



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ  
ΤΟΜΕΑΣ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΟΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΣΤΗΝ ΚΛΙΝΙΚΗ  
ΠΡΑΞΗ

Τα μιτοχόνδρια ως βιοδείκτες στους γαμέτες και τα  
προεμφυτευτικά έμβρυα

Τσίρκα Γεωργία  
Χημικός

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ  
ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2024





ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ  
ΤΟΜΕΑΣ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΟΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΣΤΗΝ ΚΛΙΝΙΚΗ  
ΠΡΑΞΗ

Τα μιτοχόνδρια ως βιοδείκτες στους γαμέτες και τα  
προεμφυτευτικά έμβρυα

Τσίρκα Γεωργία  
Χημικός

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ  
ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2024



Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν.5343/32 άρθρο 202 παράγραφος 2, (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος).



**Ημερομηνία αίτησης της κας Τσίρκα Γεωργίας:** 21-10-2019

**Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:** Γ.Σ. αριθμ. 914<sup>α</sup>/3-3-2020

**Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:**

Επιβλέπων:

Γεωργίου Ιωάννης, Καθηγητή Ιατρικής Γενετικής και Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής της Μαιευτικής-Γυναικολογίας

Μέλη:

Ζηκόπουλος Κωνσταντίνος, Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας με έμφαση στην Υποβοηθούμενη Αναπαραγωγή

Μακρυδήμας Γεώργιος, Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας

**Ημερομηνία ορισμού θέματος:** 26-3-2020

«Τα μιτοχόνδρια ως βιοδείκτες στους γαμέτες και τα προεμφυτευτικά έμβρυα»

**ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ 1080<sup>α</sup>/14-12-2023**

1. Γεωργίου Ιωάννης, Καθηγητής Ιατρικής Γενετικής και Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής της Μαιευτικής-Γυναικολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
2. Ζηκόπουλος Κωνσταντίνος, Ομότιμος Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας με έμφαση στην Υποβοηθούμενη Αναπαραγωγή του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
3. Μακρυδήμας Γεώργιος, Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
4. Μιχαηλίδης Θεολόγος, Αναπληρωτής Καθηγητής Μοριακής Γενετικής του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
5. Αφένδρα Αμαλία-Σοφία, Επίκουρη Καθηγήτρια Μικροβιακής Γενετικής του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
6. Σκέντου Χαρίκλεια, Επίκουρη Καθηγήτρια Μαιευτικής-Γυναικολογίας με έμφαση στην Εμβρυομητρική Ιατρική
7. Ζαχαρίου Αθανάσιος, Επίκουρος Καθηγητής Ουρολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 8-1-2024

Ιωάννινα 18-04-2024

**ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

Σπυρίδων Κονιτσιώτης

Καθηγητής Νευρολογίας







...Στους γονείς μου

## Πρόλογος – Ευχαριστίες

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής στην Κλινική πράξη, στο τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Με την ολοκλήρωσή της θα ήθελα να ευχαριστήσω πρωτίστως τον κ. Γεωργίου Ιωάννη, Καθηγητή του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, για την ευκαιρία που μου έδωσε να γίνω μέλος του εργαστηρίου του και να ασχοληθώ με ένα τόσο ενδιαφέρον θέμα. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω και τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς μου επιτροπής τον κ. Κωνσταντίνο Ζηκόπουλο, Καθηγητή Μαιευτικής-Γυναικολογίας με έμφαση στην Υποβοηθούμενη Αναπαραγωγή και τον κ. Γεώργιο Μακρυδήμα, Καθηγητή Μαιευτικής-Γυναικολογίας για την πολύτιμη καθοδήγησή τους.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στον κ. Μιχαηλίδη Θεολόγο, Καθηγητή του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και στην κα. Παπαγεωργίου Κική για τη συμβολή τους και την πολύτιμη βοήθειά τους στα πρώτα βήματα αυτής της εργασίας.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλο τα μέλη του εργαστηρίου Ιατρικής Γενετικής για το θερμό περιβάλλον που δημιούργησαν κατά τα τρία χρόνια εκπόνησης της διατριβής μου και ιδιαίτερα την υποψήφια διδάκτορα Μουστακλή Θάλεια για την άψογη συνεργασία. Φυσικά, ένα τεράστιο ευχαριστώ στο εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής και Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων για τα δείγματα βιολογικού υλικού που μου παραχώρησαν. Ιδιαίτερα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τις ίδιες τις γυναίκες που με τη συγκατάθεσή τους συμμετείχαν στην παρούσα διδακτορική διατριβή, αφού χωρίς αυτές δε θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου και τους φίλους μου για την υποστήριξη και την αμέριστη στήριξή τους.



## Περιεχόμενα

Πρόλογος – Ευχαριστίες.....	9
ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	15
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 : ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ.....	16
1.1 Γυναικεία Υπογονιμότητα .....	16
1.2 Το γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα .....	16
1.3 Ωογένεση- Ωοθυλακιόγένεση .....	19
1.4 Ρόλος των ορμονών στην ωοθυλακιόγένεση.....	22
1.5 Ορμονική ρύθμιση της ωοθυλακιόγένεσης.....	23
1.6 Παράγοντες που επιδρούν στη γονιμότητα των γυναικών .....	25
1.7 OS και ROS σαν αιτία υπογονιμότητας .....	28
1.8 Αντιοξειδωτικά ενάντια στην υπογονιμότητα .....	31
Υποβοηθούμενη αναπαραγωγή.....	34
Τεχνικές υποβοηθούμενης αναπαραγωγής (Assisted Reproductive Technology , ART).....	35
Στάδια Μεθόδου Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής.....	36
Χορηγούμενα φάρμακα .....	38
Δείκτες επιτυχούς έκβασης εξωσωματικής γονιμοποίησης.....	39
Σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών ( Polycystic Ovary Syndrome, PCOS) .....	41
Μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και PCOS.....	42
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 : ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑ ΚΑΙ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟ DNA.....	44
2.1 Τα μιτοχόνδρια και μιτοχονδριακό DNA.....	44
2.2 Τα μιτοχόνδρια σαν βιοδείκτες για την ποιότητα των ωαρίων.....	46
2.3 Μόρια DNA εκτός κυττάρων στα βιολογικά υγρά cfDNA .....	47
2.4 cf-nDNA ως βιοδείκτες στην εξωσωματική γονιμοποίηση .....	48
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 : ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΥΛΙΚΟ.....	50
3.1 Βιολογικό υλικό μελέτης, ωοθυλακικό υγρό (Follicular Fluid ή FF).....	50
3.2 Ελεύθερο DNA στο ωοθυλακικό υγρό .....	53
3.3 Προέλευση του cfDNA στο ωοθυλακικό υγρό .....	53
3.4 cf-mtDNA στο ωοθυλακικό υγρό .....	55
3.5 Απόπτωση - Νέκρωση .....	57
Απόπτωση.....	57

Νέκρωση.....	58
3.6 Μιτοφαγία- Μιτοχονδριακή Βιογένεση .....	59
3.7 Μεταβολές του ελεύθερου DNA στο ωοθυλακικό υγρό σε σχέση με την ηλικία της γυναίκας .....	63
3.7.1 Ελεύθερο DNA σε σχέση με την ηλικία της γυναίκας.....	63
3.8 Μεταβολές στον λόγο cf-mtDNA/cf-nDNA στο ωοθυλακικό υγρό σε σχέση με την ηλικία της γυναίκας.....	66
3.9 Μεταβολές στον αριθμό μιτοχονδριακών αντιγράφων (mtDNA relative copies number RCN) στο ωοθυλακικό υγρό σε σχέση με την ηλικία της γυναίκας .....	67
cfDNA , αναλογία cf-mtDNA/cf-nDNA και ο αριθμός των αντιγράφων cf-mtDNA μεταξύ των γυναικών με PCOS .....	70
cfDNA σε γυναίκες με PCOS .....	70
Αναλογία cf-mtDNA/cf-nDNA σε PCOS .....	71
Αριθμός αντιγράφου mtDNA στο PCOS .....	71
Δείκτες για γυναίκες με PCOS .....	72
3.10 Σχέση μεταξύ των επιπέδων FSH, AMH και cfDNA σε γυναίκες με PCOS και non PCOS .....	72
3.10.1 FSH (θυλακιοτρόπος ορμόνη) .....	72
3.10.2 AMH (Anti-Müllerian ορμόνη).....	73
3.10.3 cfDNA .....	73
3.10.4 LH.....	74
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....	77
Σκοπός .....	79
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 : ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ .....	81
4.1 Συλλογή και προέλευση βιολογικού υλικού .....	81
4.2 Απομόνωση κοκκωδών κυττάρων με τη χρήση κυτταρικών φίλτρων (cell strainers) ..	82
4.3 Μέτρηση του αριθμού των κυττάρων με πλακίδιο Neubauer (αιμοκυτταρόμετρο) ...	83
4.4 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμερής (Polymerase Chain Reaction, PCR).....	84
4.5 Ηλεκτροφόρηση .....	87
4.6 Real- time PCR ή qPCR.....	90
4.7 Εξαγωγή DNA.....	92
Πειραματικό μέρος.....	94
Μέθοδος $2^{-\Delta\Delta CT}$ .....	98
Στατιστική ανάλυση .....	101
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	102
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 : ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....	103

5.1 Ανίχνευση ελεύθερου πυρηνικού DNA (cf-nDNA) και ελεύθερου μιτοχονδριακού DNA (cf-mtDNA).....	103
5.2 Συσχέτιση λόγου cf-mtDNA/cf-nDNA με την ηλικία της γυναίκας .....	103
5.3 Συσχέτιση λόγου cf-mtDNA/ cf-nDNA στις υπό εξέταση κατηγορίες.....	105
5.4 cf-nDNA, cf-mtDNA, λόγος cf-mtDNA/cf-nDNA .....	106
5.5 cf-mtDNA/cf-nDNA και mtDNA relative copy number μεταξύ γυναικών με επιτυχή ή όχι εγκυμοσύνη .....	107
5.6 Συσχέτιση αντιγράφων mtDNA με την ηλικία της γυναίκας.....	108
5.7 Σχετικό περιεχόμενο mtDNA σε σύγκριση με την ηλικία της γυναίκας και τον αριθμό ώριμων ωοκυττάρων.....	111
5.8 Συσχέτιση λόγου cf-mtDNA/cf-nDNA με τις ορμόνες.....	113
ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	115
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	116
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....	126
Περίληψη.....	130
Abstract .....	133
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ .....	136
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	138



## ΕΙΣΑΓΩΓΗ



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 : ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

### 1.1 Γυναικεία Υπογονιμότητα

Η γυναικεία υπογονιμότητα αναφέρεται στην αδυναμία μιας γυναίκας να συλλάβει παρά την τακτική σεξουαλική επαφή για τουλάχιστον ένα χρόνο. Τα αίτια της γυναικείας υπογονιμότητας είναι πολυπαραγοντικά, συμπεριλαμβανομένων των ορμονικών ανισορροπιών, των δομικών ανωμαλιών στο αναπαραγωγικό σύστημα, των διαταραχών της ωορρηξίας και της μείωσης της λειτουργίας των ωοθηκών που σχετίζεται με την ηλικία.

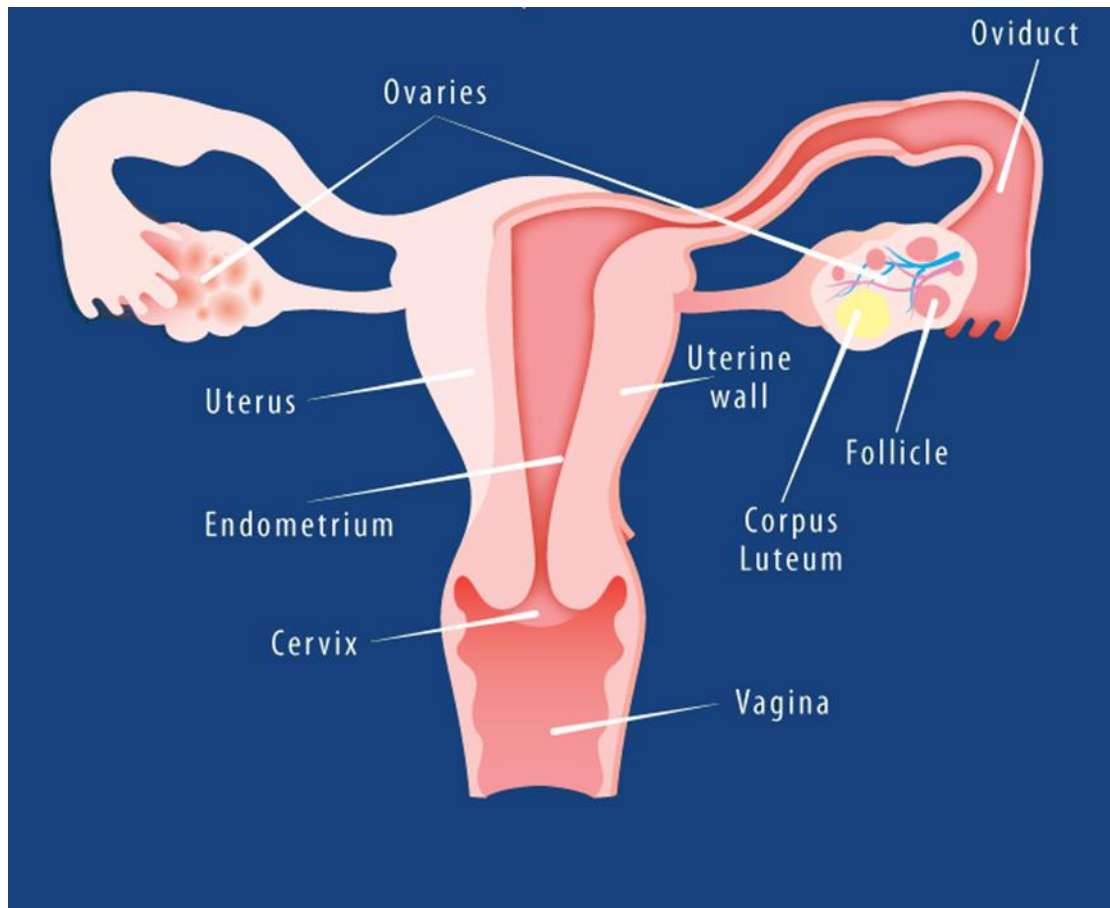
Επιπρόσθετα, το οξειδωτικό στρες (OS) - μια κατάσταση που χαρακτηρίζεται από ανισορροπία μεταξύ της παραγωγής δραστικών ριζών οξυγόνου (ROS) και της ικανότητας του σώματος να τις αποβάλει - έχει αναδειχθεί ως δυνητικός παράγοντας στη γυναικεία υπογονιμότητα.

Το πρόβλημα της υπογονιμότητας αφορά πολλά ζευγάρια αναπαραγωγικής ηλικίας και εκτιμάται ότι επηρεάζει το 13 έως 15% του πληθυσμού παγκοσμίως. Είναι αδιαμφισβήτητο ότι ο σημαντικότερος παράγοντας που συμβάλλει στην υπογονιμότητα είναι η ηλικία της μητέρας. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η αυξημένη παραγωγή δραστικών ριζών οξυγόνου (ROS) επηρεάζει τη γυναικεία αναπαραγωγή και παίζει καθοριστικό ρόλο στην έκβαση μιας εγκυμοσύνης. Διαπιστώθηκε ότι το οξειδωτικό στρες μπορεί να βλάψει τα ωοκύτταρα και να επηρεάσει την ικανότητα γονιμοποίησής τους [1].

Το OS μπορεί, επίσης να προκαλέσει συγγενείς ανωμαλίες του εμβρύου και θεωρείται ένας από τα σημαντικά αίτια καθ' ἑξιν αποβολών . Επιπλέον, η παραγωγή δραστικών ριζών οξυγόνου (ROS) έχει σημαντικό αντίκτυπο στην επιτυχία της εξωσωματικής γονιμοποίησης (IVF) [1].

### 1.2 Το γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα

Το γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα αποτελείται από εσωτερικά ή έσω και εξωτερικά ή έξω γεννητικά όργανα.



Εικόνα 1: Γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα , LifeMap Sciences

Τα έσω γεννητικά όργανα αποτελούνται από:

- Τις ωοθήκες: πρόκειται για μία δεξαμενή ωοθυλακίων που βρίσκονται σε διαφορετικά στάδια ωρίμανσης (αρχέγονα, πρωτογενή ή δευτερογενή) ένα ποσοστό από τα οποία θα δώσει ώριμα ωάρια[2]. Επίσης, στις ωοθήκες παράγονται και στεροειδείς ορμόνες, κυρίως οιστρογόνα όπως η οιστραδιόλη και προγεστερόνη. Κάθε γυναίκα γεννιέται με χιλιάδες ωοθυλάκια τα οποία θα ενεργοποιηθούν κατά την εφηβεία μέσω της ωορρηξίας και κατ' επέκταση του εμμηνορρυσιακού κύκλου. Η διαδικασία αυτή σταματάει με την εμμηνόπαυση κατά την οποία πλέον δεν ωριμάζουν άλλα ωοθυλάκια.
- Τους αγωγούς ή σάλπιγγες: οι σάλπιγγες βοηθούν στη σύνδεση μεταξύ των ωοθηκών και της μήτρας. Στις σάλπιγγες γίνεται η διαδικασία γονιμοποίησης και σηματοδοτείται η αρχή της εμβρυογένεσης
- Τη μήτρα: αποτελεί ένα κοίλο όργανο με παχιά μυϊκά τοιχώματα που αποτελούνται από τρεις στοιβάδες. Η μήτρα περιβάλλεται εσωτερικά από

βλεννογόνο, το οποίο ονομάζεται ενδομήτριο. Παίζει σημαντικότερο ρόλο στην εγκυμοσύνη, καθώς φιλοξενεί το γονιμοποιημένο ωάριο και στη συνέχεια το έμβρυο κατά τη διάρκεια της κύησης. Σε περίπτωση εγκυμοσύνης αυξάνεται τόσο η αιμάτωση του ενδομητρίου όσο και το μέγεθος, ώστε να παρέχει τις κατάλληλες συνθήκες για την ανάπτυξη του εμβρύου.

- Τον τράχηλο: το κατώτερο μέρος της ονομάζεται τράχηλος της μήτρας και είναι ένας ινομυώδης σωλήνας, που φέρνει σε επικοινωνία το σώμα της μήτρας με τον κόλπο
- Τον κόλπο: είναι ένας ευθύς ινομυώδης σωλήνας μήκους 10cm περίπου και εκτείνεται από τον τράχηλο της μήτρας ως το αιδοίο, ενώ παράλληλα αποτελεί ουδό εξόδου του αίματος κατά την έμμηνου ρύση και του εμβρύου κατά τον τοκετό.

Τα έξω γεννητικά όργανα αποτελούνται από:

- Το εφήβαιο: είναι ποσότητα ινολιπώδους ιστού καλυμμένο με χαρακτηριστικό τρίχωμα από τη στιγμή που η γυναίκα φτάσει στην ήβη. Το δέρμα του εφηβαίου διαθέτει ιδρωτοποιούς και σμηγματογόνους αδένες
- Τα μεγάλα χείλη: είναι δύο εξωτερικές πτυχές δέρματος και περιβάλλουν το πρόδρομο του κόλπου. Διαθέτουν ιδρωτοποιούς, σμηγματογόνους και ειδικούς αποκρινείς αδένες και καλύπτονται από το τρίχωμα που ξεκινάει από το εφηβαίο
- Τα μικρά χείλη: δύο μικρότερες πτυχές εσωτερικά των μεγάλων χειλέων, καθώς περιέχουν λιγότερο λιπώδη ιστό. Δεν καλύπτονται από τρίχωμα αλλά φέρουν σμηγματογόνους και σπάνια ιδρωτοποιούς αδένες. Ο ρόλος τόσο των μεγάλων όσο και των μικρών χειλέων είναι να προστατεύουν τον κόλπο από ξένα σωματίδια
- Την κλειτορίδα: βρίσκεται στο σημείο που ενώνονται τα άνω άκρα των μικρών χειλέων και έχει μήκος 3-4cm. Είναι ένα μικρό κι ευαίσθητο όργανο με στυτικό ιστό, όπως το πέος.

- Τον πρόδρομο του κόλπου: πρόκειται για χώρο, στον οποίο εκβάλλουν η ουρήθρα, ο κόλπος και τα στόμια των Bartholinείων και παραουρηθρικών αδένων.
- Τους Bartholinείους αδένες: μικρού μεγέθους αδένες, που βρίσκονται πίσω από τα μικρά χείλη και εκκρίνουν βλέννη για τη διευκόλυνση της σεξουαλικής επαφής.
- Τους παραουρηθρικούς αδένες, ή αδένες του Skene : βρίσκονται ανάμεσα από την κλειτορίδα και το στόμιο της ουρήθρας.
- Το εξωτερικό στόμιο της ουρήθρας: απαντάται στο άνω μέρος του αιδοίου, κάτω από την κλειτορίδα [3 - 4].

### 1.3 Ωογένεση- Οοθυλακιογένεση

Η ωογένεση είναι η διαδικασία με την οποία σχηματίζονται θηλυκοί γαμέτες, τα ωάρια, στις θηλυκές γονάδες, τις ωοθήκες. Η διαδικασία ξεκινά κατά την εμβρυϊκή ζωή του θήλεως και συνεχίζεται μέχρι την εμμηνόπαυση. Η ωογένεση είναι μια πολύπλοκη διαδικασία που περιλαμβάνει πολλά στάδια, συμπεριλαμβανομένης της μιτωτικής διαίρεσης, της μείωσης και της ωρίμανσης. Είναι σημαντικό να αναφέρουμε ότι οι γυναίκες γεννιούνται με ένα συγκεκριμένο αποθεματικό ωαρίων, το οποίο αρχίζει σιγά - σιγά να καταναλώνεται κατά την διάρκεια της ζωής της και δεν παράγονται άλλα ωάρια.

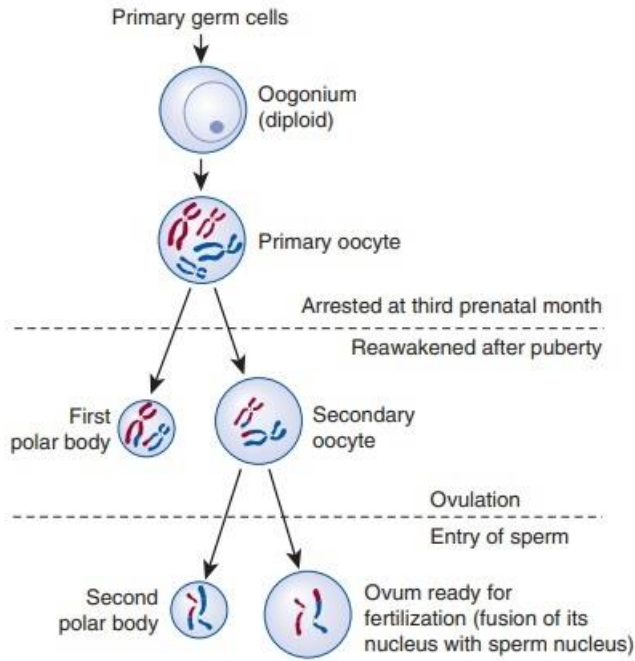
Η διαδικασία ξεκινά κατά την διάρκεια της 5<sup>ης</sup> εβδομάδας κύησης όπου ένας αριθμός κυττάρων περίπου 1.000-2.000 που ονομάζονται αρχέγονα γαμετικά κύτταρα μεταναστεύουν προς τις ωοθήκες που έχουν δημιουργηθεί στο έμβρυο και πλέον ονομάζονται ωογόνια. Τότε αρχίζουν να πολλαπλασιάζονται γρήγορα με μιτωτικές διαιρέσεις και περίπου την 6<sup>η</sup> – 7<sup>η</sup> εβδομάδα κύησης έχουν φτάσει τον αριθμό των 10.000. Ο πολλαπλασιασμός τους σταματάει περίπου την 20<sup>η</sup> εβδομάδα της κύησης όπου έχουμε τον μεγαλύτερο αριθμό γαμετικών κυττάρων που έχει φτάσει πλέον τα 6-7 εκατομμύρια κύτταρα, τα οποία περιβάλλονται από ένα στρώμα κοκκωδών κυττάρων και έτσι σχηματίζεται το αρχέγονο ωοθυλάκιο (primordial follicles) το οποίο αποτελείται από ένα ακινητοποιημένο πρωτογενές ωοκύτταρο και από μία μονή στιβάδα κοκκωδών κυττάρων. Ο αριθμός αυτός μειώνεται με αποτέλεσμα κατά τη

γέννηση, ένα θηλυκό βρέφος να διαθέτει περίπου 1-2 εκατομμύρια πρωτογενή ωάρια [5]. Ωστόσο, τα περισσότερα από αυτά τα ωάρια θα υποστούν μια διαδικασία εκφυλισμού που ονομάζεται ατρησία, αφήνοντας μόνο περίπου 400.000 ωοκύτταρα μέχρι την εφηβεία [6].

Στην εφηβεία, τα αρχέγονα ωοθυλάκια αρχίζουν να αναπτύσσονται και να αποκτούν περισσότερες στιβάδες από κοκκώδη κύτταρα. Μόλις το ωοκύτταρο αποκτήσει μία πλήρη στιβάδα από κοκκώδη κύτταρα τότε σχηματίζεται το πρωτογενές ωοθυλάκιο (primary follicles). Όταν οι στιβάδες των κοκκωδών κυττάρων αυξηθούν σε αριθμό και έχουν σχηματιστεί περίπου 2-3 στιβάδες, σχηματίζεται εξωτερικά αυτών μια στρώση από κύτταρα θήκης (theca cells), τα οποία παίζουν σημαντικό ρόλο στην έκκριση των ορμονών και τότε έχουμε τον σχηματισμό του δευτερογενούς ωοθυλακίου.

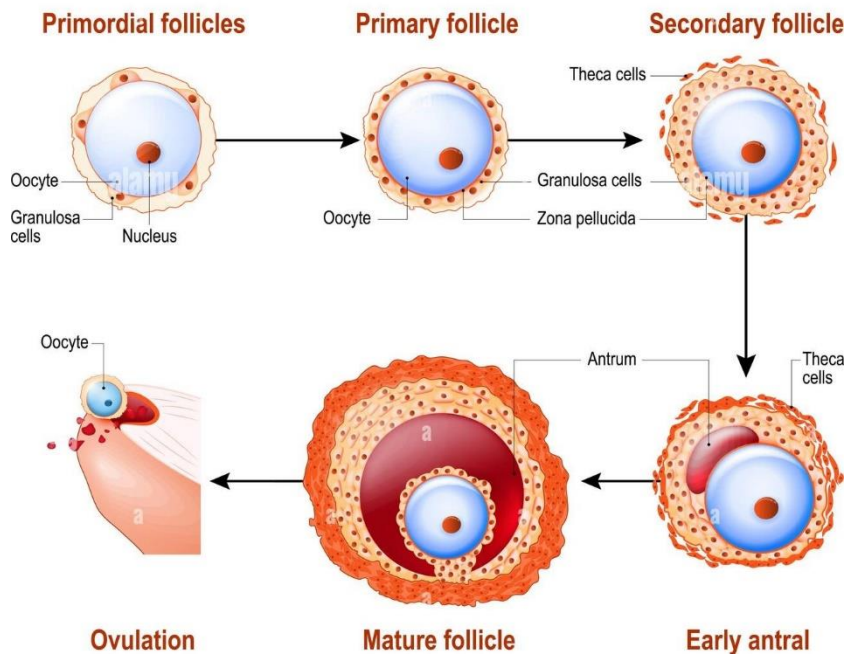
Όταν εμφανιστεί το άντρο, μια κοιλότητα γεμάτη ωοθυλακικό υγρό που βρίσκεται στον ίδιο χώρο με τα κοκκώδη κύτταρα και καταλάβει μεγάλο μέρος του ωοθυλακίου τότε σχηματίζεται το τριτογενές ωοθυλάκιο ή ώριμο ωοθυλάκιο που έχει κυριαρχήσει των υπολοίπων. Το ωοκύτταρο βρίσκεται μέσα στο ωοθυλάκιο και δεν πραγματοποιεί κάποια αλλαγή στο γενετικό του υλικό (46 διπλασιασμένα χρωμοσώματα).

Στην διάρκεια της εφηβείας, ένας μικρός αριθμός πρωτογενών ωοκυττάρων ενεργοποιείται κάθε μήνα. Μόνο ένα από αυτά γίνεται κυρίαρχο και συνεχίζει να αναπτύσσεται καθώς θα υποστεί την πρώτη μειωτική διαίρεση για να σχηματίσει ένα δευτερεύον ωοκύτταρο (23 διπλασιασμένα χρωμοσώματα) και το πρώτο πολικό σωματίο (23 διπλασιασμένα χρωμοσώματα), ενώ τα άλλα εκφυλίζονται. Στη συνέχεια, το δευτερογενές ωοκύτταρο εισέρχεται στη δεύτερη μειωτική διαίρεση αλλά σταματά στη μετάφαση II μέχρι να συμβεί γονιμοποίηση. Το δευτερεύον ωοκύτταρο απελευθερώνεται από την ωοθήκη κατά τη διάρκεια της ωορρηξίας και μεταφέρεται στη σάλπιγγα, όπου μπορεί να γονιμοποιηθεί από ένα σπέρμα. Εάν συμβεί γονιμοποίηση, το δευτερογενές ωάριο ολοκληρώνει τη δεύτερη μειωτική διαίρεση με αποτέλεσμα να σχηματιστεί ένα ώριμο ωάριο (23 μονά χρωμοσώματα) και το δεύτερο πολικό σωματίο. Η παρουσία του δεύτερου πολικού σωματίου στην ουσία επιβεβαιώνει και την γονιμοποίηση του ωαρίου [7].



Εικόνα 2: Φυσιολογία του γυναικείου αναπαραγωγικού συστήματος. Chapter: Anatomy and Physiology for Health Professionals: Reproductive System, pharmacy180.com

## THE MATURATION OF A FOLLICLE



Εικόνα 3 : Η ωρίμανση του ωοθυλακίου, Διάγραμμα ωοθυλακιογένεσης. Stock Vector Image & Art - Alamy

## 1.4 Ρόλος των ορμονών στην ωοθυλακιογένεση

Η ορμονική ρύθμιση της ωοθυλακιογένεσης είναι μια λεπτομερώς συντονισμένη διαδικασία που είναι απαραίτητη για τη γυναικεία αναπαραγωγική λειτουργία. Η ωοθυλακιογένεση, δηλαδή η διαδικασία σχηματισμού ωοθυλακίων στις ωοθήκες, ρυθμίζεται από μια πολύπλοκη αλληλεπίδραση ορμονών.

Τα ωοθυλάκια είναι μικροί, γεμάτοι με υγρό σάκοι που περιέχουν ανώριμα ωάρια και βρίσκονται στις ωοθήκες. Η διαδικασία της ωοθυλακιογένεσης ξεκινά κατά την ανάπτυξη του εμβρύου και συνεχίζεται σε όλη την αναπαραγωγική ζωή της γυναίκας. Οι δύο κύριες ορμόνες που εμπλέκονται στην διαδικασία είναι η ωοθυλακιοτρόπος ορμόνη (FSH) και η ωχρινοτρόπος ορμόνη (LH), οι οποίες παράγονται από την υπόφυση ως απόκριση σε σήματα από τον υποθάλαμο.

Κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης, οι ωοθήκες αρχίζουν να σχηματίζουν ωοθυλάκια ως απόκριση σε σήματα από την αναπτυσσόμενη υπόφυση. Αυτά τα σήματα διαμεσολαβούνται από την FSH, η οποία διεγείρει την ανάπτυξη και τη διαφοροποίηση των ωοθυλακίων των ωοθηκών.

Στις ενήλικες γυναίκες, η διαδικασία της γένεσης των ωοθυλακίων ρυθμίζεται από έναν πολύπλοκο μονοπάτι ορμονών που περιλαμβάνει FSH, LH και οιστραδιόλη, μια μορφή οιστρογόνου που παράγεται από τα αναπτυσσόμενα ωοθυλάκια.

Καθώς τα ωοθυλάκια μεγαλώνουν και ωριμάζουν, παράγουν αυξημένες ποσότητες οιστραδιόλης, η οποία με τη σειρά της καταστέλλει την παραγωγή της LH από την υπόφυση. Όταν ένα ωοθυλάκιο γίνεται κυρίαρχο, εκκρίνει μεγάλη ποσότητα οιστραδιόλης, η οποία πυροδοτεί παραγωγή LH από την υπόφυση. Η ορμόνη LH προκαλεί ρήξη του κυρίαρχου ωοθυλακίου και την απελευθέρωση του περιεχομένου του, συμπεριλαμβανομένου του ώριμου ωαρίου του, μια διαδικασία γνωστή ως ωορρηξία.

Μετά την ωορρηξία, σχηματίζεται το ωχρό σωματίο, το οποίο εκκρίνει προγεστερόνη για να προετοιμάσει τη μήτρα για εμφύτευση. Η προγεστερόνη αναστέλλει την έκκριση τόσο της FSH όσο και της LH με αποτέλεσμα τη μείωση της ανάπτυξης των ωοθυλακίων. Τα υπόλοιπα ωοθυλάκια υφίστανται μια διαδικασία εκφυλισμού που είναι γνωστή και ως ατρησία [8].

## 1.5 Ορμονική ρύθμιση της ωοθυλακιογένεσης

Ο άξονας Υποθάλαμος-Υπόφυση-Ωοθήκη (HPO) είναι ένα κρίσιμο νευροενδοκρινικό σύστημα που ρυθμίζει διάφορες πτυχές της γυναικείας αναπαραγωγικής λειτουργίας, συμπεριλαμβανομένων των εμμηνορροϊκών κύκλων, της ωορρηξίας και της παραγωγής ορμονών. Αυτό το περίπλοκο δίκτυο επικοινωνίας περιλαμβάνει τον υποθάλαμο και την υπόφυση στον εγκέφαλο, καθώς και τις ωοθήκες στην περιοχή της πυέλου.

Ο άξονας HPO παίζει κεντρικό ρόλο στη διατήρηση της ορμονικής ισορροπίας και στη διευκόλυνση της περίπλοκης αλληλεπίδρασης μεταξύ του νευρικού και του ενδοκρινικού συστήματος. Πρόκειται για μία περιοδική αυξομείωση ορισμένων γοναδοτροπινών και στεροειδών ορμονών, η οποία ρυθμίζει αυστηρά την επιλογή του επικρατούς ωοθυλακίου που θα υποστεί ωοθυλακιορρηξία, καθώς και την προετοιμασία του ενδομήτριου για εμφύτευση του εμβρύου [9].

Η διαδικασία ξεκινά με τον υποθάλαμο, μια περιοχή που βρίσκεται στον εγκέφαλο και χρησιμεύει ως κέντρο ελέγχου για πολλές φυσιολογικές λειτουργίες. Στο πλαίσιο του άξονα HPO, ο υποθάλαμος απελευθερώνει ορμόνη απελευθέρωσης γοναδοτροπίνης (GnRH) με παλμικό τρόπο. Η GnRH δρα ως σήμα προς την υπόφυση για να απελευθερώσει συγκεκριμένες ορμόνες, ξεκινώντας έτσι τον καταρράκτη των γεγονότων στον άξονα HPO.

Η υπόφυση, που συχνά αναφέρεται ως «κύριος αδένας», είναι μια δομή σε μέγεθος μπιζελιού που βρίσκεται στη βάση του εγκεφάλου, ακριβώς κάτω από τον υποθάλαμο. Σε απόκριση στην απελευθέρωση της GnRH από τον υποθάλαμο, η υπόφυση εκκρίνει δύο σημαντικές ορμόνες: την ωοθυλακιοτρόπο ορμόνη (FSH) και την ωχρινοτρόπο ορμόνη (LH). Ο πρωταρχικός ρόλος της FSH είναι να διεγείρει την ανάπτυξη των ωοθυλακίων εντός των ωοθηκών. Τα ωοθυλάκια είναι μικροσκοπικοί σάκοι που περιέχουν ανώριμα ωάρια (ωοκύτταρα) και καθώς ωριμάζουν, παράγουν αυξανόμενες ποσότητες οιστρογόνων. Η LH πυροδοτεί τη διαδικασία της ωορρηξίας, η οποία είναι η απελευθέρωση ενός ώριμου ωαρίου από την ωοθήκη. Μετά την



ωορρηξία, τα υπολείμματα του σπασμένου ωοθυλακίου μεταμορφώνονται σε μια δομή που ονομάζεται ωχρο σωματίο, το οποίο εκκρίνει προγεστερόνη.

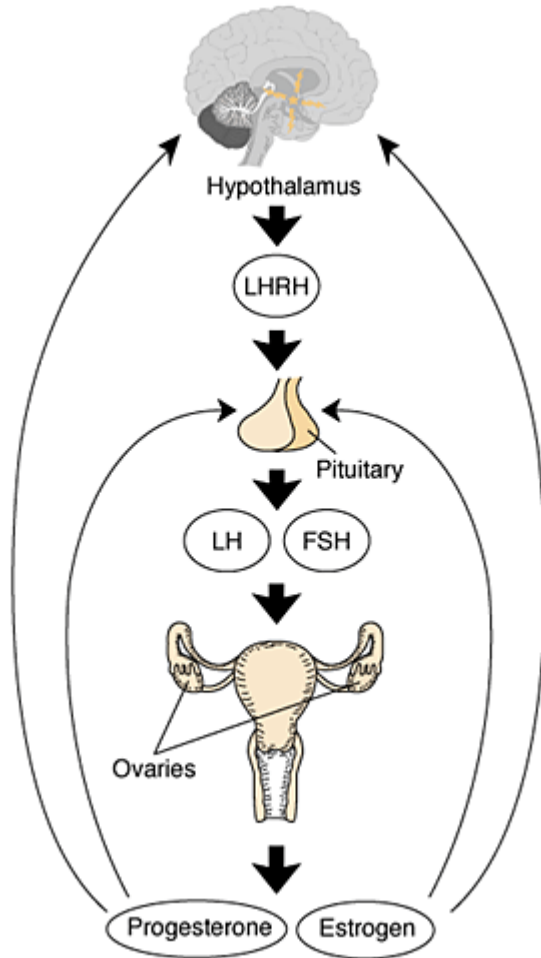
Οι ωοθήκες που είναι τα γυναικεία αναπαραγωγικά όργανα, είναι υπεύθυνα για την παραγωγή ωαρίων καθώς και ορμονών όπως τα οιστρογόνα και η προγεστερόνη. Η αλληλεπίδραση μεταξύ FSH, LH, οιστρογόνων και προγεστερόνης ρυθμίζει τον εμμηνορρυσιακό κύκλο και προετοιμάζει το σώμα για πιθανή εγκυμοσύνη.

Τα οιστρογόνα παράγονται κυρίως από τα αναπτυσσόμενα ωοθυλάκια των ωοθηκών. Παίζουν κρίσιμο ρόλο στην πάχυνση της επένδυσης της μήτρας (ενδομήτριο) κατά τη διάρκεια του εμμηνορρυσιακού κύκλου, καθώς και στη ρύθμιση των δευτερογενών

Μετά την ωορρηξία, το ωχρο σωματίο εκκρίνει προγεστερόνη. Η προγεστερόνη βοηθά στη διατήρηση της επένδυσης της μήτρας, δημιουργώντας ένα κατάλληλο περιβάλλον για την εμφύτευση ενός γονιμοποιημένου ωαρίου. Εάν δεν συμβεί εγκυμοσύνη, το ωχρο σωματίο εκφυλίζεται, τα επίπεδα προγεστερόνης μειώνονται και εμφανίζεται η έμμηνος ρύση.

Ο άξονας HPO λειτουργεί με δυναμικό και εξαιρετικά ρυθμισμένο τρόπο, με ορμονικές διακυμάνσεις να συμβαίνουν καθ' όλη τη διάρκεια του εμμηνορρυσιακού κύκλου. Αυτό το περίπλοκο σύστημα είναι ευαίσθητο σε διάφορους εσωτερικούς και εξωτερικούς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένου του στρες, της διατροφής και των ορμονικών διαταραχών. Οι ανισορροπίες εντός του άξονα HPO μπορεί να οδηγήσουν σε ακανόνιστους εμμηνορρυσιακούς κύκλους, ανωορρηξία (έλλειψη ωορρηξίας) και προβλήματα γονιμότητας.

Η κατανόηση του άξονα Υποθάλαμος-Υπόφυση-Ωοθήκη είναι απαραίτητη για την κατανόηση της γυναικείας αναπαραγωγικής υγείας και την αντιμετώπιση καταστάσεων που σχετίζονται με τη γονιμότητα, την αντισύλληψη και τις ορμονικές διαταραχές. Οι ιατρικές παρεμβάσεις συχνά στοχεύουν σε αυτόν τον άξονα για τη διαχείριση ζητημάτων όπως η υπογονιμότητα, το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών (PCOS) και τα συμπτώματα της εμμηνόπαυσης, υπογραμμίζοντας τη σημασία αυτής της περίπλοκης ρυθμιστικής οδού για την υγεία των γυναικών [10 -11].



Εικόνα 4 : Το δίκτυο Υποθάλαμος – Υπόφυση – Ωοθήκη ελέγχει την ανάπτυξη των ωοθυλακίων (2009 Lecture 16 - Embryology (unsw.edu.au))

## 1.6 Παράγοντες που επιδρούν στη γονιμότητα των γυναικών

Η υπογονιμότητα είναι ένα βασικό ζήτημα της σημερινής κοινωνικής εξέλιξης και επιδρά σημαντικά στην κοινωνική συνοχή και στην ψυχολογία των ζευγαριών. Οι παράγοντες που ευθύνονται για την υπογονιμότητα μπορεί να είναι είτε γενετικοί δηλαδή να οφείλονται σε προβλήματα τόσο στην ανατομία όσο και στη λειτουργία του αναπαραγωγικού συστήματος και των δύο φύλων είτε επιγενετικοί ή περιβαλλοντικοί παράγοντες οι οποίοι επηρεάζουν την έκφραση των γονιδίων. Η γυναικεία υπογονιμότητα μπορεί να προκληθεί από διάφορους παράγοντες. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι η γυναικεία υπογονιμότητα είναι ένα σύνθετο ζήτημα και πολλοί παράγοντες μπορούν να συμβάλλουν ταυτόχρονα. Εάν μια γυναίκα αντιμετωπίζει δυσκολίες στη σύλληψη, συνιστάται να συμβουλευτεί έναν επαγγελματία υγείας για

μια ολοκληρωμένη αξιολόγηση και κατάλληλες θεραπευτικές επιλογές. Κάποιους από τους σημαντικούς παράγοντες υπογονιμότητας αποτελούν :

- Οι διαταραχές ωορρηξίας:

Η ακανόνιστη ή απουσία ωορρηξίας είναι η κύρια αιτία υπογονιμότητας. Καταστάσεις όπως το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών (PCOS), οι ορμονικές ανισορροπίες, οι διαταραχές του θυρεοειδούς και η πρόωρη ωοθηκική ανεπάρκεια μπορεί να διαταράξουν την ωορρηξία.

- Η ηλικία της μητέρας :

Ο αριθμός και η ποιότητα των ωαρίων μειώνονται με την πάροδο του χρόνου, καθιστώντας δυσκολότερη τη σύλληψη. Οι πιθανότητες αποβολής και γενετικών ανωμαλιών αυξάνονται επίσης με την ηλικία.

- Οι δομικές ανωμαλίες:

Δομικά προβλήματα στο αναπαραγωγικό σύστημα μπορεί να επηρεάσουν τη σύλληψη. Καταστάσεις όπως φραγμένες σάλπιγγες, ινομώματα της μήτρας, πολύποδες ή συμφύσεις μπορούν να εμποδίσουν τη γονιμοποίηση ή τη σωστή εμφύτευση του ωαρίου.

- Η ενδομητρίωση:

Η ενδομητρίωση είναι πάθηση στην οποία το στρώμα του ιστού που φυσιολογικά καλύπτει το εσωτερικό της μήτρας (ενδομήτριο), αναπτύσσεται σε κάποιο άλλο σημείο στο σώμα, επηρεάζοντας τις ωοθήκες και τις σάλπιγγες. Αυτή η κατάσταση μπορεί να προκαλέσει ουλές, φλεγμονές και να οδηγήσει σε στειρότητα.

- Ορμονικές ανισορροπίες

Άλλο σύννηθες πρόβλημα γονιμότητας αποτελούν οι ορμονικές ανισορροπίες: Ανισορροπίες σε ορμόνες όπως η ωχρινότροπος ορμόνη (LH), η ωοθυλακιοτρόπος ορμόνη (FSH), η προγεστερόνη, τα οιστρογόνα και η προλακτίνη μπορεί να διαταράξουν την ωορρηξία και να επηρεάσουν τον εμμηνορυσιακό κύκλο, καθιστώντας δύσκολη τη σύλληψη.

- Οι αυτοάνοσες διαταραχές:

Ορισμένες αυτοάνοσες παθήσεις, μπορεί να προκαλέσουν στειρότητα επηρεάζοντας τη λειτουργία του αναπαραγωγικού συστήματος ή προκαλώντας επαναλαμβανόμενες αποβολές.

- Ο καρκίνος και οι θεραπείες του:

Η χημειοθεραπεία και η ακτινοθεραπεία που χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία του καρκίνου μπορεί να βλάψουν τα αναπαραγωγικά όργανα ή να διαταράξουν τα επίπεδα ορμονών, οδηγώντας σε στειρότητα. Οι μέθοδοι συντήρησης, όπως η κατάψυξη ωαρίων ή εμβρύων, μπορούν να βοηθήσουν στη διατήρηση της γονιμότητας πριν από τη θεραπεία του καρκίνου.

- Παχυσαρκία και κακή διατροφή:

Το υπερβολικό βάρος και η κακή διατροφή μπορεί να επηρεάσουν τη γονιμότητα διαταράσσοντας την παραγωγή ορμονών και την ωορρηξία. Καταστάσεις όπως το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών (PCOS) συνδέονται συχνά με την παχυσαρκία και μπορεί να συμβάλλουν στην υπογονιμότητα.

- Τρόπος ζωής:

Ορισμένες συνήθειες όπως το κάπνισμα, η υπερβολική κατανάλωση αλκοόλ, η κατάχρηση ναρκωτικών και τα υψηλά επίπεδα στρες μπορούν να επηρεάσουν αρνητικά τη γονιμότητα στις γυναίκες [12 - 14].

## 1.7 OS και ROS σαν αιτία υπογονιμότητας

Το οξειδωτικό στρες (OS), είναι μια φυσιολογική κατάσταση που εμφανίζεται όταν υπάρχει ανισορροπία μεταξύ της παραγωγής δραστικών ριζών οξυγόνου (ROS) και της ικανότητας του σώματος να αποτοξινώνει και να εξουδετερώνει αυτά τα επιβλαβή μόρια. Οι δραστικές ρίζες οξυγόνου είναι πολύ ενεργές χημικές ουσίες που περιέχουν οξυγόνο, όπως ρίζες υπεροξειδίου, υπεροξειδίου του υδρογόνου και ρίζες υδροξυλίου, που παράγονται ως φυσικά υποπροϊόντα του κυτταρικού μεταβολισμού και διαφόρων βιοχημικών αντιδράσεων στο σώμα [15].

Σε κανονικές συνθήκες, το σώμα διαθέτει αμυντικούς μηχανισμούς για να εξουδετερώσει τις επιδράσεις των ενεργών ειδών οξυγόνου και να αποτρέψει την κυτταρική βλάβη [16].

Αυτή η βλάβη μπορεί να συμβάλει σε μια ποικιλία θεμάτων υγείας και ασθενειών, όπως:

### 1. Γήρανση:

Το οξειδωτικό στρες πιστεύεται ότι παίζει ρόλο στη διαδικασία γήρανσης, καθώς η συσσωρευμένη κυτταρική βλάβη με την πάροδο του χρόνου μπορεί να οδηγήσει σε λειτουργική έκπτωση στους ιστούς και τα όργανα.

### 2. Φλεγμονή:

Το οξειδωτικό στρες μπορεί να προκαλέσει και να επιδεινώσει τη φλεγμονή, η οποία εμπλέκεται σε πολλές χρόνιες ασθένειες όπως οι καρδιαγγειακές παθήσεις, ο διαβήτης και οι νευροεκφυλιστικές διαταραχές.

### 3. Νευροεκφυλιστικές ασθένειες:

Καταστάσεις όπως η νόσος Αλτσχάιμερ, η νόσος Πάρκινσον σχετίζονται με οξειδωτικό στρες και βλάβες στα νευρικά κύτταρα.

### 4. Καρκίνος:

Το οξειδωτικό στρες μπορεί να οδηγήσει σε μεταλλάξεις του DNA και άλλες κυτταρικές αλλαγές που μπορεί να συμβάλλουν στην ανάπτυξη καρκίνου.

#### 5. Καρδιαγγειακές παθήσεις:

Το οξειδωτικό στρες μπορεί να βλάψει τα αιμοφόρα αγγεία και να συμβάλει στην ανάπτυξη αθηροσκλήρωσης, μια κατάσταση που χαρακτηρίζεται από τη συσσώρευση πλάκας στις αρτηρίες.

#### 6. Διαβήτης:

Το οξειδωτικό στρες πιστεύεται ότι εμπλέκεται στην αντίσταση στην ινσουλίνη και στις επιπλοκές που σχετίζονται με τον διαβήτη.

#### 7. Αυτοάνοσα νοσήματα:

Καταστάσεις όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα και ο συστηματικός ερυθηματώδης λύκος (ΣΕΛ) σχετίζονται με αυξημένο οξειδωτικό στρες και φλεγμονή.

#### 8. Περιβαλλοντικοί παράγοντες:

Η έκθεση σε ρύπους, ακτινοβολία και τοξίνες μπορεί να αυξήσει την παραγωγή ROS και να συμβάλει στο οξειδωτικό στρες [17].

Το οξειδωτικό στρες επίσης, διαδραματίζει βασικό ρόλο στην παθοφυσιολογία της γυναικείας υπογονιμότητας [18]. Στο πλαίσιο της γονιμότητας των γυναικών, το οξειδωτικό στρες μπορεί να επηρεάσει τόσο την ποσότητα και την ποιότητα των ωαρίων (ωοκυττάρων) όσο και το αναπαραγωγικό περιβάλλον. Τα υψηλά επίπεδα οξειδωτικού στρες έχουν συνδεθεί με καταστάσεις όπως το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών (PCOS), η ενδομητρίωση και η σχετιζόμενη με την ηλικία υπογονιμότητα [19].

Πιο αναλυτικά, ορισμένοι παράγοντες που επηρεάζουν τη γυναικεία γονιμότητα που σχετίζονται με το OS

##### 1. Ηλικία

Δεδομένου ότι η γονιμότητα μειώνεται με την ηλικία, η ηλικία της μητέρας είναι φυσικά ένας καθοριστικός παράγοντας για την υπογονιμότητα. Εκτός από την ηλικία της μητέρας, η πατρική ηλικία παίζει επίσης ρόλο στη γονιμότητα, καθώς η γήρανση επηρεάζει αρνητικά την ποιότητα των γαμετών και του σπέρματος και προκαλεί επίσης οξειδωτική βλάβη στο DNA. Πράγματι, όσο μεγαλύτερος είναι ο πατέρας, τόσο περισσότερο το DNA του σπέρματος εκτίθεται στο OS [20].

## 2. Σωματικό βάρος

(i) Παχυσαρκία: Η παχυσαρκία αποτελεί σημαντική απειλή για τη γυναικεία γονιμότητα παρεμβαίνοντας στην ορμονική ρύθμιση και στους εμμηνορρυσιακούς κύκλους [21]. Η παθολογία της νόσου περιλαμβάνει την υπερπαραγωγή ROS, που οδηγεί σε OS που καταστρέφει τα αναπαραγωγικά κύτταρα και τους ιστούς στα αναπαραγωγικά συστήματα των γυναικών [21]. Η παραγωγή ROS από την παχυσαρκία μπορεί να επηρεάσει την αγγειοδιαστολή και τη ροή του αίματος στα αναπαραγωγικά όργανα, οδηγώντας σε προβλήματα γονιμότητας. Επιπλέον, η παχυσαρκία συχνά προκαλεί ορμονικές ανισορροπίες που μεταβάλλουν την κανονικότητα της ωορρηξίας οδηγώντας σε καταστάσεις όπως το PCOS που είναι η κύρια αιτία γυναικείας υπογονιμότητας [22]. Επιπλέον, το OS που προκαλείται από την παχυσαρκία μπορεί να βλάψει άμεσα τη γυναικεία γονιμότητα βλάπτοντας τα ωάρια και βλάπτοντας τη λειτουργία του άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-ωοθηκών [22].

(ii) Ελλιποβαρή: Οι υποσιτισμένες αναπαραγωγικές γυναίκες έχουν εξασθενημένη αγγειοδιαστολή που εξαρτάται από το ενδοθήλιο, η οποία με τη σειρά της προκαλεί OS [23].

## 3. Παράγοντες τρόπου ζωής

(i) Κάπνισμα τσιγάρου: Είναι ευρέως γνωστό ότι το κάπνισμα κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης αυξάνει τον κίνδυνο υπογονιμότητας, προβλημάτων εγκυμοσύνης, απώλειας εμβρύου, καθυστέρησης στην ανάπτυξη του εμβρύου, πρόωρου τοκετού και αποβολής [24]. Οι τοξικές ενώσεις και τα προοξειδωτικά στα τσιγάρα προκαλούν το σώμα να απελευθερώνει ROS, οδηγώντας σε OS στο μικροπεριβάλλον των ωοθυλακίων [25].

(ii) Χρήση αλκοόλ: Η κατανάλωση αλκοόλ παράγει μεταβολίτες, όπως ρίζες ακετυλίου και μεθυλίου, οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για το σχηματισμό των ROS. Η κατανάλωση αλκοόλ κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης αυξάνει το ROS στο μητρικό πλάσμα, προκαλεί υπεροξειδωση των λιπιδίων και μειώνει την αντιοξειδωτική δράση και τα επίπεδα γλουταθειόνης (GSH) της υπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD). Επομένως, η κατανάλωση αλκοόλ κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης μπορεί να οδηγήσει σε πρόωρο τοκετό, χαμηλό βάρος γέννησης, αυξημένο κίνδυνο συγγενών ασθενειών, αποβολή και πρόωρο τοκετό [19].

## 1.8 Αντιοξειδωτικά ενάντια στην υπογονιμότητα

Τα αντιοξειδωτικά είναι ουσίες που μπορούν να βοηθήσουν στην άμυνα του οργανισμού ενάντια στις βλαβερές συνέπειες των ελεύθερων ριζών και του οξειδωτικού στρες, είτε αποτρέποντας το σχηματισμό ROS είτε βοηθώντας στην απομάκρυνση και εξουδετέρωση τους πριν προκαλέσουν βλάβη. Αυτά τα αντιοξειδωτικά περιλαμβάνουν ένζυμα όπως η υπεροξειδική δισμουτάση, η καταλάση και η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, καθώς και βιταμίνες όπως η βιταμίνη C, η βιταμίνη E και ορισμένα μέταλλα [26].

Η κύρια γραμμή άμυνας κατά της υπογονιμότητας που προκαλείται από τις ελεύθερες ρίζες είναι τα αντιοξειδωτικά. Τα αντιοξειδωτικά μπορούν να βελτιώσουν την ποιότητα και τη δραστηριότητα του σπέρματος, να ελαχιστοποιήσουν το οξειδωτικό στρες, να προστατεύσουν τα ωκύτταρα από βλάβες ενισχύοντας την ανάπτυξή του και να αυξήσουν τη γυναικεία γονιμότητα. Τα αντιοξειδωτικά μπορούν να καταστρέψουν τα ROS ενώ προστατεύουν τα κύτταρα, τις πρωτεΐνες και το DNA από οξειδωτική βλάβη. Αρκετές μελέτες έχουν συνδέσει το OS με τη γυναικεία υπογονιμότητα και επιπλέον έχουν δείξει ότι η λήψη συμπληρωμάτων με αντιοξειδωτικά μπορεί να αυξήσει τις πιθανότητες εγκυμοσύνης [27].

Αξίζει να σημειωθεί ότι η βιταμίνη E, ένα λιποδιαλυτό αντιοξειδωτικό, έχει την ικανότητα να προστατεύει τις κυτταρικές μεμβράνες από οξειδωτική βλάβη. Τα ποσοστά εγκυμοσύνης σε γυναίκες που χρησιμοποιούν θεραπείες ART έχουν δείξει βελτίωση με τη λήψη συμπληρωμάτων βιταμίνης E [28]. Η βιταμίνη C μπορεί να εξουδετερώσει το ROS και να αποκαταστήσει τη βιταμίνη E επειδή είναι ένα υδατοδιαλυτό αντιοξειδωτικό. Η γονιμότητα σε γυναίκες με PCOS έχει αποδειχθεί ότι βελτιώνεται όταν λαμβάνουν συμπληρώματα βιταμίνης C [29]. Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης και άλλα αντιοξειδωτικά ένζυμα δεν μπορούν να λειτουργήσουν επαρκώς χωρίς Se και, συγκεκριμένα, έχει παρατηρηθεί ότι το ποσοστό εγκυμοσύνης σε υπογόνιμες γυναίκες αυξάνεται όταν λαμβάνουν συμπληρώματα σεληνίου (Se) [30].

Τα αντιοξειδωτικά βοηθούν στη βελτίωση της συνολικής αναπαραγωγικής υγείας και της ορμονικής ισορροπίας στις γυναίκες. Ένας υγιεινός τρόπος ζωής, συμπεριλαμβανομένης μιας ισορροπημένης διατροφής πλούσιας σε αντιοξειδωτικά, τακτικής σωματικής δραστηριότητας, διαχείρισης του στρες και αποφυγής ή



ελαχιστοποίησης της έκθεσης σε περιβαλλοντικές τοξίνες, μπορεί να βοηθήσει στη μείωση του κινδύνου οξειδωτικού στρες και των σχετικών προβλημάτων υγείας. Υπάρχουν γυναίκες που παρακάμπτουν τις διαδικασίες εξωσωματικής γονιμοποίησης και παίρνουν απλώς αντιοξειδωτικά συμπληρώματα για να αυξήσουν τη γονιμότητά τους, ενώ άλλες ακολουθούν και τα δύο μονοπάτια ταυτόχρονα [31 - 32].

Συγκεκριμένα, μερικά από τα κοινά αντιοξειδωτικά που έχουν μελετηθεί σε σχέση με τη γονιμότητα περιλαμβάνουν:

Το σύμπλεγμα βιταμινών Β :

Το σύμπλεγμα των βιταμινών Β, συμπεριλαμβανομένων των βιταμινών Β6 και Β12, δρα ως ένα από τα απαραίτητα αντιοξειδωτικά κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, υποστηρίζοντας το μητρικό σώμα στη διαχείριση του οξειδωτικού στρες και προάγοντας την υγιή ανάπτυξη του αναπτυσσόμενου εμβρύου. Επίσης, οι βιταμίνες Β6 και Β12, είναι σημαντικές για τη διατήρηση των επιπέδων ομοκυστεΐνης. Αυτές οι βιταμίνες βοηθούν στη μετατροπή της ομοκυστεΐνης σε άλλες ουσίες που δεν είναι επιβλαβείς για τον οργανισμό. Τα υψηλότερα επίπεδα ομοκυστεΐνης σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο επιπλοκών της εγκυμοσύνης, όπως προεκλαμψία, ελαττώματα του νευρικού σωλήνα και αποβολές. Η μείωση των αυξημένων επιπέδων ομοκυστεΐνης μέσω της σωστής διατροφής και, εάν είναι απαραίτητο, η λήψη συμπληρωμάτων με βιταμίνες Β μπορεί να βοηθήσει στον περιορισμό αυτών των κινδύνων και στην έκβαση μιας πιο υγιούς εγκυμοσύνης [33].

Βιταμίνη C:

Αυτή η βιταμίνη είναι γνωστή για τις ισχυρές αντιοξειδωτικές της ιδιότητες. Μπορεί να βοηθήσει στην προστασία των ωαρίων από οξειδωτική βλάβη και να βελτιώσει την ποιότητα της τραχηλικής βλέννας, η οποία είναι σημαντική για την επιβίωση και την κινητικότητα του σπέρματος [34].

Βιταμίνη E:

Η βιταμίνη E είναι ένα άλλο ισχυρό αντιοξειδωτικό που μπορεί να υποστηρίξει την αναπαραγωγική υγεία προστατεύοντας τα ωάρια και προάγοντας την υγιή ανάπτυξη του βλεννογόνου της μήτρας [35].

#### Βιταμίνη D:

Τα υψηλότερα επίπεδα επηρεάζουν το σχηματισμό των φυλετικών χρωμοσωμάτων που παράγουν οιστραδιόλη και προγεστερόνη και συνδέονται με υψηλότερο ποσοστό επιτυχίας για την εξωσωματική γονιμοποίηση [36].

#### Φολικό οξύ (B9) :

Συμβάλει στην προστασία των γονιδίων κατά την ταχεία κυτταρική διαίρεση και αυξάνει την πιθανότητα ενός υγιούς εμβρύου. Τα αυξημένα επίπεδα ομοκυστεΐνης που προκαλούνται από ανεπάρκεια φολικού οξέως βλάπτουν τα αναπαραγωγικά κύτταρα [37].

#### Συνένζυμο Q10 (CoQ10):

Το CoQ10 απαιτείται για το σώμα καθώς παίζει καθοριστικό ρόλο στην παραγωγή ενέργειας των κυττάρων και επίσης δρα ως αντιοξειδωτικό. Έχει αποδειχθεί ότι αυξάνει τα αποθέματα των ωοθηκών, την ποιότητα των ωαρίων και τα ποσοστά ωορρηξίας σε γυναίκες που υποβάλλονται σε αναπαραγωγικές θεραπείες. Ορισμένες μελέτες υποδεικνύουν ότι η συμπλήρωση CoQ10 μπορεί να βελτιώσει την ποιότητα των ωαρίων, ειδικά σε εκείνες τις γυναίκες που βρίσκονται σε προχωρημένη μητρική ηλικία [38].

#### Σελήνιο (Se):

Το σελήνιο είναι ένα μέταλλο που χρησιμεύει ως συστατικό διαφόρων αντιοξειδωτικών ενζύμων. Τα επαρκή επίπεδα σεληνίου μπορεί να υποστηρίξουν την υγεία των ωοθηκών και την ανάπτυξη των ωαρίων [39].

#### N-ακετυλοκυστεΐνη (NAC):

Το NAC είναι πρόδρομος της παραγωγής γλουταθειόνης, ενός ισχυρού αντιοξειδωτικού. Έχει διερευνηθεί για τη δυνατότητά του να βελτιώσει τα αποτελέσματα γονιμότητας σε γυναίκες με παθήσεις όπως το PCOS [40].

#### Μελατονίνη:

Η μελατονίνη δεν συμμετέχει μόνο στη ρύθμιση του ύπνου αλλά δρα και ως αντιοξειδωτικό. Ορισμένες μελέτες υποδεικνύουν ότι τα συμπληρώματα μελατονίνης

μπορεί να έχουν θετικά αποτελέσματα στην ποιότητα των ωαρίων και τη συνολική γονιμότητα [41].

## Υποβοηθούμενη αναπαραγωγή

Για να ξεπεραστούν τα προβλήματα της υπογονιμότητας όλο και περισσότερα ζευγάρια αναζητούν λύσεις γονιμοποίησης σε μεθόδους ιατρικώς υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Για τη διεξαγωγή μιας επιτυχημένης εξωσωματικής γονιμοποίησης (in vitro Fertilization, IVF) βασική προϋπόθεση αποτελεί η σωστή Προεμφυτευτική Γενετική Διάγνωση, δηλαδή τη διαδικασία κατά την οποία είναι εφικτή η ανίχνευση ορισμένων χρωμοσωμικών ανωμαλιών ή η ανίχνευση γενετικού νοσήματος σε ένα κύτταρο του γονιμοποιημένου ωαρίου πριν από την εμφύτευση στη μήτρα. Η προεμφυτευτική γενετική διάγνωση αυξάνει την πιθανότητα σύλληψης σε υπογόνιμα ζευγάρια, μιας και είναι πλέον γνωστό από μελέτες ότι η ποιότητα των ωαρίων είναι η βασική αιτία της μειωμένης εμφύτευσης εμβρύων ιδίως σε γυναίκες μεγαλύτερης ηλικίας.

Η εξωσωματική γονιμοποίηση (IVF) είναι ένας τύπος τεχνολογίας υποβοηθούμενης αναπαραγωγής (ART) που περιλαμβάνει τη γονιμοποίηση ενός ωαρίου με σπέρμα εκτός του σώματος της γυναίκας σε ένα εργαστήριο. Η Louise Brown ήταν το πρώτο παιδί στον κόσμο που γεννήθηκε με εξωσωματική γονιμοποίηση (IVF) στις 25 Ιουλίου 1978 στο Γενικό Νοσοκομείο Oldham του Μάντσεστερ στην Αγγλία. Η ομάδα ερευνητών με επικεφαλής τον Patrick Steptoe και τον Robert Edwards εργάζονταν σε μια τεχνική για να γονιμοποιήσουν τα ανθρώπινα ωάρια εξωτερικά και στη συνέχεια να επιστρέψουν τα γονιμοποιημένα έμβρυα στη μήτρα για εμφύτευση. Τελικά, χρησιμοποιώντας αυτή τη μέθοδο, μπόρεσαν να πραγματοποιήσουν με επιτυχία μια εγκυμοσύνη μετά από πολλά χρόνια δοκιμών και αποτυχιών. Η γέννηση της Louise Brown σηματοδότησε ένα σημαντικό επίτευγμα στην αναπαραγωγική ιατρική και δημιούργησε νέους δρόμους για τη θεραπεία της υπογονιμότητας [42].

Στις μέρες μας, πολλά ζευγάρια που αντιμετωπίζουν προβλήματα γονιμοποίησης, χρησιμοποιούν θεραπείες υποβοηθούμενης αναπαραγωγής, οι οποίες περιλαμβάνουν εξαιρετικά προηγμένες τεχνολογικές διαδικασίες. Η διαδικασία

συνήθως περιλαμβάνει διάφορα βήματα. Ένα από τα βασικότερα βήματα είναι η διέγερση των ωοθηκών. Για την διέγερση των ωοθηκών γίνεται χρήση φαρμάκων που επιτυγχάνουν την τόνωση τους ώστε να παράγουν πολλαπλά ωοθυλάκια, το καθένα από τα οποία περιέχει ένα ωάριο, έτσι ώστε πολλά ωάρια να μπορούν να ανακτηθούν για γονιμοποίηση και εμφύτευση. Μόλις τα ωάρια ωριμάσουν, αφαιρούνται από τις ωοθήκες της γυναίκας χρησιμοποιώντας μια μικρή βελόνα. Τα ωάρια αναμιγνύονται με το σπέρμα σε ένα εργαστηριακό τρυβλίο για να επιτευχθεί η γονιμοποίηση. Τα γονιμοποιημένα ωάρια παρακολουθούνται και αφήνονται να αναπτυχθούν σε έμβρυα για αρκετές ημέρες. Ένα ή περισσότερα έμβρυα μεταφέρονται στη μήτρα της γυναίκας με την ελπίδα της εμφύτευσης και της επιτυχούς εγκυμοσύνης [43].

Η εξωσωματική γονιμοποίηση μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να ξεπεραστούν διάφορες αιτίες υπογονιμότητας, όπως η ενδομητρίωση, οι φραγμένες σάλπιγγες, η ανδρική υπογονιμότητα καθώς και η ανεξήγητη υπογονιμότητα. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι η εξωσωματική γονιμοποίηση δεν είναι πάντα επιτυχής και σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να απαιτούνται πολλαπλοί γύροι θεραπείας. Τα ποσοστά επιτυχίας της εξωσωματικής γονιμοποίησης μπορεί να ποικίλλουν ανάλογα με διάφορους παράγοντες όπως η ηλικία, η διάγνωση της υπογονιμότητας και ο αριθμός των εμβρύων που μεταφέρονται.

Οι μέθοδοι υποβοηθούμενης αναπαραγωγής χωρίζονται σε επεμβατικές και μη επεμβατικές. Στις μη επεμβατικές προσεγγίσεις συγκαταλέγονται οι: IUI (intrauterine insemination) και η GIFT (gamete intrafallopian transfer), ενώ στις επεμβατικές μεθόδους συγκαταλέγονται οι: IVF (in vitro fertilisation) και ICSI (intracytoplasmic sperm injection). Η μέθοδος η οποία εφαρμόζεται στο εκάστοτε ζευγάρι καθορίζεται από πολλούς παράγοντες καθώς και από το πρόβλημα το οποίο υπάρχει.

## Τεχνικές υποβοηθούμενης αναπαραγωγής (Assisted Reproductive Technology , ART)

Η εξωσωματική γονιμοποίηση μπορεί να γίνει με τους εξής τρόπους:

α. Εξωσωματική σε Φυσικό Κύκλο, κατά την οποία χρησιμοποιείται μόνο το ένα ωάριο που παράγει η γυναίκα κατά τη φυσιολογική της μηνιαία ωορρηξία.

β. Η κλασική μέθοδος εξωσωματικής γονιμοποίησης, in vitro fertilization (IVF), με την χρήση φαρμάκων διέγερσης των ωοθηκών για ανάπτυξη πολλαπλών ώριμων ωοθυλακίων ταυτόχρονα.

γ. Μικρογονιμοποίηση, intracytoplasmatic sperm injection (ICSI), χρησιμοποιείται στις περιπτώσεις που παρεμποδίζεται η διείσδυση του σπέρματος στο ωάριο λόγω ανδρικής υπογονιμότητας [44].

Οι παραπάνω τεχνικές συστήνονται σε περιπτώσεις κατά τις οποίες τα ζευγάρια δεν μπορούν να τεκνοποιήσουν με φυσιολογικό τρόπο, είτε η υπογονιμότητα αφορά τη γυναίκα, είτε τον άνδρα ή άτομα που πρόκειται να ακολουθήσουν κάποια θεραπεία/αγωγή όπως χημειοθεραπεία, που μπορεί να αλλοιώσει την ποιότητα των γαμετών, προκειμένου να αποθηκευτούν τα γαμετικά τους κύτταρα [45].

### Στάδια Μεθόδου Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής

Κατά την διάρκεια της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής είτε βασίζεται στην IVF ή στην ICSI αποτελείται από τα ίδια στάδια. Η μόνη διαφορά έγκειται στον τρόπο με τον οποίο γίνεται η γονιμοποίηση.

1ο βήμα: Αποτελεί η χορήγηση σκευασμάτων FSH και/ή LH για την αναστολή της ενδογενούς έκκρισης των υποφυσιακών ορμονών FSH και LH. Στη συνέχεια ανάλογα με το πρωτόκολλο που θα ακολουθήσει ο εκάστοτε ιατρός χορηγούνται είτε αγωνιστές (Agvekar) είτε ανταγωνιστές (Cetrotide) GnRH. Οι αγωνιστές, γενικά, GnRH έχουν παρόμοια δράση με αυτή των φυσικών ορμονών. Αρχικά η χορήγηση των αγωνιστών προκαλεί μια αύξηση της έκκρισης των γοναδοτροπινών FSH/LH με αποτέλεσμα να διεγείρουν τη σύνθεση υποδοχέων της GnRH στα γοναδοτρόπα κύτταρα της υπόφυσης. Εάν η χορήγηση των συναγωνιστικών αναλόγων παραταθεί τότε προκαλείται καταστολή της ωοθηκικής λειτουργίας λόγω ελάττωσης της έκκρισης γοναδοτροπινών. Η ελάττωση αυτή προκύπτει αφ' ενός λόγω του παρατεταμένου χρόνου κατάληψης των υποδοχέων της GnRH από το GnRH ανάλογο και αφ' ετέρου λόγω της ελάττωσης του αριθμού υποδοχέων της GnRH στα γοναδοτρόπα κύτταρα της υπόφυσης. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται καταστολή (down-regulation) ή απευαισθητοποίηση της υπόφυσης (pituitary desensitization). Οι γιατροί

εκμεταλλεύονται το γεγονός αυτό για να ελαττώσουν τα επίπεδα των ενδογενών γοναδοτροπινών και να προκαλέσουν ελεγχόμενη ωοθηκική διέγερση. Οι ανταγωνιστές από την άλλη μεριά έχουν ανταγωνιστική δράση με αυτή της φυσικής ορμόνης. Οι ανταγωνιστές συνδέονται με τον υποδοχέα των υποφυσιακών ορμονών και προκαλούν καταστολή από την αρχή της χορήγησής τους λόγω κατάληψης της θέσης των υποδοχέων GnRH. Επομένως, έχουν ως συνέπεια την ελάττωση της παραγωγής των ενδογενών γοναδοτροπινών FSH και LH. Η καταστολή της υποφυσιακής λειτουργίας επιτυγχάνεται σε ελάχιστο χρόνο (σχεδόν αμέσως) μετά τη χορήγησή τους [46 - 47].

2ο βήμα: Στη συνέχεια χορηγούνται ξανά γοναδοτροπίνες FSH και LH για να αυξηθούν τα επίπεδά τους. Οι ορμόνες που χρησιμοποιούνται είναι είτε ανθρώπινες εμμηνοπαυσιακές γοναδοτροπίνες (human Menopausal Gonadotrophins, hMG - φάρμακο Menopur-Meriofert), οι οποίες προέρχονται από ούρα μετα-εμμηνοπαυσιακών γυναικών και περιέχουν τόσο FSH όσο και LH, είτε ανασυνδυασμένες γοναδοτροπίνες (recFSH - φάρμακο Gonal F), οι οποίες παράγονται από γενετικά τροποποιημένα κύτταρα ωοθήκης χάμστερ και περιέχουν μόνο FSH. Χορηγούνται ημερησίως για 10-12 ημέρες.

3ο βήμα: 36 ώρες πριν από τη διαδικασία της ωοληψίας χορηγείται στη γυναίκα η ανθρώπινη χοριακή γοναδοτροπίνη (hCG). Ένας μικρός αριθμός ωοθυλακίων έχει φτάσει στο μέγεθος των 14-28mm κατάλληλα για ωοληψία. Σε όλη αυτή τη διαδικασία ελέγχονται τα επίπεδα της οιστραδιόλης, της προγεστερόνης και της LH στο αίμα των γυναικών.

4ο βήμα: Μετά τη ωοληψία πραγματοποιείται η σύντηξη των δύο γαμετών είτε μέσω της IVF είτε μέσω της ICSI. Τα έμβρυα ελέγχονται από τους εμβρυολόγους σε καθημερινή βάση.

5ο βήμα: τελευταίο βήμα όλης αυτής της διαδικασίας είναι η εμβρυομεταφορά η οποία μπορεί να γίνει είτε την 3η ημέρα στο στάδιο των βλαστομεριδίων είτε την 5η ημέρα στο στάδιο της βλαστοκύστης. Μετά την εμβρυομεταφορά χορηγείται στη γυναίκα προγεστερόνη για να παρατείνει τη διάρκεια ζωής του ωχρού σωματίου το οποίο είναι σημαντικό για τη διατήρηση των κυττάρων του ενδομητρίου [48].

## Χορηγούμενα φάρμακα

Καταλυτικό μέρος των τεχνικών υποβοηθούμενης αναπαραγωγής αποτελούν και τα φάρμακα που χορηγούνται πριν από έναν κύκλο IVF, με σκοπό την ανάπτυξη και ωρίμανση περισσότερων του ενός ωοθυλακίου και κατ' επέκταση ωαρίου. Στο εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής και Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων οι γυναίκες που υποβλήθηκαν σε IVF ακολούθησαν συγκεκριμένα πρωτόκολλα διέγερσης ωοθηκών. Μεταξύ των πρωτοκόλλων διέγερσης ωοθηκών συγκαταλέγονται τα εξής: α) πρωτόκολλο ανταγωνιστών, β) μακρύ πρωτόκολλο και γ) βραχύ πρωτόκολλο και το ποιο από αυτά θα ακολουθήσει μία γυναίκα αφορά τις ανάγκες τις ίδιας [49].

Τα φάρμακα αυτά είναι τα Menopur και Gonal F τα οποία διαφέρουν ως προς τη σύνθεσή τους. Το Menopur περιέχει ανθρώπινες εμμηνοπαυσιακές γοναδοτροπίνες (human -Menopausal Gonadotrophins, h-MG), οι οποίες προέρχονται από ούρα μετα-εμμηνοπαυσιακών γυναικών και περιέχουν τόσο FSH όσο και LH. Το Gonal F περιέχει ανασυνδυσασμένες γοναδοτροπίνες, οι οποίες παράγονται από γενετικά τροποποιημένα κύτταρα ωοθήκης χάμστερ και περιέχουν μόνο FSH.

Παρά τα υψηλότερα ποσοστά επιτυχίας, η εξωσωματική γονιμοποίηση εξακολουθεί να είναι δαπανηρή, χρονοβόρα και συναισθηματικά επιβαρυντική. Προκειμένου όμως να κατανοηθούν καλύτερα οι διαδικασίες και τα ποσοστά επιτυχίας της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής είναι σημαντικό να μελετηθεί και να κατανοηθεί σε βάθος η πορεία της ωοθυλακιογένεσης καθώς και οι παράγοντες που επηρεάζουν την ωρίμανση των ωοθυλακίων καθώς επίσης και το ωοθυλακικό υγρό που αποτελεί το άμεσο μικροπεριβάλλον τους.

Είναι αναγκαίο λοιπόν, να βρεθούν ισχυροί προγνωστικοί δείκτες προκειμένου να βοηθηθούν οι γιατροί, να εξατομικευτεί η θεραπεία εξωσωματικής γονιμοποίησης και να αυξηθούν τα ποσοστά επιτυχίας των ασθενών. Οι τεχνολογίες πρόβλεψης μπορούν να βοηθήσουν τους γιατρούς να προσδιορίσουν ποιοι ασθενείς θα ωφεληθούν περισσότερο από τη θεραπεία εξωσωματικής γονιμοποίησης και μπορούν να παρέχουν κρίσιμες πληροφορίες σχετικά με τις υποκειμενικές αιτίες της υπογονιμότητας.

## Δείκτες επιτυχούς έκβασης εξωσωματικής γονιμοποίησης

Η υπογονιμότητα επηρεάζει εκατομμύρια άτομα παγκοσμίως και η ακριβής διάγνωση είναι απαραίτητη για την εξατομικευμένη θεραπεία. Οι βιοδείκτες έχουν φέρει επανάσταση στο διαγνωστικό τοπίο, προσφέροντας μη επεμβατικές εναλλακτικές λύσεις στις παραδοσιακές αξιολογήσεις. Για παράδειγμα, η μέτρηση της αντι-Müllerian ορμόνης (AMH) έχει γίνει βασικός βιοδείκτης για την αξιολόγηση του αποθέματος των ωοθηκών, βοηθώντας στην πρόβλεψη της ανταπόκρισης των ωοθηκών στη διέγερση κατά τη διάρκεια τεχνικών υποβοηθούμενης αναπαραγωγής.

Οι ορμόνες διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στην αναπαραγωγική υγεία και οι βιοδείκτες που σχετίζονται με τα επίπεδα ορμονών έχουν αποδειχθεί καθοριστικοί στη διάγνωση και τη διαχείριση των αναπαραγωγικών διαταραχών. Η ωοθυλακιοτρόπος ορμόνη (FSH), η ωχρινοτρόπος ορμόνη (LH), η οιστραδιόλη (E2), η προγεστερόνη και η τεστοστερόνη είναι μερικοί από τους βασικούς ορμονικούς βιοδείκτες που χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση της κατάστασης γονιμότητας και την παρακολούθηση των αναπαραγωγικών κύκλων, καθώς έχει αποδειχθεί ότι είναι αξιόπιστοι δείκτες του αποθεματικού των ωοθηκών, της ποιότητας των ωαρίων και της απόκρισης στη διέγερση των ωοθηκών.

Τα επίπεδα AMH μιας γυναίκας μπορούν να βοηθήσουν τους γιατρούς να καθορίσουν την κατάλληλη δόση φαρμάκου για τη διέγερση των ωοθηκών, που είναι το σημαντικότερο βήμα στις τεχνικές αυτές και να εκτιμήσουν το βέλτιστο χρόνο για την ανάκτηση ωαρίων. Επιπρόσθετα, μπορεί να βοηθήσει και στη μείωση του κινδύνου του συνδρόμου υπερδιέγερσης των ωοθηκών (OHSS). Πιο συγκεκριμένα, η AMH αποτελεί εξαιρετικό δείκτη και μέτρο της γονιμότητας μιας γυναίκας. Το επίπεδο της AMH στο αίμα μπορεί να δείξει τον αριθμό των ωαρίων που διαθέτει μια γυναίκα και να βοηθήσει στη διάγνωση της ανεπάρκειας ωοθηκών. Χαμηλά επίπεδα της συγκεκριμένης ορμόνης υποδηλώνουν και χαμηλό αριθμό ωαρίων και υψηλότερο ποσοστό μη φυσιολογικής γονιμοποίησης. Αντίθετα, υψηλά επίπεδα μπορεί να υποδηλώνουν την ύπαρξη πολυκυστικών διαταραχών ή κάποια άλλη ορμονική διαταραχή [50].



Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι η εξατομικευμένη δόση FSH με βάση τα επίπεδα AMH βελτιώνει τα αποτελέσματα της εξωσωματικής γονιμοποίησης, συμπεριλαμβανομένης της απόδοσης των ωαρίων, της ποιότητας του εμβρύου και των ποσοστών εγκυμοσύνης.

Ωστόσο, είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι ενώ τα επίπεδα AMH, FSH και LH μπορούν να είναι ένα χρήσιμο εργαλείο στην εξωσωματική γονιμοποίηση, δεν είναι όμως ο μόνος παράγοντας που καθορίζει το δυναμικό γονιμότητας μιας γυναίκας [51].

## Σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών ( Polycystic Ovary Syndrome, PCOS)

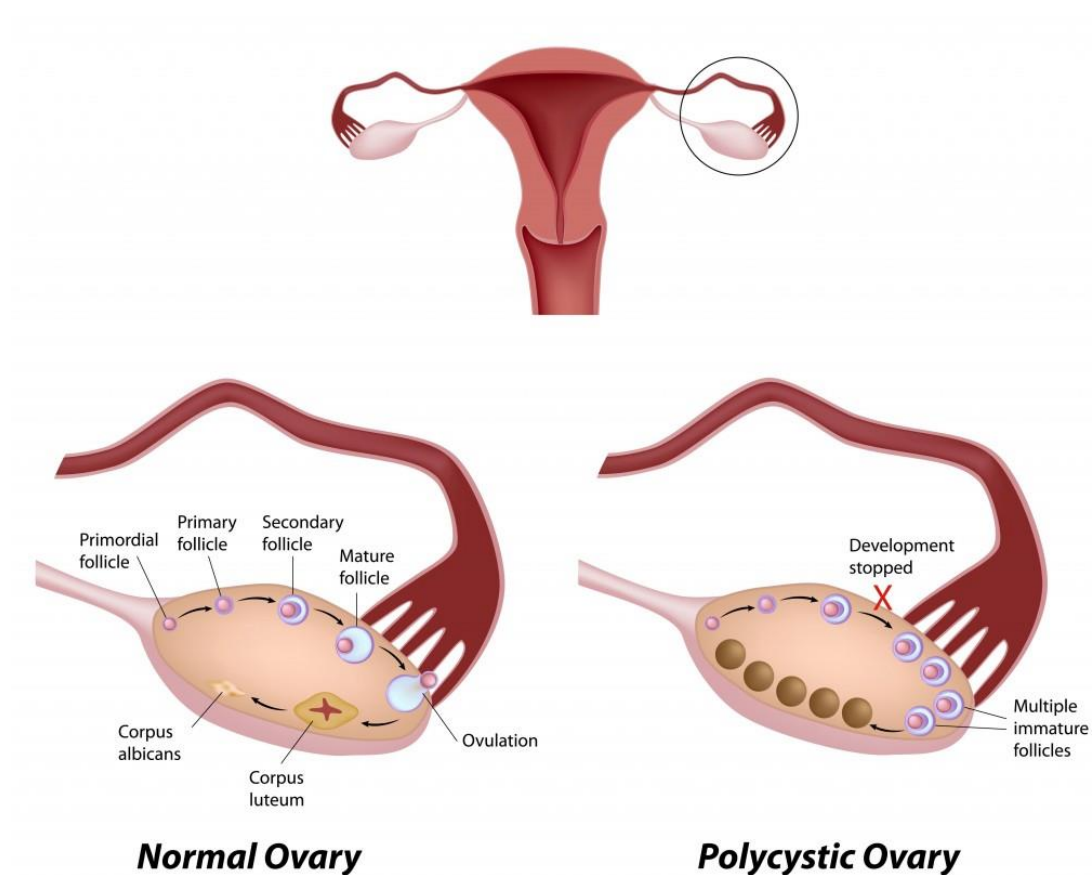
Το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών (PCOS) είναι μια κοινή ορμονική διαταραχή που επηρεάζει γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας. Χαρακτηρίζεται από μια σειρά συμπτωμάτων, συμπεριλαμβανομένων ακανόνιστων εμμηνορροϊκών κύκλων, υπερβολικών επιπέδων ανδρογόνων και σχηματισμού μικρών κυστών στις ωοθήκες [52-53]. Το PCOS μπορεί να έχει σημαντικό αντίκτυπο στη γονιμότητα μιας γυναίκας, καθώς και στη συνολική υγεία της, καθώς σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης παθολογικών καταστάσεων όπως ο διαβήτης τύπου 2, η υψηλή αρτηριακή πίεση και οι καρδιαγγειακές παθήσεις [54].

Η ακριβής αιτία του συνδρόμου δεν είναι πλήρως κατανοητή, αλλά επηρεάζεται τόσο από γενετικούς όσο και από περιβαλλοντικούς παράγοντες. Η αντίσταση στην ινσουλίνη θεωρείται ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη της πάθησης. Η ινσουλίνη είναι μια ορμόνη που ρυθμίζει τα επίπεδα σακχάρου στο αίμα και όταν το σώμα γίνει ανθεκτικό στην ινσουλίνη, μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένα επίπεδα ινσουλίνης στο αίμα. Αυτό μπορεί να διαταράξει τη φυσιολογική ισορροπία των ορμονών στο σώμα, οδηγώντας στα συμπτώματα που σχετίζονται με το PCOS [55-56].

Προκειμένου να καθίσταται πιο εύκολη η διάγνωση του συνδρόμου PCOS εφαρμόστηκαν τα κριτήρια του Ρότερνταμ [57]. Ένα από τα χαρακτηριστικά συμπτώματα του PCOS είναι οι ακανόνιστοι εμμηνορρυσιακοί κύκλοι. Οι γυναίκες με PCOS μπορεί να εμφανίσουν σπάνιες ή παρατεταμένες περιόδους που συνοδεύεται με βαριά ή λιγότερο έντονη έμμηνο ρύση. Αυτό οφείλεται στις ορμονικές ανισορροπίες που προκαλούνται από την πάθηση. Τα υπερβολικά επίπεδα ανδρογόνων, ή οι ανδρικές ορμόνες, μπορούν επίσης να οδηγήσουν στην ανάπτυξη ακμής, υπερβολικής τριχοφυΐας και σε ορισμένες περιπτώσεις τριχόπτωσης. Αρκεί μία γυναίκα να έχει 2 από αυτά τα 3 χαρακτηριστικά για να διαγνωστεί με σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών [58].

Η διάγνωση του PCOS μπορεί να είναι δύσκολη επειδή τα συμπτώματα μπορεί να διαφέρουν από γυναίκα σε γυναίκα. Ένας τρόπος διάγνωσης είναι ειδικές εξετάσεις, συμπεριλαμβανομένων εξετάσεων αίματος για τη μέτρηση των επιπέδων ορμονών. Επιπρόσθετα, απεικονιστικές τεχνικές όπως οι υπέρηχοι μπορούν επίσης να

χρησιμοποιηθούν για την εξέταση των ωθηκών για την παρουσία κυστών. Αν και δεν υπάρχει θεραπεία για το σύνδρομο του PCOS, τα συμπτώματα μπορούν να αντιμετωπιστούν μέσω τροποποιήσεων του τρόπου ζωής. Η απώλεια βάρους, εάν είναι απαραίτητο, μπορεί να είναι ευεργετική για υπέρβαρες ή παχύσαρκες γυναίκες με PCOS, καθώς μπορεί να βελτιώσει την ευαισθησία στην ινσουλίνη και την ισορροπία των ορμονών. Συνιστώνται επίσης τακτική άσκηση και υγιεινή διατροφή.



Εικόνα 5: Απεικόνιση φυσιολογικής ωοθήκης και πολυκυστικής ωοθήκης

### Μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και PCOS

Τα μιτοχόνδρια έχουν εμπλακεί στην παθογένεση του PCOS, καθώς παίζουν καθοριστικό ρόλο σε διάφορες κυτταρικές διεργασίες που εμπλέκονται στην αναπαραγωγική λειτουργία. Μελέτες έχουν δείξει ότι η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία, η αλλοιωμένη περιεκτικότητα του μιτοχονδριακού DNA (mtDNA) και η μη

φυσιολογική μιτοχονδριακή μορφολογία μπορεί να συμβάλλουν στην ανάπτυξη του συνδρόμου των πολυκυστικών ωοθηκών [59].

Η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία αναφέρεται σε μια κατάσταση στην οποία τα μιτοχόνδρια δεν μπορούν να λειτουργήσουν σωστά, οδηγώντας σε διαταραχή των κυτταρικών διεργασιών. Αυτές οι ανωμαλίες περιλαμβάνουν μειωμένη μιτοχονδριακή μάζα, αλλοιωμένο δυναμικό μιτοχονδριακής μεμβράνης και μειωμένη οξειδωτική φωσφορυλίωση, η οποία είναι η διαδικασία με την οποία τα μιτοχόνδρια παράγουν ΑΤΡ.

Οι γυναίκες με PCOS είχαν χαμηλότερη έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στη μιτοχονδριακή βιογένεση (τη διαδικασία με την οποία σχηματίζονται νέα μιτοχόνδρια) και στον ενεργειακό μεταβολισμό στα κοκκώδη κύτταρα σε σύγκριση με τις γυναίκες χωρίς PCOS.

Όπως είναι γνωστό, το μιτοχονδριακό DNA (mtDNA) κληρονομείται από τη μητέρα και κωδικοποιεί αρκετές βασικές πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην οξειδωτική φωσφορυλίωση. Αλλαγές στο περιεχόμενο και την ακεραιότητα του mtDNA έχουν αναφερθεί κατά κύριο λόγο σε γυναίκες με PCOS καθώς έχει διαπιστωθεί σύμφωνα με μια μελέτη ότι ο αριθμός αντιγράφων mtDNA ήταν σημαντικά χαμηλότερος σε γυναίκες με PCOS σε σύγκριση με τις γυναίκες χωρίς κάποια ορμονολογική διαταραχή, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι μεταλλάξεις στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα μπορεί να είναι αιτιολογικός παράγοντας στο PCOS [60].

Ωστόσο, βάση μιας άλλης μελέτης βρέθηκε το αντίθετο αποτέλεσμα, ότι ο αριθμός αντιγράφων mtDNA ήταν σημαντικά υψηλότερος σε γυναίκες με PCOS σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, υποδεικνύοντας γενικότερα μιτοχονδριακή δυσλειτουργία στο σύνδρομο PCOS [61].

Εκτός από τις λειτουργικές και γενετικές ανωμαλίες, μελέτες έχουν αναφέρει επίσης ανωμαλίες στη μορφολογία των μιτοχονδρίων στις γυναίκες με PCOS. Συμπερασματικά, υπάρχουν αυξανόμενες ενδείξεις ότι οι παραλλαγές του mtDNA παίζουν παθοφυσιολογικό ρόλο στην ανάπτυξη του PCOS. Παρόλα αυτά, απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για να διαπιστωθεί η αιτιώδης σύνδεση μεταξύ των παραλλαγών του mtDNA και του συνδρόμου PCOS.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 : ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑ ΚΑΙ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟ DNA

### 2.1 Μιτοχόνδρια και μιτοχονδριακό DNA

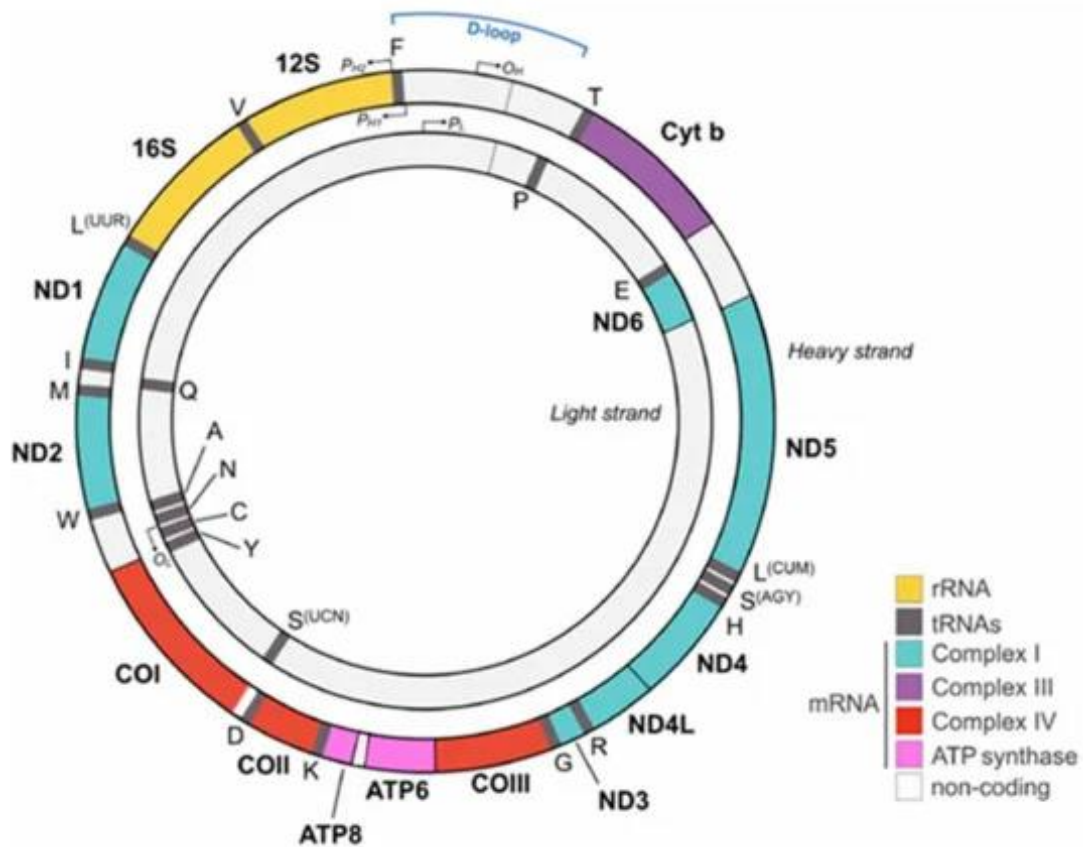
Τα μιτοχόνδρια είναι μικροσκοπικά οργανίδια που βρίσκονται σχεδόν σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα. Τα μιτοχόνδρια θεωρούνται οι κυτταρικές μονάδες παραγωγής ενέργειας καθώς συμμετέχουν ενεργά στην κυτταρική ζωή και η κύρια λειτουργία τους είναι να παράγουν ενέργεια η οποία χρησιμοποιείται από το κύτταρο.

Σε αντίθεση με άλλα κυτταρικά οργανίδια, τα μιτοχόνδρια περιέχουν το δικό τους δίκλωνο κυκλικό DNA, το οποίο ονομάζεται μιτοχονδριακό DNA, (mitochondrial DNA ή mtDNA) και σε αντίθεση με το πυρηνικό DNA (nuclear DNA ή nDNA) υπάρχει σε πολλά αντίγραφα αφού κάθε μιτοχόνδριο περιέχει 2-10 αντίγραφα του κυκλικού αυτού μορίου [62 - 63].

Το mtDNA διαφέρει επίσης από το nDNA στο μήκος και στη χημική δομή καθώς επίσης και στο γεγονός ότι ενώ το nDNA, κληρονομείται και από τους δύο γονείς, το mtDNA κληρονομείται μόνο από τη μητέρα, αλλά ωστόσο μπορεί να προκύψουν και σπάνιες εξαιρέσεις [64 - 66].

Το mtDNA περιέχει ένα βαρύ (H) κλώνο (πλούσιο σε πουρίνες) και ένα ελαφρύ (L) κλώνο (πλούσιο σε πυριμιδίνη). Έχει συνολικά 16.569 ζεύγη βάσεων και έχει αλληλουχηθεί πλήρως. Περιλαμβάνει 37 γονίδια, τα οποία ταξινομούνται σε 3 κατηγορίες: 13 γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες (πρωτεϊνικά γονίδια), 2 ριβοσωμικά γονίδια (rRNA) και 22 μεταφορικά γονίδια (tRNA). Είναι ιδιαίτερα ευαίσθητο σε μοριακές και μεμβρανικές βλάβες. Μεταλλάσσεται 17 φορές ταχύτερα από ότι το πυρηνικό DNA. Σοβαρές ασθένειες οφείλονται σε μεταλλάξεις μιτοχονδριακών γονιδίων και προκαλούν διάφορες μορφές μυϊκής δυστροφίας [67].

Το mtDNA φέρει σημαντικές γενετικές πληροφορίες σχετικά με τον κυτταρικό μεταβολισμό και την παραγωγή ενέργειας και λόγω του υψηλού αριθμού αντιγράφων του mtDNA εντός του κυττάρου, έχει γίνει ένας ολοένα και πιο δημοφιλής βιοδείκτης για την αξιολόγηση της αναπαραγωγικής ικανότητας και υγείας καθώς έχει αποδειχθεί ότι τα μιτοχόνδρια και το mtDNA θα μπορούσαν να παίζουν σημαντικό ρόλο κατά την πρόωμη ανάπτυξη του εμβρύου [68].



Εικόνα 6: Ανθρώπινο μιτοχondριακό DNA (mtDNA). Το mtDNA αποτελείται από ένα ελαφρύ (εσωτερικό) και βαρύ (εξωτερικό) κυκλικό κλώνο DNA με το καθένα να περιέχει μια ξεχωριστή αρχή αντιγραφής που ονομάζεται OL και OH, αντίστοιχα. Το mtDNA περιλαμβάνει 16.569 νουκλεοτίδια και κωδικοποιεί 37 γονίδια, συμπεριλαμβανομένων 2 ριβοσωμικών και 22 RNA μεταφοράς που απαιτούνται για τη σύνθεση πρωτεϊνών. Οι μιτοχondριακές κωδικοποιημένες πρωτεΐνες αποτελούν βασικά μέρη της αναπνευστικής αλυσίδας συνεισφέροντας επτά υπομονάδες στο σύμπλοκο I, μία υπομονάδα στο σύμπλοκο III, τρεις υπομονάδες στο σύμπλοκο IV και δύο υπομονάδες στο σύμπλοκο V (τριφωσφορική αδενοσίνη, συνθάση ATP). Οι προαγωγείς στον βαρύ κλώνο (PH1 και PH2) και στον ελαφρύ κλώνο (PL) οδηγούν την έκφραση του γονιδίου mtDNA. Ο υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών (GR) δεσμεύεται στο mtDNA κοντά στον βρόχο D που περικλείει την προέλευση του OH. Margherita Protasoni and Massimo Zeviani: Mitochondrial Structure and Bioenergetics in Normal and Disease Conditions Int. J. Mol. Sci. 2021, 22(2),586; <https://doi.org/10.3390/ijms22020586>

## 2.2 Τα μιτοχόνδρια σαν βιοδείκτες για την ποιότητα των ωαρίων

Η ποιότητα των ωαρίων είναι ένας κρίσιμος καθοριστικός παράγοντας για την επιτυχία της εξωσωματικής γονιμοποίησης. Τα μιτοχόνδρια διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στην ωρίμανση των ωαρίων, τη γονιμοποίηση και την επακόλουθη ανάπτυξη του εμβρύου. Η δυσλειτουργία ή η μη φυσιολογική μιτοχονδριακή δραστηριότητα μπορεί να οδηγήσει σε μειωμένη ποιότητα των ωαρίων και σε κίνδυνο για τη βιωσιμότητα του εμβρύου.

Η αξιολόγηση της μιτοχονδριακής λειτουργίας, όπως η παραγωγή ATP, ο αριθμός των μιτοχονδριακών αντιγράφων και τα επίπεδα αντιδραστικών ειδών οξυγόνου (ROS), μπορεί να προσφέρει πολύτιμες γνώσεις για την ποιότητα των ωαρίων και να προβλέψει τις πιθανότητες επιτυχών αποτελεσμάτων εξωσωματικής γονιμοποίησης [65].

Μελέτες έχουν δείξει ότι η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία σχετίζεται με τη γήρανση των ωοθηκών, το μειωμένο ωοθηκικό απόθεμα, την κακή απόκριση των ωοθηκών και πολλά προβλήματα αναπαραγωγής σε γαμέτες και ζυγώτες, όπως ανευπλοειδία και γενετικές διαταραχές. Η υψηλή συγκέντρωση mtDNA στα ωάρια έχει συνδεθεί με κατώτερο αναπτυξιακό δυναμικό, το οποίο μπορεί να προκληθεί από υψηλότερο οξειδωτικό στρες και μειωμένη παραγωγή ενέργειας.

Οι τεχνικές εξωσωματικής γονιμοποίησης (IVF) μπορεί να ωφεληθούν με την επιλογή των πιο βιώσιμων ωοκυττάρων βάσει του αριθμού αντιγράφων του mtDNA στα ωοκύτταρα, σύμφωνα με αρκετές μελέτες. Αυτή η μέθοδος μπορεί να προβλέψει την πιθανότητα επιτυχούς γονιμοποίησης και ανάπτυξης εμβρύου [69].

Ένα ώριμο ανθρώπινο ωάριο έχει μερικά από τα υψηλότερα μιτοχονδριακά περιεχόμενα μεταξύ των ανθρώπινων κυττάρων, 100.000-600.000 μιτοχόνδρια ενώ τα περισσότερα κύτταρα στο ανθρώπινο σώμα έχουν περίπου 100-10.000 μιτοχόνδρια, πιθανώς λόγω των μεγάλων ενεργειακών απαιτήσεων της γονιμοποίησης και της πρώιμης εμβρυϊκής ανάπτυξης. Έχει αποδειχθεί ότι το ωοκύτταρο έχει περισσότερα μιτοχόνδρια επειδή το ωάριο τροφοδοτεί το αναπτυσσόμενο έμβρυο με πολύ περισσότερο κυτταρόπλασμα από το σπέρμα. Το σπέρμα συνεισφέρει το ήμισυ του γενετικού υλικού στο έμβρυο, αλλά μετά τη γονιμοποίηση, τα μιτοχόνδριά του συχνά καταστρέφονται [70].

Μελέτες που αποδεικνύουν ότι τα σφάλματα στη μιτοχονδριακή δραστηριότητα μπορεί να οδηγήσουν σε μια ποικιλία αναπαραγωγικών παθολογιών, συμπεριλαμβανομένης της υπογονιμότητας, της αποβολής και των αναπτυξιακών ανωμαλιών, έχουν αυξήσει την ευαισθητοποίηση για τη σημασία της μιτοχονδριακής λειτουργίας στην ανθρώπινη αναπαραγωγή [71].

Το mtDNA έχει χρησιμοποιηθεί και ως δείκτης για την ανδρική υπογονιμότητα εκτός από την ποιότητα των ωαρίων. Λόγω του αυξημένου οξειδωτικού στρες και της βλάβης του DNA, έχει βρεθεί ότι τα σπερματοζώαρια με υψηλή συγκέντρωση mtDNA έχουν χαμηλότερη κινητικότητα και έχουν μικρότερο δυναμικό γονιμότητας. Επομένως, ο εντοπισμός της ανδρικής υπογονιμότητας και η επιλογή του πιο υγιούς σπέρματος για χρήση σε μεθόδους υποβοηθούμενης αναπαραγωγής όπως η ενδοκυτταροπλασματική έγχυση σπέρματος (ICSI) μπορεί να ωφεληθεί από τη μέτρηση του αριθμού αντιγράφων mtDNA στο σπέρμα. οι αριθμοί αντιγράφων του μιτοχονδριακού DNA είναι σημαντικά υψηλότεροι στην μη φυσιολογική εικόνα σπέρματος σε σύγκριση με την φυσιολογική. Επίσης έχει παρατηρηθεί σημαντική αρνητική συσχέτιση μεταξύ των αριθμών αντιγράφων του μιτοχονδριακού DNA και των παραμέτρων του σπέρματος [72].

### 2.3 Μόρια DNA εκτός κυττάρων στα βιολογικά υγρά cfDNA

Μικρά τμήματα νουκλεϊκών οξέων DNA και RNA, κυκλοφορούν ελεύθερα στα βιολογικά υγρά του ανθρώπου και των ζώων, όπως το αίμα και τα ούρα, ονομάζονται κυκλοφορούντα νουκλεϊκά οξέα (Circulating Nucleic Acids, CNAs) και έχουν την ιδιότητα να διασπείρονται στο εξωκυτταρικό περιβάλλον. Οι Mandel και Metais παρατήρησαν για πρώτη φορά DNA απαλλαγμένο από κύτταρα (cfDNAs) στο περιφερικό αίμα το 1948 [73 - 74].

Τα θραύσματα cfDNA μπορούν να προκύψουν τόσο από υγιή όσο και από μη υγιή κύτταρα και είναι σε θέση να αποκαλύψουν ζωτικές λεπτομέρειες για την υγεία ενός ατόμου. Αποβάλλονται από τα κύτταρα τόσο κατά τη διάρκεια παθολόγων περιστάσεων όπως ο καρκίνος και οι λοιμώξεις όσο και κατά τις τακτικές φυσιολογικές διεργασίες όπως η απόπτωση δηλαδή ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος καθώς και κατά την κυτταρική ανανέωση [75].



Πιο συγκεκριμένα, τα μόρια DNA που απελευθερώνονται τόσο από τα οργανίδια του πυρήνα όσο και από τα μιτοχόνδρια [76] έξω από τα κύτταρα και κυκλοφορούν ελεύθερα στα βιολογικά υγρά, ονομάζονται circulating cell free-DNA (ccf-DNA) ή cell free-DNA (cf-DNA) και είναι το cell free-πυρηνικό DNA (cf-nDNA) και το cell free-μιτοχονδριακό DNA (cf-mtDNA). Το μήκος τους πιστεύεται ότι κυμαίνεται από 40 έως 200 ζεύγη βάσεων (bp), με συνηθέστερο στα 166 bp [77] περίπου στο μέγεθος του DNA που είναι τυλιγμένο γύρω από ένα νουκλεόσωμα [78]. Ωστόσο, έχουν βρεθεί και μεγαλύτερα τμήματα έως >30 kb [79]. Γενικά, μακρύτερα θραύσματα DNA > 10 kb πιστεύεται ότι είναι αποτέλεσμα νεκρωτικού κυτταρικού θανάτου, όπως αυτά των κυττάρων σε νεκρωθέντα ιστό όγκου. Το επίπεδο του cfDNA στο αίμα ποικίλλει και συνήθως κυμαίνεται από 0 έως 100 ng/ml σε υγιή άτομα και από 0 - 5 έως >1000 ng/ml σε καρκινοπαθείς [77].

Αυτός ο τύπος DNA (cfDNA) έχει ανακαλυφθεί σε μια ποικιλία σωματικών και βιολογικών υγρών όπως στο πλάσμα και στον ορό του αίματος, στο ωοθυλακικό υγρό (ΩΥ) γυναικών, στο νωτιαίο υγρό, στα ούρα, στο σίελο, στον ιδρώτα και στα δάκρυα, καθώς επίσης και στο σπέρμα [80].

Τα τελευταία χρόνια, το πυρηνικό DNA χωρίς την παρουσία κυττάρων (cf-nDNA) και το μιτοχονδριακό DNA χωρίς την παρουσία κυττάρων (cf-mtDNA) έχουν αναδειχθεί ως πολλά υποσχόμενοι βιοδείκτες στην εξωσωματική γονιμοποίηση καθώς μπορεί να παρέχουν πληροφορίες σχετικά με την ποιότητα του εμβρύου και το δυναμικό εμφύτευσης.

#### 2.4 cf-nDNA ως βιοδείκτες στην εξωσωματική γονιμοποίηση:

Οι προγνωστικοί βιοδείκτες είναι απαραίτητοι για τη βελτιστοποίηση της εξωσωματικής γονιμοποίησης, καθώς μπορούν να παρέχουν στους ειδικούς σημαντικές πληροφορίες, να προσαρμόσουν τα σχέδια θεραπείας και να ενισχύσουν την απόκριση των ασθενών στην θεραπεία. Καλύτερη απόκριση ασθενών και επιθυμητά αποτελέσματα από τη θεραπεία εξωσωματικής γονιμοποίησης θα προκύψουν από πιο εξατομικευμένες εναλλακτικές θεραπείες. Επίσης, ο εντοπισμός δεικτών που συνδέονται με την ανάπτυξη των εμβρύων μπορεί να βοηθήσει τους

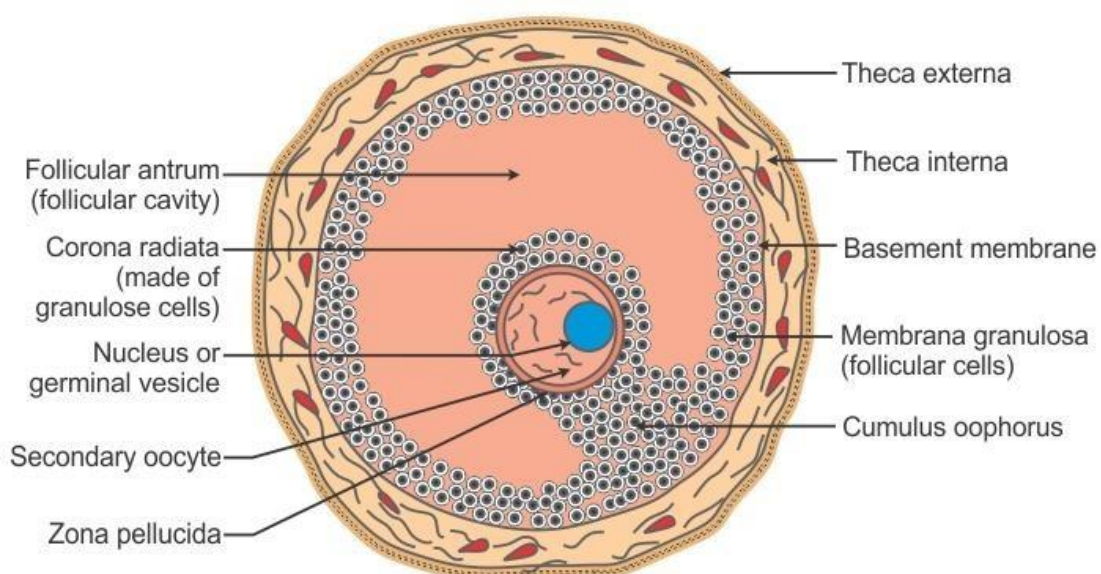
γιατρούς να επιλέξουν ποιο ωάριο θα μεταφέρουν και να μειώσουν τον κίνδυνο αποβολών.

Η επιτυχία της εξωσωματικής γονιμοποίησης βασίζεται σε μεγάλο βαθμό στην επιλογή των πιο «βιώσιμων εμβρύων» για μεταφορά, ώστε να μεγιστοποιηθούν οι πιθανότητες εγκυμοσύνης. Παραδοσιακά, η επιλογή εμβρύου βασίζεται σε μορφολογικές εκτιμήσεις, οι οποίες μπορεί να μην αποτυπώνουν πλήρως την ποιότητα του εμβρύου [81].

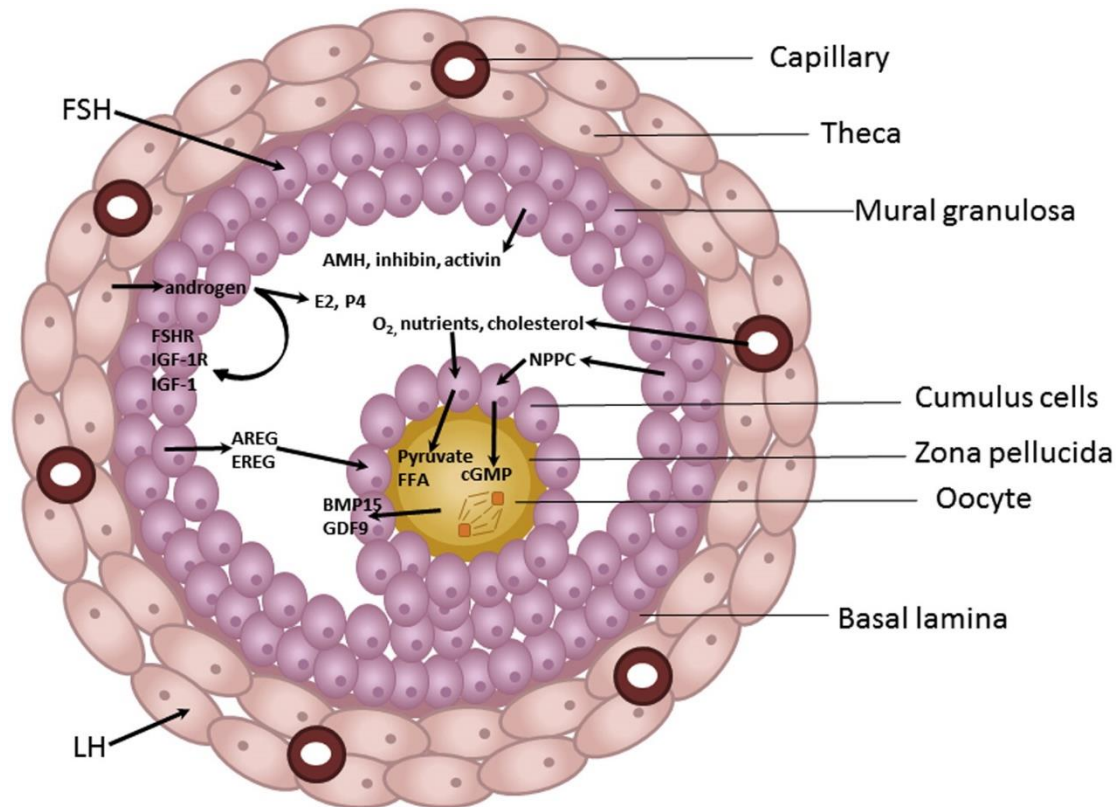
Η πρόσφατη έρευνα επικεντρώθηκε στην εξερεύνηση καινοτόμων βιοδεικτών, όπως το ελεύθερο πυρηνικό DNA (cf-nDNA) από το ωοθυλακικό υγρό, για τη βελτίωση της επιλογής εμβρύων και την ενίσχυση των ποσοστών επιτυχίας της εξωσωματικής γονιμοποίησης [82].

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 : ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΥΛΙΚΟ

### 3.1 Βιολογικό υλικό μελέτης, ωοθυλακικό υγρό (Follicular Fluid ή FF)



Εικόνα 7: Δομή ωοθυλακίου



Εικόνα 8 : Ανατομία ωοθυλακίου, όπου φαίνεται το ωοθυλακικό υγρό και τα διάφορα κύτταρα που περικλείουν το ωάριο

Το υγρό που περιβάλλει το ωάριο μέσα στο ωοθυλάκιο ονομάζεται ωοθυλακικό υγρό. Το ωοθυλακικό υγρό είναι ένα περίπλοκο και ζωτικό συστατικό του γυναικείου αναπαραγωγικού συστήματος, με πολύπλευρο ρόλο στη διαδικασία της ωορρηξίας και της γονιμότητας. Αυτό το εξειδικευμένο υγρό βρίσκεται μέσα στα ωοθυλάκια των ωοθηκών, τα οποία είναι μικροί σάκοι μέσα στις ωοθήκες μιας γυναίκας που φιλοξενούν τα αναπτυσσόμενα ωάρια.

Η σύνθεση του ωοθυλακικού υγρού είναι ένα μείγμα διαφόρων συστατικών, συμπεριλαμβανομένων ορμονών, θρεπτικών ουσιών, αυξητικών παραγόντων και κυττάρων. Αυτά τα στοιχεία συνεργάζονται για να δημιουργήσουν ένα βέλτιστο μικροπεριβάλλον για την ωρίμανση και την ανάπτυξη του ωαρίου. Ορμόνες όπως τα οιστρογόνα και η προγεστερόνη υπάρχουν σε ποικίλες συγκεντρώσεις, επηρεάζοντας την ανάπτυξη και την υγεία του αναπτυσσόμενου ωοθυλακίου [83].

Μία από τις κύριες λειτουργίες του ωοθυλακικού υγρού είναι να υποστηρίζει την ανάπτυξη του ωαρίου δημιουργώντας το κατάλληλο περιβάλλον για την ωορρηξία. Το υγρό παρέχει τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά, όπως σάκχαρα και αμινοξέα, τα

οποία είναι ζωτικής σημασίας για την ανάπτυξη και τις ενεργειακές απαιτήσεις του αυγού κατά τη διάρκεια του ταξιδιού του προς την ωρίμανση. Επιπλέον, το υγρό περιέχει μόρια σηματοδότησης γνωστά ως αυξητικούς παράγοντες, τα οποία καθοδηγούν το ωοκύτταρο στα στάδια ανάπτυξής του.

Επιπρόσθετα, το ωοθυλακικό υγρό λειτουργεί και ως «προστατευτικό μαξιλάρι» για το ευαίσθητο ωάριο. Παρέχει ένα υποστηρικτικό περιβάλλον που προστατεύει το αναπτυσσόμενο ωάριο από εξωτερικές πιέσεις και πιθανές βλάβες. Αυτή η προστασία είναι ιδιαίτερα σημαντική καθώς τα ωοθυλάκια μεγαλώνουν και γίνονται πιο ευάλωτα σε μηχανικές και βιοχημικές επιδράσεις. Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι το ωοθυλακικό υγρό παίζει καθοριστικό ρόλο στην επικοινωνία μεταξύ του ωαρίου και των γύρω ωοθυλακίων. Αυτή η περίπλοκη αλληλεπίδραση περιλαμβάνει την ανταλλαγή σημάτων που ρυθμίζουν το χρόνο και την εξέλιξη της ωορρηξίας [84].

Το ωοθυλακικό υγρό χρησιμεύει ως αγωγός για αυτά τα σήματα, επιτρέποντας τον συντονισμό διαφόρων φυσιολογικών διεργασιών. Δεδομένου του κεντρικού της ρόλου στη διαδικασία της ωορρηξίας, η ανάλυση του ωοθυλακικού υγρού έχει σημαντικές επιπτώσεις στις τεχνολογίες υποβοηθούμενης αναπαραγωγής (ART), όπως η εξωσωματική γονιμοποίηση (IVF). Μελετώντας τη σύνθεση του ωοθυλακικού υγρού, οι κλινικοί γιατροί μπορούν να αποκτήσουν γνώσεις για την υγεία και τη βιωσιμότητα των ωαρίων. Αυτές οι πληροφορίες μπορούν να βοηθήσουν στην επιλογή των καταλληλότερων ωαρίων για γονιμοποίηση, αυξάνοντας έτσι τις πιθανότητες επιτυχούς εμφύτευσης και εγκυμοσύνης [85-86]

Συμπερασματικά, το ωοθυλακικό υγρό είναι μια αξιοσημείωτη και περίπλοκη ουσία που συμβάλλει εκτενώς στις πολύπλοκες διαδικασίες της γυναικείας αναπαραγωγής. Η σύνθεσή του, οι θρεπτικές του ιδιότητες και η ενεργή συμμετοχή στη σηματοδότηση το καθιστούν βασικό παράγοντα για επιτυχημένες θεραπείες ωορρηξίας και γονιμότητας.

### 3.2 Ελεύθερο DNA στο ωοθυλακικό υγρό

Το ελεύθερο DNA (cfDNA) στο ωοθυλακικό υγρό είναι ένα θέμα αυξανόμενου ενδιαφέροντος στον τομέα της αναπαραγωγικής ιατρικής και της έρευνας για τη γονιμότητα. Το ωοθυλακικό υγρό περιέχει διάφορα μόρια και ουσίες που είναι ζωτικής σημασίας για την ανάπτυξη και την ωρίμανση των ωαρίων. Ένα από αυτά τα συστατικά είναι και το DNA απαλλαγμένο από κύτταρα, το οποίο αποτελείται από μικρά θραύσματα DNA που έχουν απελευθερωθεί από κύτταρα εντός του ωοθυλακίου.

Η παρουσία του cfDNA στο ωοθυλακικό υγρό έχει εγείρει ερωτήματα σχετικά με τις πιθανές επιπτώσεις του στη γυναικεία γονιμότητα και στα αναπαραγωγικά αποτελέσματα, ιδιαίτερα σε σχέση με την ηλικία της γυναίκας [81].

Η μελέτη του cfDNA αποτελεί συχνά πρόκληση λόγω της μεγάλης του περιεκτικότητας σε γονιδιωματικό DNA, της χαμηλής συγκέντρωσης του και του υψηλού κατακερματισμού [87-88].

### 3.3 Προέλευση του cfDNA στο ωοθυλακικό υγρό

Το ελεύθερο DNA (cfDNA) στο ωοθυλακικό υγρό αναφέρεται στο κατακερματισμένο DNA που υπάρχει στο υγρό που περιβάλλει το ωάριο στο ωοθυλάκιο της ωοθήκης και μπορεί να προέρχεται από διάφορες πηγές εντός του ωοθυλακίου. Μπορεί να απελευθερωθεί από τα κοκκώδη κύτταρα (granulosa and cumulus), τα κύτταρα θήκης (theca cells), τα κύτταρα των αιμοφόρων αγγείων που τροφοδοτούν το ωοθυλάκιο ή ακόμα και το ίδιο το ωοκύτταρο. Αυτά τα κύτταρα υπόκεινται φυσικά σε διεργασίες κυτταρικού θανάτου όπως απόπτωση ή εναλλαγή κυττάρων κατά τη διάρκεια της θυλακιογένεσης, συμβάλλοντας στην δημιουργία του cfDNA.

Έτσι, το ωοθυλακικό υγρό αποτελείται από ένα μείγμα ουσιών που εκκρίνονται από το ωάριο και τα γύρω κύτταρα, συμπεριλαμβανομένων ορμονών, αυξητικών παραγόντων και άλλων βιομορίων [82,89].

Τα επίπεδα του cfDNA στο ωοθυλακικό υγρό μπορεί να ποικίλλουν ανάλογα με διάφορους παράγοντες όπως η ηλικία της γυναίκας, ο αριθμός των ωοθυλακίων που

υπάρχουν και η υποκείμενη αιτία της υπογονιμότητας. Έχει βρεθεί ότι κατά τη διαδικασία της εξωσωματικής γονιμοποίησης, το cfDNA από το ωοθυλακικό υγρό θα εισέλθει στην κυκλοφορία του αίματος και θα λειτουργήσει ως μετρήσιμη ένδειξη της υγείας των ωοθηκών. Σύμφωνα με έρευνα, όταν τα επίπεδα του cfDNA στο πλάσμα αυξήθηκαν σε γυναίκες που υποβάλλονταν σε εξωσωματική γονιμοποίηση, οι πιθανότητές τους για επίτευξη εγκυμοσύνης μειώθηκαν [90].

Γι' αυτό έχει αποδειχθεί ότι η ανάλυση του cfDNA (cf-nDNA και cf-mtDNA) στο ωοθυλακικό υγρό μπορεί να παρέχει πολύτιμες πληροφορίες σχετικά με τη γενετική και επιγενετική κατάσταση του ωαρίου, καθώς και την ποιότητα και το αναπτυξιακό δυναμικό του εμβρύου. Για παράδειγμα, μη φυσιολογικά επίπεδα cfDNA στο θυλακικό υγρό έχουν συσχετιστεί με χρωμοσωμικές ανωμαλίες στο έμβρυο, αποτυχία εμφύτευσης και μειωμένα ποσοστά εγκυμοσύνης στις τεχνολογίες υποβοηθούμενης αναπαραγωγής (ART). Συνολικά, η ανάλυση του cfDNA στο ωοθυλακικό υγρό είναι ένας αναδυόμενος τομέας έρευνας που έχει τη δυνατότητα να βελτιώσει την κατανόησή μας για τους μοριακούς μηχανισμούς που κρύβονται πίσω από την υπογονιμότητα και να βελτιώσει τα αποτελέσματα της ART [91-92].

Μια αυξημένη ποσότητα ελεύθερου πυρηνικού DNA (cf-nDNA) στο ωοθυλακικό υγρό μπορεί να υποδηλώνει κυτταρικό θάνατο και/ή φλεγμονή στο ωοθυλάκιο. Το cf-nDNA στο ωοθυλακικό υγρό μπορεί να προέρχεται από διάφορες πηγές, συμπεριλαμβανομένων των ωοκυττάρων, των κοκκωδών κυττάρων και των αιμοφόρων αγγείων.

Ένας πιθανός μηχανισμός για αυξημένα επίπεδα cf-nDNA στο ωοθυλακικό υγρό είναι η απόπτωση ή ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος. Η απόπτωση αποτελεί μια φυσιολογική διαδικασία που συμβαίνει κατά την ανάπτυξη των ωοθυλακίων και την ωορρηξία, αλλά η υπερβολική απόπτωση μπορεί να οδηγήσει σε μειωμένη ποιότητα των ωαρίων και μειωμένη γονιμότητα [93-94].

Τα αυξημένα επίπεδα cf-nDNA στο ωοθυλακικό υγρό έχουν συσχετιστεί με υψηλότερα ποσοστά απόπτωσης στα κοκκώδη κύτταρα, καθώς και με μειωμένη ποιότητα ωαρίων και χαμηλότερο δυναμικό ανάπτυξης εμβρύου [95].

Εκτός από την απόπτωση, τα αυξημένα επίπεδα cf-nDNA στο ωοθυλακικό υγρό μπορεί επίσης να σχετίζονται με φλεγμονή και οξειδωτικό στρες. Η φλεγμονή μπορεί να οδηγήσει στην απελευθέρωση προφλεγμονωδών κυτοκινών, οι οποίες μπορούν να

προκαλέσουν κυτταρικό θάνατο και βλάβη στο DNA. Ομοίως, το οξειδωτικό στρες μπορεί να προκαλέσει βλάβη στο DNA, η οποία μπορεί να οδηγήσει στην απελευθέρωση θραυσμάτων nDNA στο ωοθυλακικό υγρό [96].

Συνολικά, τα αυξημένα επίπεδα cf-nDNA στο ωοθυλακικό υγρό μπορεί να είναι ένας χρήσιμος βιοδείκτης για την αναγνώριση ωοθυλακίων με αυξημένη απόπτωση, φλεγμονή και οξειδωτικό στρες, τα οποία μπορεί να σχετίζονται με μειωμένη ποιότητα ωαρίων και γονιμότητα. Ωστόσο, απαιτείται περαιτέρω έρευνα για τον προσδιορισμό της κλινικής χρησιμότητας της μέτρησης cf-nDNA στο ωοθυλακικό υγρό για αξιολόγηση και θεραπεία γονιμότητας [97].

### 3.4 cf-mtDNA στο ωοθυλακικό υγρό

Το cf-mtDNA έχει βρεθεί σε μια ποικιλία σωματικών υγρών [98-99], συμπεριλαμβανομένου και του ωοθυλακικού υγρού. Ορισμένες από τις βιοχημικές του ιδιότητες μπορεί να είναι κρίσιμες για την ποιότητα του ωαρίου καθώς και για την πιθανότητα επιτυχούς γονιμοποίησης και ανάπτυξης του εμβρύου.

Η ποιότητα των ωαρίων είναι ένας καθοριστικός παράγοντας της αναπτυξιακής ικανότητας του εμβρύου και του κλινικού ποσοστού εγκυμοσύνης, αν και, στις περισσότερες περιπτώσεις εξωσωματικής γονιμοποίησης, η αξιολόγηση της ποιότητας των ωαρίων περιορίζεται κυρίως στην αξιολόγηση των μορφολογικών παραμέτρων. Σύμφωνα με διάφορες μελέτες, υποσχόμενοι βιοδείκτες έχουν βρεθεί στα κοκκώδη κύτταρα και στο ωοθυλακικό υγρό [100-101].

Οι συγκεντρώσεις cf-mtDNA στο ωοθυλακικό υγρό βρέθηκαν να συσχετίζονται ουσιαστικά με τη βιωσιμότητα των ωοκυττάρων και των εμβρύων και μπορεί να αποτελεί ενδεχομένως, ένα μη επεμβατικό διαγνωστικό εργαλείο για την ενίσχυση της επιτυχίας της εξωσωματικής γονιμοποίησης.

Σύμφωνα με μια προηγούμενη ερευνητική έκθεση, τα κοκκώδη κύτταρα (GC) απελευθέρωσαν ενεργά cf-mtDNA στο μέσο ως απόκριση σε μιτοχονδριακή δυσλειτουργία. Επιπλέον, εξακολουθεί να είναι αβέβαιο εάν η ποσότητα του cf-n- και/ή του cf-mtDNA αντανάκλα την ικανότητα των ωαρίων για ανάπτυξη. Για παράδειγμα,



έχει βρεθεί ότι η χαμηλή συγκέντρωση cf-mtDNA στο ωοθυλακικό υγρό, αλλά όχι η χαμηλή συγκέντρωση cf-nDNA, σχετίζεται με καλό δυναμικό ανάπτυξης ωαρίων [97].

Η θυλακική ατρησία έχει συσχετιστεί με την απόπτωση κοκκωδών κυττάρων (GC). Ωστόσο, πρόσφατη έρευνα έχει δείξει ότι η ωοθυλακική ατρησία μπορεί να ενεργοποιήσει διάφορους τύπους προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (PCD), κυρίως σε GCs, συμπεριλαμβανομένης της αυτοφαγίας, αν και διαφορετικά μονοπάτια σηματοδότησης μιτοφαγίας έχουν διαφορετικούς ρόλους ανάλογα με τους τύπους των κυττάρων ή τους εξωτερικούς παράγοντες.

Αρκετοί τύποι αυτοφαγίας έχουν ως αποτέλεσμα τη διάσπαση συγκεκριμένων οργανιδίων, όπως η μιτοφαγία, για την καταστροφή των μιτοχονδρίων. Η μιτοφαγία, ένας μηχανισμός με τον οποίο τα κύτταρα εξαλείφουν επιλεκτικά τα επιπλέον ή κατεστραμμένα μιτοχόνδρια με αυτοφαγία, είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της μιτοχονδριακής ομοιόστασης και της κυτταρικής επιβίωσης [102].

Τα μη λειτουργικά μιτοχόνδρια μπορούν να εξαλειφθούν με μιτοφαγία στα αρχικά στάδια της ωογένεσης. Παρά την ύπαρξη ρυθμιστών μιτοφαγίας στα ωοκύτταρα, μετά τον σχηματισμό ωοκυττάρων, η μιτοφαγία δεν ενεργοποιείται πλήρως για την εκκαθάριση των ελαττωματικών μιτοχονδρίων. Ως αποτέλεσμα, τα μιτοχόνδρια που δυσλειτουργούν μεταφέρονται από το ωοκύτταρο στο έμβρυο. Ωστόσο, αυξάνοντας τη μιτοφαγία, τα GC στην περιοχή των ωαρίων μπορεί να ενισχύσουν τη μιτοχονδριακή δραστηριότητα, βελτιώνοντας έτσι το αναπτυξιακό δυναμικό των ωαρίων [103].

Μια αυξημένη ποσότητα ελεύθερου μιτοχονδριακού DNA (cf-mtDNA) στο ωοθυλακικό υγρό μπορεί να υποδηλώνει μιτοχονδριακή δυσλειτουργία στο ωοκύτταρο ή στα γύρω κύτταρα. Τα μιτοχόνδρια και το mtDNA κωδικοποιούν τις βασικές μιτοχονδριακές πρωτεΐνες που είναι απαραίτητες για τη σωστή λειτουργία των μιτοχονδρίων. Μελέτες έχουν δείξει ότι τα αυξημένα επίπεδα cf-mtDNA στο ωοθυλακικό υγρό μπορεί να συσχετιστούν με μειωμένη ποιότητα ωαρίων, μειωμένους ρυθμούς γονιμοποίησης και χαμηλότερο δυναμικό ανάπτυξης εμβρύου. Ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο τα αυξημένα επίπεδα cf-mtDNA επηρεάζουν την ποιότητα των ωαρίων και των εμβρύων δεν είναι πλήρως κατανοητός, αλλά πιστεύεται ότι οφείλεται σε εξασθενημένη μιτοχονδριακή λειτουργία, οξειδωτικό στρες και βλάβη του DNA [104].

Υπάρχουν διάφοροι παράγοντες που μπορούν να συμβάλουν στην αύξηση των επιπέδων cf-mtDNA στο ωοθυλακικό υγρό, συμπεριλαμβανομένης της ηλικίας, του τρόπου ζωής και των υποκείμενων ιατρικών παθήσεων. Για παράδειγμα, η γήρανση σχετίζεται με συσσώρευση μεταλλάξεων mtDNA και μείωση του αριθμού αντιγράφων του mtDNA, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και αυξημένα επίπεδα cf-mtDNA.

Άλλοι παράγοντες που μπορούν να αυξήσουν τα επίπεδα cf-mtDNA περιλαμβάνουν την έκθεση σε τοξίνες, το οξειδωτικό στρες και τη φλεγμονή. Συνολικά, τα αυξημένα επίπεδα cf-mtDNA στο ωοθυλακικό υγρό μπορεί να είναι ένας χρήσιμος βιοδείκτης για τον εντοπισμό ωοκυττάρων με μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και μειωμένο αναπτυξιακό δυναμικό. Ωστόσο, απαιτείται περαιτέρω έρευνα για τον προσδιορισμό της κλινικής χρησιμότητας της μέτρησης του cf-mtDNA στο ωοθυλακικό υγρό για την αξιολόγηση και τη θεραπεία της γονιμοποίησης [97].

Ο κυτταρικός θάνατος είναι μια θεμελιώδης πτυχή του κύκλου ζωής, που διέπεται από περίπλοκες μοριακές διεργασίες. Μεταξύ των διαφόρων μηχανισμών κυτταρικού θανάτου, η απόπτωση και η νέκρωση ξεχωρίζουν ως δύο διακριτές οδοί, καθεμία από τις οποίες χαρακτηρίζεται από μοναδικά χαρακτηριστικά και επιπτώσεις για τον οργανισμό. Αυτές οι διεργασίες παίζουν ζωτικό ρόλο στην ανάπτυξη, την ομοιόσταση των ιστών και τις παθολογικές καταστάσεις, τονίζοντας την πολυπλοκότητα της κυτταρικής βιολογίας.

### 3.5 Απόπτωση - Νέκρωση

#### Απόπτωση

Η απόπτωση, που συχνά αναφέρεται ως προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος, είναι μια σχολαστικά ρυθμισμένη διαδικασία απαραίτητη για τη διατήρηση της ακεραιότητας των ιστών και τη ρύθμιση των κυτταρικών πληθυσμών. Αυτή η διαδικασία παίζει καθοριστικό ρόλο στην εμβρυογένεση, στη ρύθμιση της ανοσοαπόκρισης και στην απομάκρυνση κατεστραμμένων ή δυνητικά επιβλαβών κυττάρων. Τα αποπτωτικά κύτταρα παρουσιάζουν μια σειρά από ευδιάκριτες

μορφολογικές αλλαγές, όπως συρρίκνωση των κυττάρων, συμπύκνωση χρωματίνης και σχηματισμό αποπτωτικών σωμάτων δεσμευμένων στη μεμβράνη [105].

Σε μοριακό επίπεδο, η απόπτωση οδηγείται από έναν καταρράκτη γεγονότων σηματοδότησης που περιλαμβάνουν διάφορες οικογένειες πρωτεϊνών. Η οικογένεια Bcl-2, που περιλαμβάνει προ-αποπτωτικά και αντι-αποπτωτικά μέλη, ελέγχει τη διαπερατότητα της μιτοχονδριακής μεμβράνης και την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c, ένα βασικό βήμα στην έναρξη της απόπτωσης. Το κυτόχρωμα c ενεργοποιεί τις κασπάσες, οι οποίες είναι πρωτεάσες κυστεΐνης υπεύθυνες για την εκτέλεση του αποπτωτικού προγράμματος. Αυτές οι κασπάσες διασπούν πολυάριθμα κυτταρικά υποστρώματα, οδηγώντας τελικά σε κατακερματισμό του DNA και εκφυλισμό των κυττάρων.

Η διαδικασία της απόπτωσης, επιτρέπει στο κύτταρο να αποσυναρμολογηθεί με οργανωμένο τρόπο, αποτρέποντας την απελευθέρωση δυνητικά επιβλαβών κυτταρικών περιεχομένων στο περιβάλλον. Επιπλέον, τα αποπτωτικά κύτταρα απελευθερώνουν σήματα που προσελκύουν τα φαγοκύτταρα, τα οποία απορροφούν αποτελεσματικά και απομακρύνουν τα αποπτωτικά σώματα χωρίς να προκαλούν φλεγμονώδη απόκριση [106].

## Νέκρωση

Σε αντίθεση με την απόπτωση, η νέκρωση είναι μια πιο άτακτη μορφή κυτταρικού θανάτου που συχνά σχετίζεται με τραυματισμό, μόλυνση ή σοβαρό στρες. Ο νεκρωτικός κυτταρικός θάνατος χαρακτηρίζεται από διόγκωση των κυττάρων, ρήξη της πλασματικής μεμβράνης και την επακόλουθη απελευθέρωση κυτταρικού περιεχομένου στον εξωκυττάριο χώρο. Αυτό μπορεί να πυροδοτήσει μια φλεγμονώδη απόκριση, συμβάλλοντας δυνητικά στη βλάβη των ιστών και στην εξέλιξη της νόσου [107-108].

Η νέκρωση δεν έχει την προσεκτικά καθορισμένη ακολουθία γεγονότων που παρατηρούνται στην απόπτωση. Αντίθετα, συχνά προκύπτει από συντριπτικές αλλαγές που διαταράσσουν την κυτταρική ομοιόσταση, όπως ακραίες αλλαγές θερμοκρασίας, τοξίνες ή στέρηση οξυγόνου. Κατά συνέπεια, το κατεστραμμένο κύτταρο χάνει την ικανότητά του να διατηρεί βαθμίδες ιόντων, οδηγώντας σε ωσμωτικές ανισορροπίες

και κυτταρικό οίδημα. Αυτό μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα τη ρήξη της πλασματικής μεμβράνης, την απελευθέρωση του ενδοκυτταρικού περιεχομένου και την ενεργοποίηση των φλεγμονωδών οδών [109].

Τόσο η απόπτωση όσο και η νέκρωση διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο σε διάφορα φυσιολογικά και παθολογικά σενάρια. Η απόπτωση βοηθά στη διαδικασία δημιουργίας και διαμόρφωσης των αναπτυσσόμενων ιστών, στην εξάλειψη των περιττών ή κατεστραμμένων κυττάρων και στη ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος. Η απορρύθμιση της απόπτωσης εμπλέκεται σε περιπτώσεις καρκίνου, αυτοάνοσες διαταραχές και νευροεκφυλιστικές ασθένειες. Η νέκρωση, από την άλλη πλευρά, συχνά προκύπτει από ακραίο στρες ή εξωτερικές προσβολές. Μπορεί να συμβάλει στη βλάβη των ιστών, στη φλεγμονή και στην απελευθέρωση σημάτων κινδύνου που ενεργοποιούν τις ανοσολογικές αποκρίσεις.

Συμπερασματικά, η απόπτωση και η νέκρωση αντιπροσωπεύουν δύο διακριτές οδούς κυτταρικού θανάτου, η καθεμία με τα δικά της χαρακτηριστικά και επιπτώσεις. Η απόπτωση είναι μια διαδικασία ζωτικής σημασίας για τη διατήρηση της ομοιόστασης των ιστών και την εξάλειψη των ανεπιθύμητων κυττάρων χωρίς να προκαλείται φλεγμονή. Η νέκρωση, αντίθετα, είναι μια μορφή κυτταρικού θανάτου που συχνά προκύπτει από ακραίο στρες ή τραυματισμό, που οδηγεί σε ρήξη και φλεγμονή των κυττάρων. Η κατανόηση αυτών των μηχανισμών είναι ζωτικής σημασίας για την κατανόηση της φυσιολογικής ανάπτυξης, της εξέλιξης μιας νόσου και των πιθανών θεραπευτικών παρεμβάσεων [110-111].

### 3.6 Μιτοφαγία- Μιτοχονδριακή Βιογένεση

Για να εξασφαλιστεί η κυτταρική ζωτικότητα και λειτουργικότητα, είναι απαραίτητη μια δυναμική ισορροπία μεταξύ του μιτοχονδριακού κύκλου. Αυτή η ισορροπία επιτυγχάνεται μέσω δύο περίπλοκων διεργασιών: της μιτοφαγίας και της μιτοχονδριακής βιογένεσης.

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η μιτοφαγία είναι μια εξειδικευμένη μορφή αυτοφαγίας, ο κυτταρικός μηχανισμός που είναι υπεύθυνος για την υποβάθμιση και την ανακύκλωση κατεστραμμένων ή περιττών συστατικών. Στη βιολογία των μιτοχονδρίων, η μιτοφαγία περιλαμβάνει την επιλεκτική αφαίρεση δυσλειτουργικών ή περιττών μιτοχονδρίων για τη διατήρηση της κυτταρικής υγείας. Αυτή η διαδικασία

αποτρέπει τη συσσώρευση κατεστραμμένων μιτοχονδρίων, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε μειωμένη παραγωγή ATP και στην απελευθέρωση επιβλαβών δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS).

Ένα από τα βασικά γονίδια στη μιτοφαγία είναι το PINK1 (PTEN-induced kinase 1), μια πρωτεΐνη που εντοπίζεται στην εξωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου. Όταν τα μιτοχόνδρια είναι υγιή, το PINK1 εισάγεται γρήγορα και αποικοδομείται μέσα στα μιτοχόνδρια. Ωστόσο, παρουσία κατεστραμμένων μιτοχονδρίων, η συσσώρευση του PINK1 εμφανίζεται στην εξωτερική τους μεμβράνη, χρησιμεύοντας ως σήμα για τη στρατολόγηση μιας άλλης πρωτεΐνης, της Parkin. Το Parkin, μια λιγάση ουβικιτίνης E3, συνδέει στα κατεστραμμένα μιτοχόνδρια αλυσίδες ουβικιτίνης, επισημαίνοντάς τα για αποικοδόμηση [112].

Η μιτοχονδριακή βιογένεση είναι η διαδικασία με την οποία τα κύτταρα δημιουργούν νέα μιτοχόνδρια για να καλύψουν τις αυξημένες ενεργειακές απαιτήσεις ή να αντικαταστήσουν τις δυσλειτουργικές. Αυτή η περίπλοκη διαδικασία περιλαμβάνει τη συντονισμένη σύνθεση μιτοχονδριακού DNA (mtDNA), πρωτεϊνών και λιπιδίων. Ο βασικός ρυθμιστής της μιτοχονδριακής βιογένεσης είναι ο peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (PGC-1α), ένας μεταγραφικός συνενεργοποιητής που αλληλεπιδρά με διάφορους μεταγραφικούς παράγοντες και ενισχύει την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τη μιτοχονδριακή λειτουργία [113].

Κατά τη διάρκεια περιόδων αυξημένης ζήτησης ενέργειας, όπως η άσκηση, το PGC-1α συντονίζει την ανοδική ρύθμιση των μιτοχονδριακών γονιδίων που κωδικοποιούνται από πυρήνα, συμπεριλαμβανομένων εκείνων που εμπλέκονται στην οξειδωτική φωσφορυλίωση και τη μιτοχονδριακή δυναμική.

Η μιτοχονδριακή βιογένεση είναι στενά συνδεδεμένη με τις κυτταρικές οδούς σηματοδότησης. Η ενεργοποιημένη με AMP πρωτεϊνική κινάση (AMPK), ένας αισθητήρας της κυτταρικής ενεργειακής κατάστασης, ενεργοποιεί το PGC-1α ως απόκριση σε χαμηλά επίπεδα ATP, ξεκινώντας τη δημιουργία νέων μιτοχονδρίων για την αποκατάσταση της ενεργειακής ισορροπίας [113-114].

Η μιτοφαγία και η μιτοχονδριακή βιογένεση είναι αλληλένδετες διαδικασίες που λειτουργούν αρμονικά για τη διατήρηση της κυτταρικής ενεργειακής ισορροπίας. Μια πρωτεΐνη, η DCT-1/NIX που βρίσκεται στην επιφάνεια των μιτοχονδρίων, είναι

αυτή που ρυθμίζει το συντονισμό των δύο παραπάνω διαδικασιών. Το NIX είναι ένα προ-αποπτωτικό γονίδιο που ρυθμίζει τη μιτοφαγία προκαλώντας αυτοφαγία, μια ενδοκυτταρική λειτουργία μέσω της οποίας τα κυτταροπλασματικά συστατικά παραδίδονται στο λυσόσωμα για να διασπαστούν και να χρησιμοποιηθούν αλλού ή να απεκκριθούν από το κύτταρο. Επίσης, παίζει σημαντικό ρόλο στη διαφοροποίηση και ωρίμανση των ερυθροκυττάρων και των λεμφοκυττάρων με τη διαδικασία της μιτοφαγίας με τη βοήθεια του ρυθμιστή του BNIP3 [115].

Η μιτοχονδριακή βιογένεση ρυθμίζεται από μια ποικιλία παραγόντων όπως PGC-1α, NRF-1 και TFAM [115]. Η συντονισμένη βιογένεση και η μιτοφαγία εξασφαλίζουν βιώσιμες μιτοχονδριακές λειτουργίες. Η ταυτόχρονη πρόκληση μιτοφαγίας και βιογένεσης αυξάνει τον ρυθμό ανανέωσης των μιτοχονδρίων και διασφαλίζει τη μιτοχονδριακή ομοιόσταση. Ενώ η μιτοφαγία εξαλείφει τα κατεστραμμένα μιτοχόνδρια για να αποτρέψει την κυτταρική βλάβη, η μιτοχονδριακή βιογένεση διασφαλίζει την αντικατάσταση των δυσλειτουργικών μιτοχονδρίων με υγιή. Διαταραχές σε αυτή τη λεπτή ισορροπία μπορεί να οδηγήσουν σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις [116].

Η υπερβολική μιτοφαγία μπορεί να οδηγήσει σε απώλεια λειτουργικών μιτοχονδρίων, συμβάλλοντας σε ενεργειακά ελλείμματα, ενώ η μειωμένη μιτοφαγία μπορεί να οδηγήσει στη συσσώρευση κατεστραμμένων μιτοχονδρίων, οδηγώντας σε οξειδωτικό στρες και κυτταρική δυσλειτουργία. Ομοίως, η μη ρυθμισμένη μιτοχονδριακή βιογένεση μπορεί να οδηγήσει σε ανισορροπία μεταξύ παραγωγής και ζήτησης ενέργειας [117 - 118].

Συμπερασματικά, οι διαδικασίες της μιτοφαγίας και της μιτοχονδριακής βιογένεσης είναι απαραίτητες για την κυτταρική ζωτικότητα. Αυτοί οι μηχανισμοί διασφαλίζουν την ποιότητα και την ποσότητα των μιτοχονδρίων, διατηρώντας τη βέλτιστη παραγωγή ενέργειας και αποτρέποντας τη συσσώρευση επιβλαβών ενεργών ειδών οξυγόνου. Η βαθύτερη κατανόηση αυτών των διεργασιών μπορεί να ανοίξει το δρόμο για νέες θεραπευτικές στρατηγικές που στοχεύουν διάφορες ασθένειες που συνδέονται με τη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία, όπως οι νευροεκφυλιστικές διαταραχές, ο καρκίνος και τα μεταβολικά σύνδρομα [118].

Πίνακας με τα βασικά γονίδια του μιτοχονδριακού γονιδιώματος και των γονιδίων της μιτοφαγίας

Κατηγορία	Γονίδιο	Λειτουργία
Μιτοχονδριακά γονίδια [119]	MT-ND1, MT-ND2, MT-ND3	Κωδικοποιούν υπομονάδες αφυδρογονάσης NADH (Σύμπλοκο I) στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων.
	MT-CO1, MT-CO2, MT-CO3	Κωδικοποιούν υπομονάδες της οξειδάσης του κυτοχρώματος c (Σύμπλοκο IV) στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων.
	MT-CYB	Κωδικοποιεί μια υπομονάδα του συμπλόκου του κυτοχρώματος b-c1 (Σύμπλεγμα III) στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων.
	MT-ATP6, MT-ATP8	Κωδικοποιούν υπομονάδες συνθάσης ATP (Σύμπλοκο V) που εμπλέκονται στην παραγωγή ATP.
Μιτοχονδριακό DNA (mtDNA) [119]	D-loop περιοχή	Μη κωδικοποιητική περιοχή σημαντική για την έναρξη της αντιγραφής του mtDNA.
	tRNA	Κωδικοποιεί αγγελιοφόρα μόρια RNA που είναι απαραίτητα για τη σύνθεση πρωτεϊνών στα μιτοχόνδρια.
	rRNA	Κωδικοποιεί μόρια ριβοσωμικού RNA απαραίτητα για τη σύνθεση των

		μιτοχονδριακών πρωτεϊνών.
Γονίδια μιτοφαγίας [120]	PINK1	Παρακολουθεί το δυναμικό της μιτοχονδριακής μεμβράνης και επισημαίνει τα κατεστραμμένα μιτοχόνδρια για αποικοδόμηση.
	Parkin	Η λιγάση της ουβικιτίνης που αλληλεπιδρά με το PINK1 για να επισημάνει τα κατεστραμμένα μιτοχόνδρια για μιτοφαγία.
	BNIP3 (BCL2)	Επάγει τη μιτοφαγία ως απόκριση στην υποξία και άλλες καταστάσεις στρες.
	FUNDC1	Μεσολαβεί στη μιτοφαγία υπό υποξικές συνθήκες.
	ULK1/2	Ξεκινά την αυτοφαγία και εμπλέκεται στον σχηματισμό αυτοφαγοσωμάτων, συμπεριλαμβανομένων εκείνων που καταπίνουν κατεστραμμένα μιτοχόνδρια.

### 3.7 Μεταβολές του ελεύθερου DNA στο ωοθυλακικό υγρό σε σχέση με την ηλικία της γυναίκας

#### 3.7.1 Ελεύθερο DNA σε σχέση με την ηλικία της γυναίκας

Οι μεταβολές που σχετίζονται με την ηλικία στο ελεύθερο DNA (cfDNA) στο ωοθυλακικό υγρό γυναικών που υποβάλλονται σε εξωσωματική γονιμοποίηση (IVF) έχουν αποτελέσει αντικείμενο ενδιαφέροντος στην αναπαραγωγική ιατρική. Η



κατανόηση αυτών των αλλαγών μπορεί να προσφέρει πολύτιμες γνώσεις για τον αντίκτυπο της ηλικίας μιας γυναίκας στη γονιμότητά της και στα αποτελέσματα της εξωσωματικής γονιμοποίησης [81].

Καθώς αυξάνεται η ηλικία της γυναίκας, το απόθεμα των ωοθηκών τους σε ωάρια, καθώς και η ποιότητα των ωαρίων μειώνεται. Αυτή η μείωση σχετίζεται με διάφορες αλλαγές στο μικροπεριβάλλον του ωοθυλακίου, συμπεριλαμβανομένων των αλλαγών στη σύνθεση του ωοθυλακικού υγρού. Μελέτες έχουν προτείνει ότι τα επίπεδα και τα χαρακτηριστικά του cfDNA στο ωοθυλακικό υγρό μπορεί να επηρεάζονται από την ηλικία της γυναίκας [121].

Τα επίπεδα του cfDNA στο ωοθυλακικό υγρό τείνουν να αυξάνονται με την ηλικία της γυναίκας. Αυτό πιθανότατα οφείλεται σε έναν συνδυασμό παραγόντων, συμπεριλαμβανομένου του υψηλότερου επιπολασμού της κυτταρικής απόπτωσης (κυτταρικού θανάτου) και των μειωμένων μηχανισμών επιδιόρθωσης του DNA στο μικροπεριβάλλον της γήρανσης των ωοθυλακίων [122-123].

Οι γυναίκες μεγαλύτερης ηλικίας (>35 χρόνων) μπορεί να έχουν υψηλότερη αναλογία κατακερματισμένου DNA στο ωοθυλακικό τους υγρό. Αυτό μπορεί να είναι ενδεικτικό της μειωμένης ποιότητας των ωαρίων, καθώς ο κατακερματισμός του DNA μπορεί να επηρεάσει τη γονιμοποίηση και την ανάπτυξη του εμβρύου [124].

Οι μεταβολές του μιτοχονδριακού DNA (mtDNA) παίζουν καθοριστικό ρόλο. Το μιτοχονδριακό DNA είναι ένα σημαντικό συστατικό του cfDNA στο ωοθυλακικό υγρό. Έχουν παρατηρηθεί αλλαγές στο mtDNA που σχετίζονται με την ηλικία, συμπεριλαμβανομένης της αύξησης του αριθμού αντιγράφων του mtDNA και των μεταλλάξεων. Αυτές οι αλλοιώσεις μπορεί να σχετίζονται με μειωμένη ποιότητα ωαρίων και μειωμένη μιτοχονδριακή λειτουργία, η οποία μπορεί να επηρεάσει τη βιωσιμότητα του εμβρύου [97].

Η γήρανση συχνά συνοδεύεται από αυξημένα επίπεδα φλεγμονής και οξειδωτικού στρες στο μικροπεριβάλλον των ωοθυλακίων. Αυτοί οι παράγοντες μπορούν να συμβάλουν στη βλάβη του DNA και στην απελευθέρωση του cfDNA, επηρεάζοντας δυνητικά την ποιότητα των ωαρίων [82].

Αρκετές μελέτες έχουν διερευνήσει τη σχέση μεταξύ των αλλαγών που σχετίζονται με την ηλικία στα αποτελέσματα του cfDNA και της εξωσωματικής

γονιμοποίησης. Υψηλότερα επίπεδα cfDNA και αυξημένος κατακερματισμός του DNA στο ωοθυλακικό υγρό έχουν συσχετιστεί με μειωμένη ποιότητα ωαρίων, χαμηλότερα ποσοστά γονιμοποίησης και έμβρυα κακής ποιότητας σε γυναίκες μεγαλύτερης ηλικίας. Κατά συνέπεια, η προχωρημένη ηλικία της μητέρας θεωρείται σημαντικός παράγοντας κινδύνου για αποτυχία της εξωσωματικής γονιμοποίησης [125].

Ενώ οι αλλαγές που σχετίζονται με την ηλικία στο cfDNA στο ωοθυλακικό υγρό αποτελούν αναδυόμενο τομέα έρευνας, έχουν τη δυνατότητα να συμβάλλουν στη λήψη κλινικών αποφάσεων στην εξωσωματική γονιμοποίηση. Οι ειδικοί στη γονιμότητα μπορούν να χρησιμοποιήσουν αυτές τις πληροφορίες για να συμβουλευθούν τις γυναίκες σχετικά με τις πιθανότητες επιτυχίας με την εξωσωματική γονιμοποίηση και να εξετάσουν εναλλακτικές προσεγγίσεις όπως η δωρεά ωαρίων ή ο προεμφυτευτικός γενετικός έλεγχος.

Συνοπτικά, αλλαγές στο cfDNA που σχετίζονται με την ηλικία στο ωοθυλακικό υγρό των γυναικών που υποβάλλονται σε εξωσωματική γονιμοποίηση αντανακλούν αλλαγές στο μικροπεριβάλλον των ωοθυλακίων που σχετίζονται με την προχωρημένη ηλικία. Αυτές οι αλλαγές μπορεί να έχουν επιπτώσεις στην ποιότητα των ωαρίων, τη γονιμοποίηση και την ανάπτυξη του εμβρύου [126].

Ενώ απαιτείται περαιτέρω έρευνα για την πλήρη κατανόηση της κλινικής σημασίας αυτών των αλλαγών, η κατανόηση της σχέσης μεταξύ του cfDNA στο ωοθυλακικό υγρό και της ηλικίας μιας γυναίκας θα αποφέρει πολύτιμες γνώσεις για τις προκλήσεις που αντιμετωπίζουν οι γυναίκες της δεύτερης αναπαραγωγικής ηλικίας που αναζητούν θεραπείες γονιμοποίησης και μπορεί να καθοδηγούν εξατομικευμένες θεραπευτικές προσεγγίσεις για τη βελτιστοποίηση των αποτελεσμάτων της εξωσωματικής γονιμοποίησης. Η προσαρμογή των στρατηγικών θεραπείας με βάση τα μεμονωμένα χαρακτηριστικά του ωοθυλακικού υγρού θα μπορούσε να βοηθήσει στη βελτιστοποίηση των πιθανοτήτων επιτυχούς σύλληψης σε γυναίκες μεγαλύτερης ηλικίας.

Η ανάλυση του cfDNA στο ωοθυλακικό υγρό θα μπορούσε να χρησιμεύσει γενικά, ως μη επεμβατικό διαγνωστικό εργαλείο για την αξιολόγηση της ποιότητας των ωαρίων και την πρόβλεψη της επιτυχίας της εξωσωματικής γονιμοποίησης. Εάν διαπιστωθεί ισχυρή συσχέτιση μεταξύ του cfDNA και των αναπαραγωγικών

αποτελεσμάτων, θα μπορούσε ενδεχομένως να καθοδηγήσει τις αποφάσεις θεραπείας γονιμοποίησης, ειδικά στις γυναίκες και ειδικά σε αυτές της μεγαλύτερης ηλικίας [82].

### 3.8 Μεταβολές στον λόγο cf-mtDNA/cf-nDNA στο ωοθυλακικό υγρό σε σχέση με την ηλικία της γυναίκας

Η αναλογία του ελεύθερου μιτοχονδριακού DNA (cf-mtDNA) προς το ελεύθερο πυρηνικό DNA (cf-nDNA) ή λόγος cf-mtDNA/cf-nDNA, σε δείγματα ωοθυλακικού υγρού γυναικών που υποβάλλονται σε εξωσωματική γονιμοποίηση είναι μια ενδιαφέρουσα περιοχή έρευνας στην αναπαραγωγική ιατρική. Αυτή η αναλογία μπορεί να παρέχει πληροφορίες για την υγεία και τη λειτουργία των μιτοχονδρίων εντός του ωοκυττάρου και τη σχέση του με την ηλικία της γυναίκας.

Η έρευνα έχει δείξει ότι η αναλογία cf-mtDNA/cf-nDNA τείνει να αυξάνεται με την ηλικία της γυναίκας, γεγονός που αποδείχθηκε και σύμφωνα με την έρευνα μας ότι η αναλογία mtDNA/nDNA των ωοθυλακίων αυξάνεται με την ηλικία της γυναίκας [126]. Αυτό υποδηλώνει ότι οι γυναίκες της δεύτερης αναπαραγωγικής ηλικίας που υποβάλλονται σε εξωσωματική γονιμοποίηση μπορεί να έχουν υψηλότερη αναλογία μιτοχονδριακού DNA σε σχέση με το πυρηνικό DNA στο ωοθυλακικό τους υγρό. Αυτή η μετατόπιση μπορεί να είναι ενδεικτική των αλλαγών που σχετίζονται με την ηλικία στη μιτοχονδριακή λειτουργία.

Η γήρανση σχετίζεται με μείωση της μιτοχονδριακής λειτουργίας και αύξηση των μεταλλάξεων και διαγραφών του μιτοχονδριακού DNA. Καθώς μια γυναίκα μεγαλώνει, τα ωοκύτταρά της συσσωρεύουν αυτές τις μιτοχονδριακές ανωμαλίες, οι οποίες μπορούν να επηρεάσουν την παραγωγή ενέργειας και τη συνολική υγεία του ωαρίου [68].

Η αναλογία cf-mtDNA/cf-nDNA πιστεύεται ότι είναι ένας πιθανός δείκτης της ποιότητας των ωαρίων. Μια υψηλότερη αναλογία μπορεί να υποδηλώνει μειωμένη λειτουργία των μιτοχονδρίων, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε μειωμένη ποιότητα των ωαρίων και χαμηλότερες πιθανότητες επιτυχούς γονιμοποίησης και ανάπτυξης εμβρύου [127].

Η σχετιζόμενη με την ηλικία αύξηση της αναλογίας cf-mtDNA/cf-nDNA μπορεί να οφείλεται σε συνδυασμό παραγόντων, όπως η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία, μειωμένοι μηχανισμοί επιδιόρθωσης DNA και αυξημένο οξειδωτικό στρες στο μικροπεριβάλλον του ωοθυλακίου. Αυτοί οι παράγοντες μπορούν να συμβάλουν στη συσσώρευση ανωμαλιών του μιτοχονδριακού DNA. Μελέτες έχουν προτείνει ότι η αναλογία cf-mtDNA/cf-nDNA μπορεί να σχετίζεται με τα αποτελέσματα της εξωσωματικής γονιμοποίησης, ειδικά σε γυναίκες μεγαλύτερης ηλικίας. Οι υψηλότερες αναλογίες έχουν συνδεθεί με μειωμένα ποσοστά γονιμοποίησης, χαμηλότερη ποιότητα εμβρύου και μειωμένη δυνατότητα εμφύτευσης [128-129].

Η παρακολούθηση της αναλογίας cf-mtDNA/cf-nDNA σε δείγματα ωοθυλακικού υγρού μπορεί να προσφέρει έναν μη επεμβατικό τρόπο αξιολόγησης της μιτοχονδριακής υγείας και της ποιότητας των ωαρίων σε γυναίκες που υποβάλλονται σε εξωσωματική γονιμοποίηση, ειδικά σε μεγαλύτερες ηλικιακές ομάδες. Οι ειδικοί αναπαραγωγής μπορούν να χρησιμοποιήσουν αυτές τις πληροφορίες για να συμβουλέψουν τους ασθενείς σχετικά με τις πιθανότητες επιτυχίας τους με την εξωσωματική γονιμοποίηση και να εξετάσουν εξατομικευμένες στρατηγικές θεραπείας.

Μερικοί ερευνητές διερευνούν παρεμβάσεις που στοχεύουν στη βελτίωση της μιτοχονδριακής λειτουργίας στα ωοκύτταρα. Αυτές οι παρεμβάσεις θα μπορούσαν να περιλαμβάνουν θεραπείες με αντιοξειδωτικά ή μιτοχονδριακές θεραπείες για την αντιμετώπιση της σχετιζόμενης με την ηλικία μιτοχονδριακής δυσλειτουργία και δυνητικά βελτίωση των αποτελεσμάτων της εξωσωματικής γονιμοποίησης [130-132].

### 3.9 Μεταβολές στον αριθμό μιτοχονδριακών αντιγράφων (mtDNA relative copies number RCN) στο ωοθυλακικό υγρό σε σχέση με την ηλικία της γυναίκας

Ο αριθμός αντιγράφων του μιτοχονδριακού DNA (mtDNA RCN) σε δείγματα ωοθυλακικού υγρού γυναικών που υποβάλλονται σε εξωσωματική γονιμοποίηση είναι μια άλλη πτυχή της αναπαραγωγικής βιολογίας που έχει μελετηθεί σε σχέση με τις αλλαγές που σχετίζονται με την ηλικία και τα αποτελέσματα γονιμότητας.

Η έρευνα έχει δείξει ότι υπάρχει συχνά μια σχετιζόμενη με την ηλικία αύξηση στον αριθμό των αντιγράφων mtDNA στο ωοθυλακικό υγρό των γυναικών που

υποβάλλονται σε εξωσωματική γονιμοποίηση. Αυτό σημαίνει ότι καθώς οι γυναίκες γερνούν, τείνουν να έχουν περισσότερα αντίγραφα του μιτοχονδριακού DNA στο ωοθυλακικό τους υγρό [133].

Η αύξηση του αριθμού αντιγράφων mtDNA με την ηλικία μπορεί να συνδεθεί με μιτοχονδριακή δυσλειτουργία. Με βάση τα ευρήματα της μελέτης μας, υπάρχει μια προφανής αντίφαση σχετικά με το γεγονός ότι ο αριθμός των μιτοχονδρίων έχει πράγματι μειωθεί [134-135].

Επίσης βρήκαμε ότι το επίπεδο αναλογίας cf-mtDNA/cf-nDNA σε δείγματα ωοθυλακικού υγρού ήταν υψηλότερο στις γυναίκες, οι οποίες είχαν επίσης τα υψηλότερα ποσοστά επιτυχούς εξωσωματικής γονιμοποίησης. Η σχετική αναλογία cf-mtDNA προς περιεχόμενο cf-nDNA στο ανθρώπινο ωοθυλακικό υγρό συσχετίστηκε θετικά με την ηλικία και το δυναμικό εμφύτευσης μόνο για γυναίκες χωρίς ειδική αναπαραγωγική παθολογία αλλά όχι μεταξύ εκείνων με PCOS [126].

Καθώς οι γυναίκες μεγαλώνουν, η λειτουργία των μιτοχονδρίων τείνει να μειώνεται και τα μιτοχόνδρια μπορεί να αντισταθμίσουν την αντιγραφή του DNA τους. Αυτή η αύξηση στον αριθμό αντιγράφων του mtDNA μπορεί να αντανακλά μια προσπάθεια διατήρησης της μιτοχονδριακής λειτουργίας ενόψει των στρεσογόνων παραγόντων που σχετίζονται με την ηλικία [136].

Ο αριθμός αντιγράφου mtDNA μπορεί να είναι ένας πιθανός δείκτης της ποιότητας των ωαρίων. Ενώ κάποια αύξηση στον αριθμό των αντιγράφων του mtDNA μπορεί να είναι ένας αντισταθμιστικός μηχανισμός, τα υπερβολικά υψηλά επίπεδα μπορεί να είναι ενδεικτικά της μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας και της μειωμένης ποιότητας των ωαρίων. Η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία μπορεί να επηρεάσει αρνητικά την παραγωγή ενέργειας και άλλες ζωτικές διεργασίες μέσα στο ωάριο [137].

Μελέτες έχουν διερευνήσει τη σχέση μεταξύ του αριθμού αντιγράφων mtDNA στο ωοθυλακικό υγρό και των αποτελεσμάτων της εξωσωματικής γονιμοποίησης, ειδικά σε γυναίκες μεγαλύτερης ηλικίας. Οι υψηλότεροι αριθμοί αντιγράφων mtDNA έχουν συσχετιστεί με μειωμένα ποσοστά γονιμοποίησης, φτωχότερη ποιότητα εμβρύου και μειωμένη δυνατότητα εμφύτευσης. Αυτά τα ευρήματα υποδηλώνουν ότι οι αυξημένοι αριθμοί αντιγράφων mtDNA μπορεί να είναι επιζήμιοι για την ποιότητα των ωαρίων και τη συνολική επιτυχία της εξωσωματικής γονιμοποίησης [133].

Η σχετιζόμενη με την ηλικία αύξηση του αριθμού αντιγράφων του mtDNA μπορεί να προκύψει από έναν συνδυασμό παραγόντων, συμπεριλαμβανομένης της μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας, του οξειδωτικού στρες και της βλάβης του DNA στο μικροπεριβάλλον του ωοθυλακίου. Αυτοί οι παράγοντες μπορούν να οδηγήσουν σε συσσώρευση ανωμαλιών του μιτοχονδριακού DNA [138].

Η παρακολούθηση του αριθμού αντιγράφων mtDNA σε δείγματα ωοθυλακικού υγρού προσφέρει έναν πιθανό μη επεμβατικό τρόπο αξιολόγησης της μιτοχονδριακής υγείας και της ποιότητας των ωαρίων σε γυναίκες που υποβάλλονται σε εξωσωματική γονιμοποίηση, ιδιαίτερα σε μεγαλύτερες ηλικιακές ομάδες. Οι ειδικοί στην αναπαραγωγή μπορούν να χρησιμοποιήσουν αυτές τις πληροφορίες για να συμβουλέψουν τους ασθενείς σχετικά με τις πιθανότητες επιτυχίας τους με την εξωσωματική γονιμοποίηση και να εξετάσουν εξατομικευμένες στρατηγικές θεραπείας [97].

Μερικοί ερευνητές διερευνούν παρεμβάσεις που στοχεύουν στη βελτίωση της μιτοχονδριακής λειτουργίας σε παλαιότερα ωοκύτταρα. Αυτές οι παρεμβάσεις μπορεί να περιλαμβάνουν θεραπείες με αντιοξειδωτικά ή μιτοχονδριακές θεραπείες για τον μετριασμό της σχετιζόμενης με την ηλικία μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και πιθανή βελτίωση των αποτελεσμάτων της εξωσωματικής γονιμοποίησης [65, 132].

## cfDNA , αναλογία cf-mtDNA/cf-nDNA και ο αριθμός των αντιγράφων cf-mtDNA μεταξύ των γυναικών με PCOS

Όπως περιγράφηκε πιο πάνω, το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών (PCOS) είναι μια συχνή ενδοκρινική διαταραχή που επηρεάζει γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας και σχετίζεται με διάφορες ορμονικές και μεταβολικές διαταραχές. Αρκετές μελέτες έχουν διερευνήσει το ελεύθερο DNA (cfDNA), την αναλογία του ελεύθερου μιτοχονδριακού DNA (cf-mtDNA) προς το ελεύθερο πυρηνικό DNA (cf-nDNA) και τον αριθμό αντιγράφων του μιτοχονδριακού DNA (mtDNA) σε γυναίκες με PCOS.

### cfDNA σε γυναίκες με PCOS:

Οι γυναίκες με PCOS συχνά εμφανίζουν αυξημένα επίπεδα cfDNA στο αίμα τους, πιθανώς λόγω αυξημένου οξειδωτικού στρες, φλεγμονής και μεταβολικών ανωμαλιών που σχετίζονται με αυτήν την ενδοκρινολογική πάθηση. Τα αυξημένα επίπεδα cfDNA μπορεί να αντικατοπτρίζουν την υποκείμενη συστηματική δυσλειτουργία και να συμβάλλουν σε επιπλοκές που σχετίζονται με το PCOS, όπως η αντίσταση στην ινσουλίνη και οι καρδιαγγειακοί κίνδυνοι [139].

### Αναλογία cf-mtDNA/cf-nDNA σε PCOS:

Ορισμένες μελέτες έχουν διερευνήσει την αναλογία cf-mtDNA/cf-nDNA σε γυναίκες με PCOS. Μια αυξημένη αναλογία μπορεί να υποδηλώνει μιτοχονδριακή δυσλειτουργία, καθώς υποδηλώνει σχετικά υψηλότερη αναλογία μιτοχονδριακού DNA σε σύγκριση με το πυρηνικό DNA. Η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία στο PCOS μπορεί να επηρεάσει τον ενεργειακό μεταβολισμό και μπορεί να συμβάλει στην αντίσταση στην ινσουλίνη, η οποία είναι χαρακτηριστικό γνώρισμα της πάθησης [140-141].

### Αριθμός αντιγράφων mtDNA στο PCOS:

Το PCOS έχει συσχετιστεί με αλλαγές στον αριθμό αντιγράφων του mtDNA, αν και τα ευρήματα δεν ήταν ξεκάθαρα. Ορισμένες μελέτες αναφέρουν αύξηση του αριθμού αντιγράφων mtDNA, ενώ άλλες υποδηλώνουν μείωση ή καμία σημαντική αλλαγή. Η μεταβλητότητα στον αριθμό αντιγράφων mtDNA στο PCOS μπορεί να αντανακλά την ετερογένεια της πάθησης, με διαφορετικούς υποτύπους και φαινότυπους να επιδεικνύουν διαφορετικά μεταβολικά προφίλ [58, 126, 141].



## Δείκτες για γυναίκες με PCOS

Οι σχέσεις μεταξύ του cfDNA, της αναλογίας cf-mtDNA/cf-nDNA και του αριθμού αντιγράφων mtDNA στο PCOS είναι πολύπλοκες και δεν είναι πλήρως κατανοητές. Αυτές οι παράμετροι μπορεί να χρησιμεύσουν ως δείκτες της μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας και του οξειδωτικού στρες, που πιστεύεται ότι παίζουν ρόλο στην παθογένεση του PCOS. Η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία μπορεί να συμβάλει στην αντίσταση στην ινσουλίνη, στον μεταβολισμό της γλυκόζης και στη διαταραχή της λειτουργίας των ωοθηκών που παρατηρείται στο PCOS. Απαιτείται περαιτέρω έρευνα για τον προσδιορισμό της κλινικής σημασίας αυτών των βιοδεικτών στη διάγνωση, την πρόγνωση και τη θεραπεία του PCOS [142-143].

Η κατανόηση του cfDNA, της αναλογίας cf-mtDNA/cf-nDNA και του αριθμού αντιγράφων mtDNA στο PCOS μπορεί να επιτρέψει πιο εξατομικευμένες προσεγγίσεις στη διάγνωση και τη θεραπεία. Η προσαρμογή των παρεμβάσεων για την αντιμετώπιση της μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας και του οξειδωτικού στρες θα μπορούσε ενδεχομένως να βελτιώσει τα μεταβολικά αποτελέσματα και την αναπαραγωγική υγεία σε γυναίκες με PCOS.

### 3.10 Σχέση μεταξύ των επιπέδων FSH, AMH και cfDNA σε γυναίκες με PCOS και non PCOS

Το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών (PCOS) μπορεί να προκαλέσει διαταραχές και στα επίπεδα διαφόρων ορμονών, συμπεριλαμβανομένης της ωοθυλακιοτρόπου ορμόνης (FSH), της ορμόνης αντι-Müllerian (AMH) και του cfDNA [144].

#### 3.10.1 FSH (θυλακιοτρόπος ορμόνη):

Σε γυναίκες με PCOS, τα επίπεδα FSH είναι συχνά φυσιολογικά ή ακόμη και χαμηλότερα από τα φυσιολογικά. Αυτό συμβαίνει επειδή το PCOS χαρακτηρίζεται από ανισορροπία στις ορμόνες του φύλου, κυρίως από αύξηση των ανδρογόνων (ανδρικές ορμόνες). Τα αυξημένα επίπεδα ανδρογόνων στο PCOS μπορούν να διαταράξουν τους φυσιολογικούς μηχανισμούς ανάδρασης που ρυθμίζουν την έκκριση FSH από την υπόφυση. Αυτή η διαταραχή μπορεί να οδηγήσει σε μειωμένα επίπεδα FSH. Τα

χαμηλότερα επίπεδα FSH στο PCOS μπορούν να συμβάλουν στην ανωορρηξία (έλλειψη ωορρηξίας) και στα χαρακτηριστικά συμπτώματα του PCOS, όπως οι ακανόνιστοι εμμηνορρυσιακοί κύκλοι [142].

Σε γυναίκες χωρίς PCOS, τα επίπεδα FSH τείνουν να ακολουθούν ένα πιο κανονικό μοτίβο κατά τη διάρκεια του εμμηνορρυσιακού κύκλου. Τα επίπεδα FSH αυξάνονται στην πρώιμη ωοθυλακική φάση για να διεγείρουν την ανάπτυξη των ωοθυλακίων και αυξάνονται λίγο πριν την ωορρηξία. Τα φυσιολογικά επίπεδα FSH είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη και την ωρίμανση των ωαρίων στις ωοθήκες και για τη διατήρηση ενός τακτικού εμμηνορρυσιακού κύκλου [145].

### 3.10.2 AMH (Anti-Müllerian ορμόνη)

Οι γυναίκες με PCOS έχουν συνήθως υψηλότερα επίπεδα AMH σε σύγκριση με τις γυναίκες χωρίς PCOS. Τα αυξημένα επίπεδα AMH είναι χαρακτηριστικό χαρακτηριστικό του PCOS. Αυτή η αύξηση της AMH συχνά σχετίζεται με αυξημένο αριθμό μικρών ωοθυλακίων, που είναι ένα από τα διαγνωστικά κριτήρια για το PCOS. Τα αυξημένα επίπεδα AMH στο PCOS πιστεύεται ότι προκύπτουν από την υπερβολική παραγωγή ανδρογόνων και την αντίσταση στην ινσουλίνη, η οποία μπορεί να διαταράξει την κανονική ρύθμιση της ανάπτυξης των ωοθυλακίων [142].

Σε γυναίκες χωρίς PCOS, τα επίπεδα AMH τείνουν να είναι χαμηλότερα και να ακολουθούν ένα πιο προβλέψιμο μοτίβο. Τα επίπεδα AMH μειώνονται καθώς οι γυναίκες γερνούν, αντανακλώντας μια φυσική μείωση του αποθεματικού των ωοθηκών σε ωάρια. Η AMH χρησιμοποιείται ως δείκτης για την αξιολόγηση του δυναμικού γονιμότητας μιας γυναίκας, με χαμηλότερα επίπεδα συνήθως υποδηλώνουν χαμηλότερο αποθεματικό ωοθηκών σε ωάρια και δυνητικά μειωμένη γονιμότητα [146].

### 3.10.3 cfDNA

Η σχέση μεταξύ των επιπέδων cfDNA και του PCOS είναι ένας τομέας συνεχιζόμενης έρευνας και δεν υπάρχει τεκμηριωμένη συσχέτιση σχετικά με το πώς τα επίπεδα cfDNA σχετίζονται συγκεκριμένα με το PCOS. Τα επίπεδα του cfDNA μπορεί να ποικίλλουν μεταξύ των ατόμων και επηρεάζονται από μια σειρά παραγόντων, όπως η ηλικία. Επομένως, τα επίπεδα cfDNA μπορεί να διαφέρουν ανάμεσα στους πληθυσμούς PCOS και στους μη PCOS. Τα αυξημένα επίπεδα cfDNA έχουν

συσχετιστεί με διάφορες ιατρικές καταστάσεις, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου, των αυτοάνοσων νοσημάτων και των επιπλοκών που σχετίζονται με την εγκυμοσύνη [147].

Ορισμένες μελέτες έχουν προτείνει ότι οι γυναίκες με PCOS μπορεί να έχουν διαφορετικά προφίλ cfDNA, πιθανώς να σχετίζονται με χρόνια φλεγμονή και αντίσταση στην ινσουλίνη, που συνήθως συνδέονται με το συγκεκριμένο σύνδρομο. Ωστόσο, απαιτείται περισσότερη έρευνα για την πλήρη κατανόηση αυτής της σχέσης [148].

Σε γυναίκες χωρίς PCOS, τα επίπεδα cfDNA μπορεί να ποικίλλουν λόγω διαφόρων παραγόντων, όπως η ηλικία, η κατάσταση της υγείας και η παρουσία οποιωνδήποτε υποκείμενων ιατρικών καταστάσεων [149].

#### 3.10.4 LH

Σε γυναίκες με PCOS, τα επίπεδα LH είναι συχνά αυξημένα σε σύγκριση με εκείνες χωρίς την πάθηση. Αυτή η αυξημένη LH είναι συνήθως αποτέλεσμα διαταραγμένων μηχανισμών ανάδρασης μεταξύ του υποθαλάμου, της υπόφυσης και των ωοθηκών. Στο PCOS, τα υψηλά επίπεδα ανδρογόνων και η αντίσταση στην ινσουλίνη μπορεί να οδηγήσουν σε αυξημένη παραγωγή LH από την υπόφυση. Αυτό, με τη σειρά του, μπορεί να διαταράξει τον κανονικό εμμηνορρυσιακό κύκλο και να συμβάλει στα χαρακτηριστικά συμπτώματα του PCOS, όπως ακανόνιστες περιόδους, ανωορρηξία και σχηματισμό κύστεων ωοθηκών. Τα αυξημένα επίπεδα LH σε γυναίκες με PCOS, μαζί με τα αυξημένα επίπεδα ανδρογόνων και τα διαταραγμένα επίπεδα της ωοθυλακιοτρόπου ορμόνης (FSH), συμβάλλουν στις ορμονικές ανισορροπίες και τα κλινικά χαρακτηριστικά του PCOS [150].

Σε γυναίκες χωρίς PCOS, τα επίπεδα LH τείνουν να ακολουθούν ένα πιο προβλέψιμο μοτίβο κατά τη διάρκεια του εμμηνορρυσιακού κύκλου. Τα επίπεδα LH αυξάνονται στη μέση του εμμηνορρυσιακού κύκλου, πυροδοτώντας την ωορρηξία. Μετά την ωορρηξία, τα επίπεδα LH μειώνονται. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι τα επίπεδα LH μπορεί να διαφέρουν μεταξύ των ατόμων και μπορεί να αλλάξουν με την ηλικία. Επηρεάζονται επίσης από παράγοντες όπως το άγχος, τα φάρμακα και ορισμένες ιατρικές καταστάσεις [151].

Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι το PCOS είναι μια περίπλοκη κατάσταση και η ακριβής αιτία και οι μηχανισμοί του δεν είναι πλήρως κατανοητοί. Οι ορμονικές ανισορροπίες στο PCOS μπορεί να οδηγήσουν σε μια σειρά συμπτωμάτων, συμπεριλαμβανομένων των ακανόνιστων εμμηνορυσιακών κύκλων, της στειρότητας και της ανάπτυξης κύστεων στις ωοθήκες.

Η σχέση μεταξύ των επιπέδων FSH, LH, AMH και cfDNA σε γυναίκες με PCOS είναι ένας ενεργός τομέας έρευνας και οι συνεχιζόμενες μελέτες μπορεί να παρέχουν περισσότερες πληροφορίες για αυτήν την περίπλοκη κατάσταση. Επιπλέον, μπορεί να συμβούν μεμονωμένες διακυμάνσεις στα επίπεδα ορμονών, γεγονός που καθιστά απαραίτητο για τους παρόχους υγειονομικής περίθαλψης να αξιολογούν το συγκεκριμένο ορμονικό προφίλ και το ιατρικό ιστορικό κάθε ασθενούς κατά τη διάγνωση και τη διαχείριση του PCOS.

Συμπερασματικά, η παρουσία και τα χαρακτηριστικά του ελεύθερου DNA στο ωοθυλακικό υγρό είναι μια ενδιαφέρουσα περιοχή έρευνας στην αναπαραγωγική ιατρική. Ενώ υπάρχουν στοιχεία που υποδηλώνουν πιθανή σχέση μεταξύ του cfDNA και της ηλικίας μιας γυναίκας στο πλαίσιο της γονιμότητας, απαιτείται περαιτέρω έρευνα για να αποσαφηνιστεί πλήρως αυτή η σχέση και η κλινική της σημασία.

Αυτή η συνεχιζόμενη έρευνα έχει τη δυνατότητα να βελτιώσει την κατανόησή μας για τη γυναικεία γονιμότητα, ειδικά στο πλαίσιο της προχωρημένης ηλικίας της μητέρας, και μπορεί να οδηγήσει σε πιο αποτελεσματικές θεραπείες γονιμοποίησης. Οι αλλαγές που σχετίζονται με την ηλικία στο cfDNA στο ωοθυλακικό υγρό γυναικών που υποβάλλονται σε εξωσωματική γονιμοποίηση αντανακλούν αλλαγές στο μικροπεριβάλλον του ωοθυλακίου που σχετίζονται με την προχωρημένη ηλικία.

Αυτές οι αλλαγές μπορεί να έχουν επιπτώσεις στην ποιότητα των ωαρίων, τη γονιμοποίηση και την ανάπτυξη του εμβρύου. Ενώ απαιτείται περαιτέρω έρευνα για την πλήρη κατανόηση της κλινικής σημασίας αυτών των αλλαγών, παρέχουν πολύτιμες γνώσεις για τις προκλήσεις που αντιμετωπίζουν οι ηλικιωμένες γυναίκες που αναζητούν θεραπείες γονιμοποίησης και μπορεί να καθοδηγούν εξατομικευμένες θεραπευτικές προσεγγίσεις για τη βελτιστοποίηση των αποτελεσμάτων της εξωσωματικής γονιμοποίησης.



## ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



## Σκοπός

Η εξωσωματική γονιμοποίηση (IVF) έχει φέρει επανάσταση στην αναπαραγωγική ιατρική, προσφέροντας ελπίδα σε αμέτρητα άτομα και ζευγάρια που αντιμετωπίζουν υπογονιμότητα. Είναι γνωστό ότι, στις σύγχρονες κοινωνίες η υπογονιμότητα είναι ένα σοβαρό πρόβλημα που επηρεάζει σημαντικό ποσοστό των νέων ζευγαριών που φτάνει το 15%. Από την έναρξή της στα τέλη της δεκαετίας του 1970, η εξωσωματική γονιμοποίηση έχει βοηθήσει εκατομμύρια ανθρώπους να πραγματοποιήσουν το όνειρό τους για την δημιουργία της δικής τους οικογένειας. Ωστόσο, παρά την επιτυχία της, η διαδικασία παραμένει πολύπλοκη και μεταβλητή, με τα ποσοστά επιτυχίας να επηρεάζονται από πληθώρα παραγόντων. Τα τελευταία χρόνια, υπάρχει αυξανόμενο ενδιαφέρον για τον εντοπισμό και τη χρήση βιοδεικτών για την ενίσχυση της επιτυχίας των διαδικασιών εξωσωματικής γονιμοποίησης.

Η επιτυχία της εξωσωματικής γονιμοποίησης συχνά μετριέται από το ποσοστό ζώντων γεννήσεων, το οποίο μπορεί να ποικίλλει ευρέως με βάση παράγοντες όπως η ηλικία της μητέρας, οι υποκείμενες ιατρικές παθήσεις και η ποιότητα του εμβρύου. Ενώ οι εξελίξεις στις τεχνολογίες υποβοηθούμενης αναπαραγωγής έχουν οδηγήσει σε βελτιωμένα ποσοστά επιτυχίας, το υψηλό κόστος της διαδικασίας, το σωματικό και συναισθηματικό κόστος και τα μεταβλητά αποτελέσματα υπογραμμίζουν την ανάγκη για περαιτέρω βελτίωση.

Ενώ η εξωσωματική γονιμοποίηση έχει μεταμορφώσει τη θεραπεία υπογονιμότητας, η επιτυχία της παραμένει επηρεασμένη από διάφορους παράγοντες. Οι βιοδείκτες, οι οποίοι είναι μετρήσιμοι βιολογικοί δείκτες, έχουν τη δυνατότητα να μεταμορφώσουν το τοπίο της εξωσωματικής γονιμοποίησης καθώς προσφέρουν μια ευκαιρία ενίσχυσης της αποτελεσματικότητας της εξωσωματικής γονιμοποίησης. Επί του παρόντος, οι κύριοι δείκτες που χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση της βιωσιμότητας του εμβρύου περιλαμβάνουν τη μορφολογία του εμβρύου (σχήμα και εμφάνιση) και την παρουσία ενός φυσιολογικού χρωμοσωμικού συμπληρώματος. Ωστόσο, αυτοί οι δείκτες έχουν περιορισμούς. Η μορφολογική αξιολόγηση είναι υποκειμενική και ακόμη και τα έμβρυα με καλά οπτικά χαρακτηριστικά μπορεί να έχουν γενετικές ανωμαλίες. Έτσι, ερευνητές και κλινικοί γιατροί οφείλουν να εξερευνήσουν εναλλακτικούς



βιοδείκτες που θα μπορούσαν να παρέχουν πιο ακριβείς γνώσεις σχετικά με τη βιωσιμότητα των εμβρύων.

Οι μιτοχονδριακοί δείκτες που σχετίζονται με την ηλικία μπορεί να διευκολύνουν την πρόγνωση των αποτελεσμάτων της τεχνητής αναπαραγωγικής τεχνολογίας. Σε αυτή την έρευνα, παρουσιάζουμε τη μελέτη μας σχετικά με την αναλογία cf-mtDNA/cf-nDNA, δηλαδή την ποσότητα μιτοχονδριακού DNA απαλλαγμένου από κύτταρα σε σχέση με πυρηνικό DNA χωρίς κύτταρα, στο ωοθυλακικό υγρό (FF) γυναικών που υποβάλλονται σε εξωσωματική γονιμοποίηση, με στόχο για δημιουργία μοριακού δακτυλικού αποτυπώματος της ποιότητας του ωαρίου.

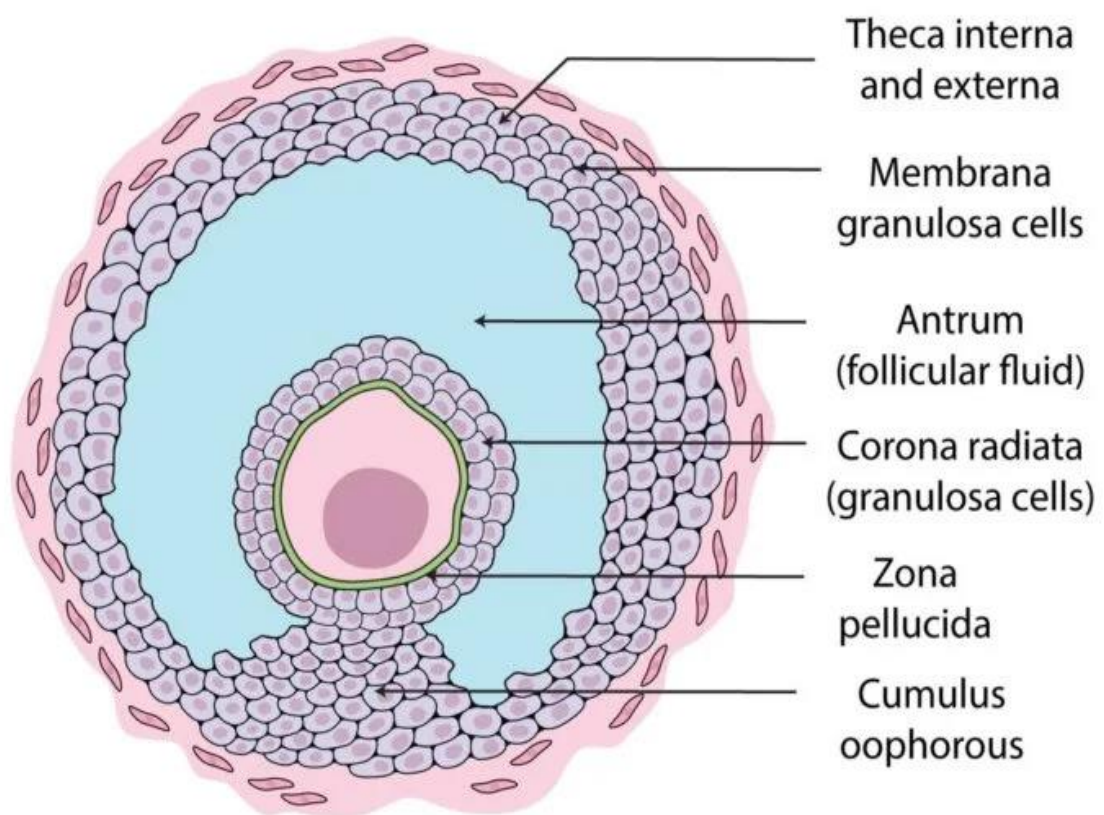
Οι τιμές αυτής της αναλογίας μετρήθηκαν και συγκρίθηκαν μεταξύ τριών ομάδων γυναικών (101 συνολικά): (Α) 31 γυναίκες με σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών (PCOS), (Β) 34 γυναίκες μικρότερες των 36 ετών και (Γ) 36 γυναίκες άνω των 35 ετών. Πραγματοποιήθηκε ποσοτική PCR σε πραγματικό χρόνο (qPCR) για να ποσοτικοποιηθεί η αναλογία χρησιμοποιώντας πυρηνικούς και μιτοχονδριακούς ειδικούς εκκινητές και αναλύθηκε για πιθανή συσχέτιση με την ηλικία και το ποσοστό εγκυμοσύνης.

Το βιολογικό υλικό που θα χρησιμοποιηθεί κατά την διάρκεια της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι το ωοθυλακικό υγρό. Το ωοθυλακικό υγρό συλλέγεται από γυναίκες που υπόκεινται σε διαδικασία υποβοηθούμενης αναπαραγωγής στην μονάδα Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής της Μαιευτικής και Γυναικολογικής κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων, η οποία είναι αδειοδοτημένη από το Υπουργείο Υγείας και λειτουργεί με πιστοποίηση κατά ISO. Στο ωοθυλακικό υγρό εκτός από κοκκώδη κύτταρα εμπεριέχονται και άφθονα λευκοκύτταρα και ερυθροκύτταρα, τα οποία θα απομακρυνθούν με κατάλληλες τεχνικές. Τέλος, το βιολογικό υλικό που θα χρησιμοποιηθεί στην παρούσα διατριβή δεν προορίζεται για την επίτευξη εγκυμοσύνης.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 : ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 4.1 Συλλογή και προέλευση βιολογικού υλικού

Μεταφέραμε τα δείγματα με το βιολογικό υλικό από την μονάδα Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής της Μαιευτικής και Γυναικολογικής κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων, στο εργαστήριο για την περαιτέρω επεξεργασία τους μέσα σε πάγο. Στην παρούσα διδακτορική διατριβή, το βιολογικό υλικό αποτελεί το ωοθυλακικό υγρό, το οποίο εμπεριέχει εκτός από συναθροίσεις κοκκωδών κυττάρων και άφθονα λευκοκύτταρα και ερυθροκύτταρα. Λόγω αυτής της ετερογένειας κυτταρικών πληθυσμών έχουν αναπτυχθεί ποικίλες μέθοδοι που αποσκοπούν στην απομόνωση επαρκούς αριθμού και καλής ποιότητας κοκκωδών κυττάρων. Κάθε μέθοδος έχει τα δικά της πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα, επειδή οι πληθυσμοί που απομονώνονται διαφέρουν ως προς την ποιότητα και ποσότητα των νουκλειικών οξέων καθώς και την καθαρότητα και ζωτικότητα των κοκκωδών κυττάρων [152].



Εικόνα 9: Δομή ωοθυλακίου

#### 4.2 Απομόνωση κοκκωδών κυττάρων με τη χρήση κυτταρικών φίλτρων (cell strainers)

Ένα σημαντικό πρόβλημα που παρουσιάζεται συνήθως κατά την ωοληψία είναι η ανάμειξη του ωοθυλακικού υγρού με αίμα με αποτέλεσμα να δημιουργείται η ανάγκη απομάκρυνσης των συστατικών του αίματος όπως ερυθροκύτταρα και λευκοκύτταρα. Με τη μέθοδο απομόνωσης κοκκωδών κυττάρων με τη χρήση φίλτρων, απομακρύνεται η πλειοψηφία των ανεπιθύμητων κυττάρων.

Η μεθοδολογία αποτελείται από τα εξής στάδια:

1. Το ωοθυλακικό υγρό που συλλέγεται, διέρχεται από φίλτρο με πόρους διαμέτρου 40 $\mu$ m έτσι ώστε να παραμείνουν στην επιφάνεια του φίλτρου τα συσσωματώματα των κοκκωδών κυττάρων και να περάσουν στο έκλουσμα τα ερυθροκύτταρα, τα λευκοκύτταρα αλλά και όσα άλλα κύτταρα μικρού μεγέθους περιέχονται στο υγρό. Σε αυτό το σημείο το έκλουσμα, που ως επί το πλείστον περιέχει ερυθροκύτταρα, φυλλάσσεται και συμβολίζεται ως RBC (Red Blood Cells)
2. Το φίλτρο καθαρίζεται με 10ml PBS
3. Ακολουθεί αντίστροφο πλύσιμο του φίλτρου (backwash) και τα συσσωματώματα κοκκωδών κυττάρων συλλέγονται σε ένα τρυβλίο 10cm.
4. Για να γίνουν μονήρη τα κοκκώδη κύτταρα ακολουθεί 10 φορές θραύση των κυτταρικών συσσωματωμάτων με μηχανικό τρόπο (trituration).
5. Αφού παρατηρηθεί στο μικροσκόπιο ότι τα κύτταρα είναι μονήρη το υγρό διέρχεται από φίλτρο διαμέτρου 70 $\mu$ m έτσι ώστε τα μονήρη κοκκώδη να περάσουν στο έκλουσμα και στην επιφάνεια του φίλτρου να μείνουν συσσωματώματα που δεν διαχωρίστηκαν αλλά και ανεπιθύμητα τμήματα κυτταρικού ιστού.
6. Πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στα 1.200 rpm για 5 λεπτά.
7. Απομακρύνεται το υπερκείμενο και το ίζημα επαναιωρείται σε 1ml PBS.
8. Τέλος ο αριθμός των κοκκωδών κυττάρων αλλά και των ερυθροκυττάρων και λευκοκυττάρων που περιέχονται στο έκλουσμα RBC υπολογίζεται με τη χρήση αιμοκυτταρόμετρου Neubauer.

### 4.3 Μέτρηση του αριθμού των κυττάρων με πλακίδιο Neubauer (αιμοκυτταρόμετρο)

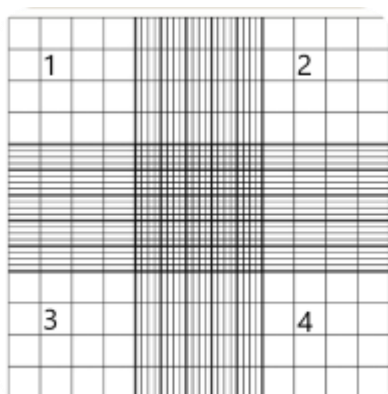
Το πλακίδιο Neubauer ή αιμοκυτταρόμετρο, είναι μια ειδικά κατασκευασμένη αντικειμενοφόρος πλάκα που έχει τη δική της καλυπτρίδα που κατασκευάστηκε για την καταμέτρηση των στερεών συστατικών του αίματος όπως τα ερυθρά αιμοσφαίρια, τα λευκοκύτταρα και τα αιμοπετάλια σε ορισμένο όγκο αίματος.

Το όργανο όμως αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για την καταμέτρηση άλλων μικροσκοπικών δομών ή κυττάρων που βρίσκονται σε κάποιο εναιώρημα.

Ο αριθμός των κοκκωδών κυττάρων που απομονώθηκαν από το ωοθυλακικό υγρό υπολογίστηκε με την συγκεκριμένη πλάκα Neubauer.

Η διαδικασία μέτρησης των κυττάρων είναι η εξής:

1. 10μl του κυτταρικού εναιωρήματος προστίθενται στην πλάκα
2. Γίνεται μέτρηση των κυττάρων που υπάρχουν στα 4 μεγάλα τετράγωνα τα οποία βρίσκονται στις 4 γωνίες της πλάκας. Τα τετράγωνα αυτά αποτελούνται από 16 μικρότερα τετράγωνα.
3. Υπολογίζεται το άθροισμα του αριθμού των κυττάρων που περιλαμβάνονται σε καθένα από τα 4 μεγάλα τετράγωνα.
4. Ο συνολικός αριθμός των κυττάρων προκύπτει αφού διαιρεθεί το άθροισμα δια του 4 και πολλαπλασιαστεί  $\times 10^4$ . Ο αριθμός που προκύπτει αποτελεί τον αριθμό των κυττάρων της καλλιέργειας ανά ml.



Εικόνα 10: Μέτρηση του αριθμού των κυττάρων με αιμοκυτταρόμετρο NEUBAUER

#### 4.4 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμερής (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) είναι ίσως η ευρύτερα χρησιμοποιούμενη μέθοδος της μοριακής βιολογίας, με αναρίθμητες εφαρμογές τόσο σε ερευνητικό όσο και σε διαγνωστικό επίπεδο. Η PCR είναι ένας απλός τρόπος πολλαπλασιασμού συγκεκριμένων τμημάτων του αρχικού γενετικού υλικού, έτσι ώστε να είναι εφικτή η περαιτέρω μελέτη του με διάφορες μεθόδους, όπως η αλληλούχηση, η πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες και η ηλεκτροφόρηση.

Πιο συγκεκριμένα, είναι μια τεχνική, η οποία επιτρέπει τη λογαριθμική ενζυμική ενίσχυση μικρών αλληλουχιών DNA (100-600 bp), χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα ένα μεγαλύτερο δίκλωνο μόριο DNA. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται δύο εκκινητές (primers), καθένας από τους οποίους είναι συμπληρωματικός προς μια συγκεκριμένη αλληλουχία μιας εκ των δύο αλυσίδων του DNA. Η αλληλουχία των εκκινητών επιμηκύνεται μέσω της DNA πολυμεράσης, με τελικό αποτέλεσμα την παραγωγή αντιγράφων της επιθυμητής αλληλουχίας.

Οι εκκινητές επαναχρησιμοποιούνται πολλές φορές για την περαιτέρω ενίσχυση της συγκεκριμένης αλληλουχίας από τα ήδη υπάρχοντα αντίγραφα, με αποτέλεσμα την λογαριθμική αύξηση των αντιγράφων. Σε κάθε κύκλο της διαδικασίας ενίσχυσης, οι δύο κλώνοι της αλληλουχίας του DNA αποδιατάσσονται μέσω αύξησης της θερμοκρασίας. Ακολουθεί μείωση της θερμοκρασίας για την πρόσδεση των εκκινητών και σύνθεση της αλληλουχίας μέσω της DNA πολυμερής [153].

Αφού ξεπαγώσουν όλα τα αντιδραστήρια και γίνει ανάδευσή τους, σε ένα σωληνάριο τύπου eppendorf του 1,5mL προστίθενται τα παρακάτω αντιδραστήρια, εκτός από το template DNA. Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 1) φαίνεται η στοιχειομετρία της αντίδρασης PCR με ένζυμο Taq polymerase της Invitrogen σε τελικό όγκο αντίδρασης 25μl για την ανίχνευση ελεύθερου πυρηνικού DNA (cf-nDNA) και ελεύθερου μιτοχονδριακού DNA (cf-mtDNA). Οι παρακάτω συγκεντρώσεις αφορούν το Master Mix για μία αντίδραση.

Πίνακας 1 : Στοιχειομετρία για 1 αντίδραση PCR

	1x
H <sub>2</sub> O	14.05μl
10x buffer	2.5 μl
dNTP's (2mM)	2.5 μl
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	0.75 μl
Primer F	0.5 μl
Primer R	0.5 μl
Taq Polymerase Invitrogen (5 unit/μl)	0.2 μl
Template	4 μl
Final Volume	25 μl

Ακολουθεί καλή ανάδευση του μείγματος και διαμοίρασή του κατάλληλου όγκου στα επιμέρους σωληνάρια (ο αριθμός τους εξαρτάται από τον αριθμό των δειγμάτων που πρόκειται να ενισχυθούν κάθε φορά). Προστίθεται το template cell free DNA. Σε κάθε ομάδα δειγμάτων προστίθεται και ένα δείγμα με template γενωμικό DNA σαν θετικός έλεγχος, με τη διαφορά ότι η ποσότητα του template γενωμικού DNA είναι 1μl.

Έπειτα, τα σωληνάρια τοποθετούνται στον θερμοκυκλοποιητή Veriti™ 96-Well Thermal Cycler, της Thermo Fisher Scientific σύμφωνα με τις παρακάτω συνθήκες, οι οποίες περιγράφονται και στον Πίνακα 2 :

## Χρόνοι- θερμοκρασίες- κύκλοι

Πιο συγκεκριμένα, τα στάδια μιας αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης αναλυτικά :

1. Αρχική μετουσίωση του DNA στους 94°C για 5 λεπτά
2. Η κάθε αντίδραση PCR πραγματοποιείται σε τρία στάδια, τα οποία επαναλαμβάνονται διαδοχικά:
  - I. Αποδιάταξη του DNA (*denaturation*): Οι δύο αλυσίδες του DNA διαχωρίζονται (αποδιατάσσονται) με θέρμανση σε θερμοκρασία 94° C για 45 sec.
  - II. Υβριδισμός εκκινήτων (*annealing*): Με μείωση της θερμοκρασίας στους 60°C για τους πυρηνικούς primers και στους 59°C για τους μιτοχονδριακούς primers για 30 sec, οι εκκινήτες υβριδίζονται στις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες στο εκμαγείο DNA.
  - III. Επιμήκυνση (*extension*): Για τη σύνθεση της νέας αλυσίδας αυξάνουμε τη θερμοκρασία στους 72°C για 1:30 min, τη βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της Ταq πολυμεράσης. Η πολυμεράση επιμηκώνει τους εκκινήτες εισάγοντας τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (Deoxynucleotide triphosphates, dNTPs) χρησιμοποιώντας τη συμπληρωματική αλληλουχία DNA ως εκμαγείο.

Τα παραπάνω στάδια επαναλαμβάνονται για 40 κύκλους και ακολουθούν :

3. Τελική επιμήκυνση στους 72°C για 10 λεπτά.
4. Αναμονή στους 4°C για ∞

Πίνακας 2: Συνθήκες PCR

Στάδια	Θερμοκρασία	Διάρκεια	Κύκλοι
Denaturation	94°C	5 min	
Annealing	94°C	45 sec	40 κύκλοι
	59°C και 60°C (για nDNA mtDNA αντίστοιχα)	30 sec	
	72°C	1.30 min	
Extension	72°C	10 min	
Final Hold	4°C	∞	

Η PCR εκτελείται στον θερμικό κυκλοποιητή (Veriti 96 well Thermal Cycler, appliedbiosystems by Thermo Fisher Scientific), συσκευή που φέρει θερμαινόμενη πλάκα που μπορεί να εναλλάσσει θερμοκρασίες με ταχύτητα και ακρίβεια.

Μετά το πέρας μιας PCR, ακολουθεί η ηλεκτροφόρηση που δίνει την εικόνα των αποτελεσμάτων της αντίδρασης. Η σύσταση του gel είναι 2% αγαρόζη σε διάλυμα TBE 1X και τα δείγματα τρέχουν σε συσκευή ηλεκτροφόρησης με TBE 1X, στα 80V για μία ώρα. Για τον προσδιορισμό του μεγέθους των προϊόντων PCR χρησιμοποιείται ο 100bp ladder της Thermo scientific ο οποίος έχει φάσμα ζωνών από 100bp μέχρι 2000bp, ανά 100bp.

#### 4.5 Ηλεκτροφόρηση

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα ή πηκτή αγαρόζης είναι μια σημαντική αναλυτική μέθοδος, που επιτρέπει τον διαχωρισμό μορίων DNA και πρωτεϊνών, με βάση το μέγεθός τους και εξαιτίας του ηλεκτρικού φορτίου τους.

Η αγαρόζη είναι ένας ουδέτερος πολυσακχαρίτης που προέρχεται από φύκη. Η πηκτή αγαρόζης ή το πήκτωμα αγαρόζης, όπως λέγεται εναλλακτικά, αποτελείται από ένα πυκνό δίκτυο πολυσακχαριτών αγαρόζης, οι αλυσίδες των οποίων, κατά το σχηματισμό του, δημιουργούν πόρους. Το μέγεθος των πόρων εξαρτάται από τη συγκέντρωση της αγαρόζης, και καθορίζει το μέγεθος των μορίων που περνούν από αυτούς. Υψηλή συγκέντρωση αγαρόζης έχει ως αποτέλεσμα μικρότερο μέγεθος των πόρων στο πήκτωμα, και επιτρέπει τη ροή μικρότερων μορίων DNA. Αντίθετα, μικρή συγκέντρωση αγαρόζης έχει ως αποτέλεσμα μεγάλο μέγεθος πόρων στο πήκτωμα, που επιτρέπουν τη διέλευση μεγαλύτερων μορίων DNA.

Η συσκευή ηλεκτροφόρησης διοχετεύει ηλεκτρικό ρεύμα μέσω ηλεκτροδίων στο πήκτωμα αγαρόζης, και έτσι τα μόρια DNA μπορούν να κινούνται από τον αρνητικό πόλο προς τον θετικό εξαιτίας του ηλεκτρικού φορτίου που φέρουν· είναι μόρια αρνητικά φορτισμένα λόγω των φωσφορικών ομάδων τους.

Η ταχύτητα με την οποία κινούνται τα μόρια DNA στο πήκτωμα εξαρτάται από το μήκος τους, το φορτίο και το σχήμα τους, και τα μικρότερα μόρια μετακινούνται ταχύτερα από τα μεγαλύτερα.

Τα μόρια διαφορετικού μεγέθους, ικανά όμως να περνούν από τους πόρους του πηκτώματος, διαχωρίζονται σε ζώνες και γίνονται ορατά με τη χρήση κατάλληλων χρωστικών κάτω από υπεριώδη ακτινοβολία. Οι χρωστικές αυτές προστίθενται στο

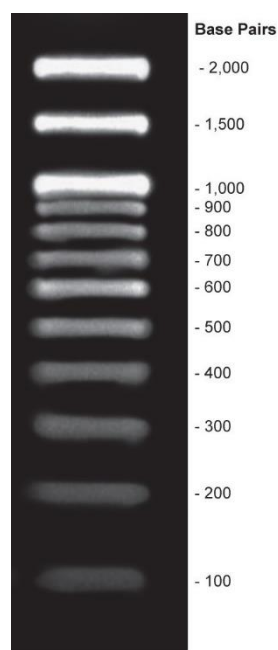


πήκτωμα αγαρόζης κατά την παρασκευή του και έχουν την ικανότητα να διεισδύουν στη διπλή αλυσίδα του DNA και να δεσμεύονται μεταξύ των βάσεων, καθιστώντας το έτσι ορατό στο υπεριώδες. Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες χρωστικές είναι το Βρωμιούχο Αιθίδιο (EtBr), Gel Red και το SYBRGreen.

Προκειμένου να καταστεί πιο εύκολη η παρατήρηση των βιομορίων, προτού αυτά φορτωθούν στο πήκτωμα αναμιγνύονται με ένα διάλυμα φόρτωσης που περιέχει τη χρωστική μπλε της βρωμοφαινόλης 0,4% w/v (Blue Juice Loading Buffer, Invitrogen). Το διάλυμα αυτό περιέχει και διάφορα άλατα τα οποία βοηθούν τα δείγματα που φορτώνονται να «καθίσουν» στα πηγαδάκια της πηκτής, δίνοντας τους επιπλέον βάρος. Αυτό οφείλεται συνήθως στη γλυκερόλη που περιέχουν τα διαλύματα αυτά.

Με την έκθεση του πηκτώματος στο υπεριώδες φως, τα τμήματα DNA παρουσιάζονται σε φωτεινές ζώνες και καθεμία αντιστοιχεί σε ένα τμήμα συγκεκριμένου μεγέθους. Τα μεγέθη αυτά προσδιορίζονται μετά από σύγκριση με μόρια DNA γνωστού μεγέθους, τους γνωστούς ως μάρτυρες μοριακών βαρών. Ανάλογα με το μέγεθος των προς ανίχνευση μορίων DNA, επιλέγεται η περιεκτικότητα σε αγαρόζη.

Προκειμένου να προσδιοριστεί το μέγεθος των βιομορίων χρησιμοποιείται και ένα πρότυπο δείγμα (ladder) το οποίο δίνει ένα συγκεκριμένο πρότυπο ζωνών στην πηκτή, με γνωστό το μέγεθος της κάθε ζώνης. Στην παρούσα εργασία, χρησιμοποιείται ο 100bp ladder της Thermo Fisher Scientific, με μικρότερη ζώνη τα 100 ζεύγη βάσεων (bp) και φτάνει έως τα 2000 ζεύγη βάσεων (bp) με ενδιάμεσες ζώνες ανά 100 ζεύγη.



Εικόνα 11 : Ζώνες ladder 100bp της Invitrogen (Thermo Fisher Scientific)

Αναλυτικά τα βήματα που ακολουθήθηκαν είναι τα εξής:

Ζυγίζονται 3gr αγαρόζης και τοποθετούνται σε κωνική φιάλη. Στην ίδια κωνική φιάλη προστίθενται 150mL διαλύματος TBE 1X (89mM Tris-HCl, 89mM boric acid, 2,5mM EDTA pH=8). Το διάλυμα τοποθετείται σε φούρνο μικροκυμάτων και θερμαίνεται έως ότου γίνει διαυγές. Έπειτα αφήνεται κάτω από τρεχούμενο νερό έως ότου πέσει θερμοκρασία του. Στο διάλυμα προστίθενται 7μL βρωμιούχου αιθιδίου συγκέντρωσης και τοποθετείται στην οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης OWL A1, της Thermo Fisher Scientific και το Gel Electrophoresis EV243 Power Supply, της Consort. Τοποθετούνται τα κατάλληλα χτενάκια για να δημιουργηθούν στο πήκτωμα τα πηγάδια και αφήνεται στο πάγκο έως ότου πήξει. Σε κάθε πηγάδι τοποθετούνται 7μL DNA και 3μL διαλύματος φόρτωσης (loading buffer). Κάθε φορά στο πρώτο πηγάδι τοποθετούνται 2,5μL από τον ladder. Τα δείγματα αφήνονται να τρέξουν στα 110V για 45-60 λεπτά. Τέλος, εκτίθενται σε ακτινοβολία UV και παρατηρούνται με το σύστημα φωτογραφίας EDAS 290 (Kodak).

#### 4.6 Real-time PCR ή qPCR

Η ποσοτική PCR (Quantitative PCR, QPCR) είναι μια γρήγορη, αξιόπιστη και ευαίσθητη μέθοδος, η οποία επιτρέπει την ποσοτικοποίηση συγκεκριμένων αλληλουχιών-στόχων. Υπάρχουν δύο είδη ποσοτικής PCR: η τελικού σημείου (end-point) και η πραγματικού χρόνου (Real-Time) PCR. Στην end-point PCR ο υπολογισμός του προϊόντος πραγματοποιείται στο τέλος της αντίδρασης, με εμφανές μειονέκτημα τη μείωση της αποδοτικότητας της αντίδρασης, λόγω της κατανάλωσης των αντιδρώντων και της συσσώρευσης αναστολέων, κάτι που δυσχεραίνει την αξιόπιστη ποσοτικοποίηση.

Αντίθετα, στη Real-Time PCR, η μέτρηση της ποσότητας του προϊόντος πραγματοποιείται καθ' όλη τη διάρκεια της αντίδρασης, μέσω της παρακολούθησης της αύξησης του φθορισμού κάποιας φθορίζουσας ουσίας. Στη συγκεκριμένη περίπτωση ο φθορισμός μετρείται σε κάθε κύκλο της PCR, με αποτέλεσμα να προκύπτει μια καμπύλη ενίσχυσης (amplification plot), γεγονός που επιτρέπει στον ερευνητή να παρακολουθεί όλη τη διαδικασία της αντίδρασης.

Η αύξηση του σήματος φθορισμού είναι ανάλογη του συντιθέμενου προϊόντος και σχετίζεται άμεσα με την ποσότητα του αρχικού υποστρώματος. Η καμπύλη ενίσχυσης διακρίνεται σε τρεις φάσεις: την εκθετική, τη γραμμική και τη φάση κορεσμού. Κατά την εκθετική φάση (exponential phase), σε κάθε κύκλο της αντίδρασης πραγματοποιείται ακριβής διπλασιασμός του προϊόντος, καθώς όλα τα απαραίτητα για την PCR συστατικά (π.χ. dNTPs, εκκινητές, πολυμεράση) βρίσκονται σε περίσσεια (100% αποδοτικότητα). Καθώς συνεχίζεται η αντίδραση, επέρχεται η γραμμική φάση κατά την οποία κάποια από τα αντιδραστήρια αρχίζουν να εξαντλούνται, ενώ παράλληλα συσσωρεύονται, σταδιακά, αναστολείς. Στη συγκεκριμένη φάση, η αντίδραση της ενίσχυσης επιβραδύνεται, καθώς μειώνεται η αποδοτικότητα της και τελικά σταματάει εντελώς, οπότε η καμπύλη φθορισμού φτάνει σε σημείο κορεσμού (plateau). Το σημείο κορεσμού διαφέρει μεταξύ των δειγμάτων και εξαρτάται από τις κινητικές των αντιδράσεών τους. Οι μετρήσεις για την ποσοτικοποίηση αφορούν την εκθετική φάση της αντίδρασης.

Σημαντική παράμετρο για την ποσοτικοποίηση αποτελεί η τιμή Ct (threshold cycle). Πρόκειται για τον αριθμό των κύκλων της αντίδρασης ενίσχυσης που απαιτούνται ώστε η τιμή του παρατηρούμενου φθορισμού να προσεγγίζει ένα συγκεκριμένο όριο (threshold). Η τιμή του ορίου αυτού ορίζεται πάνω από την αντίστοιχη του μη-ειδικού

σήματος (background). Η τιμή Ct είναι αντιστρόφως ανάλογη της αρχικής ποσότητας του υποστρώματος: όσο μικρότερη είναι η τιμή Ct τόσο υψηλότερη είναι η συγκέντρωση του αρχικού υποστρώματος [154].

Με την real time PCR πραγματοποιείται απόλυτη ποσοτικοποίηση. Στην απόλυτη ποσοτικοποίηση χρησιμοποιείται μια πρότυπη καμπύλη, η οποία κατασκευάζεται με βάση διαδοχικές αραιώσεις δείγματος DNA γνωστής συγκέντρωσης.

Η καμπύλη αυτή χρησιμοποιείται ως καμπύλη αναφοράς για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης άγνωστων δειγμάτων DNA's.

## 4.7 Εξαγωγή DNA

Για την εξαγωγή DNA χρησιμοποιήθηκε το PureLink Genomic DNA mini kit της Invitrogen (Thermo Fisher Scientific, USA) και το ωθυλακικό υγρό επαναδιαλύθηκε σε 50μl. Η εξαγωγή έγινε σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας.

Για να μεγιστοποιηθεί η απόδοση των αναλύσεων που βασίζονται σε cfDNA, πριν ξεκινήσουμε την πορεία εξαγωγής DNA, κάθε δείγμα ωθυλακικού υγρού φυγοκεντρήθηκε στα  $10.000 \times g$  για 15 λεπτά και το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε ένα νέο σωληνάριο τύπου erpendorf.

Πιο συγκεκριμένα η πορεία περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

- Αρχικά, τοποθετούμε σε ένα φιαλίδιο τύπου Eppendorf 200 μl ωθυλακικού υγρού , 20 μl Proteinase K και 20 μl Rnase A, ανάδευση σε Vortex και το αφήνουμε για 2 min σε θερμοκρασία δωματίου
- Στην συνέχεια προσθέτουμε 200 μl PureLink (Genomic Lysis/ Binding Buffer), ανάδευση με vortex και τα αφήνουμε 10 min στους 55°C
- Έπειτα προσθέτουμε 200μl αιθανόλης (96-100%), ανάδευση με vortex και το μεταφέρουμε σε στήλη. Κάνουμε φυγοκέντρηση την στήλη στα 10.000g για 1min και τοποθετούμε την στήλη σε καινούριο tube
- Προσθέτουμε 500 μl Wash Buffer 1, το τοποθετούμε για φυγοκέντρηση στα 10.000g για 1min και τοποθετούμε πάλι την στήλη σε καινούριο tube
- Προσθήκη 500 μl Wash Buffer 2, φυγοκέντρηση στις max στροφές για 3 min και τοποθετούμε την στήλη σε καινούριο φιαλίδιο τύπου erpendorf
- Τέλος, γίνεται προσθήκη 50μl PureLink (Genomic Elution Buffer),τελική φυγοκέντρηση στις max στροφές για 1 min. Απορρίπτουμε την στήλη και φυλάσσουμε το Eppendorf που περιέχει το DNA που κάναμε εξαγωγή στους για μελλοντική χρήση.

Το DNA το οποίο απομονώνεται από αυτή τη διαδικασία είναι το ελεύθερο DNA που βρίσκεται στο ωθυλακικό υγρό και καλείται cell free DNA (cfDNA).

Μετά το τέλος της εξαγωγής, για τα εκχυλισμένα cfDNA πραγματοποιείται μία φωτομέτρηση της συγκέντρωσης των δειγμάτων με το UV-Vis Spectrophotometer

Q5000, της Quawell, προκειμένου να προσδιοριστεί αν το δείγμα είναι καθαρό ή υπάρχουν τυχόν προσμίξεις και για προσδιοριστεί η συγκέντρωσή του.

Η καθαρότητα του εξαγόμενου DNA αξιολογήθηκε μέσω των τιμών απορρόφησης 230/280 και 260/280, όπου στα 230nm απορροφά το RNA, στα 260nm το DNA και στα 280nm οι πρωτεΐνες. Η μελέτη των παραπάνω λόγων γίνεται με τη βοήθεια του προγράμματος Q5000 V6.0.3. Το τελικό προϊόν μπορεί να αποθηκευτεί στους -20°C ή να χρησιμοποιηθεί αμέσως μετά.

## Πειραματικό μέρος

Συνολικά 101 γυναίκες που υποβλήθηκαν σε IVF/ICSI συμπεριλήφθηκαν στην παρούσα διδακτορική διατριβή. Τα δείγματα του ωοθυλακικού υγρού που μελετήθηκαν, ελήφθησαν από τη Μονάδα εξωσωματικής γονιμοποίησης της Μαιευτικής και Γυναικολογικής κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων.

Το ωοθυλακικό υγρό αρχικά, φυγοκεντρήθηκε στις 5000 rpm για 5 λεπτά για να απαλλαγεί από κοκκώδη κύτταρα, αιμοσφαίρια και οποιαδήποτε άλλα μικρά κύτταρα που περιείχονταν στο υγρό και μόνο το υπερκείμενο συλλέχθηκε. Για να μεγιστοποιηθεί η απόδοση των δοκιμασιών που βασίζονται σε cf-DNA, πριν από την εκχύλιση DNA, κάθε δείγμα ωοθυλακικού υγρού φυγοκεντρήθηκε στα 10.000 g για 15 λεπτά και το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέο σωληνάριο τύπου erpendorf.

Στην μελέτη, χρησιμοποιήθηκαν μόνο δείγματα ωοθυλακικού υγρού χωρίς να έχουν προσμίξεις αίματος από 31 γυναίκες με σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών (PCOS) και 69 χωρίς κάποια συγκεκριμένη αναπαραγωγική διαταραχή. Οι τελευταίες χωρίστηκαν σε δύο κατηγορίες ανάλογα με την ηλικία τους: γυναίκες της πρώτης αναπαραγωγικής ηλικίας έως 35 ετών και γυναίκες της δεύτερης αναπαραγωγικής ηλικίας, άνω των 35 ετών. Η σύμφωνη συγκατάθεση υπογράφηκε από κάθε συμμετέχοντα. Τα κριτήρια του Ρότερνταμ χρησιμοποιήθηκαν για τον εντοπισμό της νόσου PCOS [155].

Τα διαγνωστικά κριτήρια PCOS του Ρότερνταμ στις γυναίκες περιλαμβάνουν δύο από τα ακόλουθα τρία χαρακτηριστικά: διαταραχή της εμμήνου ρύσεως, υπερανδρογονισμό και μορφολογία πολυκυστικών ωοθηκών κατόπιν υπερηχογραφήματος [56]. Η ομάδα ελέγχου αποτελούνταν από γυναίκες ηλικίας έως 35 ετών, οι οποίες είχαν επιτυχημένη έκβαση εγκυμοσύνης. Η ηλικία των γυναικών που συμμετείχαν στην έρευνα ήταν μεταξύ 23-43 ετών. Συλλέχθηκαν κι άλλες πληροφορίες για τα χαρακτηριστικά κάθε συμμετέχουσας: εκτός από ηλικία, ο αριθμός ωαρίων, ο αριθμός κοκκωδών κυττάρων και ορμονολογικές διαταραχές ή παθολογίες όπως το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών (PCOS) [Πίνακας 2]. Πραγματοποιήθηκαν αρκετές εκτιμήσεις ορμονικών επιπέδων, όπως η ωοθυλακιοτρόπος ορμόνη [FSH], η ωχρινότροπος ορμόνη [LH] και η οιστραδιόλη [E2] την ημέρα 2 ή 3 του κύκλου. Η αντι-Mullerian ορμόνη [AMH] μετρήθηκε επίσης σε όλες τις γυναίκες. Όλες οι

ορμόνες υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας την τεχνική ELISA [Πίνακας 3]. Και οι 101 ασθενείς είχαν λάβει θεραπεία με ανταγωνιστή και διέγερση των ωοθηκών με ανασυνδυασμένη ανθρώπινη FSH (εμπορική ονομασία: Gonal F) ή ανθρώπινη εμμηνοπαυσιακή γοναδοτροπίνη (hMG) (εμπορική ονομασία: Menopur). Η απόκριση της διέγερσης των ωοθηκών παρακολούθηθηκε με μέτρηση της συγκέντρωσης 17-β οιστραδιόλης [E2].

**Πίνακας 3: Γενικά χαρακτηριστικά των γυναικών που συμμετείχαν στη μελέτη, συμπεριλαμβανομένου, τον αριθμό των ωοκυττάρων και τον αριθμό των κοκκωδών κυττάρων. SD, τυπική απόκλιση**

Ομάδα Γυναικών	Αριθμός δειγμάτων (n)	Μέσος όρος ηλικίας ± SD	Μέσος όρος ωαρίων ± SD	Αριθμός κοκκωδών κυττάρων
≤35	34	31.4 ± 3.5	10.7 ± 4.1	112.213
≥36	36	39.3 ± 2.1	10.1 ± 5.7	135.000
PCOS	31	32.0 ± 3.6	18.0 ± 8.1	199.298

**Πίνακας 4: Συγκεντρώσεις ορμονών σε κάθε ομάδα συμμετεχόντων. Κλινικά χαρακτηριστικά των γυναικών που συμμετείχαν στη μελέτη. Τα επίπεδα AMH, FSH και LH ορού αίματος προσδιορίστηκαν σε έναν κύκλο που προηγήθηκε της θεραπείας με εξωσωματική γονιμοποίηση. Τα επίπεδα οιστραδιόλης στον ορό του αίματος μετρήθηκαν 2 ημέρες πριν από την ανάκτηση των ωαρίων. SD, τυπική απόκλιση. AMH, ορμόνη anti Mullerian; FSH, ωοθυλακιοτρόπος ορμόνη. LH, ωχρινοτρόπος ορμόνη; Estr, οιστρογόνο.**

Ομάδα Γυναικών	AMH (ng/ml) ± SD	FSH ± SD	LH ± SD	Estr (pg/ml)
≤35	3.58 ± 4.2	6.11 ± 1.5	7.98 ± 7.7	2398.73
≥36	4.56 ± 6.9	7.16 ± 2.7	6.45 ± 11.6	2226.96
PCOS	10.58 ± 18.3	6.45 ± 1.1	14.65 ± 14.6	2901.20



Για την ανάλυση του cfDNA, χρησιμοποιήθηκαν τόσο πυρηνικοί όσο και ειδικοί για μιτοχόνδρια εκκινητές. Αναζητήσαμε κατάλληλα ζεύγη πυρηνικών και μιτοχονδριακών primers από το εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και τα ελέγξαμε αρχικά με βιοπληροφορική ανάλυση μέσω του προγράμματος blast.

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό του cf-nDNA, χρησιμοποιήσαμε τους πλέον κατάλληλους εκκινητές RPE 5'-ATAGGAAGCCAGAGAGAAGAGAGACT-3' και 5'-TCTATCTCTGCGGACTTTGAGCAT-3', (200 bp), που αντιστοιχούν στο γονίδιο αναφοράς της ανθρώπινης ρετινοειδούς ισομεροϋδρολάσης (RPE65) και για τον ποσοτικό προσδιορισμό cf-mtDNA χρησιμοποιήσαμε το ζεύγος εκκινητών που αντιστοιχεί σε ένα τμήμα του μιτοχονδριακά κωδικοποιημένου 12S RNA, ως γονίδιο αναφοράς μιτοχονδριακού DNA, όπως περιγράφεται στον Πίνακα και φέρει τις αλληλουχίες 5'-TAGAGGAGCCTGTTCTGTAATCG-3' και 5'-TAAGGGCTATCGTAGTTTTCTGG-3', (205bp).

Εφόσον οι εκκινητές αναφέρονται στον πίνακα, δεν χρειάζεται να γραφτούν και στο κείμενο.

Πίνακας 5: Αλληλουχίες ολιγονουκλεοτιδίων για τον προσδιορισμό Cf-mtDNA/cf-nDNA που χρησιμοποιούνται για την ποσοτική PCR σε πραγματικό χρόνο, το αντίστοιχο Tm και το μέγεθος της περιοχής στόχου.

Primer	Αλληλουχία εκκινητών (forward/reverse)	Μέγεθος προϊόντος PCR (ζεύγη βάσεων)	Tm (°c)
Πυρηνικό γονίδιο (RPE)	5'-ATAGGAAGCCAGAGAAGAGAGACT-3' 5'-TCTATCTCTGCGGACTTTGAGCAT-3'	200bp	60 °c
Μιτοχονδριακό γονίδιο	5'-TAGAGGAGCCTGTTCTGTAATCG-3' 5'-TAAGGGCTATCGTAGTTTTCTGG-3'	205bp	59 °c

Η αναλογία cf-mtDNA/cf-nDNA αξιολογήθηκε χρησιμοποιώντας ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (qPCR). Συνοπτικά, αναμίξαμε 0,02-0,03μg εκχυλισθέντος cf-DNA, 0,25 μl 10 μM από κάθε εκκινητή, και 5 μl SYBR Green Master Mix (PowerUp SYBR Green Master Mix, Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, USA) και 2,5 μl απεσταγμένου νερού, σε συνολικό όγκο 10 μl για κάθε αντίδραση, όπως περιγράφεται και στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 4). Η επανάληψη εκτελέστηκε σε περιστροφικό αναλυτή Corbett Rotor-Gene 3000 Real-Time (Corbett Research, Sydney, Australia) με τις ακόλουθες συνθήκες: 50°C για 2 λεπτά (melt 1), 95°C για 2 λεπτά (melt 2), ακολουθούμενοι από 40 κύκλους μετουσίωσης στους 95°C για 15 sec και στους 60°C για 1 λεπτό, οι οποίες φαίνονται αναλυτικά στον παρακάτω πίνακα.(Πίνακας 5). Κάθε δείγμα αναλύθηκε εις διπλούν. Στη συνέχεια, η αναλογία cf-mtDNA προς cf-nDNA υπολογίστηκε με τη μέθοδο ΔΔCt όπως περιγράφεται αναλυτικά παρακάτω και χρησιμοποιήθηκε ως μέτρο της περιεκτικότητας ελεύθερου mtDNA σε κάθε δείγμα ωοθυλακικού υγρού.

Αρχικά για κάθε ένα από τα ζευγάρια εκκινητών που θα χρησιμοποιηθεί χρειάζεται μία πρότυπη καμπύλη (standard curve) προκειμένου να προσδιοριστεί η επαναληψιμότητα και αποδοτικότητα των εκκινητών. Για να γίνει η πρότυπη καμπύλη επιλέξαμε ένα αρχικό δείγμα DNA που προέρχεται από εξαγωγή DNA από δείγμα αίματος αρχικής συγκέντρωσης 73,95 ng/μl και γίνονται διαδοχικές αραιώσεις σε 30 ng/μl, 15 ng/μl, 5 ng/μl, 1 ng/μl και 0,2 ng/μl. Αφού προσδιοριστεί η αποτελεσματικότητα των εκκινητών, μπορεί να γίνει η σχετική ποσοτικοποίηση των υπό μελέτη δειγμάτων.

Η qPCR πραγματοποιείται με τη χρήση του PowerUp SYBR Green Master Mix της appliedbiosystems. Σε ένα flat tube των 0,2μL τοποθετούνται οι παρακάτω ποσότητες

και τα αποτελέσματα που προκύπτουν μελετώνται με τη βοήθεια του προγράμματος Rotor Gene-SYBR Green.

Πίνακας 5 :Στοιχειομετρία για 1 αντίδραση real time PCR

SYBR Green Master Mix	5 $\mu$ l
Primer F	0,25 $\mu$ l
Primer R	0,25 $\mu$ l
Template	2 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	2,5 $\mu$ l
Final Volume	10 $\mu$ l

Πίνακας 6 : Συνθήκες Real time PCR

Βήμα	Θερμοκρασία	Χρόνος	Κύκλοι
Ενεργοποίηση UDG	50°C	2 λεπτά	Hold 1
Dual-Lock DNA πολυμεράση	95°C	2 λεπτά	Hold 2
Μετουσίωση του δίκλωνου DNA	95°C	15 δευτερόλεπτα	40 κύκλοι
Σύνδεση των εκκινητών/επέκταση	60°C	1 λεπτό	

## Μέθοδος 2<sup>- $\Delta\Delta$ CT</sup>

Η μέθοδος 2<sup>- $\Delta\Delta$ CT</sup> είναι ένας μαθηματικός τύπος που χρησιμοποιείται συνήθως στη μοριακή βιολογία και τη γενετική για την ανάλυση δεδομένων ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (qPCR). Είναι ένα θεμελιώδες εργαλείο στην ανάλυση γονιδιακής έκφρασης και είναι ιδιαίτερα χρήσιμο για τη σύγκριση των σχετικών επιπέδων έκφρασης ενός γονιδίου στόχου μεταξύ διαφορετικών πειραματικών συνθηκών ή δειγμάτων.

CT (Κύκλος Κατώφλι): Το CT είναι μια παράμετρος που λαμβάνεται από πειράματα qPCR. Αντιπροσωπεύει τον αριθμό των κύκλων PCR που απαιτούνται για να διασχίσει το σήμα φθορισμού ένα προκαθορισμένο όριο, υποδεικνύοντας ότι έχει ενισχυθεί σημαντική ποσότητα του DNA ή του RNA στόχου. Μια χαμηλότερη τιμή CT υποδηλώνει υψηλότερη αρχική ποσότητα του γονιδίου στόχου στο δείγμα, ενώ μια υψηλότερη τιμή CT υποδηλώνει χαμηλότερη αρχική ποσότητα του γονιδίου στόχου στο δείγμα.

$\Delta$ CT : Το  $\Delta$ CT είναι η διαφορά στις τιμές CT μεταξύ του γονιδίου στόχου και ενός γονιδίου αναφοράς (γνωστό και ως γονίδιο housekeeping) στο ίδιο δείγμα. Το γονίδιο αναφοράς είναι τυπικά ένα που είναι γνωστό ότι εκφράζεται σταθερά σε διαφορετικές πειραματικές συνθήκες. Το  $\Delta$ CT αντανακλά τη σχετική έκφραση του γονιδίου στόχου σε σύγκριση με το γονίδιο αναφοράς σε ένα μόνο δείγμα.

$\Delta\Delta$ CT : Το  $\Delta\Delta$ CT αντιπροσωπεύει τη σχετική αλλαγή στη γονιδιακή έκφραση μεταξύ δύο διαφορετικών συνθηκών ή δειγμάτων. Για να υπολογίσετε το  $\Delta\Delta$ CT, αφαιρείτε την τιμή  $\Delta$ CT της συνθήκης ελέγχου από την τιμή  $\Delta$ CT της πειραματικής συνθήκης ενδιαφέροντος.

Μαθηματικά εκφράζεται ως:  $\Delta\Delta$ CT =  $\Delta$ CT (πειραματική συνθήκη) -  $\Delta$ CT (συνθήκη ελέγχου)

Ο τύπος  $2^{-\Delta\Delta$ CT χρησιμοποιείται μας λέει πόσες φορές περισσότερο ή λιγότερο ένα γονίδιο εκφράζεται στην πειραματική συνθήκη σε σύγκριση με τη συνθήκη ελέγχου.

Εάν  $2^{-\Delta\Delta$ CT > 1, υποδηλώνει ότι το γονίδιο στόχος έχει ρυθμιστεί προς τα πάνω στην πειραματική συνθήκη σε σύγκριση με τον έλεγχο.

Εάν  $2^{-\Delta\Delta$ CT < 1, υποδηλώνει ότι το γονίδιο-στόχος είναι μειωμένο στην πειραματική συνθήκη σε σύγκριση με τον έλεγχο.

Εάν  $2^{-\Delta\Delta$ CT = 1, δεν υποδηλώνει σημαντική αλλαγή στη γονιδιακή έκφραση μεταξύ των δύο συνθηκών.

Οι δύο πιο συχνά χρησιμοποιούμενες μέθοδοι για την ανάλυση δεδομένων από πειράματα PCR σε πραγματικό χρόνο, είναι η απόλυτη ποσοτικοποίηση και η σχετική ποσοτικοποίηση. Η σχετική ποσοτικοποίηση, αυτή που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα της παρούσας εργασίας, είναι μία συγκριτική μέθοδος της γονιδιακής έκφρασης πραγματοποιείται χωρίς πρότυπη καμπύλη γονιδίου αναφοράς, αλλά με σύγκριση του σήματος που προκύπτει από την αντίδραση PCR διαφορετικών ομάδων δειγμάτων που μελετώνται για το ίδιο γονίδιο ενδιαφέροντος.

Η μέθοδος που χρησιμοποιείται, συνήθως, για την ανάλυση των διαφορών της έκφρασης που προκύπτουν από την qPCR είναι η μέθοδος  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

Η μέθοδος  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  είναι ένα πολύτιμο εργαλείο στην έρευνα της μοριακής βιολογίας επειδή επιτρέπει στους ερευνητές να ποσοτικοποιούν τις αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση σε σχέση με μια συνθήκη αναφοράς χωρίς την ανάγκη απόλυτης ποσοτικοποίησης. Αυτό το καθιστά ιδιαίτερα χρήσιμο για τη μελέτη των επιδράσεων πειραματικών θεραπειών, ασθενειών ή άλλων παραγόντων στα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης με σχετικό και τυποποιημένο τρόπο. Οι ερευνητές μπορούν να χρησιμοποιήσουν αυτή τη μέθοδο για να αποκτήσουν γνώσεις σχετικά με τη ρύθμιση των γονιδίων και να εντοπίσουν πιθανούς βιοδείκτες ή θεραπευτικούς στόχους [156-157].

Όσον αφορά τα πειράματα στην παρούσα διδακτορική διατριβή, για τη σχετική ποσοτικοποίηση, επίσης γνωστή ως μέθοδος  $\Delta\Delta Ct$ , αντιστοιχίσαμε μια ομάδα ελέγχου και χρησιμοποιήσαμε τις τιμές  $Ct$  κύκλου ως εξής:

(α)  $\Delta Ct$  για κάθε δείγμα όπως περιγράφεται παραπάνω, αφαιρώντας τη μέση τιμή  $Ct$  που αντιστοιχεί στο πυρηνικό γονίδιο από τη μέση τιμή  $Ct$  του μιτοχονδριακού γονιδίου:  $\Delta Ct = (mtDNA Ct - nDNA Ct)$ ,

β) η μέση τιμή  $\Delta Ct$  για την ομάδα ελέγχου, στην περίπτωση μας, η ομάδα ελέγχου αποτελούνταν από αναπαραγωγικά νεότερες γυναίκες ( $\leq 35$  ετών) που είχαν θετική έκβαση εγκυμοσύνης και χωρίς αναπαραγωγικές διαταραχές όπως το σύνδρομο των πολυκυστικών ωοθηκών

γ) το  $\Delta\Delta Ct$  για κάθε δείγμα αφαιρώντας το  $\Delta Ct$  της ομάδας ελέγχου από τη μέση  $\Delta Ct$  του δείγματος, δηλαδή  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$  δείγματος ενδιαφέροντος -  $\Delta Ct$  της ομάδας ελέγχου [157].

(δ) υπολογίσαμε την έκφραση χρησιμοποιώντας τον τύπο  $2^{-\Delta\Delta Ct}$

Οι τιμές  $\Delta\Delta Ct$  για κάθε δείγμα αφαιρώντας το  $\Delta Ct$  της ομάδας ελέγχου από τη μέση  $\Delta Ct$  του δείγματος, δηλαδή  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$  δείγματος ενδιαφέροντος μείον το  $\Delta Ct$  της ομάδας ελέγχου. Ως ομάδα ελέγχου, εξετάσαμε την ομάδα αναπαραγωγικά νεότερων γυναικών (ηλικίας  $\leq 35$  ετών) που είχαν θετική έκβαση εγκυμοσύνης και χωρίς αναπαραγωγικές διαταραχές. Οι αντίστοιχες τιμές (μέσος όρος  $\pm SD$ ) ήταν οι εξής: για γυναίκες  $\leq 35$ , χωρίς εγκυμοσύνη =  $5065,4 \pm 6414,7$  και με επιτυχή εγκυμοσύνη =  $3904,6 \pm 2863,4$  > 35, χωρίς εγκυμοσύνη =  $2159,8 \pm 6045,3$  και με επιτυχή

εγκυμοσύνη=  $540,2 \pm 440,7$ ; για PCOS, χωρίς εγκυμοσύνη =  $4084,2 \pm 4334,9$  και με επιτυχή εγκυμοσύνη:  $13344,3 \pm 19621,4$ .

## Στατιστική ανάλυση

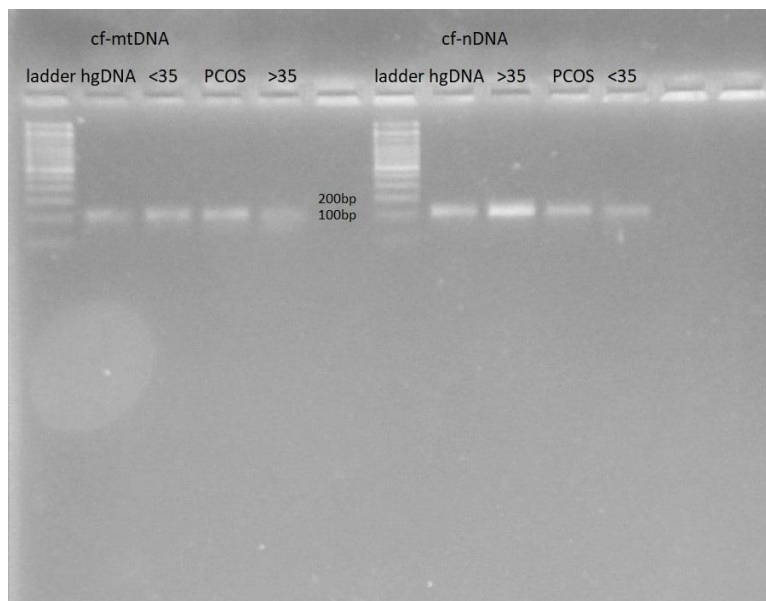
Για την ανάλυση των δεδομένων μεταξύ δύο ομάδων, χρησιμοποιήσαμε το Student's t-test και τα δεδομένα από τρεις ή περισσότερες ομάδες αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας ανάλυση διακύμανσης (ANOVA). Τα δεδομένα εξαγωγής, οι αριθμοί αντιγράφων mt-DNA και οι ρυθμοί  $\Delta C_t$  τοποθετήθηκαν σε υπολογιστικά φύλλα του Microsoft Excel για σχεδίαση γραφήματος.  $p < 0,05$  θεωρήθηκε στατιστικά σημαντική.

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 : ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 5.1 Ανίχνευση ελεύθερου πυρηνικού DNA (cf-nDNA) και ελεύθερου μιτοχονδριακού DNA (cf-mtDNA)

Αρχικά, προκειμένου να ελέγξουμε αν οι primers που σχεδιάστηκαν είναι αποτελεσματικοί και ανιχνεύουν πυρηνικό και μιτοχονδριακό DNA αντίστοιχα, χρησιμοποιήθηκαν όλα τα δείγματα του DNA που προηγουμένως είχαν εξαχθεί από το ωοθυλακικό υγρό των γυναικών σε μια αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με τους παραπάνω εκκινητές χρησιμοποιώντας συμβατή PCR. Κατόπιν, τα προϊόντα PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 2% με EtBr και διαπιστώσαμε επιτυχή λήψη προϊόντων cfDNA κοντά στα 200 bp (Εικόνα 1)



Εικόνα 12: Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτη αγαρόζης. Για ανίχνευση ελεύθερου πυρηνικού και μιτοχονδριακού DNA στα δείγματα των υπό μελέτη κατηγοριών των γυναικών καθώς και σε ένα δείγμα human genomic DNA (hgDNA) από εξαγωγή αίματος, το οποίο χρησιμοποιήσαμε σαν θετικό control. Επιτυχής λήψη προϊόντων κοντά στα 200 bp για όλα τα δείγματα.

### 5.2 Συσχέτιση λόγου cf-mtDNA/cf-nDNA με την ηλικία της γυναίκας

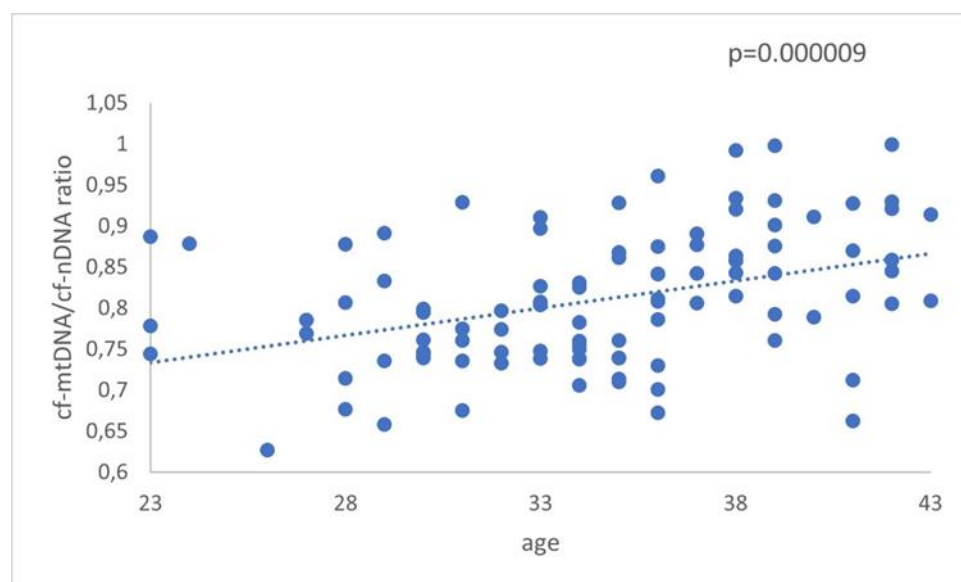
Αφού βεβαιωθήκαμε για την αποτελεσματικότητα των primers με την συμβατική PCR, χρησιμοποιώντας real time PCR (ή qPCR) εκτιμήθηκε η σχετική αναλογία cf-mtDNA



προς cf-nDNA σε σχέση με την ηλικία της γυναίκας. Πιο συγκεκριμένα, μια αρχική σύγκριση σε 57 δείγματα cfDNA από ωοθυλακικό υγρό που ελήφθησαν από μια ομάδα γυναικών μεταξύ 23-35 ετών (μέση ηλικία 31 ετών) και 44 δείγματα cfDNA από μια μεγαλύτερη ηλικιακή ομάδα με εύρος μεταξύ 36-43 ετών (μέση ηλικία 38,8 ετών) αναλύθηκε με qPCR σε πραγματικό χρόνο. Η ανάλυση δεδομένων οδήγησε σε μια στατιστικά σημαντική αύξηση ( $p = 0,000009$ ) στην ποσότητα της αναλογίας mtDNA/nDNA σε δείγματα ωοθυλακικού υγρού από τις μεγαλύτερες γυναίκες (Εικόνα 2). Οι σχετικές ποσότητες της αναλογίας mtDNA/nDNA για τις υπό διερεύνηση γυναικείες ηλικιακές ομάδες συνοψίζονται στον Πίνακα 4 και απεικονίζονται στο Σχήμα 2.

Πίνακας 7: Ο πίνακας εμφανίζει τις μέσες τιμές για την ηλικία και την αναλογία των δειγμάτων.

Ομάδα Γυναικών	Αριθμός δειγμάτων	Μέσος όρος ηλικίας $\pm$ SD	Μέσος όρος λόγου Cf-mtDNA/Cf-nDNA $\pm$ SD
$\leq 35$	57	$31.0 \pm 3.3$	$0.77 \pm 0.06$
$\geq 36$	44	$38.8 \pm 2.3$	$0.85 \pm 0.08$



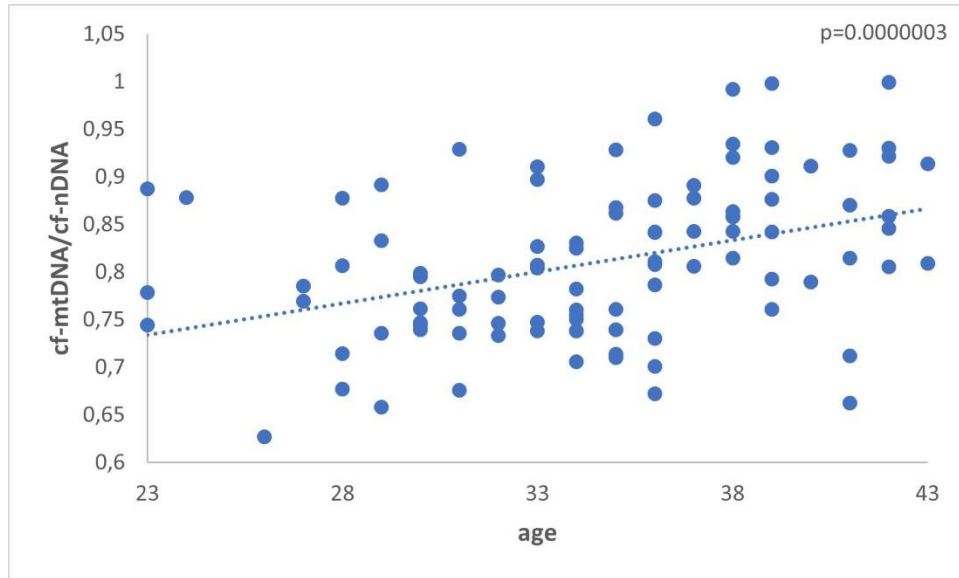
Εικόνα 13: Η σχέση μεταξύ της ποσότητας cf-mtDNA/cf-nDNA και της γυναικείας ηλικίας. Τα δεδομένα που ελήφθησαν κατά τη διάρκεια της ποσοτικής ανάλυσης PCR σε πραγματικό χρόνο δειγμάτων ωοθυλακικού υγρού που ελήφθησαν από γυναίκες που υποβάλλονταν σε εξωσωματική γονιμοποίηση έδειξαν μια στατιστικά σημαντική αύξηση ( $p = 0,000009$ ) στο περιεχόμενο της αναλογίας σχετικά με την προχωρημένη γυναικεία ηλικία.

### 5.3 Συσχέτιση λόγου cf-mtDNA/ cf-nDNA στις υπό εξέταση κατηγορίες

Σημαντική διαφορά ( $p = 0,0000003$ ) στα επίπεδα του λόγου cf-mtDNA προς cf-nDNA παρατηρήθηκε επίσης στις 3 κατηγορίες γυναικών που συγκρίθηκαν μεταξύ τους. Οι δύο πρώτες ομάδες περιλάμβαναν τις αναπαραγωγικά νεότερες ( $n=34$ ) και τις μεγαλύτερες ( $n=36$ ) γυναίκες, αντίστοιχα, και η τρίτη ομάδα περιλάμβανε γυναίκες με PCOS ( $n=31$ ). Για άλλη μια φορά, η ανάλυση δεδομένων έδειξε σαφώς μια στατιστικά σημαντική αύξηση στην αναλογία του λόγου cf-mtDNA προς cf-nDNA στα δείγματα ωοθυλακικού υγρού από τις αναπαραγωγικά μεγαλύτερες γυναίκες. Όσον αφορά τις γυναίκες με PCOS, δεν παρατηρήθηκε στατιστική διαφορά. Φάνηκε ότι όλα τα δείγματα ακολουθούν το πρότυπο ηλικίας που απεικονίζεται στο Σχήμα 2. Για τις γυναικείες ομάδες που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη, οι σχετικές ποσότητες αναλογίας mtDNA/nDNA παρατίθενται στον Πίνακα 5 και παρουσιάζονται στο Σχήμα 3 και στο Σχήμα 4.

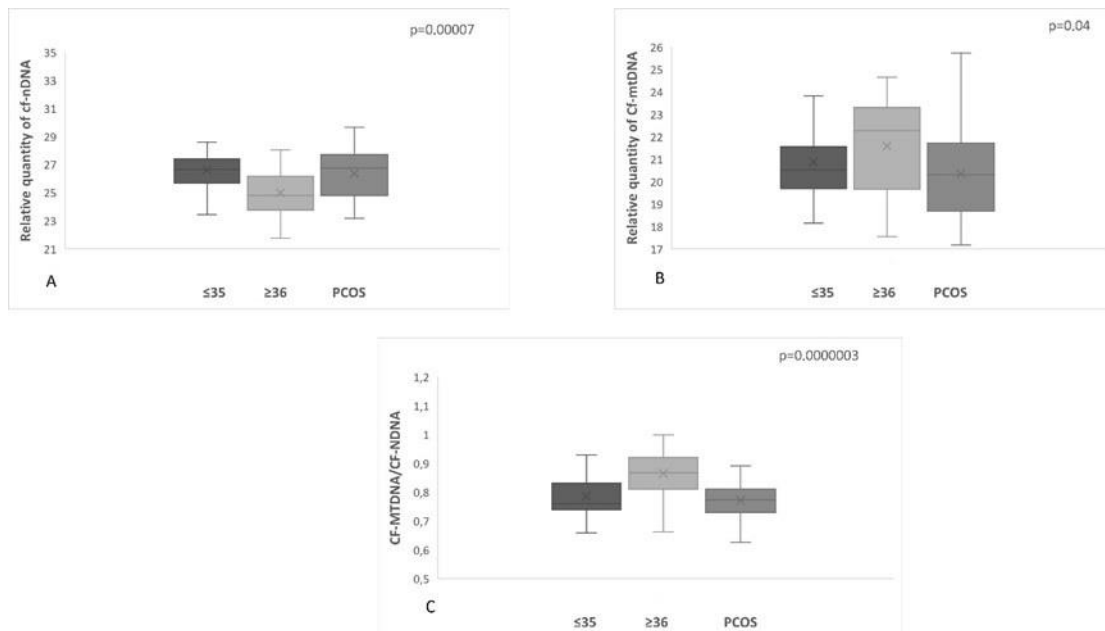
**Πίνακας 8: Ο πίνακας εμφανίζει τις μέσες τιμές για την ηλικία και την αναλογία των δειγμάτων σε κάθε ομάδα γυναικών.**

Ομάδα Γυναικών	Αριθμός δειγμάτων	Ηλικία $\pm$ SD	Λόγος Cf-mtDNA/ Cf-n DNA $\pm$ SD
$\leq 35$	34	$31.4 \pm 3.5$	$0.78 \pm 0.06$
$\geq 36$	36	$39.3 \pm 2.1$	$0.86 \pm 0.07$
PCOS	31	$32.0 \pm 3.6$	$0.77 \pm 0.06$



Εικόνα 14: Η σχέση μεταξύ της ποσότητας cf-mtDNA/cf-nDNA στις 3 ομάδες. Τα δεδομένα που ελήφθησαν κατά τη διάρκεια της ποσοτικής ανάλυσης PCR σε πραγματικό χρόνο δειγμάτων ωοθυλακικού υγρού που ελήφθησαν από γυναίκες που υποβλήθηκαν σε εξωσωματική γονιμοποίηση έδειξαν στατιστικά σημαντική αύξηση ( $p = 0,0000003$ ) στο επίπεδο της αναλογίας σε σύγκριση με την προχωρημένη ηλικία της γυναίκας. Συγκεκριμένα, η τιμή  $p$  μειώθηκε περαιτέρω σε γυναίκες μεγαλύτερης ηλικίας. Δεν αναφέρθηκε εμφανής διαφορά για γυναίκες με PCOS.

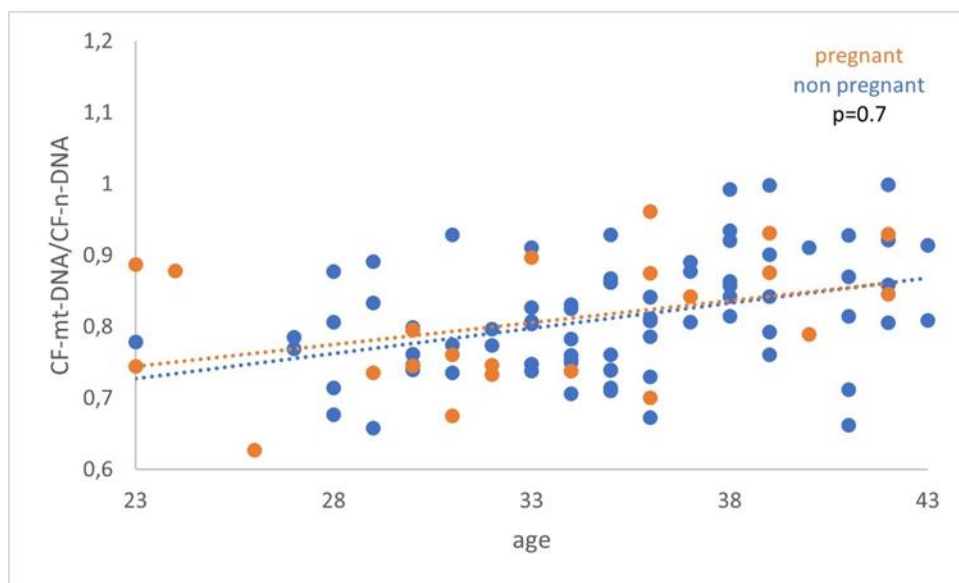
#### 5.4 cf-nDNA, cf-mtDNA, λόγος cf-mtDNA/cf-nDNA



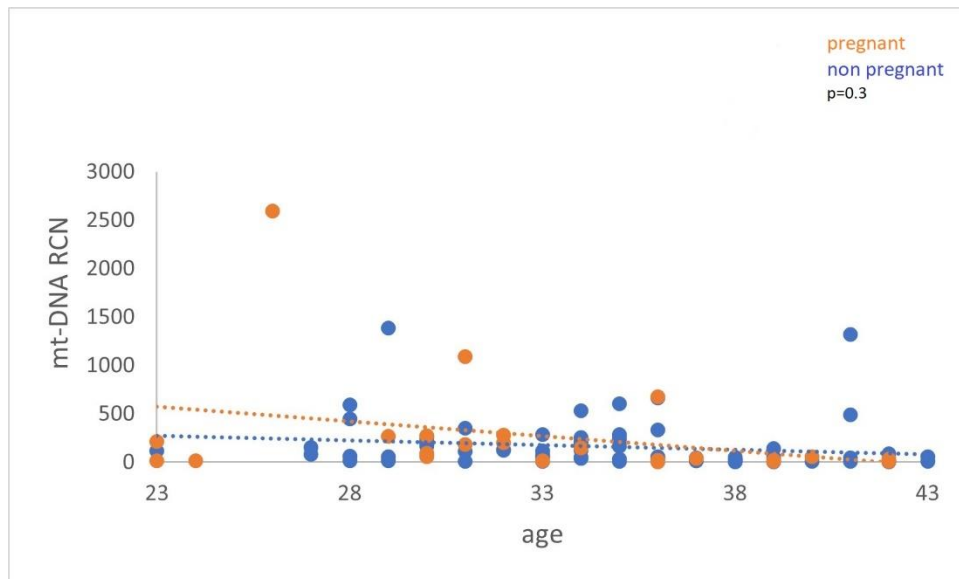
Εικόνα 15: Α. Η σχέση μεταξύ της ποσότητας cf-nDNA, στις υπό μελέτη κατηγορίες έδειξε στατιστικά σημαντική αύξηση ( $p = 0,00007$ ) σε γυναίκες με PCOS. Β. Η σχέση μεταξύ της ποσότητας cf-mtDNA στις υπό μελέτη κατηγορίες, έδειξε στατιστικά σημαντική αύξηση ( $p=0,04$ ) σε γυναίκες ηλικίας  $\geq 36$  ετών. C. Η σχέση μεταξύ της αναλογίας cf-mtDNA/cf-nDNA στις υπό μελέτη κατηγορίες, έδειξε στατιστικά σημαντική αύξηση ( $p=0,0000003$ ) στις αναπαραγωγικά ηλικιωμένες γυναίκες.

## 5.5 cf-mtDNA/cf-nDNA και mtDNA relative copy number μεταξύ γυναικών με επιτυχή ή όχι εγκυμοσύνη

Μια παρόμοια σύγκριση έγινε μεταξύ του λόγου cf-mtDNA/cf-nDNA και του σχετικού περιεχομένου cf-mtDNA relative copy number (RCN), γυναικών με επιτυχή ή όχι εγκυμοσύνη. Ωστόσο, η ανάλυση έδειξε μια μη στατιστικά σημαντική διαφορά ( $p=0,7$ ) ( $p=0,3$ ) (Εικόνα 5) (Εικόνα 6). Με πορτοκαλί χρώμα αναπαρίστανται οι γυναίκες που είχαν θετικό τεστ εγκυμοσύνης ενώ με μπλε αυτές με τα αρνητικά τεστ.



Εικόνα 16: Η ανάλυση δεν έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά ( $p=0,7$ ) μεταξύ γυναικών με θετικά και αρνητικά τεστ εγκυμοσύνης.



Εικόνα 17: Σχετικός αριθμός αντιγράφων cf-mtDNA (RCN) μεταξύ γυναικών με θετικά και αρνητικά τεστ εγκυμοσύνης. Η ανάλυση δεδομένων δεν έχει δείξει στατιστικά σημαντική διαφορά (p=0,3).

## 5.6 Συσχέτιση αντιγράφων mtDNA με την ηλικία της γυναίκας

Ο αυξημένος κίνδυνος ασθενειών που σχετίζονται με την ηλικία, όπως ο καρκίνος, οι καρδιαγγειακές παθήσεις και οι νευρολογικές διαταραχές συνδέεται με τη μείωση του αριθμού αντιγράφων του mtDNA με την ηλικία.

Αυτό οφείλεται στον ζωτικό ρόλο των μιτοχονδρίων σε κυτταρικές λειτουργίες όπως η παραγωγή ενέργειας και άλλες που είναι απαραίτητες για τη διατήρηση της καλής κυτταρικής λειτουργίας και της ομοιόστασης των ιστών. Συνολικά, η απώλεια αντιγράφων mtDNA με την ηλικία μπορεί να επηρεάσει τόσο την ικανότητα μιας γυναίκας να μείνει έγκυος όσο και την υγεία των παιδιών.

Επομένως, συγκρίναμε τη σχετική περιεκτικότητα σε mtDNA σε αυτά τα δείγματα. Παρατηρήσαμε ότι αυτός ο αριθμός είναι μειωμένος σε αναπαραγωγικά ηλικιωμένες γυναίκες, εύρημα που συνάδει με την τρέχουσα διαθέσιμη έρευνα. Ο σχετικός αριθμός αντιγράφων mtDNA υπολογίστηκε με βάση τη μέθοδο  $\Delta\Delta C_t$  όπως περιγράφεται στα υλικά και τις μεθόδους.

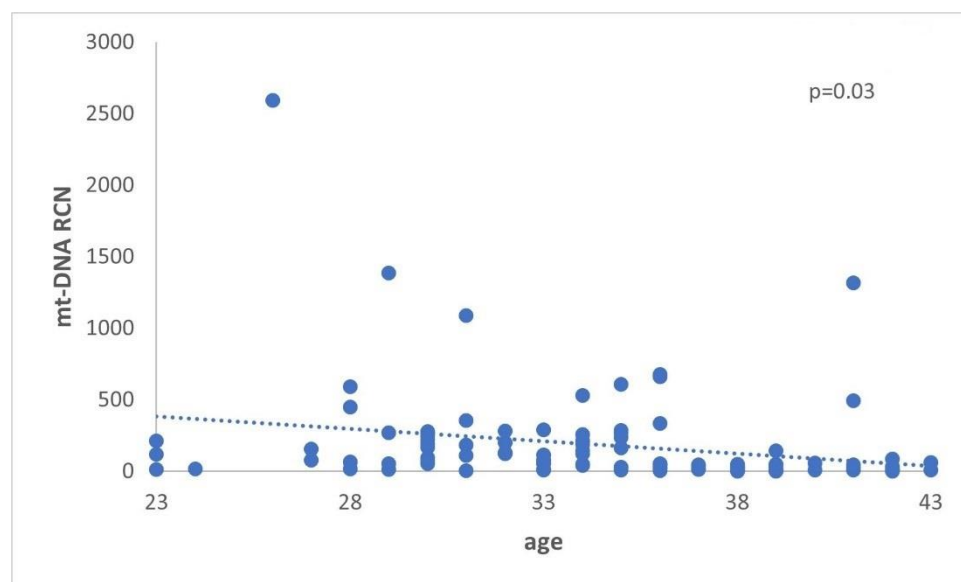
Επεξεργαστήκαμε τα δείγματα για να αξιολογήσουμε τον πολλαπλό αριθμό των φορών που εκφράζονται σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, η οποία αποτελούνταν από αναπαραγωγικά νεότερες γυναίκες που είχαν επιτυχείς εγκυμοσύνες, χρησιμοποιώντας τον τύπο  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ . Μια τιμή  $2^{-\Delta\Delta C_t} > 1$  δείχνει ότι η υπό εξέταση ομάδα εμφανίζει υψηλότερα επίπεδα mtDNA από την ομάδα ελέγχου.

Έχει αναφερθεί σε προηγούμενες μελέτες ότι τα επίπεδα cf-mtDNA σε ωοθυλακικό υγρό είναι υψηλότερα σε γυναίκες με PCOS από ότι σε γυναίκες χωρίς αυτήν την πάθηση. Σύμφωνα με τους Qasemi et al. (2021), [141] σε γυναίκες χωρίς ειδικό αναπαραγωγικό πρόβλημα, τα επίπεδα του cf-mtDNA μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως βιοδείκτης για την πιθανή έκβαση μιας διαδικασίας υποβοηθούμενης αναπαραγωγής (ART).

Όπως φαίνεται στον Πίνακα 10 και στο Σχήμα 18, τα δεδομένα μας συμφωνούν με αυτούς τους συγγραφείς, υποδηλώνοντας ότι η μη φυσιολογική συσσώρευση mtDNA σε αυτές τις παθολογικές καταστάσεις μπορεί να προκαλέσει αυξημένα επίπεδα cf-mtDNA. Τα δεδομένα παρουσιάζονται στον Πίνακα 10 και απεικονίζονται στο Σχήμα 18.

Πίνακας 10: Η ποσοτική ανάλυση PCR σε πραγματικό χρόνο είχε ως αποτέλεσμα τα παρακάτω αποτελέσματα. Επίσης επισημαίνεται η αναλογία cf-mtDNA/cf-nDNA και η σχετική ποσότητα μιτοχονδρίων. Τα δεδομένα αντιπροσωπεύονται ως μέσος όρος  $\pm$  SD.

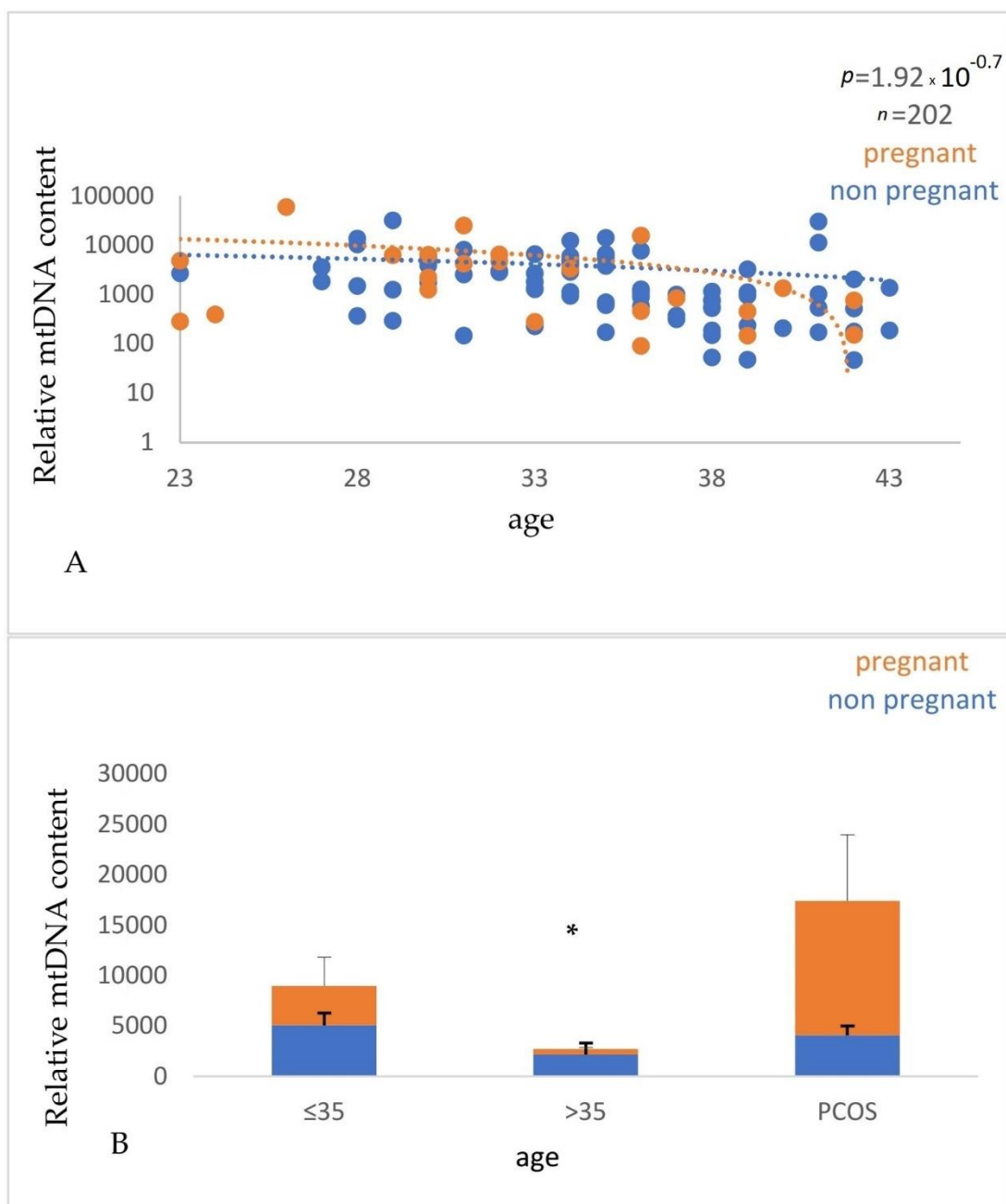
Ομάδα	CfDNA (ng/μl) $\pm$ SD	Cf-nDNA (μέσος όρος Ct) $\pm$ SD	Cf-mtDNA (μέσος όρος Ct) $\pm$ SD	Λόγος Cf- mtDNA/ Cf-n DNA $\pm$ SD	$2^{*2^{\Delta Ct}}$ (RCN)	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
$\leq 35$	10.38 $\pm$ 9.1	26.62 $\pm$ 1.2	20.88 $\pm$ 1.5	0.78 $\pm$ 0.06	207	2.28
$\geq 36$	7.68 $\pm$ 7.2	24.99 $\pm$ 1.7	21.59 $\pm$ 2.1	0.86 $\pm$ 0.07	76	9.26
PCOS	8.67 $\pm$ 5.9	26.37 $\pm$ 1.9	20.36 $\pm$ 2.3	0.77 $\pm$ 0.06	289	1.42
Ομάδα ελέγχου	12.8 $\pm$ 6.2	26.3 $\pm$ 0.9	20.7 $\pm$ 1.4	0.79 $\pm$ 0.07	166	



Εικόνα 18: Σχετικός αριθμός αντιγράφου Cf-mtDNA (RCN) που αφορά την ηλικία της γυναίκας. Η ανάλυση δεδομένων έδειξε μια στατιστικά σημαντική μείωση ( $p=0,03$ ) στον αριθμό αντιγράφων cf-mtDNA με προχωρημένη γυναικεία ηλικία.

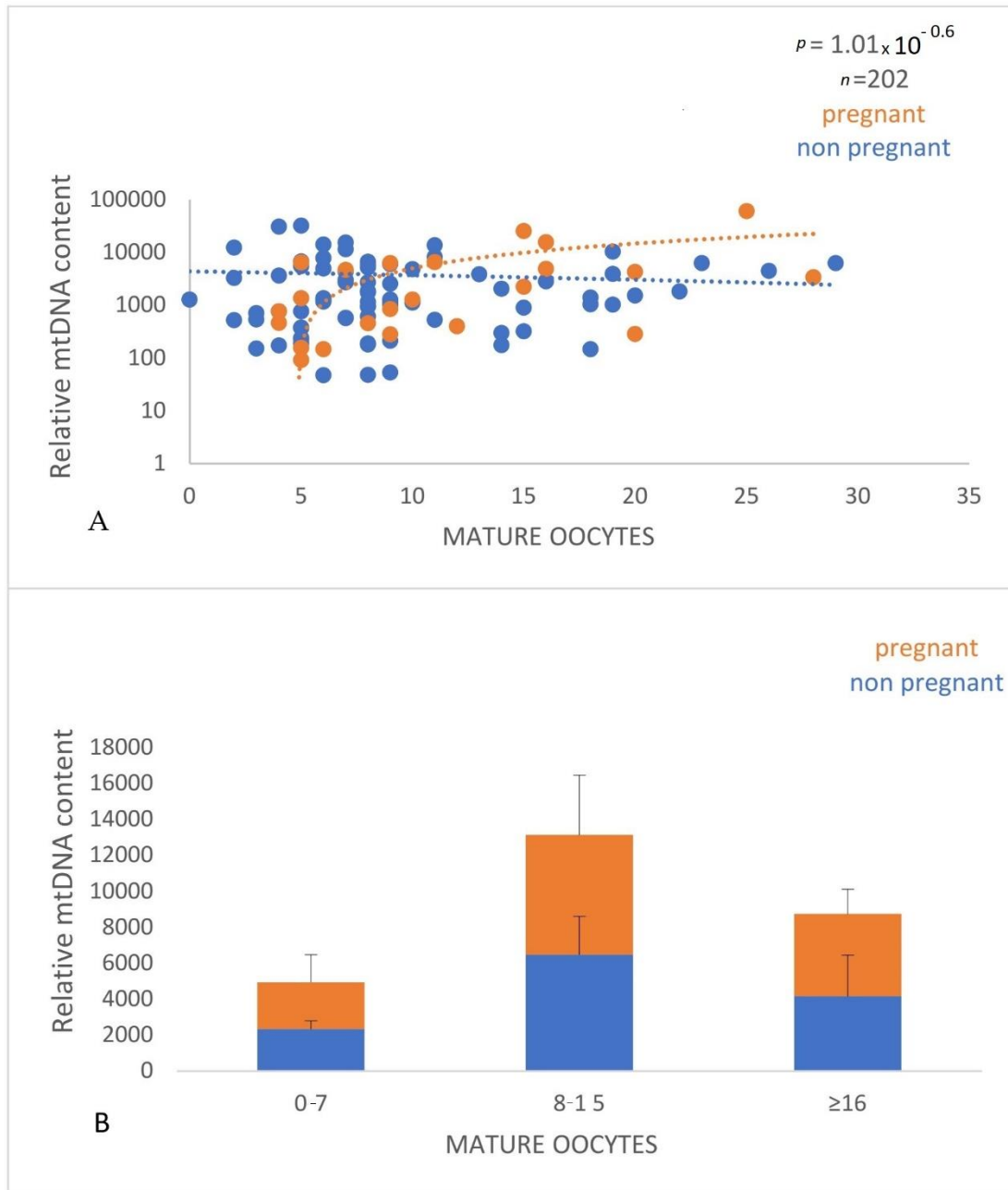
### 5.7 Σχετικό περιεχόμενο mtDNA σε σύγκριση με την ηλικία της γυναίκας και τον αριθμό ώριμων ωοκυττάρων

Είναι ενδιαφέρον ότι παρατηρήσαμε μια σημαντική μείωση ( $p < 0,0001$ ) στη σχετική περιεκτικότητα σε mtDNA με την προχωρημένη ηλικία (Εικόνα 19) και μια θετική συσχέτιση ( $p < 0,0001$ ) του σχετικο με τον αριθμό των ώριμων ωοκυττάρων (στάδιο MII) (Εικόνα 20), υποδεικνύοντας ότι αυτή η παράμετρος μπορεί είναι ένας χρήσιμος βιοδείκτης της ποιότητας των ωαρίων και της γήρανσης των ωοθηκών.





Εικόνα 19: 19A. Συσχέτιση μεταξύ του σχετικού περιεχομένου mtDNA και της ηλικίας των γυναικών. Οι τιμές που αντιστοιχούν σε γυναίκες με θετικά και αρνητικά τεστ εγκυμοσύνης εμφανίζονται με πορτοκαλί και μπλε χρώμα, αντίστοιχα. Τα δεδομένα ελήφθησαν από ανάλυση qPCR σε cfDNA που απομονώθηκε από δείγματα ωοθυλακικού υγρού που ελήφθησαν από γυναίκες που υποβλήθηκαν σε εξωσωματική γονιμοποίηση και αναλύθηκαν με τη μέθοδο  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Παρατηρήθηκε σημαντική μείωση ( $p < 0,0001$ ) στη σχετική περιεκτικότητα σε mtDNA με την πρόοδο της ηλικίας. 19B. Γραφική αναπαράσταση του σχετικού περιεχομένου mtDNA με την ηλικία των γυναικών. Το πορτοκαλί μέρος των ράβδων αντιστοιχεί σε γυναίκες με θετική έκβαση εγκυμοσύνης και το μπλε μέρος γυναίκες με μη θετική έκβαση. \*Παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά ( $p < 0,05$ ) της σχετικής περιεκτικότητας σε mtDNA μεταξύ των νεαρών και των μεγαλύτερων γυναικών.

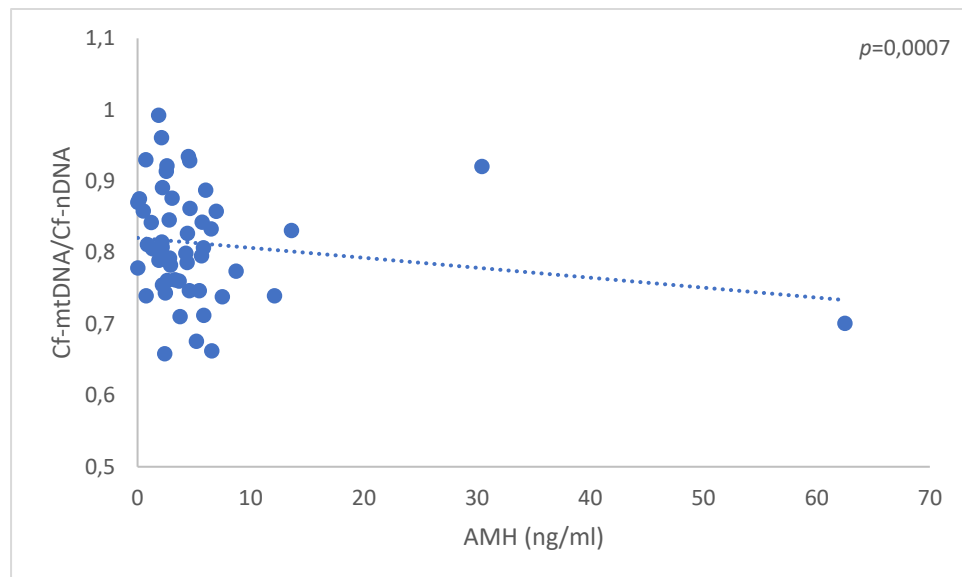


Εικόνα 20: 20A. Η σχέση μεταξύ του σχετικού περιεχομένου mtDNA και του αριθμού των ώριμων (MII) ωοκυττάρων. Οι τιμές που αντιστοιχούν σε γυναίκες με θετικά και αρνητικά τεστ εγκυμοσύνης εμφανίζονται με πορτοκαλί και μπλε χρώμα, αντίστοιχα. Τα δεδομένα προέκυψαν όπως περιγράφεται στο παραπάνω Σχήμα. 20B. Γραφική αναπαράσταση της σχετικής περιεκτικότητας mtDNA με τον αριθμό των ώριμων (MII)

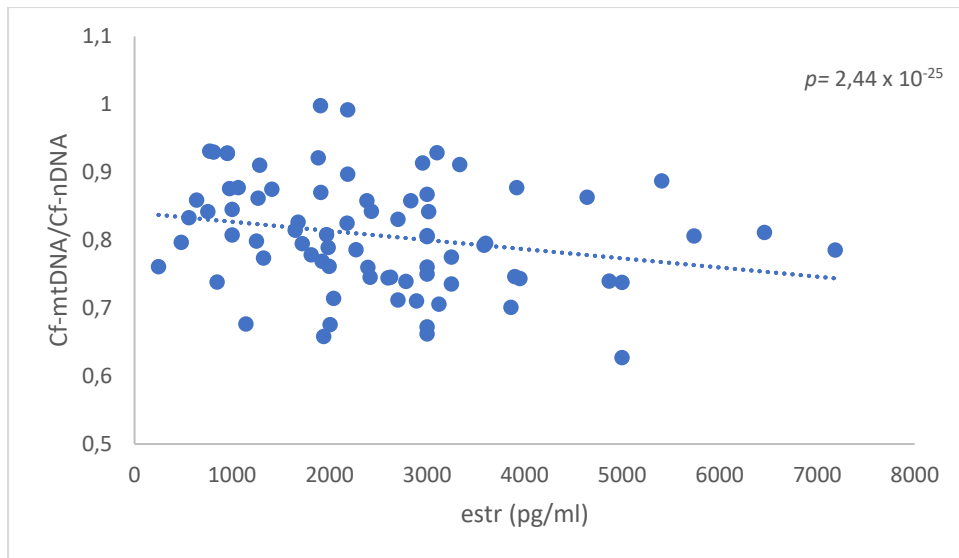
ωοκυττάρων. Το πορτοκαλί μέρος των ράβδων αντιστοιχεί σε έγκυες γυναίκες και το μπλε μέρος σε μη έγκυες γυναίκες. Αποκαλύφθηκε σημαντική διαφορά ( $p < 0,05$ ) της σχετικής περιεκτικότητας σε mtDNA μεταξύ γυναικών που είχαν σχετικά μικρό (0-7 και 8-15) αριθμό ώριμων ωαρίων.

## 5.8 Συσχέτιση λόγου cf-mtDNA/cf-nDNA με τις ορμόνες

Τέλος, αξιολογώντας και τα επίπεδα των ορμονών των γυναικών παρατηρήσαμε μια σημαντική μείωση ( $p=0,0007$ ) στη σχετική περιεκτικότητα του λόγου cf-mtDNA/cf-nDNA με την αύξηση του επιπέδου της AMH ορού αίματος (Εικόνα 21) και μια αρνητική συσχέτιση ( $p=2,44 \times 10^{-25}$ ) με τα επίπεδα οιστραδιόλης στον ορό του αίματος τα οποία μετρήθηκαν 2 ημέρες πριν από την ανάκτηση των ωαρίων (Εικόνα 22), υποδεικνύοντας ότι η αξιολόγηση των ορμονών μπορεί να αποτελέσει έναν χρήσιμο δείκτη για την έκβαση μιας εξωσωματικής γονιμοποίησης σε συνδυασμό με την αξιολόγηση του μιτοχονδριακού περιεχομένου.



Εικόνα 21: Η σχέση μεταξύ της ποσότητας cf-mtDNA/cf-nDNA με τα επίπεδα AMH ορού αίματος προσδιορίστηκαν σε έναν κύκλο που προηγήθηκε της θεραπείας με εξωσωματική γονιμοποίηση. Η ανάλυση έδειξε αρνητική συσχέτιση με στατιστική σημαντική διαφορά  $p=0,0007$ .



Εικόνα 22: Η σχέση μεταξύ της ποσότητας cf-mtDNA/cf-nDNA με τα επίπεδα οιστραδιόλης στον ορό του αίματος τα οποία μετρήθηκαν 2 ημέρες πριν από την ανάκτηση των ωαρίων. Η ανάλυση έδειξε αρνητική συσχέτιση με στατιστική σημαντική διαφορά  $p = 2,44 \times 10^{-25}$ .

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η εξωσωματική γονιμοποίηση (IVF) έχει φέρει επανάσταση στην αναπαραγωγική ιατρική, προσφέροντας ελπίδα σε άτομα και ζευγάρια που αντιμετωπίζουν προβλήματα γονιμότητας. Καθώς τα ποσοστά επιτυχίας της εξωσωματικής γονιμοποίησης ποικίλλουν, η ικανότητα εντοπισμού αξιόπιστων βιοδεικτών που προβλέπουν τη βιωσιμότητα του εμβρύου και τη δυνατότητα εμφύτευσης είναι υψίστης σημασίας.

Η αναπαραγωγική ιατρική, ένας διαρκώς εξελισσόμενος τομέας, εστιάζει στην κατανόηση και την ενίσχυση της ανθρώπινης γονιμότητας και της αναπαραγωγικής υγείας. Οι πρόσφατες εξελίξεις στη βιοϊατρική έρευνα έχουν ρίξει φως στον σημαντικό ρόλο των βιοδεικτών σ' αυτόν τον τομέα. Οι βιοδείκτες, μετρήσιμοι δείκτες βιολογικών διεργασιών ή καταστάσεων, έχουν αναδειχθεί ως ανεκτίμητα εργαλεία για τη διάγνωση, την παρακολούθηση και την πρόβλεψη του αποτελέσματος σε διάφορες αναπαραγωγικές διαταραχές. Αποτελούν ένα ευρύ φάσμα μορίων, γονιδίων, πρωτεϊνών ή χαρακτηριστικών που αντιπροσωπεύουν φυσιολογικές διεργασίες μέσα στο σώμα, επιτρέποντας έτσι τους ερευνητές και τους κλινικούς γιατρούς να αξιολογήσουν την κατάσταση γονιμότητας, να διαγνώσουν τυχόν διαταραχές, να παρακολουθήσουν τις απαντήσεις στη θεραπεία και να προβλέψουν τα αποτελέσματα αυτών.

Συγκεκριμένα, στον τομέα της αναπαραγωγικής ιατρικής, οι βιοδείκτες έχουν μεταμορφώσει το τοπίο της αναπαραγωγικής ιατρικής, ενισχύοντας τη διαγνωστική ακρίβεια, τις εξατομικευμένες στρατηγικές θεραπείας και τα αποτελέσματα των ασθενών καθώς προσφέρουν πολύτιμες προγνωστικές ικανότητες, βοηθώντας τους κλινικούς γιατρούς να λαμβάνουν τεκμηριωμένες αποφάσεις. Η αναπαραγωγική ιατρική συχνά περιλαμβάνει τη λήψη κρίσιμων αποφάσεων σχετικά με τις θεραπευτικές επιλογές και την πρόβλεψη των αποτελεσμάτων του ασθενούς.

Η εξέλιξη των τεχνολογιών υποβοηθούμενης αναπαραγωγής (ART) έχει γνωρίσει αξιοσημείωτες προόδους, προσφέροντας ελπίδα σε αμέτρητα ζευγάρια που παλεύουν με την υπογονιμότητα. Μεταξύ αυτών των τεχνολογιών, η εξωσωματική γονιμοποίηση (IVF) αποτελεί βασική προσέγγιση. Παρά τις συνεχείς βελτιώσεις στις τεχνικές εξωσωματικής γονιμοποίησης, τα ποσοστά επιτυχίας εξακολουθούν να διαφέρουν σημαντικά μεταξύ των ασθενών. Ο εντοπισμός προγνωστικών βιοδεικτών για τα

αποτελέσματα της εξωσωματικής γονιμοποίησης είναι απαραίτητος για την ενίσχυση της αποτελεσματικότητάς της και τη βελτιστοποίηση της φροντίδας των ασθενών.

Τα τελευταία χρόνια, η διερεύνηση του cfDNA σε διάφορα βιολογικά υγρά έχει συγκεντρώσει σημαντική προσοχή στον τομέα της αναπαραγωγικής ιατρικής. Στο πλαίσιο της εξωσωματικής γονιμοποίησης (IVF), η ανάλυση του cfDNA στο ωοθυλακικό υγρό αποτελεί μια μοναδική ευκαιρία να διερευνηθούν πιθανοί βιοδείκτες που θα μπορούσαν να συνεισφέρουν βοηθώντας στην πρόβλεψη της επιτυχίας της εξωσωματικής γονιμοποίησης. Μια ιδιαίτερη πτυχή ενδιαφέροντος αποτελεί και η αναλογία του απαλλαγμένου από κύτταρα μιτοχονδριακού DNA (cf-mtDNA) προς το ελεύθερο κυττάρων πυρηνικού DNA (cf-nDNA) στο ωοθυλακικό υγρό καθώς και οι επιπτώσεις του για τα αποτελέσματα της εξωσωματικής γονιμοποίησης.

Στο πλαίσιο των ωοκυττάρων και των πρώιμων εμβρύων, τα μιτοχόνδρια διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στην παροχή της απαραίτητης ενέργειας για γονιμοποίηση, διάσπαση και εμφύτευση. Οι αλλαγές που σχετίζονται με την ηλικία στη λειτουργία και την ποσότητα των μιτοχονδρίων αποτελεί επίσης θέμα ενδιαφέροντος στον τομέα της αναπαραγωγής.

Αυτή η μελέτη εμβάθυνε στο ρόλο των μιτοχονδρίων ως πιθανών βιοδεικτών και συγκεκριμένα στην αναλογία mtDNA/nDNA (γνωστή και ως η σχετική αφθονία του μιτοχονδριακού DNA σε σύγκριση με το πυρηνικό DNA μέσα σε ένα κύτταρο) στο ωοθυλακικό υγρό και η πιθανή συσχέτισή του με την ηλικία των γυναικών που υποβάλλονται σε εξωσωματική γονιμοποίηση ρίχνοντας φως στη σημασία τους στο πλαίσιο της εξωσωματικής γονιμοποίησης.

Τα μιτοχόνδρια είναι ζωτικής σημασίας για πολλές βιολογικές διεργασίες και η εμπλοκή τους στην ανθρώπινη αναπαραγωγή είναι ιδιαίτερα σημαντική. Τα μιτοχόνδρια είναι απαραίτητα για όλες τις κυτταρικές λειτουργίες, συμπεριλαμβανομένης της παραγωγής ATP, της εμβρυϊκής ανάπτυξης και της γονιμοποίησης των ωαρίων [158-159].

Το ιδιαίτερο χαρακτηριστικό των μιτοχονδρίων είναι ότι κληρονομούνται αποκλειστικά μέσω της μητέρας (μητρική προέλευση).

Το ωοκύτταρο έχει περισσότερα μιτοχόνδρια επειδή το ωάριο παρέχει στο αναπτυσσόμενο έμβρυο πολύ περισσότερο κυτταρόπλασμα από το σπέρμα. Το σπέρμα

συνεισφέρει το ήμισυ του γενετικού υλικού στο έμβρυο αλλά, μετά τη γονιμοποίηση, τα μιτοχόνδριά του είναι συχνά κατεστραμμένα.

Διάφορες, μελέτες αποδεικνύουν ότι τα σφάλματα στη μιτοχονδριακή δραστηριότητα μπορούν να οδηγήσουν σε μια ποικιλία αναπαραγωγικών παθολογιών, συμπεριλαμβανομένης της στειρότητας, της αποβολής και των αναπτυξιακών ανωμαλιών, έχουν αυξήσει την ευαισθητοποίηση για τη σημασία της μιτοχονδριακής λειτουργίας στην ανθρώπινη αναπαραγωγή [71]. Αν και τα μιτοχόνδρια έχουν το DNA τους (mtDNA), έχει βρεθεί ότι και το πυρηνικό DNA παίζει επίσης σημαντικό ρόλο στο μεγαλύτερο μέρος της παραγωγής και συντήρησης πρωτεϊνών στα μιτοχόνδρια [160-161].

Το ωοθυλακικό υγρό είναι ένα κρίσιμο μικροπεριβάλλον για την ανάπτυξη των ωαρίων και την πρόιμη ανάπτυξη του εμβρύου. Περιέχει ένα πολύπλοκο μείγμα μορίων, συμπεριλαμβανομένων ορμονών, αυξητικών παραγόντων και διαφόρων μορφών DNA. Ωστόσο, μέχρι πρόσφατα, η επιλογή των εμβρύων με το υψηλότερο δυναμικό εμφύτευσης κατά τις διαδικασίες υποβοηθούμενης αναπαραγωγής λάμβανε υπόψη τα μορφολογικά κριτήρια των ωαρίων. Επειδή το ωοθυλακικό υγρό λαμβάνεται μόνο όταν αναρροφούνται ωάρια από τα ωοθυλάκια, είναι κοινώς αποδεκτό ότι αυτή η διαδικασία δεν είναι εντελώς επεμβατική.

Η παρουσία του cfDNA στο ωοθυλακικό υγρό έχει αναγνωριστεί από καιρό, αλλά η λειτουργική του σημασία παρέμενε άγνωστη μέχρι τα τελευταία χρόνια και ο ρόλος του ως προγνωστικού βιοδείκτη στην εξωσωματική γονιμοποίηση μόλις πρόσφατα άρχισε να αναδεικνύεται. Το cfDNA στο ωοθυλακικό υγρό περιλαμβάνει τόσο μιτοχονδριακό DNA (mtDNA) όσο και πυρηνικό DNA (nDNA) και η αναλογία cf-mtDNA/cf-nDNA στο ωοθυλακικό υγρό είναι μια νέα και ενδιαφέρουσα παράμετρος που πρέπει να ληφθεί υπόψη στο πλαίσιο της εξωσωματικής γονιμοποίησης.

Πολλές γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας επηρεάζονται από μια ενδοκρινική πάθηση γνωστή ως σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών (PCOS). Χαρακτηρίζεται από μια ορμονική ανισορροπία, ιδιαίτερα από υπερβολική αφθονία ανδρογόνων (ανδρικές ορμόνες), που μπορεί να προκαλέσει ποικίλα συμπτώματα, όπως ακανόνιστη περίοδο, ακμή, αναπαραγωγικά προβλήματα καθώς επίσης και στειρότητα.

Τα αντιοξειδωτικά είναι ουσίες που μπορούν να βοηθήσουν στην άμυνα του οργανισμού ενάντια στις βλαβερές συνέπειες των ελεύθερων ριζών και του

οξειδωτικού στρες. Η ποσότητα των ROS και των φυσικών αντιοξειδωτικών στο σώμα κατανέμεται άνισα, γεγονός που οδηγεί σε οξειδωτικό στρες (OS). Η κύρια γραμμή άμυνας κατά της υπογονιμότητας που προκαλείται από τις ελεύθερες ρίζες είναι τα αντιοξειδωτικά.

Τα αντιοξειδωτικά, που βρίσκονται σε διάφορα τρόφιμα και συμπληρώματα, βοηθούν στην καταπολέμηση του οξειδωτικού στρες εξουδετερώνοντας τις ελεύθερες ρίζες καθώς επίσης μπορούν να προστατεύσουν τα ωκύτταρα από βλάβες ενισχύοντας την ανάπτυξή του και να αυξήσουν τη γυναικεία γονιμότητα. Αναδυόμενες έρευνες δείχνουν ότι η αύξηση της πρόσληψης αντιοξειδωτικών μπορεί να έχει θετικό αντίκτυπο στην υπογονιμότητα που σχετίζεται με το PCOS. Αντιοξειδωτικά όπως η βιταμίνη C, η βιταμίνη E και το συνένζυμο Q10 έχουν δείξει δυνατότητες μείωσης του οξειδωτικού στρες και βελτίωσης της ωορρηξιακής λειτουργίας σε γυναίκες με PCOS.

Το cfDNA, η αναλογία cf-mtDNA/cf-nDNA και ο αριθμός αντιγράφων mtDNA έχουν διερευνηθεί επίσης, στο πλαίσιο του PCOS για να αποκτηθούν πληροφορίες σχετικά με τις υποκείμενες μεταβολικές και μιτοχονδριακές ιδιαιτερότητες που σχετίζονται με την πάθηση. Ενώ η έρευνα είναι σε εξέλιξη, η ανάδειξη αυτών των παραμέτρων σαν βιοδείκτες υπόσχονται τη βελτίωση της κατανόησής μας για την παθογένεια του PCOS και την καθοδήγηση εξατομικευμένων στρατηγικών θεραπείας για τα προσβεβλημένα άτομα. Ωστόσο, απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για να διαπιστωθεί η κλινική τους χρησιμότητα και σημασία στη διαχείριση του PCOS.

Τα ευρήματά μας επιβεβαιώνουν την παρουσία μιτοχονδρίων και cfDNA στο ωοθυλακικό υγρό, σύμφωνα και με προηγούμενες μελέτες στο συγκεκριμένο πεδίο. Η ποσοτικοποίηση του μιτοχονδριακού DNA (mtDNA) και η αξιολόγηση της μιτοχονδριακής λειτουργίας παρουσίασαν ενδιαφέροντα αποτελέσματα. Είναι αξιοσημείωτο ότι τα επίπεδα mtDNA του ωοθυλακικού υγρού συσχετίστηκαν με την επιτυχία της εξωσωματικής γονιμοποίησης, υποδεικνύοντας τις δυνατότητές τους ως προγνωστικοί βιοδείκτες. Με βάση τα αποτελέσματα της μελέτης μας αποδείξαμε ότι τα χαμηλότερα επίπεδα mtDNA του ωοθυλακικού υγρού σχετίζονται με αυξημένες πιθανότητες επιτυχίας της εξωσωματικής γονιμοποίησης. Αυτή η συσχέτιση υπογραμμίζει την πιθανή χρήση του mtDNA ως μη επεμβατικού βιοδείκτη για την πρόβλεψη των αποτελεσμάτων της εξωσωματικής γονιμοποίησης.



Οι ασθενείς με υψηλότερα επίπεδα mtDNA στο ωοθυλακικό υγρό μπορεί να ωφεληθούν από εξατομικευμένες παρεμβάσεις για τη βελτίωση των πιθανοτήτων επιτυχούς εμφύτευσης εμβρύου.

Επιπρόσθετα, η ερευνά μας αποκάλυψε μια σημαντική συσχέτιση μεταξύ και της αναλογίας cf-mtDNA/cf-nDNA και των ποσοστών επιτυχίας της εξωσωματικής γονιμοποίησης. Οι γυναίκες με υψηλότερη αναλογία cf-mtDNA/cf-nDNA έτειναν να έχουν καλύτερα αποτελέσματα, συμπεριλαμβανομένων υψηλότερων ποσοστών γονιμοποίησης, ανάπτυξης εμβρύου και κλινικής εγκυμοσύνης. Αυτό υποδηλώνει ότι η σχετική αφθονία του μιτοχονδριακού DNA στο ωοθυλακικό υγρό σχετίζεται με βελτιωμένα αποτελέσματα εξωσωματικής γονιμοποίησης, συμπεριλαμβανομένων των ποσοστών γονιμοποίησης, της ανάπτυξης του εμβρύου και των κλινικών ποσοστών εγκυμοσύνης και μπορεί να χρησιμεύσει ως προγνωστικός βιοδείκτης για την επιτυχία της εξωσωματικής γονιμοποίησης.

Είναι σημαντικό ότι βρήκαμε σημαντική μεταβλητότητα στην αναλογία cf-mtDNA/cf-nDNA μεταξύ των ασθενών, υποδηλώνοντας πιθανή κλινική σημασία. Τα ευρήματα της έρευνάς μας καταδεικνύουν επίσης μια θετική συσχέτιση μεταξύ της αναλογίας του cf-mtDNA έναντι του cf-nDNA στο ωοθυλακικό υγρό και της ηλικίας των γυναικών που υποβάλλονται σε εξωσωματική γονιμοποίηση. Συγκεκριμένα, παρατηρήσαμε ότι όσο αυξανόταν η ηλικία, αυξήθηκε και η αναλογία cf-mtDNA/cf-nDNA. Αυτό υποδηλώνει ότι οι γυναίκες μεγαλύτερης ηλικίας τείνουν να έχουν μεγαλύτερη σχετική αφθονία μιτοχονδριακού DNA στο ωοθυλακικό τους υγρό σε σύγκριση με το πυρηνικό DNA.

Η σχετική αναλογία cf-mtDNA προς περιεχόμενο cf-nDNA σε ανθρώπινο ωοθυλακικό υγρό συσχέτιστηκε θετικά με την ηλικία και τη δυνατότητα εμφύτευσης μόνο για τις γυναίκες χωρίς συγκεκριμένη αναπαραγωγική παθολογία αλλά όχι μεταξύ αυτών με PCOS, που αποδεικνύεται ότι, με βάση τα προκαταρκτικά ευρήματά μας, η σχετική αναλογία cf-mtDNA προς cf-nDNA μπορεί να χρησιμεύσει ως πιθανός προγνωστικός παράγοντας για την αξιολόγηση της απόδοσης μιας εξωσωματικής γονιμοποίησης μόνο σε γυναίκες χωρίς κάποια ενδοκρινική διαταραχή.

Με βάση τα ευρήματα της μελέτης μας, υπάρχει μια προφανής αντίφαση σχετικά με το γεγονός ότι η αναλογία mtDNA/nDNA των ωοθυλακίων αυξάνεται με την ηλικία, αν και ο αριθμός των μιτοχονδρίων έχει πράγματι μειωθεί. Είναι ήδη γνωστό ότι η

ποσότητα του cfDNA σε το ωοθυλακικό υγρό μπορεί να είναι ένας καλός δείκτης της ποιότητας του ωαρίου μέσα στο ωοθυλάκιο και του επιπέδου της ωοθυλακικής απόπτωσης. Υψηλές ποσότητες cfDNA έχουν συνδεθεί με μειωμένη αναπτυξιακή ικανότητα των ωαρίων και υψηλότερη θυλακική ατρησία [81].

Για να ενισχυθεί η αποτελεσματικότητα των θεραπειών υπογονιμότητας, θα πρέπει να αναπτυχθούν νέες τεχνικές για την αξιολόγηση της ικανότητας των ωαρίων και της βιωσιμότητας του εμβρύου.

Οι αλλαγές στην αναλογία mtDNA/nDNA και στον αριθμό των μιτοχονδρίων στις μεγαλύτερης ηλικίας γυναίκες επηρεάζονται από διάφορους παράγοντες. Μια εύλογη εξήγηση για την παρατηρούμενη συσχέτιση είναι ότι οι γυναίκες μεγαλύτερης ηλικίας μπορεί να εμφανίσουν μιτοχονδριακή δυσλειτουργία που σχετίζεται με την ηλικία. Με την πάροδο του χρόνου, τα μιτοχόνδρια είναι ευάλωτα σε οξειδωτική βλάβη η οποία μπορεί να οδηγήσει σε εξασθενημένη λειτουργία των μιτοχονδρίων. Αυτή η δυσλειτουργία μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένη απελευθέρωση mtDNA στο ωοθυλακικό υγρό, συμβάλλοντας στην υψηλότερη αναλογία cf-mtDNA/cf-nDNA που παρατηρείται σε μεγαλύτερης ηλικίας γυναίκες.

Ένας άλλος σημαντικός παράγοντας είναι η συσσώρευση μεταλλάξεων στο mtDNA. Αυτό θα μπορούσε να οδηγήσει σε αυξημένη απόρριψη κατεστραμμένου mtDNA στο ωοθυλακικό υγρό, συμβάλλοντας περαιτέρω στην παρατηρούμενη συσχέτιση. Το μιτοχονδριακό DNA είναι πιο ευάλωτο στην οξειδωτική βλάβη και οι μηχανισμοί επιδιόρθωσης του DNA του είναι λιγότερο αποτελεσματικοί [161].

Ως αποτέλεσμα, οι συσσωρευμένες μεταλλάξεις του mtDNA μπορεί να γίνονται πιο διαδεδομένες με την ηλικία. Αυτές οι μεταλλάξεις μπορεί να επηρεάσουν την ικανότητα των μιτοχονδρίων να αναπαράγονται και να διατηρούνται, κάτι που θα μπορούσε να είναι επιζήμια για τη γονιμότητα [162].

Οι σχετιζόμενες με την ηλικία μειώσεις στο μιτοχονδριακό περιεχόμενο μπορεί επίσης να προκληθούν από διάφορους παράγοντες, όπως ορμονικές αλλαγές μείωση της βιογένεσης των μιτοχονδρίων, τον τρόπο ζωής, τη γενετική και τις περιβαλλοντικές επιρροές [136].

Η απόπτωση και η μιτοφαγία είναι δύο κυτταρικές διεργασίες που συνδέονται στενά, με μια περίπλοκη και ασαφή αλληλεπίδραση. Ωστόσο, έχει προταθεί ότι η μιτοφαγία

μπορεί να λειτουργήσει ως διαδικασία προεπιβίωσης εξαλείφοντας ελαττωματικά μιτοχόνδρια που θα μπορούσαν να πυροδοτούν την απόπτωση [163]. Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι η αναστολή της μιτοφαγίας μπορεί να προάγει την απόπτωση [164]. Τόσο η αποτελεσματικότητα της απόπτωσης όσο και της μιτοφαγίας μπορεί να μειωθεί καθώς αυξάνεται η ηλικία της γυναίκας.

Μια συσσώρευση κατεστραμμένων μιτοχονδρίων στα κύτταρα θα μπορούσε να προκύψει από αυτή την πτώση. Οι αυξήσεις που σχετίζονται με την ηλικία στα κατεστραμμένα ή δυσλειτουργικά μιτοχόνδρια οδηγούν σε υψηλότερη αναλογία mtDNA/nDNA. Τόσο η ανάπτυξη των ωοθυλακίων όσο και η ατρησία (εκφύλιση των ωοθυλακίων) εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από την απόπτωση. Μόνο ένα ποσοστό των ωοθυλακίων που σχηματίζονται κατά τη διάρκεια της ωοθυλακιογένεσης ωριμάζουν και απελευθερώνουν ένα βιώσιμο ωάριο. Τα υπόλοιπα ωοθυλάκια επιδεινώνονται και υφίστανται απόπτωση [5].

Σύμφωνα με έρευνες για την ακεραιότητα του cfDNA στο ωοθυλακικό υγρό, η απελευθέρωση του cf-nDNA σε αυτό το υγρό είναι μία από τις πολλές κυτταρικές και μοριακές οδούς που ενεργοποιούνται κατά την απόπτωση και έως και το 85% του cfDNA προέρχεται από την κυτταρική απόπτωση [97].

Η υπογονιμότητα είναι μια πολύπλοκη και πολυπαραγοντική πάθηση και οι εξατομικευμένες θεραπευτικές στρατηγικές αναγνωρίζονται όλο και περισσότερο ως απαραίτητες. Η χρήση μιτοχονδρίων ως βιοδεικτών στην εξωσωματική γονιμοποίηση μπορεί να ανοίξει το δρόμο για μια πιο εξατομικευμένη προσέγγιση στην υποβοηθούμενη αναπαραγωγή. Στόχος μας με την παρούσα εργασία αποτέλεσε το γεγονός ότι θέλαμε να παρέχουμε μια εναλλακτική, μη χρονοβόρα, μη εντατική και μη επεμβατική προσέγγιση για τη μέτρηση του ποσού του μιτοχονδριακού DNA χωρίς κύτταρα (cf-mtDNA) με τον υπολογισμό της αναλογίας cf-mtDNA/cf-nDNA σε δείγματα ωοθυλακικού υγρού γυναικών που υποβλήθηκαν σε ωοθυλακική αναρρόφηση για IVF/ICSI.

Οι κλινικοί γιατροί μπορούν να χρησιμοποιήσουν αυτούς τους βιοδείκτες για να εντοπίσουν ασθενείς με υψηλότερο κίνδυνο αποτυχίας εξωσωματικής γονιμοποίησης και να σχεδιάσουν προσαρμοσμένα σχέδια θεραπείας για την αντιμετώπιση συγκεκριμένων μιτοχονδριακών δυσλειτουργιών. Η προσαρμογή των πρωτοκόλλων εξωσωματικής γονιμοποίησης που βασίζονται σε μιτοχονδριακές αξιολογήσεις μπορεί

να οδηγήσει σε βελτιωμένα ποσοστά επιτυχίας και καλύτερα αποτελέσματα των ασθενών. Αυτές οι πληροφορίες θα μπορούσαν να καθοδηγήσουν αποφάσεις σχετικά με τη διάρκεια της θεραπείας, μειώνοντας πιθανώς τις σωματικές, συναισθηματικές και οικονομικές επιβαρύνσεις που σχετίζονται με τους επαναλαμβανόμενους κύκλους εξωσωματικής γονιμοποίησης. Ακόμη, η μελέτη μας υπογραμμίζει τη σημασία της βελτιστοποίησης της μιτοχονδριακής λειτουργίας εντός του ωοθυλακικού περιβάλλοντος.

Τα μιτοχόνδρια είναι κεντρικής σημασίας για την ωρίμανση των ωαρίων και την πρόωμη ανάπτυξη του εμβρύου καθιστώντας το mtDNA έναν πιθανό δείκτη ενδιαφέροντος. Ως εκ τούτου, οι παρεμβάσεις που στοχεύουν στην ενίσχυση της μιτοχονδριακής λειτουργίας, όπως η συμπλήρωση με αντιοξειδωτικά ή άλλα φαρμακευτικά σκευάσματα μπορεί να υπόσχονται τη βελτίωση των ποσοστών επιτυχίας της εξωσωματικής γονιμοποίησης.

Ενώ η μελέτη μας παρείχε πολύτιμες γνώσεις σχετικά με τον ρόλο των μιτοχονδρίων ως βιοδεικτών στο ωοθυλακικό υγρό, υπάρχουν αρκετοί τρόποι για μελλοντική έρευνα. Πρώτον, απαιτούνται περαιτέρω έρευνες για να επικυρωθούν τα ευρήματά μας σε περισσότερα δείγματα γυναικών. Επιπλέον, η διερεύνηση και κατανόηση των μοριακών μηχανισμών που διέπουν τη σχέση μεταξύ του mtDNA του ωοθυλακικού υγρού και των αποτελεσμάτων της εξωσωματικής γονιμοποίησης είναι απαραίτητη και μπορεί να παρέχει πληροφορίες για τον ακριβή ρόλο των μιτοχονδρίων στην ανάπτυξη ωαρίων και εμβρύων και μπορεί να προσδιορίσει συγκεκριμένους στόχους για παρέμβαση. Η αποσαφήνιση του τρόπου με τον οποίο η μιτοχονδριακή λειτουργία επηρεάζει την ποιότητα των ωαρίων και την ανάπτυξη του εμβρύου σε μοριακό επίπεδο μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη στοχευμένων θεραπειών και παρεμβάσεων.

Οι βιοδείκτες ενισχύουν αυτό που είναι ήδη γνωστό στην πρόγνωση, τη διάγνωση και τη θεραπεία. Είναι χρήσιμα εργαλεία με σημαντικές βιολογικές και θεραπευτικές εφαρμογές σε πολλά ιατρικούς κλάδους. Η διατήρηση του περιβάλλοντος του ωοθυλακικού υγρού είναι ζωτικής σημασίας για την παραγωγή του κατάλληλου ωαρίου και, ως εκ τούτου, ενός καλώς ανεπτυγμένου εμβρύου.

Οι αξιόπιστοι σχετικοί βιοδείκτες και τα μη επεμβατικά διαγνωστικά τεστ είναι απαραίτητα στον τομέα της ανθρώπινης αναπαραγωγικής ιατρικής. υπάρχει αυξανόμενο ενδιαφέρον για τον ρόλο του cfDNA στην ανθρώπινη αναπαραγωγή.

Εξαιτίας της αποικοδόμησης του γονιδιωματικού DNA, της χαμηλής συγκέντρωσης και το υψηλού κατακερματισμού, η μελέτη του cfDNA αποτελεί συνήθως πρόκληση, αλλά μπορεί να βελτιωθεί ώστε να χρησιμεύσει ως χρήσιμο εργαλείο στην ιατρική υποβοηθούμενη αναπαραγωγή.

Σαν αποτέλεσμα, ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός του cf-nDNA και του cf-mtDNA είναι γρήγορος, παρουσιάζει μεγάλη ευαισθησία και είναι απλός στην εκτέλεση. Επιπλέον, παρέχει γενική επισκόπηση της ποιότητας του ωοθυλακικού μικροπεριβάλλοντος, ενισχύοντας την επιτυχία των ART. Είναι γενικά γνωστό ότι η ηλικία της μητέρας έχει δυσμενή σχέση με την πιθανότητα ένα ωάριο να εξελιχθεί σε βιώσιμο έμβρυο, γεγονός που επιβεβαιώνεται έντονα από τη σημαντική διαφορά στο ποσοστό επιτυχίας της θεραπείας εξωσωματικής γονιμοποίησης για αναπαραγωγικά ηλικιωμένους γυναίκες σε σύγκριση με νεότερες. Ωστόσο, η μείωση του cf-mtDNA με την ηλικία που παρατηρείται στα δείγματα του ωοθυλακικού υγρού κατά τη διάρκεια της τρέχουσας μελέτης εγείρει το ερώτημα εάν τα μιτοχόνδρια μπορεί να παίζουν άμεσο ρόλο στη γυναικεία γονιμότητα και ηλικία.

Τέλος, για να συνοψίσουμε, απαιτείται περισσότερη έρευνα για να εξεταστούν διεξοδικά οι πιθανές εφαρμογές cfDNA, nDNA, mtDNA, και η αναλογία mt/n, στην αναπαραγωγική βιολογία και για την ανάπτυξη πιο αποτελεσματικών διαγνωστικών και θεραπευτικές προσεγγίσεις που βασίζονται σε αυτόν τον βιοδείκτη.

Μελέτες που επικεντρώνονται στη μιτοχονδριακή λειτουργία, τα κοκκώδη και σωρευτικά κύτταρα, τα ωάρια και τα έμβρυα, καθώς και το ωοθυλακικό υγρό, πιθανότατα θα οδηγήσουν σε νέα ευρήματα. Το μεγαλύτερο μέρος της έρευνας έχει δημιουργήσει μια σύνδεση μεταξύ της επιτυχίας της ART και της ικανότητας των ωαρίων να υποστηρίξουν την προεμφυτευτική ανάπτυξη και εγκυμοσύνη. Η αναγνώριση ενός εμβρύου υψηλής ποιότητας με χρήση αξιόπιστης μοριακής τεχνολογίας και η μέτρηση της επιτυχίας της ART είναι οι δύο κύριοι στόχοι των βιοδεικτών που χρησιμοποιούνται στην ανθρώπινη αναπαραγωγική ιατρική.

Ωστόσο, για να γίνουν αυτά τεχνικές όσο το δυνατόν πιο αποτελεσματικές, είναι σημαντικό να αναζητηθούν οι παράγοντες που επηρεάζουν την ποιότητα των ωοθυλακίων και, στη συνέχεια, των ωαρίων. Έχουν υπάρξει πολυάριθμες αξιολογήσεις του mtDNA στην αξιολόγηση των κλινικών αποτελεσμάτων της εξωσωματικής γονιμοποίησης [165].

Τέλος, θα πρέπει να τονιστεί ότι τα μιτοχόνδρια είναι ένας εξαιρετικός προγνωστικός παράγοντας. Παρά τη σημασία των μιτοχονδρίων στην ανθρώπινη αναπαραγωγή, ο τρόπος λειτουργίας και ρύθμισής τους παραμένει μη κατανοητός. Πολλές μελέτες έχουν δείξει την πιθανή κλινική χρησιμότητα της ανάλυσης cfDNA (cf mtDNA και cf-nDNA) στο ωοθυλακικό υγρό στην ART για την ποιότητα του ωοκυττάρου και η πιθανότητα μιας επιτυχημένης εγκυμοσύνης ωστόσο απαιτούνται περισσότερες μελέτες.

Η γονιμότητα, μια επιτυχής εγκυμοσύνη και η γήρανση των ωαρίων φαίνεται να επηρεάζεται από τον αριθμό αντιγράφων cf-mtDNA. Ακόμα κι αν οι αριθμοί αντιγράφων cf-mtDNA μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως κλινικό εργαλείο για τη διάγνωση και για τη θεραπεία των αναπαραγωγικών παθολογιών, απαιτείται περαιτέρω μελέτη για την πλήρη κατανόηση του μηχανισμών που διέπουν αυτές τις συσχετίσεις. Λόγω του σημαντικού βαθμού μεταβλητότητας του mtDNA, η εφαρμογή άλλων δεικτών, όπως η αναλογία cf-mtDNA και cf-nDNA, οι ορμόνες και η μορφολογία μπορούν να αξιολογηθούν σε συνδυασμό με άλλους βιοδείκτες.

Καθώς συνεχίζουμε να διερευνούμε την περίπλοκη αλληλεπίδραση μεταξύ της ηλικίας, της μιτοχονδριακής λειτουργίας και των αποτελεσμάτων της εξωσωματικής γονιμοποίησης, απαιτείται περαιτέρω έρευνα. Η κατανόηση αυτών των μηχανισμών θα συμβάλει στην ανάπτυξη πιο εξατομικευμένων και αποτελεσματικών θεραπειών γονιμότητας, προσφέροντας ελπίδα σε άτομα και ζευγάρια που επιδιώκουν να δημιουργήσουν τις οικογένειές τους μέσω της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Αυτός ο τομέας έρευνας, ανοίγει πόρτες σε νέες δυνατότητες στην υποβοηθούμενη αναπαραγωγή προς τη βελτίωση των αποτελεσμάτων της και ο ρόλος των μιτοχονδρίων ως βιοδεικτών μας φέρνει ένα βήμα πιο κοντά στην επίτευξη αυτού του στόχου.

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- ✓ Η παρούσα μελέτη είχε σαν στόχο να αναδείξει τα μιτοχόνδρια ως ένα πιθανό προγνωστικό εργαλείο για την αξιολόγηση της βιωσιμότητας ενός εμβρύου στην ART.
- ✓ Αποτελεί μια εναλλακτική, μη χρονοβόρα, και μη επεμβατική προσέγγιση για τη μέτρηση του cf-mtDNA με τον υπολογισμό της αναλογίας cf-mtDNA/cf-nDNA σε δείγματα ΩΥ γυναικών που υποβάλλονται σε IVF/ICSI.
- ✓ Η ποσότητα του cfDNA στο ΩΥ συσχετίζεται με την ποιότητα του εμβρύου και θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως νέος βιοδείκτης, κυρίως σε εργαστήριο υποβοηθούμενης αναπαραγωγής.
- ✓ η ποσότητα του cf-nDNA που ανιχνεύεται στο ΩΥ έχει αποδειχθεί ότι αντανακλά την απόπτωση των κοκκωδών κυττάρων, ενώ το περιεχόμενο cf-mtDNA αντανακλά την αλλαγή στη μιτοχονδριακή λειτουργία και τη δυναμική των κοκκωδών κυττάρων.
- ✓ Ο λόγος cf-mtDNA/cf-nDNA στο ΩΥ συσχετίστηκε θετικά με την ηλικία και το δυναμικό εμφύτευσης μόνο για γυναίκες χωρίς ειδική αναπαραγωγική παθολογία και ήταν υψηλότερο στις γυναίκες, οι οποίες είχαν επίσης τα υψηλότερα ποσοστά επιτυχημένης IVF.
- ✓ Τα αντίγραφα cf-mtDNA στο ΩΥ ήταν χαμηλότερα σε γυναίκες μεγαλύτερης ηλικίας.
- ✓ Τα αντίγραφα cf-mtDNA βρέθηκαν άλλοτε υψηλότερα κι άλλοτε χαμηλότερα σε γυναίκες με PCOS σε σύγκριση με τις γυναίκες χωρίς κάποια ορμονολογική διαταραχή, γεγονός που υποδεικνύει γενικότερα μιτοχονδριακή δυσλειτουργία στο σύνδρομο PCOS.
- ✓ Σημαντική θετική συσχέτιση μεταξύ του σχετικού αριθμού cf-mtDNA και του αριθμού των ώριμων (MII) ωαρίων.
- ✓ Τα δεδομένα δείχνουν ότι η σχετική αναλογία cf-mtDNA/ cf-nDNA στο ΩΥ μπορεί να είναι ένας αποτελεσματικός προγνωστικός παράγοντας για την αξιολόγηση της απόδοσης στην IVF σε σχέση με την ηλικία της γυναίκας.
- ✓ Ωστόσο, απαιτούνται περαιτέρω μελέτες με μεγαλύτερα μεγέθη δειγμάτων για να επιβεβαιώσουν αυτά τα ευρήματα.







## Περίληψη

Οι συγγενείς κλάδοι της γενετικής και της μοριακής βιολογίας είναι από τα σημαντικότερα πεδία της σύγχρονης βιολογίας. Αποτελούν και οι δύο αυτοί κλάδοι εργαλεία για την κατανόηση της λειτουργίας του συνόλου των γονιδίων, των βιολογικών μονοπατιών και των βιοσυστημάτων. Η εφαρμογή τους στις επιστήμες υγείας είναι η αιχμή του δόρατος για την ακριβή διάγνωση και την στοχευμένη εξατομικευμένη αντιμετώπιση πολλών νοσημάτων του ανθρώπου. Η Ιατρικώς Υποβοηθούμενη Αναπαραγωγή είναι ένα από τα πεδία που εφαρμόζονται συστηματικά οι γνώσεις της γενετικής και μοριακής βιολογίας και συνεπώς άμεσα εξαρτημένη από τις επιστημονικές εξελίξεις στους τομείς της μοριακής γενετικής, της βιοτεχνολογίας και της βιοιατρικής.

Το DNA χωρίς κύτταρα ή ελεύθερο DNA (cfDNA) έχει αναδειχθεί ως ένας πολλά υποσχόμενος υποψήφιος βιοδείκτης. Το cfDNA, αποτελείται από μικρά θραύσματα DNA, είναι στην ουσία δίκλωνο εξωκυτταρικό μόριο, αποτελείται από πυρηνικό και μιτοχονδριακό DNA, απελευθερώνεται κυρίως από τον πυρήνα εξαιτίας αποπτωτικών ή νεκρωτικών διαδικασιών, έχει τη δυνατότητα να φέρει επανάσταση στον τρόπο με τον οποίο αξιολογούμε τη βιωσιμότητα του εμβρύου στις διαδικασίες εξωσωματικής γονιμοποίησης καθώς πρόσφατα έχει αποδειχθεί χρήσιμος βιοδείκτης στην προεμφυτευτική διάγνωση.

Η μη επεμβατική φύση του και η δυνατότητα παρακολούθησης σε πραγματικό χρόνο το καθιστούν μια συναρπαστική οδό για την προώθηση του τομέα των τεχνολογιών υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Καθώς η πρόοδος και οι μεθοδολογίες της έρευνας βελτιώνονται, το cfDNA θα μπορούσε να γίνει ένα πολύτιμο εργαλείο στη διαδικασία της εξωσωματικής γονιμοποίησης.

Το ωοθυλακικό υγρό, στο οποίο συναντάται κυρίως ελεύθερο DNA, αποτελεί πρόσφορο υλικό έρευνας των μιτοχονδρίων καθώς αποτελεί το μικροπεριβάλλον που είναι απαραίτητο για την ανάπτυξη των ωαρίων και διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην επιτυχία γονιμοποίησης και στην εμβρυική ανάπτυξη.

Τα τελευταία χρόνια, επίσης, παρατηρείται μια τάση στην μελέτη της βιολογίας των μιτοχονδρίων με σκοπό την προαγωγή γνώσεων σχετικά με την βιωσιμότητα των προεμφυτευτικών εμβρύων που δημιουργούνται στην διάρκεια των τεχνικών υποβοηθούμενης αναπαραγωγής.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή, εξετάστηκαν συγκεκριμένες πτυχές της μιτοχονδριακής βιολογίας των ωοθυλακίων με σκοπό την μελέτη τους ως πιθανών βιοδεικτών στην κλινική εμβρυολογία και τη βιολογία της αναπαραγωγής και θα συμβάλλουν στην πρόοδο της σύγχρονης Ιατρικής της Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής. Εφόσον έχει δειχθεί ότι τα υψηλά επίπεδα ελεύθερου DNA και κυρίως του ελεύθερου μιτοχονδριακού DNA μπορεί να έχουν συσχέτιση με χαμηλής ποιότητας ωάρια και μειωμένη αναπτυξιακή δυνατότητα των προεμβρύων, θεωρήθηκε σκόπιμο να μελετηθεί η ποιοτική και ποσοτική τους έκφραση, με στόχο την διερεύνηση της πιθανής κλινικής αξίας των επιπέδων τους.

Το κύριο βιολογικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε είναι το ωοθυλακικό υγρό και τα κοκκώδη κύτταρα που εμπεριέχονται σε αυτό, συλλέχθηκε από γυναίκες που υποβάλλονται σε εξωσωματική γονιμοποίηση και αναλύθηκε με την τεχνική της real time PCR. Τέλος, μεγαλύτερη βαρύτητα δόθηκε στην μελέτη του μιτοχονδριακού DNA, καθώς εκτιμάται ότι τα μιτοχόνδρια είναι ο συνδετικός κρίκος που θα μπορούσε να συνδέσει την επιστήμη της ανθρώπινης αναπαραγωγής, με νέες προγνωστικές και διαγνωστικές παρεμβάσεις στην υπογονιμότητα και ενδεχομένως σε νέες θεραπείες.

Η ανάλυσή μας έδειξε ότι το επίπεδο του FF-cf-mtDNA ήταν χαμηλότερο στην ομάδα των γυναικών σε προχωρημένη ηλικία από ότι στις ομάδες των γυναικών με PCOS και αυτών χωρίς κάποια ενδοκρινική διαταραχή. Επιπλέον, θα καταγραφεί ο αριθμός αντιγράφων mtDNA με σκοπό την διερεύνηση για το εάν ο αριθμός αυτός αποτελεί αξιόπιστο βιοδείκτη, ανεξάρτητο από την μορφολογία, την ηλικία, την ανευπλοειδία και τον προεμφυτευτικό γενετικό έλεγχο κι αν η χρήση του μπορεί να οδηγήσει σε υψηλότερα ποσοστά επιτυχούς εμφύτευσης σε γυναίκες που υπόκεινται σε υποβοηθούμενη αναπαραγωγή. Ακόμη, παρατηρήθηκε σημαντική θετική συσχέτιση μεταξύ του FF-cf-mtDNA και του αριθμού των ώριμων (MII) ωαρίων. Το κύριο ζήτημα που προέκυψε από την έρευνά μας είναι το γεγονός ότι ενώ η αναλογία mtDNA/nDNA αυξάνεται με την ηλικία της γυναίκας, ο αριθμός των μιτοχονδρίων μειώνεται με την ηλικία της γυναίκας.

Συλλογικά, τα δεδομένα δείχνουν ότι η σχετική αναλογία cf-mtDNA προς περιεχόμενο cf-nDNA στο ωοθυλακικό υγρό μπορεί να είναι ένας αποτελεσματικός προγνωστικός παράγοντας για την αξιολόγηση της απόδοσης του αντίστοιχου ωοκυττάρου που σχετίζεται με την ηλικία στην εξωσωματική γονιμοποίηση.



## Abstract

Among the most significant areas of contemporary biology are the linked subject areas of genetics and molecular biology. Undoubtedly, they provide tools for comprehending how individual genes, biological processes, and biosystems work. Their use in the health sciences is the catalyst for precise identification and individualized, focused therapy of many human disorders. A particular field where the knowledge of genetics and molecular biology is systematically applied is medically assisted reproduction, which is directly reliant on scientific advancements in the areas of molecular genetics, biotechnology, and biomedicine. IVF has transformed reproductive medicine and given hope to countless individuals and couples struggling with infertility.

Cell-free or free DNA (cfDNA) has emerged as a promising candidate biomarker. CfDNA, composed of small DNA fragments, is essentially a double-stranded extracellular molecule, composed of nuclear and mitochondrial DNA, mainly released from the nucleus due to apoptotic or necrotic processes, has the potential to revolutionize the way we assess embryo viability in IVF procedures as it has recently been shown to be a useful biomarker in pre-implantation diagnosis. Its non-invasive nature and real-time monitoring capability make it an exciting avenue to advance the field of assisted reproductive technologies. As research advances and methodologies improve, cfDNA could become a valuable tool in the IVF process.

The follicular fluid, in which free DNA is mainly found, is a suitable material for mitochondrial research as it constitutes the microenvironment necessary for the development of eggs and plays a decisive role in fertilization success and fetal development. In recent years, there has also been a trend in the study of mitochondrial biology in order to advance knowledge about the viability of preimplantation embryos created during assisted reproduction techniques.

In this PhD thesis, specific aspects of mitochondrial biology of follicles examined in order to demonstrate them as potential biomarkers in clinical embryology and reproductive biology and contribute to the advancement of modern Assisted Reproductive Medicine. Since it has been shown that high levels of free DNA and

especially free mitochondrial DNA may be associated with low-quality oocytes and reduced developmental potential of pre-embryos, it was considered appropriate to study their qualitative and quantitative expression, with the aim of investigating the potential clinical value of their levels. The main biological material that used was the follicular fluid, it collected from women undergoing IVF and analyzed with the real time PCR technique. Finally, we placed greater attention on the study of mitochondrial DNA, as it is thought that mitochondria represent the missing link that could relate the science of human reproduction to novel predictive and diagnostic interventions in infertility as well as potential new therapies.

Our analysis showed that the level of FF-cf-mtDNA was lower in the group of advanced- age women than in the groups of PCOS and those without any endocrine disorder. In addition, mtDNA copy number will be recorded to investigate whether this number is a reliable biomarker independent of morphology, age, aneuploidy and pre-implantation genetic testing and whether its use can lead to higher rates of successful implantation in women undergoing assisted reproduction.

Furthermore, a significant positive correlation was observed between FF-cf-mtDNA and the number of mature (MII) oocytes. Based on the findings of our study, there is an apparent contradiction about the fact that the follicular mtDNA/nDNA ratio increases with age, although the number of mitochondria itself has indeed decreased. Collectively, the data show that the relative ratio of cf-mtDNA to cf-nDNA content in human follicular fluid can be an effective predictor for assessing the corresponding oocyte's age-related performance in IVF.





## ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

AMH: αντι-Müllerian ορμόνη

ART: Artificial Reproductive Technologies ή υποβοηθούμενη αναπαραγωγική τεχνολογία

cf-DNA: cell free-DNA ή ελεύθερο DNA χωρίς κύτταρα

cf-mtDNA/cf-n DNA: αναλογία μιτοχονδριακό DNA προς πυρηνικό DNA

cf-mtDNA: cell free mitochondrial DNA ή μιτοχονδριακό DNA χωρίς κύτταρα

cf-nDNA: cell free nuclear DNA ή πυρηνικό DNA χωρίς κύτταρα

FF ή ΩΥ: Follicular Fluid ή ωοθυλακικό υγρό

FF-cf-mtDNA : follicular fluid cell free mitochondrial DNA ή ελεύθερο μιτοχονδριακό DNA στο ωοθυλακικό υγρό

FSH: Follicle Stimulating Hormone ή θυλακιοτρόπος ορμόνη

GC: κοκκώδη κύτταρα

IVF: In Vitro Fertilization ή εξωσωματική γονιμοποίηση

LH: Luteinizing Hormone ή ωχρινοτρόπος ορμόνη

mtDNA CN : mitochondrial DNA copies number ή αριθμός αντιγράφων του μιτοχονδριακού DNA

mtDNA: mitochondrial DNA ή μιτοχονδριακό DNA

nDNA : nuclear DNA ή πυρηνικό DNA

PCD: προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος

PCOS: Polycystic Ovary Syndrome , σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών

ROS: Reactive Oxygen Species ή δραστικές μορφές οξυγόνου



## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Joanna Wojsiat, Jerzy Korczyński, Marta Borowiecka, Halina Małgorzata Żbikowska : The role of oxidative stress in female infertility and in vitro fertilization Postepy Hig Med Dosw (Online) 2017 May 9;71(0):359-366. doi: 10.5604/01.3001.0010.3820.
2. Rosner, J. & Sarao, M. S. Physiology, Female Reproduction. StatPearls (StatPearls Publishing, 2019).
3. Alessandra Graziottin, Dania Gambini Anatomy and physiology of genital organs - women Handb Clin Neurol. 2015;130:39-60. doi: 10.1016/B978-0-444-63247-0.00004-3.
4. Διονύσιος Αραβαντινός. Φυσιολογία της Γυναίκας. (1982).
5. Markstrom, E.; Svensson, E.C.; Shao, R.; Svanberg, B.; Billig, H. Survival factors regulating ovarian apoptosis—Dependence on follicle differentiation. Reproduction 2002, 123, 23–30.
6. Yatsenko, S.A.; Rajkovic, A. Genetics of human female infertility. *Biol. Reprod.* 2019
7. Nicholas, C. R., Chavez, S. L., Baker, V. L. & Reijo Pera, R. A. Instructing an embryonic stem cell-derived oocyte fate: Lessons from endogenous oogenesis. Endocrine Reviews vol. 30 (2009).
8. Richards JS, Russell DL, Ochsner S, Espey LL. Ovulation: new dimensions and new regulators of the inflammatory-like response. Annu Rev Physiol. 2002
9. Mikhael, S., Punjala-Patel, A. & Gavrilova-Jordan, L. Hypothalamic-pituitary ovarian axis disorders impacting female fertility. Biomedicines vol. 7 (2019)
10. Millar, R. P. et al. Gonadotropin-releasing hormone receptors. Endocrine Reviews vol. 25 235–275 (2004).
11. Igarashi, M., Kamioka, J., Ehara, Y. & Matsumoto, S. Changes in human serum FSH levels during the normal menstrual cycle. Fertil. Steril. 18, 672–677 (1967).
12. Ray, A., Shah, A., Gudi, A. & Homburg, R. Unexplained infertility: An update and review of practice. Reproductive BioMedicine Online vol. 24 591–602 (2012).

13. Starc, A. et al. INFERTILITY AND SEXUAL DYSFUNCTIONS: A SYSTEMATIC LITERATURE REVIEW. *Acta Clin. Croat.* 58, 508–515 (2019).
14. Braverman, A. M. Psychosocial aspects of infertility: Sexual dysfunction. *Int. Congr. Ser.* 1266, 270–276 (2004).
15. Li D, Ding Z, Du K, Ye X, Cheng S. Reactive Oxygen Species as a Link between Antioxidant Pathways and Autophagy. *Oxid Med Cell Longev.* 2021 Jul 21;2021:5583215. doi: 10.1155/2021/5583215.
16. Sachdev, S., Ansari, S.A., Ansari, M.I. (2023). Reactive Oxygen Species (ROS): An Introduction. In: *Reactive Oxygen Species in Plants*. Springer, Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-19-9884-3\\_1](https://doi.org/10.1007/978-981-19-9884-3_1)
17. Liu, Z., Ren, Z., Zhang, J., Chuang, C.-C., Kandaswamy, E., Zhou, T., & Zuo, L. (2018). Role of ROS and Nutritional Antioxidants in Human Diseases. *Frontiers in Physiology*, 9. doi:10.3389/fphys.2018.00477
18. Kaltsas, A.; Zikopoulos, A.; Moustakli, E.; Zachariou, A.; Tsirka, G.; Tsiampali, C.; Palapela, N.; Sofikitis, N.; Dimitriadis, F. The Silent Threat to Women’s Fertility: Uncovering the Devastating Effects of Oxidative Stress. *Antioxidants* **2023**, *12*, 1490. <https://doi.org/10.3390/antiox12081490>
19. Agarwal A, Aponte-Mellado A, Premkumar BJ, Shaman A, Gupta S. The effects of oxidative stress on female reproduction: a review. *Reprod Biol Endocrinol.* 2012 Jun 29;10:49. doi: 10.1186/1477-7827-10-49.
20. Kaltsas, A.; Moustakli, E.; Zikopoulos, A.; Georgiou, I.; Dimitriadis, F.; Symeonidis, E.N.; Markou, E.; Michaelidis, T.M.; Tien, D.M.B.; Giannakis, I.; et al. Impact of Advanced Paternal Age on Fertility and Risks of Genetic Disorders in Offspring. *Genes* 2023, *14*, 486.
21. Vincent, H.K.; Taylor, A.J. Biomarkers and Potential Mechanisms of Obesity-Induced Oxidant Stress in Humans. *Int. J. Obes.* 2005, *30*, 400–418.
22. Brewer, C.T.; Balen, A.H. The Adverse Effects of Obesity on Conception and Implantation. *Reproduction* 2010, *140*, 347–364.
23. Higashi, Y.; Sasaki, S.; Nakagawa, K.; Kimura, M.; Noma, K.; Sasaki, S.; Hara, K.; Matsuura, H.; Goto, C.; Oshima, T.; et al. Low body mass index is a risk factor for

- impaired endothelium-dependent vasodilation in humans: Role of nitric oxide and oxidative stress. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2003, 42, 256–263
24. Huang, J.; Okuka, M.; McLean, M.; Keefe, D.L.; Liu, L. Effects of cigarette smoke on fertilization and embryo development in vivo. *Fertil. Steril.* 2009, 92, 1456–1465.
  25. Tiboni, G.M.; Bucciarelli, T.; Giampietro, F.; Sulpizio, M.; Di Ilio, C. Influence of cigarette smoking on vitamin E, vitamin A, beta-carotene and lycopene concentrations in human pre-ovulatory follicular fluid. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 2004, 17, 389–393.
  26. Ahmadi S, Abdolmaleki A, Jebeli Javan M. In silico study of natural antioxidants. *Vitam Horm.* 2023;121:1-43. doi: 10.1016/bs.vh.2022.09.001. Epub 2022 Nov 7. PMID: 36707131.
  27. Budani, M.C.; Tiboni, G.M. Effects of Supplementation with Natural Antioxidants on Oocytes and Preimplantation Embryos. *Antioxidants* 2020, 9, 612.
  28. Rumbold, A.; Ota, E.; Hori, H.; Miyazaki, C.; Crowther, C.A. Vitamin E supplementation in pregnancy. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2015, 2015, CD004069.
  29. Iervolino, M.; Lepore, E.; Forte, G.; Lagana, A.S.; Buzzaccarini, G.; Unfer, V. Natural Molecules in the Management of Polycystic Ovary Syndrome (PCOS): An Analytical Review. *Nutrients* 2021, 13, 1677.
  30. Modarres, S.Z.; Asemi, Z.; Heidar, Z. The effects of selenium supplementation on glycemic control, serum lipoproteins and biomarkers of oxidative stress in infertile women diagnosed with polycystic ovary syndrome undergoing in vitro fertilization: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Clin. Nutr. ESPEN* 2022, 51, 92–96.
  31. Bhardwaj, J.K., Panchal, H. & Saraf, P. Ameliorating Effects of Natural Antioxidant Compounds on Female Infertility: a Review. *Reprod. Sci.* **28**, 1227–1256 (2021). <https://doi.org/10.1007/s43032-020-00312-5>
  32. Ogunro PS, Bolarinde AA, Owa OO, Salawu AA, Oshodi AA. Antioxidant status and reproductive hormones in women during reproductive, perimenopausal and

- postmenopausal phase of life. *Afr J Med Med Sci*. 2014 Mar;43(1):49-57. PMID: 25335378.
33. Hennig B, Hammock BD, Slim R, Toborek M, Saraswathi V, Robertson LW. PCB-induced oxidative stress in endothelial cells: modulation by nutrients. *Int J Hyg Environ Health*. 2002 Mar;205(1-2):95-102. doi: 10.1078/1438-4639-00134. PMID: 12018021.
34. Bisht S, Faiq M, Tolahunase M, Dada R. Oxidative stress and male infertility. *Nat Rev Urol*. 2017 Aug;14(8):470-485. doi: 10.1038/nrurol.2017.69. Epub 2017 May 16. PMID: 28508879.
35. Bauer NC, Corbett AH, Doetsch PW. The current state of eukaryotic DNA base damage and repair. *Nucleic Acids Res*. 2015 Dec 2;43(21):10083-101. doi: 10.1093/nar/gkv1136. Epub 2015 Oct 30. PMID: 26519467; PMCID: PMC4666366.
36. Dorostghoal M, Kazeminejad SR, Shahbazian N, Pourmehdi M, Jabbari A. Oxidative stress status and sperm DNA fragmentation in fertile and infertile men. *Andrologia*. 2017 Dec;49(10). doi: 10.1111/and.12762. Epub 2017 Jan 26. PMID: 28124476.
37. Webster RP, Roberts VH, Myatt L. Protein nitration in placenta - functional significance. *Placenta*. 2008 Dec;29(12):985-94. doi: 10.1016/j.placenta.2008.09.003. Epub 2008 Oct 11. PMID: 18851882; PMCID: PMC2630542.
38. Florou P, Anagnostis P, Theocharis P, Chourdakis M, Goulis DG. Does coenzyme Q<sub>10</sub> supplementation improve fertility outcomes in women undergoing assisted reproductive technology procedures? A systematic review and meta-analysis of randomized-controlled trials. *J Assist Reprod Genet*. 2020 Oct;37(10):2377-2387. doi: 10.1007/s10815-020-01906-3. Epub 2020 Aug 7.
39. Adeoye O, Olawumi J, Opeyemi A, Christiania O. Review on the role of glutathione on oxidative stress and infertility. *JBRA Assist Reprod*. 2018 Mar 1;22(1):61-66. doi: 10.5935/1518-0557.20180003. PMID: 29266896; PMCID: PMC5844662.

40. Watson AL, Skepper JN, Jauniaux E, Burton GJ. Changes in concentration, localization and activity of catalase within the human placenta during early gestation. *Placenta*. 1998 Jan;19(1):27-34. doi: 10.1016/s0143-4004(98)90095-9. PMID: 9481782.
41. Mousavi R, Alizadeh M, Asghari Jafarabadi M, Heidari L, Nikbakht R, Babaahmadi Rezaei H, Karandish M. Effects of Melatonin and/or Magnesium Supplementation on Biomarkers of Inflammation and Oxidative Stress in Women with Polycystic Ovary Syndrome: a Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Biol Trace Elem Res*. 2022 Mar;200(3):1010-1019. doi: 10.1007/s12011-021-02725-y. Epub 2021 May 19. PMID: 34009514.
42. Steptoe, P. C., & Edwards, R. G. (1978). BIRTH AFTER THE REIMPLANTATION OF A HUMAN EMBRYO. *The Lancet*, 312(8085), 366. doi:10.1016/s0140-6736(78)92957-4
43. In vitro fertilization (IVF) - Mayo Clinic.
44. Palermo, G.; Joris, H.; Devroey, P.; Van Steirteghem, A. C. (1992-07-04). «[Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte](#)». *Lancet (London, England)* **340** (8810): 17–[ISSN 0140-6736](#). [PMID 1351601](#)
45. Filippi F, Meazza C, Paffoni A, Raspagliesi F, Terenziani M, Somigliana E. Egg Freezing in Childhood and Young Adult Cancer Survivors. *Pediatrics*. 2016 Oct 1;138(4).
46. Ευγονία, Μονάδα Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής “ Ανταγωνιστές της GnRH”
47. Orvieto R, Patrizio P. GnRH agonist versus GnRH antagonist in ovarian stimulation: an ongoing debate. *Reprod Biomed Online*. 2013 Jan;26(1):4-8. doi: 10.1016/j.rbmo.2012.11.001. Epub 2012 Nov 7. PMID: 23186555.
48. Lambalk CB, Banga FR, Huirne JA, Toftager M, Pinborg A, Homburg R, van der Veen F, van Wely M. GnRH antagonist versus long agonist protocols in IVF: a systematic review and meta-analysis accounting for patient type. *Hum Reprod Update*. 2017 Sep 1;23(5):560-579. doi: 10.1093/humupd/dmx017. PMID: 28903472.



49. Alper MM, Fauser BC. Ovarian stimulation protocols for IVF: is more better than less? *Reprod Biomed Online*. 2017 Apr;34(4):345-353. doi: 10.1016/j.rbmo.2017.01.010. Epub 2017 Jan 24. PMID: 28169189.
50. Grynnerup AG, Lindhard A, Sørensen S. The role of anti-Müllerian hormone in female fertility and infertility – an overview, May 2012 <https://doi.org/10.1111/j.1600-0412.2012.01471.x>
51. La Marca, A., Sunkara, S. K., & Individualized FSH dosing in IVF Consortium (2019). Individualized FSH dosing in IVF: what evidence do we have? *Human reproduction update*, 25(2), 221-237. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmy046>.
52. Torpy JM, Lynn C, Glass RM. JAMA patient page. Polycystic ovary syndrome. *JAMA*. 2007 Feb 7;297(5):554. doi: 10.1001/jama.297.5.554. PMID: 17284706.
53. Salvetti NR, Panzani CG, Gimeno EJ, Neme LG, Alfaro NS, Ortega HH (2009) An imbalance between apoptosis and proliferation contributes to follicular persistence in polycystic ovaries in rats. *Reprod Biol Endocrinol* 7:68. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-7-68>
54. Erin K Barthelmess, Rajesh K Naz Polycystic ovary syndrome: current status and future perspective, *Front Biosci (Elite Ed)* 2014 Jan 1;6(1):104-19. doi: 10.2741/e695.
55. Ding, Y., Xia, B.H., Zhang, C.J., and Zhuo, G.C. (2018). Mitochondrial tRNA (Leu (UUR)) C3275T, tRNA (Gln) T4363C and tRNA (Lys) A8343G mutations may be associated with PCOS and metabolic syndrome. *Gene* 642, 299–306
56. Jia, L., Li, J., He, B., Jia, Y., Niu, Y., Wang, C., et al. (2016). Abnormally activated one-carbon metabolic pathway is associated with mtDNA hypermethylation and mitochondrial malfunction in the oocytes of polycystic gilt ovaries. *Sci Rep* 6, 19436.
57. Group, R.E.A.S.P.C.W., 2004. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS). *Hum. Reprod.* 19(1), 41–47.
58. Teede, H.J., Misso, M.L., Costello, M.F., Dokras, A., Laven, J., Moran, L., et al. (2018). Recommendations from the international evidence-based guideline for the

assessment and management of polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod* 33, 1602–1618

59. Zhang J, Bao Y, Zhou X, Zheng L. Polycystic ovary syndrome and mitochondrial dysfunction. *Reprod Biol Endocrinol*. 2019 Aug 16;17(1):67. doi: 10.1186/s12958-019-0509-4. PMID: 31420039; PMCID: PMC6698037.
60. Saeed, N.A.A.A.H., Hamzah, I.H. & Al-Gharrawi, S.A.R. Polycystic ovary syndrome dependency on mtDNA mutation; copy Number and its association with insulin resistance. *BMC Res Notes* **12**, 455 (2019). <https://doi.org/10.1186/s13104-019-4453-3>
61. Finsterer, J. Mitochondrial Dysfunction in Polycystic Ovary Syndrome. *Reprod. Sci.* **30**, 1435–1442 (2023). <https://doi.org/10.1007/s43032-022-01100-z>
62. Wiesner RJ, Ruegg JC, Morano I. Counting target molecules by exponential polymerase chain reaction: copy number of mitochondrial DNA in rat tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 183:553–559.
63. Hutchison CAI, Newbold JE, Potter SS, et al. Maternal inheritance of mammalian mitochondrial DNA. *Nature* 1974; 251:536–539.
64. Cummins, J.M. Fertilization and elimination of the paternal mitochondrial genome. *Hum. Reprod.* 2000, 15 (Suppl. S2), 92–101.
65. Schatten H, Sun QY, Prather R. The impact of mitochondrial function/dysfunction on IVF and new treatment possibilities for infertility. *Reprod Biol Endocrinol*. 2014 Nov 24;12:111. doi: 10.1186/1477-7827-12-111. PMID: 25421171; PMCID: PMC4297407.
66. Song, W.-H.; Ballard, J.W.O.; Yi, Y.-J.; Sutovsky, P. Regulation of Mitochondrial Genome Inheritance by Autophagy and Ubiquitin Proteasome System: Implications for Health, Fitness, and Fertility. *BioMed Res. Int.* 2014, 2014, 981867
67. Nicholls TJ, Gustafsson CM. Separating and Segregating the Human Mitochondrial Genome. *Trends Biochem Sci.* 2018 Nov;43(11):869-881. doi: 10.1016/j.tibs.2018.08.007. Epub 2018 Sep 14. PMID: 30224181.
68. Fragouli E, Spath K, Alfarawati S, Kaper F, Craig A, Michel C-E, et al. (2015) Altered Levels of Mitochondrial DNA Are Associated with Female Age,

- Aneuploidy, and Provide an Independent Measure of Embryonic Implantation Potential. *PLoS Genet* 11(6): e1005241. doi:10.1371/journal.pgen.1005241
69. Ogino M, Tsubamoto H, Sakata K, Oohama N, Hayakawa H, Kojima T, Shigeta M, Shibahara H. Mitochondrial DNA copy number in cumulus cells is a strong predictor of obtaining good-quality embryos after IVF. *J Assist Reprod Genet.* 2016 Mar;33(3):367-371. doi: 10.1007/s10815-015-0621-0. Epub 2016 Jan 9. PMID: 26749386; PMCID: PMC4785166.
70. Reynier P, May-Panloup P, Chrétien MF, Morgan CJ, Jean M, Savagner F, Barrière P, Malthiery Y. Mitochondrial DNA content affects the fertilizability of human oocytes. *Mol Hum Reprod.* 2001 May;7(5):425-9. doi: 10.1093/molehr/7.5.425. PMID: 11331664.
71. Zou W, Slone J, Cao Y, Huang T. Mitochondria and Their Role in Human Reproduction. *DNA Cell Biol.* 2020 Aug;39(8):1370-1378. doi: 10.1089/dna.2019.4807. Epub 2019 Oct 11. PMID: 31603716.
72. Daria Popova, Priya Bhide, Francesco D'Antonio, Purusotam Basnet, Ganesh Acharya Sperm mitochondrial DNA copy numbers in normal and abnormal semen analysis: A systematic review and meta-analysis (2021) *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology* published by John Wiley & Sons Ltd. <https://doi.org/10.1111/1471-0528.17078>
73. Mandel, P.; Metais, P. Nuclear Acids In Human Blood Plasma. *C. R. Seances Soc. Biol. Fil.* 1948, 142, 241–243.
74. Meddeb, R.; Dache, Z.A.A.; Thezenas, S.; Otandault, A.; Tanos, R.; Pastor, B.; Sanchez, C.; Azzi, J.; Tusch, G.; Azan, S.; et al. Quantifying circulating cell-free DNA in humans. *Sci. Rep.* 2019, 9, 5220.
75. Pös O., Biró O., Szemes T, Nagy B. Circulating cell-free nucleic acids: characteristics and applications, *European Journal of Human Genetics* (2018) 26:937.
76. Sun, Y.; An, K.; Yang, C. Circulating Cell-Free DNA. In *Liquid Biopsy*; Strumfa, I., Gardovskis, J., Eds.; IntechOpen: London, UK, 2019. Available online:

<https://www.intechopen.com/books/liquid-biopsy/circulating-cell-free-dna>  
(accessed on 24 May 2023)

77. Kustanovich, A.; Schwartz, R.; Peretz, T.; Grinshpun, A. Life and death of circulating cell-free DNA. *Cancer Biol. Ther.* 2019, 20, 1057–1067.
78. Henikoff, S.; Church, G.M. Simultaneous Discovery of Cell-Free DNA and the Nucleosome Ladder. *Genetics* 2018, 209, 27–29.
79. Thierry, A.R.; El Messaoudi, S.; Gahan, P.B.; Anker, P.; Stroun, M. Origins, structures, and functions of circulating DNA in oncology. *Cancer Metastasis Rev.* 2016, 35, 347–376.
80. Ranucci R. Cell-Free DNA: Applications in Different Diseases. *Methods Mol Biol.* 2019;1909:3-12. doi: 10.1007/978-1-4939-8973-7\_1. PMID: 30580419.
81. Scalici E, Traver S, Molinari N, Mullet T, Monforte M, Vintejoux E, Hamamah S. Cell-free DNA in human follicular fluid as a biomarker of embryo quality. *Hum Reprod.* 2014 Dec;29(12):2661-9. doi: 10.1093/humrep/deu238. Epub 2014 Sep 29. PMID: 25267787.
82. Traver S, Scalici E, Mullet T, Molinari N, Vincens C, Anahory T, Hamamah S. Cell-free DNA in Human Follicular Microenvironment: New Prognostic Biomarker to Predict in vitro Fertilization Outcomes. *PLoS One.* 2015 Aug 19;10(8):e0136172. doi: 10.1371/journal.pone.0136172. PMID: 26288130; PMCID: PMC4545729.
83. Basuino L, Silveira CF Jr. Human follicular fluid and effects on reproduction. *JBRA Assist Reprod.* 2016 Mar 1;20(1):38-40. doi: 10.5935/1518-0557.20160009. PMID: 27203305.
84. Revelli A, Delle Piane L, Casano S, Molinari E, Massobrio M, Rinaudo P. Follicular fluid content and oocyte quality: from single biochemical markers to metabolomics. *Reprod Biol Endocrinol.* 2009 May 4;7:40. doi: 10.1186/1477-7827-7-40. PMID: 19413899; PMCID: PMC2685803.
85. Baka S, Malamitsi-Puchner A. Novel follicular fluid factors influencing oocyte developmental potential in IVF: a review. *Reprod Biomed Online.* 2006 Apr;12(4):500-6. doi: 10.1016/s1472-6483(10)62005-6. PMID: 16740225.

86. Bianchi L, Gagliardi A, Landi C, Focarelli R, De Leo V, Luddi A, Bini L, Piomboni P. Protein pathways working in human follicular fluid: the future for tailored IVF? *Expert Rev Mol Med*. 2016 May 6;18:e9. doi: 10.1017/erm.2016.4. PMID: 27149979.
87. Martignano F. Cell-Free DNA: An Overview of Sample Types and Isolation Procedures. *Methods Mol Biol*. 2019;1909:13-27. doi: 10.1007/978-1-4939-8973-7\_2. PMID: 30580420.
88. Cell-free DNA as Diagnostic Markers: Methods and Protocols, *Methods in Molecular Biology*, vol. 1909, [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8973-7\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8973-7_2)
89. Vera-Rodriguez M, Diez-Juan A, Jimenez-Almazan J, Martinez S, Navarro R, Peinado V, Mercader A, Meseguer M, Blesa D, Moreno I, Valbuena D, Rubio C, Simon C. Origin and composition of cell-free DNA in spent medium from human embryo culture during preimplantation development. *Hum Reprod*. 2018 Apr 1;33(4):745-756. doi: 10.1093/humrep/dey028. PMID: 29471395.
90. Czamanski-Cohen J, Sarid O, Cwikel J, Lunenfeld E, Douvdevani A, Levitas E, et al. Increased plasma cell-free DNA is associated with low pregnancy rates among women undergoing IVF-embryo transfer. *Reprod Biomed Online* 2013;26: 36–41. pmid:23182744
91. Casteleiro Alves, M.M.; Oliani, L.; Almeida, M.; Cardoso, H.J.; Oliani, A.H.; Breitenfeld, L.; Ramalhinho, A.C. Cell-Free DNA as a New Biomarker of IVF Success, Independent of Any Infertility Factor, Including Endometriosis. *Diagnostics* **2023**, *13*, 208 <https://doi.org/10.3390/diagnostics13020208>
92. Qasemi, M., Mahdian, R. & Amidi, F. Cell-free DNA discoveries in human reproductive medicine: providing a new tool for biomarker and genetic assays in ART. *J Assist Reprod Genet* **38**, 277–288 (2021). <https://doi.org/10.1007/s10815-020-02038-4>
93. Traver, S.; Assou, S.; Scalici, E.; Haouzi, D.; Al-Edani, T.; Belloc, S.; Hamamah, S. Cell-free nucleic acids as non-invasive biomarkers of gynecological cancers, ovarian, endometrial and obstetric disorders and fetal aneuploidy. *Hum. Reprod. Update* **2014**, *20*, 905–923.

94. Dimopoulou, M.; Anifandis, G.; Messini, C.I.; Dafopoulos, K.; Kouris, S.; Sotiriou, S.; Satra, M.; Vamvakopoulos, N.; Messinis, I.E. Follicular Fluid Oocyte/Cumulus-Free DNA Concentrations as a Potential Biomolecular Marker of Embryo Quality and IVF Outcome. *BioMed Res. Int.* **2014**, *2014*, 289306.
95. Ichikawa K, Shibahara H, Shirasuna K, Kuwayama T, Iwata H. Cell-free DNA content in follicular fluid: A marker for the developmental ability of porcine oocytes. *Reprod Med Biol.* 2019 Dec 21;19(1):95-103. doi: 10.1002/rmb2.12309. PMID: 31956291; PMCID: PMC6955585.
96. Liu, Y., Yu, Z., Zhao, S. *et al.* Oxidative stress markers in the follicular fluid of patients with polycystic ovary syndrome correlate with a decrease in embryo quality. *J Assist Reprod Genet* **38**, 471–477 (2021). <https://doi.org/10.1007/s10815-020-02014-y>
97. Liu, Y., Shen, Q., Zhao, X. *et al.* Cell-free mitochondrial DNA in human follicular fluid: a promising bio-marker of blastocyst developmental potential in women undergoing assisted reproductive technology. *Reprod Biol Endocrinol* **17**, 54 (2019). <https://doi.org/10.1186/s12958-019-0495-6>. PMID: 31291946; PMCID: PMC6621940.
98. Kohler, C.; Radpour, R.; Barekati, Z.; Asadollahi, R.; Bitzer, J.; Wight, E.; Bürki, N.; Diesch, C.; Holzgreve, W.; Zhong, X.Y. Levels of plasma circulating cell free nuclear and mitochondrial DNA as potential biomarkers for breast tumors. *Mol. Cancer* 2009, 8, 105.
99. Ellinger, J.; Albers, P.; Müller, S.C.; Von Ruecker, A.; Bastian, P.J. Circulating mitochondrial DNA in the serum of patients with testicular germ cell cancer as a novel noninvasive diagnostic biomarker. *BJU Int.* 2009, 104, 48–52.
100. Rao, M.; Zhou, F.; Tang, L.; Zeng, Z.; Hu, S.; Wang, Y.; Ke, D.; Cheng, G.; Xia, W.; Zhang, L.; et al. Follicular fluid humanin concentration is related to ovarian reserve markers and clinical pregnancy after IVF–ICSI: A pilot study. *Reprod. Biomed. Online* 2019, 38, 108–117.
101. Dumesic, D.A.; Meldrum, D.R.; Katz-Jaffe, M.G.; Krisher, R.L.; Schoolcraft, W.B. Oocyte environment: Follicular fluid and cumulus cells are critical for oocyte health. *Fertil. Steril.* 2015, 103, 303–316.

102. Shen, M.; Jiang, Y.; Guan, Z.; Cao, Y.; Sun, S.; Liu, H. FSH protects mouse granulosa cells from oxidative damage by repressing mitophagy. *Sci. Rep.* 2016, 6, 38090.
103. Shen, Q.; Liu, Y.; Li, H.; Zhang, L. Effect of mitophagy in oocytes and granulosa cells on oocyte quality. *Biol. Reprod.* 2021, 104, 294–304.
104. Huo P, Zhang N, Zhang P, Wu X. The levels of follicular fluid cell-free mitochondrial DNA could serve as a biomarker for pregnancy success in patients with small ovarian endometriosis cysts: A case-control study. *Medicine (Baltimore)*. 2020 Nov 25;99(48):e23348. doi: 10.1097/MD.00000000000023348. PMID: 33235102; PMCID: PMC7710174.
105. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007 Jun;35(4):495-516. doi: 10.1080/01926230701320337. PMID: 17562483; PMCID: PMC2117903.
106. Tsujimoto Y. Role of Bcl-2 family proteins in apoptosis: apoptosomes or mitochondria? *Genes Cells.* 1998 Nov;3(11):697-707. doi: 10.1046/j.1365-2443.1998.00223.x. PMID: 9990505.
107. Nirmala GJ, Lopus M (2020). "Cell death mechanisms in eukaryotes". *Cell Biol Toxicol.* 36 (2): 145–164. doi:10.1007/s10565-019-09496-2
108. Rock, Kenneth (2008). "[The inflammatory response to cell death](#)". *Annual Review of Pathology.* 3:99126. doi:10.1146/annurev.pathmechdis.3.121806.151456. [PMC 3094097](#). [PMID 18039143](#)
109. Proskuryakov SY, Konoplyannikov AG, Gabai VL (2003). "Necrosis: a specific form of programmed cell death?". *Exp. Cell Res.* **283** (1): 1–16. doi:10.1016/S0014-4827(02)00027-7. [PMID 12565815](#)
110. Bertheloot, D., Latz, E. & Franklin, B.S. Necroptosis, pyroptosis and apoptosis: an intricate game of cell death. *Cell Mol Immunol* **18**, 1106–1121 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41423-020-00630-3>

111. D'Arcy MS. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol Int*. 2019 Jun;43(6):582-592. doi: 10.1002/cbin.11137. Epub 2019 Apr 25. PMID: 30958602.
112. Ashrafi G, Schwarz TL. The pathways of mitophagy for quality control and clearance of mitochondria. *Cell Death Differ*. 2013 Jan;20(1):31-42. doi: 10.1038/cdd.2012.81. Epub 2012 Jun 29. PMID: 22743996; PMCID: PMC3524633.
113. Popov LD. Mitochondrial biogenesis: An update. *J Cell Mol Med*. 2020 May;24(9):4892-4899. doi: 10.1111/jcmm.15194. Epub 2020 Apr 12. PMID: 32279443; PMCID: PMC7205802.
114. Jornayvaz FR, Shulman GI. Regulation of mitochondrial biogenesis. *Essays Biochem*. 2010;47:69-84. doi: 10.1042/bse0470069. PMID: 20533901; PMCID: PMC3883043.
115. Ding, Q.; Qi, Y.; Tsang, S.-Y. Mitochondrial Biogenesis, Mitochondrial Dynamics, and Mitophagy in the Maturation of Cardiomyocytes. *Cells* **2021**, *10*, 2463. <https://doi.org/10.3390/cells10092463>
116. Mitophagy: mechanisms, pathophysiological roles, and analysis. (2019). *Biological Chemistry*, 400(6), 487-501. <https://doi.org/10.1515/hsz-2018-0344>
117. Excessive mitophagy, reduced mitochondrial biogenesis, and their interactions contribute to neurodegeneration in Parkinson's disease. (2020). *Journal of Neuroscience Research*, 98(10), 1959-1974.
118. Mitochondrial dynamics: biogenesis, fission, fusion, and mitophagy in the regulation of stem cell behaviors. (2019). *Stem Cells International*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/9757201>
119. Margherita Protasoni and Massimo Zeviani: Mitochondrial Structure and Bioenergetics in Normal and Disease Conditions *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22(2),586; <https://doi.org/10.3390/ijms22020586>
120. Ashrafi, G., Schwarz, T. The pathways of mitophagy for quality control and clearance of mitochondria. *Cell Death Differ* **20**, 31–42 (2013). <https://doi.org/10.1038/cdd.2012.81>



121. Babayev E, Duncan FE. Age-associated changes in cumulus cells and follicular fluid: the local oocyte microenvironment as a determinant of gamete quality. *Biology of Reproduction*. 2022 Feb;106(2):351-365. DOI: 10.1093/biolre/ioab241. PMID: 34982142; PMCID: PMC8862720.
122. Elnur Babayev, Francesca E Duncan, Age-associated changes in cumulus cells and follicular fluid: the local oocyte microenvironment as a determinant of gamete quality, *Biology of Reproduction*, Volume 106, Issue 2, February 2022, Pages 351–365, <https://doi.org/10.1093/biolre/ioab241>
123. Vollenhoven B, Hunt S. Ovarian ageing and the impact on female fertility. *F1000Res*. 2018 Nov 22;7:F1000 Faculty Rev-1835. doi: 10.12688/f1000research.16509.1. PMID: 30542611; PMCID: PMC6259486.
124. Chua SJ, Danhof NA, Mochtar MH, van Wely M, McLernon DJ, Custers I, Lee E, Dreyer K, Cahill DJ, Gillett WR, Righarts A, Strandell A, Rantsi T, Schmidt L, Eijkemans MJC, Mol BWJ, van Eekelen R. Age-related natural fertility outcomes in women over 35 years: a systematic review and individual participant data meta-analysis. *Hum Reprod*. 2020 Aug 1;35(8):1808-1820. doi: 10.1093/humrep/deaa129. PMID: 32696041.
125. Wang, Jw., Lyu, Yn., Qiao, B. *et al.* Cell-free fetal DNA testing and its correlation with prenatal indications. *BMC Pregnancy Childbirth* **21**, 585 (2021). <https://doi.org/10.1186/s12884-021-04044-5>
126. Tsirka, G.; Zikopoulos, A.; Papageorgiou, K.; Kostoulas, C.; Tsigkas, I.; Moustakli, E.; Kaltsas, A.; Sarafi, E.; Michaelidis, T.M.; Georgiou, I. The Ratio of cf-mtDNA vs. cf-nDNA in the Follicular Fluid of Women Undergoing IVF Is Positively Correlated with Age. *Genes* **2023**, *14*, 1504. <https://doi.org/10.3390/genes14071504>
127. Deepak Adhikari, In-won Lee, Wai Shan Yuen, John Carroll, Oocyte mitochondria—key regulators of oocyte function and potential therapeutic targets for improving fertility, *Biology of Reproduction*, Volume 106, Issue 2, February 2022, Pages 366–377, <https://doi.org/10.1093/biolre/ioac024>

128. Kirillova A, Smitz JEJ, Sukhikh GT, Mazunin I. The Role of Mitochondria in Oocyte Maturation. *Cells*. 2021 Sep;10(9):2484. DOI: 10.3390/cells10092484. PMID: 34572133; PMCID: PMC8469615.
129. Gong Y, Huang Q, Deng Y, Zhou L, Yi X, Zhu J, Wu W. Analysis of cf-mtDNA and cf-nDNA fragment size distribution using different isolation methods in BV-2 cell supernatant of starvation-induced autophagy. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*. 2022 Jan;1869(1):119147. doi: 10.1016/j.bbamcr.2021.119147. Epub 2021 Sep 30. PMID: 34600918.
130. Pascale May-Panloup, Lisa Boucret, Juan-Manuel Chao de la Barca, Valérie Desquiret-Dumas, Véronique Ferré-L'Hotellier, Catherine Morinière, Philippe Descamps, Vincent Procaccio, Pascal Reynier, Ovarian ageing: the role of mitochondria in oocytes and follicles, *Human Reproduction Update*, Volume 22, Issue 6, 20 November 2016, Pages 725–743, <https://doi.org/10.1093/humupd/dmw028>
131. Giulivi, C., Zhang, K. & Arakawa, H. Recent advances and new perspectives in mitochondrial dysfunction. *Sci Rep* **13**, 7977 (2023). <https://doi.org/10.1038/s41598-023-34624-8>
132. Kang, X., Yan, L. & Wang, J. Spatiotemporal Distribution and Function of Mitochondria in Oocytes. *Reprod. Sci.* (2023). <https://doi.org/10.1007/s43032-023-01331-8>
133. Yang, S. C., Yu, E. J., Park, J. K., Kim, T. H., Eum, J. H., Paek, S. K., Hwang, J. Y., Lyu, S. W., Kim, J. Y., Lee, W. S., Yoon, T. K., Song, H., & Lee, H. J. (2021). The Ratio of Mitochondrial DNA to Genomic DNA Copy Number in Cumulus Cell May Serve as a Biomarker of Embryo Quality in IVF Cycles. *Reproductive Sciences*, 28(8), 2495–2502. <https://doi.org/10.1007/s43032-021-00532-3>
134. Zhu, Zhengmao, Xu, Wanxue and Liu, Lin. "Ovarian aging: mechanisms and intervention strategies" *Medical Review*, vol. 2, no. 6, 2022, pp. 590-610. <https://doi.org/10.1515/mr-2022-0031>
135. Filograna R, Mennuni M, Alsina D, Larsson NG. Mitochondrial DNA copy number in human disease: the more the better? *FEBS Lett*. 2021 Apr;595(8):976-

1002. doi: 10.1002/1873-3468.14021. Epub 2020 Dec 25. PMID: 33314045; PMCID: PMC8247411.
136. Chistiakov DA, Sobenin IA, Revin VV, Orekhov AN, Bobryshev YV. Mitochondrial aging and age-related dysfunction of mitochondria. *Biomed Res Int*. 2014;2014:238463. doi: 10.1155/2014/238463. Epub 2014 Apr 10. PMID: 24818134; PMCID: PMC4003832.
137. Okada, T., McIlpatrick, S., Hin, N., Aryamanesh, N., Breen, J., & St. John, J. C. (2022). Mitochondrial supplementation of *Sus scrofa* metaphase II oocytes alters DNA methylation and gene expression profiles of blastocysts. *Epigenetics & Chromatin*, 15(1), 12. <https://doi.org/10.1186/s13072-022-00442-x>
138. Zhao, D., Bartz, T.M., Sotoodehnia, N. *et al.* Mitochondrial DNA copy number and incident atrial fibrillation. *BMC Med* **18**, 246 (2020). <https://doi.org/10.1186/s12916-020-01715-6>
139. Udesen, P.B., Sørensen, A.E., Joglekar, M.V. *et al.* Levels of circulating insulin cell-free DNA in women with polycystic ovary syndrome – a longitudinal cohort study. *Reprod Biol Endocrinol* **17**, 34 (2019). <https://doi.org/10.1186/s12958-019-0478-7>
140. Zeng X, Huang Q, Long SL, Zhong Q, Mo Z. Mitochondrial Dysfunction in Polycystic Ovary Syndrome. *DNA Cell Biol*. 2020 Aug;39(8):1401-1409. doi: 10.1089/dna.2019.5172. Epub 2020 Feb 20. PMID: 32077751.
141. Qasemi M, Aleyasin A, Mahdian R, Ghanami Gashti N, Shabani Nashtaei M, Ashrafnezhad Z, Amidi F. Cell-free mtDNA level and its biomarker potency for ART outcome are different in follicular fluid of PCOS and non-PCOS women. *Mitochondrion*. 2021 Jul;59:30-36. doi: 10.1016/j.mito.2021.04.003. Epub 2021 Apr 9. PMID: 33839320.
142. Sadeghi, H.M.; Adeli, I.; Calina, D.; Docea, A.O.; Mousavi, T.; Daniali, M.; Nikfar, S.; Tsatsakis, A.; Abdollahi, M. Polycystic Ovary Syndrome: A Comprehensive Review of Pathogenesis, Management, and Drug Repurposing. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 583. <https://doi.org/10.3390/ijms23020583>

143. Siemers KM, Klein AK, Baack ML. Mitochondrial Dysfunction in PCOS: Insights into Reproductive Organ Pathophysiology. *Int J Mol Sci*. 2023;24(17):13123. Published 2023 Aug 23. doi:10.3390/ijms241713123
144. Polycystic ovary syndrome (PCOS)- Mayo clinic
145. [FSH levels: Normal ranges, symptoms of high and low, and more](#) : Medically reviewed by Carolyn Kay, M.D. — By Rachel Nall, MSN, CRNA — Updated on March 15, 2023 <https://www.medicalnewstoday.com/articles/317746>
146. Ran Y, Yi Q, Li C. The Relationship of Anti-Mullerian Hormone in Polycystic Ovary Syndrome Patients with Different Subgroups. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2021 Mar 25;14:1419-1424. doi: 10.2147/DMSO.S299558. PMID: 33790608; PMCID: PMC8006968.
147. Yan YY, Guo QR, Wang FH, Adhikari R, Zhu ZY, Zhang HY, Zhou WM, Yu H, Li JQ, Zhang JY. Cell-Free DNA: Hope and Potential Application in Cancer. *Front Cell Dev Biol*. 2021 Feb 22;9:639233. doi: 10.3389/fcell.2021.639233. PMID: 33693004; PMCID: PMC7938321.
148. Ee, C., Pirotta, S., Mousa, A. *et al.* Providing lifestyle advice to women with PCOS: an overview of practical issues affecting success. *BMC Endocr Disord* **21**, 234 (2021). <https://doi.org/10.1186/s12902-021-00890-8>
149. Teo YV, Capri M, Morsiani C, Pizza G, Faria AMC, Franceschi C, Neretti N. Cell-free DNA as a biomarker of aging. *Aging Cell*. 2019 Feb;18(1):e12890. doi: 10.1111/accel.12890. Epub 2018 Dec 20. PMID: 30575273; PMCID: PMC6351822.
150. Milsom SR, Sowter MC, Carter MA, Knox BS, Gunn AJ. LH levels in women with polycystic ovarian syndrome: have modern assays made them irrelevant? *BJOG*. 2003 Aug;110(8):760-4. PMID: 12892688.
151. [LH Levels in Women During Menstrual Cycle | Natalist](#)
152. Aghadavod, E. et al. Isolation of granulosa cells from follicular fluid; applications in biomedical and molecular biology experiments. *Advanced Biomedical Research* 4, 250 (2015).
153. Κεφάλαιο 7 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης Δ. Παλαιολόγου, Ε. Κατσαρέλη και Γ. Παπανικολάου

154. Bustin, S. A., Benes, V., Nolan, T., and Pfaffl, M. W. (2005). Quantitative real-time RT-PCR--a perspective. *J Mol Endocrinol* 34, 597-601.
155. The Rotterdam ESHRE/ASRM-sponsored PCOS consensus workshop group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS). *Hum Reprod.* 2004 Jan 1;19(1):41–7.
156. Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods* 2001, 25, 402–408.
157. Quiros, P.M.; Goyal, A.; Jha, P.; Auwerx, J. Analysis of mtDNA/nDNA Ratio in Mice. *Curr. Protoc. Mouse Biol.* 2017, 7, 47–54
158. Amin Alizadegan, Hassan Dianat-Moghadam, Nasrin Shadman, Mohammad Nouri, Kobra Hamdi, Alieh Ghasemzadeh, Maryam Akbarzadeh, Parisa Sarvarian, Amir Mehdizadeh, Sanam Dolati, Mehdi Yousefi,
159. Application of cell free DNA in ART, Placenta, Volume 120, 2022, Pages 18-24, <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2022.02.003>
160. Stojanovski, D.; Johnston, A.J.; Streimann, I.; Hoogenraad, N.J.; Ryan, M.T. Import of Nuclear-Encoded Proteins into Mitochondria. *Exp. Physiol.* 2003, 88, 57–64.
161. Kummer, E., Ban, N. Mechanisms and regulation of protein synthesis in mitochondria. *Nat Rev Mol Cell Biol* 22, 307–325 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00332-2>
162. Stewart, J.B.; Chinnery, P.F. The dynamics of mitochondrial DNA heteroplasmy: Implications for human health and disease. *Nat. Rev. Genet.* 2015, 16, 530–542.
163. Wanderoy, S.; Hees, J.T.; Klesse, R.; Edlich, F.; Harbauer, A.B. Kill one or kill the many: Interplay between mitophagy and apoptosis. *Biol. Chem.* 2020, 402, 73–88.
164. Bloemberg, D.; Quadrilatero, J. Autophagy, apoptosis, and mitochondria: Molecular integration and physiological relevance in skeletal muscle. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* 2019, 317, C111–C130.

165. Fragouli, E.; McCaffrey, C.; Ravichandran, K.; Spath, K.; Grifo, J.A.; Munné, S.; Wells, D. Clinical implications of mitochondrial DNA quantification on pregnancy outcomes: A blinded prospective non-selection study. *Hum. Reprod.* 2017, 32, 2340–2347.



