



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

**Α΄ ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ
ΑΘΗΝΩΝ**

**ΜΟΝΑΔΑ ΥΠΟΒΟΗΘΟΥΜΕΝΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΓΕΝΝΗΤΙΚΗΣ
ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΗ ΚΑΙ ΑΝΑΓΕΝΝΗΤΙΚΗ ΙΑΤΡΙΚΗ

Διπλωματική εργασία

**«Μελέτη πολυμορφισμών του γονιδίου ANRIL σε γυναίκες που
ακολουθούν πρωτόκολλα εξωσωματικής γονιμοποίησης»**

ΕΛΕΥΘΕΡΙΑΔΟΥ ΜΑΡΙΑ

ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2021

Διπλωματική εργασία

«Μελέτη πολυμορφισμών του γονιδίου ANRIL σε γυναίκες που ακολουθούν πρωτόκολλα εξωσωματικής γονιμοποίησης»

ΕΛΕΥΘΕΡΙΑΔΟΥ ΜΑΡΙΑ

ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Δρακάκης Πέτρος

Καθηγητής Μαιευτικής και Γυναικολογίας, Ιατρικής Σχολής, Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών Διευθυντής Γ' Μαιευτικής και Γυναικολογικής Κλινικής Π.Γ.Ν ΑΤΤΙΚΟΝ

Ντόμαλη Αικατερίνη

Επίκουρη Καθηγήτρια Μαιευτικής και Γυναικολογίας, Ιατρικής Σχολής, Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών Α' Μαιευτικής και Γυναικολογικής Κλινικής Γ.Ν.Α. ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ

Μαυρογιάννη Δέσποινα

Δρ. Μοριακής Βιολογίας – Ε.ΔΙ.Π Ιατρικής Σχολής ,
Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών Α' Μαιευτικής και Γυναικολογικής Κλινικής Γ.Ν.Α. ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα ερευνητική εργασία πραγματοποιήθηκε χάρη στη σημαντική βοήθεια πολλών και αξιόλογων ανθρώπων που συμμετείχαν σε όλα τα στάδια της εκπόνησής της. Αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω θερμά την καθηγήτρια μου Μαυρογιάννη Δέσποινα, η οποία λειτούργησε ως καθοδηγητής στη δύσκολη διαδρομή της έρευνας και συγγραφής της διπλωματικής μου διατριβής. Υπήρξε για εμένα το πιο αξιόλογο και ικανό άτομο που με δίδαξε Μοριακή Βιολογία, προσφέροντάς μου απλόχερα τις γνώσεις της, σεβόμενη τους προσωπικούς μου ρυθμούς και δείχνοντας εμπιστοσύνη και υπομονή σε κάθε μου δυσκολία κατά την διάρκεια των σπουδών μου και της διπλωματικής μου εργασίας.

Επιθυμώ επίσης, να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στους καθηγητές Λουτράδη Δημήτριο και Δρακάκη Πέτρο, που μου έδωσαν τη δυνατότητα να παρακολουθήσω το μεταπτυχιακό πρόγραμμα σπουδών «Αναπαραγωγική και Αναγεννητική Ιατρική» και το οποίο μου χάρισε την ευκαιρία να γνωρίσω καλύτερα το χώρο αυτόν, φέροντάς με σε επαφή με αξιόλογους συνάδελφους επιστήμονες τόσο σε επαγγελματικό, όσο και σε προσωπικό επίπεδο.

Από τις ευχαριστίες μου δεν θα μπορούσε να λείπει η αγαπημένη μου οικογένεια. Θα ήθελα λοιπόν να εκφράσω τις εγκάρδιες ευχαριστίες μου στους γονείς μου, Κυριάκο και Σοφία για την αμέριστη συμπαράστασή τους καθ' όλη τη διάρκεια της εκπαιδευτικής μου διαδρομής της οποίας το επιστέγασμα αποτελεί η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή καθώς και τα αδέρφια μου Γιάννη, Άννα και Τάσο.

Τέλος, αλλά όχι τελευταίο, θα ήθελα να ευχαριστήσω ξεχωριστά τον σύζυγό μου Σωκράτη για την πολύτιμη βοήθειά του, την συμπαράσταση και την απόλυτη εμπιστοσύνη του όλα αυτά τα χρόνια που είμαστε μαζί, με αποτέλεσμα να εξελισσόμαστε παράλληλα ο ένας μέσω του άλλου. Αφιερώνω την παρούσα διατριβή στην αγαπημένη μου κόρη Σοφία, που για εκείνη πλέον κοιτώ μόνο μπροστά και αντιμετωπίζω τη ζωή με όλες τις δυσκολίες που μπορεί να έχει...

*«Σε όλα εκείνα τα πρόσωπα
που με στήριξαν και πίστεψαν σε μένα...
και σε όλους εκείνους που πιστεύουν ότι
η επιστήμη είναι η γνώση των λίγων
στην υπηρεσία των πολλών...».*

Για την κόρη μου Σοφία...

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	8
ABSTRACT	9
1. Η ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΤΗΣ ΓΥΝΑΙΚΑΣ	11
1.1 ΑΝΑΤΟΜΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΩΟΘΗΚΩΝ	11
1.2 ΩΟΓΕΝΕΣΗ & ΩΡΙΜΑΝΣΗ ΩΑΡΙΟΥ	13
1.3 ΩΟΘΥΛΑΚΙΟ & ΩΟΘΥΛΑΚΙΟΓΕΝΕΣΗ	16
1.4 ΚΟΚΚΩΔΗ ΚΥΤΤΑΡΑ.....	21
2. ΓΥΝΑΙΚΕΙΑ ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑ	24
2.1 ΟΡΓΑΝΙΚΕΣ ΑΝΑΤΟΜΙΚΕΣ ΠΑΘΗΣΕΙΣ	26
2.1.2 ΣΑΛΠΙΓΓΙΚΑ ΑΙΤΙΑ	28
2.1.3 ΑΙΤΙΑ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΗ ΜΗΤΡΑ.....	28
2.1.4 ΤΡΑΧΗΛΙΚΑ ΑΙΤΙΑ	30
2.1.5 ΚΟΛΠΙΚΑ ΑΙΤΙΑ	31
2.2 ΕΝΔΟΚΡΙΝΟΛΟΓΙΚΑ ΑΙΤΙΑ.....	31
2.3 ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΚΑΙ ΓΟΝΙΔΙΑΚΑ ΑΙΤΙΑ	35
3. ΕΞΩΣΩΜΑΤΙΚΗ ΓΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ	37
3.1 ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΑ ΔΙΕΓΕΡΣΗΣ ΩΟΘΗΚΩΝ	38
3.1.1 ΠΡΟΚΛΗΣΗ ΩΟΘΥΛΑΚΙΟΡΡΗΞΙΑΣ ΜΕ ΚΙΤΡΙΚΗ ΚΛΟΜΙΦΑΙΝΗ	38
3.1.2 ΠΡΟΚΛΗΣΗ ΩΟΘΥΛΑΚΙΟΡΡΗΞΙΑΣ ΜΕ ΓΟΝΑΔΟΤΡΟΠΙΝΕΣ.....	39
3.1.3 ΠΡΟΚΛΗΣΗ ΩΟΘΥΛΑΚΙΟΡΡΗΞΙΑΣ ΜΕ GNRH ΑΝΑΛΟΓΑ.....	41
3.2 ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΑ ΕΞΩΣΩΜΑΤΙΚΗΣ ΓΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗΣ	42
3.2.1 ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΜΕ GNRH ΑΓΩΝΙΣΤΗ- ΜΑΚΡΥ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ	42
3.2.2 ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΜΕ GNRH ΑΓΩΝΙΣΤΗ- ΒΡΑΧΥ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ	43
3.2.3 ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΜΕ GNRH ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΗ.....	44
3.2.4 ΦΥΣΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ (NC-IVF)	45

3.2.5 ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΟΣ ΦΥΣΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ -IVF (MNC-IVF).....	46
3.3 ΩΘΗΚΙΚΗ ΑΠΑΝΤΗΣΗ	47
3.3.1 ΚΑΛΕΣ ΑΠΑΝΤΗΤΡΙΕΣ (GOOD RESPONDERS).....	47
3.3.2 ΠΤΩΧΕΣ ΑΠΑΝΤΗΤΡΙΕΣ (POOR RESPONDERS).....	47
4. ΟΙ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΣΤΗ ΓΥΝΑΙΚΕΙΑ ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑ	48
5. ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ ANRIL.....	50
5.1 Ο ΤΟΠΟΣ CDKN2A/B	53
5.2 Η ΕΞΕΛΙΚΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ANRIL	54
5.3 ΙΣΟΜΟΡΦΕΣ ΤΟΥ ANRIL ΚΑΙ ΔΟΜΗ	55
5.4 ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΗΣ ΜΟΡΦΗ	56
5.5 ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΑΦΘΟΝΙΑΣ ΤΩΝ ΜΕΤΑΓΡΑΦΩΝ ΤΟΥ ANRIL.....	57
5.6 ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ ΤΟΥ ΥΠΟΚΙΝΗΤΗ ΤΟΥ ANRIL.....	58
5.7 ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΤΟΥ ANRIL ΜΕΣΩ ΤΩΝ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ	59
5.8 Η ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ ΜΑΤΙΣΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ANRIL.....	60
5.9 Η ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΦΘΟΝΙΑ ΤΩΝ miRNAs	61
5.10 Η ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ANRIL ΣΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ.....	61
5.11 ANRIL ΚΑΙ ΠΑΧΥΣΑΡΚΙΑ/ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΙΚΗ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ.....	62
6. ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΣΤΟ ANRIL.....	63
7. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	67
7.1 ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΥΠΟ ΜΕΛΕΤΗ ΚΑΙ ΔΕΙΓΜΑΤΑ.....	67
7.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ/ DNA EXTRACTION	67
7.3 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)	71
7.4 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ DNA ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ.....	79
8. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	81
8.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗΣ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟ RS4977574	81

8.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗΣ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟ RS10757278	83
8.3 ΣΥΝΔΥΑΣΤΙΚΑ ΓΟΝΟΤΥΠΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΩΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ RS4977574 ΚΑΙ RS10757278.....	85
ΠΙΝΑΚΑΣ ΙΙΙ.....	85
8.4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ POOR AND GOOD RESPONDERS	86
9. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	88
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	94

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

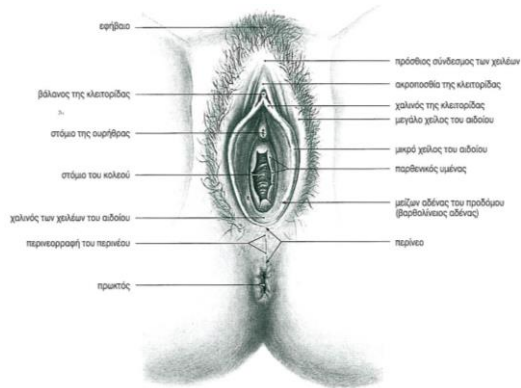
Οι πολυμορφισμοί είναι ευρέως γνωστοί ως επιγενετικές μεταλλάξεις του γονιδιώματος και ευθύνονται για τη μοναδικότητα και την ποικιλομορφία των ειδών. Σε αυτούς συγκαταλέγονται και οι πολυμορφισμοί μονών νουκλεοτιδίων (SNP's) που είναι μεταλλάξεις μίας μόνο βάσης και έχουν κατηγορηθεί ως επί το πλείστον για γονιδιακές παθήσεις μέσω των μονοπατίων μεθυλίωσης και των γονιδιακών αποσιωπήσεων. Στη παρούσα διατριβή θα μιλήσουμε για τους πολυμορφισμούς που υφίστανται σε μια ανεξερεύνητη, όσον αφορά την γονιμότητα, περιοχή του χρωμοσώματος 9 που κωδικοποιεί ένα μακρύ και μή κωδικοποιητικό RNA, το ANRIL το οποίο έχει βρεθεί ότι εκφράζεται ασυνήθιστα και παίζει σημαντικό ρόλο σε αρκετές παθήσεις συμπεριλαμβανομένης και της ενδομητρίωσης. Στόχος μας είναι να μελετήσουμε οποιαδήποτε συσχέτιση μπορεί να προκύψει μεταξύ των πολυμορφισμών αυτών, της γυναικείας υπογονιμότητας και την απάντησή τους στα πρωτόκολλα εξωσωματικής γονιμοποίησης.

ABSTRACT

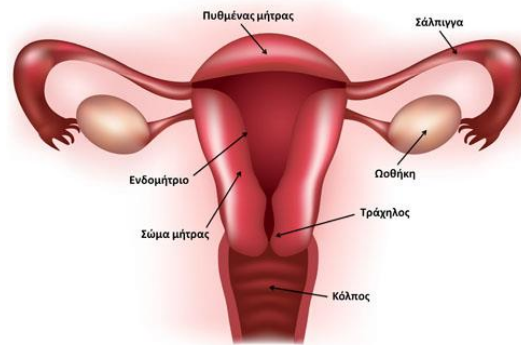
Polymorphisms are widely known as epigenetic mutations in the genome and are responsible for the uniqueness and diversity of species. These include single nucleotide polymorphisms (SNPs), which are single-base mutations and have been blamed mostly for genetic diseases through methylation pathways and gene silencing. In this study we will discuss about the polymorphisms that reside in an unexplored, in terms of fertility, region of chromosome 9 and encode a long non-coding RNA, named ANRIL which has been found to be abnormally expressed and plays an important role in several diseases including endometriosis. Our goal is to study any association that may occur between these polymorphisms, female infertility and their response to in vitro fertilization protocols.

I. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Η ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΤΗΣ ΓΥΝΑΙΚΑΣ



Εικόνα 1: Εξωτερικά γεννητικά όργανα θήλεως



Εικόνα 2: Εσωτερικά γεννητικά όργανα θήλεως

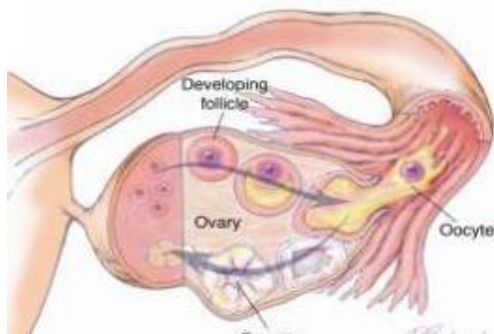
Το γεννητικό σύστημα της γυναίκας αποτελείται από τα εξωτερικά και τα εσωτερικά όργανα. Το σύνολο των έξω γεννητικών οργάνων ονομάζεται αιδούο και περιλαμβάνει τα μεγάλα και τα μικρά χείλη, την κλειτορίδα, τον πρόδρομο του κόλπου, τους βολβούς του προδρόμου, τους αδένες του προδρόμου και το εφηβαίο ή όρος της Αφροδίτης (Εικόνα 1). Τα εσωτερικά γεννητικά όργανα βρίσκονται μέσα στην ελάσσονα πύελο και αποτελούνται από τις δύο ωοθήκες, την μήτρα, τις σάλπιγγες και τον κόλπο (Εικόνα 2).

1.1 ΑΝΑΤΟΜΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΩΟΘΗΚΩΝ

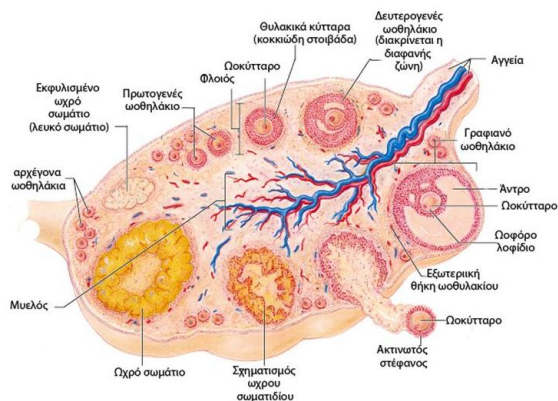
Οι ωοθήκες έχουν ωοειδές σχήμα και βρίσκονται δεξιά και αριστερά της μήτρας, στην άκρη των σαλπίγγων. Έχουν μήκος από 2 έως 5 εκατοστά, πλάτος 1,5 έως 3 εκατοστά και πάχος 0,5 έως 1,5 εκατοστό. Το βάρος τους είναι περίπου 10-20 γραμμάρια. Κατά βάση, κρέμονται εκατέρωθεν της μήτρας και ενώνονται με αυτή και με τις σάλπιγγες.

Οι ρόλοι τους είναι οι εξής:

- ✚ η παραγωγή και απελευθέρωση ωαρίων κατά τη διάρκεια της αναπαραγωγικής ηλικίας της γυναίκας.
- ✚ η παραγωγή ορμονών -ιστρογόνων και προγεστερόνης- οι οποίες έχουν θεμελιώδη ρόλο για την ομαλή λειτουργία του γυναικείου αναπαραγωγικού συστήματος και την εμφάνιση της εμμήνου ρήσεως.



Εικόνα 3: Επαφή σάλπιγγας-ωοθήκης



Εικόνα 4: Ανατομικά στοιχεία ωοθήκης & ωοθυλακιογένεση

Οι ωοθήκες διακρίνονται από τον σαλπιγγικό πόλο, που έρχεται σε επαφή με τον κώδωνα και τους κροσσούς της αντίστοιχης σάλπιγγας και τον μητρικό πόλο που συνδέεται με το κέρασ της μήτρας με τον ίδιο σύνδεσμο της ωοθήκης (Εικόνα 3). Η στήριξη της ωοθήκης επιτελείται από τον κρεμαστήρα και τον ίδιο σύνδεσμο αυτής.

Ανατομικά, αποτελούνται από τα έξω προς τα μέσα από τα εξής:

- ✚ το **βλαστικό επιθήλιο**, το οποίο αποτελείται από ένα στρώμα πλακόστρωτων κυττάρων και καλύπτει την επιφάνεια τους,
- ✚ την **φλοιώδη μοίρα**, μία λεπτή ζώνη συνδετικού ιστού στην οποία βρίσκονται τα ωοθυλάκια όλων των σταδίων ανάπτυξης τους και
- ✚ τη **μυελώδη μοίρα**, που περιέχει αιμοφόρα και λεμφικά αγγεία, συνδετικό ιστό, νεύρα καθώς και εμβρυικά υπολείμματα, στο κέντρο της ωοθήκης.

Η αιμάτωσή των ωοθηκών γίνεται από τις ωοθηκικές αρτηρίες και η νεύρωση τους από το ωοθηκικό συμπαθητικό πλέγμα.

1.2 ΩΟΓΕΝΕΣΗ & ΩΡΙΜΑΝΣΗ ΩΑΡΙΟΥ

Η ωογένεση, η οποία στη γυναίκα αρχίζει από την ενδομήτριο ζωή, είναι η βιολογική διεργασία παραγωγής και ωρίμανσης των ωοκυττάρων, η οποία λαμβάνει χώρα στις ωοθήκες. Αποτελεί ουσιαστικά την διαδικασία κατά την οποία το ανώριμο ωογόνο μετατρέπεται σε ώριμο δευτερογενές ωοκύτταρο ή ωάριο.

Το δευτερογενές ωοκύτταρο ή ωάριο είναι το μοναδικό κύτταρο του ανθρώπινου οργανισμού το οποίο μετά τη γονιμοποίηση μπορεί να αναπτυχθεί ως νέα, αυτοτελής μονάδα. Είναι ορατό με γυμνό μάτι, έχει διάμετρο περίπου 0,1 mm και είναι το μεγαλύτερο κύτταρο του ανθρώπινου οργανισμού (Εικόνα 5).



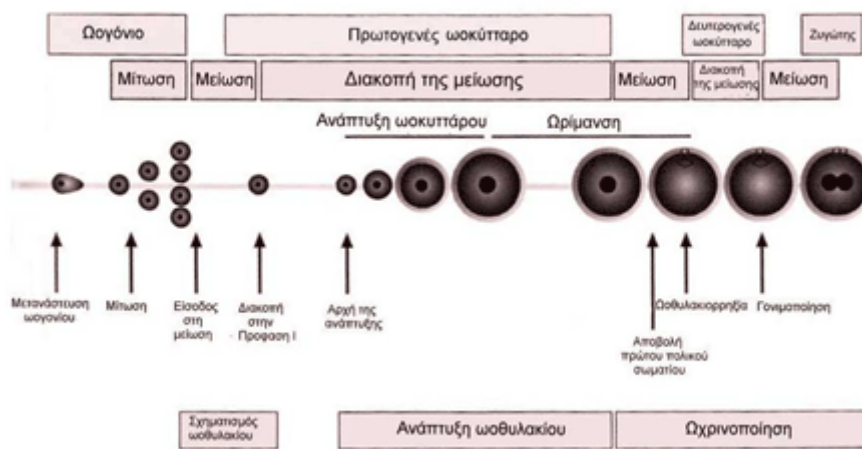
Εικόνα 5: Ανθρώπινα ωάρια κατά την ωοληψία (στερεοσκοπικό μικροσκόπιο).

Το αρχικό στάδιο του ωαρίου είναι το αρχέγονο γεννητικό κύτταρο. Κατά τη διάρκεια της 5ης εβδομάδας της εμβρυϊκής ζωής τα αρχέγονα γεννητικά κύτταρα (~ 1.000-2.000) μεταναστεύουν από το τοίχωμα του λεκιθικού ασκού στην αρχέγονη αμφιδύναμη γονάδα (γεννητική ακρολοφία). Η γοναδική περιοχή διαφοροποιείται σε όρχι επί παρουσίας Υ χρωμοσώματος, διαφορετικά εξελίσσεται σε ωοθήκη. Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης της ωοθήκης τα αρχέγονα γεννητικά κύτταρα, που ονομάζονται πλέον **ωογόνια** (Baker and Franchi 1967; Motta et al. 1997), πολλαπλασιάζονται γρήγορα με μιτωτικές διαιρέσεις, ενώ αρχίζει και η διεργασία της πρώτης μειωτικής διαίρεσης.

Οι ωοθήκες του θήλεος κατά τη γέννηση φέρουν περίπου 1-2 εκατομμύρια ωάρια, τα οποία δεν υφίστανται καμία περαιτέρω μεταβολή. Καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής της γυναίκας, ομάδες αρχέγονων ωοθυλακίων, με τη μορφή

συνεχούς ροής, εμφανίζουν τάση για περαιτέρω ανάπτυξη. Στην αρχή της εφηβείας, καταλήγουν 400.000 ωοθυλάκια και στις δύο ωοθήκες, με τα υπόλοιπα να αποπίπτουν μέσω της διαδικασίας της ατρησίας.

Τα αρχέγονα ωοθυλάκια αναπτύσσονται σε διάφορες φάσεις της ζωής της γυναίκας, όπως στην κύηση, στη γαλουχία, σε ανωοθυλακιορρηκτικούς κύκλους και στην περιεμμηνόπαυση (Peters et al, 1969). Από αυτή τη δεξαμενή των ωοθυλακίων, ένας αριθμός περίπου 400 ωοθυλακίων προορίζονται για ωοθυλακιορρηξία κατά τη διάρκεια της αναπαραγωγικής ζωής της γυναίκας.



Εικόνα 6: Σχηματική παράσταση της ανάπτυξης και ωρίμανσης του ωοκυττάρου

Συνοπτικά, η διεργασία της μείωσης αρχίζει περίπου την 8η εβδομάδα της ενδομήτριας ζωής και διακόπτεται στο στάδιο της διπλοταινίας (δηλαδή την πρόφαση της πρώτης μειωτικής διαίρεσης), κατά το οποίο τα διπλά χρωμοσώματα έχουν διαταχθεί κατά ζεύγη. Στο στάδιο αυτό τα ωοκύτταρα πλέον καλούνται πρωτογενή ωοκύτταρα. Κατά τη διάρκεια του σχηματισμού του, το πρωτογενές ωοκύτταρο περιβάλλεται από ένα στρώμα επίπεδων θυλακικών κυττάρων της ωοθήκης και ο σχηματισμός αυτός ονομάζεται πρωτογενές ωοθυλάκιο. Το πρωτογενές ωοκύτταρο παραμένει αδρανές σε αυτό το στάδιο τουλάχιστον μέχρι την εφηβεία, αλλά ακόμη και για 40 χρόνια αργότερα. Η μειωτική διαίρεση ολοκληρώνεται ακριβώς πριν την ωοθυλακιορρηξία, ως αποτέλεσμα της αύξησης των επιπέδων της LH

(ωχρινοτρόπος ορμόνη) και έτσι προκύπτει το δευτερογενές ωοκύτταρο ή **ωάριο** (Εικόνα 6).

Αναλυτικότερα, στην πρώτη μειωτική διαίρεσή του πριν την ωοθυλακιορρηξία, το κυτταρόπλασμα του πρωτογενούς ωοκυττάρου διαιρείται άνισα. Πριν το τελικό στάδιο ωριμότητας που αντιστοιχεί στην πρόφαση της πρώτης μειωτικής διαίρεσης, το ωοκύτταρο είναι ένα μεγάλο σφαιρικό κύτταρο με έναν μεγάλο πυρήνα, ο οποίος ονομάζεται βλαστικό κυστίδιο το οποίο και εξαφανίζεται όταν θα χρειαστεί να ολοκληρωθεί η μειωτική διαίρεση.

Κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης τα ζεύγη των ομολόγων χρωμοσωμάτων κατανέμονται στα δύο νέα κύτταρα, τα οποία όμως είναι άνισα σε μέγεθος. Το μεγάλο κύτταρο είναι το δευτερογενές ωοκύτταρο ή ωάριο, που παραλαμβάνει σχεδόν ολόκληρο το κυτταρόπλασμα και δεν αναπτύσσεται περαιτέρω, εκτός αν γονιμοποιηθεί και το μικρό κύτταρο ονομάζεται πρώτο πολικό σωματίο, το οποίο περιέχει ελάχιστο κυτταρόπλασμα και τον μισό αριθμό ομολόγων χρωμοσωμάτων.

Πριν το τελικό στάδιο ωριμότητας που αντιστοιχεί στην πρόφαση της πρώτης μειωτικής διαίρεσης, το ωοκύτταρο είναι ένα μεγάλο σφαιρικό κύτταρο με έναν μεγάλο πυρήνα που καλείται **βλαστικό κυστίδιο**.

Το ωοκύτταρο περιβάλλεται από τη διαφανή ζώνη και η διαφανής ζώνη περιβάλλεται από τα κοκκώδη κύτταρα τα οποία διατάσσονται ακτινωτά γύρω του και δημιουργούν έτσι τον

ακτινωτό στέφανο (Εικόνα 7).



Εικόνα 7: Πλήρως ώριμο ωάριο στη μετάφαση II της πρώτης μειωτικής διαίρεσης

1.3 ΩΟΘΥΛΑΚΙΟ & ΩΟΘΥΛΑΚΙΟΓΕΝΕΣΗ

Η ωοθυλακιογένεση σε γενικές γραμμές περιλαμβάνει τρία στάδια:

Στρατολόγηση

Χαρακτηρίζεται από την έναρξη της ωρίμανσης των αρχέγονων ωοθυλακίων. Τα αρχέγονα ωοθυλάκια εντοπίζονται στο φλοιό της ωοθήκης όπου σχηματίζουν παχύ στρώμα, το οποίο αποτελεί τη δεξαμενή των ωοθυλακίων από την οποία ξεκινούν καθημερινά κάποια τη διαδικασία της ωρίμανσης. Ο αριθμός των αρχέγονων ωοθυλακίων που μπαίνουν σε φάση ωρίμανσης εξαρτάται από το συνολικό αριθμό τους και μειώνεται με την ηλικία (Faddy & Gosden, 1995).

Βασική Ωοθυλακική ανάπτυξη

Χαρακτηρίζεται από το σχηματισμό του πρωτογενούς και δευτερογενούς ωοθυλακίου.

Επιλογή και επικράτηση επικρατούντος ωοθυλακίου

Αποτελεί μια εξαιρετικά πολύπλοκη διαδικασία με τη συμμετοχή πλήθους ορμονών και άλλων παραγόντων, χωρίς όμως να έχουν εξιχνιαστεί πλήρως οι μηχανισμοί που τη διέπουν.

Όπως έχει προαναφερθεί, τα ωοκύτταρα αναπτύσσονται και ωριμάζουν μέσα σε ανατομικές δομές γνωστές ως ωοθυλάκια. Η ανάπτυξη των ωοθυλακίων στην ωοθήκη εξαρτάται από αυτοκρινείς, παρακρινείς, ενδοκρινείς και άμεσης επαφής παράγοντες (Franchimont, Demoulin, & Valcke, 1988). Το αναπαραγωγικό υλικό του ωοθυλακίου συμπληρώνουν μαζί με το ωάριο, τα κοκκώδη κύτταρα (granulosa cells) όπως έχουν αναφερθεί προηγουμένως και τα κύτταρα θήκης (theca cells) τα οποία διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην έκκριση οιστρογόνων από τα κοκκώδη κύτταρα, εφοδιάζοντάς τα με ανδροστενεδιόνη.

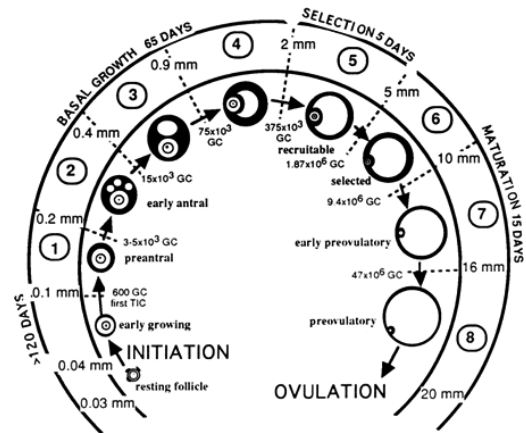
Τα ωοθυλάκια ξεκινούν την ανάπτυξή τους ως απάντηση στην αύξηση των επιπέδων της FSH, μια ορμόνη που παράγεται από την υπόφυση. Αρχίζουν την ανάπτυξή τους ως αρχέγονα ωοθυλάκια (primordial follicles) και συνεχίζουν ως πρωτογενή, δευτερογενή και τριτογενή ή γρααφιανά (Telfer & Zelinski, 2013) μέχρι την πλήρη ωρίμανση του ωαρίου και την απελευθέρωσή του από το ωοθυλάκιο, μια διαδικασία που εκτελείται ανελλιπώς και καλείται **ωοθυλακιορηξία**. Έτσι, βρίσκουμε την ωοθήκη κάθε στιγμή της ζωής της να εμπεριέχει όλα τα στάδια ανάπτυξης του ωοθυλακίου.

Πιο αναλυτικά, **το αρχέγονο ωοθυλάκιο** αποτελείται από ένα ωοκύτταρο με διπλοειδή αριθμό χρωμοσωμάτων του οποίου η μειωτική διαίρεση έχει ανασταλεί στο στάδιο της πρόφασης. Το ωοκύτταρο αυτό, περιβάλλεται από μια σειρά κοκκωδών κυττάρων και μια βασική μεμβράνη που χωρίζει το σύμπλεγμα ωαρίου-κοκκωδών κυττάρων από τον περιβάλλον ιστό. Όσα αρχέγονα ωοθυλάκια συνεχίσουν να εξελίσσονται, μετατρέπονται αρχικά σε πρωτογενή και αργότερα σε δευτερογενή ωοθυλάκια. Υπό την επίδραση ενός άγνωστου ακόμη διεγερτικού σήματος, το ωάριο αυξάνει σημαντικά σε μέγεθος και καθίσταται ικανό να συνεχίσει τη μειωτική του διαίρεση.

Το **πρωτογενές ωοθυλάκιο**, που αποτελεί εξέλιξη του αρχέγονου ωοθυλακίου, αποτελείται από: α) το αναπτυσσόμενο ωάριο, β) τη διαφανή ζώνη που περιβάλλει το ωάριο, γ) τα κοκκώδη κύτταρα και δ) τη βασική μεμβράνη που περιβάλλει τα κοκκώδη κύτταρα. Το πρωτογενές ωοθυλάκιο εν συνεχεία εξελίσσεται σε δευτερογενές ωοθυλάκιο.

Το **δευτερογενές ωοθυλάκιο**, διαφέρει από το πρωτογενές, διότι περιλαμβάνει δύο είδη κυττάρων που προέρχονται από την διαφοροποίηση των κοκκωδών κυττάρων, τα οποία είναι τα κύτταρα της κοκκώδους στοιβάδας και τα κύτταρα της έσω και της έξω θήκης. Κατά την ανάπτυξη του ωοθυλακίου στα κύτταρα της θήκης που διαφοροποιούνται σε επιθηλιακά, εμφανίζονται υποδοχείς της LH, ενώ στα κύτταρα της κοκκώδους στοιβάδας εμφανίζονται υποδοχείς της FSH. Κατά τη διάρκεια της περαιτέρω ανάπτυξης δημιουργούνται μικρές κοιλότητες μεταξύ των κοκκιωδών κυττάρων που ενώνονται μεταξύ τους σε μία ενιαία κοιλότητα γεμάτη υγρό, η οποία καλείται **άντρο**.

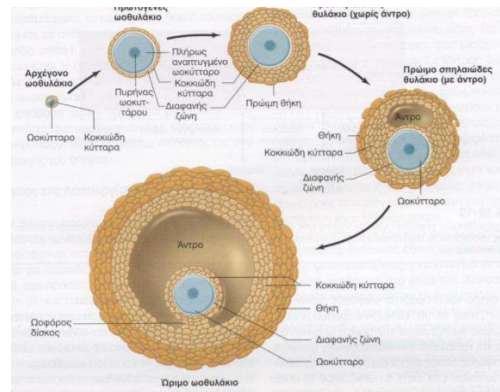
Τα στάδια της ανάπτυξης του ωοθυλακίου από αυτό το σημείο και μετά απαιτούν ένα σχετικά μεγάλο χρονικό διάστημα. Το διάστημα αυτό χωρίζεται σε οκτώ φάσεις (τρεις γεννητικούς κύκλους), από το στάδιο του ωοθυλακίου χωρίς άντρο μέχρι το προωορρηκτικό ωοθυλάκιο. Ανάλογα με το κατά πόσο στο δευτερογενές ωοθυλάκιο έχει σχηματιστεί η κοιλότητα (άντρον) ή όχι, αυτό διακρίνεται σε προκοιλοτικό (preantral) και σε κοιλοτικό (antral).



Εικόνα 8: Τα στάδια της ανάπτυξης του ωοθυλακίου από το αρχέγονο έως το γρααφιανό κατά Gougeon et al., 1986.

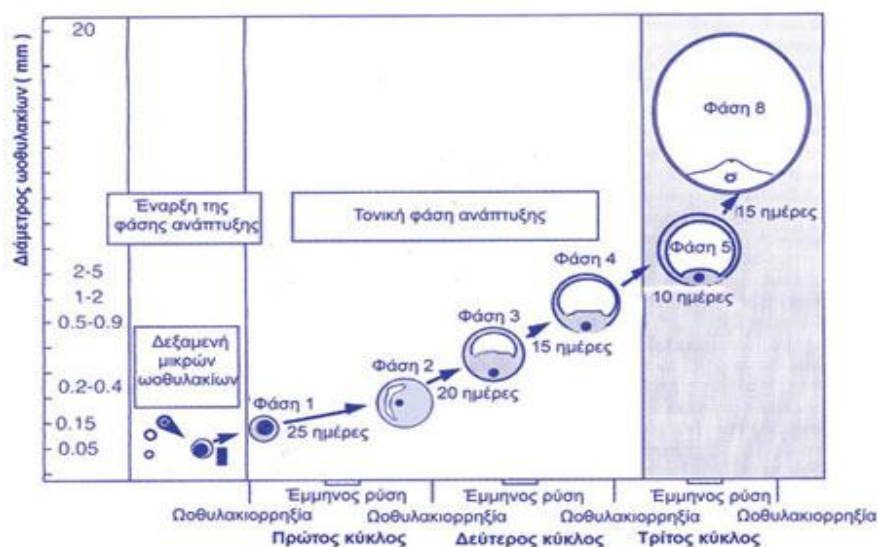
Έτσι η φάση 1 περιλαμβάνει το δευτερογενές ωοθυλάκιο χωρίς άντρο, η φάση 2 το πρώιμο ωοθυλάκιο με άντρο, η φάση 5 το ωοθυλάκιο με άντρο μεγέθους ~5mm και η φάση 8 το προωοθυλακιορρηκτικό ωοθυλάκιο (18-20mm) ενώ οι ενδιάμεσες φάσεις περιλαμβάνουν ωοθυλάκια σε ενδιάμεσο βαθμό εξέλιξης (Εικόνες 8 & 10).

Από την στιγμή λοιπόν που θα σχηματιστεί το άντρο το ωοθυλάκιο μπαίνει σε μια διαδικασία έντονης ανάπτυξης και ωρίμανσης. Το άντρο ολοένα και αυξάνεται σε μέγεθος και το ωοκύτταρο τοποθετείται έκκεντρα του ωοθυλακίου, όπου χωρίζεται από το ωοθυλακικό υγρό από τον ωοφόρο δίσκο (Εικόνα 9), ένα κάλυμμα κοκκωδών κυττάρων. Η κοιλότητα του άντρου συνεχόμενα αυξάνει σε μέγεθος και καθώς πλησιάζει η ωορρηξία, το ωάριο ολοκληρώνει την πρώτη μειωτική του διαίρεση (δευτερογενές ωοκύτταρο). Έτσι, ο ωοφόρος δίσκος αποδεσμεύεται από το τοίχωμα του ωοθυλακίου και επιτρέπει πλέον στο ωοκύτταρο να κινείται ελεύθερα εντός του υγρού του άντρου. Το ώριμο πλέον ωοθυλάκιο που καλείται **τριτογενές ή γρααφιανό** (Reinier De Graaf) είναι πλέον τόσο μεγάλο που εκπίπτει έξω από την ωοθήκη (Pavelka, Friedrich, & Caucig, 1972).



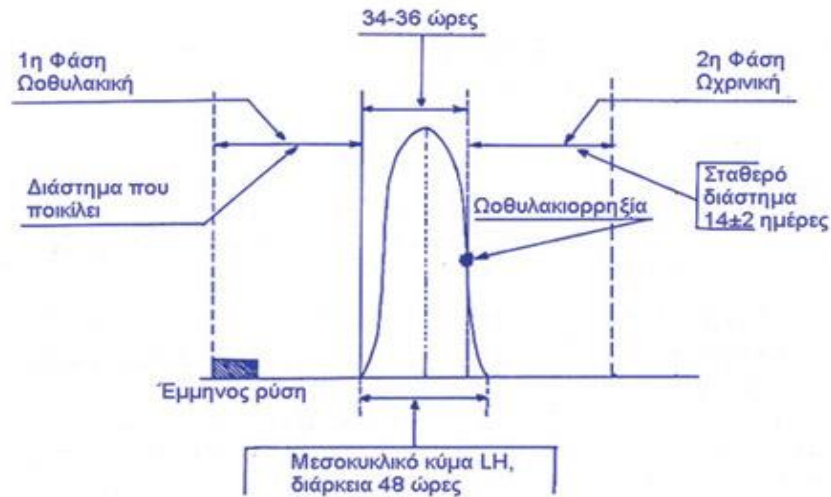
Εικόνα 9: Αναπτυξιακά στάδια ωοθυλακίου και η δημιουργία άντρου

Η ανάπτυξη του ωοθυλακίου από το προκοιλιοτικό στάδιο (φάση 1) μέχρι το μικρότερο κοιλιοτικό στάδιο (με άντρο διαμέτρου περίπου 0,15 mm, φάση 2) χρειάζεται περίπου 25 ημέρες, ενώ η ανάπτυξη μέχρι το κοιλιοτικό στάδιο των 2-5 mm (φάση 5) είναι σχετικά βραδεία και διαρκεί περίπου 70 ημέρες (Εικόνα 8).



Εικόνα 10: Διαστήματα φάσεων & γεννητικοί κύκλοι ωοθυλακιορρηξίας

Κατά τη διάρκεια της ωοθυλακικής φάσης του κύκλου της γυναίκας, η LH συνεχόμενα και σταδιακά αυξάνεται και προκαλεί αιχμή της τιμής της ως συνέπεια της θετικής παλίνδρομης αλληλορύθμισης στην αύξηση των οιστρογόνων (150-300 pg οιστραδιόλης για περίπου 50 ώρες). Στην υπόφυση, τα αυξημένα οιστρογόνα προκαλούν αύξηση των υποδοχέων της GnRH. Το **μεσοκυκλικό κύμα της LH** διαρκεί περίπου 48 ώρες και προκαλεί την ωοθυλακιορρηξία 12-14 ώρες μετά την αιχμή του, δηλαδή 34-36 ώρες μετά την έναρξη του μεσοκυκλικού κύματος, ή 36 περίπου ώρες μετά την αιχμή των οιστρογόνων (Εικόνα 11). Η LH, επιδρώντας στα κοκκώδη κύτταρα 48 ώρες πριν την αιχμή της, προκαλεί την παραγωγή προγεστερόνης.



Εικόνα 11: Το μεσοκυκλικό κύμα της LH

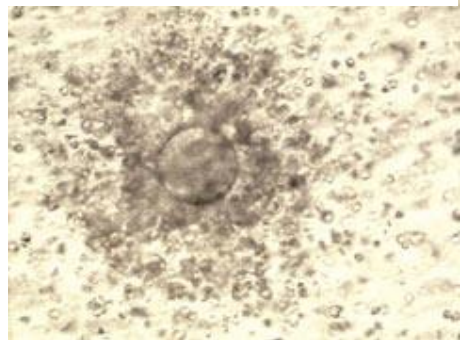
Η παραγωγή προγεστερόνης αυξάνει σημαντικά 12-24 ώρες πριν την ωοθυλακιορρηξία, αλλά τα επίπεδα των τιμών της είναι σαφώς χαμηλότερα από αυτά της ωχρινικής φάσης. Στη μέση του κύκλου σημειώνεται αιχμή των παραγόμενων ανδρογόνων λόγω της δράσης των αυξημένων επιπέδων LH στα κύτταρα της θήκης των άτρητων ωοθυλακίων, πριν αυτά μετατραπούν σε στρώμα. Επίσης, στη μέση του κύκλου παρατηρείται μικρή αύξηση της FSH η οποία πιθανότατα σχετίζεται: α) με την απόσπαση του ωαρίου από τα κοκκώδη κύτταρα και β) με την αύξηση του αριθμού υποδοχέων LH στα κοκκώδη κύτταρα, που είναι απαραίτητη για τη σωστή λειτουργία του ωχρού σωματίου μετά την ωοθυλακιορρηξία. Στη μέση του κύκλου επίσης, παρατηρείται και αύξηση των προσταγλανδινών E και F όπως και άλλων παραγόντων στο ωοθυλακικό υγρό. Όταν το ωοθυλάκιο συμπληρώσει την ανάπτυξή του, το τοίχωμά του στην επιφάνεια της ωοθήκης λεπτύνεται και ρήγνυται. Το ωάριο πλέον περιβάλλεται από πολλαπλές στοιβάδες κοκκωδών κυττάρων τα οποία και θα αναλύσουμε παρακάτω.

1.4 ΚΟΚΚΩΔΗ ΚΥΤΤΑΡΑ

Τα κοκκώδη κύτταρα αποτελούν κυρίαρχο συστατικό των ωοθυλακίων, ενώ αποτελούν την πηγή για την έκκριση στεροειδών ορμονών (οιστραδιόλης & προγεστερόνης). Τα κοκκώδη κύτταρα αναπτύσσουν στενές σχέσεις με το ωοκύτταρο με διπλή λειτουργία. Αφενός το εφοδιάζουν με τα απαραίτητα συστατικά για την ανάπτυξη του και αφετέρου απομακρύνουν τα άχρηστα παραπροϊόντα.

Τα προωοθυλακιορρηκτικά ωοθυλάκια αποτελούνται από τέσσερις ομάδες κοκκωδών κυττάρων (Εικόνα 13):

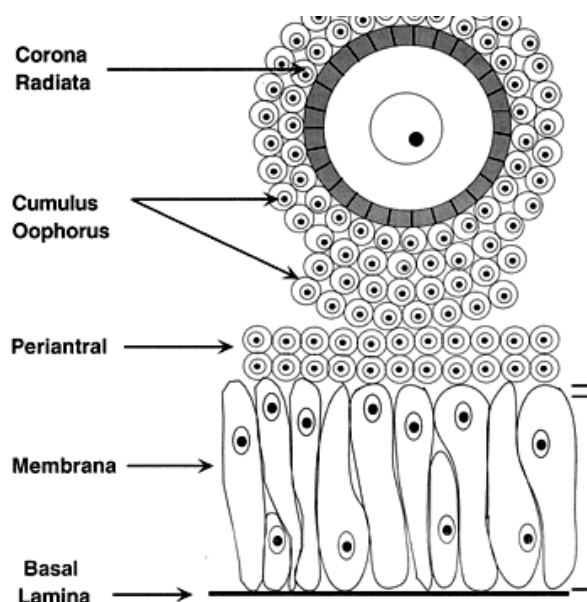
- ✚ Τα *μεμβρανικά κοκκώδη κύτταρα* (mural granulosa cells), που αποτελούν το εξωτερικό στρώμα του ωοθυλακίου.
- ✚ Τα *εσωτερικά κοκκώδη κύτταρα* (periantral), που βρίσκονται περιμετρικά του ωοθυλακίου.
- ✚ Τα *κοκκώδη κύτταρα του ωοφόρου δίσκου* (cumulus granulosa cells).
- ✚ Τα *κοκκώδη κύτταρα του ακτινωτού στεφάνου* (corona radiata cells), που βρίσκονται σε άμεση επαφή με το ωοκύτταρο (Εικόνα 12).



Εικόνα 12: Ωοκύτταρο που περιβάλλεται από κοκκώδη κύτταρα.

Και τα τέσσερα στρώματα είναι λειτουργικά ετερογενή, εκκρίνουν διαφορετικά μόρια και εκφράζουν διάφορους τύπους ορμονικών υποδοχέων (Nguyen et al, 2012).

Τα εσωτερικά κοκκώδη κύτταρα (όπως και όλα τα κύτταρα του οργανισμού μας) επικοινωνούν μεταξύ τους, αλλά και με το ωάριο με διακυτταρικές συνδέσεις και με χασμοδεσμούς (gap junctions) που εξασφαλίζουν την ανταλλαγή γλυκόζης και πυρουβικού για την παραγωγή ενέργειας. Μεταξύ των στοιχείων που μεταφέρονται είναι ιόντα, μεταβολίτες, αμινοξέα και μικρά ρυθμιστικά μόρια τα οποία είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη του ωοκυττάρου (Valdimarsson, De Sousa, & Kidder, 1993). Αυτή η επαφή έχει σαν αποτέλεσμα να εκτίθενται και στους μιτογόνους παράγοντες του ωαρίου με το οποίο βρίσκονται σε επαφή. Οι παράγοντες που καθορίζουν τα χαρακτηριστικά των κυττάρων όπως τη διαφοροποίηση, τη μεταγραφή και την πρωτεϊνοσύνθεση είναι κατά κύριο λόγο οι παράγοντες της οικογένειας Tgfb (Erickson and Shimasaki, 2000). Αξίζει να σημειωθεί σε αυτό το σημείο, ότι αρκετές μελέτες έχουν συσχετίσει την επιτυχία της εμφύτευσης με το ποσοστό διαφοροποίησης των κυττάρων αυτών (Gregory, 1998). Επαγωγικά λοιπόν, η επικοινωνία αυτή είναι καθοριστική και για τη γονιμότητα της εκάστοτε γυναίκας (Simon, Goodenough, Li, & Paul, 1997).



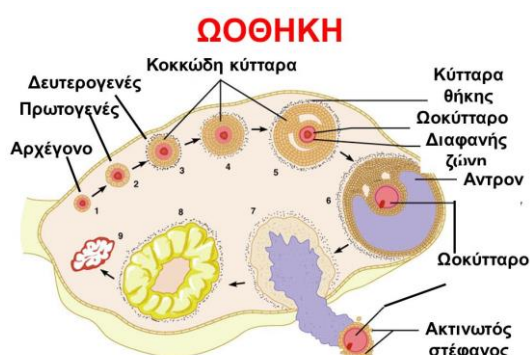
Εικόνα 13: Είδη κοκκωδών κυττάρων ανάλογα με τη θέση τους στο ωοθυλάκιο.

Συνεπώς, με την ρήξη του ωοθυλακίου και την απελευθέρωση του ωαρίου (Εικόνα 14) τα κοκκώδη κύτταρα χωρίζονται σε δύο είδη:

- ✚ Τα κοκκώδη κύτταρα του ακτινωτού στεφάνου (Εικόνα 12) τα οποία συνοδεύουν το ωάριο έξω από το ωοθυλάκιο και
- ✚ Τα κοκκώδη κύτταρα που παραμένουν στο ωοθυλάκιο (εξωτερικά κοκκώδη κύτταρα) τα οποία κατά την επερχόμενη ωχρινοποίηση συμμετέχουν ενεργά στο σχηματισμό και τη λειτουργία του **ωχρού σωματίου**.

Τα εξωτερικά κοκκώδη, πριν ακόμα κιάλας γίνει η ωοθυλακιορρηξία, δεν εμφανίζουν καμία δραστηριότητα μέχρις ότου το ωάριο να συμπληρώσει την ανάπτυξή του και να περιβληθεί από τη διαφανή ζώνη. Μόνο τότε τα κοκκώδη κύτταρα μετατρέπονται από πλακώδη σε τυπικά κυβοειδή επιθηλιακά κύτταρα και εκεί γι' αυτά ξεκινά το μονοπάτι των κυτταρικών διαφοροποιήσεων. Κατά συνέπεια λοιπόν, φτάνοντας στην ωχρινοποίηση, και εκφράζοντας τα ένζυμα της ωχρινικής τους φάσης, υφίστανται την τελική τους διαφοροποίηση και σταματούν να διαιρούνται.

Συμπερασματικά λοιπόν διαφαίνεται, ότι ο ρόλος τους για την σωστή ανάπτυξη του ωοθυλακίου είναι ιδιαίτερα κρίσιμος και αποτελούν έναν βασικό «δείκτη» για την ευημερία του ωοθυλακίου και την κατά συνέπεια ποιότητα του ωαρίου.



Εικόνα 14: Πορεία διαφοροποίησης κοκκωδών κυττάρων

2. ΓΥΝΑΙΚΕΙΑ ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑ

Η ανάγκη για τεκνοποίηση και ταυτόχρονα η απογοήτευση της αδυναμίας της, αποτελούσαν και αποτελούν σημαντικότατο κομμάτι της ζωής από τα πρώτα κίβλα βήματα της ανθρωπότητας.

Για το λόγο αυτό, ιστορίες τεκνοποίησης αναφέρονται τόσο σε θρησκευτικές περιγραφές, όσο και σε μύθους και θρύλους καθώς και στη λογοτεχνία και την τέχνη γενικότερα. Η ανάγκη για τεκνοποίηση προκύπτει είτε λόγω απλής βιολογικής παρόρμησης, είτε λόγω κοινωνικής αναγκαιότητας ή ψυχολογικής ανάγκης και γι' αυτούς τους λόγους η επίτευξή της είναι ιδιαίτερα σημαντική, ενώ πολλές φορές αποτελεί σοβαρό εμπόδιο στην ευημερία του κάθε ζευγαριού. Έτσι, σε κάθε πολιτισμό, η αδυναμία τεκνοποίησης χαρακτηρίζεται ως καταστροφικό γεγονός που απειλεί την σταθερότητα οικογενειών και κοινωνιών και ωθεί άνδρες και γυναίκες στην αναζήτηση θεραπειών θρησκευτικού, κοινωνικού και ιατρικού περιεχομένου, προκειμένου να ξεπεράσουν το πρόβλημα της ατεκνίας.

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, ως "Αναπαραγωγική Υγεία" ορίζεται η κατάσταση της φυσικής, ψυχικής και κοινωνικής ευεξίας, σε όλους τους τομείς που σχετίζονται με το αναπαραγωγικό σύστημα, σε όλα τα στάδια της ζωής.

Η επιστήμη λοιπόν που την μελετά είναι η "**Αναπαραγωγική Ιατρική**" όπου με την απόλυτη συνεργασία γυναικολόγων, εμβρυολόγων, ψυχολόγων και άλλων ειδικοτήτων διασφαλίζεται η αναπαραγωγική υγεία των ανθρώπων, που λανθασμένα θεωρείται τόσο δεδομένη από το κοινωνικό σύνολο.

Ένα ζευγάρι λοιπόν, χαρακτηρίζεται ως "αναπαραγωγικά ασθενές" ή "υπογόνιμο" όταν δεν καταφέρνει να φτάσει σε κύηση μετά από ένα έτος συχνών σεξουαλικών επαφών χωρίς την χρήση αντισυλληπτικών μεθόδων. Από το σύνολο των ζευγαριών που επιθυμούν να τεκνοποιήσουν, ένα ποσοστό 25% δεν επιτυγχάνουν κύηση μετά από χρονικό διάστημα ενός έτους, 15%

αναζητούν ιατρική βοήθεια για το πρόβλημά τους και ένα ποσοστό 5% τελικά δεν κατορθώνουν να γίνουν βιολογικοί γονείς.

Εώς πριν λίγα χρόνια, όπως είναι γνωστό η ευθύνη για την υπογονιμότητα του ζευγαριού αποδιδόταν κυρίως στη γυναίκα, σήμερα όμως πια γνωρίζουμε ότι είναι πολύ συνηθισμένη η συνύπαρξη παραγόντων υπογονιμότητας και στους δύο συντρόφους. Έτσι, ο άντρας ευθύνεται αποκλειστικά σε περίπου 40% των περιπτώσεων, ενώ συμμετέχει σε άλλο ένα ποσοστό 20% μαζί με την σύντροφό του, άρα η αιτιολογική συμμετοχή του καθενός στην υπογονιμότητα του ζεύγους βλέπουμε ότι υπάρχει σε ένα ποσοστό 60%.

Η υπογονιμότητα διακρίνεται σε **πρωτοπαθή** και **δευτεροπαθή**:

- ✚ *πρωτοπαθής* υπογονιμότητα υπάρχει στην περίπτωση που δεν έχει προηγηθεί εγκυμοσύνη.
- ✚ *δευτεροπαθής* όταν έχει προηγηθεί εγκυμοσύνη.

Οι λόγοι για τους οποίους ένα ζευγάρι δεν μπορεί να τεκνοποιήσει ποικίλουν. Τα προβλήματα υπογονιμότητας μπορεί να οφείλονται σε ανατομικούς, οργανικούς ή παθολογικούς παράγοντες. Κάποια από αυτά είναι πολύ απλά και επιδέχονται την πιο απλή θεραπεία, ενώ σε άλλες περιπτώσεις καθίσταται αναγκαία η εξωσωματική γονιμοποίηση. Ωστόσο, αρκετές φορές, παρά τη σημαντική εξέλιξη της τεχνολογίας τα αίτια της υπογονιμότητας δεν εντοπίζονται.

Όσον αφορά αυτό το 60% των περιπτώσεων που αντιστοιχεί στον γυναικείο παράγοντα μπορούμε να πούμε ότι μια γυναίκα μπορεί να καταστεί υπογόνιμη λόγω:

- ✚ *Οργανικών/Ανατομικών παθήσεων*
- ✚ *Ενδοκρινολογικών αιτιών*
- ✚ *Γενετικών και γονιδιακών αιτιών*
- ✚ *Ανοσολογικών προβλημάτων*

Στην παρούσα διπλωματική εργασία θα μιλήσουμε για τους τρεις πρώτους παράγοντες της γυναικείας υπογονιμότητας, οι οποίοι φαίνεται ότι σχετίζονται περισσότερο με την έρευνα γύρω από το γονίδιο ANRIL.

2.1 ΟΡΓΑΝΙΚΕΣ| ΑΝΑΤΟΜΙΚΕΣ ΠΑΘΗΣΕΙΣ

Η κατηγορία αυτή αφορά το βασικό τρίπτυχο ωοθήκες, σάλπιγγες, μήτρα και τις παθήσεις που το αφορούν. Οι **ωοθήκες** δρώντας και ως ενδοκρινείς αδένες, συντονίζουν όλες τις απαραίτητες πρώτες ορμονικές αλλαγές για την υποστήριξη της εμφύτευσης και της εμβρυικής ανάπτυξης. Το 40% της γυναικείας υπογονιμότητας σχετίζεται με την αδυναμία αυτών.

Η ωορρηξία απαιτεί σχεδόν άριστη ορμονική ισορροπία που χαρακτηρίζεται από χαμηλές ορμόνες του στρες, επαρκή επίπεδα θυρεοειδικών ορμονών, απουσία αντίστασης στην ινσουλίνη και χαμηλά επίπεδα προλακτίνης, ορμόνης που συχνά απελευθερώνεται υπό την επήρεια του στρες. Συνεπώς, διαταραχές, απλές και μη, που καταστρέφουν την ισορροπία αυτή μπορούν να οδηγήσουν στη μη επίτευξη της ωορρηξίας και κατ'επέκταση την απώλεια ενός γόνιμου κύκλου. Η έκθεση επίσης, των γυναικών σε επιβλαβείς παράγοντες όπως οι ρύποι, το κάπνισμα ενεργό ή παθητικό, η έκθεση σε ζιζανιοκτόνα κ.α. μπορεί να επηρεάσουν την ποιότητα των ωαρίων, ενώ επίσης είναι πλέον διαπιστωμένο ότι το κάπνισμα τείνει να μετατοπίσει την εμμηνόπαυση τουλάχιστον δύο χρόνια νωρίτερα.

Σχετικά πρόσφατα, διαπιστώθηκε ότι οι ωοθηκικές εφεδρείες των γυναικών μειώνονται με την πάροδο του χρόνου. Στην προσπάθειά τους οι επιστήμονες να γυρίσουν πίσω το "ρολόι" των γυναικών ανακάλυψαν την Αντιμυλλέριο ορμόνη (antimullerian hormone – AMH). Μεγάλος αριθμός μελετών προτείνουν ότι η AMH αντανακλά σε μεγάλο βαθμό το συνολικό αριθμό των ωοθυλακίων που απομένουν στις ωοθήκες, δηλαδή είναι ένας ισχυρός δείκτης των ωοθηκικών εφεδρειών και προγνωστικός παράγοντας της απόκρισης των ωοθηκών σε επικείμενη προσπάθεια εξωσωματικής.

Συνδυαστικά με χαμηλά επίπεδα της AMH, τα αυξημένα επίπεδα της FSH δείχνουν «μειωμένες ωοθηκικές εφεδρείες» και ενδεχομένως αυξημένη βιολογική ηλικία ωοθηκών. Άλλες παθήσεις που αφορούν κυρίως τις ωοθήκες αποτελούν η πρόωρη ωοθηκική ανεπάρκεια και η πρόωμη εμμηνόπαυση.

2.1.1 ΩΟΘΗΚΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ

Ως **πρόωρη ωοθηκική ανεπάρκεια** ορίζεται η κατάσταση κατά την οποία παρουσιάζεται απώλεια της φυσιολογικής λειτουργίας των ωοθηκών πριν από την ηλικία των 40 ετών. Το αποτέλεσμα είναι η αδυναμία παραγωγής φυσιολογικής ποσότητας οιστρογόνων, η αμηνόρροια και η αύξηση στα επίπεδα των γοναδοτροπινών, με κύρια επακόλουθα την υπογονιμότητα και τον αυξημένο κίνδυνο οστεοπόρωσης και καρδιαγγειακών παθήσεων. Οι γυναίκες με πρόωρη ωοθηκική ανεπάρκεια δεν βρίσκονται σε εμμηνόπαυση και είναι δυνατό να εμφανίζουν κατά περιόδους έμμηνο ρύση για αρκετά χρόνια. Έτσι, οι γυναίκες αυτές παράγουν οιστρογόνα κατά διαστήματα και μπορεί να έχουν ωοθυλακιορρηξία ακόμα και με υψηλά επίπεδα γοναδοτροπινών, πράγμα που κάνει υπαρκτό (έστω και με ελάχιστες πιθανότητες) το ενδεχόμενο μίας αυτόματης κύησης

Η **πρόωρη εμμηνόπαυση** είναι μια κλινική κατάσταση κατά την οποία οι ωοθήκες δεν ανταποκρίνονται στη διέγερση που προκαλείται από τις ορμόνες της υπόφυσης. Συνήθως η εμμηνόπαυση συμβαίνει στην ηλικία των 50 ετών, αλλά για το 1% των γυναικών η εμμηνόπαυση ξεκινάει νωρίτερα. Για να διαγνωστεί ότι μια γυναίκα πάσχει από πρόωρη εμμηνόπαυση, θα πρέπει να μην έχει περίοδο για τουλάχιστον 1 χρόνο και οι FSH και LH να είναι αυξημένες κατά δύο φορές τουλάχιστον. Στις περισσότερες περιπτώσεις η κατάσταση δεν είναι αναστρέψιμη. Παρόλα αυτά έχουν παρατηρηθεί υφέσεις όπου η περίοδος επανέρχεται ετεροχρονισμένα. Γυναίκες με πρόωρη εμμηνόπαυση αδυνατούν να μείνουν έγκυες από μόνες τους, με πιθανή εξαίρεση εκείνες που βιώνουν μια φάση ύφεσης. Μπορούν όμως να μείνουν έγκυες με την προϋπόθεση ότι θα χρησιμοποιηθούν ωάρια από δότρια.

2.1.2 ΣΑΛΠΙΓΓΙΚΑ ΑΙΤΙΑ

Στην επαφή ωαρίου-σπερματοζωαρίου παίζει ρόλο εκτός από την διαβατότητα των σαλπίγγων και η λειτουργικότητά τους, γιατί με τις περισταλτικές κινήσεις τους και με τις κινήσεις των κροσσών του ενδοσαλπιγγίου βοηθάνε στη σύλληψη. Κατάργηση της λειτουργικότητας των σαλπίγγων ύστερα από αποδράμουςα φλεγμονή και εγκατάλειψη περισαλπιγγικών συμφύσεων ή ύστερα από πλαστικές εγχειρήσεις σε αυτές, δεν επιτρέπει τη συνάντηση σπερματοζωαρίου-ωαρίου, έστω και αν η διαβατότητά τους έχει διαπιστωθεί ως φυσιολογική με τα γνωστά διαγνωστικά μέσα. Η απόφραξη των σαλπίγγων είναι ένας παράγοντας για το 35% όλων των προβλημάτων γονιμότητας. Ο κυριότερος λόγος βλάβης των σαλπίγγων στην Ελλάδα είναι οι επανειλημμένες εκτρώσεις που προκαλούν λοιμώξεις. Ένας άλλος λόγος μπορεί να είναι η επιλογή του γνωστού μας σπινάλ ως μεθόδου αντισύλληψης. Αν οι σάλπιγγες είναι εντελώς κατεστραμμένες, επιβάλλεται η εξωσωματική γονιμοποίηση. Άλλη μια συνήθης αιτία σαλπιγγικού παράγοντα αποτελεί η οζώδης ιθμική σαλπιγγίτιδα. Χαρακτηρίζεται από εκκολπώματα, πτυχές σαν σάκους από το τοίχωμα ή το κέντρο της σάλπιγγας. Οζώδης ιθμική σαλπιγγίτιδα μπορεί να προκληθεί από φλεγμονή ή μόλυνση. Πρέπει να θεραπευτεί πριν γίνουν προσπάθειες για θεραπεία γονιμότητας. Ένας άλλος γνωστός κίνδυνος υπογονιμότητας είναι και η προηγούμενη χειρουργική επέμβαση στην πύελο. Η χειρουργική επέμβαση στην ίδια τη σάλπιγγα, ή ακόμα και σε παρακείμενο όργανο όπως η σκωληκοειδής απόφυση, μπορεί να επηρεάσει τη λεπτή ανατομία της σάλπιγγας.

2.1.3 ΑΙΤΙΑ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΗ ΜΗΤΡΑ

Ο παράγοντας της μήτρας που οδηγεί σε αδυναμία εμφύτευσης ή αποβολή συνεισφέρει κατά 5-10% στα περιστατικά υπογονιμότητας. Ανάμεσα σε αυτά είναι οι φλεγμονές, η ενδομητρίωση, οι ενδομήτριες συμφύσεις, τα ινομώματα, οι πολύποδες και οι δυσπλασίες. Όσον αφορά τις **φλεγμονές**, οι χρόνιες ενδομητρίτιδες προκαλούν υπογονιμότητα καθώς δεν επιτρέπουν την άνοδο

των σπερματοζωαρίων στη μήτρα ή γιατί εμποδίζουν την εγκατάσταση του γονιμοποιημένου ωαρίου.

Η ενδομητρίωση είναι μια πάθηση κατά την οποία κύτταρα του ενδομήτριου αναπτύσσονται σε περιοχές έξω από τη μήτρα, δηλαδή στα όργανα της κοιλιάς και της λεκάνης. Στις περιοχές αυτές αναπτύσσονται εστίες, οζίδια ή κύστεις. Η ενδομητρίωση εμφανίζεται τις περισσότερες φορές στις ωοθήκες και ονομάζεται ενδομητρίωμα ή σοκολατοειδής κύστη, πίσω από τη μήτρα, επάνω στους συνδέσμους της μήτρας, στο έντερο, την ουροδόχο κύστη, τον κόλπο, στο περιτόναιο, σπανίως σε απομακρυσμένα όργανα όπως στο διάφραγμα και τον πνεύμονα και επίσης, σπανίως στα τοιχώματα της κοιλιάς μετά από καισαρική τομή ή χειρουργείο. Το γεγονός ότι τα ενδομήτρια κύτταρα είναι υπό την επίδραση των ορμονικών αλλαγών, ανταποκρίνονται σαν να ήταν μέσα στην μήτρα προκαλώντας αιμορραγία και φλεγμονές στις περιοχές που επηρεάζονται. Η φλεγμονή η οποία επιδεινώνεται με τους διαδοχικούς κύκλους περιόδου μπορεί να προκαλέσει απόφραξη των σαλπίνγων, αλλά και συμφύσεις μεταξύ των διαφόρων οργάνων παρεμποδίζοντας την κανονική λειτουργικότητά τους. Όταν τα ενδομήτρια κύτταρα εισβάλλουν στις ωοθήκες αλλοιώνουν ποιοτικά τα ωάρια κι επομένως η ενδεχόμενη γονιμοποίησή τους έχει σαν επακόλουθο την μειωμένη ποιότητα των εμβρύων και κατά συνέπεια, χαμηλές πιθανότητες εμφύτευσης και πρόωρη απώλεια της κύησης. Είναι από τις πιο συχνές γυναικολογικές παθήσεις και παρουσιάζεται σε ποσοστό 7-8%. Η ενδομητρίωση αφορά κυρίως σε γυναίκες ηλικίας 22 με 35 ετών. Μια στις τρεις γυναίκες που έχει πρόβλημα υπογονιμότητας έχει ενδομητρίωση.

Οι ενδομήτριες συμφύσεις που προέρχονται συνήθως από τον τραυματισμό του ενδομητρίου ύστερα από απόξεσή του μετά από έκτρωση, ενδομητρίτιδα ή παλίνδρομη κύηση ή ύστερα από μαιευτική απόξεση, εκπυρήνιση υποβλεννογόνιου ινομώματος παρεμποδίζουν την άνοδο των σπερματοζωαρίων και την εγκατάσταση του γονιμοποιημένου ωαρίου.

Τα ινομώματα της μήτρας παρατηρούνται συχνά στις γυναίκες μεταξύ 30 και 40 ετών και μπορούν να προκαλέσουν προβλήματα γονιμότητας με μηχανικό τρόπο εμποδίζοντας τη διόδο του ωαρίου ή την εμφύτευσή του. Όταν

βρίσκονται κοντά στο εσωτερικό τοίχωμα της μήτρας, δημιουργούν προβλήματα στη σύλληψη.

Οι πολύποδες της μήτρας είναι καλοήθεις αναπτύξεις σε σχήμα κουνουπιδιού που αποτελούνται από ενδομητρικά κύτταρα. Είναι συνήθης πηγή μη φυσιολογικής αιμορραγίας της μήτρας, αλλά ο ρόλος τους στη γονιμότητα είναι αβέβαιος. Απεικονίζονται στην υστεροσαλπιγγογραφία ως μια διακριτή ανωμαλία πλήρωσης. Μπορούν να διαγνωστούν και με κολπικό υπερηχογράφημα και αφαιρούνται εύκολα με υστεροσκόπηση.

Οι δυσπλασίες της μήτρας: Το μερικό διάφραγμα μήτρας είναι ένα τοίχωμα που διαιρεί μερικώς τη μήτρα και σχετίζεται με τον υψηλότερο κίνδυνο αποβολής κατά το πρώτο τρίμηνο, αλλά είναι και το πρόβλημα που θεραπεύεται ευκολότερα. Αφαιρείται εύκολα με χειρουργική επέμβαση για να δημιουργηθεί ένας μεγαλύτερος χώρος στη μήτρα. Γενικότερες δυσπλασίες της μήτρας αποτελούν και η μονόκερη, η δίκερη και διδελφύς μήτρα καθώς και η απουσία της ίδιας της μήτρας.

2.1.4 ΤΡΑΧΗΛΙΚΑ ΑΙΤΙΑ

Η παθολογική τραχηλική βλέννα αποτελεί ένα παράγοντα που μπορεί να δυσκολέψει μια σύλληψη και οφείλεται σε τραχηλίτιδες, σε μόλυνση δηλαδή του τραχήλου από μικρόβια όπως χλαμύδια, μυκόπλασμα. Τα μικρόβια αυτά αλλοιώνουν την τραχηλική βλέννα και διαταράσσουν τη σχέση της με τα σπερματοζωάρια, καθιστώντας τη βλέννα αφιλόξενη σε αυτά. Ένας άλλος παράγοντας είναι και η στένωση επίσης του τραχήλου που μπορεί να είναι συγγενής και να συνοδεύεται από υποπλαστική μήτρα ή επίκτητη, ως αποτέλεσμα άτεχνων επεμβάσεων, καυτηριάσεων ή φλεγμονών που έχουν αντιμετωπιστεί.

2.1.5 ΚΟΛΠΙΚΑ ΑΙΤΙΑ

Οι φλεγμονές του κόλπου είναι δυνατό να προκαλέσουν υπογονιμότητα εφόσον αλλάξουν το φυσιολογικό του περιβάλλον και το περιβάλλον της τραχηλικής βλέννας, περιορίζοντας κατ' αυτό τον τρόπο την κινητικότητα των σπερματοζωαρίων. Δεν έχουν όμως την ίδια συχνότητα με άλλες πιο σοβαρές παθήσεις, όπως τα σεξουαλικά μεταδιδόμενα νοσήματα που προκαλούν ελάχιστη δυσφορία ή συμπτώματα και αποτελούν μια από τις πιο συχνές αιτίες υπογονιμότητας. Λοιμώξεις από γονόρροια (*Neisseria gonorrhoeae*) ή χλαμύδια (*Chlamydia trachomatis*) μπορούν να προκαλέσουν μόνιμη βλάβη, κυρίως εάν δεν θεραπευτούν και μπορούν να οδηγήσουν σε φλεγμονή της πυέλου. Εκτός από την λοίμωξη από χλαμύδια, άλλες παθήσεις είναι λοιμώξεις από ουρεόπλασμα (*Ureaplasma urealyticum*) και μυκόπλασμα (*Mycoplasma hominis*). Ευτυχώς, σήμερα πολλά σεξουαλικά μεταδιδόμενα νοσήματα μπορούν να αντιμετωπιστούν με αντιβιοτική θεραπεία επιτυχώς.

2.2 ΕΝΔΟΚΡΙΝΟΛΟΓΙΚΑ ΑΙΤΙΑ

Αίτια ενδοκρινολογικής φύσεως που επηρεάζουν την γονιμότητα μιας γυναίκας συναντώνται σε ένα πολύ μεγάλο ποσοστό και ιδιαίτερα στους μεσογειακούς λαούς. Ένα από αυτά αποτελεί και η **υπερπρολακτιναιμία**, δηλαδή η ορμονολογική κατάσταση όπου η ορμόνη προλακτίνη βρίσκεται εκτός των ανωτάτων ορίων. Είναι η ορμόνη που προάγει τη γαλουχία και το θηλασμό και αναστέλλει την ωορρηξία, οπότε κατ'επέκταση προκαλεί υπογονιμότητα στη γυναίκα εάν δεν ρυθμιστεί.

Εξαιρετικά κοινή διαταραχή αποτελεί και το **σύνδρομο των πολυκυστικών ωοθηκών**. Με τον όρο πολυκυστικές ωοθήκες εννοούμε εκείνες τις ωοθήκες που παρουσιάζουν πολυκυστική ηχομορφολογία, περιέχουν δηλαδή πολλές μικρές κύστες, οι οποίες συνήθως δεν ξεπερνούν τα 8 χιλιοστά σε μέγεθος. Τα κύρια χαρακτηριστικά του συνδρόμου είναι η υπερανδρογοναιμία, η ινσουλινοαντίσταση, η διαταραχή της ωοθυλακιορρηξίας και η πολυκυστική

μορφολογία των ωοθηκών. Η υπερανδρογοναιμία κλινικά εκδηλώνεται με υπερτρίχωση, ακμή και αλωπεκία. Επίσης, η διαταραχή της ωοθυλακιορρηξίας κλινικά εκδηλώνεται με διαταραχές στην έμμηνο ρύση, με συχνότερη την αραιομηνόρροια ενώ η πολυκυστική μορφολογία των ωοθηκών συνδέεται με διαταραχή της φυσιολογικής εξέλιξης των ωοθυλακίων και εκτιμάται με τον υπερηχογραφικό έλεγχο.

Η διάγνωση βασίζεται στα λεγόμενα “**κριτήρια του Rotterdam**”. Η γυναίκα με ΣΠΩ πρέπει να πληροί δύο από τα τρία κριτήρια:

- Ολιγομηνόρροια και/ή αμηνόρροια
- Αυξημένα ανδρογόνα
- Πολυκυστική μορφολογία των ωοθηκών στον υπέρηχο

Επακόλουθο της ινσουλινοαντίστασης στις γυναίκες με σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών είναι η αυξημένη συχνότητα διαταραχής του μεταβολισμού της γλυκόζης, με επίπτωση την εμφάνιση του σακχαρώδους διαβήτη τύπου 2 και του διαβήτη της εγκυμοσύνης, όπως επίσης και η αυξημένη συχνότητα διαταραχής του μεταβολισμού των λιπιδίων, καθώς και του μεταβολικού συνδρόμου. Αυτές οι μεταβολικές διαταραχές συνεπάγονται αυξημένο καρδιαγγειακό κίνδυνο και



Εικόνα 15: Υπερηχογραφική εικόνα πολυκυστικής ωοθήκης.

πολλές μελέτες έχουν δείξει αυξημένους τους δείκτες αθηρωμάτωσης στις ασθενείς αυτές. Πολλές μελέτες επίσης έχουν αποδείξει την σύνδεση του αυξημένου σωματικού βάρους (BMI) με μειωμένα ποσοστά επιτυχημένων εγκυμοσυνών. Η φαρμακευτική θεραπεία βασίζεται στην ιδιομορφία της κάθε περίπτωσης ξεχωριστά και στο εάν επιθυμεί η γυναίκα να επιτευχθεί εγκυμοσύνη ή όχι και συνδυάζεται με ένα νέο τρόπο ζωής που θα περιλαμβάνει φυσική άσκηση και σωστή διατροφή.

Από μια αξιολόγηση της ενδοκρινολογικής κατάστασης μιας υπογόνιμης γυναίκας, δεν θα μπορούσε να λείπει και η εκτίμηση της λειτουργίας του θυρεοειδούς αδένος. Η καλή λειτουργία του θυρεοειδούς αδένος είναι απαραίτητη για τη γονιμότητα, την ικανότητα σύλληψης και τη διατήρηση της εγκυμοσύνης, και οι διαταραχές της μπορεί να ευθύνονται για πολλά περιστατικά ανεξήγητης υπογονιμότητας. Ο θυρεοειδής αδένος παράγει τρεις ορμόνες: την θυροξίνη ή τετραϊωδοθυρονίνη (T4), την τριιωδοθυρονίνη (T3) και την καλσιτονίνη. Οι δύο πρώτες ρυθμίζουν τον μεταβολισμό όλων των ιστών, ενώ η καλσιτονίνη ελαττώνει τα επίπεδα του ασβεστίου στο αίμα. Η σύνθεση και η έκκριση των θυρεοειδικών ορμονών ρυθμίζεται από την θυρεοειδοτρόπο ορμόνη (TSH) που παράγεται στην υπόφυση του εγκεφάλου και η οποία με τη σειρά της εξαρτάται από την έκκριση της θυρεοεκλυτικής ορμόνης (TRH) που παράγεται στον υποθάλαμο του.

Στην περίπτωση του **υπερθυρεοειδισμού**, ο θυρεοειδής παράγει υπερβολικά πολλές ορμόνες, με συνέπεια ο οργανισμός να χρησιμοποιεί πολύ γρήγορα την ενέργειά του. Υπολογίζεται ότι περισσότερο από το 1% του πληθυσμού πάσχει από αυτόν, με τις γυναίκες ασθενείς να είναι δύο έως δέκα φορές περισσότερες από τους άνδρες. Αν και ο υπερθυρεοειδισμός είναι συχνότερος στις ηλικίες άνω των 60 ετών, μπορεί να εκδηλωθεί και στην αναπαραγωγική ηλικία. Η πιο συχνή αιτία υπερθυρεοειδισμού είναι μία διαταραχή γνωστή ως **νόσος Graves**, η οποία προσβάλλει συνήθως γυναίκες ηλικίας 20-40 ετών. Η νόσος προκαλεί συμπτώματα όπως δυσκολίες στον ύπνο, τρέμουλο των χεριών, εύθραυστα μαλλιά και απώλεια βάρους, ενώ ένα χαρακτηριστικό σύμπτωμα στα προχωρημένα στάδια είναι ο εξόφθαλμος (τα μάτια προεξέχουν από τις οφθαλμικές κόγχες). Η νόσος Graves μπορεί να προκαλέσει ακανόνιστη έμμηνο ρύση στις γυναίκες και μειωμένη παραγωγή σπερματοζωαρίων στον άνδρα, με τελικό επακόλουθο την υπογονιμότητα. Στα ήπια περιστατικά, η αγωγή συνήθως επαναφέρει τα ορμονικά επίπεδα στο φυσιολογικό και έτσι διευκολύνεται η επίτευξη εγκυμοσύνης. Για τα πιο προχωρημένα περιστατικά μπορεί να χρειασθούν θεραπείες, όπως το ραδιενεργό ιώδιο ή οι εγχειρήσεις. Υπερθυρεοειδισμός μπορεί επίσης να προκληθεί από όζους στον θυρεοειδή,

καθώς και από την υπερβολική χορήγηση φαρμάκων για την θεραπεία του υποθυρεοειδισμού.

Ο **υποθυρεοειδισμός** προσβάλλει το περίπου 0,5% των γυναικών αναπαραγωγικής ηλικίας και χαρακτηρίζεται από μειωμένη παραγωγή των θυρεοειδικών ορμονών. Η συχνότερη αιτία του είναι η θυρεοειδίτιδα (είναι φλεγμονή στον θυρεοειδή), ο πιο συχνός τύπος της οποίας είναι η **θυρεοειδίτιδα Hashimoto**. Στα πιθανά συμπτώματα του υποθυρεοειδισμού συμπεριλαμβάνονται κόπωση, αύξηση του σωματικού βάρους, μειωμένη όρεξη, απώλεια ερωτικής επιθυμίας, εύθραυστα νύχια, τριχόπτωση κ.λπ.

Όταν ο υποθυρεοειδισμός εκδηλωθεί σε παιδική ή εφηβική ηλικία σχετίζεται με καθυστερήσεις στην ηλικία της σεξουαλικής ωρίμανσης, ενώ στην ενήλικη ζωή σχετίζεται με εμμηνορροϊκά προβλήματα και μερικές φορές απουσία ωορρηξίας. Ο υποθυρεοειδισμός σχετίζεται επίσης με αυξημένο κίνδυνο προβλημάτων στην εγκυμοσύνη, όπως η αποβολή, η προεκλαμψία (χαρακτηρίζεται από αυξημένη αρτηριακή πίεση της μητέρας), μειωμένη εμβρυϊκή ανάπτυξη, πρόωρο τοκετό και θνησιγένεια.

2.3 ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΚΑΙ ΓΟΝΙΔΙΑΚΑ ΑΙΤΙΑ

Σε ολόκληρο τον κόσμο υπάρχουν πολλοί άνθρωποι που θέλουν να ξέρουν γιατί είναι υπογόνιμοι. Αν η αιτία είναι γενετική ή προερχόμενη από το περιβάλλον – επιγενετική, αυτό είναι κάτι που θέλουν να είναι σε θέση να το γνωρίζουν. Αυτή η έρευνα είναι ένα βήμα προς μια τέτοια διάγνωση.

Τόσο οι αριθμητικές, όσο και οι δομικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες έχουν επιπτώσεις στη γυναικεία και στην ανδρική γονιμότητα. Η ανάλυση του καρυότυπου μπορεί να δώσει μια πρώτη κλινική εικόνα. Στις γυναίκες, η μονοσωμία του φυλετικού χρωματοσώματος X (45,X), κλινική εκδήλωση του οποίου αποτελεί το **σύνδρομο**

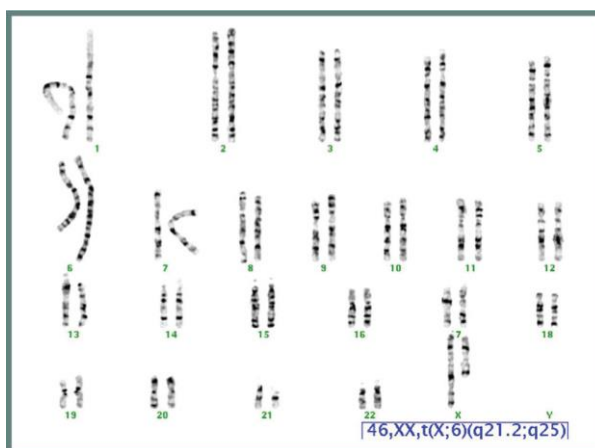
Turner, καθώς και η παρουσία ενός επιπλέον χρωματοσώματος X (47,XXX) επηρεάζουν τη γονιμότητα. Προβλήματα

υπογονιμότητας έχουν επίσης τα άτομα με τρισωμία 21 (**σύνδρομο Down**). Από τις δομικές

αναδιατάξεις των χρωμοσωμάτων οι αμοιβαίες μεταθέσεις είναι

εκείνες οι οποίες σχετίζονται συχνότερα τόσο με τη γυναικεία όσο και με την ανδρική υπογονιμότητα. Αρκετές φορές ενδέχεται ο ασθενής να φέρει μία **ισοζυγισμένη χρωμοσωμική μετάθεση** (ανταλλαγή τελικών τμημάτων μεταξύ δύο μη ομολόγων χρωμοσωμάτων χωρίς εμφανή απώλεια γενετικού υλικού). Οι **φορείς χρωμοσωμικών μεταθέσεων** συχνά παρουσιάζουν υπογονιμότητα ή/και αυξημένο αναπαραγωγικό κίνδυνο εξαιτίας του τρόπου συνδυασμού των ομολόγων χρωμοσωμάτων κατά το μηχανισμό της μείωσης.

Μπορεί επίσης, να φέρει μία μετάθεση τύπου Robertson (κεντρική σύντηξη δύο ακροκεντρικών χρωμοσωμάτων (ζεύγη 13, 14, 15, 21 και 22)). Η **μετάθεση τύπου Robertson der(13;14)** είναι η πιο γνωστή στον άνθρωπο. Στις γυναίκες ο **υπογοναδοτροπικός υπογοναδισμός και το σύνδρομο Kallman** (με



Εικόνα 16: Καρυότυπος υπογόνιμης γυναίκας με αμοιβαία μετάθεση μεταξύ των χρωμοσωμάτων X και 6.

μικρότερη συχνότητα 1:50.000 άτομα) είναι αιτίες υπογονιμότητας εξαιτίας της πρωτοπαθούς αμηνόρροιας που προκαλούν. Τα κυριότερα γονίδια, στα οποία οφείλεται είναι τα KAL1, KAL2 και GNRHR.

Σε πολλές επιστημονικές δημοσιεύσεις, αναφέρεται η συσχέτιση μεταξύ υπογονιμότητας αγνώστου αιτιολογίας και μεταλλαγών στα γονίδια της θρομβοφιλίας. Η κληρονομούμενη **θρομβοφιλία** θεωρείται μια γενετική νόσος που καθορίζεται από πολλαπλά γονίδια, γεγονός που μπορεί να εξηγήσει γιατί κάποιες γυναίκες με θρομβοφιλία δεν έχουν κανένα θρομβωτικό επεισόδιο, ενώ άλλες εμφανίζουν διάφορες επιπλοκές. Ο μέχρι τώρα πλήρης γονιδιακός έλεγχος περιλαμβάνει τα εξής γονίδια: Factor V Leiden (G169A, R506Q), Prothrombin factor II (G20210A), MTHFR (C667T), glycoprotein GPIa/IIa, PAI-1 Serpin E1, Factor V R2 haplotype – H1299R, MTHFR (A1298C), Factor XIII V24L, Apo B R3500Q (apolipoprotein B), Apo E (apolipoprotein E), fibrinogen beta chain (FGB), human platelet antigen (HPA1) και angiotensin-converting enzyme (ACE).

Μεταξύ όλων αυτών, συχνά γίνεται αναφορά για τα «ανεξήγητα» αίτια της υπογονιμότητας. Μπορούμε όμως να αναδιατυπώσουμε την έκφραση αυτή, ως «τα μέχρι τώρα ανεξήγητα» αίτια της υπογονιμότητας βασιζόμενοι στο γεγονός ότι γίνονται συνεχώς μελέτες παγκοσμίου βεληνεκούς πάνω στο γονιδίωμα και στην επιγενετική του. Έχει βρεθεί εκτός των άλλων, ότι αρκετοί πολυμορφισμοί θα μπορούσαν να αποτελέσουν αίτιο υπογονιμότητας είτε άμεσα με τη ρύθμιση τους, είτε έμμεσα μέσω σχετιζόμενων νοσημάτων. Στην παρούσα εργασία θα μελετήσουμε την επίδραση αυτών των πολυμορφισμών στην αναπαραγωγική υγεία των γυναικών.

3. ΕΞΩΣΩΜΑΤΙΚΗ ΓΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ

Η εξωσωματική γονιμοποίηση είναι αναμφισβήτητα η πιο γνωστή μέθοδος που μπορεί να αναπληρώσει την αδυναμία της υπογόνιμου ζεύγους ώστε να αποκτήσει απογόνους με φυσικό τρόπο.

Η μέθοδος αυτή συνίσταται στη γονιμοποίηση του ωαρίου από σπερματοζώαριο στο εργαστήριο και όχι της σάλπιγγας που είναι και ο φυσιολογικός χώρος για να πραγματοποιηθεί η γονιμοποίηση. Για την πραγματοποίησή της, η γυναίκα υποβάλλεται σε έναν προκαταρκτικό κύκλο στον οποίο οι ωοθήκες στην αρχή καταστέλλονται με σκοπό να αποκτηθεί ο έλεγχος των ορμονών και μετά να ακολουθήσει ενίσχυση της ωορρηξίας ώστε να οδηγηθούν σε ωρίμανση όσο περισσότερα υγιή ωάρια γίνεται. Όταν η ανταπόκριση φτάσει σε ένα μέγιστο, χορηγείται μια ένεση για προσομοίωση του σήματος της ωχρινोटρόπου ορμόνης ώστε τα ωάρια να ολοκληρώσουν το τελικό βήμα της ωρίμανσής της. Πριν από την ωορρηξία προγραμματίζεται μια διαδικασία για τη λήψη κάθε ωαρίου από της ωοθήκες, που ονομάζεται **ωοληψία**, με χρήση μιας μακράς βελόνας και υπό την επήρεια μέθης, κάτω από υπερηχογραφική καθοδήγηση. Τα ωάρια αυτά φυλάσσονται σε συνθήκες που προσομοιάζουν το φυσικό της περιβάλλον μέχρι να γονιμοποιηθούν τεχνητά και να δρομολογηθούν της **εμβρυομεταφοράς**. Προκειμένου να πραγματοποιηθεί αυτή η διαδικασία ακολουθούνται συγκεκριμένα πρωτόκολλα ωοθηκικής διέγερσης, τα οποία ενώ είναι τροποποιημένα της ανάγκες κάθε γυναίκας ώστε να υπάρχει το μέγιστο δυνατό αποτέλεσμα, έχουν κατά βάση την ίδια φιλοσοφία, δηλαδή την καταστολή της υποφυσιακής και ωοθηκικής λειτουργίας ώστε να υπάρχει απόλυτος έλεγχος και να μην γίνει πρόωρη ωορρηξία.

3.1 ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΑ ΔΙΕΓΕΡΣΗΣ ΩΟΘΗΚΩΝ

Η πρόκληση της ωοθυλακιορρηξίας γίνεται με τη χρήση ωοθυλακιορρηκτικών φαρμάκων που δρουν σε διαφορετικά επίπεδα του υποθάλαμου-υποφυσιακό-ωοθηκικού άξονα (Γουρουντή 2012). Η ωοθυλακιορρηξία μπορεί να γίνει με διάφορα φαρμακευτικά σκευάσματα. Σε ευρεία χρήση είναι η κιτρική κλομιφαίνη, ως αντι-οιστρογόνο που δρα στον υποθάλαμο, οι ανθρώπινες (εμμηνοπαυσιακές) ή τεχνητά παραγόμενες γοναδοτροπίνες, που δρουν στο επίπεδο της ωοθήκης και τα GnRH ανάλογα που δρουν στο επίπεδο της υπόφυσης. Μπορούν ακόμη, να χρησιμοποιηθούν και τα GnRH ανάλογα, η βρωμοκρυπτίνη, η καβεργολίνη, η μετφορμίνη και η λετροζόλη (Ιατράκης και συν 2009).

Με τις τεχνικές της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής μπορεί να μην χρησιμοποιηθεί κανένα φαρμακευτικό σκευάσμα για πρόκληση πολλαπλής ωοθυλακιορρηξίας, αλλά μόνο με τον καταμήνιο κύκλο και την μονοωοθυλακιορρηξία που συμβαίνουν φυσιολογικά, είναι δυνατόν να επιτευχθεί κύηση (Γουρουντή 2012).

3.1.1 ΠΡΟΚΛΗΣΗ ΩΟΘΥΛΑΚΙΟΡΡΗΞΙΑΣ ΜΕ ΚΙΤΡΙΚΗ ΚΛΟΜΙΦΑΙΝΗ

Η κιτρική κλομιφαίνη είναι μια συνθετική μη στεροειδής ουσία, αγωνιστής-ανταγωνιστής οιστρογόνων. Λειτουργεί καταλαμβάνοντας τους οιστρογονικούς υποδοχείς του υποθαλάμου και των οργάνων του αναπαραγωγικού συστήματος. Έτσι, μπλοκάροντας τους οιστρογονικούς υποδοχείς του υποθαλάμου δίνει σε αυτόν την εντύπωση ότι τα επίπεδα των οιστρογόνων είναι χαμηλότερα από αυτά που είναι πραγματικά. Με αυτόν τον τρόπο γίνεται μείωση του αρνητικού μηχανισμού ανατροφοδότησης που οδηγεί σε αυξημένη έκκριση των GnRH, κι επομένως σε αυξημένη παραγωγή των FSH και LH και άρα σε ανάπτυξη και ωρίμανση ωοθυλακίων. Η κιτρική κλομιφαίνη ως αντι-οιστρογόνο επηρεάζει δυσμενώς την παραγωγή τραχηλικής βλέννης από τον ενδοτράχηλο και την προετοιμασία του ενδομητρίου. Επιπλέον, η χρήση του

φαρμάκου αυτού έχει ως αποτέλεσμα υψηλό ποσοστό ακύρωσης κύκλων (25-40%), λόγω φτωχής απάντησης ή πρόωμης εκκριτικής αιχμής της LH (Ματαλλιωτάκης και συν 2001, Γουρουντή 2012).

Η κιτρική κλομιφαίνη χορηγείται κυρίως σε γυναίκες με αραιομηνόρροια ή αμηνόρροια αλλά με φυσιολογικά επίπεδα οιστρογόνων, FSH, LH και προλακτίνης και άρα ικανοποιητική λειτουργία του άξονα υποθάλαμος-υπόφυση-ωοθήκες, που όμως δεν καταλήγει σε κανονικές ωοθυλακιορρηξίες και αποτελεί θεραπευτική επιλογή και στο σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών. Επίσης, χορηγείται σε συνδυασμό με ενδομήτρια σπερματέγχυση σε ωοθυλακιορρηκτικές γυναίκες με ανεξήγητη υπογονιμότητα, με σκοπό να επιτευχθεί πολύ-ωοθυλακιορρηξία. Δεν είναι όμως δραστική σε περιπτώσεις υπογοναδοτροπικού υπογοναδισμού λόγω των χαμηλών επιπέδων των οιστρογόνων τα οποία δεν μπορούν να προκαλέσουν την έκκριση γοναδοτροπινών κι έτσι δεν μπορεί να το καταφέρει ούτε η κιτρική κλομιφαίνη. Ακόμη, αντενδείκνυται σε περιπτώσεις ηπατικής δυσλειτουργίας, υπερπρολακτιναιμίας και κυστών ωοθήκης. Διάφορες εμπορικές ονομασίες της κιτρικής κλομιφαίνης είναι: Serophene® και Clomid® (Bayer et al 2007, Γουρουντή 2012, Kuang et al 2014). Η κιτρική κλομιφαίνη προκαλεί περισσότερες από μια ωοθυλακιορρηξίες κι έτσι, της αποδίδεται ένα ποσοστό 5-10% ευθύνης για πολύδυμες κυήσεις. Σε κάθε περίπτωση, η παρακολούθηση της ασθενούς πρέπει να περιλαμβάνει τον υπερηχογραφικό έλεγχο.

3.1.2 ΠΡΟΚΛΗΣΗ ΩΟΘΥΛΑΚΙΟΡΡΗΞΙΑΣ ΜΕ ΓΟΝΑΔΟΤΡΟΠΙΝΕΣ

Οι γοναδοτροπίνες FSH και LH είναι γλυκοπρωτεϊνικές ορμόνες που προέρχονται από την υπόφυση. Χρησιμοποιούνται εδώ και περίπου 50 χρόνια. Τα πρώτα χρόνια χρησιμοποιούνταν γοναδοτροπίνες HMG (Human Menopausal Gonadotropins) και προέρχονταν από απομόνωση των FSH και LH από ούρα εμμηνοπαυσιακών γυναικών και περιείχαν είτε τις δύο ορμόνες σε αναλογία 1:1 ή σε μορφή υψηλής καθαρότητας της FSH, οπότε η συγκέντρωση της LH είναι <1%. Τα τελευταία χρόνια χρησιμοποιούνται ανασυνδυασμένες γοναδοτροπίνες με δράση FSH ή LH που προέρχονται από κυτταρικές καλλιέργειες, με χρήση

γενετικής μηχανικής και περιλαμβάνουν μόνο τη μία εκ των δύο γοναδοτροπινών σε καθαρότητα 100% (Γουρουντή 2012). Διάφορες εμπορικές ονομασίες γοναδοτροπινών είναι οι ακόλουθες: Humegon (FSH: LH 1:1), Normegon (FSH: LH 3:1), Pergonal (FSH: LH 1:1). «Καθαρή» FSH: Metrodin, Orgafol, Gonadotraphon, Pregnyl, Profasi. Ανασυνδυασμένη FSH: Gonal-F, Puregon (Meniru 2004).

Οι γοναδοτροπίνες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την πρόκληση ωοθυλακιορρηξίας σε οποιαδήποτε διαταραχή της διότι δρουν στους υποδοχείς των ωοθυλακίων της ωοθήκης. Επίσης, στην αμηνόρροια υποθαλαμικής αιτιολογίας η καλύτερη επιλογή είναι η πρόκληση ωοθυλακιορρηξίας με γοναδοτροπίνες. Η χορήγησή τους ενδείκνυται σε περιπτώσεις υπογοναδοτροπικού υπογοναδισμού, αποτυχίας ή αντένδειξης της χρήσης της κιτρικής κλομιφαίνης και ανεξήγητης υπογονιμότητας (Ιατράκης και συν 2009, Γουρουντή 2012).

Το ποσοστό επιτυχίας αγγίζει το 90% στις ασθενείς με υπογοναδοτροπικό υπογοναδισμό έπειτα από θεραπεία 6-9 μηνών. Από μελέτες έχει αποδειχθεί ότι, ο συνδυασμός ανθρώπινης και ανασυνδυασμένης FSH για την διέγερση των ωοθηκών προκαλεί μια θετική επίδραση στην ανάπτυξη των ωοθυλακίων, όπως την βελτίωση της ποιότητας των ωαρίων αλλά και την ανάπτυξη των εμβρύων αργότερα, με αποτέλεσμα αυξημένο ποσοστό επιτυχίας κλινικών κυήσεων. Όμως αυτό το ποσοστό φτάνει στο 30-60% στις ανωοθυλακιορρηκτικές ασθενείς με αντίσταση στη κιτρική κλομιφαίνη μετά από θεραπεία πάλι 6-9 μηνών. Παρόλα αυτά η χορήγηση μόνο γοναδοτροπινών καταλήγει σε αποτυχία σε ένα ποσοστό 30-40% των κύκλων εξωσωματικής και δεν γίνεται ωοληψία λόγω πρόωρης έκκρισης της LH και πρόωρης ωχρινοποίησης ή ωοθυλακιορρηξίας σε ακατάλληλη χρονική στιγμή (Γουρουντή 2012, Selman et al 2013).

Παράλληλα με τη χορήγηση των γοναδοτροπινών πρέπει να γίνεται συστηματικός υπερηχογραφικός έλεγχος των ωοθηκών, για την εκτίμηση του αριθμού και του μεγέθους των ωοθυλακίων καθώς και μέτρηση των επιπέδων των οιστρογόνων του αίματος, που πρέπει να αντιστοιχούν σε συγκεκριμένα επίπεδα σύμφωνα με τον αριθμό των αναπτυσσόμενων ωοθυλακίων. Αυτά πρέπει να γίνονται επίσης για την πρόληψη του συνδρόμου υπερδιέγερσης των

ωοθηκών. Τέλος, η χορήγηση γοναδοτροπινών ευθύνεται σε ποσοστό 25-30% για πολύδυμες κυήσεις (Ιατράκης και συν 2009).

3.1.3 ΠΡΟΚΛΗΣΗ ΩΟΘΥΛΑΚΙΟΡΡΗΞΙΑΣ ΜΕ GnRH ΑΝΑΛΟΓΑ

Τα GnRH ανάλογα χρησιμοποιούνται στην εξωσωματική γονιμοποίηση για την πρόληψη της πρόωρης εκκριτικής αιχμής της LH, διότι καταστέλλουν την ενδογενή έκκρισή της. Αυτή η καταστολή είναι απαραίτητη διότι μπορεί να γίνει αιχμή της LH πριν ακόμη αναπτυχθούν τα ωοθυλάκια με αποτέλεσμα την πρόωρη ωχρινοποίηση τους, μπορεί να μην επαρκεί η ποσότητα της ενδογενούς LH για την ωρίμανση όλων των ωοθυλακίων και τέλος, μπορεί η ωοθυλακιορρηξία να συμβεί σε ακατάλληλη χρονική στιγμή, δηλαδή πριν από την ωοληψία. Λόγω της καταστολής της έκκρισης των ενδογενών γοναδοτροπινών συνιστάται η χρήση τους για την πρόκληση ωοθυλακιορρηξίας κυρίως στο σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών όπου σε αυτό συνήθως αυξημένη είναι η LH (Γουρουντή 2012).

Τα GnRH ανάλογα διακρίνονται σε αγωνιστές και ανταγωνιστές. Οι GnRH αγωνιστές στην αρχή προκαλούν αυξημένη έκκριση γοναδοτροπινών από την υπόφυση, αλλά η συνεχιζόμενη χορήγησή τους καταλήγει σε απευαισθητοποίηση των υποδοχέων της GnRH στα υποφυσιακά κύτταρα και άρα την αναστολή της βιοσύνθεσης των γοναδοτροπινών («προς τα κάτω ρύθμιση» ή down-regulation). Γι' αυτό γίνεται συγχορήγηση ανάλογων GnRH και γοναδοτροπινών έτσι ώστε να αποφεύγεται η πρόωρη αιχμή της ενδογενούς LH. Διάφορες εμπορικές ονομασίες των GnRH αγωνιστών είναι οι ακόλουθες: Βουσερελίνη (Suprecur, Suprefact), Γοσερελίνη (Zoladex), Λευπρορελίνη (Prostap SR, Lucrin), Λευπρολίδη (Lupron Depot), Ναφαρελίνη (Synarel), Τριπτορελίνη (Decapeptyl) (Meniru 2004).

3.2 ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΑ ΕΞΩΣΩΜΑΤΙΚΗΣ ΓΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗΣ

Αξίζει να σημειωθεί ότι στην εξωσωματική γονιμοποίηση υπάρχουν πολλά πρωτόκολλα διέγερσης ωοθηκών, πιο συχνά όμως χρησιμοποιούνται τρία:

- ✚ Πρωτόκολλα με GnRh αγωνιστές (μακρύ και βραχύ πρωτόκολλο)
- ✚ Πρωτόκολλα με GnRh ανταγωνιστές
- ✚ Φυσικός κύκλος

3.2.1 ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΜΕ GNRH ΑΓΩΝΙΣΤΗ- ΜΑΚΡΥ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ

Ονομάζεται GnRH agonist down regulation protocol ή απλά long. Η φιλοσοφία του στηρίζεται στην καταστολή της υπόφυσης και επομένως στην πρόληψη της άκαιρης ανόδου της LH. Είναι γνωστό ότι η άκαιρη αιχμή της LH θα προκαλούσε ρήξη των ωοθυλακίων (ωοθυλακιορρηξία) πριν την ωοληψία και την απρόσμενη απώλεια των ωαρίων.

Η καταστολή (down regulation) της υπόφυσης γίνεται με τη συνεχή χορήγηση συναγωνιστικών αναλόγων της GnRH (GnRH agonist). Στη συνέχεια με δεδομένη και συνεχιζόμενη την καταστολή της υπόφυσης προχωρούμε στη διέγερση των ωοθηκών με φαρμακευτικές γοναδοτροπίνες με σκοπό την στρατολόγηση και πολλαπλή ανάπτυξη ωοθυλακίων. Δηλαδή ουσιαστικά διακόπτουμε «την επικοινωνία της υπόφυσης με τις ωοθήκες», και «παίρνουμε το τιμόνι» στα χέρια μας.

Στο μακρύ πρωτόκολλο διακρίνουμε δύο φάσεις:

- ✚ καταστολή μέσω των συναγωνιστικών αναλόγων της GnRH (Arvekar, Daronda, Suprefact, Gonapeptyl). Διάρκεια Α' φάσης περίπου 10-14 ημέρες.
- ✚ διέγερση των ωοθηκών με φαρμακευτικώς παρασκευαζόμενες γοναδοτροπίνες (Puregon, Gonal-F, Altermon, Pergoveris, Merional, Menopur, Bravelle), υπό συνεχιζόμενη καταστολή της λειτουργίας της υπόφυσης. Διάρκεια Β' φάσης περίπου 10-14 ημέρες.

Η συνολική διάρκεια του μακρύ πρωτοκόλλου υπολογίζεται περίπου σε ένα μήνα. Η έναρξη του συναγωνιστή (Arvekar, Daronda, Suprefact, Gonapeptyl) μπορεί να γίνει την 21η ημέρα του κύκλου σε κανονικό κύκλο 28 ημερών ή την 2η ημέρα του κύκλου ή τρεις ημέρες πριν το τέλος της αγωγής με αντισυλληπτικά χάπια (Λαϊνάς 2006).

3.2.2 ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΜΕ GNRH ΑΓΩΝΙΣΤΗ- ΒΡΑΧΥ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ

Στο βραχύ (short) πρωτόκολλο χορηγούνται σχεδόν ταυτόχρονα ο (συν)αγωνιστής της GnRH (GnRH agonist) μαζί με τις φαρμακευτικές γοναδοτροπίνες. Ονομάζεται Flare up GnRH agonist protocol ή απλά short (βραχύ). Το βραχύ πρωτόκολλο επιλέγεται κυρίως για γυναίκες με πτωχή ανταπόκριση των ωοθηκών στην πρόκληση πολλαπλής ανάπτυξης ωοθυλακίων.

Στο βραχύ πρωτόκολλο:

- ✚ Η έναρξη του συναγωνιστή της GnRH αρχίζει συνήθως τη 1η-2η ημέρα του κύκλου
- ✚ Η έναρξη των φαρμακευτικών γοναδοτροπινών την 2η-3η ημέρα του κύκλου
- ✚ Δεν διαχωρίζονται οι φάσεις (καταστολής και διέγερσης)
- ✚ Η συνολική διάρκειά του υπολογίζεται σε 10-15 ημέρες.

Στο βραχύ πρωτόκολλο, με την ταυτόχρονη έναρξη των συναγωνιστικών αναλόγων της GnRH και των γοναδοτροπινών εκμεταλλεύονται τρεις «πυροδοτήσεις» γοναδοτροπινών στις ωοθήκες για να στρατολογηθούν περισσότερα ωοθυλάκια και να ληφθούν περισσότερα ωάρια. Οι τρεις αυτές «πυροδοτήσεις» ασκούνται, πρώτον, από την αυξημένη ενδογενή FSH, που φυσιολογικά αυξάνεται στην αρχή του κύκλου, δεύτερον, από την αύξηση της ενδογενούς FSH, που προκαλείται από την αρχικά διεγερτική δράση του συναγωνιστικού αναλόγου της GnRH στην υπόφυση και, τρίτον, από τις φαρμακευτικές γοναδοτροπίνες που χορηγούνται εξωγενώς, υπό μορφή ενέσεων. Τις τελευταίες ημέρες του βραχέος πρωτοκόλλου ασκείται και η κατασταλτική δράση του αναλόγου της GnRH στην υπόφυση. Παραλλαγές του βραχέος (short) πρωτοκόλλου αποτελούν το υπέρβραχυ, το Microflare, Microdose flare κ.α. (Λαϊνάς 2006).

3.2.3 ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΜΕ GNRH ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΗ

Η εισαγωγή των GnRH ανταγωνιστών στην κλινική πράξη αποτέλεσε έναν από τους σημαντικότερους νεωτερισμούς των τελευταίων χρόνων. Το γεγονός ότι η χορήγηση του ανταγωνιστή οδηγεί σε άμεση καταστολή της έκλυσης FSH και LH από την υπόφυση, επιτρέπει την έναρξη χορήγησής τους αργότερα κατά τον κύκλο διέγερσης (όταν αρχίζει πλέον να υφίσταται ο κίνδυνος εμφάνισης αιχμής LH). Έτσι, περιορίζεται ο συνολικός αριθμός των απαιτούμενων ενέσεων καθιστώντας τα πρωτόκολλα αυτά πιο φιλικά για την γυναίκα.

Στα πρωτόκολλα ανταγωνιστή η διέγερση ξεκινά με την χορήγηση γοναδοτροπινών κατά την 2η ημέρα του κύκλου. Οι γοναδοτροπίνες συνεχίζονται καθημερινά και ακολούθως υπάρχουν οι εξής εναλλακτικές: α) πρωτόκολλο εφάπαξ δόσης, όπου χορηγούνται 3 mg cetrorelix ή ganirelix την 7η ή 8η ημέρα του κύκλου ή όταν το κυρίαρχο ωοθυλάκιο φτάσει τα 14 mm, και η δόση επαναλαμβάνεται 72 ώρες μετά αν δεν έχουν εκπληρωθεί τα κριτήρια τελικής ωρίμανσης, β) πρωτόκολλο πολλαπλών καθημερινών δόσεων (0,25 mg cetrorelix ή ganirelix), ξεκινώντας ευέλκτα όταν το κυρίαρχο ωοθυλάκιο

φθάσει τα 12-14 mm και/ή η οιστραδιόλη υπερβαίνει τα 150 pg/mL ή προκαθορισμένα κατά την 6η ημέρα της διέγερσης. Τα πρωτόκολλα των πολλαπλών δόσεων φαίνεται να έχουν επικρατήσει.

Σύμφωνα με πρόσφατη μετα-ανάλυση των μελετών σύγκρισης του ευέλκτου με το προκαθορισμένο πρωτόκολλο, δεν υπάρχει μεταξύ τους στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς τα ποσοστά κύησης παρά μόνο μια τάση αύξησής τους επί εφαρμογής του προκαθορισμένου πρωτοκόλλου.

3.2.4 ΦΥΣΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ (NC-IVF)

Στο πρωτόκολλο του φυσικού κύκλου, η γυναίκα παρακολουθείται με υπερηχογραφικό και ορμονολογικό αιματολογικό έλεγχο κατά τη διάρκεια του κύκλου της και μόλις το επικρατούν ωοθυλάκιο της φτάσει στο κατάλληλο μέγεθος, τότε χορηγείται μία μόνο δόση HCG εφάπαξ τα μεσάνυχτα, ώστε να ωριμάσει το ωάριο που περιέχεται μέσα στο ωοθυλάκιο. Μετά από 36 ώρες προσέρχεται για την ωοληψία, ακολουθεί η γονιμοποίησή του και μετέπειτα η εμβρυομεταφορά.

Οι πιθανότητες για εγκυμοσύνη σε φυσικό κύκλο ανά γυναίκα που υποβάλλεται σ' αυτή τη θεραπεία σήμερα είναι μεταξύ 10%-15%, ενώ ανά εμβρυομεταφορά μπορεί να αγγίξει και το 50%. Η πιθανότητα αυτή είναι εξαιρετική αν αναλογιστούμε ότι η πιθανότητα κύησης ύστερα από κλασική εξωσωματική κυμαίνεται μεταξύ 25%-35%, ανάλογα με την ηλικία της γυναίκας. Η εξωσωματική σε φυσικό κύκλο αποτελεί σήμερα μια επιλογή πρώτης γραμμής για νέες γυναίκες που πρέπει να υποβληθούν σε εξωσωματική γονιμοποίηση.

Τα οφέλη μιας εξωσωματικής σε φυσικό κύκλο είναι σημαντικά:

- ✚ καμία λήψη ορμονών για τη διέγερση ωοθηκών
- ✚ μηδενική πιθανότητα συνδρόμου υπερδιέγερσης των ωοθηκών
- ✚ μηδαμινή πιθανότητα διδύμων κυήσεων
- ✚ ελαττωμένο κόστος
- ✚ μειωμένο ψυχολογικό φορτίο της γυναίκας
- ✚ δεν απαιτείται κύκλος ανάπαυσης μετά από έναν αποτυχημένο κύκλο (Allersma, Farquhar et al. 2013)

3.2.5 ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΟΣ ΦΥΣΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ -IVF (MNC-IVF)

Στον κύκλο MNC-IVF, τα πρωτόκολλα γοναδοτροπίνης χρησιμοποιούνται για την τόνωση της ανάπτυξης των ωοθυλακίων. Διαφορετικά πρωτόκολλα αρχίζουν τη χορήγηση ορμόνης διέγερσης ωοθυλακίων (FSH) σε διαφορετικά στάδια του κύκλου αλλά όλα τα πρωτόκολλα χρησιμοποιούν μια παρόμοια σύντομη περίοδο διέγερσης δύο έως έξι ημερών .

Μετά από έως έξι ημέρες διέγερσης των ωοθηκών ή όταν το μεγαλύτερο ωοθυλάκιο φθάσει σε διάμετρο 14 mm, τότε οι ανταγωνιστές GnRH χορηγούνται για να καταστέλλουν την έκκριση της LH ώστε να αποτραπεί η πρόωρη ωοθυλακιωρηξία.

Όταν το κύριο θυλάκιο φθάσει σε μέγεθος τουλάχιστον 15 έως 20 mm, η ωορρηξία ενεργοποιείται, αλλά μόνο ένα ωοκύτταρο αναπτύσσεται πλήρως και ανακτάται. (Allersma, Farquhar et al. 2013). Τόσο ο κύκλος MNC-IVF όσο και ο φυσικός κύκλος NC-IVF έχουν ωοθηκική ανάκτηση που πραγματοποιείται με κολπικό υπερηχογράφημα και συνήθως υπό ήπια καταστολή (Allersma, Farquhar et al. 2013).

3.3 ΩΟΘΗΚΙΚΗ ΑΠΑΝΤΗΣΗ

Απέναντι στη φαρμακευτική διέγερση, οι ωοθήκες έχουν και την ανάλογη ανταπόκριση. Έτσι, σύμφωνα με την ανταπόκριση των ωοθηκών και τον αριθμό των ωαρίων που θα λάβουμε μετά από μια διέγερση, διακρίνουμε τις γυναίκες σε καλές και πτωχές απαντήτριες.

3.3.1 ΚΑΛΕΣ ΑΠΑΝΤΗΤΡΙΕΣ (GOOD RESPONDERS)

Είναι γυναίκες με φυσιολογική ωοθηκική εφεδρεία, οι οποίες αναπτύσσουν κατά μέσο όρο 8-10 κυρίαρχα ωοθυλάκια σε απόκριση της συμβατικής ωοθηκικής διέγερσης, με τον αντίστοιχο αριθμό των ωαρίων (Broekmans, Kwee et al. 2006).

3.3.2 ΠΤΩΧΕΣ ΑΠΑΝΤΗΤΡΙΕΣ (POOR RESPONDERS)

Ο όρος αυτός αφορά ένα ποσοστό γυναικών (2-30 %) που υπόκειται σε ελεγχόμενη ωοθηκική διέγερση για τις οποίες δεν υπήρχαν μέχρι πρόσφατα σαφή και παγκοσμίως αποδεκτά κριτήρια για τον προσδιορισμό τους. Στο πλαίσιο της εξωσωματικής γονιμοποίησης μπορεί να προσδιοριστεί ως η αποτυχία στρατολόγησης και ανάπτυξης επαρκούς αριθμού ωοθυλακίων (18) που θα οδηγήσουν στην ανάκτηση ώριμων ωαρίων και/ή η επίτευξη μιας αιχμής της οιστραδιόλης μικρότερης από μια καθορισμένη τιμή που προσδιορίζεται ως ελάχιστη τιμή και η οποία ποικίλει ανάλογα με το κέντρο (Keay, Liversedge et al. 1997).

Η πρόβλεψη της πτωχής ανταπόκρισης μπορεί να γίνει με:

- α) τον αριθμό των καταβολών ωοθυλακίων (basal antral follicle count) (π.χ. < 5 καταβολών) στο κολπικό υπερηχογράφημα,
- β) τα αυξημένα επίπεδα FSH (π.χ. >12) την 3η ημέρα του κύκλου,
- γ) τα χαμηλά επίπεδα AMH (π.χ. < 1,1 ng/ml)

4. ΟΙ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΣΤΗ ΓΥΝΑΙΚΕΙΑ ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑ

Είναι πλέον αποδεδειγμένο ότι η γονιδιακή κατάσταση ενός ατόμου παίζει ρόλο στην αναπαραγωγική του ανταπόκριση. Γι' αυτό το λόγο εκτελούνται συνεχώς μελέτες για τον εντοπισμό της υπογονιμότητας, που προκαλούν διάφορες μεταλλάξεις στους ανθρώπινους πληθυσμούς. Οι μεταλλάξεις αυτές είναι γνωστές με τον όρο "Πολυμορφισμοί Μονών Νουκλεοτιδίων", ή SNPs, και είναι ο πιο κοινός τύπος γενετικής παραλλαγής. Κάθε SNP αντιπροσωπεύει τη διαφορά σε ένα μεμονωμένο δομικό στοιχείο του DNA, που ονομάζεται νουκλεοτίδιο. Οι πολυμορφισμοί μονού νουκλεοτιδίου αποτελούν την πιο άφθονη μορφή γενετικών παραλλαγών σε έναν πληθυσμό ερμηνεύοντας άνω του 90% των αποκλίσεων του γονιδιώματος ανάμεσα στους ανθρώπους. Για να θεωρηθεί μια αλλαγή σε μια βάση πολυμορφισμός μονού νουκλεοτιδίου, SNP, πρέπει να έχει παρατηρηθεί τουλάχιστον στο 1% του υπό εξέταση πληθυσμού φυσιολογικών ατόμων. Ένα άτομο μπορεί να φέρει έναν πολυμορφισμό μονού νουκλεοτιδίου, SNP, σε τρεις μορφές: ομόζυγη για το πιο συχνό αλληλόμορφο, ετερόζυγη και ομόζυγη για το λιγότερο συχνό αλληλόμορφο, που αντιστοιχεί στον πολυμορφισμό.

Οι περισσότεροι από αυτούς τους πολυμορφισμούς δεν επηρεάζουν άμεσα την υγεία ή την ανάπτυξη ενός οργανισμού, ορισμένοι από αυτούς όμως έχουν αποδειχθεί σημαντικοί για τη διερεύνηση της ανθρώπινης υγείας. Ένας ή περισσότεροι «μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί» μπορεί να καθορίζουν μια σειρά από χαρακτηριστικά όπως τον βαθμό απόκρισής σε μια φαρμακευτική αγωγή, τις πιθανότητες εκδήλωσης συγκεκριμένων ασθενειών, την ευαισθησία απέναντι σε εξωγενείς περιβαλλοντικούς παράγοντες (όπως είναι οι τοξίνες) και την επιρρέπειά σε μολύνσεις.

Παράλληλα, διεξάγονται μελέτες σε μεγάλες πληθυσμιακές ομάδες, τα αποτελέσματα των οποίων συσχετίζουν τη σύγχρονη παρουσία πολλαπλών SNPs με την εκδήλωση των πολυπαραγοντικών παθήσεων, όπως είναι τα

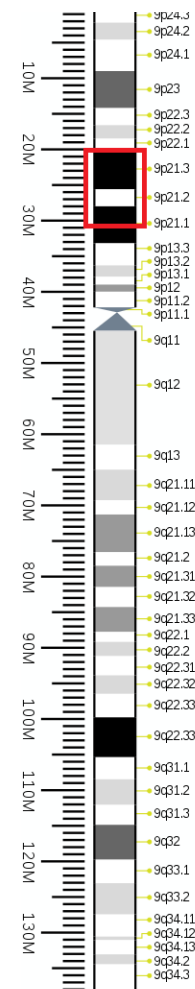
καρδιαγγειακά νοσήματα, ο σακχαρώδης διαβήτης και συγκεκριμένοι τύποι καρκίνου όπως του μαστού (Royds et al. 2016) και των ωοθηκών (Jun-Jun Qiu et al.). Ορισμένοι πολυμορφισμοί επίσης, έχουν κατηγορηθεί για την εμφάνιση νόσων στον γυναικείο πληθυσμό που σχετίζονται με την αναπαραγωγική του υγεία όπως η ενδομητρίωση (Nakaoka et al. 2016).

5. ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ ANRIL

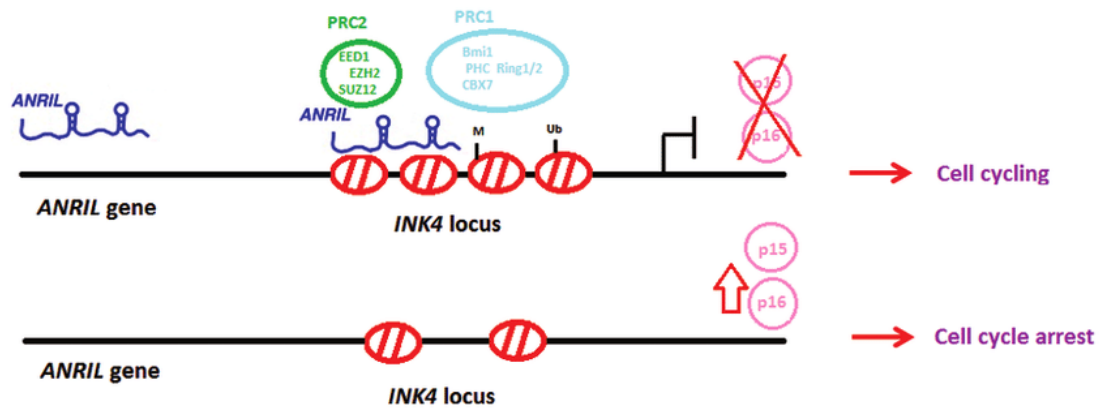
Στη παρούσα διπλωματική εργασία θα ασχοληθούμε με ένα πρόσφατα ανακαλυφθέν μακρύ μη κωδικοποιητικό RNA, που είναι περισσότερο γνωστό με το ακρωνύμιο ANRIL (**A**ntisense **N**on-coding **R**NA in **I**NK4 **L**ocus). Το ANRIL (Εικόνα 17) μεταγράφεται στον μικρό βραχίονα του ανθρώπινου χρωμοσώματος 9 στη θέση p21.3 που επικαλύπτει μια κρίσιμη περιοχή η οποία περιλαμβάνει τρεις κύριους τύπους καταστολής όγκων που αντιπαρατίθενται στο σύμπλεγμα γονιδίων INK4b-ARF-INK4a και το γονίδιο της φωσφορυλάσης της μεθυλοθειοαδενοσίνης MTAP (Aguilo et al.2016).

Το ANRIL (Antisense Non-coding RNA in INK4 Locus) αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά ως μια χρωμοσωμική έλλειψη 403 kb στα γενετικά κύτταρα μιας Γαλλικής οικογένειας με ιστορικό όγκων μελανώματος και νευρικού συστήματος (Pasmant et al. 2007. Μεταγράφεται ως ένα μακρύ και μη κωδικοποιό RNA 3,834 kb στην αντίθετη κατεύθυνση από το σύμπλεγμα INK4b-

ARF-INK4a (Yu et al. 2008) και μοιράζεται έναν αμφίδρομο υποκινητή με το p14ARF, καθώς το 5' άκρο του πρώτου εξονίου του ANRIL έχει απόσταση 300 ζεύγη βάσεων από τη θέση έναρξης της μεταγραφής (TSS) του γονιδίου p14ARF. Ως εκ τούτου, η έκφραση και των δύο γονιδίων είναι συντονισμένη και αρκετές μελέτες έχουν δείξει μια μεταγραφική ενεργοποίηση του αποκλίνοντος υποκινητή από τον E2F1 και τον CTCF (Sato et al. 2010; Rodriguez et al. 2010). Πιο συγκεκριμένα, απαιτείται η δέσμευση του CTCF για τη διατήρηση του τύπου INK/ARF σε μια σταθερή κατάσταση, η οποία αποσταθεροποιείται με τη μεθυλίωση του DNA, με συνέπειες στην πρόοδο του καρκίνου (Rodriguez et al. 2010).



Εικόνα 17:
Χρωμόσωμα 9 και
ANRIL (κόκκινο
πλαίσιο).



Εικόνα 18: Ο τόπος INK4

Ο γενετικός τόπος INK4b-ARF-INK4a (Εικόνα 18) κωδικοποιεί τρία κρίσιμα ογκοκατασταλτικά γονίδια, τα p14ARF (p19ARF σε ποντίκια), p15INK4b και p16INK4a, τα οποία παίζουν κεντρικό ρόλο στη διακοπή του κυτταρικού κύκλου, επηρεάζοντας βασικές κυτταρικές διαδικασίες όπως τη γήρανση, την απόπτωση, και την αναγέννηση των βλαστικών κυττάρων με την ενεργοποίηση των κυτταρικών μονοπατιών αμφότερων του ρετινοβλαστώματος (Rb) και του p53 (Gil και Peters 2006; Poron και Gil 2010). Συγκεκριμένα, τα p15INK4b και p16INK4a στοχεύουν στις εξαρτώμενες από κυκλίνη κινάσες CDK4 και CDK6, αποτρέποντας τη δέσμευση αυτών των πρωτεϊνών σε κυκλίνες τύπου D και, κατά συνέπεια, την αναστολή της φωσφορυλίωσης που προκαλείται από τις CDK4/6 (απενεργοποίηση) του ρετινοβλαστώματος (RB1). Αντιθέτως, η πρωτεΐνη p14ARF δρα πρωτίστως δεσμεύοντας την E3 συμπικτινίνη-πρωτεΐνη λιγάση MDM2, προάγοντας την αποδόμησή της, και συνεπώς καταργεί την αναστολή MDM2 της δραστικότητας του TRP53 (Poron και Gil 2010). Ο τόπος αυτός περιέχει και ένα τέταρτο γονίδιο, τη φωσφορυλάση της μεθυλοθειοαδενοσίνης (MTAP), το οποίο έχει εξόνια που επικαλύπτουν τον τόπο INK4b-ARF-INK4a (Nobori et al. 1996). Το MTAP καταλύει τη φωσφορυλίωση της 5' μεθυλαδενοσίνης (MTA) στο μονοπάτι της πολυαμίνης και έχει επίσης συσχετιστεί με καρκινογένεση (Behrmann et al. 2003; Schmid et al. 1998).

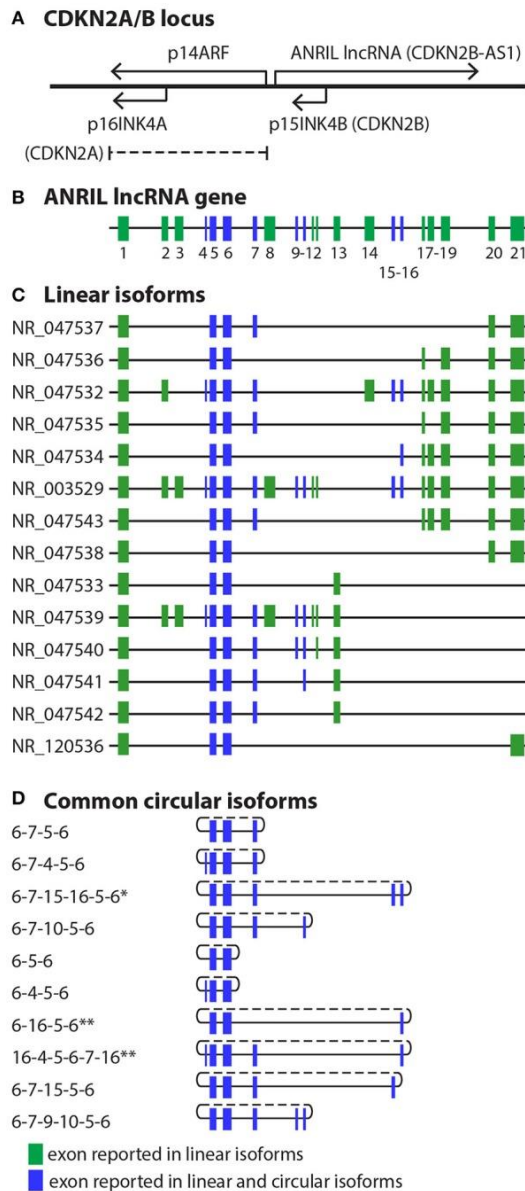
Μελέτες συσχέτισης που έχουν πραγματοποιηθεί σε ολόκληρο το γονιδίωμα έχουν εντοπίσει σε αυτήν την περιοχή έναν αξιοσημείωτο και αυξανόμενο αριθμό αλλαγών στο DNA που σχετίζονται με ασθένειες και πολυμορφισμούς

μονού νουκλεοτιδίου (SNPs). Ιδιαίτερη προσοχή έχει δοθεί στο κατά πόσον αυτές οι μεταλλαγές στην αλληλουχία ANRIL επηρεάζουν τα επίπεδα έκφρασης και/ή την παραλλαγή της μεταγραφικής συρραφής και κατά συνέπεια, την παγκόσμια κυτταρική ομοιόσταση. Επιπλέον, πρόσφατα στοιχεία υποδηλώνουν ότι το ANRIL όχι μόνο μπορεί να ρυθμίσει τα γειτονικά γονίδια στη cis, αλλά επίσης έχει την ικανότητα να ρυθμίζει επιπλέον τρόπους στην trans. Αυτή η δράση μπορεί να αυξήσει περαιτέρω την πολυπλοκότητα των μηχανισμών που επιβάλλονται μέσω του ANRIL και να περιπλέξει την οπτική στην παθογένεση της εκάστοτε νόσου (Aguilo et al.2016).

Ένας αυξανόμενος αριθμός μελετών ολόκληρου του γονιδιώματος (GWAS), έχει εντοπίσει συγκεκριμένες περιοχές που διαθέτουν ισχυρή και μη τυχαία συσχέτιση με κάποια πολύπλοκα ανθρώπινα χαρακτηριστικά που προδιαθέτουν σε νόσους (de los Campos et al. 2010). Αρκετοί πολυμορφισμοί μονού νουκλεοτιδίου (SNPs) έχουν αναγνωρισθεί στον γενετικό τόπο INK4b-ARF-INK4a ο οποίος βρίσκεται στο ανθρώπινο χρωμόσωμα 9p21 και σχετίζεται στενά με την αύξηση της καρδιαγγειακής νόσου (CVD) (de los Campos et al. 2010; al. 2009) το ισχαιμικό εγκεφαλικό επεισόδιο (Gschwendtner et al. 2009; Matarin et al. 2008), το ανεύρυσμα αορτής (Helgadottir et al. 2008), τον διαβήτη τύπου II (Zeggini et al. 2007; Scott et al. 2007), το γλοίωμα (Shete et al. 2009; Wrensch et al. 2009) την προδιάθεση για καρκίνο (Shete et al. 2009; Wrensch et al. 2009; Cunnington et al. 2010; Bishop et al. 2009) και την ενδομητρίωση (Nakaoka et al.2016) μεταξύ άλλων καταστάσεων.

5.1 Ο ΤΟΠΟΣ CDKN2A/B

Το ANRIL, ή CDKN2B-AS1, βρίσκεται στον γενετικό τόπο CDKN2A/B στο 9p21.3. Το γονιδιακό αυτό σύμπλεγμα, που εκτείνεται σε μια γονιδιωματική περιοχή περίπου 350 kb και περιέχει τρία γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες και, συμπληρωματικά σε αυτά, το ANRIL (Εικόνα 19).



Εικόνα 19: Ο τόπος CDKN2A/B και οι ισομορφές του ANRIL (Yahui Kong et al. 2018).

(A) Στον τόπο CDKN2A/B, το ANRIL βρίσκεται συμπληρωματικά των γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες. Το γονίδιο p15INK4B εμπεριέχεται στο ιντρόνιο 1 του ANRIL. (B) Τα μέχρι τώρα ανακαλυφθέντα εξόνια του ANRIL (C,D) Γραμμικές και κυκλικές ισομορφές του ANRIL D) Εξόνια του ANRIL.

Λόγω της ανακάλυψης πρόσθετων εξονίων, τα απομακρυσμένα εξόνια σε ορισμένες κυκλικές ισομορφές έχουν επαναριθμηθεί βάσει των τρεχόντων 21 αναφερόμενων εξονίων.

* Τα εξόνια 15-16 αναφέρονται στα εξόνια 14-15 στο Holdt et al.

** Το εξόνιο 16 αναφέρεται στο εξόνιο 14 στο Sarkar et al. και Burd et al.

Τα γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες περιλαμβάνουν τη φωσφορυλάση της S-μεθυλ-5'-θειοαδενοσίνης (MTAP), το CDKN2A, που κωδικοποιεί με εναλλακτικά ματίσματα τα p16INK4A και p14ARF, και το CDKN2B, που κωδικοποιεί το p15INK4B (Holdt LM et al. 2011; Kong Y et al. 2016). Το MTAP βρίσκεται τελομερικά στο 5ο άκρο του τόπου, 192.000 βάσεις μακριά από το ξεκίνημα του ANRIL. Στο κεντρομερές άκρο του τόπου, το γονίδιο ANRIL περιέχει 19-21 έως τώρα γνωστά εξόνια σε μια περιοχή 126 kb. Το CDKN2A βρίσκεται μεταξύ του MTAP και του ANRIL, κοντά στο πρώτο εξόνιο του ANRIL ενώ το CDKN2B

βρίσκεται εντός του πρώτου ιντρονίου του ANRIL, στην αντίθετη κατεύθυνση. Οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από το CDKN2A και το CDKN2B είναι καταστολείς όγκων με εγκαθιδρυμένους ρόλους στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, την απόπτωση και τη γήρανση (Matheu A et al. 2009; Cánepa ET al. 2007). Τα p16INK4A και p15INK4B είναι κυκλινοεξαρτώμενοι αναστολείς (CDK), που αναστέλλουν τη φωσφορυλίωση του ρετινοβλαστώματος από το CDK4/6. Η πρωτεΐνη p14ARF, ως προϊόν εναλλακτικού ματίσματος του CDKN2A, που εξαιτίας του μετατοπισμένου πλαισίου ανάγνωσης δεν έχει αμινοξική ομολογία με την κύρια παραλλαγή ματίσματος του CDKN2A, το p16INK4A, ρυθμίζει τη δραστηριότητα του p53. Το ANRIL μεταγράφεται από την RNA πολυμεράση II και προκύπτουν πολλές γραμμικές και κυκλικές ισομορφές εξαιτίας του εναλλακτικού ματίσματος.

Σε γενικές γραμμές, οι ρόλοι του ANRIL, περιλαμβάνουν τη ρύθμιση γονιδίων σε cis και trans μέσω της αλληλεπίδρασης με τους PRC (PRC1,PRC2) ρυθμιστές ιστονών, καθώς και αλληλεπιδράσεις μεταξύ RNA-RNA (Congrains A et al. 2013; Kotake Y et al. 2011). Οι γνωστές πλέον βιολογικές επιπτώσεις της δράσης του ANRIL περιλαμβάνουν τη ρύθμιση του πολλαπλασιασμού, της απόπτωσης και της κυτταρικής πρόσφυσης.

5.2 Η ΕΞΕΛΙΚΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ANRIL

Η εξελικτική πορεία του ανθρώπινου γονιδίου ANRIL έχει μελετηθεί με συγκριτική ανάλυση των γονιδιωμάτων 27 οργανισμών, συμπεριλαμβανομένου μη θηλαστικών σπονδυλωτών, μη πλακουντοφόρων θηλαστικών, μη πρωτευόντων πλακουντοφόρων θηλαστικών και πρωτευόντων (He S et al.2013). Το ANRIL προήλθε από τους προγόνους των πλακουντοφόρων θηλαστικών. Αρχικά το γονίδιο περιείχε μόνο λίγα εξόνια και με την πάροδο του χρόνου, το ANRIL εξελίχθηκε διαφορετικά σε κάθε κλάδο, προσθέτοντας εξόνια σε πολλά θηλαστικά και χάνοντας εξόνια σε τρωκτικά. Το πλήρες γονίδιο των 21 εξονίων έχει βρεθεί μόνο στα ανώτερα πρωτεύοντα. Τα γονίδια του ANRIL περιέχουν πολλά επαναλαμβανόμενα στοιχεία, τόσο ιντρονικά όσο και εξονικά και πολλές μελέτες συμπεραίνουν ότι η ιδιότητα του να μεταπηδά σε διάφορες

θέσεις (transposon) αποτελεί την αιτία για τις εξελικτικές αλλαγές στην παρουσία ή την απουσία των εξονίων, τη θέση, την ακολουθία, τη συντήρηση και τη δομή, καθώς και την εισαγωγή θέσεων ματίσματος (He S et al. 2013).

Το πρώιμο ANRIL πιθανότατα δεν είχε μεταγραφική ιδιότητα ή κάποια λειτουργικότητα (He S et al. 2013). Ένα χαρακτηριστικό γνώρισμα των λειτουργικών RNA είναι τα σήματα ματίσματος στα όρια ιντρονίων και εξονίων. Στα όρια ιντρονίων/εξονίων των ανωτέρων πρωτευόντων, τα 191 περιείχαν κανονικά τα σήματα ματίσματος, ενώ 20 δεν τα περιείχαν. Σε κατώτερα θηλαστικά, ωστόσο, μόνο οι μισές συνδέσεις ιντρονίων/εξονίων περιείχαν αναγνωρίσιμα σήματα ματίσματος (He S et al. 2013). Το εύρημα αυτό υποδηλώνει ότι καθώς το ANRIL κέρδιζε εξόνια και οι αλληλουχίες των εξονίων γινόντουσαν όλο και πιο συντηρητικές από είδος σε είδος, με την πάροδο του χρόνου αυξήθηκε και ο αριθμός των σημάτων ματίσματος και απέκτησε λειτουργικότητα. Συμπερασματικά, τα δεδομένα υποδηλώνουν ότι το ANRIL μπορεί να είναι λειτουργικό μόνο στα ανώτερα πρωτεύοντα και ότι η λειτουργικότητα του μπορεί να εισάχθηκε από την ιδιότητα του να μεταπηδά θέσεις (transposon) (He S et al. 2013).

5.3 ΙΣΟΜΟΡΦΕΣ ΤΟΥ ANRIL ΚΑΙ ΔΟΜΗ

Με τουλάχιστον 21 εξόνια [νέα εξόνια ανακαλύφθηκαν μόλις το 2017 (Sarkar D et al. 2017)], το γονίδιο ANRIL μπορεί δυνητικά να δημιουργήσει ένα μεγάλο αριθμό προϊόντων εναλλακτικού ματίσματος. Στην πραγματικότητα, έχουν αναφερθεί πολλές ισομορφές του ANRIL (Εικόνα 19) (Folkersen L et al. 2019) και ο πλήθος των εξονίων έχει αλλάξει με την πάροδο του χρόνου καθώς ανακαλύφθηκαν νέα εξόνια. Μελέτες έχουν ανακαλύψει πολλές ισομορφές του σε κάθε τύπο κυττάρου, όμως σε χαμηλή αφθονία. Έχει αναγνωριστεί σε διάφορους κυτταρικούς τύπους διαφορετικό εύρος ισομορφών, αλλά δεν έχει ακόμη ποσοτικοποιηθεί πλήρως σε πρωτογενή κύτταρα ή ιστούς η έκφραση κάποιας ιστοεξαρτώμενης ισομορφής του ANRIL, με τη χρήση των γνωστών αντιδραστηρίων και τεχνικών. Αποτελεί επίσης, ενδιαφέρον ότι πολλές μελέτες

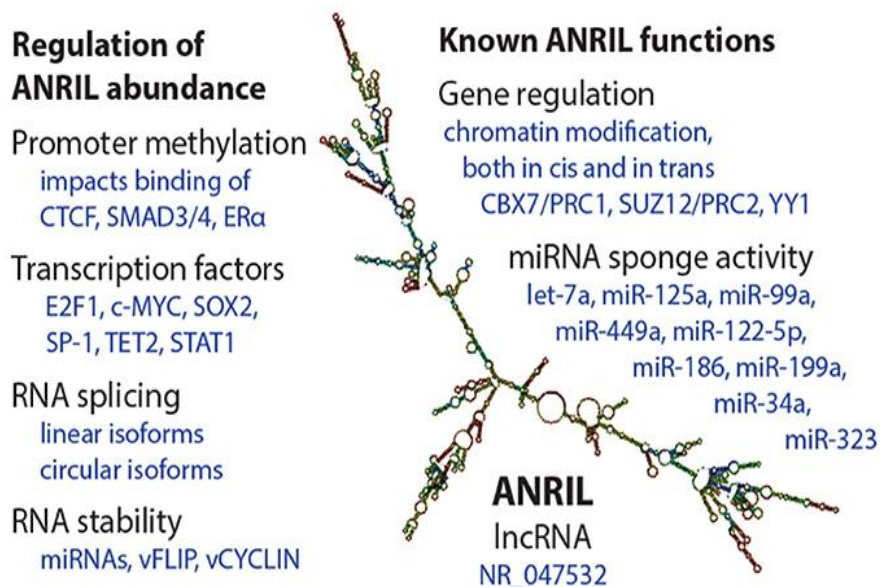
έχουν εντοπίσει τόσο γραμμικές όσο και κυκλικές ισομορφές του ANRIL (Holdt LM et al. 2016; Sarkar D et al.2017; Burd CE et al.2010). Το μακρύτερο ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF) που έχει βρεθεί σε οποιαδήποτε παραλλαγή του ANRIL είναι 86 κωδικόνια, θεμελιώνοντας την ιδέα ότι η λειτουργικότητα αυτού του γονιδίου είναι μέσω της δραστηριότητας του παραγόμενου RNA (Folkersen L et al. 2019).

5.4 ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΗΣ ΜΟΡΦΗ

Η δομή και η λειτουργία των μακρών και μη κωδικών RNAs προκαλεί μεγάλο ενδιαφέρον στην επιστημονική κοινότητα, δεδομένης της ολοένα και αυξανόμενης συμμετοχής τους, στον καρκίνο και την βιολογία των ανώτερων οργανισμών. Έτσι λοιπόν είναι πολύ σημαντικό να γίνει κατανοητή η δομή τους όσο περίπλοκη και να είναι. Ένας τρόπος είναι να συγκριθούν οι ισομορφές του ANRIL με άλλες γνωστές μακρές και μη κωδικές αλυσίδες RNA ως προς τα δομικά τους στοιχεία. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε το εργαλείο MONSTER, που στόχο είχε να συγκρίνει το ANRIL με δύο άλλα lncRNA που εμφάνιζαν παρόμοια λειτουργία: το HOTAIR και το COLDAIR (Jeck WR et al.2013). Το MONSTER μπορεί να αναγνωρίσει μια δευτερογενή μορφή σε περιοχές που είναι πιθανό το RNA να είναι μονόκλωνο ή δίκλωνο, να υπάρχουν φουρκέτες εσωτερικές λούπες και προεξοχές. Όταν συγκρίθηκαν τα HOTAIR, COLDAIR και ANRIL, εντοπίστηκαν πολλές κοινές δομές και αναπτύχθηκαν θεωρητικά δομικά μοτίβα που αφορούσαν την κοινή τους λειτουργία σε επιγενετικό επίπεδο και η οποία θα μπορούσε να οδηγήσει στη μοριακή κατανόηση του μηχανισμού δράσης του ANRIL σε μελλοντικές μελέτες (Jeck WR et al.2013). Μια άλλη μελέτη, εντόπισε την περιοχή του ANRIL που αλληλοεπιδρά με το CBX7, ένα πολυκομβικό ανασταλτικό στοιχείο και η ανάλυση της δευτερογενούς δομής του αποκάλυψε σημαντικής δεσμευτικής ικανότητας μοτίβα φουρκέτας, με το CBX7 (Yap KL et al. 2010).

5.5 ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΑΦΘΟΝΙΑΣ ΤΩΝ ΜΕΤΑΓΡΑΦΩΝ ΤΟΥ ANRIL

Η αφθονία των μεταγράφων του ANRIL καθορίζεται από τη μεταγραφική δραστηριότητα του υποκινητή, τις αποφάσεις για τους τύπους ματίσματος που θα γίνουν και τη σταθερότητα του RNA (Εικόνα 20). Όπως και σε άλλα γονίδια, η δραστηριότητα του υποκινητή του ANRIL επηρεάζεται από τον επιγενετικό του έλεγχο και το επίπεδο κατάληψης των μεταγραφικών του παραγόντων. Είναι ενδιαφέρον ότι τα επιδημιολογικά ευρήματα υποδηλώνουν πως η επιγενετική του ρύθμιση, μέσω της μεθυλίωσης του υποκινητή, έχει σημαντικές και μακροχρόνιες συνέπειες στη λειτουργία των ιστών (Lillycrop K et al. 2017; Curtis E Met al. 2017; Murray R et al. 2016). Ως εκ τούτου, το ANRIL μπορεί να αποτελέσει ένα βιοδείκτη του αντικτύπου των περιβαλλοντικών παραγόντων που παίζουν ρόλο στην υγεία των ενηλίκων, από μικρή κιόλας ηλικία.



Εικόνα 20: Περίληψη της ρύθμισης και των λειτουργιών του ANRIL lncRNA. Στα αριστερά, μερικοί από τους γνωστούς μηχανισμούς με τους οποίους ρυθμίζεται η αφθονία του ANRIL, σε μεταγραφικό και μετα-μεταγραφικό επίπεδο. Στα δεξιά, απεικονίζεται μια επιλογή γνωστών κυτταρικών λειτουργιών του ANRIL. Στο κέντρο αναγράφεται μια πολύ κοινή και μακρά ισομορφή του ANRIL, η δομική πρόβλεψη της οποίας δημιουργήθηκε από τους Gruber et al. 2018 (Yahui Kong et al. 2018).

5.6 ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ ΤΟΥ ΥΠΟΚΙΝΗΤΗ ΤΟΥ ANRIL

Επιδημιολογικά και πειραματικά ευρήματα δείχνουν ότι η μεθυλίωση του υποκινητή του ANRIL μπορεί να ρυθμίσει την έκφραση του γονιδίου του ANRIL, ένα γεγονός με εξαιρετικά μεγάλη λειτουργική σημασία. Τα πρώτα εξόνια του ANRIL και του p14ARF έχουν απόσταση μόνο 300 ζεύγη βάσεων, με «κεφαλή προς κεφαλή» αντινοσηματική κατεύθυνση και με την διαγονιδιακή μεταξύ τους περιοχή να είναι ένας αμφίδρομος υποκινητής (Pasmant E et al. 2011, Sato K et al. 2010, Wan G et al. 2013). Σε *in silico* ανάλυση των δεδομένων (Ernst J et al. 2011) αποκαλύφθηκε ότι αυτή η περιοχή ρυθμίζει τόσο τη δραστηριότητα του υποκινητή όσο και του ενισχυτή και η υπερευαισθησία της DNAσης I σε αυτήν την περιοχή, μεταξύ διαφόρων κυτταρικών τύπων, υποδηλώνει ότι αυτή η περιοχή είναι ρυθμιστική. Αυτή η περιοχή δεσμεύεται από τον CTCF, έναν μεταγραφικό καταστολέα, που μονώνει υποκινητές από κάθε δραστηριότητα ενίσχυσης. Παραδόξως, η σύνδεση του CTCF στον υποκινητή του ANRIL συσχετίστηκε με την τριμεθυλίωση της H3K4 ιστόνης σε ενεργή χρωματίνη (Rodriguez C et al. 2010). Η δέσμευση του CTCF, η έκφραση του ANRIL και η έκφραση του p14ARF παρεμποδίζονταν με τη μεθυλίωση των τοπικών CpG νήσων και αυξάνονταν με την απομεθυλίωση τους. Η καταστολή του CTCF απέτρεψε την επαγόμενη από την απομεθυλίωση έκφραση του ANRIL και του p14ARF, επιβεβαιώνοντας ότι ο CTCF αποτελεί έναν ευαίσθητο στη μεθυλίωση θετικό ρυθμιστή της δραστηριότητας του υποκινητή του ANRIL (Rodriguez C et al. 2010).

Επιπρόσθετες ενδείξεις, υποστηρίζουν τη λειτουργική σημασία των θέσεων CpG για τη δραστηριότητα του υποκινητή του ANRIL, της τοπικής γονιδιακής έκφρασης και της συνδεσιμότητάς των μεταγραφικών παραγόντων. Τυχόν μεταλλαξογένεση των θέσεων CpG επηρεάζει τόσο τη δραστηριότητα του υποκινητή του ANRIL όσο και του p14ARF (Lillycrop K et al. 2017; Curtis EM et al. 2017). Η κατάσταση μεθυλίωσης αρκετών CpG μεθυλιωτικά διαφοροποιημένων περιοχών στο ANRIL σε ιστούς του ομφάλιου λώρου, συσχετίστηκε θετικά με την αφθονία του γραμμικού αλλά όχι του κυκλικού ANRIL, ενώ επίσης συσχετίστηκε αντιστρόφως με την έκφραση των p14ARF και p16INK4a (Lillycrop K et al. 2017). Η μεθυλίωση των CpG επηρεάζει και τους

υπόλοιπους μεταγραφικούς παράγοντες που συνδέονται στον υποκινητή του ANRIL ώστε να ρυθμιστεί η downstream ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, όπως συμβαίνει στην γάμμα ιντερφερόνη, SMAD3/4 και ERα (Lillycrop K et al. 2017; Curtis EM et al. 2017). Επίσης, η κατάσταση μεθυλίωσης των CpG νήσων γύρω από το σημείο έναρξης της μεταγραφής του p16INK4A απέδειξε επίσης ότι συντονίζει τη μεταγραφή των ANRIL και p16INK4A στα ανθρώπινα κύτταρα (Gan Y et al. 2016). Δεδομένων των πολλαπλών πρωτεϊνικών συμπλεγμάτων που συνδέονται σε όλα τα CpG νησιά, και της μεταβαλλόμενης ποσοτικής επίδρασης των μεταλλαγών κάθε CpG νήσου στις ισομορφές του ANRIL, αλλά και στην έκφραση του γονιδιακού τύπου, συμπεραίνουμε ότι η ρύθμιση φαίνεται να είναι αρκετά πολύπλοκη.

5.7 ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΤΟΥ ANRIL ΜΕΣΩ ΤΩΝ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ

Η έκφραση του ANRIL βρέθηκε να επηρεάζεται από διάφορες κυτταρικές διεργασίες όπως το γονοτοξικό στρες, την ογκογένεση, τη γήρανση και τις φλεγμονές. Στην γονιδιακή περιοχή ανάμεσα στο ANRIL και το p14ARF, όπου βρίσκεται ο αμφίδρομος υποκινητής, η δραστηριότητα επηρεάζεται από έναν ρυθμιστή του κυτταρικού κύκλου, τον E2F1 (Sato K et al. 2010; Wan G et al. 2013). Σε άμεση ανταπόκριση στο γονοτοξικό στρες ενδεχομένης βλάβης του DNA, ο E2F1 ενεργοποιεί μεταγραφικά το ANRIL με ATM (Ataxia-telangiectasia-mutate) εξαρτώμενο τρόπο (Wan G et al. 2013; Özgür E et al. 2013). Σε αυτήν την περίπτωση, το ANRIL πιστεύεται ότι προωθεί την κυτταρική ανάπτυξη καταστέλλοντας τους αναστολείς της οικογένειας του τύπου INK, μετά την ολοκλήρωση της επιδιόρθωσης του DNA, επιτρέποντας την επανεισαγωγή του στον κυτταρικό κύκλο (Wan G et al. 2013). Σε καρκινικά κύτταρα, ο υποκινητής του ANRIL επίσης, ήταν ανταποκρινόμενος στον E2F2 (Sato K et al. 2010). Επιπροσθέτως, αρκετά γνωστά και ισχυρά ογκογονίδια βρέθηκε ότι ρυθμίζουν την έκφραση του ANRIL σε διαφορετικούς τύπους καρκίνου. Στον καρκίνο του πνεύμονα, το c-MYC συνδέεται με ένα E-box στον υποκινητή του ANRIL και επάγει την έκφραση του (Lu Y et al. 2016). Στο ρινοφαρυγγικό καρκίνωμα, ο

μεταγραφικός παράγοντας SOX2 φάνηκε να συνδέεται απευθείας με τον υποκινητή του ANRIL και να ενεργοποιεί τη μεταγραφή αυτού και του downstream τελεστή του την β-κατενίνη (Wu JH et al. 2018). Στον καρκίνο του ήπατος, το SP1 δεσμεύει τον υποκινητή του ANRIL και ρυθμίζει θετικά τη μεταγραφή του ANRIL (Huang M et al. 2015). Από την άλλη πλευρά, το TET2, ένας ογκοκαταστολέας του καρκίνου του στομάχου, συνδέεται με την περιοχή του υποκινητή του ANRIL και κατά συνέπεια ρυθμίζει την έκφραση του, όπως επίσης και των p16INK4a, p15INK4b και p14ARF (Deng W et al. 2016). Η ρύθμιση της μεταγραφικής ιδιότητας του ANRIL εμπλέκεται όχι μόνο σε βλάβες του DNA, των κυττάρων και την ογκογένεση, αλλά και σε διαδικασίες όπως η γήρανση των κυττάρων και η φλεγμονή. Στην γήρανση, το ογκογονίδιο Ras βρέθηκε να μειώνει την έκφραση του ANRIL (Kotake Y et al. 2011, Yap KL et al. 2010, Kotake Y et al. 2016). Στις φλεγμονές, έχει αναφερθεί, ότι το STAT1 ενεργοποιεί το ANRIL σε αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα. Συνοψίζοντας, όλα τα δεδομένα υποστηρίζουν τον σημαντικό ρόλο που έχει το ANRIL στην μεταγραφική του ρύθμιση, μέσα σε ένα εύρος κυτταρικών διεργασιών και αποτελεσμάτων, η οποία είναι ειδική σε κάθε κυτταρικό τύπο.

5.8 Η ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ ΜΑΤΙΣΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ANRIL

Η κυτταρική διακύμανση που εξαρτάται από την αφθονία των διαφορετικών ισομορφών του ANRIL, υποδηλώνει ότι το μάτισμα μπορεί να είναι ένα ρυθμιστικό σημείο (Burd CE et al. 2010, Holdt LM et al. 2010). Σχεδόν τίποτα δεν είναι γνωστό για τις αποφάσεις ματίσματος του ANRIL. Περαιτέρω φως σε αυτήν την διαδικασία έχουν ρίξει οι πολυμορφισμοί (SNPs) του ANRIL που έχουν συσχετισθεί με ασθένειες. Στα λεμφοκύτταρα, το SNP rs10757278 που σχετίζεται με τη στεφανιαία νόσο (CAD) συσχετίζεται με την αφθονία ορισμένων κυκλικών (14-5 και 4-6) και γραμμικών ισομορφών (Burd CE et al. 2010). Το αλληλόμορφο rs10757278 βρέθηκε ότι αναστέλλει την παράλειψη του εξονίου 15, υποκινώντας το κυκλικό ANRIL να τελιώνει στο εξόνιο 14 (Burd CE et al. 2010). Οι μηχανισμοί που ρυθμίζουν το μάτισμα του ANRIL απαιτούν περαιτέρω μελέτη.

5.9 Η ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΦΘΟΝΙΑ ΤΩΝ miRNAs

Έχει βρεθεί ότι το ANRIL επηρεάζει την έκφραση διαφόρων γονιδίων μέσω των δικτύων miRNA. Ρυθμίζει τα miRNAs τόσο στο επιγενετικό επίπεδο, μέσω της μεταγραφικής ρύθμισης του miRNA, όσο και μέσω της άμεσης σύνδεσης στο miRNA, δρώντας ως «σφουγγάρι». Σε καρκινικά κύτταρα του γαστρικού συστήματος, το ANRIL αποσιωπά επιγενετικά τα miR-99a / miR-449a μέσω του PRC2 μηχανισμού (Zhang E et al. 2014). Γενικά, η έκφραση του ANRIL και των miRNA στόχων του έχει συσχετιστεί αρνητικά στους ιστούς και τις κυτταρικές σειρές (Zhang E et al. 2014; Zhang E et al. 2017; Ma J, Dong X et al; 2018; Zhao B et al. 2018; Xu ST et al. 2017). Το ANRIL έχει περιγραφεί ότι έχει προογκογονικές επιδράσεις δρώντας ως «σφουγγάρι» των miRNAs. Από την άλλη πλευρά, το κυκλικό ANRIL που περιέχει τα εξόνια 5-6-7 βρέθηκε να στερείται της miRNA σπογγώδους ιδιότητας (Holdt LM et al. 2016). Αναστολή των miRNAs, μπορεί να αντιστρέψει τις επιδράσεις της αποσιώπησης του ANRIL.

5.10 Η ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ANRIL ΣΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Το ANRIL έχει πολλαπλές επιπτώσεις στη βιολογία των κυττάρων, συμπεριλαμβανομένης της επιρροής του στον πολλαπλασιασμό, τη γήρανση, την απόπτωση, την αναδιαμόρφωση της εξωκυτταρικής μήτρας και τις φλεγμονές (Congrains A et al. 2012). Στον καρκίνο, οι αλληλεπιδράσεις ANRIL-miRNA ρυθμίζουν δίκτυα καθοδικών στόχων miRNAs, προωθώντας έναν ογκογόνο ρόλο για το ANRIL στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, τη μετάσταση, την εισβολή, την ραδιοαντοχή, την κυτταροτοξικότητα και την απόπτωση, μέσω πολλών διαφορετικών μονοπατιών (Zhang E et al. 2014; Zhang E et al. 2017; Ma J, Dong X et al; 2018; Zhao B et al. 2018; Xu ST et al. 2017). Συγκεκριμένα, η καταστολή των αναστολέων p14ARF, p15INK4B και p16INK4A του κυτταρικού κύκλου, αυξάνει τον πολλαπλασιασμό, μειώνει τη γήρανση και συμβάλλει στην απόκριση βλαβών του DNA (Kotake Y et al. 2011, Yap KL et al. 2010, Wan G et al. 2013). Η επιγενετική καταστολή τύπου Kruppel (KLF2), που προκαλείται από το PRC (polycomb repressive complex) του παράγοντα 2, επηρεάζει τον πολλαπλασιασμό και την απόπτωση (Huang M et al. 2015, Nie F et al. 2015).

Επίσης, η συνεργασία μεταξύ του ANRIL και του YY1 που σχετίζεται με το PRC, αυξάνει τους φλεγμονώδεις μεσολαβητές IL-6, IL-8, που εξαρτώνται από τον TNF-άλφα μέσω του NF-kB (Zhou X et al. 2016). Το ANRIL επηρεάζει την κυτταρική απάντηση στο οξειδωτικό στρες μέσω μιας miR-125a ρύθμισης του MCL-1 (Li R et al. 2017). Κυκλικές ισομορφές του ANRIL βρέθηκαν να ρυθμίζουν τη βιογένεση του ριβοσώματος σε κύτταρα αγγειακού λείου μυός (Holdt LM et al. 2016).

5.11 ANRIL ΚΑΙ ΠΑΧΥΣΑΡΚΙΑ/ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΙΚΗ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ

Παρόλο που οι μελέτες συσχέτισης ολόκληρου του γονιδιώματος δεν υποδηλώνουν καμία σύνδεση μεταξύ των SNPs του τόπου CDKN2A/B και του κινδύνου παχυσαρκίας στον πληθυσμό των ενηλίκων, αποτελεί ενδιαφέρον ότι το ANRIL μπορεί να είναι τελικά ένας γονιδιωματικός τύπος περιβαλλοντικής επιγενετικής επίδρασης για την παχυσαρκία. Ο υποκινητής του ANRIL περιέχει τοποθεσίες μεθυλίωσης των CpG που ρυθμίζονται διαφοροποιημένα από δείγμα σε δείγμα. Σε ανθρώπινους ιστούς που λαμβάνονται κατά τη γέννηση, χαμηλότερη μεθυλίωση CpG κατά την βρεφική ηλικία προέβλεπε υψηλότερη μάζα λίπους στην ηλικία των 6 ετών, καθώς και αυξημένο μέγεθος οστού, ανοργανοποίηση και πυκνότητα (Lillycrop K et al. 2017; Curtis EM et al. 2017). Η μεθυλίωση του υποκινητή του ANRIL συσχετίστηκε επίσης αρνητικά με το BMI σε πρόσφατα δείγματα περιφερικού αίματος εφήβων και σε λιπώδη ιστό ενηλίκων (Lillycrop K et al. 2017). Η μεθυλίωση αυτών των CpG θέσεων αύξησε την αφθονία του ANRIL RNA στους ιστούς, με έναν μηχανισμό ο οποίος συμπεριλαμβάνει και την αυξημένη δραστηριότητα ενός στοιχείου οιστρογονικής απάντησης. Λειτουργικές μελέτες στη κυτταρική σειρά του λιποσαρκώματος έδειξαν ότι η σύνδεση του μεταγραφικού παράγοντα σε ένα παρακείμενο ERE μπορούσε να ενισχυθεί με μεθυλίωση, ενώ παράλληλα η οιστραδιόλη αύξησε την έκφραση του ANRIL (Lillycrop K et al. 2017).

6. ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΣΤΟ ANRIL

Οι πιο γνωστοί πολυμορφισμοί βρίσκονται σε διαγονιδιακές περιοχές και ιντρόνια και όχι σε κωδικοποιητικές περιοχές, γεγονός που υποδηλώνει ότι σχετίζονται με τον κίνδυνο εμφάνισης νοσημάτων μέσω της ρύθμισης των επιπέδων έκφρασης των κοντινών γονιδίων (Nakaoka et al. 2016).

Δεν έχει βρεθεί ακόμα κάποιο εξακριβωμένο μοτίβο που να συνδέει την έκφραση πολυμορφισμών με την αφθονία του ANRIL. Για τις περισσότερες ομάδες πολυμορφισμών, τα πιο ενοχοποιημένα SNPs αναφέρεται ότι αυξάνουν τόσο, όσο και μειώνουν τα επίπεδα του ANRIL αναλόγως της εκάστοτε μελέτης. Είναι απολύτως πιθανό να είναι όλα τα αντικρουόμενα αποτελέσματα σωστά. Για παράδειγμα, ένας πολυμορφισμός που σχετίζεται με τη στεφανιαία νόσο θα μπορούσε να αυξήσει τις προ-πολλαπλασιαστικές ισομορφές του ANRIL στα κύτταρα του ενδοθηλιακού, μακροφάγου ή αγγειακού λείου μυός ώστε να οδηγήσει σε αθηροσκλήρωση, ενώ ο κίνδυνος για διαβήτη σχετιζόμενου με πολυμορφισμό, στην ίδια θέση θα μπορούσε να μειώσει τις πολλαπλασιαστικές ισομορφές του ANRIL στα βήτα κύτταρα ώστε να περιορίσει τη μάζα των βήτα κυττάρων (Yahui Kong et al. 2018). Οι μελέτες λοιπόν, δείχνουν ότι οι πολυμορφισμοί του γονιδίου ANRIL μπορούν να επηρεάσουν την έκφραση και τη λειτουργία του. Ο τύπος αυτός, όπως προαναφέρθηκε, σχετίζεται ισχυρά με τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου, αθηροσκλήρωσης, διαβήτη τύπου II, εγκεφαλικού επεισοδίου, ανευρύσματος, περιοδοντίτιδας, νόσου του Αλτσχάιμερ, γήρανσης, αδυναμίας, γλαυκώματος, ενδομητρίωσης, σκλήρυνσης κατά πλάκας, υπέρτασης και άλλων (Kong Y et al. 2016; Rezazadeh M et al. 2018).

Ενσωματώνοντας πληροφορίες από δημοσιεύσεις και την βάση δεδομένων του NCBI (Ward LD et al. 2016), διαπιστώνουμε ότι οι πολυμορφισμοί του ANRIL που σχετίζονται με ενδεχόμενα νοσήματα και ρυθμίζουν την έκφραση του γονιδιακού αυτού τύπου, εμπίπτουν σε περίπου έξι ομάδες (Εικόνα 21). Οι πολυμορφισμοί της Α ομάδας, ενώ βρίσκονται μέσα στα ιντρόνια του ANRIL, επηρεάζουν το CDKN2A/B αλλά όχι τη βιολογία του ANRIL (Cunnington MS et al.

2010; Johnson AD et al. 2013; Hungate EA et al. 2016). Όλες οι άλλες ομάδες πολυμορφισμών σχετίζονται με επιπτώσεις στο ίδιο το ANRIL, παρόλα αυτά υπάρχουν αναφορές που συχνά περιγράφουν μια αντίθετη κατεύθυνση. Ορισμένοι πολυμορφισμοί αναφέρεται ότι βρίσκονται σε περιοχές ενισχυτών (Harismendy O et al. 2011, Jarinova O et al. 2009; Hungate EA et al. 2016) ή επηρεάζουν το μάτισμα του ANRIL (Burd CE et al. 2010) ή και τη δευτερεύουσα δομή (Cheng M et al. 2017; Gong W et al. 2017).

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, θα μελετήσουμε δύο πολυμορφισμούς που έχουν στοχοποιηθεί εκτός των άλλων, για τη σκλήρυνση κατά πλάκας, τον RS4977574 και RS10757278. Βασισμένοι σε προηγούμενες δημοσιεύσεις που κατέληξαν σε στατιστικώς σημαντικά αποτελέσματα για τους συγκεκριμένους πολυμορφισμούς, θα μελετήσουμε την εμφάνιση των αντίστοιχων αλληλομόρφων σε γυναίκες που έχουν ακολουθήσει πρωτόκολλα εξωσωματικής γονιμοποίησης.

SNP group	Location in ANRIL	SNPs	Diseases associated	Cell type tested	Impact	References
A	Intron 1	rs2811712 rs598664 rs3218018 rs3218005 rs662463	Frailty, cancers, diabetes, MI, CAC	Blood, leukocytes	Altered <i>CDKN2A</i> and <i>CDKN2B</i> expression, but no change in <i>ANRIL</i> expression or not reported	(14, 48, 50, 64, 65)
B	Intron 2 Intron 1	rs3217992 rs3218020	CAD, glaucoma, cancer	Blood	Risk SNPs decrease <i>ANRIL</i> expression	(14, 48)
C	Intron 1	rs1063192	CAD, glaucoma, stroke, MI, diabetes, cancers	Blood, lympho-blastoid cells, HUVEC, lymphocytes, islets	Increase/decrease <i>ANRIL</i> expression. Possible enhancer. Disrupt miRNA binding site. Reduce beta cell proliferation index	(14, 48, 66–68)
D	Exon 2 Intron 2	rs564398 rs7865618	Cancers, CAD, Stroke, MI, CAC, glaucoma, cancers	Blood, PBMC, lymphoblastoid cells, HUVEC, leukocytes	Exonic SNPs change predicted <i>ANRIL</i> free energy calculation, may impact secondary structure. Most intronic SNPs decrease <i>ANRIL</i> expression; possible predicted enhancers	(4, 14, 43, 48, 50, 69, 70)
	Intron 1	rs7044859 rs496892				
E	Exon 2	rs10965215	CAD, stroke, intracranial aneurysm, MI, endometriosis, hypertension, cancers	Blood, PBMC, PBTL, VSMC, atherosclerotic plaque, primary vascular tissue, lympho-blastoid, HUVEC	Isoform-specific <i>ANRIL</i> up/downregulation. Experimentally tested enhancer regions. rs10757278 may impact <i>ANRIL</i> splicing, promoting circ <i>ANRIL</i> production	(8, 14, 16, 43, 44, 48, 49, 51, 71–73)
	Intron 3	rs2151280				
	Exon 6	rs10738605				
	Intron 6	rs944799				
	Intron 13	rs10116277 rs6475606 rs10738607 rs10757274				
F	Intron 14 Intron 18	rs10757278 rs2383206 rs2383207	Type 2 diabetes	Blood, islets	Decrease/increase <i>ANRIL</i> expression, Predicted enhancer region	(48, 68)
	Intron 19	rs1333045				
	Distal to exon 21	rs10811656 rs1333049				
	Distal to exon 21	rs2383208 rs10811661				

Εικόνα 21:
Πολυμορφισμοί στο (ή κοντά) στο ANRIL που σχετίζονται με νοσήματα και ρυθμίζουν την γονιδιακή έκφραση του τύπου (Yahui Kong et al. 2018).

Groups A-F are defined loosely based on linkage disequilibrium (defined as LD>0.8 in Caucasian population in LDHap) and by predicted or tested impact on ANRIL expression or structure. Intron and exon numbers are based on 21 exons.

II. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η μελέτη των πολυμορφισμών, SNPs, του γονιδίου ANRIL σε γυναίκες που ακολουθούν πρωτόκολλα εξωσωματικής γονιμοποίησης καθώς και η μελέτη της οποιασδήποτε συσχέτισης των πολυμορφισμών του γονιδίου αυτού με την υπογονιμότητα. Έτσι, συγκρίνοντας τα μοριακά αποτελέσματα της παρούσας εργασίας με την πρόοδο των γυναικών στα πρωτόκολλα εξωσωματικής, θα κάνουμε υποθέσεις εκ των συμπερασμάτων, οι οποίες θα μπορέσουν να αποτελέσουν έναυσμα για ειδικότερες μελέτες στο μέλλον.

7. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

7.1 ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΥΠΟ ΜΕΛΕΤΗ ΚΑΙ ΔΕΙΓΜΑΤΑ

Για την πραγματοποίηση της παρούσας μελέτης συλλέχθηκαν δείγματα περιφερικού αίματος από 53 γυναίκες που προσήλθαν στη Μονάδα Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής της Α΄ Μαιευτικής και Γυναικολογικής Κλινικής του Νοσοκομείου Αλεξάνδρα. Στα τυχαίως διαλεγμένα αυτά δείγματα κάποιες από αυτές τις γυναίκες είχαν πτωχή απάντηση στο ιστορικό τους και κάποιες καλή κατά τη διάρκεια της ωοθηκικής διέγερσης. Στο εργαστήριο μελετήθηκαν οι RS4977574 και RS10757278 πολυμορφισμοί για ομοζυγωτία ή ετεροζυγωτία σε όλες τις γυναίκες. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο της Εξωσωματικής Γονιμοποίησης της Μονάδας Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής της Α΄ Μαιευτικής και Γυναικολογικής Κλινικής του Νοσοκομείου Αλεξάνδρα.

7.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ/ DNA EXTRACTION

Το απομονωμένο DNA έχει μέγεθος 20-50 kb και είναι κατάλληλο για να ενισχυθεί με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (polymerase chain reaction, PCR). Το περιφερικό αίμα λαμβάνεται με απλή αιμοληψία περιφερικού αίματος (2-3 ml) και τοποθετείται σε σωληνάριο που περιέχει αντιπηκτικό, συγκεκριμένα ηπαρίνη ή EDTA, για να αποφευχθεί η πήξη (φιαλίδιο γενικής αίματος).

Η απομόνωση του γονιδιωματικού DNA από περιφερικό αίμα περιλαμβάνει τη λύση των κυττάρων (cell lysis), την κατακρήμνιση των πρωτεϊνών (protein precipitation) και την κατακρήμνιση του DNA (DNA precipitation). Το εμπορικά διαθέσιμο σκεύασμα PureLink Genomic DNA Kits for purification of genomic DNA της Invitrogen by life technologies επιτρέπει την γρήγορη και αποτελεσματική απομόνωση του γονιδιωματικού DNA από κύτταρα και ιστούς

θηλαστικών, φρέσκα ή κατεψυγμένα δείγματα αίματος, βαμβακοφόρους στυλεούς και ιστούς μονιμοποιημένους με φορμαλίνη και εγκλεισμένους σε παραφίνη (formalin-fixed paraffin-embedded tissues). Σε ένα αποστειρωμένο σωληνάριο φυγοκέντρησης (Eppendorf tube του 1.5 ml) προστίθενται 200 µl φρέσκου ή κατεψυγμένου περιφερικού αίματος μαζί με 200 µl PureLink Genomic Lysis/ Binding Buffer, 20 µl πρωτεΐνάσης K και 20 µl RNάσης A. Το Genomic Lysis/ Binding Buffer προκαλεί την πλήρη διάρρηξη της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, των ενδοκυτταρικών μεμβρανών και των οργανιδίων προκειμένου να απελευθερωθεί στο διάλυμα το DNA που ανευρίσκεται στον πυρήνα των λευκών αιμοσφαιρίων του περιφερικού αίματος. Η πρωτεΐνάση K αποικοδομεί τις πρωτεΐνες και αδρανοποιεί τις νουκλεάσες που μπορούν να βλάψουν τα καθαρισμένα μόρια του DNA. Η ριβονουκλεάση A (RNάση A) είναι μια ενδοριβονουκλεάση που αποικοδομεί το μονόκλωνο RNA (single-stranded RNA), έχει συγκέντρωση 20 mg RNase A/mL σε 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA και προέρχεται από πάγκρεας βοός.

Το προϊόν λύσης επωάζεται στο υδατόλουτρο στους 55o C για 10 λεπτά για να προωθηθεί η πέψη των πρωτεϊνών. Το γονιδιωματικό DNA βρίσκεται πακεταρισμένο σε σύμπλοκα DNA-πρωτεϊνών, που ονομάζονται πυρηνικά χρωμοσώματα και για να θεωρείται πετυχημένη η διαδικασία της απομόνωσης του γονιδιωματικού DNA πρέπει να έχει αποδώσει ένα μόριο DNA απαλλαγμένο από πρωτεΐνες για να μπορεί να χρησιμοποιηθεί με αξιοπιστία για PCR. Έπειτα προσθέτουμε αιθανόλη για την κατακρήμνιση του DNA και μεταφέρουμε το ομογενοποιημένο διάλυμα σε μια περιστρεφόμενη στήλη, όπου μετά από φυγοκέντρηση το DNA που έχει απελευθερωθεί στο διάλυμα δεσμεύεται στην ειδική μεμβράνη της περιστρεφόμενης στήλης PureLink Spin Column, ενώ οι πρωτεΐνες και τα μεμβρανικά υπολείμματα που περιέχονται στο διάλυμα δεν συγκρατούνται στη μεμβράνη, αλλά εκλούονται στο σωλήνα συλλογής, ο οποίος απορρίπτεται. Ακολουθούν δύο διαδοχικές φυγοκεντρήσεις της περιστρεφόμενης στήλης με δύο ρυθμιστικά διαλύματα, ώστε να εξασφαλιστεί η απομάκρυνση τυχόν υπολειμμάτων που έχουν δεσμευθεί στη μεμβράνη και να βελτιστοποιηθεί με αυτόν τον τρόπο η καθαρότητα του DNA. Η συναπομόνωση πρωτεϊνών μειώνει την επιτυχία της PCR, γι'αυτό είναι σημαντικό να

ελαχιστοποιηθούν ή ακόμη καλύτερα να εξαλειφθούν τα στοιχεία εκτός του DNA που δεσμεύονται στη μεμβράνη της στήλης. Το καθαρισμένο DNA εκλύεται από τη μεμβράνη της περιστρεφόμενης στήλης PureLink Spin Column χρησιμοποιώντας διάλυμα έκπλυσης, Elution Buffer (10 mM Tris-HCl, pH 9.0, 0.1 mM EDTA). Η στήλη απορρίπτεται και το σωληνάριο συλλογής που περιέχει το απομονωμένο DNA σε ρυθμιστικό διάλυμα αποθηκεύεται στους -20o C για να χρησιμοποιηθεί για ενίσχυση του DNA και ανίχνευση πολυμορφισμών σε γονίδια με PCR.

Το πρωτόκολλο (PureLink Genomic DNA Kits Manual, Life Technologies) που χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση του γονιδιωματικού DNA από περιφερικό αίμα περιλαμβάνει τα ακόλουθα βήματα:

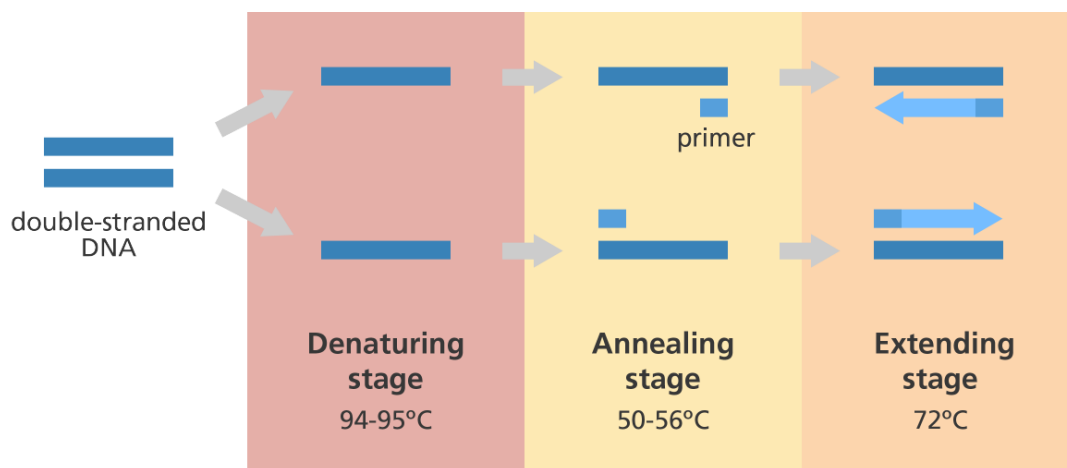
1. Προσθέτουμε 200 μl φρέσκου ή κατεψυγμένου αίματος σε ένα αποστειρωμένο σωληνάριο φυγοκέντρησης Eppendorf.
2. Προσθέτουμε 20 μl πρωτεΐνης K.
3. Προσθέτουμε 20 μl RNάσης A, αναδεύουμε καλά με αυτόματο αναδευτήρα τύπου δίνης (Vortex) και επωάζουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 2 λεπτά.
4. Προσθέτουμε 200 μl PureLink Genomic Lysis/ Binding Buffer και αναδεύουμε καλά με το Vortex για να αποκτήσουμε ένα ομογενοποιημένο διάλυμα.
5. Επωάζουμε στο υδατόλουτρο στους 55o C για 10 λεπτά για να προωθήσουμε την πέψη των πρωτεϊνών.
6. Προσθέτουμε 200 μl 96-100% αιθανόλη.
7. Αναδεύουμε καλά με το Vortex για 5 δευτερόλεπτα για να παραχθεί ένα ομογενοποιημένο διάλυμα.
8. Μεταφέρουμε το διάλυμα (~640 μl) στην περιστρεφόμενη στήλη PureLink Spin Column.
9. Φυγοκεντρούμε τη στήλη σε 10.000 x g (12.500 rpm) για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

10. Απορρίπτουμε το σωλήνα συλλογής και τοποθετούμε τη στήλη σε ένα καθαρό σωλήνα συλλογής.
11. Προσθέτουμε 500 μl Wash Buffer 1 στη στήλη.
12. Φυγοκεντρούμε τη στήλη σε 10.000 x g (12.500 rpm) για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
13. Απορρίπτουμε το σωλήνα συλλογής και τοποθετούμε τη στήλη σε ένα καθαρό σωλήνα συλλογής.
14. Προσθέτουμε 500 μl Wash Buffer 2 στη στήλη.
15. Φυγοκεντρούμε τη στήλη στη μέγιστη ταχύτητα για 4 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Απορρίπτουμε το σωλήνα συλλογής.
16. Τοποθετούμε τη στήλη σε έναν αποστειρωμένο σωλήνα μικροφυγοκέντρωσης mini Eppendorf του 1,5 ml.
17. Προσθέτουμε 150 μl PureLink Elusion Buffer απευθείας στο κέντρο της μεμβράνης της στήλης.
18. Φυγοκεντρούμε τη στήλη στη μέγιστη ταχύτητα για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
19. Απορρίπτουμε τη στήλη και πωματίζουμε το σωλήνα φυγοκέντρωσης του 1,5 ml.
20. Αποθηκεύουμε το σωλήνα φυγοκέντρωσης του 1,5 ml που περιέχει το απομονωμένο DNA σε ρυθμιστικό διάλυμα στους -20o C.

7.3 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) είναι μία επαναστατική μέθοδος της βιοχημείας και της μοριακής βιολογίας η οποία επιτρέπει την απομόνωση και τον πολλαπλασιασμό μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA *in vitro* μέσω της ενζυμικής αναπαραγωγής του DNA. Η ταχύτητα, η ευκολία, η ευαισθησία, η ειδικότητα και η αυτοματοποίηση της μεθόδου έχει συμβάλει σημαντικά στην εξέλιξη της μοριακής βιολογίας και στην ευρεία εφαρμογή της στην ιατρική έρευνα και τη διάγνωση ασθενειών. Ο επιστήμονας που την επινόησε, Karry Mullis, τιμήθηκε με το βραβείο Νόμπελ το 1993. Η τεχνική του Mullis και των συνεργατών του ήταν αργή, δύσκολη και ανακριβής και το μεγαλύτερο μειονέκτημα ήταν ότι σε κάθε νέο κύκλο πολλαπλασιασμού ήταν απαραίτητη η εκ νέου προσθήκη DNA πολυμεράσης, καθώς με την άνοδο της θερμοκρασίας κατά την αποδιάταξη του δίκλωνου DNA το ένζυμο αποδιατασσόταν με αποτέλεσμα να χάνει τη λειτουργικότητά του. Η μέθοδος βελτιστοποιήθηκε χάρη στην απομόνωση της θερμοανθεκτικής Taq πολυμεράσης από το βακτήριο *Thermus aquaticus*, η οποία παραμένει αναλλοίωτη κατά την αποδιάταξη στους 95°C και έχει τη βέλτιστη δυνατότητα πολυμερισμού στους 72°C, κάτι το οποίο οδήγησε στην αυτοματοποίηση της μεθόδου.

Με τη μέθοδο της PCR επιτυγχάνεται ο *in vitro* πολλαπλασιασμός συγκεκριμένων νουκλεοτιδικών αλληλουχιών ενός DNA ή cDNA δείγματος με τη χρήση επαναλαμβανόμενων κύκλων κατευθυνόμενης σύνθεσης DNA. Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης είναι μια μέθοδος παραγωγής μεγάλου αριθμού αντιγράφων συγκεκριμένων αλληλουχιών DNA με λογαριθμική αύξηση. Βασίζεται στην ιδιότητα των αλυσίδων του DNA να αποχωρίζονται σε υψηλή θερμοκρασία και να επανενώνονται σε χαμηλότερη θερμοκρασία και να αντιγράφονται. Η αντίδραση στηρίζεται στην επέκταση δύο ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών (primers), οι οποίοι υβριδίζονται με αλληλουχίες που βρίσκονται εκατέρωθεν της αλληλουχίας - στόχου του DNA που επιθυμείται να ενισχυθεί.



Εικόνα 22: Αρχή μεθόδου της PCR

Η PCR βασίζεται στη χρήση διαφορετικών θερμοκρασιών για να πραγματοποιηθούν τα τρία βήματα της αποδιάταξης του DNA, του υβριδισμού των εκκινητών και της επιμήκυνσης των εκκινητών. Τα μείγματα της αντίδρασης προθερμαίνονται στους 95oC για 15 min για να ενεργοποιηθεί η HotStarTaq DNA πολυμεράση (1ος κύκλος). Με τον τρόπο αυτόν μειώνεται σημαντικά η δημιουργία μη ειδικών προϊόντων πολλαπλασιασμού (non specific amplification), εφόσον ελαχιστοποιείται η πιθανότητα επέκτασης των μη ειδικά συνδεδεμένων εκκινητών, καθώς και των διμερών τους. Το δίκλωνο DNA αποδιατάσσεται θερμαίνοντάς το στους 95oC για να διαχωριστούν οι συμπληρωματικές αλυσίδες. Έπειτα η θερμοκρασία ελαττώνεται για να επιτρέψει στους εκκινητές να υβριδοποιηθούν στις συμπληρωματικές αλληλουχίες των αλυσίδων του DNA, αυτή η θερμοκρασία ποικίλει ανάλογα με τους εκκινητές.

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



Εικόνα 23: Αναλυτής συμβατικής PCR- Eppendorf® 5331 Master Cyclor Gradient Thermal Cyclor

Για την εκτέλεση της αντίδρασης είναι απαραίτητα τα εξής αντιδραστήρια (reagents):

- ✚ **το μόριο DNA** που θα χρησιμοποιηθεί ως μήτρα αντιγραφής (template DNA) για να ενισχυθεί και να πολλαπλασιαστεί μια συγκεκριμένη αλληλουχία βάσεων. Στην παρούσα εργασία ως μήτρα DNA χρησιμοποιήθηκε το ολικό DNA που απομονώθηκε από τα λευκοκύτταρα του περιφερικού αίματος. Η ποιότητα της μήτρας του DNA που αντιπροσωπεύει την ακεραιότητα και την καθαρότητα του μορίου του DNA που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί είναι καθοριστικός παράγοντας της επιτυχίας της αντίδρασης. Επιπλέον να σημειωθεί ότι συνήθως απαιτείται ποσότητα DNA που κυμαίνεται από 0,01 μg έως 1 μg.
- ✚ **ένα ζεύγος εκκινητών (primers)**, ένας νοηματικός εκκινητής (forward primer) και ένας αντινοηματικός εκκινητής (reverse primer), τα οποία υβριδίζονται στις 5' και 3' γειτονικές περιοχές του τμήματος DNA που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί για να μπορέσει να προσδεθεί η DNA

πολυμεράση και να πολυμερίσει. Οι εκκινητές αποτελούν συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια μήκους 15-30 βάσεων (συνήθως 20 βάσεων) συμπληρωματικά ως προς τα 5' και 3' άκρα της διπλής έλικας του τμήματος DNA που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί και οριοθετούν τα άκρα του τελικού προϊόντος της PCR. Το περιεχόμενό τους σε ζεύγη βάσεων G/C, δηλαδή η περιεκτικότητά τους σε G/C, κυμαίνεται από 40% έως 60% με αντιπροσωπευτικότερο ποσοστό συνήθως το 50%. Οι εκκινητές δεν πρέπει να σχηματίζουν δευτεροταγείς δομές ή ετεροδιμερή λόγω συμπληρωματικότητας και η θερμοκρασία τήξης (melting temperature, T_m) στην οποία το 50% των εκκινητών θα υβριδοποιηθεί στη μήτρα πρέπει να είναι περίπου 50-72o C και τα T_m των δύο εκκινητών να μην διαφέρουν μεταξύ τους περισσότερους από 5oC. Οι εκκινητές είναι δυνατόν να περιέχουν αλληλουχίες χρήσιμες για μετέπειτα πειραματικές ανάγκες, όπως θέσεις πέψης για περιοριστικές ενδονουκλεάσες. Η τελική συγκέντρωση του κάθε εκκινητή στην αντίδραση είναι 20 μ M (20 pmol/ μ l).

✚ **η θερμοσταθερή Taq DNA πολυμεράση** που απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1976 από το θερμόφιλο βακτήριο *Thermus aquaticus* και είναι σταθερή στις υψηλές τιμές θερμοκρασίας, Η Taq DNA πολυμεράση είναι ένα εμπορικώς διαθέσιμο ένζυμο που απομονώνεται από βακτήρια *Escherichia coli*. Αυτό το ένζυμο έχει τη δραστικότητα της 5' → 3' πολυμεράσης και τη δραστικότητα της 5' → 3' εξωνουκλεάσης, αλλά στερείται την 3' → 5' εξωνουκλεολυτική δραστικότητα με αποτέλεσμα να μην έχει επιδιορθωτική δράση (proofreading activity).

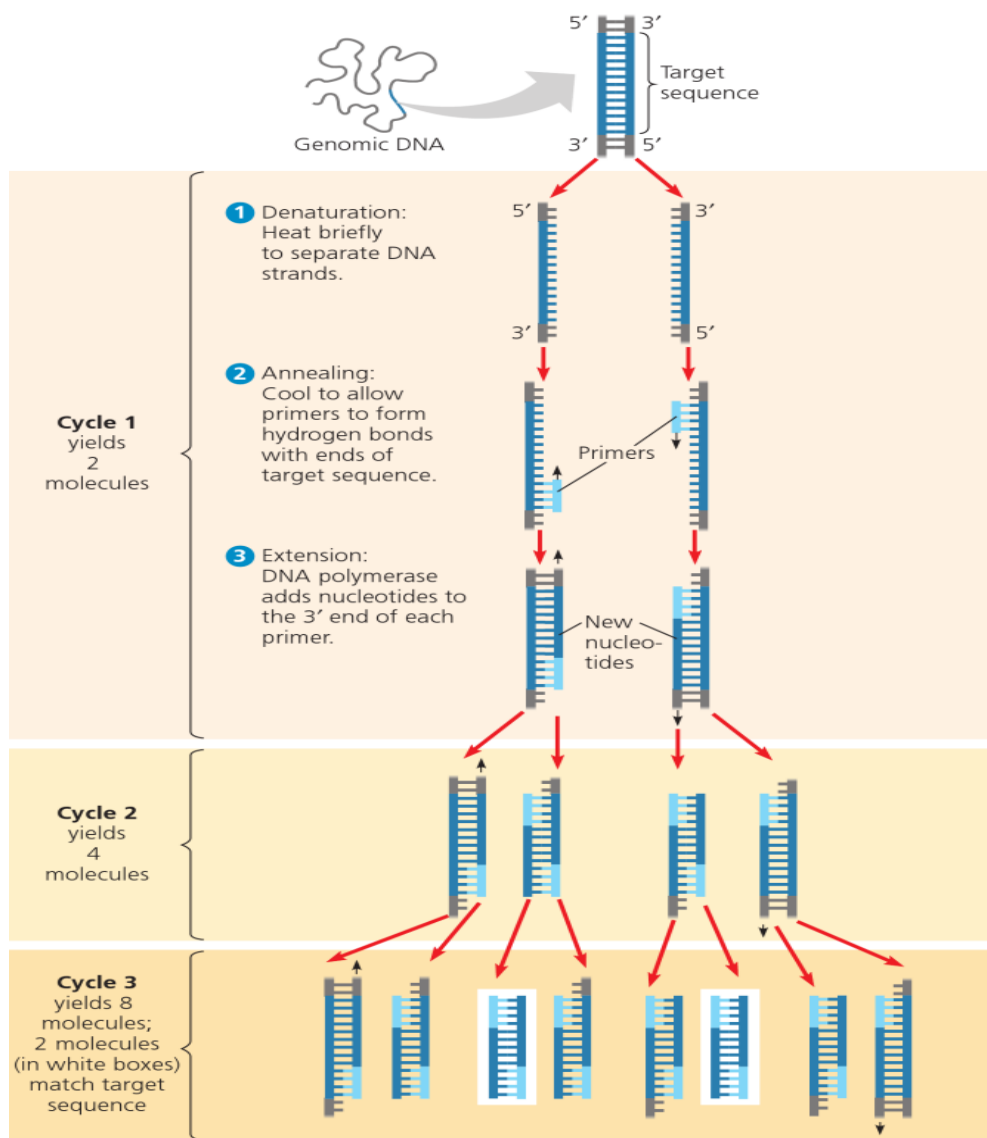
✚ **τα 5'- τριφωσφορικά 2'- δεοξυριβονουκλεοτίδια (2'- deoxynucleotide 5'-triphosphates, dNTPs**, που περιλαμβάνουν την dATP, την dTTP, την dGTP, και την dCTP) που προσθέτει η DNA πολυμεράση για να δημιουργήσει την πολυνουκλεοτιδική αλυσίδα. Τα τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια χρησιμοποιούνται σε τελική συγκέντρωση 200 μ M το καθένα. Τα dNTPs σχηματίζουν σύμπλοκα με τα ιόντα Mg^{2+} . Στην περίπτωση που μεταβληθεί η συγκέντρωσή τους πρέπει να προσαρμόζεται και η συγκέντρωση του $MgCl_2$.

✚ **το ρυθμιστικό διάλυμα (buffer solution)** που διασφαλίζει τη μέγιστη δυνατή σταθερότητα και δραστηριότητα της DNA πολυμεράσης. Το ρυθμιστικό διάλυμα (buffer solution) εξασφαλίζει τις ιδανικές συνθήκες pH και αλατότητας για τη δράση της πολυμεράσης. Το ρυθμιστικό διάλυμα (buffer solution) της αντίδρασης περιέχει τα εξής συστατικά: Tris-HCl (pH 8,3 στους 20 °C), MgCl₂ KCl, Tween 20 και ζελατίνη ή βόεια αλβουμίνη και

✚ **τα ιόντα μαγνησίου Mg²⁺ με τη μορφή χλωριούχου μαγνησίου MgCl₂** που είναι απαραίτητα για τη δραστηριότητα της DNA πολυμεράσης. Η συγκέντρωση του MgCl₂ προσδιορίζεται εμπειρικά και συνήθως κυμαίνεται από 1mM έως 5mM. Είναι συμπαραγόντας της θερμοσταθερής πολυμεράσης. Χαμηλές συγκεντρώσεις ιόντων μαγνησίου επηρεάζουν αρνητικά τη λειτουργία της ενώ οι υψηλές συγκεντρώσεις την πιστότητά της. Σταθεροποιεί το δίκλωνο DNA αυξάνοντας την T_m και τελικά την ειδικότητα των εκκινήτων. Σχηματίζει διαλυτά σύμπλοκα με τα dNTPs τα οποία αποτελούν το υπόστρωμα του ενζύμου. Η συγκέντρωση του χλωριούχου μαγνησίου μπορεί να κυμαίνεται από 0,5 mM έως 2,5 mM. Η παρουσία EDTA ή άλλων χηλικών παραγόντων που δεσμεύουν τα ιόντα μαγνησίου στο διάλυμα των εκκινήτων ή στο DNA μπορεί να διαταράξει τη συγκέντρωση του μαγνησίου.



Το διάλυμα της αντίδρασης τοποθετείται εντός του θερμοκυκλοποιητή ο οποίος διαθέτει θερμαινόμενο καπάκι για να επιτυγχάνεται ομοιογενής θερμοκρασία στο εσωτερικό του μηχανήματος και μετά τη λήξη του προγράμματος τα προϊόντα της αντίδρασης οπτικοποιούνται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης περιεκτικότητας 3%.



Εικόνα 24: Ενίσχυση τμημάτων DNA με τη χρήση της PCR

Στο συγκεκριμένο πειραματικό πρωτόκολλο χρησιμοποιήθηκαν δύο primers με σκοπό την ανίχνευση του μη φυσιολογικού (A) και του φυσιολογικού (G) αλληλομόρφου στους δύο υπό μελέτη πολυμορφισμούς, καθώς και άλλοι δύο Reverse και Forward του ευρύτερου γονιδίου (Rezazadeh et al. 2017). Οι εκκινητές αυτοί δοκιμάστηκαν με απόλυτη επιτυχία στην πειραματική διαδικασία των Rezazadeh et al. 2017 και κατασκευάστηκαν ξανά για τις ανάγκες της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

Επιπλέον, η DNA Taq Polymerase που χρησιμοποιήθηκε ήταν της εταιρίας Minotech.

Το πρωτόκολλο της συμβατικής PCR που χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση του γονιδίου ANRIL και των πολυμορφισμών rs4977574 και rs10757278 περιλαμβάνει τα ακόλουθα βήματα:

- ✚ Σε ένα αποστειρωμένο σωληνάριο φυγοκέντρησης του 0,5 mL προσθέτουμε **2,5μl** 10X PCR Buffer minus Mg²⁺, **1μl** 10 mM dNTP mixture, **1,5 μl** 50 mM MgCl₂, **1μl** Primer G, **1μl** Primer A, **1μl** Outer Forward Primer, **1μl** Outer Reverse Primer, **2 μl** Template DNA, **0,5 μl** Taq DNA polymerase, **13,5 μl** απεσταγμένο νερό (**V_{total}= 25μl**).
- ✚ Τοποθετούμε τα σωληνάρια στον αναλυτή PCR, όπου επωάζουμε στους 95°C για 5min.
- ✚ Εκτελούμε τα ακόλουθα βήματα για 30 κύκλους: 95°C για 45sec, τα αναφερόμενα T_m (βλ. ΠΙΝΑΚΑΣ I) για κάθε πολυμορφισμό ξεχωριστά για 45 sec και 72°C για 55 sec.
- ✚ Επωάζουμε τα σωληνάρια στους 72°C για 5 λεπτά και διατηρούμε την αντίδραση στους 4o C.
- ✚ Τα δείγματα μπορούν να αποθηκευτούν στους -20o C μέχρι να χρησιμοποιηθούν.

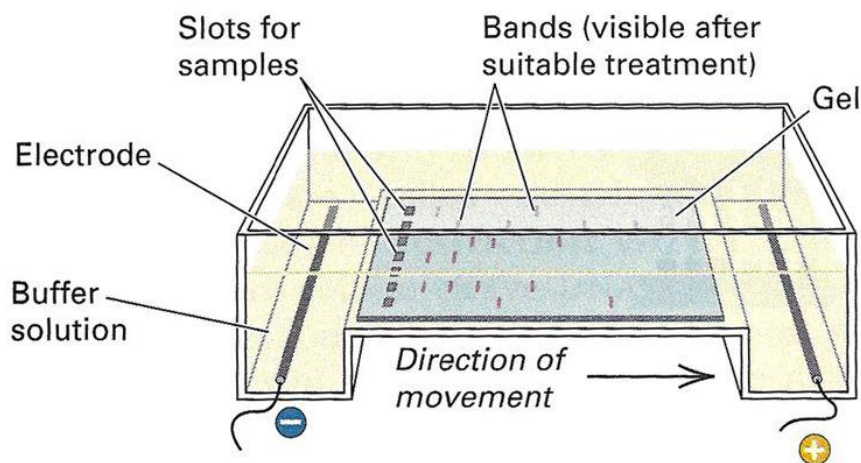
Για να αξιολογήσουμε την επιτυχία της συμβατικής PCR πρέπει να οπτικοποιήσουμε το αποτέλεσμα της, κάτι το οποίο επιτυγχάνεται με post-PCR analysis όπως ηλεκτροφόρηση του PCR προϊόντος σε πήκτωμα αγαρόζης, η οποία δίνει τη δυνατότητα για την ανίχνευση και την αδρή ποσοτικοποίηση της ενισχυμένης αλληλουχίας.

ΠΙΝΑΚΑΣ Ι	Εκκινητής (Primer)	Γονιδιακή Αλληλουχία Εκκινητή	Μέγεθος Ενισχυμένου Προϊόντος	Tm
RS4977574	A	TTTATTAGAGTGAACATCCCGT	166 bp	53oC
	G	TTGAGGGTACATCAAAAGCATTCTATATCG	226 bp	
	Outer Forward (5'-3')	CACCATTCTTTCTGAAACAACAGGATAT	335 bp	
	Outer Reverse (5'-3')	AAGGCTCTGACATTTCTAACTCTCTGA		
RS10757278	A	AAGTCAGGGTGTGGTCATTACGGGAA	263 bp	54oC
	G	CTCAGTCTTGATTCTGCATCGCTTCC	234 bp	
	Outer Forward (5'-3')	GGGCATTAAGAAATGGATGGGTAGACAAAA	443 bp	
	Outer Reverse (5'-3')	GCTGTTCTCAATTAGCCAGGACTACCTCT		

7.4 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ DNA ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Η ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης εφαρμόζεται σε όλες εκείνες τις περιπτώσεις που απαιτείται διαχωρισμός και εντοπισμός ή και απομόνωση διακριτών τμημάτων DNA ενός δείγματος. Η μέθοδος βασίζεται στην αρχή ότι η κινητικότητα των νουκλεϊκών οξέων σε ηλεκτρικό πεδίο καθορίζεται από το μέγεθος και τη δομή τους. Η αγαρόζη είναι ένας φυτικός πολυσακχαρίτης που απομονώνεται από μερικά είδη θαλάσσιων φυκιών και έχει την ιδιότητα να ρευστοποιείται στους 100°C και να στερεοποιείται στους 45°C σχηματίζοντας ένα αδρανές πορώδες, ζελατινώδες πήκτωμα. Το μέγεθος των πόρων του υλικού αυτού εξαρτάται από τη συγκέντρωση της αγαρόζης και καθορίζει το μέγεθος των μορίων του DNA που θα το διαπεράσουν. Πηκτώματα με χαμηλές συγκεντρώσεις αγαρόζης (0,4% -1,2% w/v) χρησιμοποιούνται για το διαχωρισμό μεγάλων μορίων DNA, ενώ πηκτώματα με υψηλές συγκεντρώσεις αγαρόζης (έως 2,5% w/v) είναι καταλληλότερα για την ανάλυση μικρών μορίων DNA.

Agarose gel electrophoresis of DNA



Εικόνα 26: Σχηματική αναπαράσταση ηλεκτροφόρησης.

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας η ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων εφαρμόζεται για να ελεγχθεί το αποτέλεσμα της αντίδρασης PCR. Το πήκτωμα αγαρόζης που χρησιμοποιείται στο πείραμα έχει περιεκτικότητα 3%, και σε αυτήν προστίθενται 5 μ L βρωμιούχο αιθίδιο, συγκέντρωσης 5 mg/mL, το οποίο είναι μια φθορίζουσα χρωστική που καθιστά ορατά τα μόρια DNA κάτω από υπεριώδες φως.




Τα δείγματα τοποθετούνται σε ειδικές εσοχές (πηγάδια-wells) του πήκτωματος και ηλεκτροφορούνται εφαρμόζοντας ηλεκτρικό πεδίο τάσης 5 V/ cm. Το DNA ως αρνητικά φορτισμένο μόριο λόγω των φωσφορικών ομάδων που υπάρχουν στον φωσφοδιεστερικό σκελετό, όταν βρεθεί μέσα στο ηλεκτρικό πεδίο, μετακινείται προς το θετικό ηλεκτρόδιο της συσκευής ηλεκτροφόρησης με ταχύτητα που εξαρτάται από το μέγεθος και τη δομή του. Η χρωστική μπλε της βρωμοφαινόλης μάς επιτρέπει να παρακολουθούμε τη γενική πορεία της ηλεκτροφόρησης. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα τοποθετείται κάτω από υπεριώδη ακτινοβολία (ultraviolet, UV, radiation). Τα ενισχυμένα τμήματα DNA εμφανίζονται ως φωτεινές ζώνες, ενώ ο μάρτυρας των DNA τμημάτων γνωστού μεγέθους (ladder) επιτρέπει τον προσδιορισμό του μεγέθους τους.

8. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

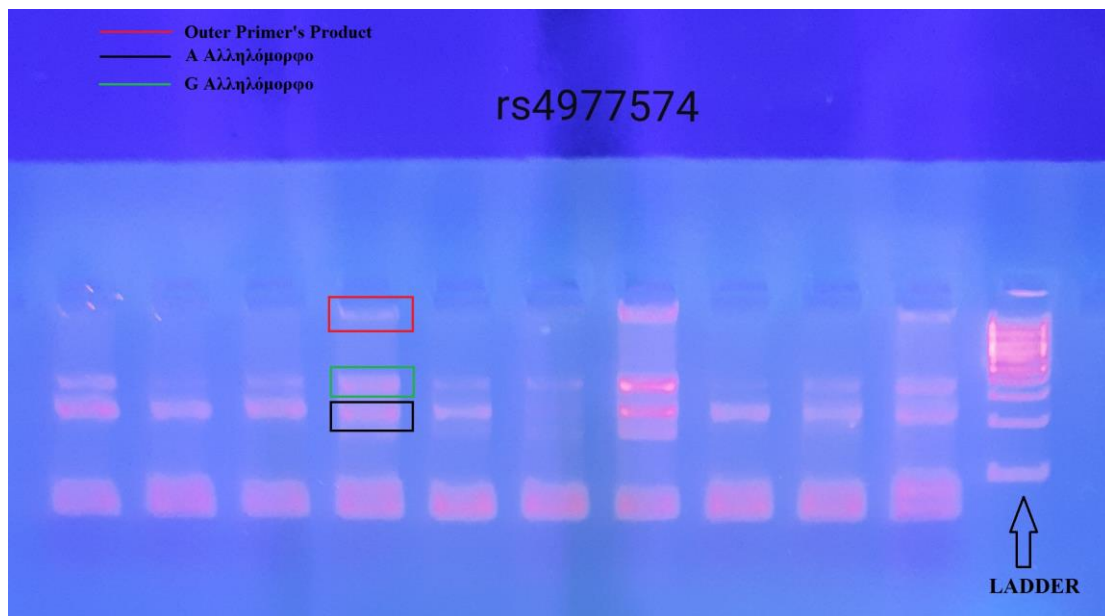
8.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗΣ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟ RS4977574

Στην εικόνα 27 του πηκτώματος παρατηρούμε τα ενισχυμένα κομμάτια κάθε δείγματος (σύνολο 10 δείγματα) με την μορφή «γραμμών» και σε συνδυασμό με τον ladder (δεξιά) μπορούμε να διακρίνουμε εάν ο πολυμορφισμός είναι ομόζυγος στο G αλληλόμορφο (φυσιολογικό), ομόζυγος στο A αλληλόμορφο (μη φυσιολογικό) ή ετερόζυγος A/G. Σύμφωνα με αυτό, μπορούμε να αναγνωρίσουμε λοιπόν ότι το πρώτο δείγμα είναι ετερόζυγο στα A/G, ενώ το δεύτερο είναι ομόζυγο στο A αλληλόμορφο κ.ο.κ.

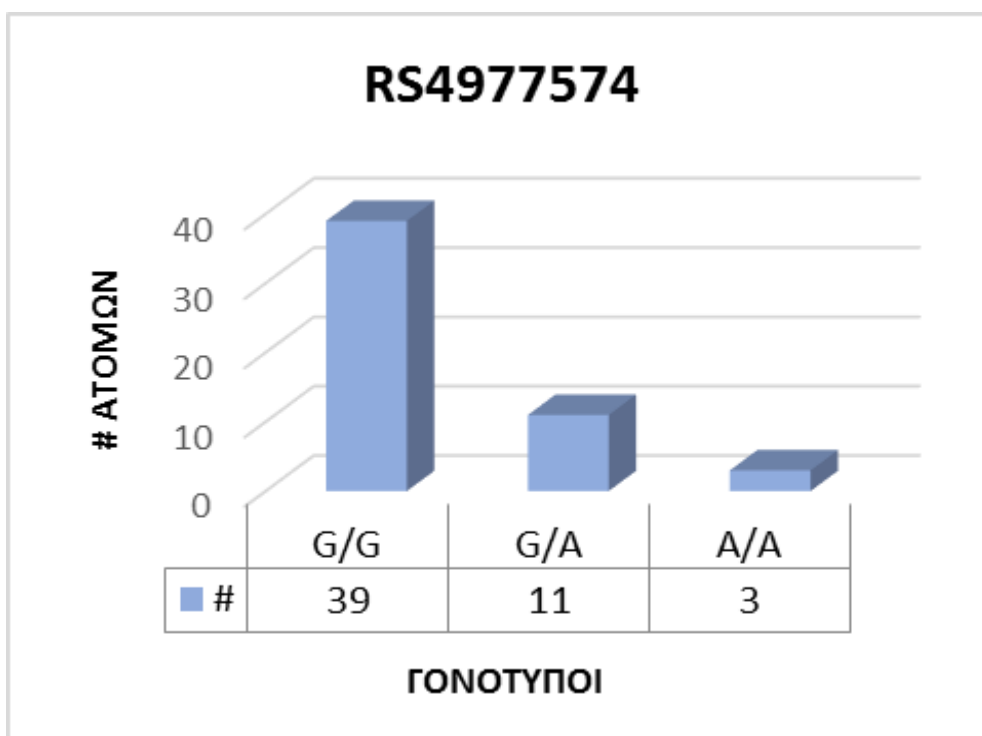
Τα γονοτυπικά αποτελέσματα της ανίχνευσης του πολυμορφισμού RS4977574 σε ένα σύνολο 53 δειγμάτων συνοψίζονται ως εξής (Γράφημα 1):

-  39 δείγματα ομόζυγα στο G αλληλόμορφο
-  11 δείγματα ετερόζυγα στα A/G αλληλόμορφα
-  3 δείγματα ομόζυγα στο A αλληλόμορφο

Παρατηρήσαμε ότι στον πολυμορφισμό **RS4977574** επικρατεί σε μεγάλο ποσοστό **73,58%** η ομοζυγωτία του φυσιολογικού αλληλομόρφου G, σε ποσοστό **20,75%** η ετεροζυγωτία A/G και σε κατά πολύ μικρότερο ποσοστό **5,6%** η ομοζυγωτία του μη φυσιολογικού αλληλομόρφου A.



Εικόνα 27: Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων για την ανίχνευση του πολυμορφισμού RS4977574.



Γράφημα 1: Αποτελέσματα γονοτύπησης RS4977574.

8.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗΣ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟ RS10757278

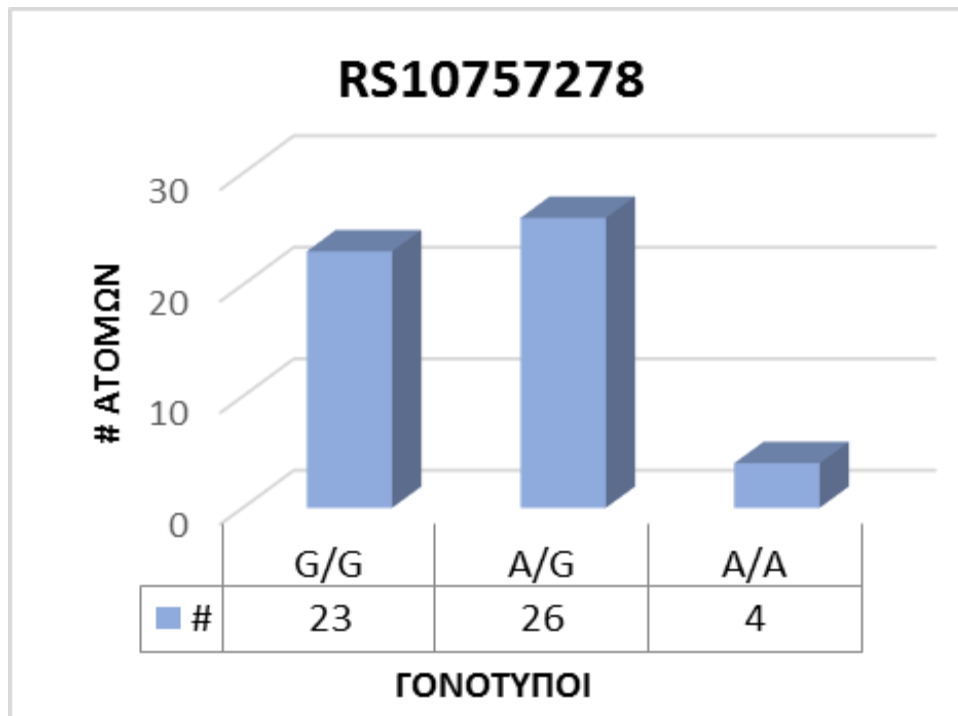
Για τον πολυμορφισμό RS10757278 (Εικόνα 28) τα αποτελέσματα της γονοτύπισης στο σύνολο των 53 δειγμάτων συνοψίζονται ως εξής (Γράφημα 2) :

- ✚ 23 ομόζυγα στο G αλληλόμορφο
- ✚ 26 ετερόζυγα στα A/G αλληλόμορφα
- ✚ 4 ομόζυγα στο A αλληλόμορφο

Στον πολυμορφισμό **RS10757278** παρατηρήσαμε ότι η εμφάνιση της ομοζυγωτίας του φυσιολογικού αλληλομόρφου G κυμαίνεται στα ίδια ποσοστά με την ετεροζυγωτία A/G με **43,39%** και **49,05%** αντίστοιχα, ενώ η ομοζυγωτία του μη φυσιολογικού αλληλομόρφου παραμένει σε πολύ χαμηλό ποσοστό **7,54 %**.



Εικόνα 28: Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων για την ανίχνευση του πολυμορφισμού RS10757278.



Γράφημα 2: Αποτελέσματα γονοτύπησης RS10757278.

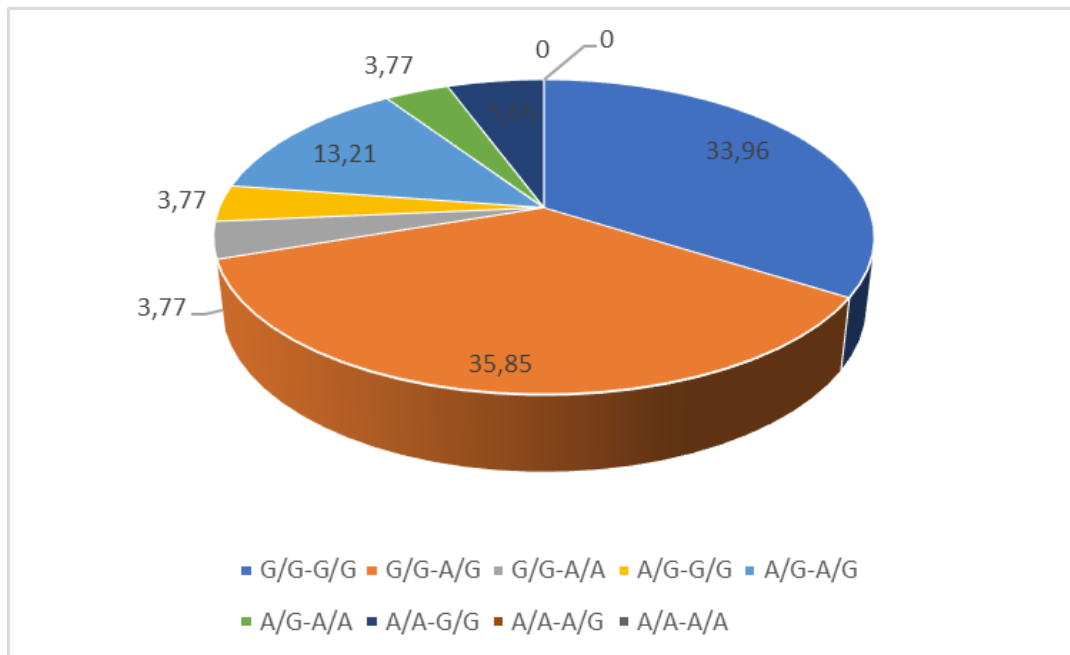
8.3 ΣΥΝΔΥΑΣΤΙΚΑ ΓΟΝΟΤΥΠΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΩΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ RS4977574 ΚΑΙ RS10757278

Στον παρακάτω ΠΙΝΑΚΑ III παρατίθενται τα συνδυαστικά γονοτυπικά αποτελέσματα των δύο υπό μελέτη πολυμορφισμών, ενώ παρουσιάζονται αργότερα και σε μορφή πίτας στο Γράφημα 4.

ΠΙΝΑΚΑΣ III

RS4977574 - RS10757278	ΠΛΗΘΟΣ
G/G - G/G	18
G/G - A/G	19
G/G - A/A	2
A/G - G/G	2
A/G - A/G	7
A/G - A/A	2
A/A - G/G	3
A/A - A/G	0
A/A - A/A	0

Παρατηρούμε ότι σύμφωνα με τον Πίνακα III οι επικρατέστεροι γονοτυπικοί συνδυασμοί μεταξύ των RS4977574 και RS10757278 είναι σε αντιστοιχία οι G/G-G/G και G/G-A/G με ποσοστά **33,96%** και **35,85%**. Ακολουθεί ο συνδυασμός των A/G-A/G με ποσοστό **13,21%**, ο συνδυασμός A/A-G/G με **5,66%** και μετά οι G/G-A/A, A/G-G/G και A/G-A/A με ποσοστό **3,77%** ο καθένας. Οι συνδυασμοί A/A-A/G και A/A-A/A δεν εμφανίστηκαν καθόλου στα αποτελέσματα μας, ένα γεγονός που θα μπορούσε να χρήζει περαιτέρω μελέτης.



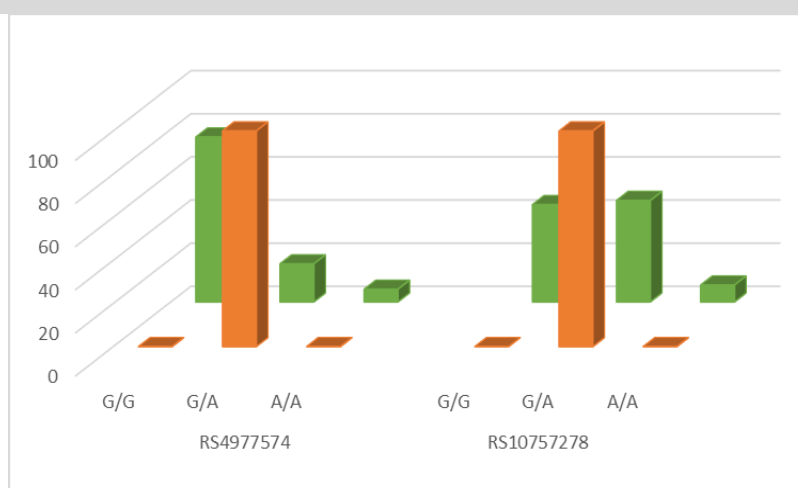
Γράφημα 4: Παρουσίαση συνδυαστικών γονοτυπικών αποτελεσμάτων σε μορφή πίτας.

8.4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ POOR AND GOOD RESPONDERS

Δεδομένου ότι η μελέτη αφορά ένα τυχαίο δείγμα γυναικών που προσήλθαν στην μονάδα εξωσωματικής γονιμοποίησης αντιλαμβανόμαστε ότι δεν θα μπορούσαν να υπάρξουν δύο ξεκάθαρα και μεγάλες υπό μελέτη ομάδες πτωχών και καλών απαντητριών ώστε να συγκριθούν και να διενεργηθούν οι ανάλογες στατιστικές μελέτες. Παρόλα αυτά, τα αποτελέσματα μας δίνουν αυθόρμητες πληροφορίες που σε κάθε περίπτωση είναι σημαντικές και άξιες περαιτέρω μελέτης. Με γνώμονα τα όσα προειπώθηκαν τα αποτελέσματα της μελέτης μας παρατίθενται στον παρακάτω ΠΙΝΑΚΑ II και το αντίστοιχο Γράφημα 3 όπου καταγράφονται οι συχνότητες εμφάνισης όλων των αλληλομόρφων σε κάθε πολυμορφισμό σε σχέση με την εκάστοτε απάντηση.

**ΠΙΝΑΚΑΣ
II**

SNP	Γονότυποι	Συχνότητα στις πτωχές απαντήτριες (πλήθος/ %)	Συχνότητα στις καλές απαντήτριες (πλήθος/ %)
RS4977574	G/G	0	76,47
	G/A	100	17,65
	A/A	0	5,88
RS10757278	G/G	0	45,1
	G/A	100	47,06
	A/A	0	7,84



Γράφημα 3: Παρουσίαση συγκεντρωτικών αποτελεσμάτων Good/Poor Responders

Στο πλήθος των 53 υπό μελέτη δειγμάτων βρέθηκε ότι μόνο 2 γυναίκες ήταν πτωχές απαντήτριες. Αξιοσημείωτο είναι όμως, πως και οι δύο αυτές γυναίκες ήταν ετερόζυγες στα A/G και στους δύο υπό μελέτη πολυμορφισμούς. Το αν αυτό ήταν τυχαίο εύρημα, θα μπορούσε να το αποδείξει μια επόμενη μελέτη πάνω σε αυτό το θέμα. Έτσι, σε ποσοστό 18,18% επί του συνόλου των ετερόζυγων A/G αποτελεσμάτων του πολυμορφισμού RS4977574 υφίστανται οι πτωχές απαντήτριες και το υπόλοιπο 81,82% το καταλαμβάνουν οι καλές απαντήτριες, ενώ στον RS10757278 οι πτωχές καταλαμβάνουν το 7,69% και οι καλές το 92,31%.

9. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρούσα διπλωματική εργασία αποτελεί μια παρουσίαση της μελέτης δύο πολυσυζητημένων πολυμορφισμών του γονιδίου ANRIL που κατηγορήθηκαν για την έμμεση συμμετοχή τους σε πολλές ασθένειες και κατ'επέκταση της υπογονιμότητας.

Ο χώρος στον οποίο εδρεύει το ANRIL και ο οποίος παράγει αρκετά μη κωδικοποιητικά RNAs έχει στοχοποιηθεί στο παρελθόν για βλάβες στο μονοπάτι της σπερματογένεσης και κατ' επέκταση της ανδρικής υπογονιμότητας (Joshi et al. 2020). Άλλες μελέτες έχουν επίσης στο επίκεντρό τους την περιοχή αυτή όσον αφορά και την γυναικεία αναπαραγωγική υγεία, καθότι έχει φανεί πως προάγει μέσω των ρυθμιστικών του μηχανισμών τις καθέξιν αποβολές, αλλά και την εμφάνιση ενδομητρικού ιστού (Nakaoka et al. 2016). Τα στοιχεία αυτά ήταν αρκετά για να μας κεντρίσουν το ενδιαφέρον και να προβούμε σε μια μελέτη πάνω σε γυναίκες που έχουν ξεκινήσει πρωτόκολλα εξωσωματικής γονιμοποίησης.

Η μελέτη αυτή, όπως έχει ήδη αναφερθεί, αφορά ένα πλήθος 53 γυναικών που το μοναδικό κοινό τους χαρακτηριστικό είναι πως προσήλθαν στην μονάδα εξωσωματικής γονιμοποίησης του Γ.Ν.Α. για να ακολουθήσουν το πρωτόκολλο που αφορά την καθεμία. Μελετήθηκαν ταυτόχρονα δύο πολυμορφισμοί οι οποίοι σε προγενέστερες μελέτες είχαν σημαντική εμφάνιση (Maryam Rezazadeh et al. 2018) και οι οποίοι είχαν δουλευτεί τόσο, ώστε να μπορέσουμε να διαμορφώσουμε μια ασφαλή πειραματική διαδικασία σε μια γονιδιακή περιοχή που ακόμα δεν έχει εξιχνιαστεί αρκετά. Στη συνέχεια τα αποτελέσματά μας αξιολογήθηκαν αυτούσια αλλά και συνδυαστικά με το ιστορικό των γυναικών και συγκεκριμένα με την απάντησή τους στα πρωτόκολλα που ακολούθησαν.

Για τον πολυμορφισμό RS4977574 τα ποσοστά εμφάνισης της ομοζυγωτίας του φυσιολογικού αλληλομόρφου G σε όλα μας τα δείγματα βρίσκονταν σε αναλογία 3,5:1 σε σχέση με της ετεροζυγωτίας A/G, ενώ αντίστοιχα σε αναλογία 13:1 με της ομοζυγωτίας του μεταλλαγμένου αλληλομόρφου A. Σε ποσοστό 5% υπολογίστηκε η εμφάνιση της ομοζυγωτίας του μεταλλαγμένου αλληλομόρφου A σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα στον ίδιο πολυμορφισμό, ενώ αντίστοιχα

μόνο η εμφάνιση του αλληλομόρφου A είχε γενικό ποσοστό εμφάνισης 17%. Δεδομένου ότι ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός είχε σημαντικότερη συσχέτιση με την εμφάνιση της ενδομητρίωσης (Yadav Sarkota et al. 2015) μας κάνει να αναρωτιόμαστε εάν αυτό το ποσοστό εμφάνισης του αλληλομόρφου στην μελέτη μας θεωρείται μικρό ή μεγάλο αντίστοιχα.

Όσον αφορά τον πολυμορφισμό **RS10757278** τα ποσοστά εμφάνισης της ομοζυγωτίας του φυσιολογικού αλληλομόρφου G βρίσκονταν σε αναλογία **1:1** σε σχέση με της ετεροζυγωτίας, ενώ αντίστοιχα σε αναλογία **5:1** με της ομοζυγωτίας του μεταλλαγμένου αλληλομόρφου A. Σε ποσοστό **7%** επίσης υπολογίστηκε και η εμφάνιση της ομοζυγωτίας του μεταλλαγμένου αλληλομόρφου A σε σχέση με τα υπόλοιπα. Αντίστοιχα, η γενική εμφάνιση του αλληλομόρφου A είχε ποσοστό **32%**, δηλαδή διπλάσια εμφάνιση σε σχέση με του RS4977574. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι δεν έχει μελετηθεί ακόμα ο RS10757278 για τη συσχέτισή του με την ενδομητρίωση εφόσον το A αλληλόμορφο έχει διπλάσια ποσοστά εμφάνισης. Αυτό βέβαια δεν παίζει πάντα σημαντικό ρόλο καθότι έχει σημασία και η θέση του πολυμορφισμού σε σχέση με τη λειτουργικότητα του γονιδίου (ρυθμιστικό σημείο γονιδίου). Εντύπωση κάνει επίσης πως οι αναλογίες εμφάνισης της ομοζυγωτίας του φυσιολογικού G και της ετεροζυγωτίας είναι σχεδόν ίδιες και πιθανότατα μια πιο στοχοποιημένη μελέτη να μας δώσει εξαιρετικά σημαντικές πληροφορίες.

Άξια σημασίας, είναι επίσης και η συνδυαστική εμφάνιση των γονοτύπων των πολυμορφισμών. Παρατηρήθηκε, πως η συχνότερη γονοτυπική εμφάνιση ήταν αυτή των **G/G-G/G** και **G/G-A/G** (**RS4977574-RS10757278** αντιστοίχως) και επιπλέον όλες αυτές οι γυναίκες ήταν καλές απαντήτριες. Σε μεσαίες αναλογίες, συγκριτικά με τις υπόλοιπες κινήθηκε ο συνδυασμός A/G-A/G ο οποίος χρήζει περισσότερης μελέτης καθότι είναι και ο μοναδικός γονοτυπικός συνδυασμός που βρέθηκε σε γυναίκες με πτωχή απάντηση σε αναλογία **1:3,5** με τις καλές απαντήτριες του ίδιου γονοτυπικού συνδυασμού. Σε αξιοσημείωτα πλαίσια βρίσκονται και οι συνδυασμοί A/A-A/G και A/A-A/A που δεν εμφανίζονται καθόλου στα δείγματά μας.

Άξιο προσοχής υφίσταται και το γεγονός ότι στα δείγματά μας καμία από τις πτωχές απαντήτριες δεν είχε το φυσιολογικό αλληλόμορφο σε ομοζυγωτία

όπως και το αντίστροφο, ότι όλες είχαν ετεροζυγωτία και στους δύο πολυμορφισμούς.

Τα αποτελέσματα αυτά θα μπορούσαν να έχουν πολλαπλές εξηγήσεις σε επίπεδο θεωριών, αλλά χωρίς στατιστικές αναλύσεις μεγάλων πληθυσμών δεν θα μπορούσαν να ευδοκιμήσουν. Εκτιμάται όμως ότι το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο όσο πιο συχνά εμφανίζεται τόσο πιο πιθανό είναι η γυναίκα να έχει κάποια γενετική ευαισθησία στο συγκεκριμένο γονίδιο που θα μπορούσε φαινοτυπικά να πάρει την μορφή της πτωχής απάντησης. Αντίστοιχα, όσο πιο συχνά βλέπουμε το φυσιολογικό αλληλόμορφο G τόσο πιο πολύ ισχυροποιούμε τις θεωρίες περί απάντησης αλλά και επιβεβαιώνουμε τη γενική θεωρία περί της δυναμικής του φυσιολογικού αλληλομόρφου.

Το 2015 οι Yadav Sarkota et al έβαλαν στο επίκεντρο της μελέτης τους μερικούς από τους πολυμορφισμούς του ANRIL και κατάφεραν να βρουν μια σημαντική συσχέτιση μεταξύ αυτών και των γυναικών που διαγνώστηκαν με ενδομητρίωση. Πιο συγκεκριμένα, κατέληξαν στο ότι ο πολυμορφισμός RS4977574 όπου μελετήσαμε και εμείς, παρουσίασε σημαντική συσχέτιση της τάξης του $p < 0.018$ με τη νόσο (Yadav Sarkota et al. 2015). Η ενδομητρίωση είναι μια ορμονοεπηρεαζόμενη πάθηση που οδηγεί στη μετανάστευση ενδομητρικού ιστού σε εκτοπικά σημεία τα οποία αποκτούν συμπεριφορά καλοήθων όγκων με αμφίβολη εξέλιξη ως επί το πλείστον. Ο γενετικός τόπος που εδρεύει το ANRIL φημίζεται ήδη για την συμμετοχή του στην αναστολή της καρκινογένεσης και την εξέλιξη της νόσου. Μεταλλάξεις όλων των ειδών σε ρυθμιστικά σημεία του τόπου δύναται να μπλοκάρουν τη φυσιολογικό του ογκοκατασταλτικό χαρακτήρα. Συμπερασματικά λοιπόν, φαίνεται πολύ λογικό (όπως και αποδεικνύεται απ'τους Yadav Sarkota et al. 2015) να υπάρξει συσχέτιση μεταξύ ενός από τους πολυμορφισμούς του ANRIL και της ενδομητρίωσης. Μένει πλέον να επεκταθεί η μελέτη αυτή και στους υπόλοιπους πολυμορφισμούς του γονιδίου αλλά και σε άλλες σχετικές παθήσεις με γενική προέκταση την υπογονιμότητα.

Μελέτες επίσης που έχουν γίνει στον πολυμορφισμό RS10757278 έχουν προς το παρόν καταλήξει στο ότι ο συγκεκριμένος σχετίζεται περισσότερο με μεταβολικά νοσήματα, στεφανιαία νόσο, δυσλιπιδαιμία, υπέρταση και υπεργλυκαιμία κ.α. (Burcu Bayoglu et al. 2013) , παθήσεις που έχουν έμμεση

σχέση με την υπογονιμότητα. Προς το παρόν λοιπόν, τα στοιχεία που έχουμε στα χέρια μας για τον συγκεκριμένο πολυμορφισμό τον καθιστούν ικανό για ενδεχόμενες φθορές του αναπαραγωγικού συστήματος με έμμεσο τρόπο.

Αν και οι GWAS (genome-wide association studies) έχουν ανιχνεύσει πολλά γονίδια που εμφανίζουν ευαισθησία στην εμφάνιση της ενδομητρίωσης, είναι σαφές ότι υπάρχουν διαφορετικές γενετικές συσχετίσεις για την ενδομητρίωση μεταξύ των πληθυσμών (Matalliotakis et al. 2017). Ως εκ τούτου, είναι σημαντικό να μελετηθεί η γενετική βάση αυτής της κατάστασης και όσον αφορά τα πρωτόκολλα εξωσωματικής γονιμοποίησης. Έχοντας υπόψιν όσα έχουν προειπωθεί, καταλήγουμε στο ότι θα πρέπει ενδεχομένως να ακολουθηθεί μια εξατομικευμένη θεραπεία για κάθε ασθενή, η οποία θα περιλαμβάνει εξατομικευμένο γενετικό και συμβουλευτικό έλεγχο σύμφωνα με τον τύπο του εκάστοτε πολυμορφισμού.

Όσον αφορά τώρα τη μελέτη μας, σε κάθε περίπτωση το υπό μελέτη δείγμα είναι αρκετά μικρό ώστε να μπορέσουμε να διενεργήσουμε μια πλήρη στατιστική ανάλυση και έκφραση ασφαλών συμπερασμάτων με στατιστικώς σημαντικά αποτελέσματα. Μπορούμε όμως να λάβουμε σοβαρά υπόψιν κάποιες πολύ σημαντικές πληροφορίες που μας δίδονται αβίαστα, ώστε να προχωρήσουμε σε πιο ειδικές μελέτες. Τα αποτελέσματα της μελέτης μας σε έναν τελείως άγνωστο γενετικό τόπο, όσον αφορά την αναπαραγωγική υγεία, θα μπορούσαν να δώσουν πολύτιμες πληροφορίες αλλά και μεγαλύτερους προβληματισμούς.

Συνεπώς οι προτάσεις για επόμενες μελέτες βασισμένες στα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής συνοψίζονται ως εξής:

- ✚ Γονοτυπική ανάλυση ή ανάλυση των ίδιων πολυμορφισμών σε γυναίκες που ακολουθούν πρωτόκολλα εξωσωματικής και συγκριτική μελέτη ενός επαρκούς αριθμού πτωχών απαντητριών ως ομάδα μελέτης με το control group πλήθους καλών απαντητριών. Σε αυτή τη μελέτη θα μπορούσε να αποσαφηνιστεί εάν το εύρημα μας για την ετεροζυγωτία A/G ήταν τυχαίο ή όχι.

- ✚ Ανάλυση του πολυμορφισμού RS10757278 σε μεγαλύτερο δείγμα ώστε να φανούν εάν οι αναλογίες ομοζυγωτίας του φυσιολογικού αλληλομόρφου G και της ετεροζυγωτίας είναι επιβεβαιωμένα 1:1 , κάτι το οποίο θα μπορούσε να εξηγηθεί καλύτερα και θα μπορούσε να διαλευκανθεί και ο λόγος για τον οποίο συμβαίνει αυτό.
- ✚ Μελέτη του πολυμορφισμού RS10757278, ο οποίος έχει κατηγορηθεί περισσότερο για καρδιαγγειακές παθήσεις, σε γυναίκες που έχουν διαγνωστεί με ενδομητρίωση και ενδεχομένως συγκριτική ανάλυση με γυναίκες που δεν έχουν διαγνωστεί.
- ✚ Στη μελέτη των Nakaoka et al. 2016 είχε βρεθεί συσχέτιση μεταξύ κάποιων άλλων πολυμορφισμών του ANRIL και της ενδομητρίωσης, ενώ στην μετα-ανάλυση των Yadav Sarkota et al. 2015 βρέθηκε όπως προαναφέρθηκε μια σημαντικότερη συσχέτιση μεταξύ του RS4977574 και της ενδομητρίωσης. Προτείνεται λοιπόν να μελετηθεί και ο πολυμορφισμός RS10757278 σε γυναίκες με ενδομητρίωση. Στην προκειμένη περίπτωση με μια τέτοια μελέτη θα μπορούσε να βρεθεί ή όχι ένας επιπλέον συνδετικός κρίκος και να αξιοποιηθούν καλύτερα τα δεδομένα αυτής της έρευνας εκφέροντας επιπλέον πληροφορίες για τον υπό μελέτη γενετικό τόπο.

Ανάμεσα στα πολλά και πολύτιμα εργαλεία του Βιολόγου τα οποία μπορούν να βοηθήσουν σε πιο ειδικές μελλοντικές μελέτες, ανήκει και το NGS το οποίο ενδύκνεται ισχυρά διότι παρουσιάζει εξαιρετική κλινική ευαισθησία, πολύ μικρότερο κόστος από τις πιο παραδοσιακές μεθόδους και λιγότερο χρόνο ολοκλήρωσης από τις τρέχουσες μεθόδους (Bonny Patel et al. 2018).

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης ισχυροποιούν την αναγκαιότητα των GWAS σε μεγαλύτερα μεγέθη δείγματος ώστε να αποκαλύψουν ή και να επιβεβαιώσουν τις γενετικές παραλλαγές που σχετίζονται με την υπογονιμότητα αρχικά στον Ελληνικό πληθυσμό και κατ'επέκταση στον υπόλοιπο κόσμο, χαρτογραφώντας με αυτόν τον τρόπο την εμφάνιση συγκεκριμένων πολυμορφισμών και την επίδρασή τους στην υπογονιμότητα.

Γι' αυτόν ακριβώς το λόγο τα εργαλεία που υπάρχουν στη διάθεση των επιστημόνων, συνεχώς εξελίσσονται με αποτέλεσμα να μπορούν να πραγματοποιηθούν όλες οι επιθυμητές μελέτες αλλά και όλα τα απαραίτητα διαγνωστικά τεστ τόσο για την γυναίκα όσο και για τον άντρα.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Villegas VE, Zaphiropoulos PG. «Neighboring gene regulation by antisense long non-coding RNAs». *Int J Mol Sci.* (2015) 16:3251–66. doi: 10.3390/ijms16023251.
- Pasmant E, Laurendeau I, Héron D, Vidaud M, Vidaud D, Bièche I. «Characterization of a germ-line deletion, including the entire INK4/ARF locus, in a melanoma-neural system tumor family: identification of ANRIL, an antisense noncoding RNA whose expression coclusters with ARF». *Cancer Res.* (2007) 67:3963–9. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-2004.
- Congrains A, Kamide K, Ohishi M, Rakugi H. «ANRIL: molecular mechanisms and implications in human health». *Int J Mol Sci* (2013) 14:1278–92. doi: 10.3390/ijms14011278.
- Pasmant E, Sabbagh A, Vidaud M, Bièche I. «ANRIL, a long, noncoding RNA, is an unexpected major hotspot in GWAS». *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* (2011) 25:444–8. doi: 10.1096/fj.10-172452.
- Rao SSP, Huntley MH, Durand NC, Stamenova EK, Bochkov ID, Robinson JT, et al. «A 3D map of the human genome at kilobase resolution reveals principles of chromatin looping». *Cell* (2014) 159:1665–80. doi: 10.1016/j.cell.2014.11.021.
- Holdt LM, Stahringer A, Sass K, Pichler G, Kulak NA, Wilfert W, et al. «Circular non-coding RNA ANRIL modulates ribosomal RNA maturation and atherosclerosis in humans». *Nat Commun.* (2016) 7:12429. doi: 10.1038/ncomms12429.
- Sarkar D, Oghabian A, Bodiabadi PK, Joseph WR, Leung EY, Finlay GJ, et al. «Multiple isoforms of ANRIL in melanoma cells: structural complexity suggests variations in processing». *Int J Mol Sci.* (2017) 18:E1378. doi: 10.3390/ijms18071378.
- Burd CE, Jeck WR, Liu Y, Sanoff HK, Wang Z, Sharpless NE. «Expression of linear and novel circular forms of an INK4/ARF-associated non-coding RNA

correlates with atherosclerosis risk». *PLoS Genet* (2010) 6:e1001233. doi: 10.1371/journal.pgen.1001233.

- Holdt LM, Sass K, Gäbel G, Bergert H, Thiery J, Teupser D. «Expression of Chr9p21 genes CDKN2B (p15INK4b), CDKN2A (p16INK4a, p14ARF) and MTAP in human atherosclerotic plaque». *Atherosclerosis* (2011) 214:264–70. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2010.06.029.
- Kong Y, Sharma RB, Nwosu BU, Alonso LC. «Islet biology, the CDKN2A/B locus and type 2 diabetes risk». *Diabetologia* (2016) 59:1579–93. doi: 10.1007/s00125-016-3967-7.
- Matheu A, Maraver A, Collado M, Garcia-Cao I, Cañamero M, Borrás C, et al. «Anti-aging activity of the Ink4/Arf locus». *Aging Cell* (2009) 8:152–61. doi: 10.1111/j.1474-9726.2009.00458.x.
- Cánepa ET, Scassa ME, Ceruti JM, Marazita MC, Carcagno AL, Sirkin PF, et al. «INK4 proteins, a family of mammalian CDK inhibitors with novel biological functions». *IUBMB Life* (2007) 59:419–26. doi: 10.1080/15216540701488358.
- Kotake Y, Nakagawa T, Kitagawa K, Suzuki S, Liu N, Kitagawa M, et al. «Long non-coding RNA ANRIL is required for the PRC2 recruitment to and silencing of p15 INK4B tumor suppressor gene». *Oncogene* (2011) 30:1956–62. doi: 10.1038/onc.2010.568.
- Congrains A, Kamide K, Katsuya T, Yasuda O, Oguro R, Yamamoto K, et al. «CVD-associated non-coding RNA, ANRIL, modulates expression of atherogenic pathways in VSMC». *Biochem Biophys Res Commun* (2012) 419:612–6. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.02.050.
- He S, Gu W, Li Y, Zhu H. «ANRIL/CDKN2B-AS shows two-stage clade-specific evolution and becomes conserved after transposon insertions in simians». *BMC Evol Biol* (2013) 13:247. doi: 10.1186/1471-2148-13-247.
- Folkersen L, Kyriakou T, Goel A, Peden J, Mälarstig A, Paulsson-Berne G, et al. «Relationship between CAD risk genotype in the chromosome 9p21 locus and

- gene expression. Identification of eight new ANRIL splice variants». *PLoS ONE* (2009) 4:e7677. doi: 10.1371/journal.pone.0007677.
- Salzman J, Gawad C, Wang PL, Lacayo N, Brown PO. «Circular RNAs are the predominant transcript isoform from hundreds of human genes in diverse cell types». *PLoS ONE* (2012) 7:e30733. doi: 10.1371/journal.pone.0030733.
 - Jeck WR, Sorrentino JA, Wang K, Slevin MK, Burd CE, Liu J, et al. «Circular RNAs are abundant, conserved, and associated with ALU repeats». *RNA* (2013) 19:141–57. doi: 10.1261/rna.035667.112.
 - Barrett SP, Salzman J. «Circular RNAs: analysis, expression and potential functions». *Dev Camb Engl.* (2016) 143:1838–47. doi: 10.1242/dev.128074.
 - Fiscon G, Paci P, Iannello G. «MONSTER v1.1: a tool to extract and search for RNA non-branching structures». *BMC Genomics* (2015) 16:S1. doi: 10.1186/1471-2164-16-S6-S1.
 - Yap KL, Li S, Muñoz-Cabello AM, Raguz S, Zeng L, Mujtaba S, et al. «Molecular Interplay of the noncoding RNA ANRIL and methylated histone H3 lysine 27 by Polycomb CBX7 in transcriptional silencing of INK4a». *Mol Cell.* (2010) 38:662–74. doi: 10.1016/j.molcel.2010.03.021.
 - Zhang E, Kong R, Yin D, You L, Sun M, Han L, Xu T, et al. «Long noncoding RNA ANRIL indicates a poor prognosis of gastric cancer and promotes tumor growth by epigenetically silencing of miR-99a/miR-449a». *Oncotarget* (2014) 5:2276–92. doi: 10.18632/oncotarget.1902.
 - Hoffmann MJ, Dehn J, Droop J, Niegisch G, Niedworok C, Szarvas T, Schulz WA. «Truncated Isoforms of lncRNA ANRIL are overexpressed in bladder cancer, but do not contribute to repression of INK4 tumor suppressor». *Non Coding RNA* (2015) 1:266–84. doi: 10.3390/ncrna1030266 .
 - Cabili MN, Dunagin MC, McClanahan PD, Biaesch A, Padovan-Merhar O, Regev A, Rinn JL, Raj A. «Localization and abundance analysis of human lncRNAs at single-cell and single-molecule resolution». *Genome Biol.* (2015) 16:20. doi: 10.1186/s13059-015-0586-4.

- Thomas AA, Feng B, Chakrabarti S. «ANRIL: a regulator of VEGF in diabetic retinopathy». *Invest Ophthalmol Vis Sci.* (2017) 58:470–80. doi: 10.1167/iovs.16-20569.
- Zhou X, Han X, Wittfeldt A, Sun J, Liu C, Wang X, et al. «Long non-coding RNA ANRIL regulates inflammatory responses as a novel component of NF-κB pathway». *RNA Biol.* (2016) 13:98–108. doi: 10.1080/15476286.2015.1122164.
- Cao S, Moss W, O'Grady T, Concha M, Strong MJ, Wang X, et al. «New noncoding lytic transcripts derived from the epstein-barr virus latency origin of replication, oriP, are hyperedited, bind the paraspeckle protein, NONO/p54nrb, and support viral lytic transcription». *J Virol.* (2015) 89:7120–32. doi: 10.1128/JVI.00608-15.
- Gruber AR, Lorenz R, Bernhart SH, Neuböck R, Hofacker IL. «The Vienna RNA websuite». *Nucleic Acids Res.* (2008) 36: W70–4. doi: 10.1093/nar/gkn188.
- Lillycrop K, Murray R, Cheong C, Teh AL, Clarke-Harris R, Barton S, et al. «ANRIL promoter DNA methylation: a perinatal marker for later adiposity». *EBioMedicine* (2017) 19:60–72. doi: 10.1016/j.ebiom.2017.03.037.
- Curtis EM, Murray R, Titcombe P, Cook E, Clarke-Harris R, Costello P, et al. «Perinatal DNA methylation at CDKN2A is associated with offspring bone mass: findings from the southampton Women's survey». *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res.* (2017) 32:2030–40. doi: 10.1002/jbmr.3153.
- Murray R, Bryant J, Titcombe P, Barton SJ, Inskip H, Harvey NC, et al. «DNA methylation at birth within the promoter of ANRIL predicts markers of cardiovascular risk at 9 years». *Clin Epigenetics* (2016) 8:90. doi: 10.1186/s13148-016-0259-5.
- Sato K, Nakagawa H, Tajima A, Yoshida K, Inoue I. «ANRIL is implicated in the regulation of nucleus and potential transcriptional target of E2F1». *Oncol Rep.* (2010) 24:701–7. doi: 10.3892/or_00000910.

- Wan G, Mathur R, Hu X, Liu Y, Zhang X, Peng G, et al. «Long non-coding RNA ANRIL (CDKN2B-AS) is induced by the ATM-E2F1 signaling pathway». *Cell Signal.* (2013) 25:1086–95. doi: 10.1016/j.cellsig.2013.02.006.
- Ernst J, Kheradpour P, Mikkelson TS, Shores N, Ward LD, Epstein CB, et al. «Mapping and analysis of chromatin state dynamics in nine human cell types». *Nature* (2011) 473:43–9. doi: 10.1038/nature09906.
- Rodriguez C, Borgel J, Court F, Cathala G, Forné T, Piette J. «CTCF is a DNA methylation-sensitive positive regulator of the INK/ARF locus». *Biochem Biophys Res Commun.* (2010) 392:129–34. doi: 10.1016/j.bbrc.2009.12.159.
- Gan Y, Ma W, Wang X, Qiao J, Zhang B, Cui C, et al. «Coordinated transcription of ANRIL and P16 genes is silenced by P16 DNA methylation». *Chin J Cancer Res.* (2018) 30:93–103. doi: 10.21147/j.issn.1000-9604.2018.01.10.
- Özgür E, Mert U, Isin M, Okutan M, Dalay N, Gezer U. «Differential expression of long non-coding RNAs during genotoxic stress-induced apoptosis in HeLa and MCF-7 cells». *Clin Exp Med.* (2013) 13:119–26. doi: 10.1007/s10238-012-0181-x.
- Lu Y, Zhou X, Xu L, Rong C, Shen C, Bian W. «Long noncoding RNA ANRIL could be transactivated by c-Myc and promote tumor progression of non-small-cell lung cancer». *OncoTargets Ther.* (2016) 9:3077–84. doi: 10.2147/OTT.S102658.
- Wu JH, Tang JM, Li J, Li XW. «Upregulation of SOX2-activated lncRNA ANRIL promotes nasopharyngeal carcinoma cell growth». *Sci Rep.* (2018) 8:3333. doi: 10.1038/s41598-018-21708-z.
- Huang M, Chen W, Qi F, Xia R, Sun M, Xu T, et al. «Long non-coding RNA ANRIL is upregulated in hepatocellular carcinoma and regulates cell apoptosis by epigenetic silencing of KLF2». *J Hematol Oncol.* (2015) 8:50. doi: 10.1186/s13045-015-0146-0.
- Deng W, Wang J, Zhang J, Cai J, Bai Z, Zhang Z. «TET2 regulates LncRNA-ANRIL expression and inhibits the growth of human gastric cancer cells». *IUBMB Life* (2016) 68:355–64. doi: 10.1002/iub.1490.

- Kotake Y, Naemura M, Kitagawa K, Niida H, Tsunoda T, Shirasawa S, et al. «Oncogenic Ras influences the expression of multiple lncRNAs». *Cytotechnology* (2016) 68:1591–6. doi: 10.1007/s10616-014-9834-9.
- Harismendy O, Notani D, Song X, Rahim NG, Tanasa B, Heintzman N, et al. «9p21 DNA variants associated with coronary artery disease impair interferon- γ signalling response». *Nature* (2011) 470:264–68. doi: 10.1038/nature09753.
- Holdt LM, Beutner F, Scholz M, Gielen S, Gäbel G, Bergert H, et al. «ANRIL expression is associated with atherosclerosis risk at chromosome 9p21». *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* (2010) 30:620–7. doi: 10.1161/ATVBAHA.109.196832.
- Sethuraman S, Gay LA, Jain V, Haecker I, Renne R. «microRNA dependent and independent deregulation of long non-coding RNAs by an oncogenic herpesvirus». *PLoS Pathog* (2017) 13:e1006508. doi: 10.1371/journal.ppat.1006508.
- Holdt LM, Hoffmann S, Sass K, Langenberger D, Scholz M, Krohn K, et al. «Alu elements in ANRIL non-coding RNA at chromosome 9p21 modulate atherogenic cell functions through trans-regulation of gene networks». *PLoS Genet.* (2013) 9: e1003588. doi: 10.1371/journal.pgen.1003588.
- Ren C, Smith SG, Yap K, Li S, Li J, Mezei M, et al. «Structure-Guided Discovery of Selective Antagonists for the Chromodomain of Polycomb Repressive Protein CBX7». *ACS Med Chem Lett.* (2016) 7:601–5. doi: 10.1021/acsmchemlett.6b00042.
- Cunnington MS, Santibanez Koref M, Mayosi BM, Burn J, Keavney B. «Chromosome 9p21 SNPs associated with multiple disease phenotypes correlate with ANRIL expression». *PLoS Genet* (2010) 6:e1000899. doi: 10.1371/journal.pgen.1000899.
- Jarinova O, Stewart AFR, Roberts R, Wells G, Lau P, Naing T, et al. «Functional analysis of the chromosome 9p21.3 coronary artery disease risk

- locus». *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* (2009) 29:1671–7. doi: 10.1161/ATVBAHA.109.189522.
- Johnson AD, Hwang SJ, Voorman A, Morrison A, Peloso GM, Hsu YH, et al. «Resequencing and clinical associations of the 9p21.3 region: a comprehensive investigation in the Framingham heart study». *Circulation* (2013) 127:799–810. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.112.111559.
 - Motterle A, Pu X, Wood H, Xiao Q, Gor S, Liang Ng F, et al. «Functional analyses of coronary artery disease associated variation on chromosome 9p21 in vascular smooth muscle cells». *Hum Mol Genet.* (2012) 21:4021–9. doi: 10.1093/hmg/dds224.
 - Bai Y, Nie S, Jiang G, Zhou Y, Zhou M, Zhao Y, et al. «Regulation of CARD8 expression by ANRIL and association of CARD8 single nucleotide polymorphism rs2043211 (p.C10X) with ischemic stroke». *Stroke* (2014) 45:383–8. doi: 10.1161/STROKEAHA.113.003393.
 - Wang F, Su X, Liu C, Wu M, Li B. «Prognostic value of plasma long noncoding RNA ANRIL for in-stent restenosis». *Med Sci Monit Int Med J Exp Clin Res.* (2017) 23:4733–9. doi: 10.12659/MSM.904352.
 - Ma J, Li T, Han X, Yuan H. «Knockdown of LncRNA ANRIL suppresses cell proliferation, metastasis, and invasion via regulating miR-122-5p expression in hepatocellular carcinoma». *J Cancer Res Clin Oncol.* (2018) 144:205–14. doi: 10.1007/s00432-017-2543-y.
 - Dong X, Jin Z, Chen Y, Xu H, Ma C, Hong X, et al. «Knockdown of long non-coding RNA ANRIL inhibits proliferation, migration, and invasion but promotes apoptosis of human glioma cells by upregulation of miR-34a». *J Cell Biochem.* (2018) 119:2708–18. doi: 10.1002/jcb.26437.
 - Zhao B, Lu YL, Yang Y, Hu LB, Bai Y, Li RQ, et al. «Overexpression of lncRNA ANRIL promoted the proliferation and migration of prostate cancer cells via regulating let-7a/TGF- β 1/ Smad signaling pathway». *Cancer Biomark Sect Dis Markers* (2018) 21:613–20. doi: 10.3233/CBM-170683.

- Xu ST, Xu JH, Zheng ZR, Zhao QQ, Zeng XS, Cheng SX, et al. «Long non-coding RNA ANRIL promotes carcinogenesis via sponging miR-199a in triple-negative breast cancer». *Biomed Pharmacother Biomedecine Pharmacother.* (2017) 96:14–21. doi: 10.1016/j.biopha.2017.09.107.
- Nie F, Sun M, Yang J, Xie M, Xu T, Xia R, et al. «Long noncoding RNA ANRIL promotes non-small cell lung cancer cell proliferation and inhibits apoptosis by silencing KLF2 and P21 expression». *Mol Cancer Ther.* (2015) 14:268–77. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-14-0492.
- Li R, Yin F, Guo YY, Zhao KC, Ruan Q, Qi YM. «Knockdown of ANRIL aggravates H2O2-induced injury in PC-12 cells by targeting microRNA-125a». *Biomed Pharmacother Biomedecine Pharmacother* (2017) 92:952–61. doi: 10.1016/j.biopha.2017.05.122.
- Broadbent HM, Peden JF, Lorkowski S, Goel A, Ongen H, Green F, et al. «Susceptibility to coronary artery disease and diabetes is encoded by distinct, tightly linked SNPs in the ANRIL locus on chromosome 9p». *Hum Mol Genet.* (2008) 17:806–14. doi: 10.1093/hmg/ddm352.
- Rezazadeh M, Gharesouran J, Moradi M, Noroozi R, Omrani MD, Taheri M, et al. «Association study of ANRIL genetic variants and multiple sclerosis». *J Mol Neurosci.* (2018) 65:54–9 doi: 10.1007/s12031-018-1069-3.
- Hannou SA, Wouters K, Paumelle R, Staels B. «Functional genomics of the CDKN2A/B locus in cardiovascular and metabolic disease: what have we learned from GWASs» *Trends Endocrinol Metab.* (2015) 26:176–84. doi: 10.1016/j.tem.2015.01.008.
- Ward LD, Kellis M. «HaploReg v4: systematic mining of putative causal variants, cell types, regulators and target genes for human complex traits and disease». *Nucleic Acids Res.* (2016) 44: D877–81. doi: 10.1093/nar/gkv1340.
- Hungate EA, Vora SR, Gamazon ER, Moriyama T, Best T, Hular I, et al. «A variant at 9p21.3 functionally implicates CDKN2B in paediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia aetiology». *Nat Commun.* (2016) 7:10635. doi: 10.1038/ncomms10635.

- Gong J, Liu C, Liu W, Wu Y, Ma Z, Chen H, et al. «An update of miRNASNP database for better SNP selection by GWAS data, miRNA expression and online tools». *Database* (2015) 2015: bav029. doi: 10.1093/database/bav029.
- Wang X, Li W, Ma L, Gao J, Liu J, Ping F, et al. «Association study of the miRNA-binding site polymorphisms of CDKN2A/B genes with gestational diabetes mellitus susceptibility». *Acta Diabetol.* (2015) 52:951–8. doi: 10.1007/s00592-015-0768-2.
- Zhao W, Smith JA, Mao G, Fornage M, Peyser PA, Sun YV, et al. «The cis and trans effects of the risk variants of coronary artery disease in the Chr9p21 region». *BMC Med Genomics* (2015) 8:21. doi: 10.1186/s12920-015-0094-0.
- Kong Y, Sharma RB, Ly S, Stamateris RE, Jesdale WM, Alonso LC. «CDKN2A/B T2D genome-wide association study risk SNPs impact locus gene expression and proliferation in human islets». *Diabetes* (2018) 67:872–84. doi: 10.2337/db17-1055.
- Cheng M, An S, Li J. «CDKN2B-AS may indirectly regulate coronary artery disease-associated genes via targeting miR-92a». *Gene* (2017) 629:101–7. doi: 10.1016/j.gene.2017.07.070.
- Poi MJ, Li J, Sborov DW, VanGundy Z, Cho YK, Lamprecht M, et al. «Polymorphism in ANRIL is associated with relapse in patients with multiple myeloma after autologous stem cell transplant». *Mol Carcinog.* (2017) 56:1722–32. doi: 10.1002/mc.22626.
- Zhuang J, Peng W, Li H, Wang W, Wei Y, Li W, et al. «Methylation of p15INK4b and expression of ANRIL on chromosome 9p21 are associated with coronary artery disease». *PLoS ONE* (2012) 7: e47193. doi: 10.1371/journal.pone.0047193.
- Liu Y, Sanoff HK, Cho H, Burd CE, Torrice C, Mohlke KL, et al. «INK4/ARF transcript expression is associated with chromosome 9p21 variants linked to atherosclerosis». *PLoS ONE* (2009) 4: e5027. doi: 10.1371/journal.pone.0005027.

- Zhang W, Chen Y, Liu P, Chen J, Song L, Tang Y, et al. «Variants on chromosome 9p21.3 correlated with ANRIL expression contribute to stroke risk and recurrence in a large prospective stroke population». *Stroke* (2012) 43:14–21. doi: 10.1161/STROKEAHA.111.625442.
- Gong W, Peng J, Yin J, Li X, Zheng W, Xiao L, et al. «Association between well-characterized lung cancer lncRNA polymorphisms and platinum-based chemotherapy toxicity in Chinese patients with lung cancer». *Acta Pharmacol Sin.* (2017) 38:581–90. doi: 10.1038/aps.2016.164.
- Nakaoka H, Gurumurthy A, Hayano T, Ahmadloo S, Omer WH, Yoshihara K, et al. «Allelic Imbalance in Regulation of ANRIL through chromatin interaction at 9p21 endometriosis risk locus». *PLOS Genet.* (2016) 12:e1005893. doi: 10.1371/journal.pgen.1005893.
- Tano K, Akimitsu N. «Long non-coding RNAs in cancer progression». *Front Genet.* (2012) 3:219. doi: 10.3389/fgene.2012.00219.
- Zhu H, Li X, Song Y, Zhang P, Xiao Y, Xing Y. «Long non-coding RNA ANRIL is up-regulated in bladder cancer and regulates bladder cancer cell proliferation and apoptosis through the intrinsic pathway». *Biochem Biophys Res Commun.* (2015) 467:223–8. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.10.002.
- Qiu JJ, Lin YY, Ding JX, Feng WW, Jin HY, Hua KQ. «Long non-coding RNA ANRIL predicts poor prognosis and promotes invasion/metastasis in serous ovarian cancer». *Int J Oncol.* (2015) 46:2497–505. doi: 10.3892/ijo.2015.2943.
- Hu X, Bao J, Wang Z, Zhang Z, Gu P, Tao F, et al. «The plasma lncRNA acting as fingerprint in non-small-cell lung cancer». *Tumour Biol J Int Soc Oncodevelopmental Biol Med.* (2016) 37:3497–504. doi: 10.1007/s13277-015-4023-9.
- Naemura M, Murasaki C, Inoue Y, Okamoto H, Kotake Y. «Long noncoding RNA ANRIL regulates proliferation of non-small cell lung cancer and cervical cancer cells». *Anticancer Res.* (2015) 35:5377–82.

- Qiu J, Wang Y, Liu Y, Zhang Y, Ding J, Hua K. «The long non-coding RNA ANRIL promotes proliferation and cell cycle progression and inhibits apoptosis and senescence in epithelial ovarian cancer». *Oncotarget* (2016) 7:32478–92. doi: 10.18632/oncotarget.8744.
- Kang YH, Kim D, Jin EJ. «Down-regulation of phospholipase D stimulates death of lung cancer cells involving up-regulation of the Long ncRNA ANRIL». *Anticancer Res.* (2015) 35:2795–2803.
- Hua L, Wang CY, Yao KH, Chen JT, Zhang JJ, Ma WL. «High expression of long non-coding RNA ANRIL is associated with poor prognosis in hepatocellular carcinoma». *Int J Clin Exp Pathol.* (2015) 8:3076–82.
- Liu M, Xing LQ, Liu YJ. «A three-long noncoding RNA signature as a diagnostic biomarker for differentiating between triple-negative and non-triple-negative breast cancers». *Medicine* (2017) 96: e6222. doi: 10.1097/MD.00000000000006222.
- Meseure D, Vacher S, Alsibai KD, Nicolas A, Chemlali W, Caly M, et al. «Expression of ANRIL-polycomb complexes-CDKN2A/B/ARF genes in breast tumors: identification of a two-gene (EZH2/CBX7) signature with independent prognostic value». *Mol Cancer Res.* (2016) 14:623–33. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-15-0418.
- Chen D, Zhang Z, Mao C, Zhou Y, Yu L, Yin Y, et al. «ANRIL inhibits p15(INK4b) through the TGFβ1 signaling pathway in human esophageal squamous cell carcinoma». *Cell Immunol.* (2014) 289:91–6. doi: 10.1016/j.cellimm.2014.03.015.
- Zou ZW, Ma C, Medoro L, Chen L, Wang B, Gupta R, et al. «LncRNA ANRIL is up-regulated in nasopharyngeal carcinoma and promotes the cancer progression via increasing proliferation, reprogramming cell glucose metabolism and inducing side-population stem-like cancer cells». *Oncotarget* (2016) 7:61741–54. doi: 10.18632/oncotarget.11437.
- Wang Y, Cheng N, Luo J. «Downregulation of lncRNA ANRIL represses tumorigenicity and enhances cisplatin-induced cytotoxicity via regulating

microRNA let-7a in nasopharyngeal carcinoma». *J Biochem Mol Toxicol.* (2017) 31:e21904 doi: 10.1002/jbt.21904.

- Zhao JJ, Hao S, Wang LL, Hu CY, Zhang S, Guo LJ, et al. «Long non-coding RNA ANRIL promotes the invasion and metastasis of thyroid cancer cells through TGF- β /Smad signaling pathway». *Oncotarget* (2016) 7:57903–18. doi: 10.18632/oncotarget.11087.
- Cheng S, Huang T, Li P, Zhang W, Wang Z, Chen Y. «Long non-coding RNA ANRIL promotes the proliferation, migration and invasion of human osteosarcoma cells». *Exp Ther Med.* (2017) 14:5121–5. doi: 10.3892/etm.2017.5123.
- Zhang JJ, Wang DD, Du CX, Wang Y. «Long noncoding RNA ANRIL promotes cervical cancer development by acting as a sponge of miR-186». *Oncol Res.* (2017) 26:345–52. doi: 10.3727/096504017X14953948675449.
- Sun Z, Ou C, Ren W, Xie X, Li X, Li G. «Downregulation of long non-coding RNA ANRIL suppresses lymphangiogenesis and lymphatic metastasis in colorectal cancer». *Oncotarget* (2016) 7:47536–55. doi: 10.18632/oncotarget.9868.
- Wang H, Liu Y, Zhong J, Wu C, Zhong Y, Yang G, et al. «Long noncoding RNA ANRIL as a novel biomarker of lymph node metastasis and prognosis in human cancer: a meta-analysis». *Oncotarget* (2018) 9:14608–18. doi: 10.18632/oncotarget.21825.
- Stacey SN, Sulem P, Masson G, Gudjonsson SA, Thorleifsson G, Jakobsdottir M, et al. «New common variants affecting susceptibility to basal cell carcinoma». *Nat Genet.* (2009) 41:909–14. doi: 10.1038/ng.412.
- Bishop DT, Demenais F, Iles MM, Harland M, Taylor JC, Corda E, et al. «Genome-wide association study identifies three loci associated with melanoma risk». *Nat Genet.* (2009) 41:920–5. doi: 10.1038/ng.411.
- Gu F, Pfeiffer RM, Bhattacharjee S, Han SS, Taylor PR, Berndt S, et al. «Common genetic variants in the 9p21 region and their associations with multiple tumours». *Br J Cancer* (2013) 108:1378–86. doi: 10.1038/bjc.2013.7.

- Xu R, Mao Y, Chen K, He W, Shi W, Han Y. «The long noncoding RNA ANRIL acts as an oncogene and contributes to paclitaxel resistance of lung adenocarcinoma A549 cells». *Oncotarget* (2017) 8:39177–84. doi: 10.18632/oncotarget.16640.
- Lan WG, Xu DH, Xu C, Ding CL, Ning FL, Zhou YL, et al. «Silencing of long non-coding RNA ANRIL inhibits the development of multidrug resistance in gastric cancer cells». *Oncol Rep.* (2016) 36:263–70. doi: 10.3892/or.2016.4771.
- Zhang D, Ding L, Li Y, Ren J, Shi G, Wang Y, et al. «Midkine derived from cancer-associated fibroblasts promotes cisplatin-resistance via up-regulation of the expression of lncRNA ANRIL in tumour cells». *Sci Rep.* (2017) 7:16231. doi: 10.1038/s41598-017-13431-y.
- Xu S, Wang H, Pan H, Shi Y, Li T, Ge S, et al. «ANRIL lncRNA triggers efficient therapeutic efficacy by reprogramming the aberrant INK4-hub in melanoma». *Cancer Lett.* (2016) 381:41–8. doi: 10.1016/j.canlet.2016.07.024.
- Chai L, Yuan Y, Chen C, Zhou J, Wu Y. «The role of long non-coding RNA ANRIL in the carcinogenesis of oral cancer by targeting miR-125a». *Biomed Pharmacother.* (2018) 103:38–45. doi: 10.1016/j.biopha.2018.01.105.
- Zhang H, Wang X, Chen X. «Potential role of long non-coding RNA ANRIL in pediatric medulloblastoma through promotion on proliferation and migration by targeting miR-323». *J Cell Biochem.* (2017) 118:4735–44. doi: 10.1002/jcb.26141.
- Yu G, Liu G, Yuan D, Dai J, Cui Y, Tang X. «Long non-coding RNA ANRIL is associated with a poor prognosis of osteosarcoma and promotes tumorigenesis via PI3K/Akt pathway». *J Bone Oncol.* (2018) 11:51–5. doi: 10.1016/j.jbo.2018.02.002.
- Xie H, Rachakonda PS, Heidenreich B, Nagore E, Sucker A, Hemminki K, et al. «Mapping of deletion breakpoints at the CDKN2A locus in melanoma:

detection of MTAP-ANRIL fusion transcripts». *Oncotarget* (2016) 7:16490–504. doi: 10.18632/oncotarget.7503.

- Zeggini E, Weedon MN, Lindgren CM, Frayling TM, Elliott KS, Lango H, et al. «Replication of genome-wide association signals in UK samples reveals risk loci for type 2 diabetes». *Science* (2007) 316:1336–41. doi: 10.1126/science.1142364.
- Vausort M, Wagner DR, Devaux Y. «Long noncoding RNAs in patients with acute myocardial infarction». *Circ Res* (2014) 115:668–77. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.303836.
- Taneera J, Lang S, Sharma A, Fadista J, Zhou Y, Ahlqvist E, et al. «A systems genetics approach identifies genes and pathways for type 2 diabetes in human islets». *Cell Metab.* (2012) 16:122–34. doi: 10.1016/j.cmet.2012.06.006.
- Dayeh TA, Olsson AH, Volkov P, Almgren P, Rönn T, Ling C. «Identification of CpG-SNPs associated with type 2 diabetes and differential DNA methylation in human pancreatic islets». *Diabetologia* (2013) 56:1036–46. doi: 10.1007/s00125-012-2815-7.
- Ruiz MA, Feng B, Chakrabarti S. «Polycomb repressive complex 2 regulates MiR-200b in retinal endothelial cells: potential relevance in diabetic retinopathy». *PLoS ONE* (2015) 10:e0123987. doi: 10.1371/journal.pone.0123987.
- Baker T. G., L. L. Franchi. «The Fine Structure of Oogonia and Oocytes in Human Ovaries». *Journal of Cell Science* 1967 2: 213-224.
- Faddy M J, R G Gosden. «A mathematical model of follicle dynamics in the human ovary». PMID: 7650119 DOI: 10.1093/oxfordjournals.humrep.a136036.
- Franchimont P., A Demoulin, J C Valcke. «Endocrine, paracrine and autocrine control of follicular development». PMID: 3294154 DOI: 10.1055/s-2007-1010793.

- Telfer Evelyn E., Mary B Zelinski. «Ovarian follicle culture: advances and challenges for human and nonhuman primates». PMID: 23635350. PMCID: PMC3929501. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2013.03.043.
- Pavelka R., F Friedrich, H Caucig. «Ultrastructure of the human ovocyte of the Graafian follicle» 1972. PMID: 4558289.
- De Sousa P A., G Valdimarsson, B J Nicholson, G M Kidder. «Connexin trafficking and the control of gap junction assembly in mouse preimplantation embryos» 1993. PMID: 8404537.
- Erickson G F., S Shimasaki «The role of the oocyte in folliculogenesis» 2000. PMID: 10856922. DOI: 10.1016/s1043-2760(00)00249-6.
- Gregory R. 1998. «Circuits and bumps» PMID: 10505183. DOI: 10.1068/p271389.
- Simon A M., D A Goodenough, E Li, D L Paul. «Female infertility in mice lacking connexin 37» PMID: 9020357. DOI: 10.1038/385525a0.
- Γουρουντή Κλεάνθη «Συμβουλευτική στην Υπογονιμότητα». Εκδόσεις Λαγός 5 Δ., 2012. ISBN: 978-960-7875-78-5.
- Κλήμης Νικηφόρος «Γονιμότητα-Κατακτήστε τη με φυσικούς και άλλους τρόπους» Εκδόσεις Ψύχαλος 2012. ISBN:9789608455948.
- Ιατράκης Γ. (συνεργασία με τις Καθ. Αναστασιάδου Ε, Αντωνίου Ε-συμμετοχή κ. Ροκοπάνου Θ). «Συμβουλευτική στην Υποβοηθούμενη Αναπαραγωγή . Αθήνα 2009, Εκδόσεις «Δεσμός». ISBN: 978-960-98884-2-4.
- Jordana K Bayer 1, Harriet Hiscock, Anne Hampton, Melissa Wake. «Sleep problems in young infants and maternal mental and physical health» an-Feb 2007;43(1-2):66-73. doi: 10.1111/j.1440-1754.2007.01005.x. PMID: 17207059. DOI: 10.1111/j.1440-1754.2007.01005.x
- Λαϊνάς Τρύφων Γεώργιος «Ανθρώπινη αναπαραγωγή & εξωσωματική γονιμοποίηση» Τόμοι Α & Β . Εκδόσεις Ηλιας Μανιατέας, Αθήνα 2006.
- Allersma Thomas, Cindy Farquhar and Cochrane Gynaecology and Fertility Group. «Natural cycle in vitro fertilisation (IVF) for subfertile couples».

Cochrane Database Syst Rev. 2013 Aug; 2013(8): CD010550. Published online 2013 Aug 30. doi: 10.1002/14651858.CD010550.pub2.PMCID: PMC7390465. PMID: 23990351.

- Janice A. Royds, Anna P. Pilbrow and Tania L. Slatter. «The rs11515 Polymorphism Is More Frequent and Associated With Aggressive Breast Tumors with Increased ANRIL and Decreased p16INK4a Expression». *Front Oncol.* 2015; 5: 306. Published online 2016 Jan 21. doi: 10.3389/fonc.2015.00306. PMCID: PMC4720739. PMID: 26835415.
- Hirofumi Nakaoka, Aishwarya Gurumurthy, Takahide Hayano, Somayeh Ahmadloo, Waleed H Omer, Kosuke Yoshihara, Akihito Yamamoto, Keisuke Kurose, Takayuki Enomoto, Shigeo Akira, Kazuyoshi Hosomichi, Ituro Inoue. «Allelic Imbalance in Regulation of ANRIL through Chromatin Interaction at 9p21 Endometriosis Risk Locus». Published: April 7, 2016. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005893>.
- S. D. Keay, N. H. Liversedge, R. S. Mathur, J. M. Jenkins. «Assisted conception following poor ovarian response to gonadotrophin stimulation» First published: 19 August 2005. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0528.1997.tb11525.x>
- F J Broekmans 1, J Kwee, D J Hendriks, B W Mol, C B Lambalk. «A systematic review of tests predicting ovarian reserve and IVF outcome» *Nov-Dec 2006*;12(6):685-718. doi: 10.1093/humupd/dml034. Epub 2006 Aug 4. PMID: 16891297.
- Yadav Sapkota, Amelie Fassbender, Lisa Bowdler, Jenny N. Fung, Daniëlle Peterse, Dorien O, Grant W. Montgomery «Independent Replication and Meta-Analysis for Endometriosis Risk Loci». Published online by Cambridge University Press: 04 September 2015.
- Bayoglu, Huseyin Altug Cakmak, Husniye Yuksel, Gunay Can, Bilgehan Karadag , Turgut Ulutin, Vural Ali Vural, Mujgan Cengiz «Chromosome 9p21 rs10757278 polymorphism is associated with the risk of metabolic syndrome» 28 March 2013 379:77–85 DOI 10.1007/s11010-013-1629-3.

- Bonny Patel¹ & Sasha Parets¹ & Matthew Akana¹ & Gregory Kellogg¹ & Michael Jansen¹ & Chihyu Chang¹ & Ying Cai¹ & Rebecca Fox¹ & Mohammad Niknazar¹ & Roman Shraga¹ & Colby Hunter¹ & Andrew Pollock¹ & Robert Wisotzkey¹ & Malgorzata Jaremko¹ & Alex Bisignano¹ & Oscar Puig¹ «Comprehensive genetic testing for female and male infertility using next-generation sequencing» Received: 6 March 2018 /Accepted: 8 May 2018 /Published online: 19 May 2018.
- Michail Matalliotakis¹, Maria I Zervou², Charoula Matalliotaki¹, Nilufer Rahmioglu³, George Koumantakis⁴, Ioannis Kalogiannidis⁵, Ioannis Prapas⁶, Krina Zondervan³, Demetrios A Spandidos⁷, Ioannis Matalliotakis¹, George N Goulielmos²⁰¹⁷ «The role of gene polymorphisms in endometriosis» PMID: 28901453 PMCID: PMC5865763 DOI: 10.3892/mmr.2017.7398.