



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΟΣ

ΚΛΙΝΙΚΗ ΜΑΙΕΥΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΣΤΗΝ ΚΛΙΝΙΚΗ ΠΡΑΞΗ

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΪΚΗΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣ ΣΤΑ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΑ
ΚΥΤΤΑΡΑ**

ΕΙΡΗΝΗ Κ. ΜΑΣΤΟΡΑ

ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2019



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΟΣ

ΚΛΙΝΙΚΗ ΜΑΙΕΥΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΣΤΗΝ ΚΛΙΝΙΚΗ ΠΡΑΞΗ

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΪΚΗΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣ ΣΤΑ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΑ
ΚΥΤΤΑΡΑ**

ΕΙΡΗΝΗ Κ. ΜΑΣΤΟΡΑ

ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2019

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 κ. Μάστορα Ειρήνης: 4-3-2016

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 786^α/29-3-2016

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Γεωργίου Ιωάννης, Καθηγητής Ιατρικής Γενετικής και Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής της Μαιευτικής-Γυναικολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Πασχόπουλος Μηνάς, Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Βρεκούσης Θωμάς, Επίκουρος Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας με έμφαση στη Γυναικολογική Ογκολογία του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 9-5-2019

«Μελέτη της ικής παρουσίας στα αναπαραγωγικά κύτταρα»

ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ 906^α/25-11-2019

Γεωργίου Ιωάννης	Καθηγητής Ιατρικής Γενετικής και Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής της Μαιευτικής-Γυναικολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Ζηκόπουλος Κωνσταντίνος	Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας με έμφαση στην Υποβοηθούμενη Αναπαραγωγή του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Μπατιστάτου Άννα	Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Παρασκευαΐδης Ευάγγελος	Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Πασχόπουλος Μηνάς	Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Γκαρτζονίκα Κωνσταντίνα	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Βρεκούσης Θωμάς	Επίκουρος Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 2-12-2019

Ιωάννινα 4-12-2019

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Άννα Μπατιστάτου

Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας



Η Γραμματέας του Τμήματος

ΜΑΡΙΑ ΚΑΠΙΤΟΠΟΥΛΟΥ

The single biggest threat to man's continued dominance on the planet is the virus...

Joshua Lederberg, 1925-2008, microbiologist, virologist, geneticist

Nobel in Physiology or Medicine, 1958

Πρόλογος

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Ιωάννη Γεωργίου, Καθηγητή Ιατρικής Γενετικής και Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής της Μαιευτικής-Γυναικολογίας και Κοσμήτορα της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, για την επίβλεψη της διδακτορικής μου διατριβής, αλλά κυρίως για τη σπουδαία και πολυεπίπεδη επιστημονική του καθοδήγηση. Ήταν πάντοτε πρόθυμος για κάθε συζήτηση και κατανοητικός σε κάθε προβληματισμό μου. Νιώθω ευγνώμων που με εμπιστεύθηκε και δέχθηκε να κατευθύνει την ερευνητική μου πορεία. Τον ευχαριστώ θερμά για τη συνολική αποδοχή του.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Μηνά Πασχόπουλο, Καθηγητή Μαιευτικής-Γυναικολογίας και Αντιπρύτανη του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, για την ευγένεια και τη δεκτικότητα του, τον κ. Θωμά Βρεκούση, Επίκουρο Καθηγητή Μαιευτικής-Γυναικολογίας με έμφαση στη Γυναικολογική Ογκολογία, για τις εξαιρετικά εύστοχες, καίριες και μελετημένες επιστημονικές του παρατηρήσεις και τον κ. Κωνσταντίνο Ζηκόπουλο, Καθηγητή Μαιευτικής-Γυναικολογίας με έμφαση στην Υποβοηθούμενη Αναπαραγωγή, για την ουσιαστική στήριξή του σ' εμένα.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα την κ. Άννα Μπατιστάτου, Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας και Πρόεδρο του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, τον κ. Ευάγγελο Παρασκευαΐδη, Καθηγητή Μαιευτικής-Γυναικολογίας και την κ. Κωνσταντίνα Γκαρτζονίκα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας, για τη συμμετοχή τους στη συνολική αξιολόγηση της παρούσας διατριβής.

Ένα ξεχωριστό ευχαριστώ στην κ. Ελισάβετ Χατζή, Εμβρυολόγο της Μονάδας Ιατρικώς Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής και στην κ. Ιωάννα Μπούμπα, Εργαστηριακό Διδακτικό Προσωπικό του Εργαστηρίου Ιατρικής Γενετικής, για τη φιλική τους στάση, την υποστηρικτική τους διάθεση και τις πολύτιμες συμβουλές τους. Θα θυμάμαι πάντα το ειλικρινές ενδιαφέρον τους για μένα, το ήθος και την αξιοπρέπεια τους.

Ένα ακόμη ευχαριστώ πρωτίστως στην κ. Αλεξάνδρα Μπέλλου για τη βοήθειά της και στα μέλη της Μονάδας Ιατρικής Γενετικής, την κ. Ελένη Παπαντωνίου, Τεχνολόγο Ιατρικών Εργαστηρίων, την κ. Δήμητρα Αρχιμανδρίτη, Βιοχημικό και την κ. Ελένη Θανοπούλου, Βιολόγο.

Ευχαριστώ πάρα πολύ τους διδάκτορες Χρυσούλα Κίτσου, Πρόδρομο Σακάλογλου, Χαρίλαο Κωστούλα και Πάρη Λαδιά για τις όμορφες συζητήσεις μας και την υποψήφια διδάκτορα Φωτεινή Αλβανοπούλου για τη συνεργασία μας στο Εργαστήριο Εμβρυολογίας.

Ευχαριστώ πραγματικά τη Βιοχημικό Ζωή Φλώρου για την αδιαμφισβήτητη καθοριστική συμβολή της, καθώς και την Καθηγήτρια Ιατρικής Βιοπαθολογίας-Κλινικής Μικροβιολογίας κ. Ευθυμία Πετεινάκη για τη συνεισφορά της.

Ευχαριστώ τη Βιολόγο Αθανασία Γούνη, για την αμέριστη συμπαράστασή της και την ακλόνητη πίστη της στις ερευνητικές μου ικανότητες. Δε θα ξεχάσω ποτέ τα ενθαρρυντικά της λόγια σε κάθε δύσκολη στιγμή μου.

Ευχαριστώ ολόψυχα την αδελφή μου Αικατερίνη, τη Μαρία, την Ευαγγελία και βέβαια το μικρό Βαγγελάκη, που κατάφερνε με το δικό του τρόπο να με γεμίζει αισιοδοξία και να εξαφανίζει κάθε αρνητική σκέψη.

Ένα τεράστιο ευχαριστώ στον αγαπημένο μου θείο κ. Γεώργιο Καψάλη, Καθηγητή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, που με λάτρεψε από μικρή και πίστεψε σ' εμένα πριν ακόμη πιστέψω εγώ στον εαυτό μου. Τον ευχαριστώ γιατί με δίδαξε να μελετώ με έμπνευση.

Φυσικά, δεν έχω λόγια να ευχαριστήσω τους γονείς μου Κωνσταντίνο και Αριστούλα, για τα 28 χρόνια που τους έχω δίπλα μου να μ' αγαπούν και να με προσέχουν. Κάνοντας κυριολεκτικά τα αδύνατα δυνατά για μένα και παραμερίζοντας πάντοτε τις προσωπικές τους ανάγκες, κατάφεραν να στηρίξουν ολοκληρωτικά την επιστημονική μου προσπάθεια. Τους ευχαριστώ μέσα απ' την καρδιά μου.

Ειρήνη

Πίνακας Περιεχομένων

	Σελίδα
1. Εισαγωγή	7
1.1. Εμβρυολογία του Ανθρώπου	8
1.1.1. Γαμετογένεση	8
1.1.2. Σπερματογένεση	8
1.1.3. Ωογένεση	10
1.1.4. Αναπαραγωγικά Κύτταρα	11
1.1.4.1. Σπερματοζώαριο	11
1.1.4.2. Ωάριο	13
1.1.5. Γονιμοποίηση	14
1.1.6. Εμβρυογένεση	18
1.1.6.1. Πρώιμη Εμβρυική Ανάπτυξη	18
1.1.6.2. Εμφύτευση του Εμβρύου	18
1.2. Ιός του Ανθρώπινου Θηλώματος	21
1.2.1. Δομή του Ιού HPV	22
1.2.1.1. Ιϊκό Καψίδιο	22
1.2.1.2. Ιϊκό Γονιδίωμα	23
1.2.1.3. Ιϊκές Πρωτεΐνες E1 και E2	25
1.2.1.4. Ιϊκή Ογκοπρωτεΐνη E6	27
1.2.1.5. Ιϊκή Ογκοπρωτεΐνη E7	28

1.2.2. Κύκλος Ζωής του Ιού HPV	30
1.2.2.1. Είσοδος του Ιού HPV στο Κύτταρο	30
1.2.2.2. Αντιγραφή και Μεταγραφή του Ιού HPV	31
1.2.2.3. Έξοδος του Ιού HPV από το Κύτταρο	32
1.3. Επιδημιολογία	33
1.4. Ιός HPV και Γεννητικό Σύστημα	33
1.5. Ιός HPV και Καρκίνος	34
1.6. Ιός HPV και Υπογονιμότητα	34
1.7. Ιός HPV και Σπερματοζώαριο	35
1.7.1. Ιός HPV και Παράμετροι Σπέρματος	35
1.8. Ιός HPV και Έμβρυο	36
1.8.1. Ιός HPV και Πρώιμη Εμβρυογένεση	36
1.8.2. Ιός HPV και Πρώιμη Κύηση	36
1.9. Ιός HPV και Υποβοηθούμενη Αναπαραγωγή	37
1.9.1. Ιός HPV και Ενδομήτρια Σπερματέγχυση	37
1.9.2. Ιός HPV και In Vitro Γονιμοποίηση	37
1.9.3. Ιός HPV και Τεχνικές Πλύσης Σπέρματος	38
1.10. Ιός HPV και Κύηση	39
1.11. Ιός HPV και Εμβολιασμός	39
2. Υλικά και Μέθοδοι	42
2.1. Συλλογή Δειγμάτων	43
2.2. Σπερμοδιάγραμμα	44
2.3. Διασπορά Χρωματίνης Σπέρματος	46

2.4. Εξαγωγή Γενετικού Υλικού	51
2.5. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης	53
2.6. Επεξεργασία Σπέρματος	64
2.7. In Vitro Γονιμοποίηση και Ενδοκυτταροπλασματική Έγχυση Σπέρματος	68
2.8. Αξιολόγηση Εμβρύων	73
3. Αποτελέσματα	76
3.1. Παρουσία HPV στα Κολποτραχηλικά Δείγματα	77
3.2. Παρουσία HPV στα Δείγματα Σπέρματος	85
3.3. Παρουσία HPV στα Νορμοζωοσπερμικά Δείγματα Σπέρματος	95
3.4. Παρουσία HPV στα Παθολογικά Δείγματα Σπέρματος	96
3.4.1. Παρουσία HPV και Συγκέντρωση Σπερματοζωαρίων	97
3.4.2. Παρουσία HPV και Κινητικότητα Σπερματοζωαρίων	97
3.4.3. Παρουσία HPV και Μορφολογία Σπερματοζωαρίων	98
3.4.4. Παρουσία HPV και Παθολογικό Σπερματικό Πλάσμα και/ή Συγκολλήσεις και/ή Λευκά Αιμοσφαίρια	98
3.5. Παρουσία HPV και Κατακερματισμός DNA Σπερματοζωαρίων	100
3.6. Παρουσία HPV και Έμβρυα	102
4. Συζήτηση	108
4.1. Παρουσία HPV σε Υπογόνιμα Ζευγάρια	109
4.2. Παρουσία HPV και Ανδρική Υπογονιμότητα	113
4.2.1. Παρουσία HPV και Παράμετροι Σπέρματος	114
4.2.2. Παρουσία HPV και Κατακερματισμός DNA Σπερματοζωαρίων	117
4.3. Παρουσία HPV και Έμβρυα	119

5. Συμπεράσματα	121
Περίληψη	123
Abstract	124
6. Βιβλιογραφία	125

1. Εισαγωγή

1.1. Εμβρυολογία του Ανθρώπου

1.1.1. Γαμετογένεση

Γαμέτες καλούνται τα κύτταρα της αναπαραγωγής, το ωάριο και το σπερματοζώαριο, τα οποία περιέχουν το μισό αριθμό χρωμοσωμάτων σε σχέση με τα υπόλοιπα κύτταρα του σώματος. Η διεργασία της ωρίμανσης των γαμετών ονομάζεται γαμετογένεση: σπερματογένεση στο αρσενικό και ωογένεση στο θηλυκό. Κατά τη γαμετογένεση, ο αριθμός των χρωμοσωμάτων μειώνεται στο ήμισυ μέσω μίας ιδιαίτερης κυτταρικής διεργασίας, της μείωσης (1).

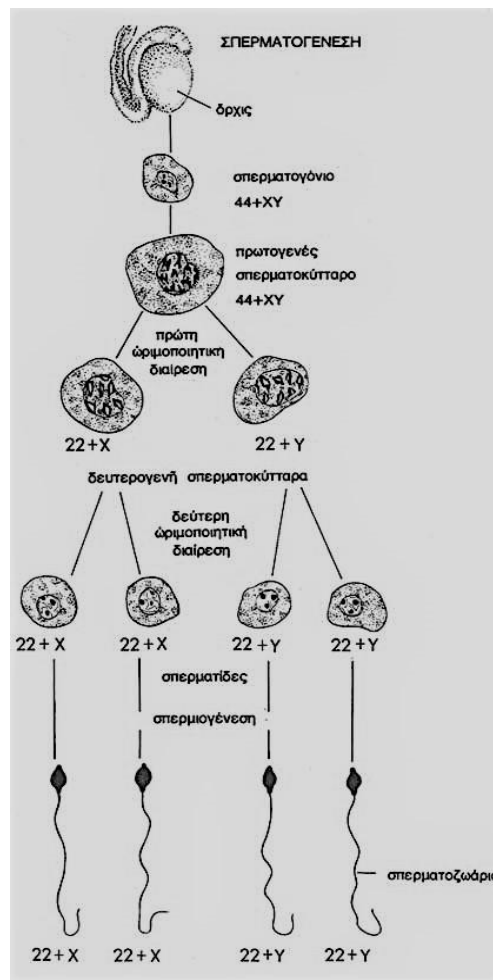
Ο φυσιολογικός αριθμός χρωμοσωμάτων στον άνθρωπο είναι 46. Τα χρωμοσώματα βρίσκονται διατεταγμένα κατά ζεύγη, σχηματίζοντας 23 ομόλογα ζεύγη χρωμοσωμάτων. Οι πυρήνες των σωματικών κυττάρων περιέχουν 46 χρωμοσώματα, διαθέτουν δηλαδή 23 ζεύγη χρωμοσωμάτων και τα σωματικά κύτταρα καλούνται διπλοειδή. Οι γαμέτες είναι απλοειδή κύτταρα και περιλαμβάνουν 23 χρωμοσώματα. Συνεπώς, ο ζυγώτης που προκύπτει από τη συνένωση του απλοειδούς ωαρίου και του απλοειδούς σπερματοζωαρίου περιέχει 46 χρωμοσώματα (1).

1.1.2. Σπερματογένεση

Η σπερματογένεση αποτελεί μία συνεχή διεργασία, κατά την οποία τα αρχικά ανώριμα γεννητικά κύτταρα, τα σπερματογόνια, μετατρέπονται σε ώριμα σπερματοζώαρια.

Τα σπερματογόνια τοποθετούνται στην εξωτερική πλευρά των σπερματικών σωληναρίων του όρχεως ανάμεσα στα κύτταρα του Sertoli. Τα κύτταρα του Sertoli αποτελούν συνέχεια της βασικής μεμβράνης των σπερματικών σωληναρίων, εντοπίζονται ανάμεσα στα κύτταρα της σπερματογένεσης και διαδραματίζουν υποστηρικτικό ρόλο. Τα σπερματογόνια είναι ανενεργά πριν την ήβη, ενώ μετά την ήβη μετατρέπονται σε πρωτοταγή ή πρωτογενή σπερματοκύτταρα ή σπερματοκύτταρα πρώτης τάξης. Τα πρωτοταγή σπερματοκύτταρα υφίστανται την

πρώτη μειωτική διαίρεση και σχηματίζουν δύο δευτεροταγή ή δευτερογενή σπερματοκύτταρα ή σπερματοκύτταρα δεύτερης τάξης, όπου είναι μικρά, σφαιρικά, απλοειδή κύτταρα. Τα δευτεροταγή σπερματοκύτταρα περιέχουν το μισό αριθμό χρωμοσωμάτων και ένα μόνο φυλετικό χρωμόσωμα X ή Y. Τα δευτεροταγή σπερματοκύτταρα υφίστανται τη δεύτερη μειωτική διαίρεση και σχηματίζουν τέσσερις απλοειδείς σπερματίδες. Κατά τη διάρκεια της δεύτερης διαίρεσης δεν εκτελείται περαιτέρω ελάττωση του αριθμού των χρωμοσωμάτων, ενώ η δεδομένη διαίρεση, παρότι ονομάζεται μειωτική, μοιάζει αρκετά με μία απλή μιτωτική διαίρεση. Οι σπερματίδες σταδιακά χάνουν το κυτταρόπλασμα τους και μετατρέπονται σε ώριμα σπερματοζώαρια μέσω της σπερμιογένεσης, μίας εκτεταμένης διεργασίας διαφοροποίησης. Κατόπιν της οριστικής διαφοροποίησής τους, τα σπερματοζώαρια απελευθερώνονται στον αυλό των σπερματικών σωληναρίων υπό την επίδραση της τεστοστερόνης και καταλήγουν μέσω του ορχικού δικτύου στις επιδιδυμίδες (2).



Εικόνα 1: Η διαδικασία της σπερματογένεσης.

1.1.3. Ωογένεση

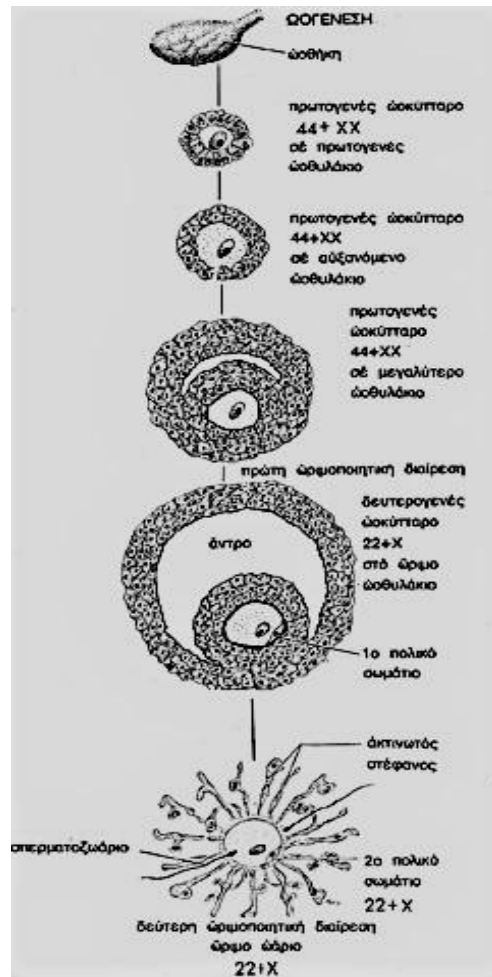
Η ωογένεση αποτελεί μία διεργασία, κατά την οποία τα ανώριμα ωογόνια μετατρέπονται σε ώριμα δευτερογενή ωοκύτταρα ή ωάρια.

Τα ωάρια προέρχονται εμβρυολογικώς από τα αρχέγονα γεννητικά κύτταρα. Την 5η εβδομάδα της εμβρυϊκής ζωής, τα περίπου 1.000-2.000 αρχέγονα γεννητικά κύτταρα, μεταναστεύουν από το τοίχωμα του λεκιθικού ασκού στην περιοχή των γονάδων. Η γοναδική περιοχή διαφοροποιείται σε όρχι επί παρουσίας Y χρωμοσώματος, διαφορετικά εξελίσσεται σε ωοθήκη. Κατά την ανάπτυξη της ωοθήκης, τα αρχέγονα γεννητικά κύτταρα, που καλούνται πλέον ωογόνια, πολλαπλασιάζονται γρήγορα με μιτωτικές διαιρέσεις, ενώ συντελείται και η πρώτη μειωτική διαίρεση. Ο αριθμός των γεννητικών κυττάρων την 6η-7η εβδομάδα της κύησης είναι περίπου 10.000 ωογόνια, ενώ την 8η εβδομάδα της κύησης 600.000 ωογόνια. Από αυτή τη φάση της εμβρυϊκής ζωής, τα γεννητικά κύτταρα εξαρτώνται από τρεις συνυπάρχουσες διεργασίες, τη μίτωση, τη μείωση και την ατρησία (3).

Η μίτωση υπερισχύει και έτσι την 20η εβδομάδα το έμβρυο διαθέτει το μέγιστο αριθμό γεννητικών κυττάρων, περίπου 7 εκατομμύρια. Η ατρησία, η διεργασία καταστροφής των ωογονίων, παύει τον 7ο μήνα της κύησης, καθώς όλα τα ωογόνια υφιστάμενα τη μειωτική διαίρεση έχουν μετατραπεί σε αρχέγονα ωοθυλάκια. Σε αυτή τη φάση, η ατρησία των ωοθυλακίων αντικαθιστά την ατρησία των ωογονίων. Στη γέννηση, η ωοθήκη διαθέτει περίπου 1-2 εκατομμύρια γεννητικά κύτταρα. Ο αριθμός τους μειώνεται αναλογικά με την ηλικία. Στην ήβη, απομένουν περίπου 300.000-400.000 γεννητικά κύτταρα. Έτσι, το ενήλικο θηλυκό άτομο έχει απολέσει το 80% των γεννητικών κυττάρων της εμβρυϊκής ζωής. Ο αριθμός των ωοθυλακίων στην ωοθήκη, περίπου 25.000, μειώνεται με διαφορετικό ρυθμό πριν και μετά την ηλικία των 37 ετών. Στο 51ο έτος, τη συνήθη ηλικία εμμηνόπαυσης, απομένουν περίπου 1.000 ωοθυλάκια, τα οποία εξαφανίζονται έως την ηλικία των 71 ετών (3).

Η μείωση συντελείται την 8η εβδομάδα της ενδομήτριας ζωής και διακόπτεται στην πρόφαση της πρώτης μειωτικής διαίρεσης, στο στάδιο της διπλοταινίας, όπου τα διπλά χρωμοσώματα διατάσσονται ανά ζεύγη. Κατά το σχηματισμό τους, τα πρωτογενή ωοκύτταρα περιβάλλονται από ένα στρώμα επίπεδων θυλακικών

κυττάρων της ωθήκης και καλούνται πρωτογενή ωοθυλάκια. Τα πρωτογενή ωοκύτταρα παραμένουν αδρανή τουλάχιστον μέχρι την εφηβεία. Τα δευτερογενή ωοκύτταρα ή ωάρια σχηματίζονται όταν η μειωτική διαίρεση ολοκληρώνεται ακριβώς πριν την ωοθυλακιορρηξία (3).



Εικόνα 2: Η διαδικασία της ωογένεσης.

1.1.4. Αναπαραγωγικά Κύτταρα

1.1.4.1. Σπερματοζωάριο

Το σπερματοζωάριο μεταφέρει τα 23 απλοειδή χρωμοσώματά του στο ωάριο και ενεργοποιεί την ανάπτυξη του ζυγώτη. Έχει ολικό μήκος 50 μm και αποτελείται από

τρεις μορφολογικά και λειτουργικά διακριτές περιοχές, την κεφαλή, τον αυχένα ή μέσο τμήμα και την ουρά ή μαστίγιο.

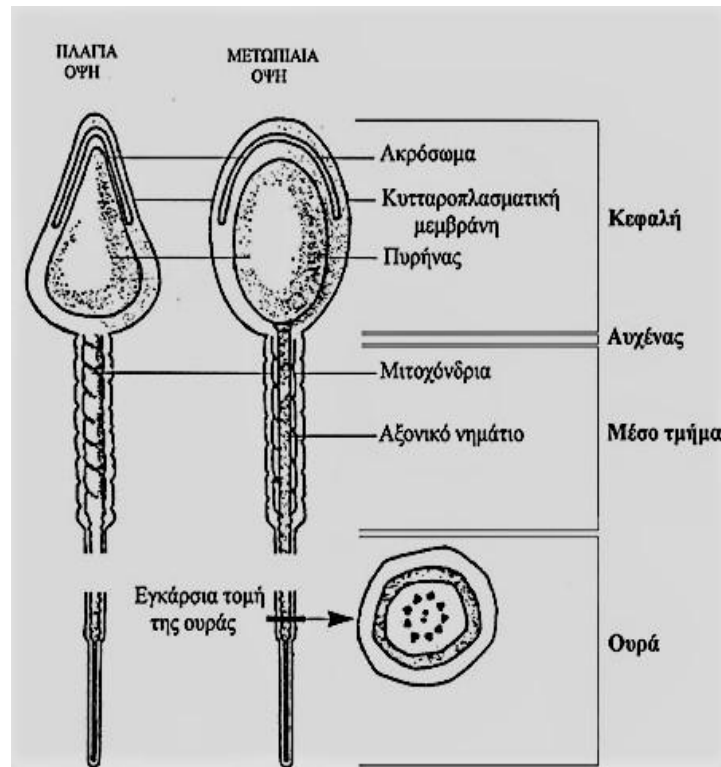
Η κεφαλή του φυσιολογικού σπερματοζωαρίου έχει ωοειδές σχήμα, μήκος 3-5 μm , πλάτος 2-3 μm και πάχος 1,5 μm . Αποτελείται από τον πυρήνα και το ακρόσωμα, τα οποία καλύπτονται από την πυρηνική μεμβράνη και το μετακροσωματικό έλυτρο. Ο πυρήνας περιέχει το γενετικό υλικό του αρσενικού ατόμου. Το DNA των σπερματοζωαρίων διαθέτει αρκετά διαφορετική δομή από το DNA των διπλοειδών σωματικών κυττάρων, καθώς βρίσκεται συμπυκνωμένο στο μικρότερο δυνατό όγκο, προς εξοικονόμηση χώρου. Το ακρόσωμα καλύπτει τα πρόσθια 2/3 του πυρήνα και αποτελείται από δύο τμήματα, το πρόσθιο και του ισημερινού. Το πρόσθιο τμήμα του ακροσώματος περιέχει πρωτεολυτικά ένζυμα όπως ακροσίνη, θρυψίνη, υαλουρονιδάση και πρωτεάσες, τα οποία κατά την ακροσωματική αντίδραση απελευθερώνονται και υδρολύουν τη μάζα των κοκκιωδών κυττάρων και τη διαφανή ζώνη του ωαρίου, υποβοηθώντας τη διείσδυση του σπερματοζωαρίου και τη συγχώνευσή του με το ωάριο. Ο ισημερινός δεν περιέχει ένζυμα, αλλά παίζει σημαντικό ρόλο στην ένωση σπερματοζωαρίου-ωαρίου. Η κυτταρική μεμβράνη καλύπτει την κεφαλή, τον αυχένα και την ουρά. Κατά την ακροσωματική αντίδραση ρήγνυται μονάχα η μεμβράνη της κεφαλής. Η μεμβράνη της ουράς παραμένει ανέπαφη, χωρίς να επηρεάζεται η κινητικότητα του σπερματοζωαρίου. Το μετακροσωματικό έλυτρο αποτελεί μία πάχυνση της κυτταρικής μεμβράνης μεταξύ του οπισθίου άκρου του ακροσώματος και του οπίσθιου δακτυλίου, ενώ σχετίζεται με την αναγνώριση του σπερματοζωαρίου από το ωάριο και την ένωσή τους.

Ο αυχέννας ή μέσο τμήμα έχει μήκος 5-7 μm , πλάτος 1 μm και συνδέει την κεφαλή με την ουρά. Περιέχει το αξονικό νημάτιο, που περιβάλλεται από ινίδια με κυκλωτερή διάταξη και ένα ή δύο κεντροσωμάτια. Ο αυχέννας περιλαμβάνει μιτοχόνδρια, ενζυμικά συστήματα γλυκόλυσης και οξείδωσης και παρέχει την απαραίτητη ενέργεια για την επιβίωση και την κινητικότητα του σπερματοζωαρίου.

Η ουρά έχει μήκος 40-50 μm . Περιέχει δέκα συνολικά ζεύγη ινιδίων, ένα κεντρικό και εννέα περιφερικά και προσδίδει στο σπερματοζωάριο τη χαρακτηριστική κινητικότητά του.

Το σπερματικό πλάσμα περιλαμβάνει πρωτεΐνες, καθώς και τον παράγοντα αναστολής της ενεργοποίησης. Προστατεύει τα σπερματοζωάρια αμέσως μετά την

εκσπερμάτιση από το δυσμενές όξινο περιβάλλον του κόλπου, παρέχει θρεπτικές ουσίες όπως η φρουκτόζη, αναστέλλει το φαινόμενο της ενεργοποίησης και της πρόωρης ακροσωματικής αντίδρασης και συνεπώς αποτρέπει την ταχεία απώλεια της γονιμοποιητικής ικανότητας του σπερματοζωαρίου.



Εικόνα 3: Η μορφολογία του σπερματοζωαρίου.

1.1.4.2. Ωάριο

Το ωάριο, ο θηλυκός γαμέτης, αποτελεί το μοναδικό κύτταρο του ανθρώπου, το οποίο μετά τη γονιμοποίηση αναπτύσσεται ως νέα, αυτοτελής μονάδα. Το ωάριο έχει διάμετρο περίπου 0,1 mm, είναι το μεγαλύτερο κύτταρο του ανθρώπινου οργανισμού και είναι ορατό δια γυμνού οφθαλμού.

Στην πρόφαση της πρώτης μειωτικής διαίρεσης, πριν το τελικό στάδιο ωριμότητας, το ωοκύτταρο αποτελεί ένα μεγάλο σφαιρικό κύτταρο με ευμεγέθη πυρήνα. Ο πυρήνας του ωοκυττάρου καλείται βλαστικό κυστίδιο. Το ωοκύτταρο περικλείεται από τη διαφανή ζώνη και η διαφανής ζώνη από τα κοκκιώδη κύτταρα, που διατάσσονται ακτινωτά γύρω της, σχηματίζοντας τον ακτινωτό στέφανο. Οι προεκβολές των

κοκκιωδών κυττάρων διεισδύουν στο ωοκύτταρο, μεταφέροντας πιθανώς χημικά σήματα και θρεπτικά συστατικά. Το ωοκύτταρο περιβάλλεται εξωτερικά από την κυτταροπλασματική μεμβράνη. Εσωτερικά της μεμβράνης του ωοκυττάρου εντοπίζονται τα φλοιώδη κοκκία, σφαιρικά οργανίδια.

Στην πρώτη μειωτική διαίρεση, πριν την ωοθυλακιορρηξία, αντίθετα με το αντίστοιχο στάδιο της σπερματογένεσης, το κυτταρόπλασμα του πρωτογενούς ωοκυττάρου διαιρείται άνισα. Η συνέχιση της μειωτικής διαίρεσης είναι εμφανής με την εξαφάνιση του βλαστικού κυστιδίου. Κατά την ωρίμανση, τα ζεύγη των ομολόγων χρωμοσωμάτων κατανέμονται στα δύο νέα, άνισα σε μέγεθος κύτταρα. Το μεγάλο κύτταρο, το δευτερογενές ωοκύτταρο ή ωάριο, παραλαμβάνει σχεδόν ολόκληρο το κυτταρόπλασμα και δεν αναπτύσσεται περαιτέρω, εκτός εάν γονιμοποιηθεί. Το μικρό κύτταρο, το πρώτο πολικό σωματίο, περιέχει ελάχιστο κυτταρόπλασμα και το μισό αριθμό ομολόγων χρωμοσωμάτων. Όταν το σπερματοζωάριο εισέρχεται στο δευτερογενές ωοκύτταρο διατρυπώντας τη διαφανή ζώνη και την κυτταροπλασματική μεμβράνη, το ωάριο ενεργοποιείται, δημιουργώντας δύο προπυρήνες, ένα αρσενικό και ένα θηλυκό, οι οποίοι κατόπιν ενώνονται. Η μειωτική διαίρεση συνεχίζεται και σχηματίζονται δύο νέα κύτταρα, ένα μεγάλο, το γονιμοποιημένο ωάριο και ένα μικρό, το δεύτερο πολικό σωματίο.

1.1.5. Γονιμοποίηση

Η γονιμοποίηση ως διεργασία, επιτρέπει την εξασφάλιση της γενετικής ποικιλομορφίας σε κάθε βιολογικό είδος, συμπεριλαμβανομένου του ανθρώπου, δεδομένης της πατρικής προέλευσης των μισών χρωμοσωμάτων και της μητρικής προέλευσης των άλλων μισών.

Η γονιμοποίηση πραγματοποιείται συνήθως στη λήκυθο της σάλπιγγας και αποτελεί την κατάληξη της συνένωσης ενός ωαρίου με ένα σπερματοζωάριο. Δύο απλοειδή κύτταρα με 23 χρωμοσώματα το καθένα δημιουργούν ένα διπλοειδή ζυγώτη με 46 χρωμοσώματα, όσα και τα χρωμοσώματα των ανθρώπινων σωματικών κυττάρων.

Το ωάριο και το σπερματοζωάριο υφίστανται αλλαγές πριν τη ένωσή τους.

Το ωάριο ωριμάζει σταδιακά. Το βλαστικό κυστίδιο, ο πυρήνας του ωαρίου, εξαφανίζεται. Η πρώτη μειωτική διαίρεση ολοκληρώνεται και εκβάλλεται το πρώτο πολικό σωματίο. Τα φλοιώδη κοκκία μεταναστεύουν από το κυτταρόπλασμα προς την κυτταρική μεμβράνη. Τα κοκκιώδη κύτταρα γύρω από το ωάριο μετατρέπονται σε βλεννώδη, δημιουργώντας τον ακτινωτό στέφανο. Συγχρόνως, διεξάγεται η δεύτερη μειωτική διαίρεση, αν και διακόπτεται για ακόμη μία φορά στην ανάφαση. Το ώριμο ανθρώπινο ωάριο έχει διάμετρο 110-120 μm και μαζί με τη διαφανή ζώνη 140-150 μm . Οι μειωτικές διαιρέσεις είναι αρκετά ασύμμετρες, έτσι τα πολικά σωματίδια έχουν διάμετρο μόλις μερικά μm (4).

Το σπερματοζωάριο ωριμάζει στην επιδιδυμίδα. Ωστόσο, δε μπορεί να γονιμοποιήσει το ωάριο μετά την εκσπερμάτιση. Ενεργοποιείται στο γεννητικό σύστημα του θηλυκού ατόμου, όπου απομακρύνονται ή διαφοροποιούνται οι ουσίες που καλύπτουν την κυτταρική μεμβράνη, όπως ο παράγοντας αναστολής της ενεργοποίησης. Φυσιολογικά, η ενεργοποίηση αρχίζει με τη διέλευση του σπερματοζωαρίου από την προωορρηκτική αλκαλική τραχηλική βλέννα και τελειώνει κατά τη διαδρομή του στην κοιλότητα της μήτρας και στον ισθμό των σαλπίνγων. Το προστατευτικό κάλυμμα που περιβάλλει το σπερματοζωάριο απομακρύνεται (4).

Το σπερματοζωάριο για να γονιμοποιήσει το ωάριο διαπερνά τα κοκκιώδη κύτταρα, τη διαφανή ζώνη και την κυτταροπλασματική μεμβράνη του ωαρίου.

Τα κοκκιώδη κύτταρα εντοπίζονται διάσπαρτα σε ένα βλεννοπολυσακχαριτικό πήκτωμα, το οποίο διασπάται από το ένζυμο υαλουρονιδάση. Το σπερματοζωάριο υπερενεργοποιείται κατά τη διέλευσή του διαμέσου των στοιβάδων των κοκκιωδών κυττάρων και η ουρά κινείται πλέον σε τρεις, αντί σε δύο διαστάσεις.

Η διαφανής ζώνη έχει πάχος 15-20 μm και περιλαμβάνει τις γλυκοπρωτεΐνες ZP1, ZP2, ZP3, τους ειδικούς υποδοχείς της κεφαλής του σπερματοζωαρίου. Έτσι, μονάχα ανθρώπινα σπερματοζωάρια μπορούν να προσδεθούν στη διαφανή ζώνη ανθρώπινων ωαρίων, διασφαλίζοντας το βιολογικό φραγμό. Η επαφή του σπερματοζωαρίου με τη διαφανή ζώνη πυροδοτεί την ακροσωματική αντίδραση, που διαρκεί 10-15 λεπτά. Η κυτταρική μεμβράνη τηκέται και δημιουργούνται οπές στην εξωτερική ακροσωματική μεμβράνη, δια μέσου των οποίων απελευθερώνεται το ακροσωματικό περιεχόμενο. Το ακρόσωμα μέσω των πρωτεολυτικών ενζύμων διαβρώνει τοπικά τη

διαφανή ζώνη. Το σπερματοζωάριο διέρχεται με τις ενισχυμένες κινήσεις της ήδη υπερενεργοποιημένης ουράς, έως την πλήρη διάτρηση της διαφανούς ζώνης.

Το σπερματοζωάριο εντοπίζεται στο περιλεκιθικό διάστημα. Συναντά τη μεμβράνη του ωαρίου και πριν την προσκόλληση, οι υποδοχείς της κεφαλής του σπερματοζωαρίου έρχονται σε επαφή με τους συμπληρωματικούς υποδοχείς της κυτταροπλασματικής μεμβράνης του ωαρίου. Το σπερματοζωάριο προσεγγίζει την επιφάνεια του ωαρίου υπό γωνία, εκτελείται η σύνδεση ανάμεσα στην κυτταροπλασματική μεμβράνη του ωαρίου και στο τμήμα του ισημερινού της κεφαλής του σπερματοζωαρίου και ακολουθεί η συνένωσή τους.

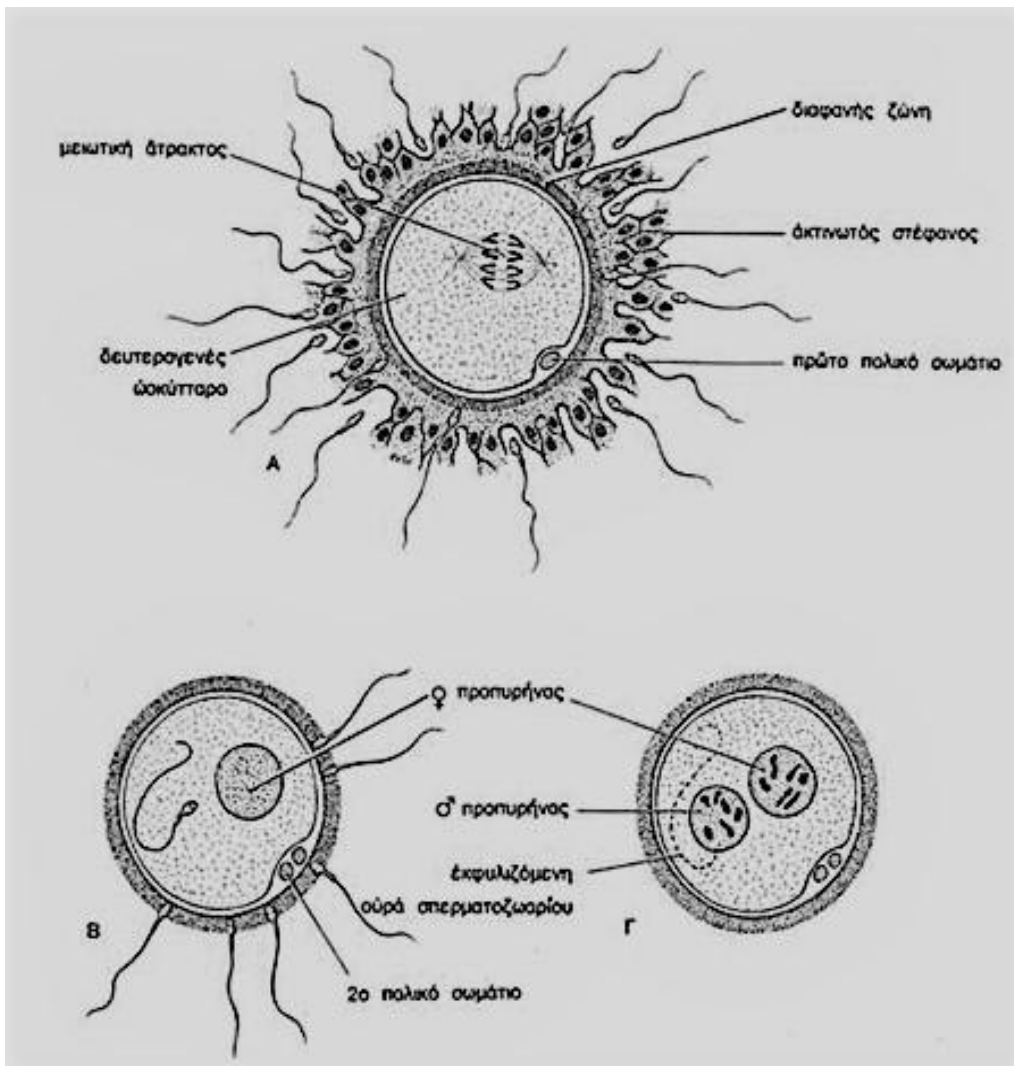
Η πρόσδεση της κεφαλής του σπερματοζωαρίου στο ωάριο προκαλεί τοπικές μεταβολές στην κυτταροπλασματική μεμβράνη του ωαρίου. Τα φλοιώδη κοκκία συνδέονται στη μεμβράνη και το περιεχόμενό τους εξωκυτταρώνεται στο περιλεκιθικό διάστημα, απελευθερώνοντας ένζυμα, πρωτεάσες και τροποποιώντας τελικά τη χημική δομή της διαφανούς ζώνης. Έτσι, η διαφανής ζώνη καθίσταται αδιαπέραστη για τα υπόλοιπα σπερματοζωάρια σχεδόν αμέσως, μέσω της φλοιώδους αντίδρασης του ωαρίου, του καθορισμένου μηχανισμού αποτροπής της πολλαπλής γονιμοποίησης (4).

Στην επαφή ανάμεσα στην κυτταροπλασματική μεμβράνη του ωαρίου και στην κεφαλή του σπερματοζωαρίου, εμπλέκονται ειδικά μόρια που επιτρέπουν τη σύντηξη των μεμβρανών, ενώ συμμετέχουν και ορισμένες πρωτεΐνες που εντοπίζονται στο ισημερινό τμήμα της κεφαλής του σπερματοζωαρίου. Κατά τη σύντηξη των μεμβρανών, ο φλοιός αντιδρά. Τα κοκκία του φλοιού απελευθερώνονται και στη φλοιώδη περιοχή ενεργοποιείται ο κυτταρικός σκελετός, προκαλώντας την εγκόλπωση της κεφαλής του σπερματοζωαρίου. Η μεμβράνη του πυρήνα του σπερματοζωαρίου ρήγνυται υπό την επίδραση κυτταροπλασματικών παραγόντων και άλλων ενεργοποιημένων συστατικών του ωαρίου. Η δεύτερη μειωτική διαίρεση ολοκληρώνεται και εκβάλλεται το δεύτερο πολικό σωματίο (4).

Προπυρήνες

Τα χρωμοσώματα του ωαρίου περιβάλλονται από μεμβράνη και σχηματίζουν το θήλυ προπυρήνα. Η χρωματίνη στην κεφαλή του σπερματοζωαρίου αποσυμπυκνώνεται και

περικλείεται από μεμβράνη, δημιουργώντας τον άρρεν προπυρήνα. Κατά τη διάρκεια του σχηματισμού των προπυρήνων λαμβάνει χώρα σύνθεση DNA. Οι προπυρήνες βρίσκονται αρχικά απομακρυσμένοι. Ο θήλυς τοποθετείται στην πλευρά του δεύτερου πολικού σωματίου και ο άρρεν στην περιοχή του φλοιού, όπου εισχώρησε η κεφαλή του σπερματοζωαρίου. Οι δυο προπυρήνες μεταναστεύουν και μετακινούνται προς το κέντρο του ωαρίου. Περίπου 20 ώρες μετά την επαφή του σπερματοζωαρίου με το ωάριο, οι προπυρήνες καταλήγουν κεντρικά του ωαρίου και διατάσσονται δίπλα-δίπλα. Κατά τη συγγαμία ή καρυογαμία, οι μεμβράνες των προπυρήνων διαλύονται και το γενετικό τους υλικό συντήκεται. Η διεργασία της γονιμοποίησης ολοκληρώνεται. Η χρωματίνη οργανώνεται αμέσως σε χρωμοσώματα, τα οποία στη συνέχεια συμμετέχουν στην πρώτη κυτταρική διαίρεση.



Εικόνα 4: Η διαδικασία της γονιμοποίησης.

1.1.6. Εμβρυογένεση

1.1.6.1. Πρώιμη Εμβρυική Ανάπτυξη

Η ανάπτυξη του εμβρύου συντελείται κατόπιν της γονιμοποίησης και της δημιουργίας του ζυγώτη, του πρώτου κυττάρου του νέου οργανισμού. Ο ζυγώτης καταλήγει στην κοιλότητα της μήτρας, οδηγούμενος από το κροσσωτό επιθήλιο της σάλπιγγας.

Ο ζυγώτης διαιρείται μιτωτικά σε δύο θυγατρικά κύτταρα, τα βλαστομερίδια. Ο όρος αυλάκωση, περιγράφει τις πρώτες γρήγορες μιτωτικές διαιρέσεις. Στην αυλάκωση, τα βλαστομερίδια διαμορφώνονται διαδοχικά σε δύο, τέσσερα, οκτώ και ούτω καθεξής. Στο στάδιο του μοριδίου, τα βλαστομερίδια σχηματίζουν μία συμπαγή μάζα. Στο διάστημα μεταξύ των κυττάρων εκβάλλεται υγρό και δημιουργείται η βλαστοκήλη, μία κοιλότητα που χαρακτηρίζει την πρώιμη βλαστοκύστη ή προβλαστοκύστη. Στο στάδιο της βλαστοκύστης, τα κύτταρα διατάσσονται σε δύο περιοχές· σε ένα έκκεντρο άθροισμα κυττάρων, την έσω κυτταρική μάζα ή εμβρυοβλάστη, από την οποία εξελίσσεται το κυρίως έμβρυο και μέρος των εξωεμβρυικών ιστών όπως το χόριο, καθώς και σε μία στοιβάδα κυττάρων που περιβάλλει την κοιλότητα της βλαστοκύστης, την έξω κυτταρική μάζα ή τροφοβλάστη, από την οποία σχηματίζεται ο πλακούντας (5).

Η βλαστοκύστη περιβάλλεται από τη διαφανή ζώνη και ο συνολικός όγκος του εμβρύου παραμένει σταθερός. Την 5η ημέρα, η κοιλότητα της βλαστοκύστης μεγεθύνεται και η διαφανής ζώνη προοδευτικά εξασθενεί και λεπτύνεται. Την 6η ημέρα, η διόγκωση της βλαστοκύστης επιτείνεται, λόγω της έκκρισης ενζύμων από τα βλαστομερίδια της τροφοβλάστης και η διαφανής ζώνη ρήγνυται. Η βλαστοκύστη αποσπάται εντελώς από τη διαφανή ζώνη και εκκολάπτεται. Το έμβρυο τελικά καταλήγει στην κοιλότητα της μήτρας και προσκολλάται στην επιφάνεια του ενδομητρίου (5).

1.1.6.2. Εμφύτευση του Εμβρύου

Η εμφύτευση αποτελεί τη διεργασία της προσκόλλησης και της εγκατάστασης ή εμφώλευσης του εμβρύου στο ενδομήτριο.

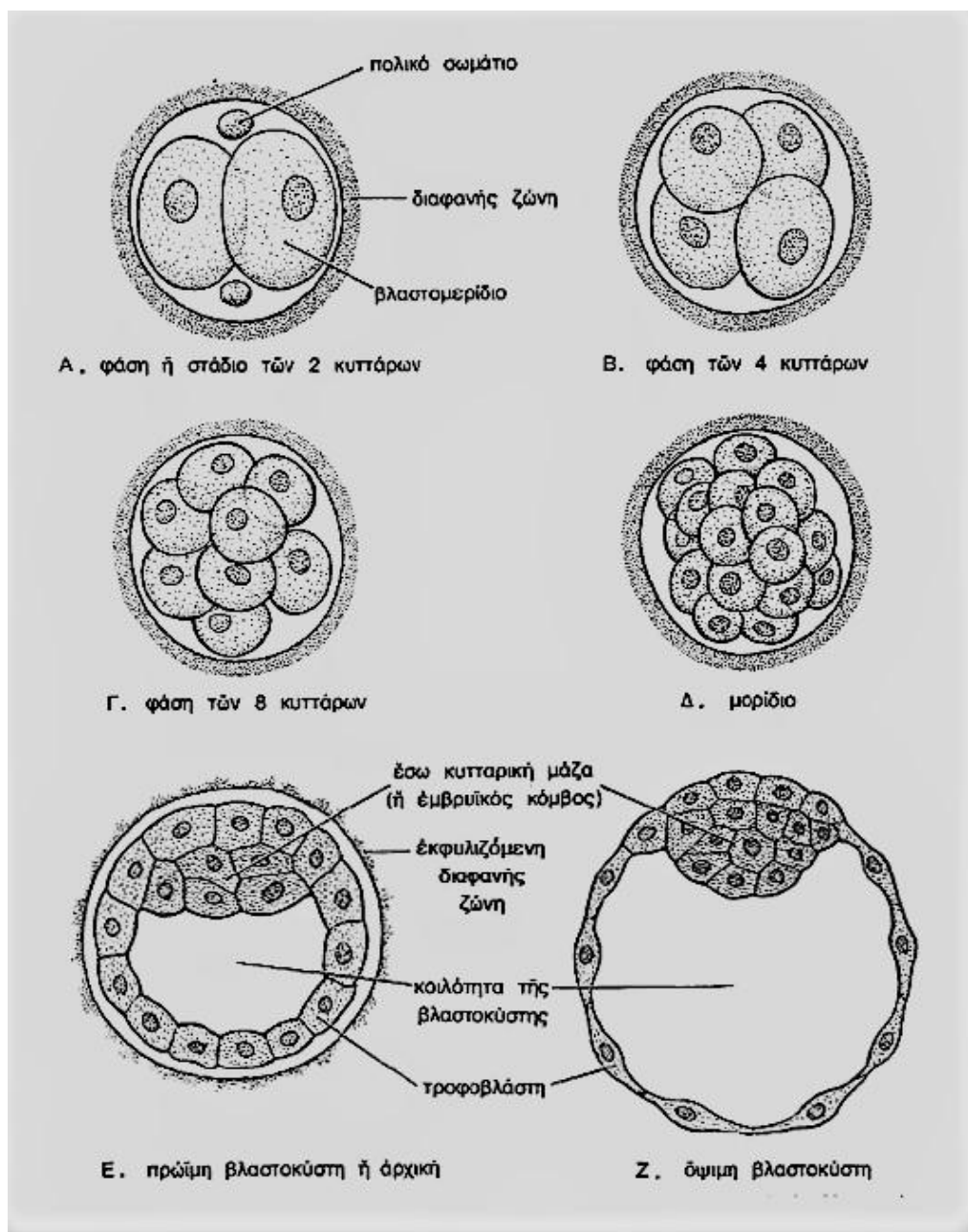
Η εμφύτευση συντελείται περίπου τη 18η-19η ημέρα του κύκλου στην κοιλότητα της μήτρας. Το έμβρυο επιλέγει το σημείο της εμφύτευσης, προσκολλώμενο στις αδενικές κρύπτες του ενδομητρίου. Η εμφύτευση πραγματοποιείται συνήθως στο πρόσθιο ή στο οπίσθιο τοίχωμα προς τον πυθμένα και σπανιότερα στο κατώτερο τμήμα της μήτρας. Η βλαστοκύστη τοποθετείται στην κοιλότητα της μήτρας και παραμένει αιωρούμενη για περίπου 1-2 ημέρες, αναμένοντας σήματα σχετικά με την κατάλληλη θέση της εμφύτευσης στο ενδομήτριο (5).

Οι ιδανικές συνθήκες στην περιοχή της εμφύτευσης δημιουργούνται λόγω των στεροειδών ορμονών της ωοθήκης, κυρίως των οιστρογόνων. Ουσίες όπως η ισταμίνη και οι προσταγλανδίνες, ενισχύουν τη διαπερατότητα των αγγείων, επιτρέποντας την πρόσβαση στην περιοχή του ενδομητρίου, συστατικών ευνοϊκών για την αγγειογένεση. Διάφοροι αυξητικοί παράγοντες επιδρούν βοηθητικά στον πολλαπλασιασμό και στη διαφοροποίηση των ενδομητρικών κυττάρων. Μόρια όπως οι κυτταροκίνες και η πλακουντιακή πρωτεΐνη συμμετέχουν στην καταστολή του ανοσολογικού μηχανισμού της μητέρας. Ποικίλοι παράγοντες παίζουν ρόλο στην ανοσοκαταστολή και στην ανάπτυξη των ενδομητρικών κυττάρων. Ακόμη, στην περιοχή της εμφυτευμένης βλαστοκύστης, η αγγείωση του ενδομητρίου εντείνεται ιδιαίτερα (5).

Η τροφοβλάστη εξακολουθεί να εισβάλλει στο ενδομήτριο, εκκρίνοντας ένζυμα και διαβρώνοντας τα κύτταρα του επιθηλίου. Κατόπιν, τα κύτταρά της πολλαπλασιάζονται και διαχωρίζεται στην κυτταροτροφοβλάστη και στη συγκυτιοτροφοβλάστη, η οποία δημιουργεί κοιλότητες με αίμα προερχόμενο από τα μητρικά αγγεία και τις εκκρίσεις των διαβρωμένων ενδομητρικών αδένων. Μεταξύ της τροφοβλάστης και της εμβρυοβλάστης σχηματίζονται κοιλότητες, που ενώνονται συνθέτοντας την αμνιακή κοιλότητα.

Τα σήματα της εμφύτευσης πυροδοτούν την ενισχυμένη υποφυσιακή έκκριση της ωχρινोटρόπου ορμόνης, διεγείροντας τα κοκκιώδη κύτταρα του ωχρού σωματίου. Η χοριακή γοναδοτροπίνη παράγεται από την τροφοβλάστη, τον υποτυπώδη πλακούντα, προκαλώντας έκκριση της προγεστερόνης έως και τη 10η εβδομάδα της κύησης.

Η διεργασία της εμφύτευσης περιλαμβάνει σύνθετες αλληλεπιδράσεις μεταξύ του εμβρύου και των κυττάρων του ενδομητρίου. Η επιτυχής εμφύτευση προϋποθέτει το συγχρονισμό της πρώιμης εμβρυϊκής ανάπτυξης και της υποδεκτικότητας του ενδομητρίου, την αποφυγή των ανοσολογικών αντιδράσεων της μήτρας προς το αλλοόνοσο έμβρυο, την αύξηση της ροής του αίματος στην περιοχή της εμφύτευσης σε συνδυασμό με την αυξημένη αγγειογένεση και την ελεγχόμενη διείσδυση της τροφοβλάστης.



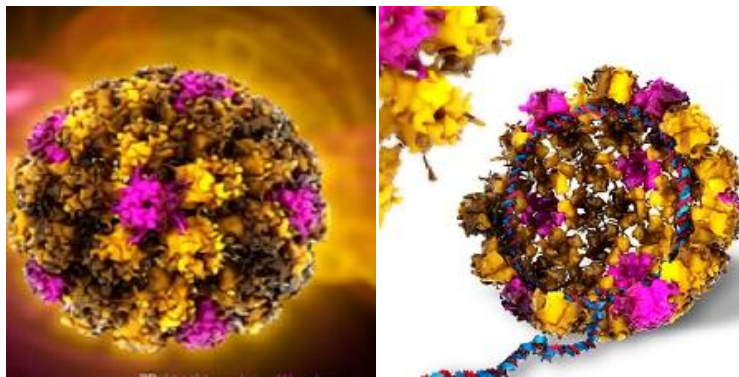
Εικόνα 5: Η διαδικασία της εμφύτευσης.

1.2. Ιός του Ανθρώπινου Θηλώματος

Οι ιοί του ανθρώπινου θηλώματος είναι δίκλωνοι, κυκλικοί, DNA ιοί, χωρίς εξωτερικό περίβλημα, με μέγεθος περίπου 8000 ζεύγη βάσεων και διάμετρο 50 ως 60 νανόμετρα. Οι ιοί HPV προσβάλλουν κυρίως τη βασική στοιβάδα του επιθηλίου και συνδέονται με την ανάπτυξη ενδοεπιθηλιακών αλλοιώσεων, ενώ προκαλούν μία σειρά βλαβών στον ξενιστή τους, οι οποίες εκτείνονται από κοινά θηλώματα μέχρι καρκίνο (6).

Οι ιοί HPV διακρίνονται βάσει του χαρακτηριστικού τροπισμού τους, στους δερματικούς ιούς και στους ιούς που προσβάλλουν το επιθήλιο του βλεννογόνου. Οι δερματικοί τύποι προκαλούν καλοήγη δερματικά θηλώματα, ενώ οι τύποι που επιτίθενται στο επιθήλιο του βλεννογόνου οδηγούν σε αλλοιώσεις και αποτελούν τον κύριο αιτιολογικό παράγοντα για την ανάπτυξη ενδοεπιθηλιακής νεοπλασίας και καρκίνου. Οι δερματοτρόποι HPV 1, 4, 5, 8, 41, 48, 60, 63, 65 απομονώνονται στα δερματικά και στα πελματιαία κονδυλώματα, ενώ οι βλεννογονοτρόποι HPV 6, 11, 13, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 44, 52, 55, 58, 67 εντοπίζονται σε καλοήθεις και κακοήθεις βλάβες της γεννητικής οδού, της στοματικής κοιλότητας, του φάρυγγα και του λάρυγγα (7).

Οι ιοί HPV, ανάλογα με τη σοβαρότητα και την έκταση της βλάβης, κατηγοριοποιούνται στην ομάδα υψηλού κινδύνου, τα μέλη της οποίας συνδέονται με το διηθητικό καρκίνο του γεννητικού συστήματος και στην ομάδα χαμηλού κινδύνου, τα μέλη της οποίας σχετίζονται με τη δημιουργία των θηλωμάτων, ενώ συναντώνται σπανίως στον καρκίνο (7).



Εικόνα 6: Ο ιός του ανθρώπινου θηλώματος.

1.2.1. Δομή του Ιού HPV

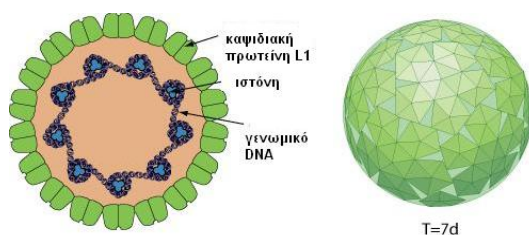
1.2.1.1. Ίικό Καψίδιο

Στο ιικό καψίδιο, οι κυτταρικές ιστόνες συμπυκνώνουν το γονιδίωμα του ιού HPV σε ένα δίκλωνο κυκλικό DNA χρωμόσωμα.

Η καψιδιακή πρωτεΐνη L1 περικλείει το ιικό σωματίο, ενώ συνεισφέρει καθοριστικά στην αλληλεπίδραση του ιού HPV με τον ξενιστή του και στην αναγνώριση των ιικών σωματίων από το ανοσολογικό σύστημα του προσβεβλημένου ατόμου (8), (9).

Η καψιδιακή πρωτεΐνη L2 τοποθετείται κεντρικά του σκελετού της πρωτεΐνης L1, μέσω μιας υδρόφοβης περιοχής κοντά στο C-τελικό άκρο της (10), ενώ αποσπάται από το καψίδιο κατά την πρόσβαση του ιού HPV στο κύτταρο (11), (12). Συμμετέχει στο πακετάρισμα του ιικού DNA στα νεοσχηματιζόμενα ιικά καψίδια, παρεμβαίνει στις αλλαγές της διαμόρφωσης των ιικών σωματίων κατά την πρόσδεσή τους στο κύτταρο ξενιστή και συμβάλλει στην καταστροφή των ενδοσωμικών μεμβρανών για την απελευθέρωσή τους (13), (14), (15), (16).

Το ιικό σωματίο σχηματίζει T=7 εικοσαεδρικά καψίδια (17). Η δομική μονάδα T=1 περιλαμβάνει δώδεκα πενταμερή L1 (18). Κάθε πενταμερές L1 περιέχει πέντε θηλιές, που μοιάζουν με πλαϊνές προεξοχές και διαθέτουν 100 C-τελικά άκρα. Κάθε προεξέχουσα θηλιά αποτελείται από μία α-έλικα αγκιστρωμένη στο δομικό πυρήνα του πενταμερούς L1 μέσω δύο ελίκων, της έλικας 2 και της έλικας 3. Τα πενταμερή L1 συνδέονται με υδρόφοβους δεσμούς μέσω της έλικας 4 του ενός πενταμερούς και των ελίκων 2 και 3 του γειτονικού πενταμερούς. Τα υπόλοιπα C-τελικά άκρα επιστρέφουν στον πυρήνα της πρωτεΐνης L1, συνθέτοντας την έλικα 5 (19).



Εικόνα 7: Το καψίδιο του ιού του ανθρώπινου θηλώματος.

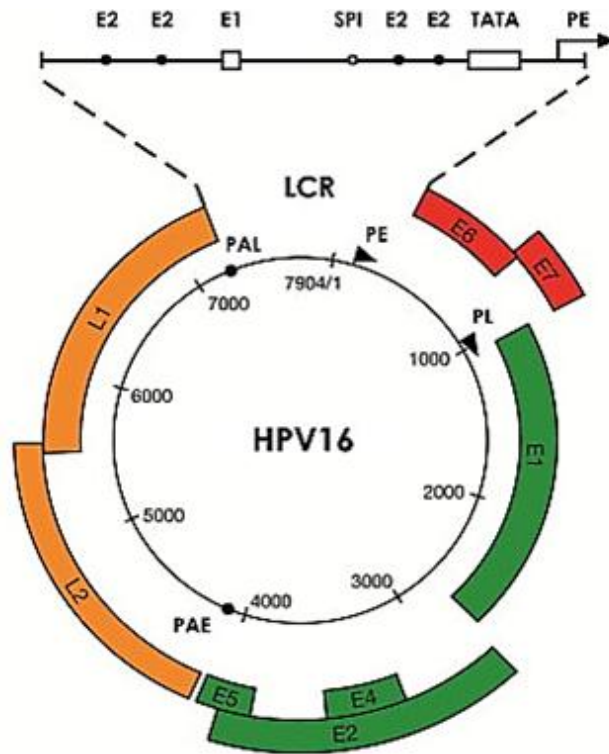
1.2.1.2. Ίικό Γονιδίωμα

Η οργάνωση του ιϊκού γονιδιώματος είναι σχετικά συντηρημένη. Το γονιδίωμα του ιού HPV περιλαμβάνει 6 μη δομικά γονίδια E1, E2, E4, E5, E6, E7 και δύο δομικά γονίδια L1, L2, εμπλεκόμενα σε διαφορετικά στάδια του κύκλου ζωής. Τα συγκεκριμένα γονίδια εκφράζουν έναν επιπλέον αριθμό προϊόντων λόγω του ματίσματος του ιϊκού mRNA (20). Το γονιδίωμα του ιού HPV περιέχει οκτώ ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης.

Το ιϊκό γονιδίωμα διαχωρίζεται βάσει των λειτουργικών του δραστηριοτήτων, στην πρώιμη περιοχή E (early region), στην όψιμη περιοχή L (late region) και στη ρυθμιστική περιοχή LCR (long control region). Η πρώιμη περιοχή κωδικοποιεί για τις πρώιμες ρυθμιστικές πρωτεΐνες E1, E2, E4, E5, E6 και E7, που επηρεάζουν την αντιγραφή, τη μεταγραφή και τη μετάφραση του DNA του ιού HPV. Η όψιμη περιοχή κωδικοποιεί για τις όψιμες δομικές πρωτεΐνες L1 και L2, που σχηματίζουν το ιϊκό καψίδιο (21). Η ρυθμιστική περιοχή LCR, μεγέθους 850 bp, συναντάται μεταξύ του τέλους του γονιδίου L1 και της αρχής του γονιδίου E6. Η αλληλουχία της δεν περιέχει ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης, περιλαμβάνει όμως τη θέση έναρξης της αντιγραφής και τις θέσεις πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων, απαραίτητων για την έκφραση των ιϊκών γονιδίων (22).

Η έκφραση του γονιδιώματος του ιού HPV καθορίζεται από δύο βασικούς υποκινητές, τον υποκινητή PE (p97), που τοποθετείται στην περιοχή LCR και συντονίζει την έκφραση των πρώιμων γονιδίων και τον υποκινητή PL (p670), που εντοπίζεται στο γονίδιο E7 και ρυθμίζει την έκφραση των όψιμων γονιδίων (23), (24). Οι θέσεις 97 και 670 αποτελούν την 5' καλύπτρα των ιϊκών μεταγράφων (25).

Το γονιδίωμα του ιού HPV εμφανίζεται ως επίσωμα, ενσωματωμένο στο DNA του κυττάρου ξενιστή ή ταυτόχρονα και στις δύο μορφές. Το ιϊκό γονιδίωμα αντιγράφεται στη φάση S με συχνότητα μία φορά ανά κυτταρικό κύκλο, εξασφαλίζοντας τη σταθεροποίηση της μόλυνσης στα κύτταρα της βασικής στοιβάδας (25). Η ενσωμάτωση του ιού HPV εκτελείται κατά τη διάρκεια της διαδικασίας επιδιόρθωσης των ασταθών χρωμοσωμικά κυττάρων (26), (27).

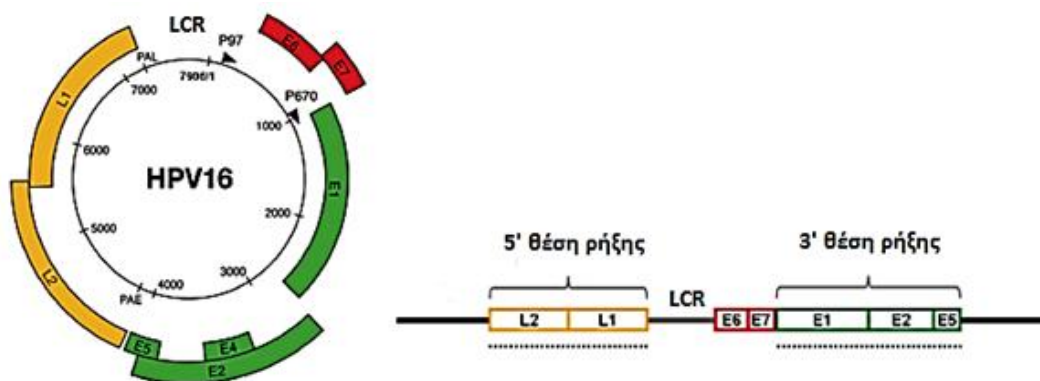


Εικόνα 8: Το γονιδίωμα του ιού του ανθρώπινου θηλώματος.

Η ρήξη του ιϊκού γονιδιώματος πραγματοποιείται συνήθως στο 3' άκρο του ιϊκού DNA. Η ρυθμιστική περιοχή LCR και τα ογκογονίδια E6 και E7 διατηρούνται ακέραια, σε αντίθεση με τα γονίδια E1 και E2 (28), (29), (30), (31), (32) και τα γονίδια L1 και L2 (33), (34), (35). Η ρήξη των πρώιμων γονιδίων E1 και E2 οδηγεί στην απορύθμιση του ελέγχου αντιγραφής των επισωματικών αντιγράφων του ιού HPV, καθώς αναστέλλεται η ελικάση E1 και στη σταθεροποίηση της έκφρασης των ογκογονιδίων E6 και E7, εφόσον παρεμποδίζεται ο καταστολέας E2 του πρώιμου υποκινητή (36), (37), (38). Η συνολική αποδιοργάνωση επιδρά σταδιακά στον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των επιθηλιακών κυττάρων και στην προώθηση γενετικών λαθών στο γονιδίωμα του ξενιστή (39), (40).

Η εμμένουσα λοίμωξη κυρίως από υψηλού κινδύνου τύπους HPV συντελεί πιθανώς στην ενσωμάτωση του ιού HPV στο χρωμόσωμα του κυττάρου ξενιστή (41), (42), (43), (44), (45), (46), (47), (48). Τα μετάγραφα των ενσωματωμένων ογκογονιδίων περιλαμβάνουν κυτταρικές αλληλουχίες, ενώ διαθέτουν επιπλέον σταθερότητα και χρόνο ζωής στο κυτταρόπλασμα, σε σύγκριση με τα μετάγραφα των επισωμάτων. (49). Έτσι, ο ιός HPV διεγείρει έντονα τον κυτταρικό κύκλο και προωθεί τη διαρκή μετάβαση του κυττάρου στη φάση της μίτωσης, παρέχοντας στα μολυσμένα κύτταρα

ένα ισχυρό αναπτυξιακό πλεονέκτημα (50). Ο συνεχής πολλαπλασιασμός των προσβεβλημένων κυττάρων προκαλεί τη συσσώρευση γενετικών λαθών και την αποσταθεροποίηση του γονιδιώματος του ξενιστή, οδηγώντας τελικά στην εμφάνιση ενδοεπιθηλιακών αλλοιώσεων και καρκίνου (51).



Εικόνα 9: Οι θέσεις ρήξης του ιϊκού γονιδιώματος.

1.2.1.3. Ιϊκές Πρωτεΐνες E1 και E2

Οι ιϊκές πρωτεΐνες E1 και E2 αποτελούν ελκυστικούς στόχους στην ανάπτυξη αντιϊκών φαρμάκων, λόγω του καθοριστικού ρόλου που διαδραματίζουν στην αντιγραφή του ιού HPV και στην ιϊκή παθογένεια (52).

Η πρωτεΐνη E1 αποτελείται από 650 αμινοξέα μοριακού βάρους 70-80 kDa και περιλαμβάνει τρεις λειτουργικές περιοχές (53), (54), (55). Το C-τελικό άκρο, διαθέτει δραστηριότητα ATPασης και 3'-5' ελικάσης, συμβάλλει στον ολιγομερισμό της πρωτεΐνης E1 σε ένα εξαμερές και συντελεί στη σύμπραξή της με τη DNA πολυμεράση α του ξενιστή. Η κεντρική περιοχή συμμετέχει στην πρόσδεση της πρωτεΐνης E1 στο DNA του ιού HPV. Το N-τελικό άκρο, η ρυθμιστική περιοχή της πρωτεΐνης E1, χαρακτηρίζεται από ένα συντηρημένο μοτίβο σύνδεσης των αλληλεπιδρώντων με την κινάση Cdk2 κυκλινών A, E, ενώ περιέχει αλληλουχίες πυρηνικού εντοπισμού (NLS) και πυρηνικής εξαγωγής (NES) και θέσεις φωσφορυλίωσης κινασών (56), (57), (58). Η πρωτεΐνη E1 εκφράζεται στην πρόιμη φάση του κύκλου ζωής του ιού HPV και διατηρεί επισωμικό το γονιδιώμα του.

Η πρωτεΐνη E1 δρα ως πρωτεΐνη έναρξης της αντιγραφής, είτε σαν πρωτεΐνη πρόσδεσης, αναγνωρίζοντας τη θέση έναρξης της αντιγραφής, είτε σαν ελικάση, ξεδιπλώνοντας τη θέση έναρξης της αντιγραφής, προωθώντας έτσι την αντιγραφική διχάλα (59). Η πρωτεΐνη E1 συνδέεται μέσω της πρωτεΐνης E2 στη θέση έναρξης της αντιγραφής, σε ένα πλούσιο σε A-T σημείο της περιοχής LCR (60). Το σύμπλοκο E1-E2 αποτελείται από δύο μόρια E1 και ένα διμερές E2, συγκροτώντας ένα εξαμερές E1. Η πρωτεΐνη E2 στρατολογεί επιπρόσθετα μόρια E1, σχηματίζοντας ένα διπλό εξαμερές E1 (61), (62). Το σύμπλοκο E1-E2 προσδέεται στη θέση έναρξης της αντιγραφής με σημαντική συγγένεια, ενισχύοντας το ξετύλιγμα της διπλής έλικας του DNA και προάγοντας την αντιγραφή του ιού HPV σε συνέργεια με την ATP-εξαρτώμενη ενεργότητα ελικάσης. Η πρωτεΐνη E1 αλληλεπιδρά με τη DNA πολυμεράση α -πριμάση, την τοποισομεράση I και την πρωτεΐνη RPA, κατευθύνοντας τους κυτταρικούς αντιγραφικούς παράγοντες στη θέση έναρξης της αντιγραφής και δημιουργώντας ένα ενεργό αντιγραφικό σύμπλοκο (63), (64), (65), (66), (67).

Η πρωτεΐνη E2 αποτελείται από 370 αμινοξέα μοριακού βάρους 50 kDa και περιλαμβάνει δύο λειτουργικές περιοχές. Η N-τελική περιοχή διενεργοποίησης (TAD) εμπλέκεται στο συντονισμό της μεταγραφής των ιικών γονιδίων και στην αλληλεπίδραση με την πρωτεΐνη E1 και η C-τελική περιοχή πρόσδεσης διμερισμού (DBD) συμμετέχει στην πρόσδεση της πρωτεΐνης E2 στο DNA του ιού HPV και στο διμερισμό της πρωτεΐνης E1. Οι δύο περιοχές διαχωρίζονται από την εύκαμπτη περιοχή αρμός (hinge region) (68). Η πρωτεΐνη E2 κατευθύνει την κατανομή του επισωμικού γονιδιώματος του ιού HPV στα θυγατρικά κύτταρα στη φάση της μίτωσης (69), (70), ενώ σε συνεργασία με τους μεταγραφικούς παράγοντες συμμετέχει στην επαφή του ιικού επισώματος με τη μιτωτική χρωματίνη και τη μιτωτική άτρακτο του κυττάρου ξενιστή (71).

Η πρωτεΐνη E2 επιδρά στην αντιγραφή μα και στη μεταγραφή του ιού HPV, λειτουργώντας ως ενεργοποιητής ή απενεργοποιητής. Συνδέεται στην περιοχή LCR με τέσσερις θέσεις της συντηρημένης αλληλουχίας ACCGN4CGGT, οι οποίες ρυθμίζουν τη μεταγραφή των γονιδίων E6 και E7 (72). Οι δύο θέσεις εντοπίζονται στο TATA Box, κοντά στον υποκινητή p97, συνορεύοντας στο 5' άκρο με μία θέση πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα Sp1 και στο 3' άκρο με την πρωτεΐνη TBP. Όταν η πρωτεΐνη E2 δεσμεύεται στις δεδομένες θέσεις, η μεταγραφή σταματά (73),

(74). Όταν η πρωτεΐνη E2 δεσμεύεται στις άλλες δύο θέσεις, οι οποίες εντοπίζονται επίσης κοντά στον υποκινητή p97 του γονιδίου E6, η μεταγραφή ξεκινά (75).

Η πρωτεΐνη E2 παρουσιάζει διαφορετική συγγένεια για τις θέσεις πρόσδεσης, η κάλυψη των οποίων εξαρτάται από τη συγκέντρωσή της. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις, η πρωτεΐνη E2 συνδέεται σε θέσεις μακριά από τον υποκινητή του γονιδίου E6, προσελκύνοντας κυτταρικούς μεταγραφικούς παράγοντες και δρώντας ως μεταγραφικός ενεργοποιητής της έκφρασης των ογκογονιδίων E6 και E7. Σε υψηλές συγκεντρώσεις, η πρωτεΐνη E2 συνδέεται στις τέσσερις θέσεις κοντά στον υποκινητή του γονιδίου E6, εκτοπίζοντας τους κυτταρικούς μεταγραφικούς παράγοντες, όπως τον Sp1 και τον TFIID/B και δρώντας ως μεταγραφικός απενεργοποιητής της έκφρασης των ογκογονιδίων E6 και E7 (76). Η πρωτεΐνη E2 προσδένεται συνολικά σε πολυάριθμους κυτταρικούς μεταγραφικούς παράγοντες TFIIB, TBP, TFIID, AMF-1/GPS, p300/CBP, NAP-1, P/CAF, TopBP1 (77), (78), (79), ο παράγοντας Brd4 ωστόσο, επηρεάζει καθοριστικά το ρόλο της ως μεταγραφικός ενεργοποιητής ή απενεργοποιητής (80).

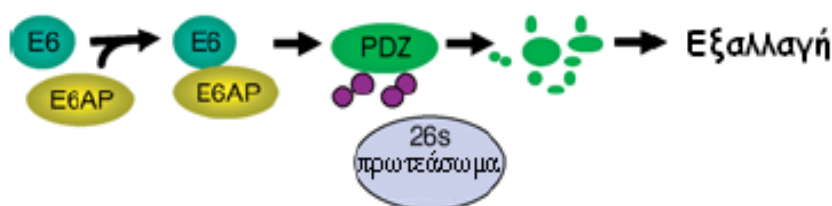
1.2.1.4. Ϊική Ογκοπρωτεΐνη E6

Η ιϊκή ογκοπρωτεΐνη E6 αποτελείται από 150 αμινοξέα με μοριακό βάρος 16-18 kDa και περιλαμβάνει τέσσερις περιοχές επαφής του ψευδαργύρου με το μοτίβο Cys-X-X-Cys. Το συγκεκριμένο συντηρημένο χαρακτηριστικό σχετίζεται με το μετασχηματισμό των κυττάρων. Η πρωτεΐνη E6 των τύπων HPV υψηλού κινδύνου, περιέχει στο C-τελικό άκρο της ένα τομέα πρόσδεσης PSD-95/Dlg/ZO1 (PDZ), ο οποίος συμμετέχει στη σύνδεσή της με τις κυτταρικές πρωτεΐνες (81), (82).

Η ιϊκή πρωτεΐνη E6 αλληλεπιδρά με την πυρηνική φωσφοπρωτεΐνη p53, η οποία ελέγχει την έκφραση παραγόντων, εμπλεκόμενων στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Σε περίπτωση βλάβης του DNA του κυττάρου, η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53 διεγείρεται και επάγει την έκφραση του αναστολέα της κινάσης της κυκλίνης p21, ο οποίος καταστέλλει τον κυτταρικό κύκλο, κατευθύνοντας το κύτταρο, είτε στην επιδιόρθωση, είτε στην απόπτωση. Σε ό, τι αφορά τον ιό HPV, η πρωτεΐνη E6 προσδένεται μαζί με την ουβικουιτινική λιγάση E6AP στην πρωτεΐνη p53 και ο σχηματισμός του καθορισμένου συμπλόκου οδηγεί στην ουβικουιτινίωση

και στην αποδόμηση της πρωτεΐνης p53 στο πρωτεάσωμα 26S. Η πρωτεΐνη E6 συνδέεται και με το συνενεργοποιητή p300/CBP της πρωτεΐνης p53, παρεμποδίζοντας τη δράση της (83). Η λειτουργία της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης p53 επηρεάζεται, τόσο από υψηλού, όσο και από χαμηλού κινδύνου τύπους HPV, ωστόσο μονάχα οι τύποι υψηλού κινδύνου επιφέρουν τη συνολική αποικοδόμησή της (84), (85), (86).

Η ιϊκή πρωτεΐνη E6 παρεμβαίνει στη δημιουργία αθάνατων κυττάρων, κινητοποιώντας συνδυαστικά μέσω του γονιδίου c-myc και του μεταγραφικού παράγοντα Sp1, την καταλυτική υπομονάδα της τελομεράσης hTERT. Η πρωτεΐνη E6 προωθεί τη συνεχή, εκτεταμένη έκφραση της τελομεράσης hTERT, συμβάλλοντας στη διατήρηση ενισχυμένων τελομερών κατά την κυτταρική διαίρεση και συντελώντας συνεπώς στην αποτροπή της κυτταρικής γήρανσης και στην αθανатоποίηση των κυττάρων (87).



Εικόνα 10: Ο ρόλος της ιϊκής ογκοπρωτεΐνης E6.

1.2.1.5. Ιϊκή Ογκοπρωτεΐνη E7

Η ιϊκή ογκοπρωτεΐνη E7 αποτελείται από 100 αμινοξέα και περιλαμβάνει τις διατηρημένες περιοχές CR1, CR2 και CR3, οι οποίες σχετίζονται με την ιϊκή παθογένεια και την αθανатоποίηση των κυττάρων. Η CR1 περιέχει το N-τελικό άκρο, το οποίο συμμετέχει στον κυτταρικό μετασχηματισμό και στην αποδόμηση της πρωτεΐνης pRB, η CR2 διαθέτει ένα συντηρημένο μοτίβο LXCXE και μία θέση φωσφορυλίωσης της κινάσης καζεΐνης CKII και η CR3 περιέχει δύο μοτίβα δακτύλων ψευδαργύρου, συμβάλλει στο διμερισμό της πρωτεΐνης E7 και συντελεί στη σύνδεσή της με την πρωτεΐνη pRb και τις κυτταρικές πρωτεΐνες (88). Η πρωτεΐνη E7 των τύπων HPV υψηλού κινδύνου συμμετέχει στην ενίσχυση των κεντρομερών

στα κύτταρα της βασικής στοιβάδας του επιθηλίου, συντελώντας καθοριστικά στην πρόκληση γενωμικής αστάθειας (89), (90).

Η ιϊκή πρωτεΐνη E7 αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος pRb, η οποία συντονίζει την πορεία του κυτταρικού κύκλου (91), (92). Η αποφωσφορυλιωμένη πρωτεΐνη pRb συμπλοκοποιείται με το μεταγραφικό παράγοντα E2F/DP1, ο οποίος επιδρά στην έκφραση γονιδίων σχετικών με την προώθηση του κυτταρικού κύκλου στη φάση S και με την προαγωγή του κυττάρου στην απόπτωση. Κατά τη μετάβαση από τη φάση G1 στη φάση S, η φωσφορυλιωμένη πρωτεΐνη pRb αποσπάται από το μεταγραφικό παράγοντα E2F, επιφέροντας τη μεταγραφή γονιδίων εμπλεκόμενων στην αντιγραφή του DNA. Σε ό, τι αφορά τον ιό HPV, η πρωτεΐνη E7 συνδέεται με την πρωτεΐνη pRb, οδηγώντας στην αποικοδόμηση της μέσω του μονοπατιού του ουβικουιτινικού πρωτεασώματος (93), (94). Η πρόσδεση της πρωτεΐνης E7 στην πρωτεΐνη pRb απορρυθμίζει τον κυτταρικό κύκλο, με συνέπεια τον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

Η πρωτεΐνη E7 προσδένεται στις κυκλίνες A και E και στους αναστολείς των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών p21 και p27. Ενισχύει τα επίπεδα των κυκλινών A και E και μπλοκάρει τη δράση των κινασών p21 και p27, επάγοντας τη φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης pRb και κατ' επέκταση την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου (95), (96).

Η πρωτεΐνη E7 συνδέεται με τις απακετυλάσες των ιστονών HDACs, οι οποίες εκφράζονται σε όλους τους ιστούς, μετακινώντας τις ακετυλομάδες από τις ιστόνες. Σε φυσιολογικές συνθήκες, η πρωτεΐνη pRb προσεγγίζει τις HDACs και τις στρατολογεί στους υποκινητές E2F. Η πρωτεΐνη E7 παρεμποδίζει τη δημιουργία του συμπλόκου pRb-HDACs, παρεμβαίνει στην απακετυλίωση του υποκινητή E2F και διακόπτει τη δράση του, απορρυθμίζοντας τον έλεγχο σύνθεσης των HDACs και πυροδοτώντας εκτεταμένη αντιγραφή του ιού HPV (97).

Οι ιϊκές ογκοπρωτεΐνες E6 και E7 δεν επικουρούν ουσιαστικά τον πολλαπλασιασμό των επιθηλιακών κυττάρων, αλλά διεγείρουν διαρκώς τον κύκλο των κυττάρων της μεσαίας επιθηλιακής στοιβάδας, ενισχύοντας έτσι το γονιδίωμα του ιού HPV (25).

Τα ογκογονίδια E6 και E7 προωθούνται από την πρωτεΐνη E5, εντείνοντας την αθανατοποίηση (98) και προάγοντας την ικανότητα διήθησης των ανθρώπινων κερατινοκυττάρων (99), (100).

Η πρωτεΐνη E5 αποτελεί μία πλούσια σε υδρόφοβα αμινοξέα διαμεμβρανική πρωτεΐνη με κυτταροπλασματικό C-τελικό άκρο (101). Ολιγομερίζεται σε εξαμερή, τα οποία επιτελούν λειτουργία pH-εξαρτώμενων καναλιών ιόντων στα λιποσώματα (102). Εντοπίζεται στις ενδοσωμικές μεμβράνες, στη συσκευή Golgi και περιστασιακά στις κυτταρικές μεμβράνες (103); (104); (105).

Η πρωτεΐνη E5 στερείται ενζυμικής ενεργότητας, ρυθμίζει ωστόσο τη δραστηριότητα των κυτταρικών πρωτεϊνών. Προσδένεται στον υποδοχέα EGFR του αυξητικού παράγοντα EGF (106) και δρομολογεί τα δεδομένα μονοπάτια. Συγκεκριμένα, προάγει την εκτεταμένη κινητοποίηση των κινασών ERK1/2 και AKT (107), προωθεί την έκφραση των ογκογονιδίων c-jun και c-fos, αλληλεπιδρώντας με το μεταγραφικό παράγοντα NF1 (108) και ευνοεί τη δράση του γονιδίου COX-2 (109). Η πρωτεΐνη E5 εμπλέκεται ακόμη στη διαφυγή του ιού HPV από την ανοσολογική απάντηση του ξενιστή, συγκρατώντας το μείζων σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας MHC I στη συσκευή Golgi και εμποδίζοντας τη μεταφορά του στην κυτταρική επιφάνεια (110), (111).

1.2.2. Κύκλος Ζωής του Ιού HPV

Ο κύκλος ζωής του ιού HPV ακολουθεί το πρόγραμμα διαφοροποίησης των κερατινοκυττάρων του ξενιστή.

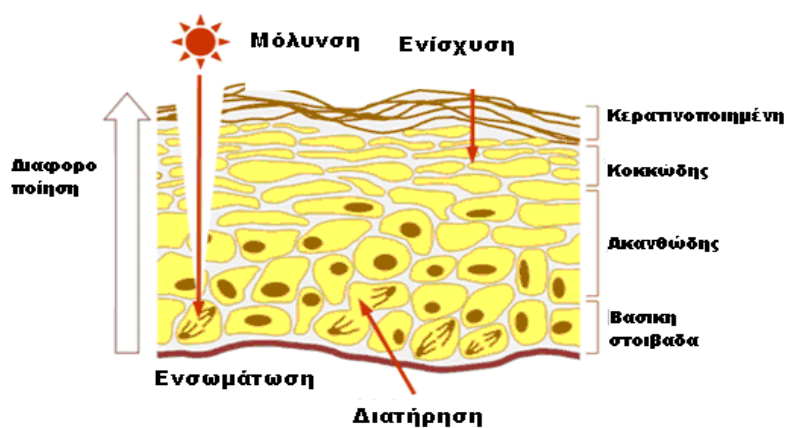
1.2.2.1. Είσοδος του Ιού HPV στο Κύτταρο

Τα ιικά σωματίδια προσβάλλουν τους επιθηλιακούς ιστούς λόγω μικροτραυματισμών. Ο ιός HPV συνδέεται με τον υποδοχέα θειϊκής ηπαρίνης και εισβάλλει στα επιθηλιακά κύτταρα της βασικής στοιβάδας (112). Η θειϊκή ηπαρίνη αποτελεί συστατικό των πρωτεογλυκανών και εντοπίζεται στον εξωκυττάριο χώρο. Ο ιός HPV προσδένεται και στον υποδοχέα Α6-ιντεγκρίνης (113). Η λαμινίνη-5 λειτουργεί επίσης ως υποδοχέας του ιού στην επιφάνεια των κερατινοκυττάρων (114).

Ο ιός HPV εισέρχεται στο κύτταρο ξενιστή με ενδοκυττάρωση σε κυστίδια κλαθρίνης ή καβεολίνης (115). Τα ιϊκά σωματίδια αποσυναρμολογούνται στα ενδοσώματα και στα λυσοσώματα. Η καψιδιακή πρωτεΐνη L2 μεταφέρει το ιϊκό DNA στον πυρήνα, ενώ η καψιδιακή πρωτεΐνη L1 αποδομείται (116), (117).

1.2.2.2 Αντιγραφή και Μεταγραφή του Ιού HPV

Ο ιός HPV αντιγράφει το γονιδιώμα του σε ξεχωριστές περιόδους κατά τη διάρκεια του κύκλου ζωής του. Η πρώτη φάση διεξάγεται στα κύτταρα της βασικής στοιβάδας. Το ιϊκό γονιδίωμα ενισχύεται εκτεταμένα παράγοντας περίπου 200 ιϊκά αντίγραφα ανά κύτταρο (118), ενώ παραμένει στον πυρήνα ως επίσωμα. Ο πολλαπλασιασμός του ιϊκού γονιδιώματος εκτελείται κατά τη διαίρεση των κυττάρων της βασικής στοιβάδας στη φάση S. Το ιϊκό DNA αντιγράφεται μαζί με το DNA του κυττάρου ξενιστή, δημιουργώντας δύο αντίγραφα, ένα σε κάθε θυγατρικό κύτταρο. Το ιϊκό γονιδίωμα σταθεροποιείται (119), (120), (121). Η τελευταία φάση διεξάγεται στα προσβεβλημένα κύτταρα των ανώτερων στοιβάδων. Η παρατεταμένη έξαρση της αντιγραφικής δραστηριότητας οδηγεί στη σύνθεση του ιϊκού DNA των νέων μολυσματικών ιϊκών σωματίων (122).



Εικόνα 11: Η αντιγραφή του ιϊκού γονιδιώματος.

Στα αδιαφοροποίητα ή ενδιάμεσα διαφοροποιημένα κερατινοκύτταρα, ο πρώιμος μεταγραφικός υποκινητής p97 ρυθμίζει την έκφραση των έξι ρυθμιστικών γονιδίων E1, E2, E4, E5, E6 και E7, εγκαθιδρύοντας τη μόλυνση και εδραιώνοντας την αντιγραφή του DNA κατά την είσοδο του ιού στο κύτταρο (20).

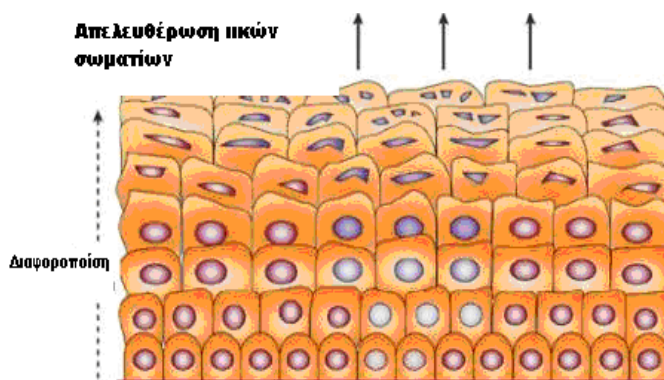
Στα πλήρως διαφοροποιημένα κερατινοκύτταρα, ο όψιμος μεταγραφικός υποκινητής p670 ελέγχεται από τους κυτταρικούς παράγοντες ή από τα διαφορετικά επίπεδα της μεθυλίωσης της ρυθμιστικής περιοχής LCR και συντονίζει την έκφραση των γονιδίων E1 και E2, ενισχύοντας το DNA του ιού HPV στη φάση της διαφοροποίησης των κυττάρων (23). Ο όψιμος μεταγραφικός υποκινητής ρυθμίζει την έκφραση των δύο δομικών γονιδίων L1 και L2, συμμετέχοντας στο σχηματισμό του ιϊκού καψιδίου και στο πακετάρισμα του ιϊκού γονιδιώματος στα νέα ιϊκά σωματίδια κατά την έξοδο του ιού από το κύτταρο (123).

Η τοποθέτηση των αντιγράφων του ιϊκού γονιδιώματος στα νεοσχηματιζόμενα καψίδια υλοποιείται με τη συμβολή της πρωτεΐνης E2. Η συναρμολόγηση των νέων μολυσματικών ιϊκών σωματίων πραγματοποιείται με τη συνεισφορά των πρωτεϊνών L1 και L2, ενώ η ωρίμανσή τους εκτελείται καθώς τα μολυσμένα κύτταρα ανέρχονται στην ανώτερη επιθηλιακή στοιβάδα.

1.2.2.3. Έξοδος του Ιού HPV από το Κύτταρο

Τα νέα ιϊκά σωματίδια απελευθερώνονται από το κερατινοποιημένο κάλυμμα της κυτταρικής επιφάνειας. Η πρωτεΐνη E1^{E4}, η οποία συντίθεται στις ανώτερες επιθηλιακές στοιβάδες κατά την όψιμη φάση του κύκλου ζωής του ιού HPV (124), αλληλεπιδρά με το δίκτυο των ινιδίων κερατίνης στα διαφοροποιημένα κερατινοκύτταρα, επάγοντας την καταστροφή του (125), (126).

Ο ιός HPV εξέρχεται από το κύτταρο ξενιστή, ενώ δεν προκαλεί λύση των προσβεβλημένων κερατινοκυττάρων (127).



Εικόνα 12: Η απελευθέρωση των ιϊκών σωματίων.

1.3. Επιδημιολογία

Ο παγκόσμιος επιπολασμός του ιού HPV εκτιμάται ακόμη σε σημαντικό ποσοστό, παρά την αδειοδότηση των HPV εμβολίων σε περισσότερες από τις μισές χώρες του κόσμου (128), (129). Η συνεχιζόμενη επικράτηση του ιού HPV αποδίδεται εν μέρει στους ασυνεπείς ρυθμούς του εμβολιασμού (130), (131).

Η HPV λοίμωξη μεταδίδεται γενικώς μέσω της δερματικής επαφής, μολύνοντας τα επιθηλιακά κύτταρα στο γεννητικό βλεννογόνο, στο στοματικό βλεννογόνο ή στο δέρμα (132), (133). Οι περισσότεροι σεξουαλικά ενεργοί ενήλικες προσβάλλονται από τον ιό HPV στη διάρκεια της ζωής τους (134), σε οποιαδήποτε ηλικία (135). Όσον αφορά την HPV λοίμωξη, τα ποσοστά της μόλυνσης κορυφώνονται στις γυναίκες ηλικίας κάτω των 30 ετών, καθώς και στις γυναίκες ηλικίας 55 έως 64 ετών (136). Γενικά, ο κίνδυνος απόκτησης του ιού HPV ενισχύεται αναλογικά με τον αριθμό των πρόσφατων αλλά και των συνολικών σεξουαλικών συντρόφων (134), (137), (138).

1.4. Ιός HPV και Γεννητικό Σύστημα

Το γυναικείο γεννητικό σύστημα αντιμετωπίζει σημαντικές και συχνές αντιγονικές εκθέσεις (139). Πριν την αναπαραγωγική ηλικία, πολυάριθμα αντιγόνα αναγνωρίζονται ως συμβιωτικά μικροβιώματα (139). Το γεννητικό σύστημα εκτίθεται σε αρκετά εξωγενή αντιγόνα, συμπεριλαμβανομένων των προερχόμενων από το ανδρικό αναπαραγωγικό σύστημα, ιδίως μετά την έναρξη της σεξουαλικής δραστηριότητας (139). Από βιολογική άποψη, ο ιός HPV αποτελεί ένα εξαιρετικά επιτυχημένο παθογόνο, το οποίο προκαλεί χρόνιες μολύνσεις χωρίς συστηματικά συμπτώματα, επιτρέποντας έτσι στον ξενιστή την περιοδική απελευθέρωση ικανών ποσοτήτων μεταδοτικού ιού (140). Η διαφυγή του ιού HPV από το ανοσοποιητικό σύστημα εξαρτάται κυρίως από τη διαφοροποίηση των κυτταρικών στοιβάδων στο βλεννογονοδερματικό επιθήλιο (140). Οι HPV λοιμώξεις χαρακτηρίζονται συνήθως υποκλινικές, παρουσιάζοντας μη παρατηρήσιμα ή ήπια συμπτώματα (140), (139). Η περίοδος επώασης του ιού HPV κυμαίνεται από τρεις εβδομάδες έως οκτώ μήνες (140), (138). Η HPV λοίμωξη υποχωρεί αυθόρμητα σε τρεις μήνες στο 10-30% των

γυναικών (138), ενώ απομακρύνεται μέσα σε δύο έτη στο 90% των γυναικών (140), (139). Η κάθαρση των συγκεκριμένων λοιμώξεων συντελείται λόγω της ανάπτυξης κυτταρομεσολαβούμενης ανοσίας, συνοδευόμενης από την ορομετατροπή του αντισώματος στη μεγάλη καψιδιακή πρωτεΐνη L1 (138). Ένα ποσοστό γυναικών (10-15%) εμφανίζει αποτυχημένη κυτταρομεσολαβούμενη ανοσιακή απόκριση και παραμένει επιμόνως μολυσμένο (141), αντιμετωπίζοντας τον κίνδυνο ανάπτυξης νόσου υψηλού βαθμού και πιθανώς καρκίνου (142).

1.5. Ιός HPV και Καρκίνος

Ο ιός HPV διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο στην ανάπτυξη διαφόρων μορφών καρκίνου (143). Η συμμετοχή των ιών HPV υψηλού κινδύνου στην κακοήθη εξέλιξη της νόσου του τραχήλου της μήτρας είναι ευρέως γνωστή εδώ και πάρα πολλά χρόνια (144). Πλέον (145), οι ιοί HPV υψηλού κινδύνου σχετίζονται και με καρκίνους σε ανατομικές θέσεις όπως η κεφαλή και ο τράχηλος (146), (147) ο στοματοφάρυγγας, (148), ο πνεύμονας (149), (150) και η ουροδόχος κύστη (151).

1.6. Ιός HPV και Υπογονιμότητα

Οι σεξουαλικά μεταδιδόμενες λοιμώξεις, οι οποίες προκαλούνται από το μικρόβιο *Chlamydia trachomatis* ή από τα βακτήρια *Neisseria gonorrhoeae* και *Treponema pallidum* οδηγούν συχνά σε μεταβολές στη γονιμότητα ή ακόμη και σε υπογονιμότητα (152). Οι αναπαραγωγικές αλλαγές συνδέονται και με τους σεξουαλικά μεταδιδόμενους ιούς, συμπεριλαμβανομένου του ιού της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας HIV, του κυτταρομεγαλοϊού CMV και του ιού του απλού έρπητα HSV 1, HSV 2 (152), (153). Πρόσφατα, ο ιός του ανθρώπινου θηλώματος HPV προτείνεται επίσης ως παράγοντας τροποποίησης της γονιμότητας (152), (154). Η HPV λοίμωξη επάγει κυρίως δύο διαφορετικά μονοπάτια: μία μολυσματική οδό παραγωγής ισοωματίων και μία μη μολυσματική οδό πρόκλησης καρκίνου (155). Η πρότερη πορεία εμπλέκεται πιθανώς στη μεταβολή της γονιμότητας (155). Ωστόσο, ο ρόλος του ιού HPV ως άμεση αιτία της υπογονιμότητας παραμένει ακόμη αβέβαιος (156).

1.7. Ιός HPV και Σπερματοζωάριο

Στους άνδρες, οι HPV λοιμώξεις προκαλούν συχνά τη μόλυνση του σπέρματος (157), (158), (159). Η ύπαρξη του DNA και του RNA του ιού HPV αποδεικνύεται στο πέος, στην ουρήθρα, στην επιδιδυμίδα και στους όρχεις (160), (161). Σε 111 άνδρες, με γυναίκες συντρόφους προσβεβλημένες από τον ιό HPV, το DNA του ιού HPV ανιχνεύθηκε στο σπέρμα του 23,4% των ανδρών (162). Ο ιός HPV δεσμεύεται πιθανώς σε δύο διαφορετικές θέσεις στην ισημερινή περιοχή της κεφαλής του σπερματοζωαρίου (163), (164), (165). Η παρουσία των γλυκοζαμινογλυκανών ή άλλων διαλυτών παραγόντων στην επιφάνεια του σπερματοζωαρίου μεσολαβεί στην αλληλεπίδραση και στη σύνδεση ανάμεσα στον ιό HPV και στα κύτταρα του σπέρματος (163), (164), (165). Η καψιδιακή πρωτεΐνη L1 του ιού HPV και η συνδεκάνη-1 της γλυκοζαμινογλυκάνης συσσωματώνονται ενδεχομένως στην ισημερινή περιοχή της κεφαλής του σπερματοζωαρίου (166).

1.7.1. Ιός HPV και Παράμετροι Σπέρματος

Γενικώς, οι σεξουαλικά μεταδιδόμενες λοιμώξεις επηρεάζουν την ποιότητα του σπέρματος προκαλώντας ορχίτιδα, επιδιδυμίτιδα και ουρηθρίτιδα (152), (165). Οι ακριβείς μηχανισμοί, μέσω των οποίων ο ιός HPV επιδρά στο σπέρμα, παραμένουν ακόμη ελάχιστα κατανοητοί. Στους άνδρες, οι HPV λοιμώξεις μεταβάλλουν κυρίως την κινητικότητα του σπέρματος (166), (167). Εντοπίζεται ενισχυμένη κινητικότητα μαζί με ελαττωμένη ταχύτητα και ευρύτητα πλευρικής μετατόπισης της κεφαλής (168). Η ενισχυμένη κινητικότητα, η προωθητικότητα και η ταχύτητα επιβεβαιώνονται στο HPV εκτεθειμένο σπέρμα (169). Ωστόσο, στους HPV προσβεβλημένους άνδρες υποδεικνύεται κυρίως η περιορισμένη κινητικότητα του σπέρματος (154), (164), (170), (171). Τα ευρήματα παραμένουν συνεπή ανάμεσα στους υπογόνιμους άνδρες και στους δότες σπέρματος. Η HPV σχετιζόμενη εξασθένηση της κινητικότητας του σπέρματος συναντάται συχνά στους άνδρες με ιδιοπαθή υπογονιμότητα σε σύγκριση με τους υγιείς γόνιμους μάρτυρες (172). Ο ιός HPV ενισχύει ακόμη τον κατακερματισμό του DNA των σπερματοζωαρίων (173) και επιφέρει αλλαγές στο pH του σπέρματος (174). Οι υπόλοιπες σπερματικές

παράμετροι, όπως ο όγκος, το ιξώδες, ο αριθμός και η μορφολογία, δε διαφέρουν στα HPV μολυσμένα και στα μη μολυσμένα δείγματα σπέρματος (165).

1.8. Ιός HPV και Έμβρυο

1.8.1. Ιός HPV και Πρώιμη Εμβρυογένεση

Το σπέρμα μεταφέρει το εξωγενές DNA του ιού HPV και δρα ενδεχομένως ως φορέας μετάδοσης του ιού HPV στους σεξουαλικούς συντρόφους, καθώς και στο έμβryo μέσω των γονιμοποιημένων ωοκυττάρων (167), (175), (176), (177). Σε μοντέλα ποντικών, το HPV προσβεβλημένο σπέρμα γονιμοποιεί επιτυχώς τα ωοκύτταρα (178), ενώ ακολουθεί η γονιδιακή έκφρασή του ιού HPV στην εσωτερική κυτταρική μάζα και στο τροφοεξώδερμα των πρώιμων βλαστοκύστεων (179). Η δοκιμασία διείσδυσης HEPT (hamster egg penetration test), αποδεικνύει παρομοίως πως το ανθρώπινο σπέρμα μεταφέρει στα ωοκύτταρα τη μεγάλη καψιδιακή πρωτεΐνη L1 και τα γονίδια E6/E7, τα οποία εκφράζονται στις αναπτυσσόμενες βλαστοκύστες (166). Ακολούθως, σημειώνεται ενισχυμένος κατακερματισμός του DNA και τροφοβλαστικός θάνατος στις βλαστοκύστες (180), (181), (182). Τα συγκεκριμένα ευρήματα αφορούν ιδιαίτερα τον υπότυπο HPV 16 (181), (182). Το ποσοστό της HPV σχετιζόμενης τροφοβλαστικής απόπτωσης συνδέεται πιθανώς με την ανάπτυξη του εμβρύου, καθώς, το ποσοστό απόπτωσης θεωρείται 3 φορές και 5,8 φορές υψηλότερο σε τρεις και σε δώδεκα ημέρες μετά τη γονιμοποίηση, αντίστοιχα (183). Τα προαναφερθέντα ευρήματα βασίζονται κυρίως σε *in vitro* πειράματα σε μοντέλα ποντικού, όπου δεν αντανakλούν απαραίτητως *in vivo* καταστάσεις στους ανθρώπους (156).

1.8.2. Ιός HPV και Πρώιμη Κύηση

Ο ιός HPV, εκτός από την επίπτωσή του στην τροφοβλαστική ανάπτυξη, περιορίζει και την ενδομήτρια εμφύτευση των τροφοβλαστικών κυττάρων, ενισχύοντας έτσι το θεωρητικό κίνδυνο αποβολής (184), (185), (186). Σε 108 ασθενείς με αποβολές, το DNA των ιών HPV 16 και 18 ανιχνεύθηκε στο 7,4% των ελεγχθέντων εμβryών

(187). Συγκρίνοντας 25 πρώιμες αποβολές με 15 εκούσιους τερματισμούς της κύησης, οι αλληλουχίες E6/E7 του ιού HPV ανιχνεύθηκαν στο 60% των πρώτων σε σύγκριση με το 20% των δεύτερων, αντίστοιχα (188). Το DNA του ιού HPV εντοπίζεται πιο συχνά στις αυθόρμητες αποβολές σε σχέση με τις εκούσιες αμβλώσεις, οδηγώντας στη θεώρηση πως ίσως ο ιός HPV εμπλέκεται στην παθοφυσιολογία της πρώιμης απώλειας της κύησης (188). Στην εγκυμοσύνη, η έκθεση στους ιούς HPV 6, 11, 16 ή 18 σχετίζεται με 2,2% επικράτηση σημαντικών γενετικών ανωμαλιών και με 1,5% κίνδυνο εμβρυικού θανάτου (186). Τα συγκεκριμένα ευρήματα ωστόσο, πρέπει να ερμηνεύονται με προσοχή, καθώς προκύπτουν από αναδρομικές ή συγχρονικές μελέτες με μικρά μεγέθη δείγματος. Αντιθέτως, από αναδρομικές μελέτες μεγαλύτερων ομάδων καταδεικνύεται πως η HPV λοίμωξη στην εγκυμοσύνη δε συνεπάγεται πιθανώς υψηλότερο κίνδυνο αποβολής (189), (190).

1.9. Ιός HPV και Υποβοηθούμενη Αναπαραγωγή

1.9.1. Ιός HPV και Ενδομήτρια Σπερματέγχυση

Ο επιπολασμός της HPV λοίμωξης του σπέρματος εκτιμάται κατά προσέγγιση σε 2-31% στο γενικό πληθυσμό, ενώ ο αντίστοιχος αριθμός στους άνδρες με ανεξήγητη υπογονιμότητα κυμαίνεται μεταξύ 10 και 35,7% (172). Στην πραγματικότητα, η ιδιοπαθής ασθενοζωοσπερμία συνδέεται ενδεχομένως αποκλειστικά με την ύπαρξη του DNA του ιού HPV ως παράγοντα κινδύνου (164), (165). Σε 590 γυναίκες υποβληθείσες σε 1529 κύκλους ενδομήτριας σπερματέγχυσης (IUI) (191), αναφέρθηκε επιπολασμός του ιού HPV 11% ανά κύκλο ενδομήτριας σπερματέγχυσης. Η εγκυμοσύνη θεωρείται έξι φορές λιγότερο πιθανή στις γυναίκες με HPV μόλυνση (1,87%) σε σύγκριση με τις γυναίκες χωρίς HPV μόλυνση (11,4%).

1.9.2. Ιός HPV και In Vitro Γονιμοποίηση

Οι γυναίκες με υπογονιμότητα ή στειρότητα, οι οποίες επιλέγουν την in vitro γονιμοποίηση (IVF), διαθέτουν σχεδόν διπλάσιο ποσοστό HPV σχετιζόμενης μη

φυσιολογικής τραχηλικής κυτταρολογίας ή υψηλού βαθμού τραχηλικών αλλοιώσεων σε σύγκριση με το γενικό πληθυσμό (192), (193), (194). Αξιολογώντας την επίπτωση του ιού HPV στις εκβάσεις της *in vitro* γονιμοποίησης (195), ο ιός HPV ανιχνεύθηκε στο 16% της ομάδας των 106 ασθενών. Αν και δε διαπιστώνονται διαφορές στον αριθμό των συλλεχθέντων ωαρίων, στον αριθμό των μεταφερθέντων εμβρύων, στην ποιότητα του εμβρύου ή στα ποσοστά των αυθόρμητων αποβολών, εμφανίζεται χαμηλότερο ποσοστό κύησης στις γυναίκες με HPV μόλυνση (23,5%) σε σχέση με τις γυναίκες χωρίς HPV μόλυνση (57,0%). Σε 199 υπογόνιμα ζευγάρια, το 9,5%, το 17,5% και το 4,5% των ανδρών, των γυναικών ή και των δύο συντρόφων αντίστοιχα, εντοπίστηκαν HPV θετικοί (196). Οι υψηλότερες πιθανότητες της αυθόρμητης αποβολής (λόγος πιθανοτήτων: 4,20) αναφέρονται ανάμεσα στις γυναίκες με HPV μόλυνση, καθώς και στις γυναίκες με HPV θετικούς άνδρες συντρόφους (λόγος πιθανοτήτων: 11,3). Τα χαμηλότερα ποσοστά γεννήσεων σημειώνονται στις HPV θετικές γυναίκες σε σχέση με τις αρνητικές μάρτυρες, αν και οι συγκεκριμένες διαφορές δε λογίζονται στατιστικά διαφορετικές, λόγω του μικρού μεγέθους του δείγματος (197). Ωστόσο, μετέπειτα αντικρουόμενα αποτελέσματα δεν υποδεικνύουν την επίδραση του ιού HPV στα ποσοστά των κλινικών κυήσεων και των αυθόρμητων αποβολών μετά την *in vitro* γονιμοποίηση (156), (198), (199).

1.9.3. Ιός HPV και Τεχνικές Πλύσης Σπέρματος

Οι συνήθεις τεχνικές πλύσης του σπέρματος δεν εξαλείφουν το DNA του ιού HPV από τα δείγματα (200), ενώ και στη μικρογονιμοποίηση οι μέθοδοι επιλογής του σπέρματος δεν εγγυώνται την έγχυση μη μολυσμένων σπερματοζωαρίων στα ωάρια. Τα μολυσμένα δείγματα και τα προσβεβλημένα κύτταρα δε μεταβάλλονται, ακόμη και μετά τη φυγοκέντρηση πλύσης του σπέρματος. Στα πρωτόκολλα Ficoll και Swim Up παρατηρείται μία ελάχιστη επίδραση αναφορικά με τον αριθμό των μολυσμένων δειγμάτων (200), ενώ χρησιμοποιώντας το τροποποιημένο πρωτόκολλο Swim Up με ηπαρινάση-III λαμβάνονται βελτιωμένα αποτελέσματα (170), (201). Ο ιός HPV δεσμεύεται στις αρνητικά φορτισμένες γλυκοζαμινογλυκάνες της κυτταρικής επιφάνειας. Η ηπαρίνη, ένας θειϊκός πολυσακχαρίτης, μοιάζει με τις γλυκοζαμινογλυκάνες στη χημική δομή. Τα μόρια της ηπαρίνης προσδένονται απευθείας στα καψίδια του ιού HPV και εμποδίζουν τη σύνδεσή τους με την

κυτταρική επιφάνεια των σπερματοζωαρίων (163). Ως εκ τούτου, η πλύση του σπέρματος με ηπαρινάση-III για την απομάκρυνση του ιού HPV αποτελεί υποσχόμενη μέθοδο (170), αν και το ερώτημα παραμένει ως προς το εάν τα πραγματικά ιικά σωματίδια είναι δυνατόν να αφαιρούνται ή να εξαλείφονται με την τροποποιημένη τεχνική Swim Up με ηπαρινάση-III.

1.10. Ιός HPV και Κύηση

Η ανίχνευση του ιού HPV στον ιστό του πλακούντα υποδεικνύει την κάθετη μετάδοσή του (177), (185). Σε 291 έγκυες γυναίκες >36 εβδομάδων κύησης, το ποσοστό της κάθετης μετάδοσης υπολογίστηκε σε 18,2% (202). Η κάθετη μετάδοση σημειώνεται συχνά στους τοκετούς μέσω του μολυσμένου τραχήλου της μήτρας, αν και η απουσία της HPV μόλυνσης σε όλα τα βρέφη 6 μηνών υποδηλώνει την προσωρινή ανοσοποίηση αντί την κάθετη μόλυνση (202). Ο ιός HPV ίσως διαδραματίζει έναν ενδεχόμενο ρόλο στις δυσμενείς εκβάσεις της εγκυμοσύνης, παρά τον παροδικό εντοπισμό του DNA του. Ο ιός HPV συμμετέχει, τουλάχιστον εν μέρει, στην πρόωρη ρήξη των μεμβρανών (203), (204) και στον αυθόρμητο πρόωρο τοκετό (205), (206), (207).

1.11. Ιός HPV και Εμβολιασμός

Το HPV εμβόλιο είναι εγκεκριμένο για την πρόληψη των γεννητικών κονδυλωμάτων, της δυσπλασίας του τραχήλου της μήτρας και του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας (140), (208). Δεδομένης της αναδυόμενης σχέσης της HPV λοίμωξης με ποικίλες κακοήθειες, καθώς και με τη μεταβολή της γονιμότητας, το HPV εμβόλιο θα συμβάλλει προφανώς στον περιορισμό της επιβάρυνσης από τις προκαλούμενες από τον ιό νόσους. Η βασική λογική της χρήσης των HPV εμβολίων αφορά στην αντιμετώπιση τυχόν HPV σχετιζόμενων διαταραχών του σπέρματος στα ζευγάρια με ιδιοπαθή υπογονιμότητα (184). Επιπλέον, από θεωρητική άποψη, ο HPV εμβολιασμός θα αποτρέψει την HPV σχετιζόμενη τροφοβλαστική απόπτωση και τις αυθόρμητες αποβολές, βελτιώνοντας έτσι τις εκβάσεις της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής (184). Η μόλυνση του σπέρματος από τον ιό HPV αποτελεί επίσης ένα πρόβλημα ευρείας κλίμακας για τις τράπεζες σπέρματος (200), (209), λόγω της

έλλειψης αποτελεσματικών διαδικασιών πλύσης του σπέρματος. Ο εμβολιασμός των ανδρών θεωρείται μία πιθανή στρατηγική αποσόβησης της HPV σχετιζόμενης βλάβης του σπέρματος στους δότες (184). Οι προαναφερθείσες τακτικές φαίνονται λογικές, αν και οι συγκεκριμένες προτάσεις βασίζονται ιδίως σε μελέτες *in vitro* παρά σε επιδημιολογικές μελέτες ευρείας κλίμακας.

Σκοπός

Η προσβολή του γεννητικού συστήματος των γυναικών και των ανδρών από τον ιό των ανθρώπινων θηλωμάτων HPV αποτελεί τη συχνότερη σεξουαλικά μεταδιδόμενη περίπτωση ιογενούς αιτιολογίας παγκοσμίως. Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση της παρουσίας του ιού HPV στο αναπαραγωγικό σύστημα των υπογόνιμων ζευγαριών και της σχέσης του με την ανδρική υπογονιμότητα (παράμετροι σπέρματος, συγκέντρωση, κινητικότητα, μορφολογία και κατακερματισμός του DNA των σπερματοζωαρίων), καθώς και με τα έμβρυα, τα οποία προέκυψαν μέσω διαδικασιών εξωσωματικής γονιμοποίησης.

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1. Συλλογή Δειγμάτων

Στη μελέτη συμμετείχαν συνολικά 305 ζευγάρια, άνδρες και γυναίκες, οι οποίοι απευθύνθηκαν στη Μονάδα Ιατρικής Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής της Μαιευτικής και Γυναικολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ιωαννίνων για διερεύνηση υπογονιμότητας και υποβλήθηκαν σε τεχνικές υποβοηθούμενης αναπαραγωγής, *in vitro* γονιμοποίησης (IVF) ή ενδοκυτταροπλασματικής έγχυσης σπέρματος (ICSI).

Η αιτιολογία της υπογονιμότητας των ζευγαριών ήταν είτε ιδιοπαθής ανεξήγητη υπογονιμότητα είτε υπογονιμότητα ανδρικού παράγοντα.

Το σύνολο των ζευγαριών ήταν ασυμπτωματικά άτομα σε ό, τι αφορά τον ιό του ανθρώπινου θηλώματος στο γεννητικό σύστημα, ενώ οι γυναίκες δεν ήταν εμβολιασμένες με κάποιο από τα εμβόλια έναντι του ιού.

Τα κλινικά δείγματα ήταν κολποτραχηλικά δείγματα και δείγματα σπέρματος.

Τα συμμετέχοντα ζευγάρια παρείχαν τη σύμφωνη γνώμη τους, αφού εξετάστηκαν από την Επιτροπή Έρευνας και εγκρίθηκαν από το Επιστημονικό Συμβούλιο και το Διοικητικό Συμβούλιο του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ιωαννίνων, το πρωτόκολλο της μελέτης, το έντυπο ενημέρωσης και συγκατάθεσης και το έντυπο σχετικά με τη χρήση βιολογικού υλικού.

2.2. Σπερμοδιάγραμμα

Ο σκοπός της βασικής εξέτασης σπέρματος ήταν να αξιολογήσει τις περιγραφικές παραμέτρους της εκσπερμάτισης, που ελήφθη με αυνανισμό (WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen, Fifth Edition, World Health Organization). Οι παράμετροι που αξιολογήθηκαν ήταν η όψη, η οσμή, η ρευστοποίηση, η γλοιότητα, ο όγκος, η συγκέντρωση των σπερματοζωαρίων και ο συνολικός τους αριθμός, η κινητικότητα και η ζωτικότητα τους. Επιπλέον η εξέταση σπέρματος περιελάμβανε την αξιολόγηση της μορφολογίας των σπερματοζωαρίων, την αξιολόγηση της παρουσίας των συσσωρεύσεων/συγκολλήσεων καθώς και της παρουσίας υπολειμμάτων και άλλων τύπων κυττάρων.

Το δείγμα σπέρματος

Η εξέταση του σπέρματος, το οποίο λήφθηκε με αυνανισμό, άρχισε στο εργαστήριο 30 λεπτά μετά την εκσπερμάτιση. Πριν από τη λήψη του δείγματος, η ΠΟΥ συστήνει ένα μέγιστο διάστημα αποχής από επαφή μεταξύ 2 και 7 ημερών, με την παραίνεση αυτό να είναι κατά το δυνατόν σταθερό. Επομένως προτάθηκε το διάστημα 3-4 ημερών ως διάστημα αποχής.

Τα βήματα της βασικής εξέτασης σπέρματος

Σε χρόνο 0-5 λεπτά μετά την εκσπερμάτιση ο όγκος του σπέρματος υπολογίστηκε με πιπέτα ακριβείας, με ακρίβεια 0,1 μl και το δείγμα τοποθετήθηκε σε ανακινήτρη κυκλικής κίνησης στον επωαστικό κλίβανο (37 °C).

Σε 20-25 λεπτά εκτιμήθηκε η ρευστοποίηση, η όψη και η οσμή.

Σε 30 λεπτά εκτιμήθηκε η γλοιότητα του σπέρματος. Η σταγόνα του δείγματος εξετάστηκε για την κινητικότητα των σπερματοζωαρίων, καθώς και την παρουσία συσσωρεύσεων/συγκολλήσεων, την παρουσία άλλων κυττάρων και υπολειμμάτων, πραγματοποιήθηκαν αραιώσεις για τον προσδιορισμό του αριθμού των

σπερματοζωαρίων και παρασκευάστηκαν επιχρίσματα για χρώση για τον υπολογισμό της μορφολογίας των σπερματοζωαρίων.

Αργότερα, υπολογίσθηκε ο αριθμός των σπερματοζωαρίων στην πλάκα και τα στρογγυλά κύτταρα, εκτελέσθηκε χρώση του επιχρίσματος για την εκτίμηση της μορφολογίας και υπολογίσθηκε η μορφολογία (διαφορική μέτρηση).

Συνολικά, καταχωρήθηκαν ο χρόνος μεταξύ της εκσπερμάτισης και της ανάλυσης, η αποχή, η χροιά (φυσιολογική, παθολογική), το ιξώδες (φυσιολογικό, παθολογικό), η ρευστοποίηση (φυσιολογική, παθολογική), ο όγκος (ml) ($> 1,5$), το pH ($> 7,2$), η πυκνότητα των σπερματοζωαρίων ($> 15 \times 10^6/\text{ml}$, ολικός αριθμός σπερματοζωαρίων $> 39 \times 10^6/$ ανά εκσπερμάτιση), η κινητικότητα (%) ($> 40\%$ ($\alpha+\beta+\gamma$) ή $> 32\%$ ($\alpha+\beta$) μέσα σε 60' από την εκσπερμάτιση), το είδος της κινητικότητας (α) ευθύγραμμη+(β) στροβυλοειδής προς τα πρόσω, (γ) επιτόπου, (δ) ακίνητα, η μορφολογία (%) (φυσιολογική $> 4\%$) (ανώμαλο κεφαλής, ανώμαλο αυχένα, ανώμαλο ουράς, υπολειπόμενο πρωτόπλασμα), οι συγκολλήσεις (%), τα λευκά αιμοσφαίρια ($\times 10^6 \text{ ml}$) ($< 1 \times 10^6/\text{ml}$) και τα κύτταρα σπερματογένεσης ($\times 10^6 \text{ ml}$).

2.3. Διασπορά Χρωματίνης Σπέρματος

Στη διαδικασία της εκτίμησης του κατακερματισμού του DNA των σπερματοζωαρίων μέσω της δοκιμής διασποράς της χρωματίνης του σπέρματος χρησιμοποιήθηκε το κιτ halosperm G2 (Halotech DNA).

Αρχή της μεθόδου

Τα άθικτα μη σταθεροποιημένα σπέρματα (νωπά, αραιωμένα δείγματα) βυθίσθηκαν σε ένα αδρανές μικροπήκτωμα αγαρόζης σε μία προεπεξεργασμένη αντικειμενοφόρο πλάκα. Μία αρχική όξινη κατεργασία αποδιάταξε το DNA στα σπερματοζωάρια με κατακερματισμένο DNA. Ακολούθως, το διάλυμα λύσης απομάκρυνε τις περισσότερες από τις πυρηνικές πρωτεΐνες.

Περιγραφή των αντιδραστηρίων

Τα συστατικά ήταν:

Agarose Cel Support (ACS): 1

Super-Coated Slides (SCS): 10

Eppendorf Tubes (ETP): 10

Solution 1 (DA) Denaturant Agent, 10 ml

Solution 2 (LS) Lysis Solution, 10 ml

Solution 3 (SSA) eosine Staining Solution A, 10 ml

Solution 4 (SSB) thiazine Staining Solution B, 10 ml

Float

Το διάλυμα οξέος (DA) περιείχε Υδροχλωρικό οξύ και το διάλυμα λύσης (LS) περιείχε Διθειοθρεϊτόλη και Triton X-100.

Δείγμα σπέρματος

Τα δείγματα νωπού σπέρματος συλλέχθηκαν σε έναν αποστειρωμένο δέκτη. Η δοκιμή του κατακερματισμού του DNA των σπερματοζωαρίων εκτελέστηκε αμέσως μόλις το δείγμα σπέρματος λήφθηκε.

Οδηγίες

1. Το σωληνάριο Agarose Gel Support (ACS) τοποθετήθηκε στο Float και έλιωσε χρησιμοποιώντας ένα υδατόλουτρο (ή ένα δοχείο με νερό σε μία θερμή πλάκα) στους 95-100 °C για 5 λεπτά. Σε 10 Eppendorf Tubes (ET) κατανεμήθηκαν 100 μικρόλιτρα λιωμένης αγαρόζης. Αμέσως μετά, το Eppendorf Tube διατηρήθηκε στους 37 °C για 5 λεπτά ώστε να αποτραπεί η πηκτωματοποίηση.

Τα Solution 1 και 2 τοποθετήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου (22 °C) κατά τη διάρκεια ολόκληρης της διαδικασίας.

Οι Super-Coated Slides (SCS) προετοιμάστηκαν και επιλέχθηκαν αυτές που επρόκειτο να χρησιμοποιηθούν.

2. Το δείγμα σπέρματος αραιώθηκε σε κατάλληλο αραιωτικό ανθρώπινου σπέρματος ή σε PBS σε ένα μέγιστο όριο 20 εκατομμυρίων σπερματοζωαρίων ανά χιλιοστόλιτρο.

3. Αμέσως μετά, μεταφέρθηκαν 50 ml από το δείγμα σπέρματος στο Eppendorf Tube και αναμείχθηκαν ελαφρώς με μία μικροπιπέτα, αποτρέποντας το σχηματισμό φυσαλίδων.

4. Ακολούθως, τοποθετήθηκε μία σταγόνα 8 μl από το κυτταρικό εναιώρημα στο κέντρο του πηγαδιού δείγματος (S), καλύφθηκε με μία καλυπτρίδα και πιέστηκε ελαφρώς, αποφεύγοντας το σχηματισμό φυσαλίδων αέρα. Οι πλάκες διατηρήθηκαν σε οριζόντια θέση σε ολόκληρη τη διεργασία. Το πηγάδι (C) χρησιμοποιήθηκε για την επεξεργασία ενός δείγματος ελέγχου.

5. Η πλάκα τοποθετήθηκε σε μία ψυχρή επιφάνεια (για παράδειγμα, μία μεταλλική ή γυάλινη πλάκα προψυγμένη στους 4 °C) και μεταφέρθηκε στο ψυγείο στους 4 °C, για 5 λεπτά ώστε να στερεοποιηθεί η αγαρόζη.

6. Η πλάκα αφαιρέθηκε από το ψυγείο και η καλυπτρίδα απομακρύνθηκε σπρώχνοντας την απαλά. Ολόκληρη η διεργασία εκτελέστηκε σε θερμοκρασία δωματίου (22 οC).

7. Η πλάκα τοποθετήθηκε οριζόντια σε ανυψωμένη θέση σε ένα τρυβλίο Petri. Το Solution 1 (DA) εφαρμόστηκε στο πηγάδι βεβαιώνοντας ότι είναι πλήρως καλυμμένο από το αντιδραστήριο κατά τη διάρκεια ολόκληρης της διαδικασίας. Πραγματοποιήθηκε επώαση για 7 λεπτά. Έπειτα, το αντιδραστήριο αφαιρέθηκε μέσω κλίσης ώσπου να ολοκληρωθεί η στέγνωση και η πλάκα τοποθετήθηκε οριζόντια σε ανυψωμένη θέση. Το αντιδραστήριο αφαιρέθηκε χωρίς ανακίνηση. Η απομάκρυνση εκτελέστηκε μέσω κλίσης και αφήνοντάς το να ολισθήσει.

8. Το Solution 2 (LS) εφαρμόστηκε στο πηγάδι βεβαιώνοντας ότι είναι πλήρως βυθισμένο. Πραγματοποιήθηκε επώαση για 20 λεπτά. Έπειτα, το αντιδραστήριο αφαιρέθηκε μέσω κλίσης ώσπου να ολοκληρωθεί η στέγνωση και η πλάκα τοποθετήθηκε οριζόντια σε ανυψωμένη θέση. Το αντιδραστήριο αφαιρέθηκε χωρίς ανακίνηση. Η απομάκρυνση εκτελέστηκε μέσω κλίσης και αφήνοντάς το να ολισθήσει.

9. Η πλάκα πλύθηκε για 5 λεπτά, καλύπτοντας με άφθονο απεσταγμένο νερό και χρησιμοποιώντας πιπέτα μίας χρήσης. Έπειτα, το αντιδραστήριο αφαιρέθηκε μέσω κλίσης ώσπου να ολοκληρωθεί η στέγνωση και η πλάκα τοποθετήθηκε οριζόντια σε ανυψωμένη θέση. Η πλάκα αφυδατώθηκε μέσω πλημμύρισης με 70% αιθανόλη, χρησιμοποιώντας πιπέτα μίας χρήσης και επώασθηκε για 2 λεπτά. Στραγγίσθηκε και εφαρμόστηκε 100% αιθανόλη για 2 λεπτά. Στραγγίσθηκε και αφέθηκε να στεγνώσει οριζόντια σε διηθητικό χαρτί.

10. Η πλάκα τοποθετήθηκε οριζόντια σε ανυψωμένη θέση σε ένα τρυβλίο Petri. Το Solution 3 (SSA) εφαρμόστηκε στα πηγάδια βεβαιώνοντας ότι είναι πλήρως βυθισμένα. Πραγματοποιήθηκε επώαση για 7 λεπτά. Έπειτα, η χρώση αφαιρέθηκε μέσω κλίσης ώσπου να ολοκληρωθεί η στέγνωση και η πλάκα τοποθετήθηκε οριζόντια σε ανυψωμένη θέση.

11. Το Solution 4 (SSB) εφαρμόστηκε στα πηγάδια βεβαιώνοντας ότι είναι πλήρως βυθισμένα. Πραγματοποιήθηκε επώση για 7 λεπτά. Έπειτα, η χρώση αφαιρέθηκε μέσω κλίσης. Η περίσσεια της χρώσης απομακρύνθηκε και η πλάκα αφέθηκε να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου.

12. Ακολούθησε οπτικοποίηση σε μικροσκόπιο φωτεινού πεδίου. Εάν η χρώση ήταν πάρα πολύ δυνατή, η πλάκα πλενόταν με νερό βρύσης. Εάν η χρώση ήταν πάρα πολύ αδύναμη, η πλάκα βυθιζόταν σε 100% αιθανόλη, αφηνόταν να στεγνώσει και επαναλαμβανόταν το βήμα 10.

13. Ακολούθησε υπολογισμός του ποσοστού των σπερματοζωαρίων με κατακερματισμένο DNA. Τα αποτελέσματα αξιολογήθηκαν λαμβάνοντας υπόψη όλα τα σχετιζόμενα με το δείγμα σπέρματος κλινικά και εργαστηριακά ευρήματα. Τα κατώτατα όρια για τη συχνότητα του κατακερματισμού του DNA των σπερματοζωαρίων (SDF) έχουν προταθεί από τους Dr. Evenson et al. (Evenson and Nixon, *Reprod Biomed Online* 12:466-472, 2006).

Ταξινόμηση σπερματοζωαρίων

Μετρήθηκε ένα ελάχιστο 300 σπερματοζωαρίων ανά δείγμα ακολουθώντας τα κριτήρια:

Σπερματοζωάρια χωρίς κατακερματισμό του DNA:

Σπερματοζωάρια με μεγάλη άλω: εκείνα των οποίων το εύρος της άλω ήταν παρόμοιο ή υψηλότερο από τη διάμετρο του πυρήνα.

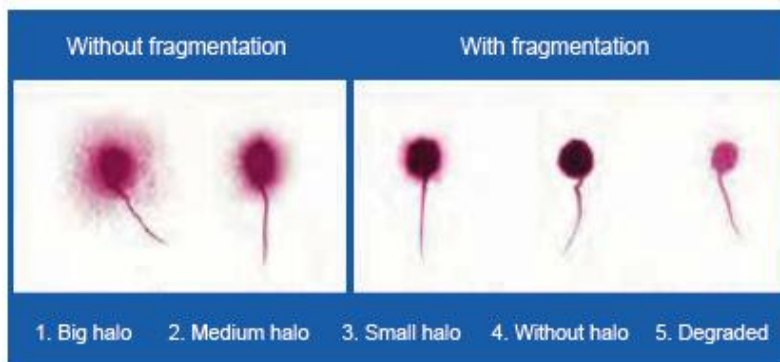
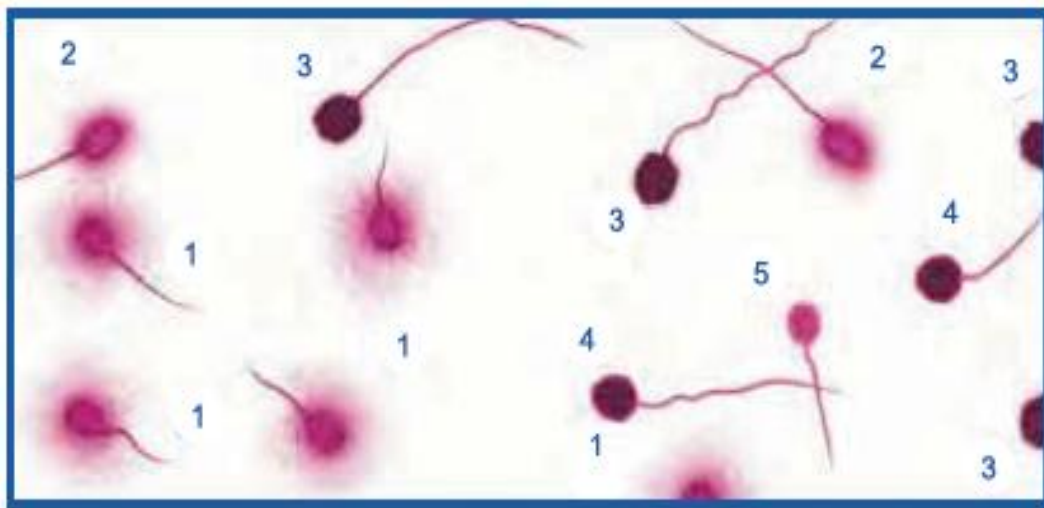
Σπερματοζωάρια με μεσαίου μεγέθους άλω: το μέγεθος της άλω τους ήταν μεταξύ εκείνων με μεγάλη και με πολύ μικρή άλω.

άλλα: κυτταρικά νουκλεοειδή που δεν αντιστοιχούσαν σε σπερματοζωάρια Ένα από τα μορφολογικά χαρακτηριστικά που τα διέκριναν ήταν η απουσία ουράς. Τα κύτταρα αυτά δε συμπεριλήφθηκαν στην εκτίμηση της συχνότητας των σπερματοζωαρίων με κατακερματισμένο DNA.

Σπερματοζωάρια με κατακερματισμένο DNA:

Σπερματοζώαρια με μικρή άλω: το εύρος της άλω ήταν παρόμοιο ή μικρότερο από το 1/3 της διαμέτρου του πυρήνα.

Σπερματοζώαρια χωρίς άλω και σπερματοζώαρια χωρίς άλω και αποδομημένα: εκείνα που δεν εμφάνισαν άλω και παρουσίασαν ένα πυρήνα ακανόνιστα ή ασθενώς χρωματισμένο.



Θετικοί και αρνητικοί μάρτυρες

Θετικός μάρτυρας: όλα τα σπερματοζώαρια εμφανίσθηκαν με άλω. Ακολουθήθηκαν οι οδηγίες χρήσης, παρακάμπτοντας το βήμα 7.

Αρνητικός μάρτυρας: όλα τα σπερματοζώαρια εμφανίσθηκαν χωρίς άλω. Ακολουθήθηκαν οι οδηγίες χρήσης, παρακάμπτοντας το βήμα 8.

2.4. Εξαγωγή Γενετικού Υλικού

Στη διαδικασία της εξαγωγής του γενετικού υλικού από τα κολποτραχηλικά δείγματα και τα δείγματα σπέρματος χρησιμοποιήθηκε το κιτ Quick-DNA MiniPrep Kit (Zymo Research).

Περιεχόμενα Προϊόντος

Genomic Lysis Buffer 50 ml

DNA Pre-Wash Buffer 15 ml

g-DNA Wash Buffer 50 ml

DNA Elution Buffer 10 ml

Zymo-Spin IIC Columns 50

Collection Tubes 100

Το DNA Pre-Wash Buffer επαναωρήθηκε πλήρως, επώασθηκε στους 30-37 οC για 30 λεπτά και αναμείχθηκε μέσω αναστροφής.

Περιγραφή Προϊόντος

Το Quick-DNA Miniprep Kit ήταν μία απλή διαδικασία για την ταχεία απομόνωση του ολικού DNA (π.χ. γενωμικού, ιϊκού) από τα βιολογικά δείγματα. Αυτό το προϊόν είχε βελτιστοποιηθεί για τη μέγιστη ανάκτηση εξαιρετικά καθαρού DNA χωρίς επιμόλυνση με RNA και ήταν συμβατό με τα υγρά βιολογικά δείγματα.

Δε χρειάστηκαν οργανικοί μετουσιωτές ή πέψη Πρωτεΐνάσης K λόγω του συστήματος του ρυθμιστικού διαλύματος λύσης. Παρήχθη υψηλής ποιότητας καθαρισμένο DNA σε λίγα λεπτά. Οι αναστολείς της PCR απομακρύνθηκαν αποτελεσματικά κατά τη διάρκεια της διαδικασίας καθαρισμού.

Προετοιμασία Ρυθμιστικού Διαλύματος

Στο Genomic Lysis Buffer προστέθηκε βήτα-μερκαπτοαιθανόλη σε τελική αραίωση 0,5% (v/v), δηλαδή 250 μ l ανά 50 ml.

Πρωτόκολλο

Το ακόλουθο πρωτόκολλο ήταν σχεδιασμένο για έως 200 μ l υγρού βιολογικού δείγματος, συμπεριλαμβανομένων των σωματικών υγρών (σπέρμα).

1. Σε κάθε όγκο υγρού δείγματος προστέθηκαν 4 όγκοι Genomic Lysis Buffer (4:1). Αναμείχθηκαν σύντομα μέσω στροβιλισμού και έπειτα αφέθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 5-10 λεπτά.
2. Το μείγμα μεταφέρθηκε σε μία Zymo-Spin IIC Column σε ένα Collection Tube. Φυγοκεντρήθηκε σε 10,000 x g για ένα λεπτό. Το Collection Tube απορρίφθηκε.
3. Η Zymo-Spin IIC Column μεταφέρθηκε σε ένα νέο Collection Tube. Στη στήλη προστέθηκαν 200 μ l DNA Pre-Wash Buffer. Φυγοκεντρήθηκε σε 10,000 x g για ένα λεπτό.
4. Στη στήλη προστέθηκαν 500 μ l g-DNA Wash Buffer. Φυγοκεντρήθηκε σε 10,000 x g για ένα λεπτό.
5. Η στήλη μεταφέρθηκε σε ένα καθαρό σωληνάριο μικροφυγοκέντρου. Στη στήλη προστέθηκαν \geq 50 μ l DNA Elution Buffer ή νερού. Επώασθηκε 2-5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και έπειτα φυγοκεντρήθηκε σε μέγιστη ταχύτητα για 30 δευτερόλεπτα ώστε να εκλουθεί το DNA.

Το εκλούμενο DNA χρησιμοποιήθηκε αμέσως ή αποθηκεύθηκε στους \leq -20 °C για μελλοντική χρήση.

2.5. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης

Στη διαδικασία της ανίχνευσης των ιών χαμηλού κινδύνου 6 και 11 και της ανίχνευσης και τυποποίησης των ιών υψηλού κινδύνου 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 και 68 του ανθρώπινου θηλώματος χρησιμοποιήθηκαν τα κιτ HPV 6/11 Real-TM (Sacace Biotechnologies) και HPV Genotypes 14 Real-TM Quant (Sacace Biotechnologies) αντίστοιχα.

HPV 6/11 Real-TM

Προβλεπόμενη Χρήση

Το κιτ HPV 6/11 Real-TM ήταν μία *in vitro* δοκιμή ενίσχυσης Πραγματικού Χρόνου για την ποιοτική ανίχνευση του Human Papillomavirus 6 και 11.

Αρχή της Δοκιμής

Το κιτ HPV 6/11 Real-TM βασίστηκε σε δύο κύριες διεργασίες: την απομόνωση του DNA από τα δείγματα και την ενίσχυση Πραγματικού Χρόνου. Το σωληνάριο PCR-mix-1 περιείχε εκκινητές κατευθυνόμενους έναντι περιοχών των τύπων HPV 6,11 και του γονιδίου της β-σφαιρίνης που χρησιμοποιήθηκε ως Εσωτερικός Μάρτυρας. Ο HPV 6 ανιχνεύθηκε στο κανάλι FAM (Πράσινο), ο HPV 11 στο κανάλι JOE (Κίτρινο)/Cy3/HEX και το Ανθρώπινο γονίδιο της β-σφαιρίνης στο κανάλι ROX (Πορτοκαλί)/Texas Red.

Υλικά

PCR-mix-1-FRT, 2 x 0,6 ml

PCR-Buffer-FRT, 2 x 0,3 ml

TaqF Polymerase, 2 x 0,03 ml

Pos Control Complex C+ (HPV 6, 11, ανθρώπινο DNA), 0,2 ml

Negative Control C-, 1,2 ml

DNA-buffer, 0,5 ml

Ο Negative Control C- χρησιμοποιήθηκε στη διαδικασία της απομόνωσης ως Αρνητικός Μάρτυρας της Εξαγωγής.

Πρωτόκολλο

1. Προετοιμάστηκε η απαιτούμενη ποσότητα των σωληναρίων της αντίδρασης για τα δείγματα (N) και τους μάρτυρες (N+2).

2. Παρασκευάστηκε το Mix για 60 δείγματα: στο σωληνάριο με το ρυθμιστικό διάλυμα PCR-buffer-FRT προστέθηκαν 30 μl πολυμεράσης TaqF DNA Polymerase. Το σωληνάριο ανακινήθηκε προσεκτικά.

3. Παρασκευάστηκε το Reaction Mix προσθέτοντας στο νέο αποστειρωμένο σωληνάριο 10 μl μείγματος PCR-mix-1-FRT και 5 μl μείγματος PCR-buffer-FRT/TaqF DNA Polymerase για κάθε δείγμα.

4. Σε κάθε σωληνάριο της αντίδρασης προστέθηκαν 15 μl Reaction Mix και 10 μl εκχυλισμένου DNA. Αναμείχθηκαν πιπετάροντας.

5. Προετοιμάστηκαν 2 μάρτυρες για κάθε πάνελ:

στο επισημασμένο σωληνάριο Amplification Negative Control προστέθηκαν 10 μl ρυθμιστικού διαλύματος DNA-buffer.

στο επισημασμένο σωληνάριο Amplification Positive Control προστέθηκαν 10 μl θετικού μάρτυρα Positive Control Complex C+.

6. Τα σωληνάρια εισήχθησαν στο θερμοκυκλοποιητή 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems).

Τα αποτελέσματα ερμηνεύθηκαν μέσω της παρουσίας της διασταύρωσης της καμπύλης φθορισμού με τη γραμμή του κατωφλίου.

Ενίσχυση

Δημιουργήθηκε ένα προφίλ θερμοκρασίας στο όργανο ως ακολούθως:

Βήμα	Θερμοκρασία, °C	Χρόνος	Επαναλήψεις
1	95	15 λεπτά	1
2	95	5 δευτερόλεπτα	5
	60	20 δευτερόλεπτα	
	72	15 δευτερόλεπτα	
3	95	5 δευτερόλεπτα	40
	60	30 δευτερόλεπτα ανίχνευση σήματος φθορισμού	
	72	15 δευτερόλεπτα	

Ρυθμίσεις Οργάνου

Η γραμμή του κατωφλίου έπρεπε να διαπερνά μόνο τις σιγμοειδείς καμπύλες της συσσώρευσης του σήματος των θετικών δειγμάτων και δεν έπρεπε να διαπερνά τη βασική γραμμή, διαφορετικά το επίπεδο του κατωφλίου έπρεπε να αυξηθεί. Το κατώφλι τέθηκε σε ένα επίπεδο όπου οι καμπύλες φθορισμού ήταν γραμμικές και δε διαπερνούσαν τις καμπύλες των αρνητικών δειγμάτων.

Οριακή τιμή του κατωφλίου κύκλου, Ct

Δείγμα	Κανάλι για φθοροφόρο	Ct οριακή τιμή
C+	FAM/Πράσινο	29
	JOE/Κίτρινο/Hex/Cy3	31

	Rox/Πορτοκαλί	28
Δείγματα	Rox/Πορτοκαλί	< 30

Ανάλυση Δεδομένων

Τα αποτελέσματα ερμηνεύθηκαν με το λογισμικό του οργάνου Real Time PCR μέσω της παρουσίας της διασταύρωσης της καμπύλης φθορισμού με τη γραμμή του κατωφλίου. Ο HPV 6 ανιχνεύθηκε στο FAM/Πράσινο κανάλι, ο HPV 11 στο JOE/Κίτρινο/HEX και το IC DNA στο Rox/Πορτοκαλί κανάλι.

Το αποτέλεσμα της εκτέλεσης θεωρήθηκε έγκυρο, εάν:

Το σήμα ήταν απόν σε όλα τα κανάλια (FAM/Πράσινο, JOE/Κίτρινο, ROX/Πορτοκαλί) για τους αρνητικούς μάρτυρες

Τα σήματα ήταν παρόντα σε όλα τα κανάλια (FAM/Πράσινο, JOE/Κίτρινο, ROX/Πορτοκαλί) για το θετικό μάρτυρα.

Το αποτέλεσμα της ανίχνευσης του DNA του HPV θεωρήθηκε:

αρνητικό, αν το σήμα του φθορισμού καταγράφηκε μόνο στο ROX/Πορτοκαλί κανάλι και η τιμή του κύκλου του κατωφλίου δεν υπερέβαινε το 30.

θετικό, αν

το σήμα καταγράφηκε στο FAM/Πράσινο κανάλι (θετικό για τον τύπο HPV 6).

το σήμα καταγράφηκε στο JOE/HEX/Κίτρινο κανάλι (θετικό για τον τύπο HPV 11).

μη έγκυρο, αν

τα θετικά σήματα δεν καταγράφηκαν στα FAM/Πράσινα και JOE/HEX/Κίτρινα κανάλια (τύποι HPV 6 και 11) και το σήμα IC (ROX/Πορτοκαλί) δεν καταγράφηκε ή η τιμή του κύκλου του κατωφλίου υπερέβαινε το 30.

το αμφίβολο σήμα καταγράφηκε στα FAM/Πράσινα και JOE/HEX/Κίτρινα κανάλια (τύποι HPV 6 και 11) και το σήμα IC (ROX/Πορτοκαλί) δεν καταγράφηκε ή η τιμή του κύκλου του κατωφλίου υπερέβαινε το 30.

Χαρακτηριστικά Απόδοσης

Αναλυτική ειδικότητα

Η αναλυτική ειδικότητα των εκκινητών και των ανιχνευτών επικυρώθηκε με αρνητικά δείγματα. Δεν παρήγαγαν κανένα σήμα με τους συγκεκριμένους εκκινητές και ανιχνευτές HPV 6,11. Η ειδικότητα του κιτ HPV 6/11 Real-TM ήταν 100%. Η πιθανή διασταυρούμενη αντιδραστικότητα του κιτ HPV 6/11 Real-TM εξετάστηκε έναντι της ομάδας ελέγχου. Δεν παρατηρήθηκε καμία διασταυρούμενη αντιδραστικότητα με άλλα παθογόνα.

Αναλυτική ευαισθησία

Το κιτ HPV 6/11 Real-TM επέτρεψε την ανίχνευση του DNA των HPV 6 & 11 στο 100% των δοκιμών με μία ευαισθησία τουλάχιστον 500 αντιγράφων/ml. Η ανίχνευση εκτελέστηκε στο πρότυπο ελέγχου και στις αραιώσεις του με αρνητικό δείγμα.

Περιοχή στόχος: γονίδιο L1

HPV Genotypes 14 Real-TM Quant

Προβλεπόμενη Χρήση

Το κιτ HPV Genotypes 14 Real-TM Quant ήταν μία in vitro δοκιμή ενίσχυσης Πραγματικού Χρόνου για την ποσοτική ή την ποιοτική ανίχνευση και τυποποίηση του Human Papillomavirus (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68).

Αρχή της Δοκιμής

Το κιτ HPV Genotypes 14 Real-TM Quant βασίστηκε σε δύο κύριες διεργασίες: την απομόνωση του DNA από τα δείγματα και την πολλαπλή ενίσχυση Πραγματικού Χρόνου 4 σωληναρίων PCR για κάθε δείγμα. Το HPV Genotypes 14 Real-TM Quant ανίχνευσε τους πλέον διαδεδομένους και ογκογόνους 14 γενοτύπους του ιού του

ανθρώπινου θηλώματος με προσδιορισμό της κλινικής σημασίας. Καθώς ο ιός του ανθρώπινου θηλώματος είναι ένας ενδοκυτταρικός παράγοντας, ήταν αναγκαίο να παρακολουθείται η παρουσία κυτταρικού υλικού στο δείγμα, προκειμένου να αποφευχθούν τα ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα. Το kit HPV Genotypes 14 Real-TM Quant περιείχε τον εσωτερικό μάρτυρα (ανθρώπινο γονίδιο της β-σφαιρίνης), ο οποίος επέτρεψε τον έλεγχο της παρουσίας κυτταρικού υλικού στο δείγμα.

Υλικά

PCR-mix-1 16-18-31-IC, 4 x 0,3 ml

PCR-mix-1 39-45-59-IC, 4 x 0,3 ml

PCR-mix-1 33-35-56-68, 4 x 0,3 ml

PCR-mix-1 51-52-58-66, 4 x 0,3 ml

PCR-buffer-FRT, 4 x 0,6 ml

Hot Start DNA Polymerase, 4 x 0,06 ml

Negative Control, 1,2 ml

Ο Negative Control χρησιμοποιήθηκε στη διαδικασία της απομόνωσης ως Αρνητικός Μάρτυρας της Εξαγωγής.

Πρότυπα:

K1 16-18-31-IC, 0,2 ml (mix HPV DNA C+ 16, 18, 31 και ανθρώπινου DNA)-
1.000.000 GE/ml

K2 16-18-31-IC, 0,2 ml (mix HPV DNA C+ 16, 18, 31 και ανθρώπινου DNA)-1.000
GE/ml

K1 39-45-59-IC, 0,2 ml (mix HPV DNA C+ 39, 45, 59 και ανθρώπινου DNA)-
1.000.000 GE/ml

K2 39-45-59-IC, 0,2 ml (mix HPV DNA C+ 39, 45, 59 και ανθρώπινου DNA)-1.000 GE/ml

K1 33-35-56-68, 0,2 ml (mix HPV DNA C+ 33, 35, 56, 68)-1.000.000 GE/ml

K2 33-35-56-68, 0,2 ml (mix HPV DNA C+ 33, 35, 56, 68)-1.000 GE/ml

K1 51-52-58-66, 0,2 ml (mix HPV DNA C+ 51, 52, 58, 66)-1.000.000 GE/ml

K2 51-52-58-66, 0,2 ml (mix HPV DNA C+ 51, 52, 58, 66)-1.000 GE/ml

Πρωτόκολλο

1. Προετοιμάστηκε η απαιτούμενη ποσότητα των σωληναρίων της PCR σύμφωνα με τον τύπο της δοκιμής:

Ποσοτική ανάλυση: 4 σωληνάρια για κάθε κλινικό δείγμα, 4 σωληνάρια για τα πρότυπα K1 και 4 σωληνάρια για τα πρότυπα K2, 4 σωληνάρια για τον Αρνητικό Μάρτυρα

Ποιοτική ανάλυση: 4 σωληνάρια για οποιοδήποτε κλινικό δείγμα, 4 σωληνάρια για το πρότυπο K2 και 4 σωληνάρια για τον Αρνητικό Μάρτυρα

2. Παρασκευάστηκε το Mix για 132 αντιδράσεις: στο σωληνάριο με το ρυθμιστικό διάλυμα PCR-buffer-FRT προστέθηκαν 60 μl πολυμεράσης Hot Start DNA Polymerase. Το σωληνάριο ανακινήθηκε προσεκτικά.

3. Προετοιμάστηκε για κάθε μείγμα PCR-mix-1 ένα νέο σωληνάριο και προστέθηκαν για κάθε δείγμα 10*N+3 (+2 για την ποιοτική ανάλυση) μl μείγματος PCR-mix-1 και 5*N+3 (+2 για την ποιοτική ανάλυση) Mix (ρυθμιστικό διάλυμα PCR-buffer-FRT με πολυμεράση Hot Start DNA Polymerase).

4. Προστέθηκαν 15 μl Reaction Mix σε κάθε σωληνάριο. Τα Αντιδραστήρια και τα Δείγματα μοιράστηκαν (κάθε δείγμα έπρεπε να ελεγχθεί σε 4 σωληνάρια): στην πρώτη γραμμή σωληναρίων προστέθηκαν 15 μl μείγματος 16,18,31, IC, στη δεύτερη γραμμή 15 μl μείγματος 39,45,59, IC, στην τρίτη 15 μl μείγματος 33,35,56,68, στην τέταρτη 15 μl μείγματος 51,52,58,66.

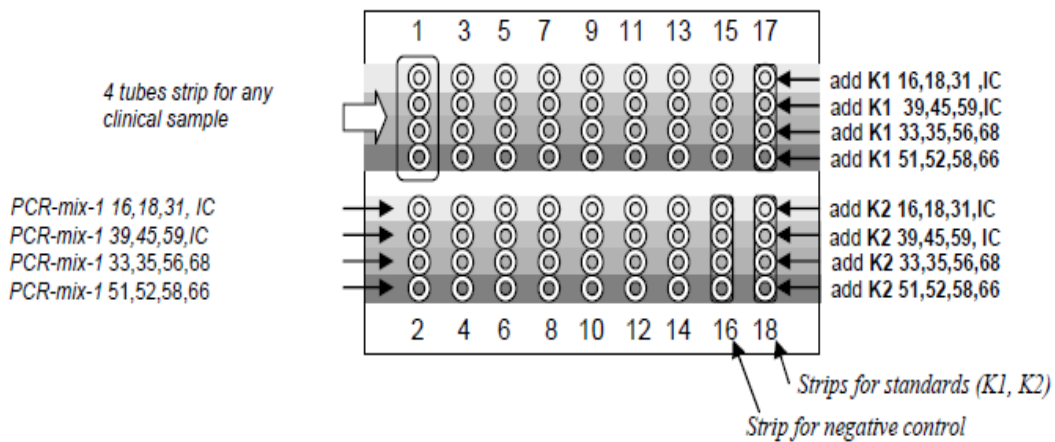
5. Προστέθηκαν 10 μl εκχυλισμένου δείγματος DNA σε κατάλληλο σωληνάριο.

6. Προετοιμάστηκαν για κάθε πάνελ οι μάρτυρες και τα πρότυπα:

προστέθηκαν 10 μl εκχυλισμένου DNA από τον Αρνητικό Μάρτυρα στα σωληνάρια της ταινίας N 16.

προστέθηκαν 10 μl από κάθε K1 στα σωληνάρια της ταινίας N 17 (απαιτείται μόνο για ποσοτική ανάλυση)

προστέθηκαν 10 μl από κάθε K2 στα σωληνάρια της ταινίας N 18



Ενίσχυση

Δημιουργήθηκε ένα προφίλ θερμοκρασίας στο όργανο ως ακολούθως:

Βήμα	Θερμοκρασία, °C	Χρόνος	Επαναλήψεις
1	95	15 λεπτά	1
2	95	5 δευτερόλεπτα	5
	60	20 δευτερόλεπτα	
	72	15 δευτερόλεπτα	
3	95	5 δευτερόλεπτα	40
	60	30 δευτερόλεπτα ανίχνευση σήματος φθορισμού	
	72	15 δευτερόλεπτα	

Ρυθμίσεις Οργάνου

Η γραμμή του κατωφλίου έπρεπε να διαπερνά μόνο τις σιγμοειδείς καμπύλες της συσσώρευσης του σήματος των θετικών δειγμάτων και δεν έπρεπε να διαπερνά τη βασική γραμμή, διαφορετικά το επίπεδο του κατωφλίου έπρεπε να αυξηθεί. Το κατώφλι τέθηκε σε ένα επίπεδο όπου οι καμπύλες φθορισμού ήταν γραμμικές και δε διαπερνούσαν τις καμπύλες των αρνητικών δειγμάτων.

Ανάλυση Δεδομένων & Ερμηνεία Αποτελεσμάτων

Το σήμα σε ένα σωληνάριο στο κανάλι θεωρήθηκε θετικό, εάν οι αντίστοιχες καμπύλες συσσώρευσης φθορισμού διέσχισαν τη γραμμή του κατωφλίου. Το σήμα χαρακτηρίστηκε από τον κύκλο (κατώφλι Ct) που αντιστοιχούσε στο σημείο τομής της καμπύλης φθορισμού με τη γραμμή του κατωφλίου. Το λογισμικό της ανάλυσης καθόρισε την τιμή Ct. Για την ποσοτική ανάλυση, η καμπύλη βαθμονόμησης σχεδιάστηκε αυτόματα με βάση αυτές τις τιμές και υπολογίστηκαν οι συγκεντρώσεις του ανθρώπινου DNA και του DNA του HPV. Για να αποκτηθεί το τελικό αποτέλεσμα, η συγκέντρωση του DNA του HPV κανονικοποιήθηκε στον αριθμό των ισοδυνάμων του ανθρώπινου γονιδιώματος σύμφωνα με τον τύπο

$$\log\left(\frac{HPV\ DNA\ copies/ reaction}{genomic\ DNA\ copies/ reaction} \times 200000\right) = \log(HPV\ DNA\ in\ 100000\ cells)$$

Η αντίδραση ήταν έγκυρη εάν

Ο αρνητικός μάρτυρας δεν είχε κανένα σήμα σε όλα τα κανάλια (FAM/Πράσινο, JOE/Κίτρινο/HEX, ROX/Πορτοκαλί, Cy5/Κόκκινο).

Όλοι οι βαθμονομητές είχαν σήματα σε όλα τα κανάλια (FAM/Πράσινο, JOE/Κίτρινο/HEX, ROX/Πορτοκαλί, Cy5/Κόκκινο).

Ο συντελεστής συσχέτισης για τις καμπύλες βαθμονόμησης για όλα τα κανάλια δεν ήταν μικρότερος από 0,98.

Το αποτέλεσμα της ανίχνευσης του DNA του HPV ενός δεδομένου δείγματος θεωρήθηκε:

Αρνητικό, εάν το σήμα του Εσωτερικού Μάρτυρα (IC, FAM/Πράσινο κανάλι) ανιχνεύθηκε στα 2 πρώτα σωληνάρια για το δείγμα και η ποσότητα των γονιδιωματικών ισοδυνάμων του ανθρώπινου DNA ανά αντίδραση υπερέβαινε τα 103.

Θετικό, αν το σήμα στο FAM/Πράσινο, JOE/Κίτρινο/HEX, ROX/Πορτοκαλί, Cy5/Κόκκινο κανάλι ανιχνεύθηκε τουλάχιστον σε ένα από τα 4 σωληνάρια (εκτός από το Cy5/Κόκκινο κανάλι στα μείγματα 16,18,31, IC και 39,45,59, IC που ήταν αποκλειστικά για την ανίχνευση των ανθρώπινων γονιδίων της β-σφαιρίνης).

Τυποποίηση του HPV:

Στο κανάλι FAM/Πράσινο ανιχνεύθηκαν οι γενότυποι HPV 16,39,33,58,

Στο κανάλι JOE/Κίτρινο/HEX ανιχνεύθηκαν οι γενότυποι 31,45,35,52,

Στο κανάλι ROX/Πορτοκαλί ανιχνεύθηκαν οι γενότυποι 18,59,68,66,

Στο κανάλι Cy5/Κόκκινο οι γενότυποι 56 και 51 (στα σωληνάρια με το PCR-mix-1 33-35-56-68 και το PCR-mix-1 51-52-58-66).

FAM	JOE	ROX	Cy5
16	31	18	IC
39	45	59	IC
33	35	68	56
58	52	66	51

Χαρακτηριστικά Απόδοσης

Αναλυτική ειδικότητα

Η αναλυτική ειδικότητα των εκκινητών και των ανιχνευτών επικυρώθηκε με αρνητικά δείγματα. Δεν παρήγαγαν κανένα σήμα με τους συγκεκριμένους εκκινητές

και ανιχνευτές Human Papillomavirus. Η ειδικότητα του κιτ HPV Genotypes 14 Real-TM Quant ήταν 100%. Η πιθανή διασταυρούμενη αντιδραστικότητα του κιτ HPV Genotypes 14 Real-TM Quant εξετάστηκε έναντι της ομάδας ελέγχου. Δεν παρατηρήθηκε καμία διασταυρούμενη αντιδραστικότητα με άλλα παθογόνα.

Αναλυτική ευαισθησία

Το κιτ HPV Genotypes 14 Real-TM Quant επέτρεψε την ανίχνευση του DNA του Human Papillomavirus στο 100% των δοκιμών με μία ευαισθησία τουλάχιστον 1000 αντιγράφων/ml. Η ανίχνευση εκτελέστηκε στο πρότυπο ελέγχου και στις αραιώσεις του με αρνητικό δείγμα.

Περιοχή στόχος: E6, E7

2.6. Επεξεργασία Σπέρματος

Sperm Preparation Medium (με ερυθρό της φαινόλης) (origio)

Το Sperm Preparation Medium χρησιμοποιήθηκε για την πλύση των σπερματοζωαρίων και για την απομόνωση των κινητών βιώσιμων σπερματοζωαρίων με τη μέθοδο της διείσδυσης σε φυσιολογικά διαλύματα swim-up.

Περιείχε διάλυμα ανθρώπινης λευκοματίνης (HAS), ανασυνδυασμένη ανθρώπινη ινσουλίνη και θειϊκή γενταμικίνη 10 µg/ml.

1. Αμέσως μετά τη συλλογή, το δείγμα σπέρματος αναμείχθηκε πλήρως (επαναλαμβανόμενο γύρισμα για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου).
2. Αφού ολοκληρώθηκε η διεργασία της ανάμειξης, η συγκέντρωση και η κινητικότητα του σπέρματος εκτιμήθηκαν στο μικροσκόπιο ώστε να επιβεβαιωθεί η μέθοδος πλύσης.
3. Στρώθηκε προσεκτικά 0,5-1 ml ρευστοποιημένου σπέρματος σε ένα σωληνάριο με 1-2 ml προεξισορροπημένου Sperm Preparation Medium.
4. Τα σωληνάρια τοποθετήθηκαν σε γωνία ώστε να αυξηθεί η επιφάνεια επαφής μεταξύ του δείγματος σπέρματος και του Sperm Preparation Medium, προκειμένου να αυξηθεί η ανάκτηση των πιο κινητών σπερματοζωαρίων, καθώς μετακινούνταν στο θρεπτικό μέσο. Το στατώ τοποθετήθηκε σε περιβάλλον 5-6% CO₂ στους 37 °C για 30-60 λεπτά ανάλογα με την ποιότητα του σπέρματος.
5. Μετά τη διείσδυση σε φυσιολογικά διαλύματα swim-up, αναρροφήθηκαν 0,2-1 ml του ανώτερου στρώματος και αξιολογήθηκαν αναφορικά με τη συγκέντρωση και την κινητικότητα των σπερματοζωαρίων. Όταν ο αριθμός των σπερματοζωαρίων ήταν υπερβολικά χαμηλός, συμπεριλαμβανόταν και 0,5 ml του επόμενου στρώματος. Τα προϊόντα της αναρρόφησης αναμείχθηκαν.

6. Όταν απαιτούνταν περαιτέρω συμπύκνωση του αναρροφηθέντος θρεπτικού μέσου του σπέρματος, προσθέτονταν 5 ml Sperm Preparation Medium, αναμειγνύονταν και φυγοκεντρούνταν σε 400 g για 10 λεπτά.

7. Το υπερκείμενο αναρροφήθηκε και το εναπομείναν ίζημα επαναιωρήθηκε σε κατάλληλο όγκο προεξισορροπημένου Sperm Preparation Medium.

Sperm Wash (origio)

Το Sperm Wash χρησιμοποιήθηκε για την πλύση του σπέρματος, για την απομόνωση κινητού, βιώσιμου σπέρματος με τη μέθοδο της διείσδυσης σε φυσιολογικά διαλύματα swim-up και για την αραίωση των διαβαθμίσεων.

Περιείχε διάλυμα ανθρώπινης λευκωματίνης (HAS) και θειϊκή γενταμικίνη 10 µg/ml.

Προετοιμασία της διείσδυσης σε φυσιολογικά διαλύματα swim up:

1. Όλα τα συστατικά τοποθετήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου (20-25 °C) πριν τη χρήση.
2. Στρώθηκε προσεκτικά 0,5-1 ml ρευστοποιημένου σπέρματος σε ένα σωληνάριο με 1-2 ml Sperm Wash.
3. Το σωληνάριο τοποθετήθηκε σε γωνία 30-45° ώστε να αυξηθεί η επιφάνεια επαφής μεταξύ του δείγματος σπέρματος και του Sperm Wash, προκειμένου να αυξηθεί η ανάκτηση των πιο κινητών σπερματοζωαρίων, καθώς μετακινούνταν στο θρεπτικό μέσο. Το στατώ τοποθετήθηκε στον επωαστήρα στους 37 °C για 30-60 λεπτά ανάλογα με την ποιότητα του σπέρματος.
4. Μετά τη διείσδυση σε φυσιολογικά διαλύματα swim-up, αναρροφήθηκαν 0,2-1 ml του ανώτερου στρώματος και αξιολογήθηκαν αναφορικά με τη συγκέντρωση και την κινητικότητα των σπερματοζωαρίων. Όταν ο αριθμός των σπερματοζωαρίων ήταν υπερβολικά χαμηλός, συμπεριλαμβανόταν και 0,5 ml του επόμενου στρώματος. Τα προϊόντα της αναρρόφησης αναμείχθηκαν.

5. Όταν απαιτούνταν περαιτέρω συμπύκνωση του αναρροφηθέντος θρεπτικού μέσου του σπέρματος, προσθέτονταν 5 ml Sperm Wash, αναμειγνύονταν και φυγοκεντρώνταν σε 300-500 g για 5 λεπτά.

6. Το υπερκείμενο αναρροφήθηκε και το εναπομείναν ίζημα επαναιωρήθηκε σε κατάλληλο όγκο ενδεδειγμένου θρεπτικού μέσου. Τα πωματισμένα σωληνάρια διατηρήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου (20-25 °C) μέχρι τη χρήση.

Για τις διαδικασίες IVF, χρησιμοποιήθηκε ένα εξειδικευμένο εξισορροπημένο θρεπτικό μέσο γονιμοποίησης όταν επαναιωρήθηκε το ίζημα (βήμα 6).

Για τις διαδικασίες ICSI όπου δε χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό μέσο ακινητοποίησης για την επιλογή του σπέρματος, χρησιμοποιήθηκε ένα εναλλακτικό θρεπτικό μέσο διατήρησης όταν επαναιωρήθηκε το ίζημα (βήμα 6).

Gradient 40/80 (origio)

Το Gradient 40/80 χρησιμοποιήθηκε για τον αποτελεσματικό διαχωρισμό του κινητού σπέρματος από το εκσπερμάτισμα με τη μέθοδο της διαβάθμισης πυκνότητας.

Περιείχε διάλυμα ανθρώπινης λευκοματίνης (HAS) και θειϊκή γενταμικίνη 10 µg/ml.

1. Όλα τα συστατικά τοποθετήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου (20-25 °C) πριν τη χρήση.

2. Για κάθε 1-2 ml δείγματος σπέρματος που χρησιμοποιήθηκε, παρασκευάστηκε μία χωριστή διαβάθμιση χρησιμοποιώντας 1-2 ml Gradient 40 επιστρωμένα προσεκτικά σε 1-2 ml Gradient 80.

3. Διανεμήθηκαν προσεκτικά έως 2 ml ρευστοποιημένου δείγματος σπέρματος πάνω στην παρασκευασμένη διαβάθμιση.

4. Η διαβάθμιση φυγοκεντρήθηκε σε 300-400 g για 15-20 λεπτά.

5. Το υπερκείμενο αφαιρέθηκε από το ίζημα και το ίζημα μεταφέρθηκε με νέο αποστειρωμένο ρύγχος σε καθαρό κωνικό δοκιμαστικό σωληνάριο φυγοκέντρωσης που περιείχε 3-5 ml Sperm Wash.

6. Φυγοκεντρήθηκε σε 200-300 g για 5-10 λεπτά. Το περισσότερο υπερκείμενο αναρροφήθηκε και αφαιρέθηκε. Η διαδικασία πύσης επαναλήφθηκε.

7. Τελικά το ίζημα επαναιωρήθηκε σε κατάλληλο θρεπτικό μέσο και προσδιορίστηκαν η κινητικότητα και η συγκέντρωση του σπέρματος.

8. Όταν απαιτούνταν, το επαναιωρημένο ίζημα του σπέρματος αραιωνόταν περαιτέρω ώστε να ληφθεί η απαιτούμενη συγκέντρωση του σπέρματος.

Για τις διαδικασίες IVF, χρησιμοποιήθηκε ένα εξειδικευμένο εξισορροπημένο θρεπτικό μέσο γονιμοποίησης όταν επαναιωρήθηκε το ίζημα (στάδιο 7/8).

Για τις διαδικασίες ICSI όπου δε χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό μέσο ακινητοποίησης για την επιλογή σπέρματος, χρησιμοποιήθηκε ένα εναλλακτικό θρεπτικό μέσο διατήρησης όταν επαναιωρήθηκε το ίζημα (στάδιο 7/8).

2.7. In Vitro Γονιμοποίηση και Ενδοκυτταροπλασματική Έγχυση Σπέρματος

Flushing Medium (με 10 IU/ml ηπαρίνη) (origio)

Το Flushing Medium χρησιμοποιήθηκε για τη συλλογή, για τη διατήρηση και για την πλύση των ωοκυττάρων.

Περιείχε ηπαρίνη 10 IU/ml, διάλυμα ανθρώπινης λευκωματίνης (HAS), ανασυνδυασμένη ανθρώπινη ινσουλίνη και θειϊκή γενταμικίνη 10 µg/ml.

1. Το Flushing Medium προθερμάνθηκε στους 37 °C.
2. Το Flushing Medium διατηρήθηκε στους 37 °C στο θερμομπλόκ σε όλη τη διεργασία της ανάκτησης και της μεταφοράς των ωοκυττάρων στο εμβρυολογικό εργαστήριο.
3. Οι σύριγγες που χρησιμοποιήθηκαν για την έκπλυση των ωοθυλακίων ήταν γεμάτες με Flushing Medium. Το ωοθυλακικό υγρό αναρροφήθηκε και το ωοθυλάκιο εκπλύθηκε με όγκο θρεπτικού μέσου ισοδύναμο της ποσότητας του ωοθυλακικού υγρού που συλλέχθηκε.
4. Τα ωοκύτταρα πλύθηκαν με Flushing Medium ή με προεξισορροπημένο μέσο καλλιέργειας, φροντίζοντας να απομακρυνθούν τυχόν πύγματα αίματος και κοκκιώδη κύτταρα.
5. Τα ωοκύτταρα μεταφέρθηκαν σε προεξισορροπημένο καλλιεργητικό μέσο και διατηρήθηκαν στους 37 °C σε περιβάλλον 5-6% CO₂.

ICSI Cumulase (origio)

Το ICSI Cumulase χρησιμοποιήθηκε για την απομάκρυνση του κοκκιώδους συμπλέγματος και του ακτινωτού στέφανου που περιέβαλαν το ωοκύτταρο κατά την προετοιμασία της ICSI.

Περιείχε διάλυμα ανθρώπινης λευκωματίνης (HAS) και ανασυνδυασμένη ανθρώπινη υαλουρονιδάση (rHuPH20) 80 U/ml.

Μετά την ωληψία, τα ωοκύτταρα παρέμεναν σε εξισορροπημένο καλλιεργητικό μέσο για τουλάχιστον 2 ώρες πριν την απογύμνωση.

1. Το ICSI Cumulase θερμάνθηκε στους 37 °C για 2 ώρες.
2. Ένα από τα πηγάδια του τρυβλίου 4 πηγαδιών γεμίστηκε με το περιεχόμενο ενός φιαλιδίου ICSI Cumulase και τα άλλα τρία πηγάδια με εξισορροπημένο καλλιεργητικό μέσο.
3. Ένα ή περισσότερα συμπλέγματα ωαρίων-κοκκιωδών κυττάρων τοποθετήθηκαν στο πηγάδι με το ICSI Cumulase. Μετά από 60 δευτερόλεπτα, τα ωοκύτταρα αναρροφήθηκαν απαλά πάνω-κάτω ώσπου να απογυμνωθούν.
4. Τα ωοκύτταρα μεταφέρθηκαν σε ένα πηγάδι με καλλιεργητικό μέσο.
5. Τα ωοκύτταρα πλύθηκαν διεξοδικά μεταφέροντας τα μεταξύ αρκετών πηγαδιών του καλλιεργητικού μέσου.
6. Τα ωοκύτταρα μεταφέρθηκαν έπειτα στο τρυβλίο έγχυσης και τοποθετήθηκαν σε χωριστές σταγόνες καλυμμένες με εξισορροπημένη Liquid Paraffin.

PVP Medium (origio)

Το PVP Medium χρησιμοποιήθηκε για την επιβράδυνση της κίνησης των σπερματοζωαρίων κατά τη μικρογονιμοποίηση ICSI.

Περιείχε διάλυμα ανθρώπινης λευκωματίνης (HAS), ανασυνδυασμένη ανθρώπινη ινσουλίνη και θειϊκή γενταμικίνη 10 µg/ml.

1. Το PVP Medium και το θρεπτικό μέσο διατήρησης αφέθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά.
2. Ανάλογα με τον αριθμό των ωοκυττάρων για έγχυση, τοποθετήθηκε με πιπέτα ο αντίστοιχος αριθμός σταγόνων 10 µl θρεπτικού μέσου διατήρησης στον πυθμένα του τρυβλίου ICSI.

3. Στη μέση του ίδιου τρυβλίου, τοποθετήθηκε μία σταγόνα 5-10 μl PVP Medium.
4. Καλύφθηκε με προεξισορροπημένη Liquid Paraffin και το τρυβλίο τοποθετήθηκε σε περιβάλλον 5-6% CO₂ στους 37 °C για 30 λεπτά πριν τη χρήση.
5. Στη σταγόνα του PVP Medium εισήχθησαν 2 μl προετοιμασμένου και πλυμένου σπέρματος. Το PVP περιόρισε την κινητικότητα του σπέρματος και διευκόλυνε τη σύλληψη και τη φόρτωση ενός μόνο σπερματοζωαρίου στην πιπέτα έγχυσης.

SAGE 1-Step με διάλυμα ανθρώπινης λευκωματίνης (origio)

Χρησιμοποιήθηκε για την *in vitro* καλλιέργεια των ανθρώπινων εμβρύων μετά τη γονιμοποίηση έως την ημέρα 5/ημέρα 6 της ανάπτυξης.

Περιείχε διάλυμα ανθρώπινης λευκωματίνης (HAS) και θειϊκή γενταμικίνη 10 μg/ml.

1. Το υλικό εξισορροπήθηκε για τουλάχιστον 2 ώρες σε 5-6% CO₂ στους 37 °C πριν τη χρήση. Το pH του θρεπτικού μέσου μετρήθηκε σε εργαστηριακές συνθήκες εργασίας και το επίπεδο του CO₂ προσαρμόστηκε ώστε να επιτευχθεί το επιθυμητό εύρος pH για τη βέλτιστη ανάπτυξη του εμβρύου. Το επιθυμητό εύρος pH για το SAGE 1-Step ήταν $7,3 \pm 0,1$.
2. Μετά τη γονιμοποίηση, οι ζυγώτες μεταφέρθηκαν στο φρέσκο προεξισορροπημένο SAGE 1-Step και το τρυβλίο επιστράφηκε στον επωαστήρα.
3. Το SAGE 1-Step είχε σχεδιαστεί για αδιάλειπτη καλλιέργεια, χωρίς αλλαγή του θρεπτικού μέσου, ώσπου να επιτευχθεί το επιθυμητό αναπτυξιακό στάδιο του εμβρύου.

Universal IVF Medium (με ερυθρό της φαινόλης) (origio)

Χρησιμοποιήθηκε για τη γονιμοποίηση και την καλλιέργεια μέχρι το στάδιο των 2-8 κυττάρων.

Περιείχε διάλυμα ανθρώπινης λευκωματίνης (HAS), ανασυνδυασμένη ανθρώπινη ινσουλίνη και θειϊκή γενταμικίνη 10 μg/ml.

1. Το υλικό εξισορροπήθηκε για τουλάχιστον 2 ώρες σε 5-6% CO₂ στους 37 °C πριν τη χρήση.
2. Ανακτήθηκαν τα ωκύτταρα και προετοιμάσθηκε το σπέρμα.
3. Η γονιμοποίηση (ημέρα 0) πραγματοποιήθηκε στο προεξισορροπημένο Universal IVF Medium. Όταν απαιτούνταν ICSI, η έγχυση του σπέρματος εκτελούνταν σε προεξισορροπημένο θρεπτικό μέσο διατήρησης.
4. Σε 16-20 ώρες (ημέρα 1), ελέγχθηκε ο σχηματισμός των προπυρήνων, έπειτα οι ζυγώτες πλύθηκαν και μεταφέρθηκαν προσεκτικά σε φρέσκες σταγόνες 50 μl ή σε πηγάδια/τρουβλία 0,5 ml Universal IVF Medium καλυμμένου με Liquid Paraffin.

Εμβρυομεταφορά την ημέρα 2 ή την ημέρα 3

1. Τα έμβρυα προετοιμάσθηκαν και μεταφέρθηκαν στη μήτρα σε 20-30 μl προεξισορροπημένου θρεπτικού μέσου μεταφοράς ή φρέσκου Universal IVF Medium.
2. Ο καθετήρας μεταφοράς εκπλύθηκε με το θρεπτικό μέσο μεταφοράς πριν τη χρήση.

Liquid Paraffin (origio)

Η Liquid Paraffin χρησιμοποιήθηκε για την επικάλυψη με λάδι των καλλιεργητικών μέσων κατά τη διάρκεια των διεργασιών IVF και ICSI.

1. Η Liquid Paraffin τοποθετήθηκε στον επωαστήρα σε περιβάλλον 5% CO₂ στους 37 °C για τουλάχιστον 12 ώρες πριν τη χρήση.
2. Αναρροφήθηκε με πιπέτα ο προβλεπόμενος όγκος του θρεπτικού μέσου που χρησιμοποιήθηκε για τη σταγόνα στον πυθμένα του τρυβλίου Petri.
3. Η εξισορροπημένη Liquid Paraffin τοποθετήθηκε με πιπέτα απαλά στο τρυβλίο Petri ώσπου οι σταγόνες να είναι επαρκώς καλυμμένες με λάδι.

UTM Transfer Medium (με ερυθρό της φαινόλης) (origio)

Χρησιμοποιήθηκε για τη μεταφορά των εμβρύων και των βλαστοκύστεων.

Περιείχε διάλυμα ανθρώπινης λευκωματίνης (HAS), ανασυνδυασμένη ανθρώπινη ινσουλίνη και θειϊκή γενταμικίνη 10 µg/ml.

1. Το υλικό εξισορροπήθηκε για τουλάχιστον 2 ώρες σε 5-6% CO₂ στους 37 °C πριν τη χρήση.
2. Τα έμβρυα προετοιμάσθηκαν και μεταφέρθηκαν στη μήτρα σε 20-30 µl προεξισορροπημένου UTM Transfer Medium.
3. Ο καθετήρας μεταφοράς εκπλύθηκε με το UTM Transfer Medium πριν τη χρήση.

2.8. Αξιολόγηση Εμβρύων

Σε ό, τι αφορά την κατάταξη των εμβρύων καθώς αναπτύσσονταν, αξιολογήθηκαν ο αριθμός και η ποιότητά τους.

Αξιολόγηση εμβρύων 2ης - 3ης ημέρας

Η αξιολόγηση των εμβρύων τη 2η και την 3η ημέρα μετά την ωοληψία πραγματοποιήθηκε με βάση δύο κριτήρια, αφ' ενός τη διαίρεση των εμβρύων σε κύτταρα, βλαστομερίδια και αφ' ετέρου τη μορφολογία των κυττάρων.

Διαίρεση

Τη 2η ημέρα καλλιέργειας τα έμβρυα έπρεπε να είχαν διαιρεθεί σε 2-4 βλαστομερίδια. Τα έμβρυα των 4 κυττάρων θεωρήθηκαν καλά, ενώ αυτά των 2 κυττάρων αργά αναπτυσσόμενα. Την 3η ημέρα καλλιέργειας τα έμβρυα έπρεπε να είχαν διαιρεθεί σε 5-8 βλαστομερίδια. Τα έμβρυα των 8 κυττάρων θεωρήθηκαν καλά, ενώ αυτά των 5 κυττάρων οριακά.

Μορφολογία - Θρυμματισμός

Τα έμβρυα κατατάχθηκαν σε τέσσερις κατηγορίες (A-D) με βάση το σχήμα των βλαστομεριδίων και την απουσία ή παρουσία θρυμματισμού. Στην κατηγορία A κατατάχθηκαν τα έμβρυα χωρίς θρυμματισμό, με κανονικό σχήμα (σφαιρικό ή ελλειψοειδές) και ομοιομορφία των βλαστομεριδίων. Αντιθέτως, στην κατηγορία D κατατάχθηκαν τα έμβρυα με έντονο θρυμματισμό, ανισομεγέθη και κατεστραμμένα βλαστομερίδια, ή βλαστομερίδια με ανώμαλο σχήμα και πολλαπλούς πυρήνες. Ενδιάμεσα, στις κατηγορίες B και C κατατάχθηκαν τα υπόλοιπα έμβρυα. Ιδανικά έμβρυα θεωρήθηκαν τα έμβρυα με 4 κύτταρα κατηγορίας A-C. Αντίστοιχα στις 72 ώρες μετά την ωοληψία ιδανικά θεωρήθηκαν τα έμβρυα με 8 κύτταρα κατηγορίας A-B.

Άλλα κριτήρια

Πολλαπλοί πυρήνες

Φυσιολογικά κάθε κύτταρο, βλαστομερίδιο του διαιρούμενου εμβρύου περιέχει ένα ορατό πυρήνα. Η παρουσία πολλαπλών πυρήνων στο εσωτερικό των βλαστομεριδίων παραπέμπει σε ανώμαλο αριθμό χρωμοσωμάτων και συνδέεται με μειωμένη ποιότητα και πιθανότητα εμφύτευσης. Ο αριθμός των πυρήνων ήταν καλύτερα ορατός στο μικροσκόπιο τη 2η ημέρα της ανάπτυξης, δηλαδή στο στάδιο των 2-4 κυττάρων.

Ομοιομορφία βλαστομεριδίων

Η ομοιομορφία των βλαστομεριδίων σχετίζεται με την ποιότητα του εμβρύου. Τυπικά, ένα έμβρυο καλής ποιότητας αποτελείται από ομοιόμορφα βλαστομερίδια, ίδιου σχήματος και μεγέθους, που καταλαμβάνουν σχεδόν εξολοκλήρου το εσωτερικό της διαφανούς ζώνης. Είναι επιτρεπτό, παρόλα αυτά, ένα βλαστομερίδιο με μεγαλύτερο μέγεθος από τα υπόλοιπα, όταν το έμβρυο βρίσκεται σε ενδιάμεσο στάδιο διαίρεσης, δηλαδή στα 3, 5 ή 7 κύτταρα.

Κυτταρόπλασμα βλαστομεριδίων

Η παρουσία κενотоπιών ή κοκκώδους κυτταροπλάσματος στο εσωτερικό των βλαστομεριδίων καταγράφεται, αν και δε σχετίζεται αποδεδειγμένα με χαμηλή εμβρυϊκή ποιότητα.

Πάχος διαφανούς ζώνης

Η διαφανής ζώνη είναι μία ακυτταρική γλυκοπρωτεϊνική στοιβάδα που περιβάλλει το έμβρυο. Κατά τη διόγκωση του εμβρύου στο στάδιο της βλαστοκύστης, η διαφανής ζώνη ρήγνυται, επιτρέποντας την εκκόλαψη του εμβρύου και τη μετέπειτα

εμφύτευση. Το αυξημένο πάχος ή η σκλήρυνση της διαφανούς ζώνης συνδέονται με μειωμένη πιθανότητα εμφύτευσης, εξαιτίας της αδυναμίας εκκόλαψης του εμβρύου.

Αξιολόγηση βλαστοκύστεων 5ης - 6ης ημέρας

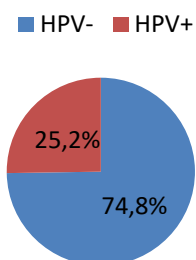
Η αξιολόγηση των βλαστοκύστεων την 5η και την 6η ημέρα μετά την ωοληψία πραγματοποιήθηκε με διαφορετικό σύστημα αξιολόγησης σε σύγκριση με τα έμβρυα 2ης και 3ης ημέρας. Βασίσθηκε στη συνδυαστική αξιολόγηση επιμέρους χαρακτηριστικών της βλαστοκύστης, δηλαδή στο βαθμό της διόγκωσης, στην πρόοδο της εκκόλαψης, στην ποιότητα της έσω κυτταρικής μάζας και της έξω κυτταρικής μάζας, της τροφοβλάστης. Τα στάδια διόγκωσης της βλαστοκύστης χαρακτηρίστηκαν με τους αριθμούς 1 έως 6, ενώ η έσω κυτταρική μάζα και η τροφοβλάστη με τα γράμματα A, B, C. Έτσι, την 5η ημέρα η ιδανική βλαστοκύστη αξιολογήθηκε ως 4AA (διόγκωμένη βλαστοκύστη με άριστη έσω κυτταρική μάζα και τροφοβλάστη), ενώ την 6η ημέρα ως 5AA ή 6AA (εκκολαπτόμενη ή εκκολαφθείσα βλαστοκύστη με άριστη έσω κυτταρική μάζα και τροφοβλάστη).

3. Αποτελέσματα

3.1. Παρουσία HPV στα Κολποτραχηλικά Δείγματα

Ο ιός HPV ανιχνεύθηκε σε 77 από τα 305 συνολικά κολποτραχηλικά δείγματα των γυναικών (25,2%).

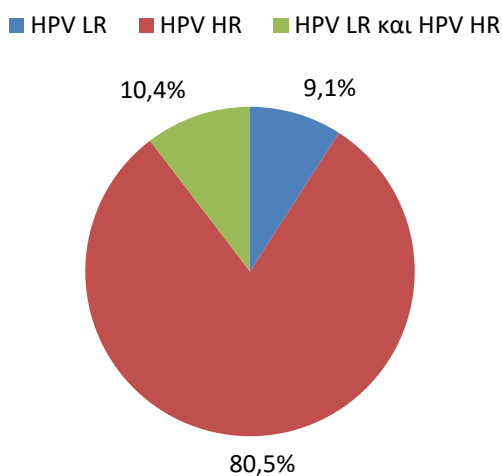
Κολποτραχηλικά Δείγματα



Γράφημα 1: Η παρουσία του ιού HPV στα κολποτραχηλικά δείγματα των γυναικών.

Στα 77 θετικά κολποτραχηλικά δείγματα, ανιχνεύθηκαν μόνο τύποι HPV χαμηλού κινδύνου σε 7 δείγματα (9,1%), μόνο τύποι HPV υψηλού κινδύνου σε 62 δείγματα (80,5%) και τύποι HPV χαμηλού κινδύνου μαζί με HPV υψηλού κινδύνου σε 8 δείγματα (10,4%).

Κολποτραχηλικά Δείγματα



Γράφημα 2: Η παρουσία των ιών HPV χαμηλού και υψηλού κινδύνου στα κολποτραχηλικά δείγματα των γυναικών.

Οι τύποι HPV χαμηλού κινδύνου (HPV 6 και HPV 11) ανιχνεύθηκαν σε 15 από τα 77 δείγματα (19,5%). Ο HPV 6 ανιχνεύθηκε σε 7 δείγματα (9,1%) και ο HPV 11 σε 13 δείγματα (16,9%).

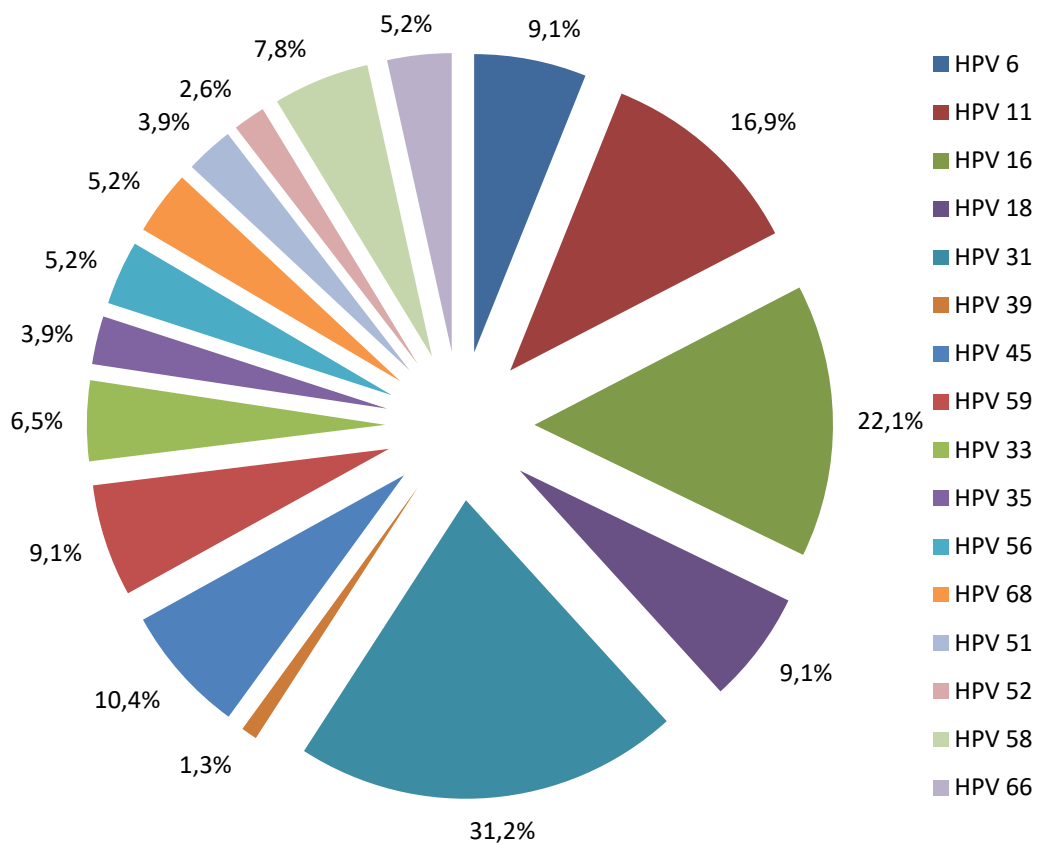
Οι τύποι HPV υψηλού κινδύνου (HPV 16, HPV 18, HPV 31, HPV 39, HPV 45, HPV 59, HPV 33, HPV 35, HPV 56, HPV 68, HPV 51, HPV 52, HPV 58 και HPV 66) ανιχνεύθηκαν σε 70 από τα 77 δείγματα (91,0%). Ο HPV 16 ανιχνεύθηκε σε 17 δείγματα (22,1%), ο HPV 18 σε 7 δείγματα (9,1%), ο HPV 31 σε 24 δείγματα (31,2%), ο HPV 39 σε 1 δείγμα (1,3%), ο HPV 45 σε 8 δείγματα (10,4%), ο HPV 59 σε 7 δείγματα (9,1%), ο HPV 33 σε 5 δείγματα (6,5%), ο HPV 35 σε 3 δείγματα (3,9%), ο HPV 56 σε 4 δείγματα (5,2%), ο HPV 68 σε 4 δείγματα (5,2%), ο HPV 51 σε 3 δείγματα (3,9%), ο HPV 52 σε 2 δείγματα (2,6%), ο HPV 58 σε 6 δείγματα (7,8%) και ο HPV 66 σε 4 δείγματα (5,2%).

Ιός HPV	Κολποτραχηλικό
Σύνολο	77
Χαμηλού Κινδύνου	15
HPV 6	7
HPV 11	13
Υψηλού Κινδύνου	70
HPV 16	17
HPV 18	7
HPV 31	24
HPV 39	1
HPV 45	8
HPV 59	7
HPV 33	5
HPV 35	3
HPV 56	4
HPV 68	4

HPV 51	3
HPV 52	2
HPV 58	6
HPV 66	4

Πίνακας 1: Η παρουσία των ιών HPV στα κολποτραχηλικά δείγματα των γυναικών.

Κολποτραχηλικά Δείγματα

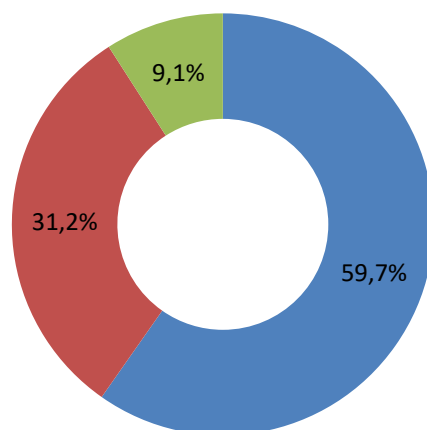


Γράφημα 3: Η παρουσία των ιών HPV στα κολποτραχηλικά δείγματα των γυναικών.

Στα 77 θετικά κολποτραχηλικά δείγματα, ανιχνεύθηκε 1 τύπος του ιού HPV σε 46 δείγματα (59,7%), 2 τύποι του ιού HPV σε 24 δείγματα (31,2%) και 3 τύποι του ιού HPV σε 7 δείγματα (9,1%).

Κολποτραχηλικά Δείγματα

■ 1 τύπος HPV ■ 2 τύποι HPV ■ 3 τύποι HPV



Γράφημα 4: Η ταυτόχρονη παρουσία των ιών HPV στα κολποτραχηλικά δείγματα των γυναικών.

Ο HPV 6 ανιχνεύθηκε σε 2 δείγματα (2,6%), ο HPV 11 σε 3 δείγματα (3,9%), ο HPV 16 σε 6 δείγματα (7,8%), ο HPV 18 σε 2 δείγματα (2,6%), ο HPV 31 σε 16 δείγματα (20,8%), ο HPV 39 σε κανένα δείγμα, ο HPV 45 σε 1 δείγμα (1,3%), ο HPV 59 σε 4 δείγματα (5,2%), ο HPV 33 σε 2 δείγματα (2,6%), ο HPV 35 σε 1 δείγμα (1,3%), ο HPV 56 σε 2 δείγματα (2,6%), ο HPV 68 σε 1 δείγμα (1,3%), ο HPV 51 σε 1 δείγμα (1,3%), ο HPV 52 σε κανένα δείγμα, ο HPV 58 σε 4 δείγματα (5,2%) και ο HPV 66 σε 1 δείγμα (1,3%).

Οι HPV 6, HPV 11 ανιχνεύθηκαν σε 2 δείγματα (2,6%), οι HPV 11, HPV 45 σε 2 δείγματα (2,6%), οι HPV 11, HPV 68 σε 1 δείγμα (1,3%), οι HPV 11, HPV 66 σε 1 δείγμα (1,3%), οι HPV 16, HPV 18 σε 1 δείγμα (1,3%), οι HPV 16, HPV 31 σε 2 δείγματα (2,6%), οι HPV 16, HPV 45 σε 1 δείγμα (1,3%), οι HPV 16, HPV 59 σε 1

δείγμα (1,3%), οι HPV 16, HPV 56 σε 1 δείγμα (1,3%), οι HPV 16, HPV 51 σε 1 δείγμα (1,3%), οι HPV 16, HPV 52 σε 1 δείγμα (1,3%), οι HPV 16, HPV 58 σε 1 δείγμα (1,3%), οι HPV 18, HPV 45 σε 2 δείγματα (2,6%), οι HPV 18, HPV 68 σε 2 δείγματα (2,6%), οι HPV 31, HPV 45 σε 1 δείγμα (1,3%), οι HPV 31, HPV 33 σε 1 δείγμα (1,3%), οι HPV 39, HPV 59 σε 1 δείγμα (1,3%), οι HPV 33, HPV 35 σε 1 δείγμα (1,3%) και οι HPV 68, HPV 66 σε 1 δείγμα (1,3%).

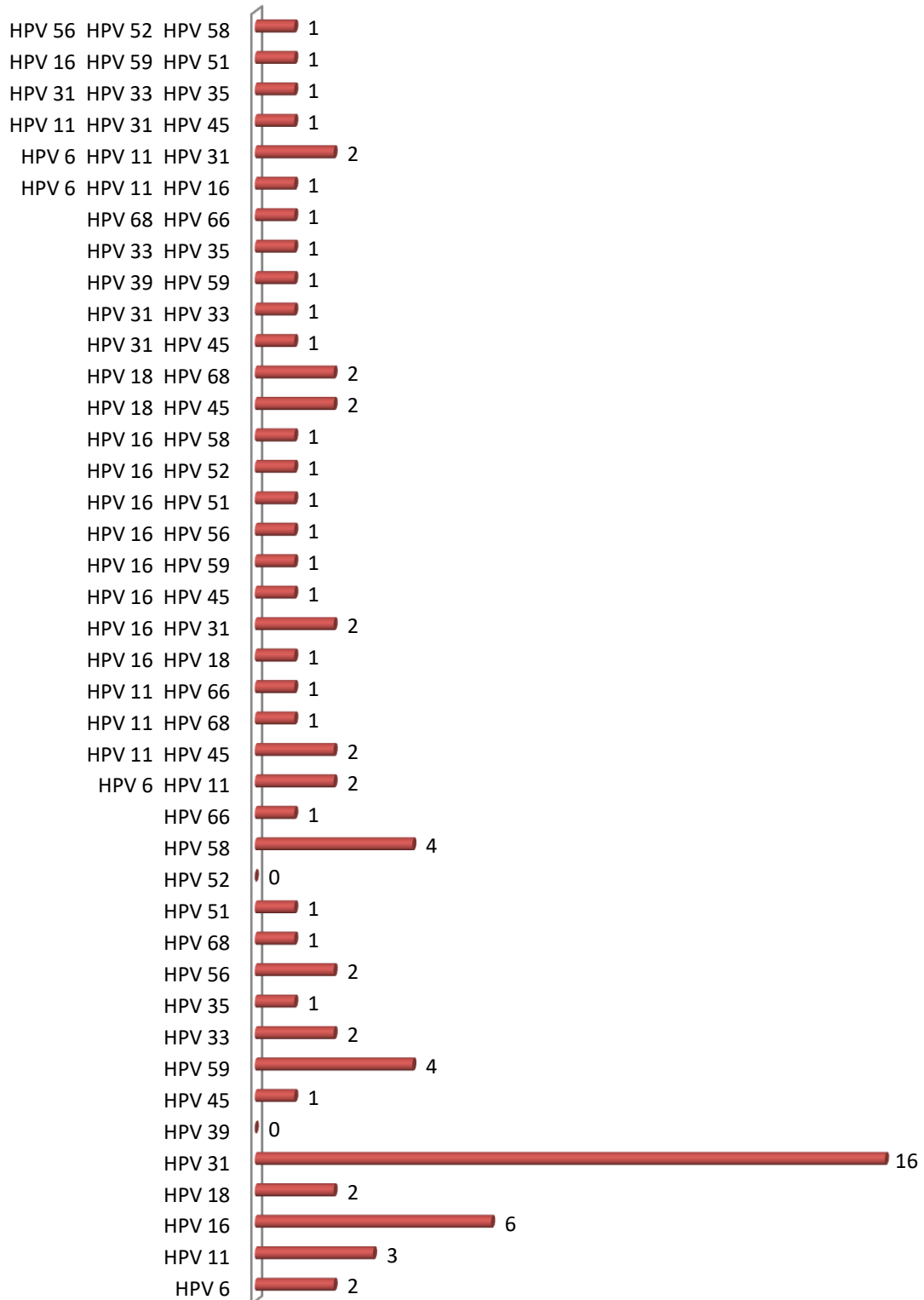
Οι HPV 6, HPV 11, HPV 16 ανιχνεύθηκαν σε 1 δείγμα (1,3%), οι HPV 6, HPV 11, HPV 31 σε 2 δείγματα (2,6%), οι HPV 11, HPV 31, HPV 45 σε 1 δείγμα (1,3%), οι HPV 31, HPV 33, HPV 35 σε 1 δείγμα (1,3%), οι HPV 16, HPV 59, HPV 51 σε 1 δείγμα (1,3%) και οι HPV 56, HPV 52, HPV 58 σε 1 δείγμα (1,3%).

	Ιοί HPV	Κολποτραχηλικό
1 τύπος HPV	HPV 6	2
	HPV 11	3
	HPV 16	6
	HPV 18	2
	HPV 31	16
	HPV 39	0
	HPV 45	1
	HPV 59	4
	HPV 33	2
	HPV 35	1
	HPV 56	2
	HPV 68	1
	HPV 51	1
	HPV 52	0
	HPV 58	4
	HPV 66	1
2 τύποι HPV	HPV 6 HPV 11	2
	HPV 11 HPV 45	2
	HPV 11 HPV 68	1

	HPV 11 HPV 66	1
	HPV 16 HPV 18	1
	HPV 16 HPV 31	2
	HPV 16 HPV 45	1
	HPV 16 HPV 59	1
	HPV 16 HPV 56	1
	HPV 16 HPV 51	1
	HPV 16 HPV 52	1
	HPV 16 HPV 58	1
	HPV 18 HPV 45	2
	HPV 18 HPV 68	2
	HPV 31 HPV 45	1
	HPV 31 HPV 33	1
	HPV 39 HPV 59	1
	HPV 33 HPV 35	1
	HPV 68 HPV 66	1
3 τύποι HPV	HPV 6 HPV 11 HPV 16	1
	HPV 6 HPV 11 HPV 31	2
	HPV 11 HPV 31 HPV 45	1
	HPV 31 HPV 33 HPV 35	1
	HPV 16 HPV 59 HPV 51	1
	HPV 56 HPV 52 HPV 58	1

Πίνακας 2: Η ταυτόχρονη παρουσία των ιών HPV στα κολποτραχηλικά δείγματα των γυναικών.

Κολποτραχηλικά Δείγματα

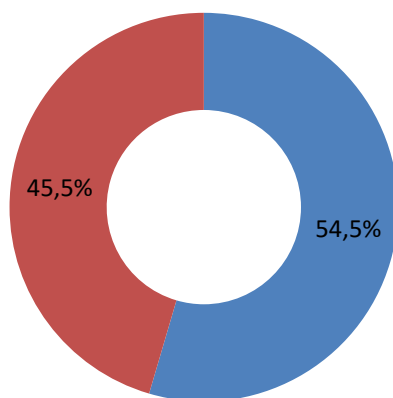


Γράφημα 5: Η ταυτόχρονη παρουσία των ιών HPV στα κολποτραχηλικά δείγματα των γυναικών.

Στα 77 θετικά κολποτραχηλικά δείγματα, ιός HPV ανιχνεύθηκε σε 42 κολποτραχηλικά δείγματα γυναικών HPV θετικών ανδρών και σε 35 κολποτραχηλικά δείγματα γυναικών HPV αρνητικών ανδρών.

Κολποτραχηλικά Δείγματα

■ ♂ HPV+ ■ ♂ HPV-

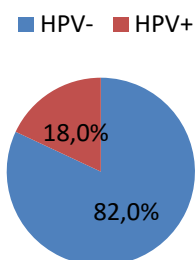


Γράφημα 6: Η παρουσία του ιού HPV στα κολποτραχηλικά δείγματα των γυναικών HPV θετικών και HPV αρνητικών ανδρών.

3.2. Παρουσία HPV στα Δείγματα Σπέρματος

Ο ιός HPV ανιχνεύθηκε σε 55 από τα 305 συνολικά δείγματα σπέρματος των ανδρών (18,0%).

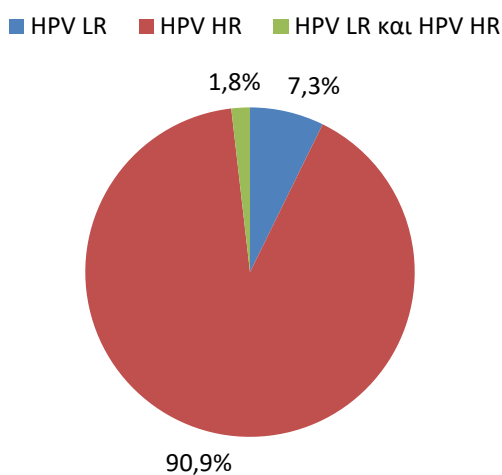
Δείγματα Σπέρματος



Γράφημα 7: Η παρουσία του ιού HPV στα δείγματα σπέρματος των ανδρών.

Στα 55 θετικά δείγματα σπέρματος, ανιχνεύθηκαν μόνο τύποι HPV χαμηλού κινδύνου σε 4 δείγματα (7,3%), μόνο τύποι HPV υψηλού κινδύνου σε 50 δείγματα (90,9%) και τύποι HPV χαμηλού κινδύνου μαζί με HPV υψηλού κινδύνου σε 1 δείγμα (1,8%).

Δείγματα Σπέρματος



Γράφημα 8: Η παρουσία των ιών HPV χαμηλού και υψηλού κινδύνου στα δείγματα σπέρματος των ανδρών.

Οι τύποι HPV χαμηλού κινδύνου (HPV 6 και HPV 11) ανιχνεύθηκαν σε 5 από τα 55 δείγματα (9,1%). Ο HPV 6 ανιχνεύθηκε σε 4 δείγματα (7,3%) και ο HPV 11 σε 4 δείγματα (7,3%).

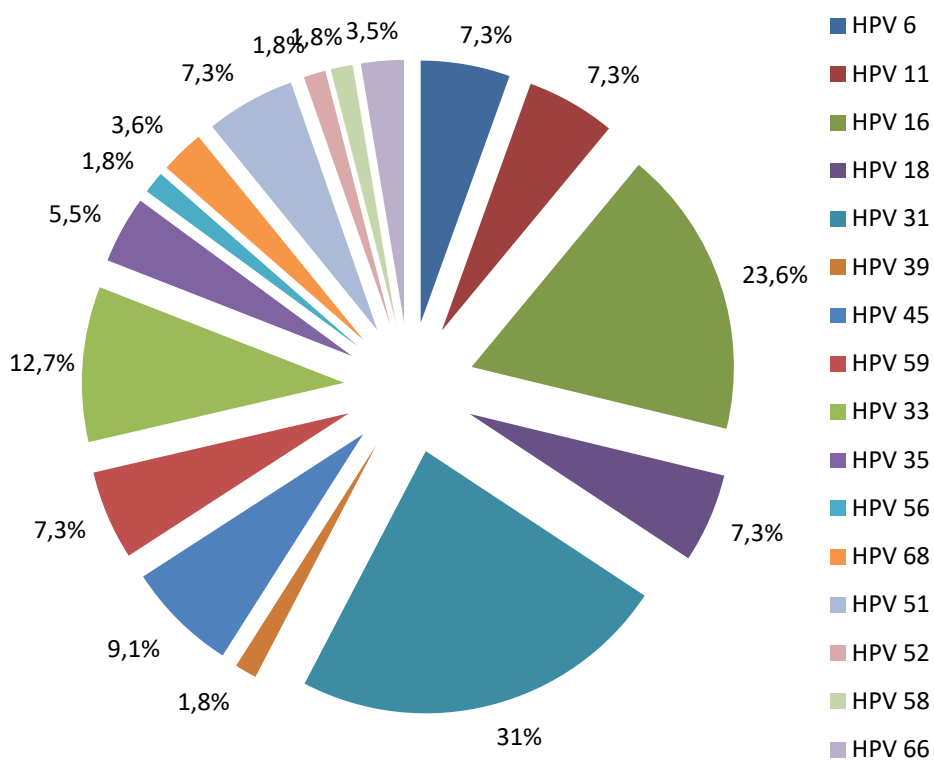
Οι τύποι HPV υψηλού κινδύνου (HPV 16, HPV 18, HPV 31, HPV 39, HPV 45, HPV 59, HPV 33, HPV 35, HPV 56, HPV 68, HPV 51, HPV 52, HPV 58 και HPV 66) ανιχνεύθηκαν σε 51 από τα 55 δείγματα (93,0%). Ο HPV 16 ανιχνεύθηκε σε 13 δείγματα (23,6%), ο HPV 18 σε 4 δείγματα (7,3%), ο HPV 31 σε 17 δείγματα (31,0%), ο HPV 39 σε 1 δείγμα (1,8%), ο HPV 45 σε 5 δείγματα (9,1%), ο HPV 59 σε 4 δείγματα (7,3%), ο HPV 33 σε 7 δείγματα (12,7%), ο HPV 35 σε 3 δείγματα (5,5%), ο HPV 56 σε 1 δείγμα (1,8%), ο HPV 68 σε 2 δείγματα (3,6%), ο HPV 51 σε 4 δείγματα (7,3%), ο HPV 52 σε 1 δείγμα (1,8%), ο HPV 58 σε 1 δείγμα (1,8%) και ο HPV 66 σε 2 δείγματα (3,6%).

Ιός HPV	Σπέρμα
Σύνολο	55
Χαμηλού Κινδύνου	5
HPV 6	4
HPV 11	4
Υψηλού Κινδύνου	51
HPV 16	13
HPV 18	4
HPV 31	17
HPV 39	1
HPV 45	5
HPV 59	4
HPV 33	7
HPV 35	3
HPV 56	1
HPV 68	2

HPV 51	4
HPV 52	1
HPV 58	1
HPV 66	2

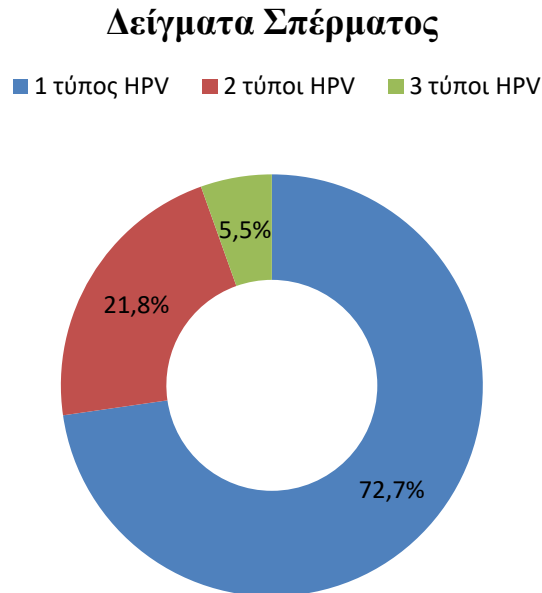
Πίνακας 3: Η παρουσία των ιών HPV στα δείγματα σπέρματος των ανδρών.

Δείγματα Σπέρματος



Γράφημα 9: Η παρουσία των ιών HPV στα δείγματα σπέρματος των ανδρών.

Στα 55 θετικά δείγματα σπέρματος, ανιχνεύθηκε 1 τύπος του ιού HPV σε 40 δείγματα (72,7%), 2 τύποι του ιού HPV σε 12 δείγματα (21,8%) και 3 τύποι του ιού HPV σε 3 δείγματα (5,5%).



Γράφημα 10: Η ταυτόχρονη παρουσία των ιών HPV στα δείγματα σπέρματος των ανδρών.

Ο HPV 6 ανιχνεύθηκε σε 1 δείγμα (1,8%), ο HPV 11 σε 1 δείγμα (1,8%), ο HPV 16 σε 9 δείγματα (16,4%), ο HPV 18 σε 3 δείγματα (2,6%), ο HPV 31 σε 9 δείγματα (16,4%), ο HPV 39 σε κανένα δείγμα, ο HPV 45 σε 3 δείγματα (5,5%), ο HPV 59 σε 2 δείγματα (3,6%), ο HPV 33 σε 3 δείγματα (5,5%), ο HPV 35 σε 1 δείγμα (1,8%), ο HPV 56 σε 1 δείγμα (1,8%), ο HPV 68 σε 1 δείγμα (1,8%), ο HPV 51 σε 3 δείγματα (5,5%), ο HPV 52 σε 1 δείγμα (1,8%), ο HPV 58 σε 1 δείγμα (1,8%) και ο HPV 66 σε 1 δείγμα (1,8%).

Οι HPV 6, HPV 11 ανιχνεύθηκαν σε 2 δείγματα (3,6%), οι HPV 16, HPV 31 σε 2 δείγματα (3,6%), οι HPV 16, HPV 33 σε 1 δείγμα (1,8%), οι HPV 18, HPV 35 σε 1 δείγμα (1,8%), οι HPV 31, HPV 33 σε 1 δείγμα (1,8%), οι HPV 39, HPV 59 σε 1

δείγμα (1,8%), οι HPV 45, HPV 31 σε 2 δείγματα (3,6%), οι HPV 33, HPV 31 σε 1 δείγμα (1,8%) και οι HPV 51, HPV 59 σε 1 δείγμα (1,8%).

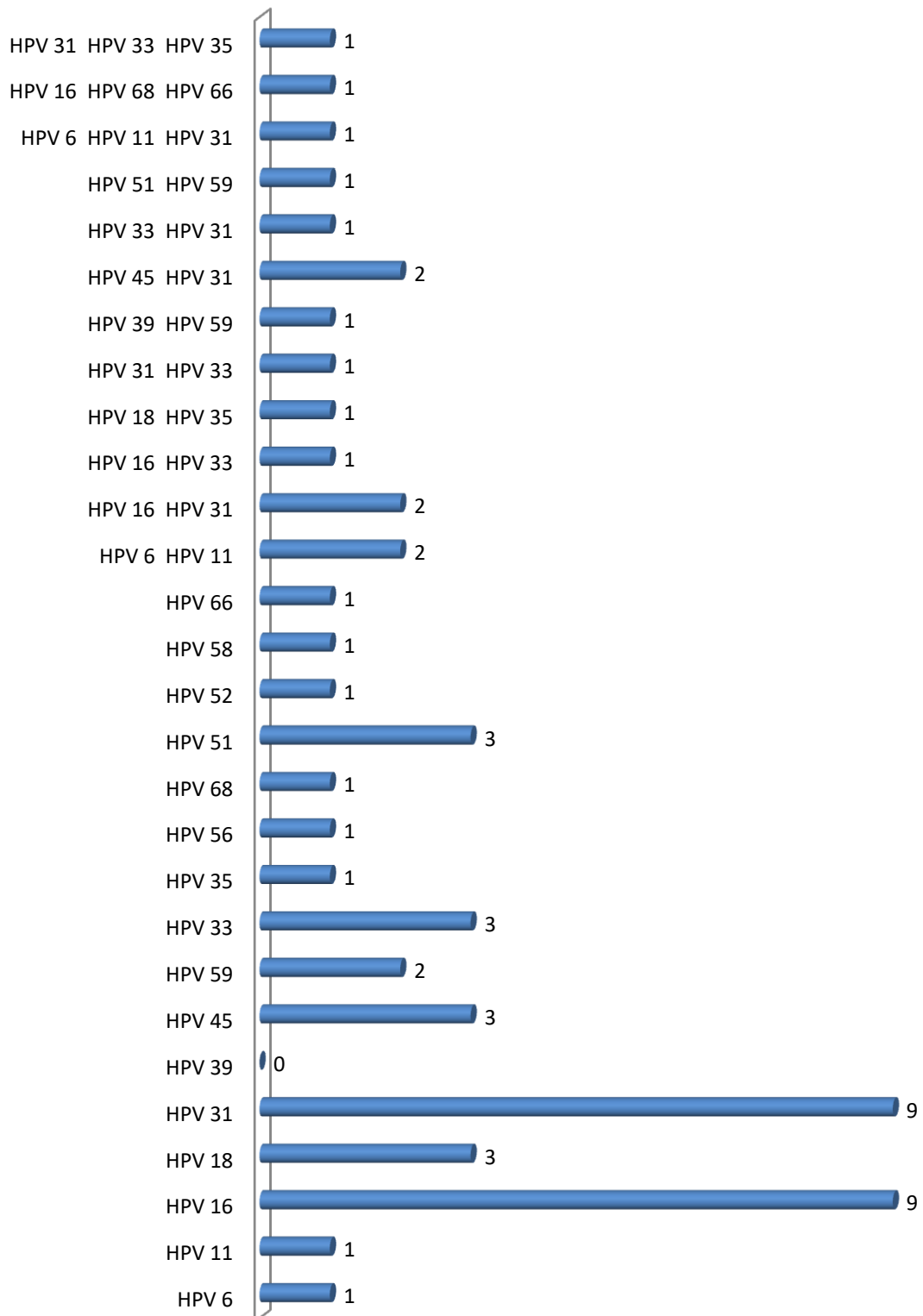
Οι HPV 6, HPV 11, HPV 31 ανιχνεύθηκαν σε 1 δείγμα (1,8%), οι HPV 16, HPV 68, HPV 66 σε 1 δείγμα (1,8%) και οι HPV 31, HPV 33, HPV 35 σε 1 δείγμα (1,8%).

	Ιοί HPV	Σπέρμα
1 τύπος HPV	HPV 6	1
	HPV 11	1
	HPV 16	9
	HPV 18	3
	HPV 31	9
	HPV 39	0
	HPV 45	3
	HPV 59	2
	HPV 33	3
	HPV 35	1
	HPV 56	1
	HPV 68	1
	HPV 51	3
	HPV 52	1
	HPV 58	1
HPV 66	1	
2 τύποι HPV	HPV 6 HPV 11	2
	HPV 16 HPV 31	2
	HPV 16 HPV 33	1
	HPV 18 HPV 35	1
	HPV 31 HPV 33	1
	HPV 39 HPV 59	1
	HPV 45 HPV 31	2
	HPV 33 HPV 31	1

	HPV 51 HPV 59	1
3 τύποι HPV	HPV 6 HPV 11 HPV 31	1
	HPV 16 HPV 68 HPV 66	1
	HPV 31 HPV 33 HPV 35	1

Πίνακας 4: Η ταυτόχρονη παρουσία των ιών HPV στα δείγματα σπέρματος των ανδρών.

Δείγματα Σπέρματος

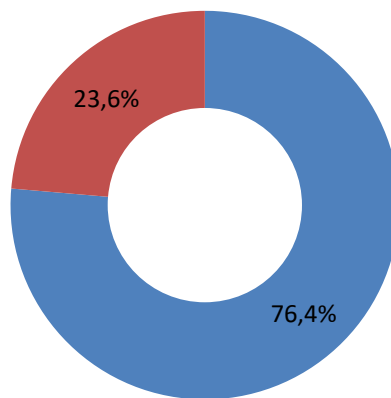


Γράφημα 11: Η ταυτόχρονη παρουσία των ιών HPV στα δείγματα σπέρματος των ανδρών.

Στα 55 θετικά δείγματα σπέρματος, ο ιός HPV ανιχνεύθηκε σε 42 δείγματα σπέρματος ανδρών HPV θετικών γυναικών και σε 13 δείγματα σπέρματος ανδρών HPV αρνητικών γυναικών.

Δείγματα Σπέρματος

■ ♀ HPV+ ■ ♀ HPV-

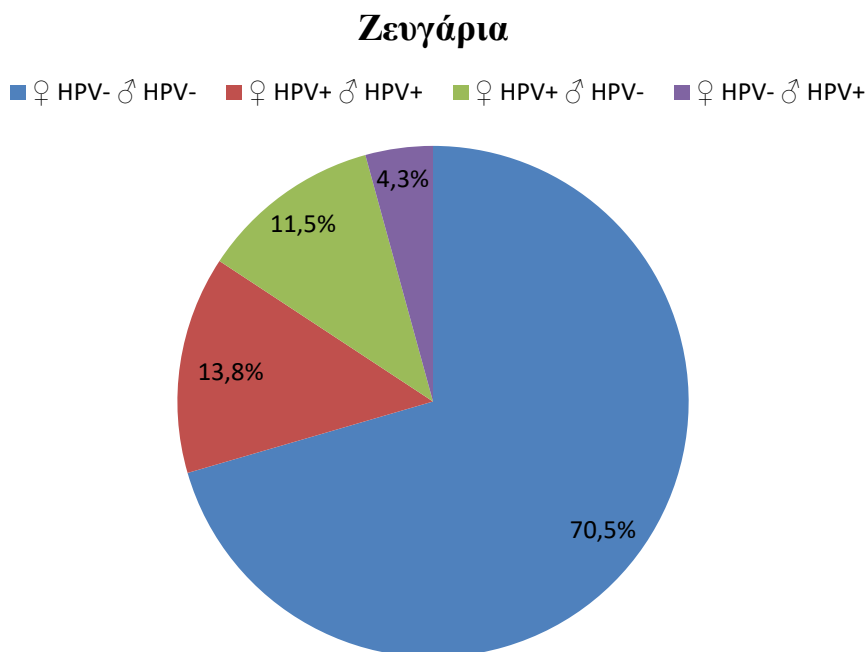


Γράφημα 12: Η παρουσία του ιού HPV στα δείγματα σπέρματος των ανδρών HPV θετικών και HPV αρνητικών γυναικών.

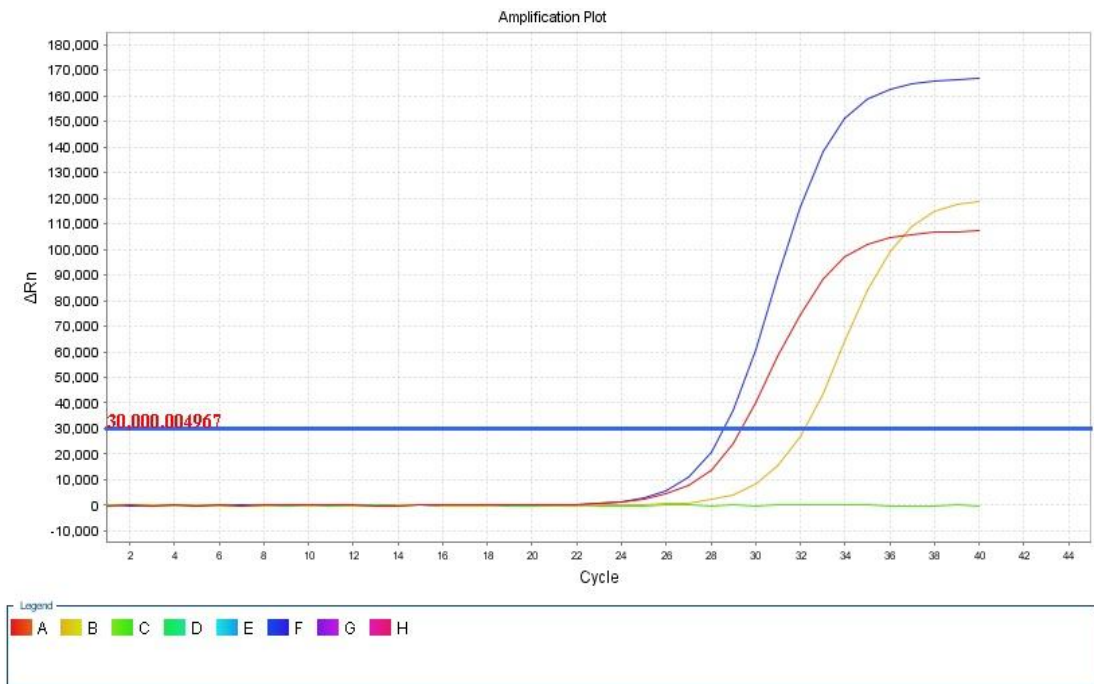
Ο ιός HPV δεν ανιχνεύθηκε σε κανέναν από τους δύο συντρόφους σε 215 ζευγάρια (70,5%) και στους δύο συντρόφους σε 42 ζευγάρια (13,8%), ενώ ανιχνεύθηκε μονάχα στη γυναίκα σύντροφο σε 35 ζευγάρια (11,5%) και μονάχα στον άνδρα σύντροφο σε 13 ζευγάρια (4,3%).

Ζευγάρια		Ιός HPV
Γυναίκες	Άνδρες	
HPV +	HPV +	42
HPV +	HPV -	35
HPV -	HPV +	13
Σύνολο		90

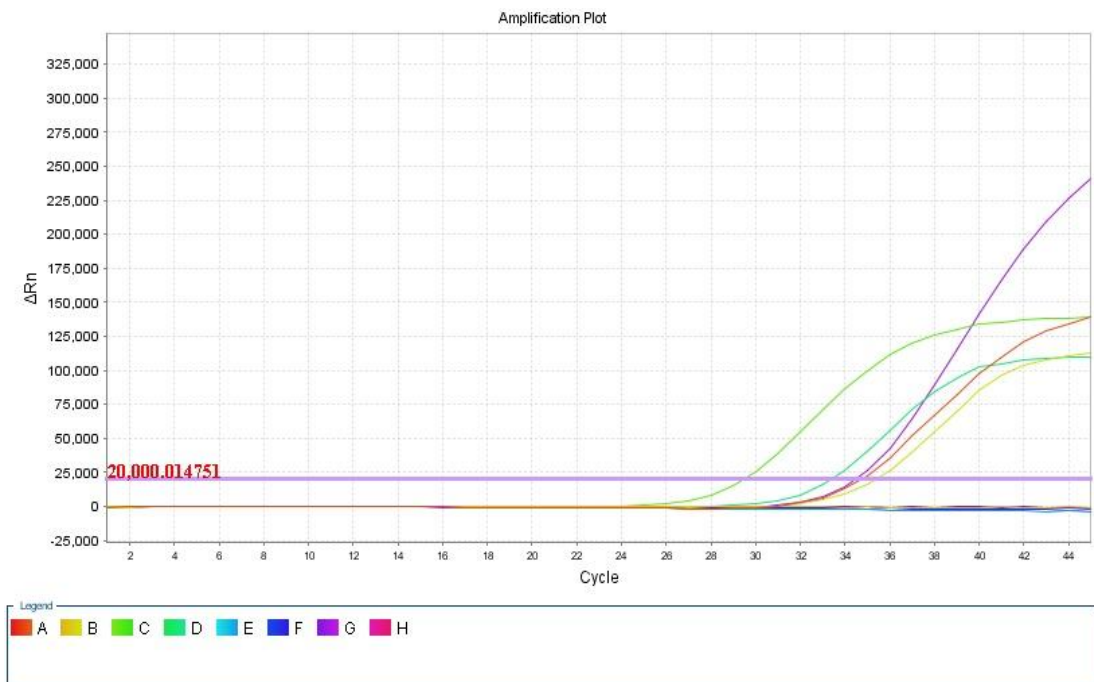
Πίνακας 5: Η παρουσία του ιού HPV στο σύνολο των ζευγαριών.



Γράφημα 13: Η παρουσία του ιού HPV στο σύνολο των ζευγαριών.



Εικόνα 1: Η ανίχνευση και η τυποποίηση των ιών HPV χαμηλού κινδύνου με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.

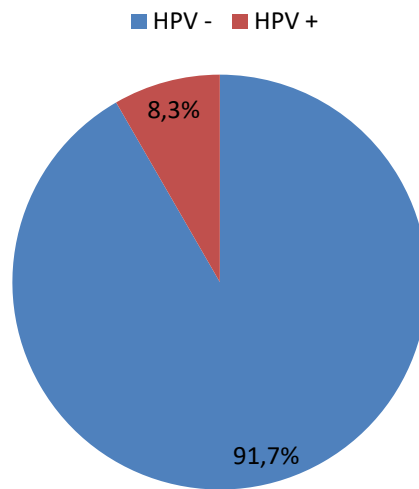


Εικόνα 2: Η ανίχνευση και η τυποποίηση των ιών HPV υψηλού κινδύνου με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.

3.3. Παρουσία HPV στα Νορμοζωοσπερμικά Δείγματα Σπέρματος

Ο ιός HPV ανιχνεύθηκε σε 5 από τα 60 συνολικά νορμοζωοσπερμικά δείγματα σπέρματος (8,3%).

Νορμοζωοσπερμικά Δείγματα Σπέρματος

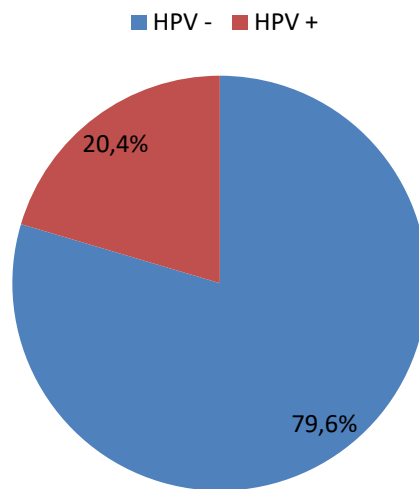


Γράφημα 14: Η παρουσία του ιού HPV στα νορμοζωοσπερμικά δείγματα σπέρματος.

3.4. Παρουσία HPV στα Παθολογικά Δείγματα Σπέρματος

Ο ιός HPV ανιχνεύθηκε σε 50 από τα 245 συνολικά παθολογικά δείγματα σπέρματος (20,4%), με στατιστικά σημαντική συσχέτιση ($P=0,0086$, Fisher's test) σε σχέση με τα νορμοζωοσπερμικά δείγματα σπέρματος.

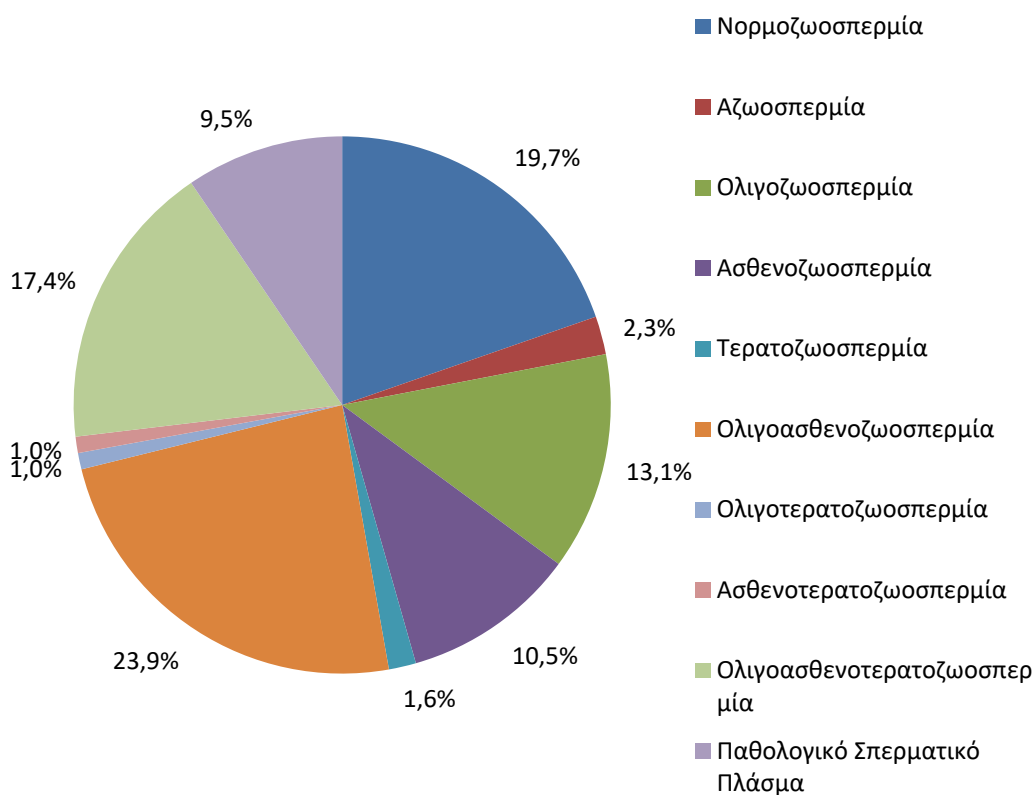
Παθολογικά Δείγματα Σπέρματος



Γράφημα 15: Η παρουσία του ιού HPV στα παθολογικά δείγματα σπέρματος.

Κατηγορία		HPV +	HPV -
Νορμοζωοσπερμικά	60	5	55
Παθολογικά	245	50	195
Σύνολο	305	55	250

Δείγματα Σπέρματος



Γράφημα 16: Οι κατηγορίες των δειγμάτων σπέρματος των ανδρών με βάση το σπερμοδιάγραμμα.

3.4.1. Παρουσία HPV και Συγκέντρωση Σπερματοζωαρίων

Ο ιός HPV ανιχνεύθηκε σε 3 από τα 40 ολιγοζωοσπερμικά δείγματα σπέρματος (7,5%).

3.4.2. Παρουσία HPV και Κινητικότητα Σπερματοζωαρίων

Ο ιός HPV ανιχνεύθηκε σε 18 από τα 32 ασθενοζωοσπερμικά δείγματα σπέρματος (56,3%), με εξαιρετικά στατιστικά σημαντική συσχέτιση ($P=0,0001$, Fisher's test) σε σχέση με τα υπόλοιπα παθολογικά δείγματα σπέρματος.

Κατηγορία		HPV +	HPV -
Ασθενοζωοσπερμικά	32	18	14
Παθολογικά	213	32	181
Σύνολο	245	50	195

3.4.3. Παρουσία HPV και Μορφολογία Σπερματοζωαρίων

Ο ιός HPV δεν ανιχνεύθηκε σε κανένα από τα 5 τερατοζωοσπερμικά δείγματα σπέρματος.

3.4.4. Παρουσία HPV και Παθολογικό Σπερματικό Πλάσμα (χροιά, ιξώδες, ρευστοποίηση, όγκος) και/ή Συγκολλήσεις και/ή Λευκά Αιμοσφαίρια

Ο ιός HPV ανιχνεύθηκε σε 3 από τα 29 δείγματα σπέρματος με παθολογικό σπερματικό πλάσμα (χροιά, ιξώδες, ρευστοποίηση, όγκος) και/ή συγκολλήσεις και/ή λευκά αιμοσφαίρια (10,3%).

Κατηγορία	Δείγμα Σπέρματος	Ιός HPV
Νορμοζωοσπερμία	60	5
Αζωοσπερμία	7	0
Ολιγοζωοσπερμία	40	3
Ασθενοζωοσπερμία	32	18
Τερατοζωοσπερμία	5	0
Ολιγοασθενοζωοσπερμία	73	17
Ολιγοτερατοζωοσπερμία	3	0
Ασθενοτερατοζωοσπερμία	3	0
Ολιγοασθενοτερατοζωοσπερμία	53	9
Παθολογικό Σπερματικό Πλάσμα	29	3
Σύνολο	305	55

Πίνακας 6: Η παρουσία του ιού HPV στις κατηγορίες των δειγμάτων σπέρματος.

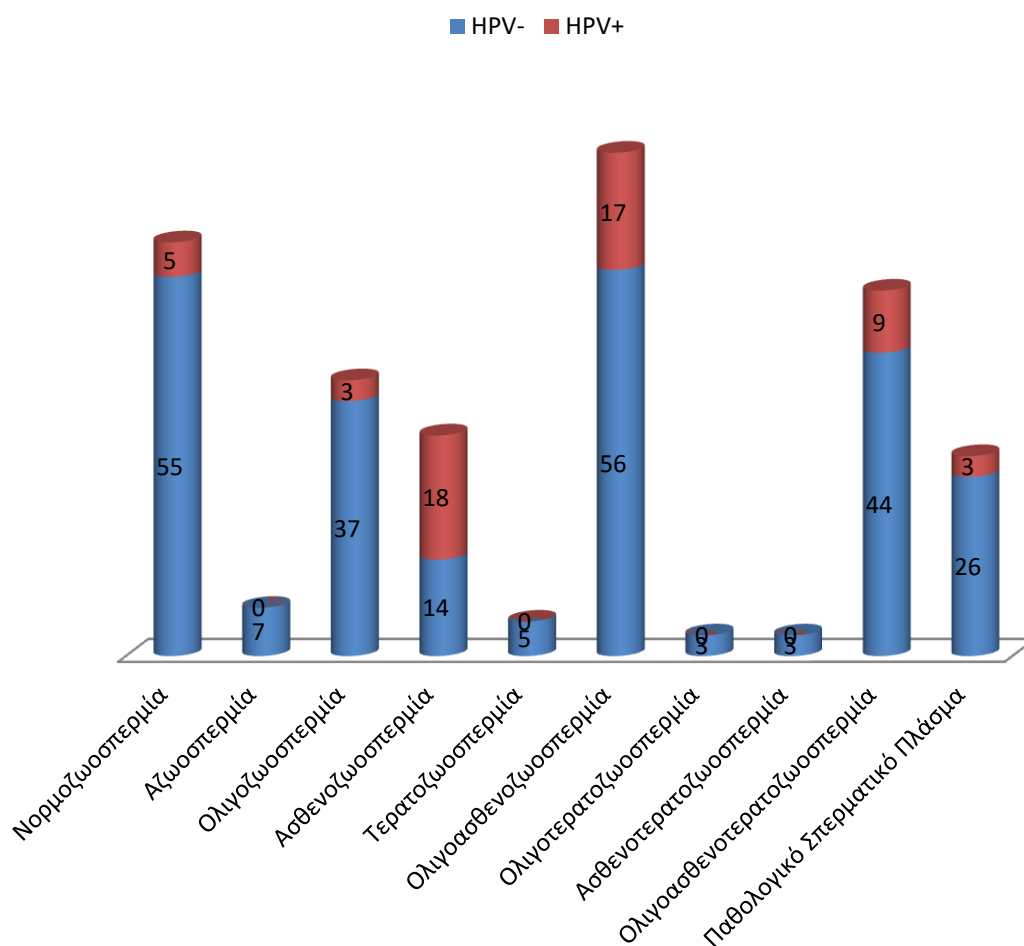
Ο ιός HPV δεν ανιχνεύθηκε σε κανένα από τα 7 αζωοσπερμικά δείγματα σπέρματος.

Ο ιός HPV ανιχνεύθηκε σε 17 από τα 73 ολιγοασθενοζωοσπερμικά δείγματα σπέρματος (23,3%).

Ο ιός HPV δεν ανιχνεύθηκε σε κανένα από τα 3 ολιγοτερατοζωοσπερμικά δείγματα σπέρματος.

Ο ιός HPV δεν ανιχνεύθηκε σε κανένα από τα 3 ασθενοτερατοζωοσπερμικά δείγματα σπέρματος.

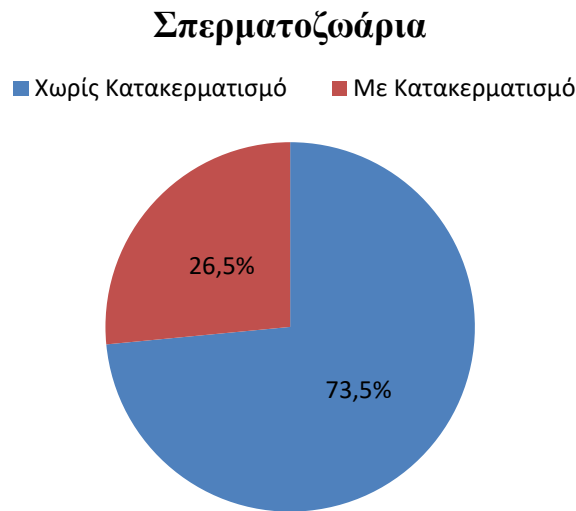
Ο ιός HPV ανιχνεύθηκε σε 9 από τα 53 ολιγοασθενοτερατοζωοσπερμικά δείγματα σπέρματος (17,0%).



Γράφημα 17: Η παρουσία του ιού HPV στις κατηγορίες των δειγμάτων σπέρματος.

3.5. Παρουσία HPV και Κατακερματισμός DNA Σπερματοζωαρίων

Στα 298 δείγματα σπέρματος, ο ιός HPV ανιχνεύθηκε σε 22 από τα 219 δείγματα σπέρματος χωρίς κατακερματισμό του DNA των σπερματοζωαρίων (10,0%) και σε 33 από τα 79 δείγματα σπέρματος με κατακερματισμό του DNA των σπερματοζωαρίων (41,8%), με εξαιρετικά στατιστικά σημαντική συσχέτιση ($P < 0,0001$, Fisher's test).



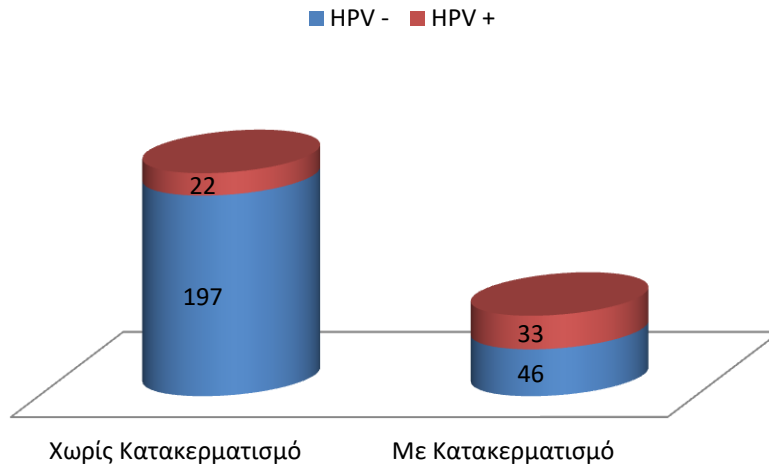
Γράφημα 18: Οι κατηγορίες των σπερματοζωαρίων με βάση τη διασπορά χρωματίνης σπέρματος.

Σπερματοζωάρια		Δείγμα Σπέρματος	Ιός HPV
Χωρίς Κατακερματισμό	Μεγάλη Άλω	219	22
	Μεσαία Άλω		
Με Κατακερματισμό	Μικρή Άλω	79	33
	Χωρίς Άλω		
	Αποδομημένα		
Σύνολο		298	55

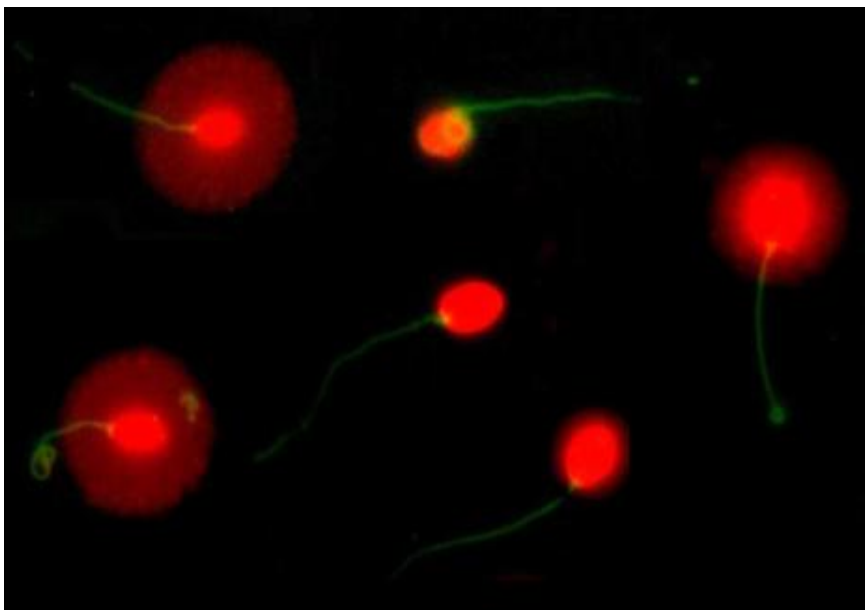
Πίνακας 7: Η παρουσία του ιού HPV στα σπερματοζωάρια με ή χωρίς κατακερματισμό του DNA των δειγμάτων σπέρματος.

	Σύνολο	HPV +	HPV -
Με Κατακερματισμό	79	33	46
Χωρίς Κατακερματισμό	219	22	197
Σύνολο	298	55	243

Σπερματοζώαρια



Γράφημα 19: Η παρουσία του ιού HPV στις κατηγορίες των σπερματοζωαρίων.



Εικόνα 3: Η εκτίμηση του κατακερματισμού του DNA των σπερματοζωαρίων με διασπορά χρωματίνης σπέρματος.

3.6. Παρουσία HPV και Έμβρυα

Η ποιότητα των εμβρύων αξιολογήθηκε 3 ημέρες κατόπιν της ωοληψίας, με βάση τον αριθμό των βλαστομεριδίων, τη μορφολογία και το θρυμματισμό τους. Τα έμβρυα με βλαστομερίδια <5 την 3η ημέρα θεωρήθηκαν στάσιμα και τα έμβρυα με ποσοστό κατακερματισμού του DNA <10%, <10-20%, <20-30% και >30% καταγράφηκαν ως κατηγορίας A, B, C και D, αντίστοιχα.

Στα 215 ζευγάρια όπου ο ιός HPV δεν ανιχνεύθηκε σε κανέναν από τους δύο συντρόφους, το ποσοστό γονιμοποίησης ήταν 89%. Την 3η ημέρα, το ποσοστό στασιμότητας των εμβρύων ήταν 27%, ενώ το 42% των εμβρύων ήταν A, το 37% B, το 16% C και το 5% D.

Στα 42 ζευγάρια όπου ο ιός HPV ανιχνεύθηκε και στους δύο συντρόφους, το ποσοστό γονιμοποίησης ήταν 81%. Την 3η ημέρα, το ποσοστό στασιμότητας των εμβρύων ήταν 69%, ενώ το 30% των εμβρύων ήταν A, το 34% B, το 26% C και το 10% D.

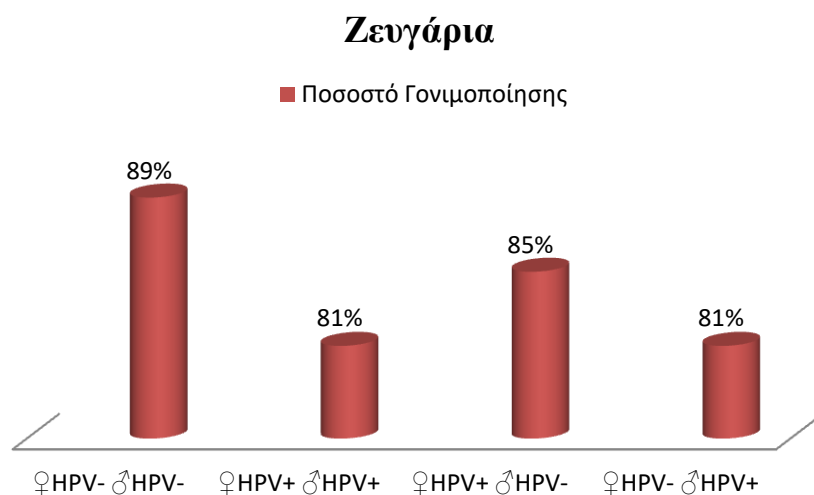
Στα 35 ζευγάρια όπου ο ιός HPV ανιχνεύθηκε μονάχα στη γυναίκα σύντροφο, το ποσοστό γονιμοποίησης ήταν 85%. Την 3η ημέρα, το ποσοστό στασιμότητας των εμβρύων ήταν 31%, ενώ το 39% των εμβρύων ήταν A, το 41% B, το 15% C και το 5% D.

Στα 13 ζευγάρια όπου ο ιός HPV ανιχνεύθηκε μονάχα στον άνδρα σύντροφο, το ποσοστό γονιμοποίησης ήταν 81%. Την 3η ημέρα, το ποσοστό στασιμότητας των εμβρύων ήταν 67%, ενώ το 26% των εμβρύων ήταν A, το 29% B, το 31% C και το 14% D.

Ζευγάρια		Ιός HPV	Ποσοστό Γονιμοποίησης
Γυναίκες	Άνδρες		
HPV -	HPV -	215	89%
HPV +	HPV +	42	81%
HPV +	HPV -	35	85%
HPV -	HPV +	13	81%

Σύνολο	305	
---------------	-----	--

Πίνακας 8: Το ποσοστό της γονιμοποίησης των ωαρίων στο σύνολο των ζευγαριών.

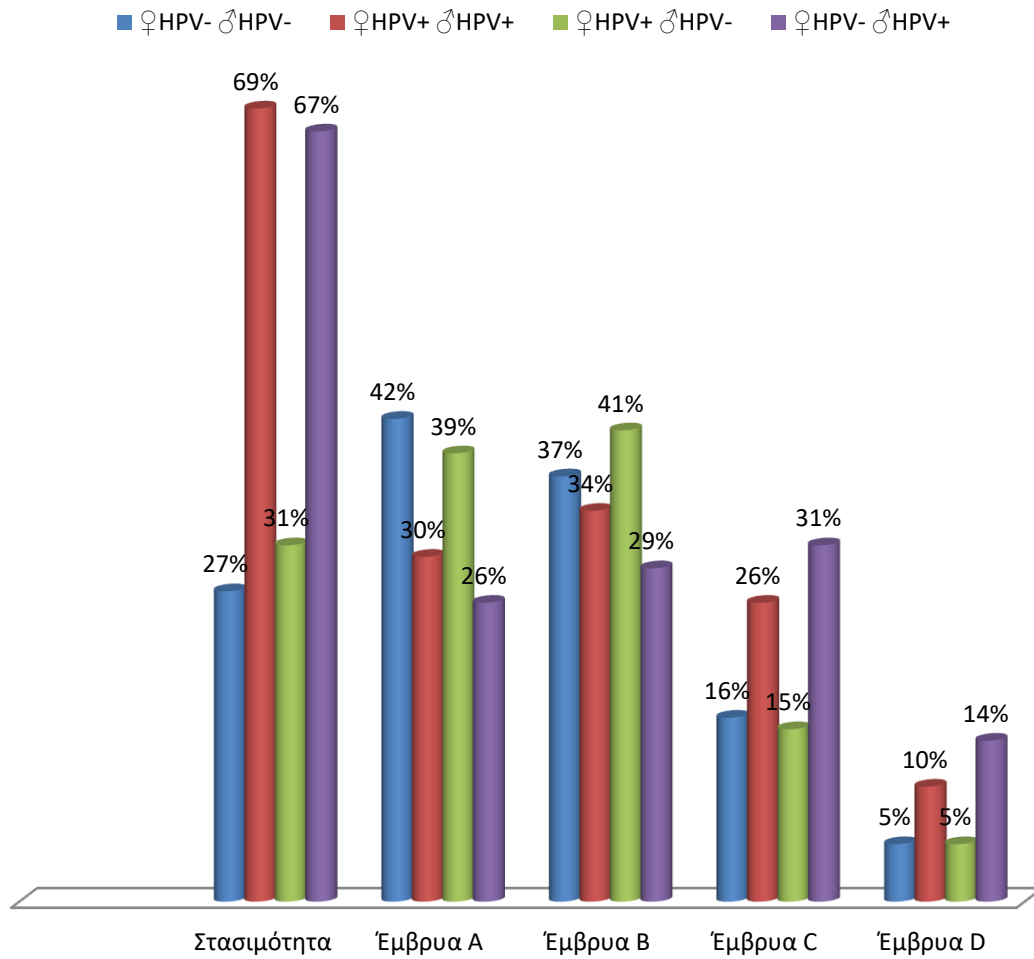


Γράφημα 20: Το ποσοστό της γονιμοποίησης των ωαρίων στο σύνολο των ζευγαριών.

Ζευγάρια		Ιός HPV	Έμβρυα				
Γυναίκες	Άνδρες		Ποσοστό Στασιμότητας	A	B	C	D
HPV -	HPV -	215	27%	42%	37%	16%	5%
HPV +	HPV +	42	69%	30%	34%	26%	10%
HPV +	HPV -	35	31%	39%	41%	15%	5%
HPV -	HPV +	13	67%	26%	29%	31%	14%
Σύνολο		305					

Πίνακας 9: Η αξιολόγηση της ποιότητας των εμβρύων στο σύνολο των ζευγαριών.

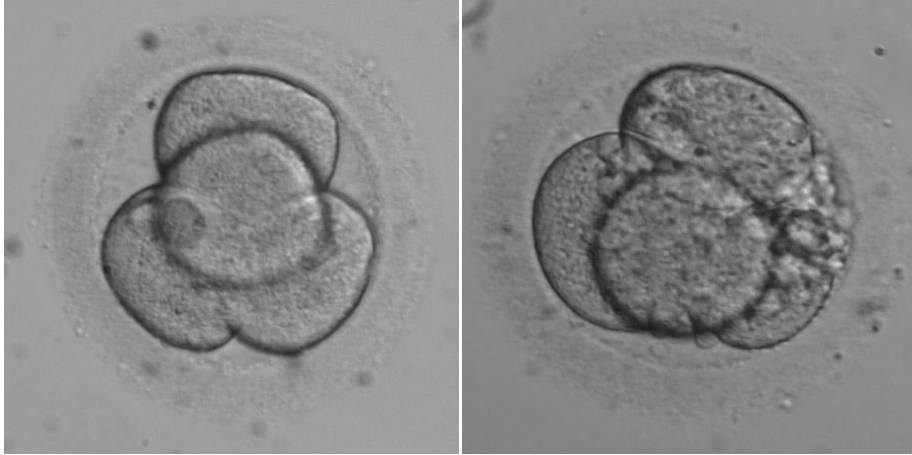
Ζευγάρια



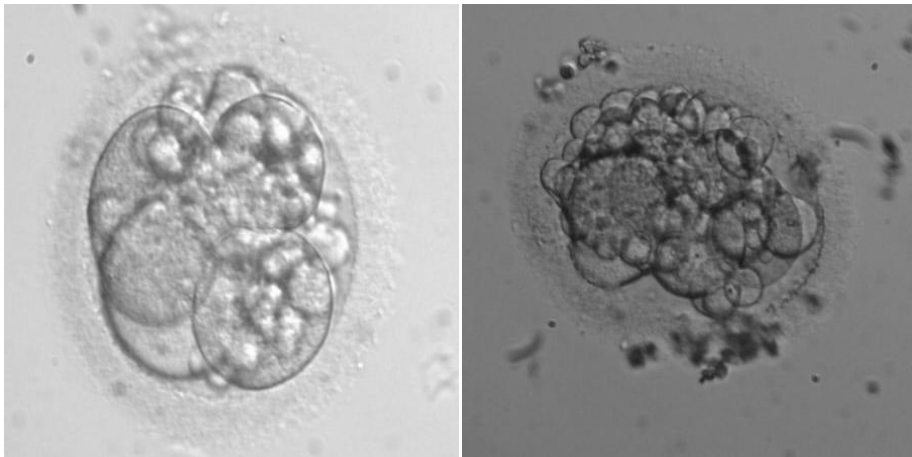
Γράφημα 21: Η αξιολόγηση της ποιότητας των εμβρύων στο σύνολο των ζευγαριών.



Εικόνα 4: Η αξιολόγηση των εμβρύων 2ης ημέρας: έμβρυα 2A, 2B, 2C.



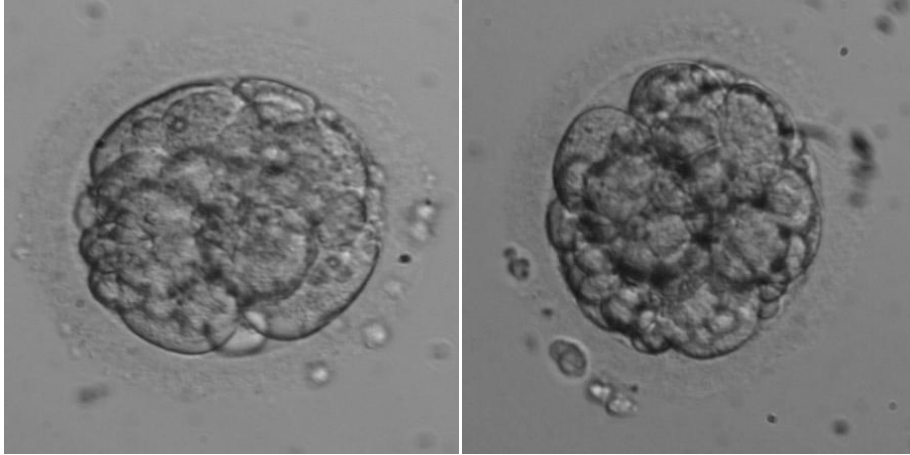
Εικόνα 5: Η αξιολόγηση των εμβρύων 2ης ημέρας: έμβρυα 4A, 4B.



Εικόνα 6: Η αξιολόγηση των εμβρύων 2ης ημέρας: έμβρυα 4C, 4D.



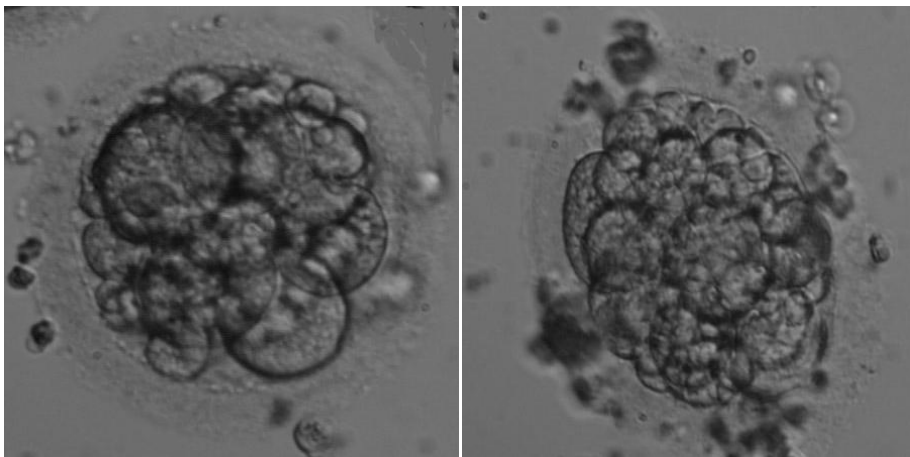
Εικόνα 7: Η αξιολόγηση των εμβρύων 3ης ημέρας: έμβρυα 6A, 6B.



Εικόνα 8: Η αξιολόγηση των εμβρύων 3ης ημέρας: έμβρυα 6C, 6D.



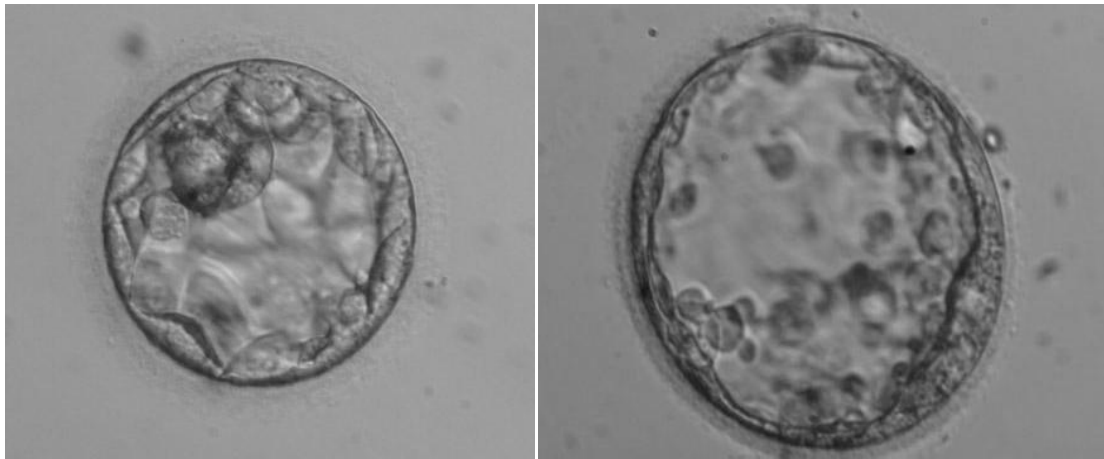
Εικόνα 9: Η αξιολόγηση των εμβρύων 3ης ημέρας: έμβρυα 8A, 8B.



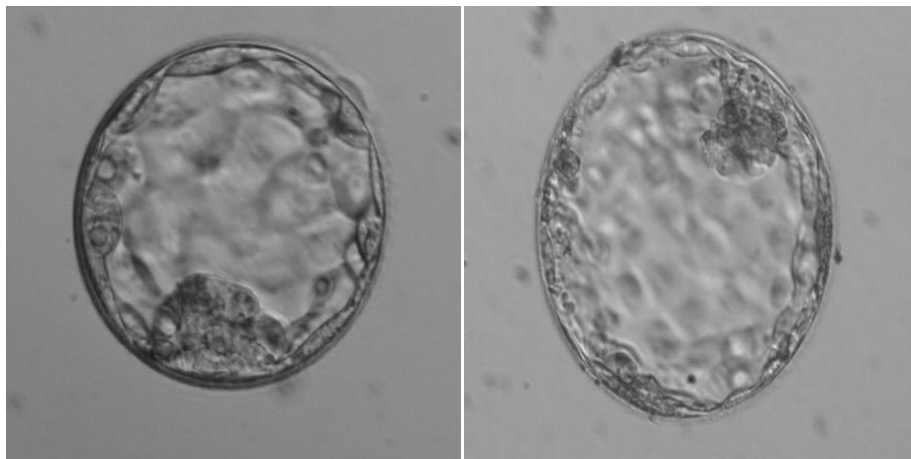
Εικόνα 10: Η αξιολόγηση των εμβρύων 3ης ημέρας: έμβρυα 8C, 8D.



Εικόνα 11: Η αξιολόγηση των εμβρύων 4ης ημέρας: μορίδιο.



Εικόνα 12: Η αξιολόγηση των εμβρύων 5-6ης ημέρας: βλαστοκύστη 3AA, 4CC.



Εικόνα 13: Η αξιολόγηση των εμβρύων 5-6ης ημέρας: βλαστοκύστη 3AB, 4BC.

4. Συζήτηση

4.1. Παρουσία HPV σε Υπογόνιμα Ζευγάρια

Η λοίμωξη από τον ιό του ανθρώπινου θηλώματος HPV αποτελεί τη συνηθέστερη σεξουαλικά μεταδιδόμενη νόσο στις γυναίκες και στους άνδρες παγκοσμίως (210). Οι ιοί HPV υψηλού κινδύνου ορίζονται ως ογκογόνοι λόγω της συσχέτισής τους με διάφορα νεοπλάσματα (211), (25), ενώ οι ιοί HPV χαμηλού κινδύνου σχετίζονται σπάνια με κακοήθειες και προκαλούν κυρίως υποκλινικές λοιμώξεις ή καλοήγη θηλώματα, τα οποία εμμένουν για μήνες ή χρόνια, ώσπου να αντιμετωπισθούν από το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή (25). Συνολικά στους άνδρες και στις γυναίκες, ο επιπολασμός της HPV λοίμωξης κυμαίνεται περίπου στο 40% του γενικού πληθυσμού, με παραλλαγές που βασίζονται στον τύπο του ιού HPV και στην ανατομική θέση της λοίμωξης (210).

Ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας, η σημαντικότερη κλινική συνέπεια της λοίμωξης από τους ιούς HPV υψηλού κινδύνου, παραμένει μία από τις κύριες αιτίες καρκινοσχετιζόμενης θνησιμότητας στις γυναίκες παγκοσμίως. Συνεπώς, τις δύο τελευταίες δεκαετίες, διεξήχθησαν αρκετές προσπάθειες ώστε να κατανοηθεί η παθογένεια και οι μοριακοί μηχανισμοί που διέπουν την HPV λοίμωξη και την καρκινική πρόοδο (25), ενώ αναπτύχθηκαν τόσο προγράμματα διαλογής (τεστ Παπανικολάου, HPV DNA τεστ) όσο και παρεμβάσεις (HPV εμβολιασμός) για τον περιορισμό της συνδεόμενης με τον ιό νόσου στις γυναίκες (212), (213), (25), (210), (214), (215). Δυστυχώς, οι άνδρες συμπεριλήφθησαν αμελητέα στα συγκεκριμένα προγράμματα, καθώς η αναλογία των πασχουσών από HPV συνδεόμενες ασθένειες γυναικών αποδεικνύεται σαφώς επικρατέστερη των ανδρών. Όσον αφορά τον ανδρικό πληθυσμό, εκτιμάται ότι οι HPV σχετιζόμενοι καρκίνοι στο πέος, στον πρωκτό και στο στοματοφάρυγγα σπανίζουν στους άνδρες, εμφανιζόμενοι περίπου σε 1-6/100.000 στο γενικό πληθυσμό (216).

Στην Ευρώπη, ο επιπολασμός της HPV λοίμωξης στο γυναικείο πληθυσμό υπολογίζεται γύρω στο 8,8%. Στις γυναίκες διατίθενται επίσης δεδομένα σχετικά με την κάθαρση των ιών HPV υψηλού κινδύνου, καθώς περίπου το 50% των ασθενών δεν παρουσιάζουν πλέον στοιχεία μόλυνσης σε 6 μήνες, ενώ το ποσοστό προσεγγίζει το 90% σε 3 χρόνια (210). Γενικώς, η HPV λοίμωξη στους άνδρες σχετίζεται με τα γεννητικά κονδυλώματα, τους καρκίνους του πρωκτού και του πέους, τα

καρκινώματα της κεφαλής και του τραχήλου και την υποτροπιάζουσα αναπνευστική θηλωμάτωση (217). Υψηλός επιπολασμός του ιού HPV, κυμαινόμενος μεταξύ 50 και 70%, περιγράφεται στο πέος, στο σπέρμα, καθώς και σε περιοχές του πρωκτού (217). Συγκεκριμένα, ο επιπολασμός της μόλυνσης στους άνδρες δε διαφέρει σημαντικά μεταξύ των ηλικιακών ομάδων, όπως συμβαίνει στις γυναίκες, η πιθανότητα απόκτησης ιών HPV χαμηλού κινδύνου φαίνεται παραπλήσια της πιθανότητας απόκτησης ιών HPV υψηλού κινδύνου (47,9% για HR έναντι 46,6% για LR) και η μέση κάθαρση εκτιμάται σε 5,9 μήνες (95% CI: 5,7-6,1) (217).

Στην παρούσα μελέτη, ο ιός HPV παρουσιάστηκε συνολικά σε ποσοστό 29,6% στα υπογόνιμα ζευγάρια, και στους δύο συντρόφους σε ποσοστό 13,8%, μονάχα στη γυναίκα σύντροφο σε ποσοστό 11,5% και μονάχα στον άνδρα σύντροφο σε ποσοστό 4,3%. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει το σημαντικό επιπολασμό του ιού HPV στον υπογόνιμο πληθυσμό, μα και τη δυνατότητα ύπαρξής του μονάχα σε έναν από τους δύο συντρόφους, τόσο λόγω της πιθανής αδυναμίας μετάδοσης του ιού εξαιτίας του περιορισμένου ιϊκού φορτίου, όσο και λόγω της ενδεχόμενης κάθαρσης του ιού.

Ο ιός HPV εντοπίστηκε σε ποσοστό 25,2% στα 305 συνολικά κολποτραχηλικά δείγματα των ασυμπτωματικών, τεστ Pap αρνητικών, μη εμβολιασμένων γυναικών. Οι τύποι HPV χαμηλού κινδύνου εντοπίστηκαν στο 19,5% και οι τύποι HPV υψηλού κινδύνου στο 91,0% των θετικών κολποτραχηλικών δειγμάτων, ενώ στο 9,1% εντοπίστηκαν μόνο τύποι HPV χαμηλού κινδύνου, στο 80,5% μόνο τύποι HPV υψηλού κινδύνου και στο 10,4% τύποι HPV χαμηλού κινδύνου μαζί με HPV υψηλού κινδύνου.

Στις γυναίκες, ο τύπος υψηλού κινδύνου HPV 31 χαρακτηρίστηκε ως ο πιο συχνός ιός (31,2%), ενώ ακολούθησαν ο HPV 16, ο HPV 11, ο HPV 45, ο HPV 6, ο HPV 18, ο HPV 59, ο HPV 58, ο HPV 33, ο HPV 56, ο HPV 68, ο HPV 66, ο HPV 35, ο HPV 51, ο HPV 52 και ο HPV 39. Στα θετικά κολποτραχηλικά δείγματα, εντοπίστηκε μονή προσβολή από έναν ιό HPV σε ποσοστό 59,7%, διπλή προσβολή από 2 ιούς HPV σε ποσοστό 31,2% και πολλαπλή προσβολή από 3 ιούς HPV σε ποσοστό 9,1%.

Ο ιός HPV εντοπίστηκε σε ποσοστό 18,0% στα 305 συνολικά δείγματα σπέρματος των ασυμπτωματικών ανδρών. Οι τύποι HPV χαμηλού κινδύνου εντοπίστηκαν στο 9,1% και οι τύποι HPV υψηλού κινδύνου στο 93,0% των θετικών δειγμάτων σπέρματος, ενώ στο 7,3% εντοπίστηκαν μόνο τύποι HPV χαμηλού κινδύνου, στο

90,9% μόνο τύποι HPV υψηλού κινδύνου και στο 1,8% τύποι HPV χαμηλού κινδύνου μαζί με HPV υψηλού κινδύνου.

Ο τύπος υψηλού κινδύνου HPV 31 χαρακτηρίστηκε ως ο πιο συχνός ιός (31,0%), ενώ ακολούθησαν ο HPV 16, ο HPV 33, ο HPV 45, ο HPV 6, ο HPV 11, ο HPV 18, ο HPV 59, ο HPV 51, ο HPV 35, ο HPV 68, ο HPV 66, ο HPV 39, ο HPV 56, ο HPV 52 και ο HPV 58. Στα θετικά δείγματα σπέρματος εντοπίστηκε μονή προσβολή από έναν ιό HPV σε ποσοστό 72,7%, διπλή προσβολή από 2 ιούς HPV σε ποσοστό 21,8% και πολλαπλή προσβολή από 3 ιούς HPV σε ποσοστό 5,5%.

Ο ενισχυμένος επιπολασμός του ιού HPV, και μάλιστα των τύπων υψηλού κινδύνου, τόσο στα ζευγάρια συνολικά, όσο και στις γυναίκες και στους άνδρες ξεχωριστά, είναι αξιοσημείωτος, δεδομένης της πλήρους απουσίας συμπτωματολογίας στο γεννητικό σύστημα των ατόμων. Ειδικότερα, παρότι οι γυναίκες ήταν στο σύνολό τους τεστ Pap αρνητικές, είναι απαραίτητο να σημειωθεί πως το 15-30% του δεδομένου ελέγχου αφορά ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα. Στην Ελλάδα δεν έχει καθιερωθεί οργανωμένο, αλλά ευκαιριακό πρόγραμμα προληπτικού ελέγχου και διαλογής, δεν έχουν συνταχθεί επίσημες εθνικές κατευθυντήριες οδηγίες, ενώ ως μέθοδος πρωταρχικού προσυμπτωματικού ελέγχου προτείνεται το τεστ Παπανικολάου ή και ο συνδυασμός του τεστ Παπανικολάου και του HPV DNA τεστ.

Ο τύπος HPV 31 αποτελεί το συχνότερα εμφανιζόμενο ιό και στις γυναίκες και στους άνδρες, με παραπλήσιο ποσοστό εύρεσης. Στις γυναίκες ακολουθούν οι τύποι HPV 16 και HPV 11, ενώ στους άνδρες οι τύποι HPV 16 και HPV 33. Η ταυτόχρονη παρουσία παραπάνω του ενός τύπων του ιού HPV, είτε χαμηλού είτε υψηλού κινδύνου, τόσο στα κολποτραχηλικά δείγματα των γυναικών, όσο και στα δείγματα σπέρματος των ανδρών, υποδηλώνει συνέργεια ανάμεσα τους, χωρίς ωστόσο να διευκρινίζεται η συχνότερη συνύπαρξη κάποιων δεδομένων συνδυασμών μεταξύ τους.

Στην παρούσα μελέτη, ο συμμετέχων ανδρικός και γυναικείος πληθυσμός αποτελούνταν από μη εμβολιασμένα άτομα. Ωστόσο, όσον αφορά την εφαρμογή του εμβολιασμού με το εννεαδύναμο πλέον εμβόλιο έναντι του ιού HPV (HPV 6, HPV 11, HPV 16, HPV 18, HPV 31, HPV 33, HPV 45, HPV 52, HPV 58), και στις γυναίκες και στους άνδρες, αξίζει να τονισθεί η αναγκαιότητα συνεχούς επιδημιολογικής παρατήρησης των κυκλοφορούντων τύπων HPV και η καταγραφή

της κατανομής τους, εξαιτίας της ενδεχόμενης καταστολής των τύπων του εμβολίου και της πιθανής ανάδυσης διαφορετικών τύπων, τόσο χαμηλού όσο και υψηλού κινδύνου.

4.2. Παρουσία HPV και Ανδρική Υπογονιμότητα

Η σχέση της παρουσίας του ιού HPV και της ανδρικής υπογονιμότητας εξετάζεται λόγω της ανίχνευσής του στο σπέρμα, όπου ο ιός ανευρίσκεται τόσο στα απολεπισμένα κύτταρα όσο και στα σπερματοζώαρια. Οι πρόσφατες ενδείξεις καταδεικνύουν μία πιθανή συσχέτιση μεταξύ της HPV μόλυνσης του σπέρματος και των περιπτώσεων ιδιοπαθούς ασθενοζωοσπερμίας και ανεξήγητης ανδρικής υπογονιμότητας (175), (167), (169), (168), (173), (174), (164), (171), (218), (166), (154), (219), (170), (201), (156). Τα ευρήματα εγείρουν ιδιαίτερες ανησυχίες σχετικά με το ρόλο της παρουσίας του ιού HPV στο σπέρμα, προπαντός στα ζευγάρια που υφίστανται τεχνικές υποβοηθούμενης αναπαραγωγής λόγω ιδιοπαθούς υπογονιμότητας και στους άνδρες που υποβάλλονται σε κρυοσυντήρηση σε τράπεζα σπέρματος για τη διατήρηση της γονιμότητάς τους (218).

Αρχικά, οι Chan et al. 1994 απέδειξαν την παρουσία του ιού HPV στα κύτταρα του σπέρματος σε δείγματα ανδρών με ιδιοπαθή υπογονιμότητα. Οι ερευνητές διαπίστωσαν ότι το 35,7% των δειγμάτων σπέρματος που αναλύθηκαν περιείχαν γονιδιωματικές αλληλουχίες του ιού HPV (175). Ο υψηλός επιπολασμός του ιού HPV στα σπερματοζώαρια επιβεβαιώθηκε ακολούθως από διάφορους ερευνητές (167), (174), (164), (171), (166), (219).

Η μελέτη των Yang et al. 2013, εντόπισε επιπολασμό του ιού HPV στο σπέρμα 12,48% σε άνδρες από το γενικό πληθυσμό και 6,7% σε επιβεβαιωμένα γόνιμους άνδρες. Μεταξύ των ιδιοπαθώς υπογόνιμων ανδρών, το 17,4% ήταν HPV θετικοί στο σπέρμα, με σημαντικά υψηλότερο ποσοστό μόλυνσης συγκριτικά με τους μάρτυρες (220). Οι Kaspersen et al. 2011, αναλύοντας τον επιπολασμό της HPV μόλυνσης του σπέρματος μεταξύ υγιών δοτών σπέρματος, εντόπισαν 16% επιπολασμό του ιού HPV (209).

Οι Foresta et al. 2010 σε μία ομάδα ατόμων (με γεννητικά κονδυλώματα, με HPV θετικές συντρόφους, υπογόνιμους ασθενείς και γόνιμους υγιείς μάρτυρες), εντόπισαν 2,2% επιπολασμό του ιού HPV στο σπέρμα των γόνιμων μαρτύρων. Οι ερευνητές εντόπισαν επίσης 10,2% επιπολασμό της HPV μόλυνσης του σπέρματος στους ιδιοπαθώς υπογόνιμους άνδρες. Επιπλέον, ανίχνευσαν την παρουσία του ιού HPV στη

σπερματική επιφάνεια στο 72% των υπογόνιμων ασθενών (171). Παράλληλα, οι Perino et al. 2011 σε υπογόνιμα ζευγάρια που υποβλήθηκαν σε κύκλους τεχνικών υποβοηθούμενης αναπαραγωγής, εντόπισαν ότι το σπέρμα των ανδρών συντρόφων ήταν HPV θετικό στο 9,5% των ζευγαριών (196). Επιπροσθέτως, οι Schillaci et al. 2013 σε ιδιοπαθώς υπογόνιμους άνδρες, εντόπισαν 7,8% επιπολασμό του ιού HPV στο σπέρμα (156).

Συνολικά, ο επιπολασμός του ιού HPV στο σπέρμα εκτιμάται σε περίπου 10% στους άνδρες από το γενικό πληθυσμό και ακόμη και σε 16% στους άνδρες με ανεξήγητη υπογονιμότητα (221). Ο επιπολασμός της ανίχνευσης του ιού HPV στο σπέρμα στο γενικό πληθυσμό κυμαίνεται από 2% έως 31% (158), (222), (223), (161), (164), (171), (209), (224), (170), (201), (220), ενώ ο επιπολασμός του ιού HPV στο σπέρμα μεταξύ των ανδρών με ανεξήγητη υπογονιμότητα κυμαίνεται από 10% έως 35,7% (175), (225), (171), (166), (196), (226), (156), (220). Γενικώς, αξιολογώντας τον επιπολασμό του ιού στους άνδρες με ιδιοπαθή υπογονιμότητα αναφέρονται υψηλότερα ποσοστά μόλυνσης σε σύγκριση με τους γόνιμους μάρτυρες.

Στην παρούσα μελέτη, ο ιός HPV εντοπίστηκε σε ποσοστό 18,0% στα συνολικά δείγματα σπέρματος των ανδρών, οι οποίοι υποβλήθηκαν σε τεχνικές υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Τα δείγματα κατηγοριοποιήθηκαν με βάση το σπερμοδιάγραμμα σε νορμοζωοσπερμικά (19,7%) και παθολογικά (80,3%). Ο ιός HPV εντοπίστηκε στο 8,3% των νορμοζωοσπερμικών δειγμάτων σπέρματος και στο 20,4% των συνολικών παθολογικών δειγμάτων σπέρματος, γεγονός το οποίο επισημαίνει την ενισχυμένη επικράτησή του στον υπογόνιμο ανδρικό πληθυσμό.

4.2.1. Παρουσία HPV και Παράμετροι Σπέρματος

Οι συνέπειες που αποδόθηκαν στην ανίχνευση του ιού HPV στη σπερματική επιφάνεια αναλύθηκαν πρωτίστως από τους Lai et al. 1997, οι οποίοι απέδειξαν σε μία *in vivo* κλινική μελέτη, ότι η συχνότητα εμφάνισης της ασθενοζωοσπερμίας στους ασθενείς με μόλυνση του σπέρματος από τους ιούς HPV 16 και HPV 18 ήταν σημαντικά υψηλότερη σε σύγκριση με τους μη μολυσμένους μάρτυρες (75% έναντι 8%) (167).

Οι Lee et al. 2002 εντόπισαν ότι τα σπερματοζωάρια που επωάσθηκαν για 24 ώρες με θραύσματα DNA από τους τύπους HPV 6/11, 16, 18, 31 ή 33 εμφάνισαν μειωμένη προωθητική κινητικότητα και ελαττωμένη πλευρική μετατόπιση κεφαλής, ιδίως μετά την έκθεση στον ιό HPV 16 και στους τύπους HPV χαμηλού κινδύνου (173).

Τα αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν ακολούθως σε διάφορες *in vivo* μελέτες από τους Foresta et al. και τους Garolla et al. Το 2010, αξιολογώντας μία ομάδα ανδρών δοτών σπέρματος, οι Foresta et al. 2010 παρατήρησαν σημαντική ελάττωση της κινητικότητας των σπερματοζωαρίων στους ασθενείς με DNA του ιού HPV στο σπέρμα, ανεξάρτητα από το γενότυπο του ιού HPV που ανιχνεύθηκε (164). Το 2010 επίσης, οι Foresta et al. 2010 επιβεβαίωσαν το αποτέλεσμα σε μία διαφορετική ομάδα ατόμων (με γεννητικά κονδυλώματα, με HPV θετικές συντρόφους, υπογόνιμων ασθενών και γόνιμων μαρτύρων), παρόλο που δεν εντοπίστηκαν διαφορές μεταξύ των άλλων παραμέτρων του σπέρματος (171). Επιπλέον, οι Garolla et al. 2012, 2013 επιβεβαίωσαν τα ευρήματα σε δύο μελέτες. Οι συγκεκριμένες μελέτες κατέδειξαν σημαντική ελάττωση της μέσης προωθητικής κινητικότητας των σπερματοζωαρίων στα δείγματα σπέρματος των μολυσμένων υπογόνιμων ασθενών έναντι και των μαρτύρων και των μη μολυσμένων υπογόνιμων ασθενών (170), (201). Επίσης, οι Yang et al. 2013 επιβεβαίωσαν τη σημαντική ελάττωση της προωθητικής κινητικότητας καθώς και της φυσιολογικής μορφολογίας στους HPV θετικούς άνδρες σε σύγκριση με τους αρνητικούς μάρτυρες. Η προωθητική κινητικότητα ήταν $20,55 \pm 10,44\%$ μεταξύ των HPV θετικών υπογόνιμων ανδρών έναντι $29,11\% \pm 13,66\%$ μεταξύ των HPV αρνητικών υπογόνιμων ανδρών. Όσον αφορά τα άτομα ελέγχου, η προωθητική κινητικότητα ήταν $32,25 \pm 10,00\%$ στους HPV θετικούς γόνιμους άνδρες έναντι $39,22 \pm 12,15\%$ στους HPV αρνητικούς γόνιμους άνδρες. Παρόμοια τάση παρατηρήθηκε και για τη μορφολογία των σπερματοζωαρίων (220). Ωστόσο, τα αποτελέσματα δεν επιβεβαιώθηκαν από τέσσερις μελέτες. Οι Brossfield et al. 1999, σε μία πειραματική *in vitro* μελέτη, διαπίστωσαν ότι σπερματοζωάρια διαμολυσμένα με θραύσματα DNA του γονιδίου L1 του ιού HPV εμφάνισαν υψηλότερα ποσοστά συνολικής προωθητικής κινητικότητας συγκρινόμενα με τους μάρτυρες (169). Αναλόγως, οι Connelly et al. 2001 σε μία πειραματική *in vitro* μελέτη, διαπίστωσαν ότι σπερματοζωάρια επωασμένα με θραύσματα DNA του ιού HPV που κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες E6/E7 των τύπων HPV 16, 18, 31, 33, 6/11, εμφάνισαν υψηλότερο ποσοστό κινητικότητας εκτός από τους τύπους 6/11, χαμηλότερο εύρος μετατόπισης

της κεφαλής μετά από έκθεση στους τύπους 16 και 6/11 και αυξημένη γραμμικότητα των σπερματοζωαρίων μετά από έκθεση σε όλους τους τύπους HPV εκτός από τον τύπο 18 (168). Οι Rintala et al. 2004, αναλύοντας τις σπερματικές παραμέτρους δοτών σπέρματος (15,5% θετικών για HR-HPV και 17% θετικών για LR-HPV), δεν ανέφεραν HPV σχετιζόμενες επιδράσεις στην κινητικότητα και στη συγκέντρωση των σπερματοζωαρίων, εκτός από μεταβολές του pH στο σπέρμα, με οριακή σημασία (174). Τέλος, οι Schillaci et al. 1999 σε μία ομάδα ανδρών συντρόφων ζευγαριών που υποβλήθηκαν σε τεχνικές υποβοηθούμενης αναπαραγωγής, δεν εντόπισαν καμία μεταβολή των παραμέτρων του σπέρματος σχετιζόμενη με την ανίχνευση του ιού HPV (156).

Στην παρούσα μελέτη, τα 305 συνολικά δείγματα σπέρματος των ανδρών κατηγοριοποιήθηκαν με βάση το σπερμοδιάγραμμα, σε νορμοζωοσπερμικά (19,7%) και παθολογικά, όπως αζωοσπερμικά, ολιγοζωοσπερμικά, ασθενοζωοσπερμικά, τερατοζωοσπερμικά, ολιγοασθενοζωοσπερμικά, ολιγοτερατοζωοσπερμικά, ασθενοτερατοζωοσπερμικά και ολιγοασθενοτερατοζωοσπερμικά (80,3%). Ο ιός HPV εντοπίστηκε σε ποσοστό 8,3% στα νορμοζωοσπερμικά δείγματα σπέρματος και σε ποσοστό 20,4% στα συνολικά παθολογικά δείγματα σπέρματος, με στατιστικά σημαντική συσχέτιση ($P=0,0086$). Ο ιός HPV δεν εντοπίστηκε σε κανένα αζωοσπερμικό δείγμα, πιθανώς λόγω απουσίας σπερματοζωαρίων, εντοπίστηκε ωστόσο στο 7,5% των ολιγοζωοσπερμικών δειγμάτων και στο 53,6% των ασθενοζωοσπερμικών δειγμάτων, και μάλιστα με εξαιρετικά στατιστικά σημαντική συσχέτιση ($P=0,0001$) σε σχέση με τα υπόλοιπα παθολογικά δείγματα σπέρματος, γεγονός που υποδηλώνει την επίπτωση της παρουσίας του ιού στην κινητικότητα των σπερματοζωαρίων. Ο ιός δεν εντοπίστηκε σε κανένα τερατοζωοσπερμικό δείγμα, ενώ εντοπίστηκε στο 10,3% των δειγμάτων με παθολογικό σπερματικό πλάσμα (χροιά, ιξώδες, ρευστοποίηση, όγκος) και/ή συγκολλήσεις και/ή λευκά αιμοσφαίρια. Στα ολιγοασθενοζωοσπερμικά και ολιγοασθενοτερατοζωοσπερμικά δείγματα σπέρματος, ο ιός HPV εντοπίστηκε σε αρκετά σημαντικό ποσοστό, 23,3% και 17,0% αντίστοιχα, ενώ δεν εντοπίστηκε σε κανένα ολιγοτερατοζωοσπερμικό και ασθενοτερατοζωοσπερμικό δείγμα. Συνολικά, ο ιός HPV επιδρά ενδεχομένως στην κινητικότητα των σπερματοζωαρίων, ενώ δεν επηρεάζει τις υπόλοιπες παραμέτρους του σπέρματος, τον αριθμό, τη συγκέντρωση και τη μορφολογία των σπερματοζωαρίων.

4.2.2. Παρουσία HPV και Κατακερματισμός DNA Σπερματοζωαρίων

Ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο ο ιός HPV επηρεάζει την κινητικότητα των σπερματοζωαρίων αναλύθηκε μόνο σε τέσσερις μελέτες. Οι Garolla et al. δε διαπίστωσαν αυξημένη ανευπλοειδία των σπερματοζωαρίων σχετιζόμενη με τον ιό HPV στους μολυσμένους υπογόνιμους ασθενείς, αλλά δύο μελέτες εντόπισαν αυξημένο κατακερματισμό του DNA στα μολυσμένα σπερματοζωάρια (168), (173), (187). Οι Connolly et al. 2001, σε μία *in vitro* μελέτη εκτίμησης του κατακερματισμού του DNA των σπερματοζωαρίων, διαπίστωσαν σημαντική αύξηση των αποπτωτικών φαινομένων σε σπερματοζωάρια εκτεθειμένα στους τύπους HPV 16 και 31 (168). Επίσης, οι Lee et al. 2002 εκτέλεσαν μία *in vitro* μελέτη επωάζοντας τα κύτταρα του σπέρματος με το DNA του ιού HPV που κωδικοποιεί για τις πρωτεΐνες E6 και E7. Οι ερευνητές εντόπισαν αυξημένο κατακερματισμό του DNA των σπερματοζωαρίων, ιδιαίτερα στα δείγματα με χαμηλότερη προωθητική κινητικότητα (173). Αντίθετα, *in vivo* ενδείξεις από τους Kaspersen et al. 2013 σε δείγματα δοτών σπέρματος δεν ανέφεραν αυξημένο κατακερματισμό του DNA στα HPV θετικά δείγματα (227).

Στην παρούσα μελέτη, τα 298 συνολικά δείγματα σπέρματος των ανδρών κατηγοριοποιήθηκαν με βάση τη διασπορά χρωματίνης σπέρματος, σε δείγματα με σπερματοζωάρια χωρίς κατακερματισμό (73,5%) και με κατακερματισμό (26,5%). Ο ιός HPV εντοπίστηκε σε ποσοστό 10,0% στα δείγματα σπέρματος χωρίς κατακερματισμό του DNA των σπερματοζωαρίων και σε ποσοστό 41,8% στα δείγματα σπέρματος με κατακερματισμό του DNA των σπερματοζωαρίων, με εξαιρετικά στατιστικά σημαντική συσχέτιση ($P < 0,0001$). Το γεγονός αυτό, υποδηλώνει την επίπτωση της παρουσίας του ιού στον κατακερματισμό του DNA των σπερματοζωαρίων, καθώς η θραύση των χρωμοσωμάτων στα HPV προσβεβλημένα κύτταρα ίσως ενισχύει την ευπάθεια των κυττάρων σε βλάβες του DNA ή την ελαττωματική επιδιόρθωση των βλαβών του DNA, ως συνέπεια της περιορισμένης λειτουργίας των πρωτεϊνών p53 και pRb. Ενδεχομένως, ο κατακερματισμός του DNA των σπερματοζωαρίων και η κινητικότητα των σπερματοζωαρίων συσχετίζονται με συνδετικό κρίκο τα μιτοχόνδρια, τα οποία συμμετέχουν στην κινητικότητα, ενώ υφίστανται επίσης κατακερματισμό μέσω του μηχανισμού του οξειδωτικού στρες.

Αναφορικά λοιπόν με την πιθανή κλινική διαχείριση των ζευγαριών, θα μπορούσε ενδεχομένως βάσει των δεδομένων ενδείξεων να προτείνεται ο έλεγχος του άνδρα συντρόφου για την παρουσία του ιού HPV στις περιπτώσεις άνδρα με ιδιοπαθή ασθενοζωοσπερμία, ανεξήγητης υπογονιμότητας του ζευγαριού (μη συνδεόμενης με γνωστά ανδρικά ή γυναικεία προβλήματα), θετικού ιατρικού ιστορικού HPV σχετιζόμενων νόσων και ενδείξεων HPV συνεχιζόμενης λοίμωξης, ιδιαίτερα σε όσους υποβάλλονται σε κρυοσυντήρηση σε τράπεζα σπέρματος και σε κύκλους τεχνικών υποβοηθούμενης αναπαραγωγής.

Φυσικά, ο επικείμενος εμβολιασμός και των ανδρών αναμένεται να συνεισφέρει ευεργετικά, καθώς ήδη θεωρείται πως ο προφυλακτικός εμβολιασμός των υπογόνιμων ασθενών με μόλυνση του σπέρματος από τον ιό HPV, βελτιώνει τις αναπαραγωγικές εκβάσεις (228).

4.3. Παρουσία HPV και Έμβρυα

Διάφορες *in vitro* πειραματικές μελέτες προτείνουν ότι ο ιός HPV ενδεχομένως επηρεάζει αρνητικά την πρόιμη εμβρυική ανάπτυξη και τη διεισδυτικότητα των τροφοβλαστικών κυττάρων, προκαλώντας πιθανώς ελάττωση της επιτυχίας της εμφύτευσης και του ποσοστού της κύησης (229), (179), (181), (230), (231), (183), (232), (233), (187). Συνολικά, τα δεδομένα, αν και δεν αποδεικνύονται ακόμη σαφώς από μακροχρόνιες προοπτικές *in vivo* μελέτες (188), (196), (234), (190), (235), υποδεικνύουν ένα πιθανό ρόλο του ιού HPV στις μειωμένες εκβάσεις γονιμότητας των ανδρών και των ζευγαριών, ιδιαίτερα στην περίπτωση της ανίχνευσης του ιού HPV στα σπερματοζώαρια.

Από την ανάλυση της βιβλιογραφίας, προέκυψε ότι το DNA του ιού HPV δεν ανιχνεύεται μέσα στον πυρήνα του σπερματοζωαρίου, είτε στην επισωματική είτε στην ενσωματωμένη μορφή, αλλά εντοπίζεται γενικώς στην επιφάνεια του σπερματοζωαρίου δεσμεύοντας διακριτές θέσεις κατά μήκος της ισημερινής περιοχής της κεφαλής του σπερματοζωαρίου μέσω μίας σύνδεσης ανάμεσα στην L1 και στη Sydecan-1 (μία ευρέως εκφραζόμενη μεμβρανοδεσμευτική πρωτεογλυκάνη) (163), (166). Οι Foresta et al. 2011 ανέφεραν ότι τα σπερματοζώαρια, μολυσμένα με τον ιό HPV *in vitro*, διαθέτουν χαμηλότερη ικανότητα διείσδυσης στα ωοκύτταρα συγκρινόμενα με τα μη μολυσμένα σπερματοζώαρια. Στην ίδια μελέτη, οι ερευνητές απέδειξαν μέσω του HEPT ότι τα μολυσμένα σπερματοζώαρια είναι ικανά να μεταφέρουν τόσο την καψιδιακή πρωτεΐνη L1 όσο και τα ιϊκά γονίδια E6/E7 στα ωοκύτταρα με επακόλουθη γονιδιακή έκφραση από τη γονιμοποιημένη βλαστοκύστη (166).

Οι *in vitro* ενδείξεις υποδεικνύουν ότι όταν ο ιός HPV προσδένεται στα σπερματοζώαρια μεταφέρεται ενδεχομένως στα γονιμοποιημένα ωοκύτταρα, στις βλαστοκύστες και στα τροφοβλαστικά κύτταρα. Συγκεκριμένα, η παρουσία του ιού HPV στα γονιμοποιημένα ωοκύτταρα σχετίζεται ενδεχομένως με το αυξημένο ποσοστό απόπτωσης, ενώ η ιϊκή ανίχνευση στα τροφοβλαστικά κύτταρα πιθανώς συνδέεται με τη μειωμένη προσκόλληση της τροφοβλάστης. Διάφορες μελέτες απέτυχαν να εξακριβώσουν τη σχέση μεταξύ της πρόιμης αποβολής/αποτυχίας των τεχνικών υποβοηθούμενης αναπαραγωγής και της HPV θετικότητας στις γυναίκες.

Ωστόσο, νέα στοιχεία ανέφεραν τον πιθανό ρόλο της ανίχνευσης του ιού HPV στο σπέρμα στη δυσμενή έκβαση της κύησης και στην αποτυχία των τεχνικών υποβοηθούμενης αναπαραγωγής.

Στην παρούσα μελέτη, το ποσοστό γονιμοποίησης των ωαρίων από τα σπερματοζωάρια ήταν παραπλήσιο στο σύνολο των ζευγαριών, είτε τα σπερματοζωάρια ήταν θετικά, είτε ήταν αρνητικά στον ιό HPV. Το ποσοστό γονιμοποίησης στα αρνητικά ζευγάρια ήταν 89%, στα θετικά ζευγάρια 81%, στα ζευγάρια με αρνητικούς άνδρες συντρόφους 85% και στα ζευγάρια με θετικούς άνδρες συντρόφους 81%.

Στα 215 αρνητικά ζευγάρια, την 3η ημέρα, το ποσοστό στασιμότητας των εμβρύων ήταν 27%, ενώ το 42% των εμβρύων ήταν A, το 37% B, το 16% C και το 5% D. Στα 42 θετικά ζευγάρια, την 3η ημέρα, το ποσοστό στασιμότητας των εμβρύων ήταν 69%, ιδιαίτερα ενισχυμένο σε σχέση με τα αρνητικά ζευγάρια και η ποιότητα των εμβρύων σαφώς επηρεασμένη, καθώς το 30% των εμβρύων ήταν A, το 34% B, το 26% C και το 10% D.

Αντιστοίχως, στα 35 ζευγάρια όπου η γυναίκα σύντροφος ήταν θετική και ο άνδρας σύντροφος ήταν αρνητικός, την 3η ημέρα, το ποσοστό στασιμότητας των εμβρύων ήταν 31%, το 39% των εμβρύων ήταν A, το 41% B, το 15% C και το 5% D, ενώ στα 13 ζευγάρια όπου η γυναίκα σύντροφος ήταν αρνητική και ο άνδρας σύντροφος ήταν θετικός, την 3η ημέρα, το ποσοστό στασιμότητας των εμβρύων ήταν 67%, το 26% των εμβρύων ήταν A, το 29% B, το 31% C και το 14% D. Το γεγονός αυτό, υποδηλώνει την ενδεχόμενη επίπτωση της παρουσίας του ιού, τόσο στο ποσοστό στασιμότητας των εμβρύων, όσο και στην ποιότητά τους, στην περίπτωση όπου το σπέρμα του άνδρα συντρόφου είναι θετικό στον ιό HPV, καθώς η μειωμένη κινητικότητα των σπερματοζωαρίων και ο αυξημένος κατακερματισμός του DNA των σπερματοζωαρίων των θετικών ανδρών δυσχεραίνει πιθανώς την επιδιόρθωση των βλαβών του παρικού DNA από το ωάριο.

5. Συμπεράσματα

Ο ιός HPV εντοπίζεται ιδιαίτερα συχνά στα υπογόνιμα ζευγάρια, τόσο στις γυναίκες όσο και στο σπέρμα των ανδρών.

Ο ιός HPV παρουσιάζεται μέσω μονής, διπλής ή και πολλαπλής συνύπαρξης ποικίλων τύπων, συνηθέστερα των HPV 31 και HPV 16.

Ο ιός HPV εμφανίζεται συχνότερα στα σπερματοζώαρια των παθολογικών δειγμάτων σπέρματος.

Ο ιός HPV εμπλέκεται ενδεχομένως στην ανδρική υπογονιμότητα, επιδρώντας στην κινητικότητα των σπερματοζωαρίων, καθώς και στον κατακερματισμό του DNA των σπερματοζωαρίων.

Ο ιός HPV επηρεάζει πιθανώς τα έμβρυα, τα οποία προκύπτουν μέσω της εξωσωματικής γονιμοποίησης των ωαρίων από τα προσβεβλημένα σπερματοζώαρια.

Περίληψη

Η προσβολή του γεννητικού συστήματος από τον ιό των ανθρώπινων θηλωμάτων HPV αποτελεί τη συχνότερη σεξουαλικά μεταδιδόμενη περίπτωση ιογενούς αιτιολογίας παγκοσμίως. Ο ρόλος του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων HPV στη γονιμότητα και στην αναπαραγωγή ερευνάται ακόμη. Ο σκοπός της μελέτης ήταν η διερεύνηση της παρουσίας του ιού HPV στο αναπαραγωγικό σύστημα των υπογόνιμων ζευγαριών και της σχέσης του με την ανδρική υπογονιμότητα και τα έμβρυα. Στη μελέτη συμμετείχαν συνολικά 305 ζευγάρια, τα οποία υποβλήθηκαν σε τεχνικές υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Στα κολποτραχηλικά δείγματα των γυναικών και στα δείγματα σπέρματος των ανδρών πραγματοποιήθηκε εξαγωγή γενετικού υλικού και ανίχνευση και τυποποίηση του ιού με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης. Στα δείγματα σπέρματος πραγματοποιήθηκε εκτίμηση των παραμέτρων του σπέρματος με σπερμοδιάγραμμα και του κατακερματισμού του DNA των σπερματοζωαρίων με διασπορά χρωματίνης σπέρματος. Ακόμη, πραγματοποιήθηκε αξιολόγηση της πορείας των εμβρύων. Ο ιός HPV εντοπίστηκε ιδιαίτερα συχνά στα υπογόνιμα ζευγάρια, τόσο στις γυναίκες όσο και στο σπέρμα των ανδρών, μέσω πολλαπλής συνύπαρξης ποικίλων τύπων χαμηλού και υψηλού κινδύνου, συνηθέστερα των HPV 31 και HPV 16. Ο ιός HPV εμπλέκεται ενδεχομένως στην ανδρική υπογονιμότητα, επιδρώντας στην κινητικότητα των σπερματοζωαρίων, καθώς και στον κατακερματισμό του DNA των σπερματοζωαρίων, ενώ επηρεάζει πιθανώς τα έμβρυα, τα οποία προκύπτουν μέσω της εξωσωματικής γονιμοποίησης των ωαρίων από τα προσβεβλημένα σπερματοζωάρια.

Abstract**The presence of Human Papilloma Virus in reproductive cells.**

Genital infection with Human Papilloma Virus (HPV) is the most common sexually transmitted disease of viral etiology worldwide. The role of Human Papilloma Virus in fertility and reproduction is still being investigated. The aim of the study was to investigate the presence of HPV virus in the reproductive system of infertile couples and its correlation with male infertility and embryos. The study included a total of 305 couples, who underwent assisted reproduction techniques. DNA extraction, detection and genotyping of HPV virus by polymerase chain reaction were performed on the biological samples of women and men. Sperm samples were evaluated for sperm parameters by spermiogram and for sperm DNA fragmentation through sperm chromatin dispersion. An evaluation of the embryos' quality and cleavage arrest was also performed. HPV virus has been quite frequently detected in infertile couples, both in women and in men's sperm, through multiple coexistence of various low and high risk types (commonly HPV 31 and HRV 16). HPV virus may be involved in male fertility, affecting sperm motility as well as sperm DNA fragmentation, and possibly. A possible impact on embryos derived from in vitro fertilization with HPV infected spermatozoa can also be implied.

6. Βιβλιογραφία

- (1) Wassarman P. Gametogenesis. Academic Press. 2012.
- (2) Douglas C, Kenneth A. Spermatogenesis. Humana Press. 2013.
- (3) Coticchio G, Albertini D, De Santis L. Oogenesis. Springer-Verlag London. 2013.
- (4) Jones R, Lopez K. Human Reproductive Biology. Academic Press. 2013.
- (5) Lafond J, Vaillancourt C. Human Embryogenesis. Humana Press. 2009.
- (6) zur Hausen H. Papillomavirus infections-a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta*. 1996 Oct 9;1288(2):F55-78.
- (7) Bernard HU, Burk RD, Chen Z, van Doorslaer K, zur Hausen H, de Villiers EM. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology*. 2010 May 25;401(1):70-9.
- (8) Yang R, Wheeler CM, Chen X, Uematsu S, Takeda K, Akira S, Pastrana DV, Viscidi RP, Roden RB. Papillomavirus capsid mutation to escape dendritic cell-dependent innate immunity in cervical cancer. *J Virol*. 2005 Jun;79(11):6741-50.
- (9) Johnson KM, Kines RC, Roberts JN, Lowy DR, Schiller JT, Day PM. Role of heparin sulfate in attachment to and infection of the murine female genital tract by human papillomavirus. *J Virol*. 2009 Mar;83(5):2067-74.
- (10) Finnen RL, Erickson KD, Chen XS, Garcea RL. Interactions between papillomavirus L1 and L2 capsid proteins. *J Virol*. 2003 Apr;77(8):4818-26.
- (11) Day PM, Baker CC, Lowy DR, Schiller JT. Establishment of papillomavirus infection is enhanced by promyelocytic leukemia protein (PML) expression. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004 Sep 28;101(39):14252-7.
- (12) Day PM, Gambhira R, Roden RB, Lowy DR, Schiller JT. Mechanisms of human papillomavirus type 16 neutralization by 12 cross-neutralizing and 11 type-specific antibodies. *J Virol*. 2008 May;82(9):4638-46.
- (13) Buck CB, Pastrana DV, Lowy DR, Schiller JT. Efficient intracellular assembly of papillomaviral vectors. *J Virol*. 2004 Jan;78(2):751-7.

- (14) Bossis I, Roden RB, Gambhira R, Yang R, Tagaya M, Howley PM, Meneses PI. Interaction of tSNARE syntaxin 18 with the papillomavirus minor capsid protein mediates infection. *J Virol*. 2005 Jun;79(11):6723-31.
- (15) Kämper N, Day PM, Nowak T, Selinka HC, Florin L, Bolscher J, Hilbig L, Schiller JT, Sapp M. A membrane-destabilizing peptide in capsid protein L2 is required for egress of papillomavirus genomes from endosomes. *J Virol*. 2006 Jan;80(2):759-68.
- (16) Richards RM, Lowy DR, Schiller JT, Day PM. Cleavage of the papillomavirus minor capsid protein, L2, at a furin consensus site is necessary for infection. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006 Jan 31;103(5):1522-7.
- (17) Kirnbauer R, Booy F, Cheng N, Lowy DR, Schiller JT. Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992 Dec 15;89(24):12180-4.
- (18) Modis Y, Trus BL, Harrison SC. Atomic model of the papillomavirus capsid. *EMBO J*. 2002 Sep 16;21(18):4754-62.
- (19) Bishop B, Dasgupta J, Klein M, Garcea RL, Christensen ND, Zhao R, Chen XS. Crystal structures of four types of human papillomavirus L1 capsid proteins: understanding the specificity of neutralizing monoclonal antibodies. *J Biol Chem*. 2007 Oct 26;282(43):31803-11.
- (20) Zheng ZM, Baker CC. Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. *Front Biosci*. 2006 Sep 1;11:2286-302.
- (21) Danos O, Katinka M, Yaniv M. Human papillomavirus 1a complete DNA sequence: a novel type of genome organization among papovaviridae. *EMBO J*. 1982;1(2):231-6.
- (22) Hebner CM, Laimins LA. Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. *Rev Med Virol*. 2006 Mar-Apr;16(2):83-97.
- (23) Grassmann K, Rapp B, Maschek H, Petry KU, Iftner T. Identification of a differentiation-inducible promoter in the E7 open reading frame of

humanpapillomavirus type 16 (HPV-16) in raft cultures of a new cell line containing high copy numbers of episomal HPV-16 DNA. *J Virol.* 1996 Apr;70(4):2339-49.

(24) Hummel M, Hudson JB, Laimins LA. Differentiation-induced and constitutive transcription of human papillomavirus type 31b in cell lines containing viral episomes. *J Virol.* 1992 Oct;66(10):6070-80.

(25) Doorbar J, Quint W, Banks L, Bravo IG, Stoler M, Broker TR, Stanley MA. The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine.* 2012 Nov 20;30 Suppl 5:F55-70.

(26) Wentzensen N, Vinokurova S, von Knebel Doeberitz M. Systematic review of genomic integration sites of human papillomavirus genomes in epithelial dysplasia and invasive cancer of the female lower genital tract. *Cancer Res.* 2004 Jun 1;64(11):3878-84.

(27) Ziegert C, Wentzensen N, Vinokurova S, Kissel'ov F, Einenkel J, Hoeckel M, von Knebel Doeberitz M. A comprehensive analysis of HPV integration loci in anogenital lesions combining transcript and genome-based amplification techniques. *Oncogene.* 2003 Jun 19;22(25):3977-84.

(28) Chen CM, Shyu MP, Au LC, Chu HW, Cheng WT, Choo KB. Analysis of deletion of the integrated human papillomavirus 16 sequence in cervical cancer: a rapid multiplex polymerase chain reaction approach. *J Med Virol.* 1994 Oct;44(2):206-11.

(29) Kalantari M, Karlsen F, Kristensen G, Holm R, Hagmar B, Johansson B. Disruption of the E1 and E2 reading frames of HPV 16 in cervical carcinoma is associated with poor prognosis. *Int J Gynecol Pathol.* 1998 Apr;17(2):146-53.

(30) Lukaszuk K, Liss J, Wozniak I, Emerich J, Wójcikowski C. Human papillomavirus type 16 status in cervical carcinoma cell DNA assayed by multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* 2003 Feb;41(2):608-12.

(31) Arias-Pulido H, Peyton CL, Joste NE, Vargas H, Wheeler CM. Human papillomavirus type 16 integration in cervical carcinoma in situ and in invasive cervical cancer. *J Clin Microbiol.* 2006 May;44(5):1755-62.

- (32) Cricca M, Venturoli S, Leo E, Costa S, Musiani M, Zerbini M. Disruption of HPV 16 E1 and E2 genes in precancerous cervical lesions. *J Virol Methods*. 2009 Jun;158(1-2):180-3.
- (33) Li H, Yang Y, Zhang R, Cai Y, Yang X, Wang Z, Li Y, Cheng X, Ye X, Xiang Y, Zhu B. Preferential sites for the integration and disruption of human papillomavirus 16 in cervical lesions. *J Clin Virol*. 2013 Apr;56(4):342-7.
- (34) Xu B, Chotewutmontri S, Wolf S, Klos U, Schmitz M, Dürst M, Schwarz E. Multiplex Identification of Human Papillomavirus 16 DNA Integration Sites in Cervical Carcinomas. *PLoS One*. 2013 Jun 18;8(6):e66693.
- (35) Akagi K, Li J, Broutian TR, Padilla-Nash H, Xiao W, Jiang B, Rocco JW, Teknos TN, Kumar B, Wangsa D, He D, Ried T, Symer DE, Gillison ML. Genome-wide analysis of HPV integration in human cancers reveals recurrent, focal genomic instability. *Genome Res*. 2014 Feb;24(2):185-99.
- (36) Hamid NA, Brown C, Gaston K. The regulation of cell proliferation by the papillomavirus early proteins. *Cell Mol Life Sci*. 2009 May;66(10):1700-17.
- (37) Kadaja M, Silla T, Ustav E, Ustav M. Papillomavirus DNA replication- from initiation to genomic instability. *Virology*. 2009 Feb 20;384(2):360-8.
- (38) Thierry F. Transcriptional regulation of the papillomavirus oncogenes by cellular and viral transcription factors in cervical carcinoma. *Virology*. 2009 Feb 20;384(2):375-9.
- (39) Huang LW, Chao SL, Lee BH. Integration of human papillomavirus type-16 and type-18 is a very early event in cervicalcar cinogenesis. *J Clin Pathol*. 2008 May;61(5):627-31.
- (40) Kulmala SM, Syrjänen SM, Gyllensten UB, Shabalova IP, Petrovichev N, Tosi P, Syrjänen KJ, Johansson BC. Early integration of high copy HPV16 detectable in women with normal and low grade cervical cytology and histology. *J Clin Pathol*. 2006 May;59(5):513-7.

- (41) Tonon SA, Picconi MA, Bos PD, Zinovich JB, Galuppo J, Alonio LV, Teyssie AR. Physical status of the E2 human papilloma virus 16 viral gene in cervical preneoplastic and neoplastic lesions. *J Clin Virol.* 2001 May;21(2):129-34.
- (42) Andersson S, Safari H, Mints M, Lewensohn-Fuchs I, Gyllensten U, Johansson B. Type distribution, viral load and integration status of high-risk human papillomaviruses in pre-stages of cervical cancer (CIN). *Br J Cancer.* 2005 Jun 20;92(12):2195-200.
- (43) Pett MR, Herdman MT, Palmer RD, Yeo GS, Shivji MK, Stanley MA, Coleman N. Selection of cervical keratinocytes containing integrated HPV16 associates with episome loss and an endogenous antiviral response. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Mar 7;103(10):3822-7.
- (44) Cheung JL, Lo KW, Cheung TH, Tang JW, Chan PK. Viral load, E2 gene disruption status, and lineage of human papillomavirus type 16 infection in cervical neoplasia. *J Infect Dis.* 2006 Dec 15;194(12):1706-12.
- (45) De Marco L, Gillio-Tos A, Bonello L, Ghisetti V, Ronco G, Merletti F. Detection of human papillomavirus type 16 integration in pre-neoplastic cervical lesions and confirmation by DIPS-PCR and sequencing. *J Clin Virol.* 2007 Jan;38(1):7-13.
- (46) Briolat J, Dalstein V, Saunier M, Joseph K, Caudroy S, Prétet JL, Birembaut P, Clavel C. HPV prevalence, viral load and physical state of HPV-16 in cervical smears of patients with different grades of CIN. *Int J Cancer.* 2007 Nov 15;121(10):2198-204.
- (47) Li W, Wang W, Si M, Han L, Gao Q, Luo A, Li Y, Lu Y, Wang S, Ma D. The physical state of HPV16 infection and its clinical significance in cancer precursor lesion and cervical carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2008 Dec;134(12):1355-61.
- (48) Matovina M, Sabol I, Grubisić G, Gasperov NM, Grce M. Identification of human papillomavirus type 16 integration sites in high-grade precancerous cervical lesions. *Gynecol Oncol.* 2009 Apr;113(1):120-7.
- (49) Couturier J, Sastre-Garau X, Schneider-Maunoury S, Labib A, Orth G. Integration of papillomavirus DNA near myc genes in genital carcinomas and its consequences for proto-oncogene expression. *J Virol.* 1991 Aug;65(8):4534-8.

- (50) Jeon S, Allen-Hoffmann BL, Lambert PF. Integration of human papillomavirus type 16 into the human genome correlates with a selective growth advantage of cells. *J Virol*. 1995 May;69(5):2989-97.
- (51) Duensing S, Münger K. Mechanisms of genomic instability in human cancer: insights from studies with human papillomavirus oncoproteins. *Int J Cancer*. 2004 Mar 20;109(2):157-62.
- (52) Archambault J, Melendy T. Targeting human papillomavirus genome replication for antiviral drug discovery. *Antivir Ther*. 2013;18(3):271-83.
- (53) Amin AA, Titolo S, Pelletier A, Fink D, Cordingley MG, Archambault J. Identification of domains of the HPV11 E1 protein required for DNA replication in vitro. *Virology*. 2000 Jun 20;272(1):137-50.
- (54) White PW, Pelletier A, Brault K, Titolo S, Welchner E, Thauvette L, Fazekas M, Cordingley MG, Archambault J. Characterization of recombinant HPV6 and 11 E1 helicases: effect of ATP on the interaction of E1 with E2 and mapping of a minimal helicase domain. *J Biol Chem*. 2001 Jun 22;276(25):22426-38.
- (55) Titolo S, Pelletier A, Pulichino AM, Brault K, Wardrop E, White PW, Cordingley MG, Archambault J. Identification of domains of the human papillomavirus type 11 E1 helicase involved in oligomerization and binding to the viral origin. *J Virol*. 2000 Aug;74(16):7349-61.
- (56) Ma T, Zou N, Lin BY, Chow LT, Harper JW. Interaction between cyclin-dependent kinases and human papillomavirus replication-initiation protein E1 is required for efficient viral replication. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Jan 19;96(2):382-7.
- (57) Deng W, Lin BY, Jin G, Wheeler CG, Ma T, Harper JW, Broker TR, Chow LT. Cyclin/CDK regulates the nucleocytoplasmic localization of the human papillomavirus E1 DNA helicase. *J Virol*. 2004 Dec;78(24):13954-65.
- (58) Fradet-Turcotte A, Moody C, Laimins LA, Archambault J. Nuclear export of human papillomavirus type 31 E1 is regulated by Cdk2 phosphorylation and required for viral genome maintenance. *J Virol*. 2010 Nov;84(22):11747-60.

- (59) Liu JS, Kuo SR, Broker TR, Chow LT. The functions of human papillomavirus type 11 E1, E2, and E2C proteins in cell-free DNA replication. *J Biol Chem*. 1995 Nov 10;270(45):27283-91.
- (60) Titolo S, Brault K, Majewski J, White PW, Archambault J. Characterization of the minimal DNA binding domain of the human papillomavirus e1 helicase: fluorescence anisotropy studies and characterization of a dimerization-defective mutant protein. *J Virol*. 2003 May;77(9):5178-91.
- (61) Sedman J, Stenlund A. The papillomavirus E1 protein forms a DNA-dependent hexameric complex with ATPase and DNA helicase activities. *J Virol*. 1998 Aug;72(8):6893-7.
- (62) D'Abramo CM, Archambault J. Small molecule inhibitors of human papillomavirus protein-protein interactions. *Open Virol J*. 2011;5:80-95.
- (63) Masterson PJ, Stanley MA, Lewis AP, Romanos MA. A C-terminal helicase domain of the human papillomavirus E1 protein binds E2 and the DNA polymerase alpha-primase p68 subunit. *J Virol*. 1998 Sep;72(9):7407-19.
- (64) Conger KL, Liu JS, Kuo SR, Chow LT, Wang TS. Human papillomavirus DNA replication. Interactions between the viral E1 protein and two subunits of human dna polymerase alpha/primase. *J Biol Chem*. 1999 Jan 29;274(5):2696-705.
- (65) Parker LM, Harris S, Gossen M, Botchan MR. The bovine papillomavirus E2 transactivator is stimulated by the E1 initiator through the E2 activation domain. *Virology*. 2000 May 10;270(2):430-43.
- (66) Loo YM, Melendy T. Recruitment of replication protein A by the papillomavirus E1 protein and modulation by single-stranded DNA. *J Virol*. 2004 Feb;78(4):1605-15.
- (67) Clower RV, Hu Y, Melendy T. Papillomavirus E2 protein interacts with and stimulates human topoisomerase I. *Virology*. 2006 Apr 25;348(1):13-8.
- (68) Hegde RS. The papillomavirus E2 proteins: structure, function, and biology. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*. 2002;31:343-60.
- (69) Blachon S, Demeret C. The regulatory E2 proteins of human genital papillomaviruses are pro-apoptotic. *Biochimie*. 2003 Aug;85(8):813-9.

- (70) McBride AA, McPhillips MG, Oliveira JG. Brd4: tethering, segregation and beyond. *Trends Microbiol.* 2004 Dec;12(12):527-9.
- (71) Ilves I, Mäemets K, Silla T, Janikson K, Ustav M. Brd4 is involved in multiple processes of the bovine papillomavirus type 1 life cycle. *J Virol.* 2006 Apr;80(7):3660-5.
- (72) Bouvard V, Storey A, Pim D, Banks L. Characterization of the human papillomavirus E2 protein: evidence of trans-activation and trans-repression in cervical keratinocytes. *EMBO J.* 1994 Nov 15;13(22):5451-9.
- (73) Dostatni N, Lambert PF, Sousa R, Ham J, Howley PM, Yaniv M. The functional BPV-1 E2 trans-activating protein can act as a repressor by preventing formation of the initiation complex. *Genes Dev.* 1991 Sep;5(9):1657-71.
- (74) Tan SH, Baker CC, Stünkel W, Bernard HU. A transcriptional initiator overlaps with a conserved YY1 binding site in the long control region of human papillomavirus type 16. *Virology.* 2003 Jan 20;305(2):486-501.
- (75) Ham J, Steger G, Yaniv M. Cooperativity in vivo between the E2 transactivator and the TATA box binding protein depends on core promoter structure. *EMBO J.* 1994 Jan 1;13(1):147-57.
- (76) Steger G, Corbach S. Dose-dependent regulation of the early promoter of human papillomavirus type 18 by the viral E2 protein. *J Virol.* 1997 Jan;71(1):50-8.
- (77) Lee D, Lee B, Kim J, Kim DW, Choe J. cAMP response element-binding protein-binding protein binds to human papillomavirus E2 protein and activates E2-dependent transcription. *J Biol Chem.* 2000 Mar 10;275(10):7045-51.
- (78) Boner W, Taylor ER, Tsimonaki E, Yamane K, Campo MS, Morgan IM. A Functional interaction between the human papillomavirus 16 transcription/replication factor E2 and the DNA damage response protein TopBP1. *J Biol Chem.* 2002 Jun 21;277(25):22297-303.
- (79) Rehtanz M, Schmidt HM, Warthorst U, Steger G. Direct interaction between nucleosome assembly protein 1 and the papillomavirus E2 proteins involved in activation of transcription. *Mol Cell Biol.* 2004 Mar;24(5):2153-68.

- (80) Schweiger MR, You J, Howley PM. Bromodomain protein 4 mediates the papillomavirus E2 transcriptional activation function. *J Virol*. 2006 May;80(9):4276-85.
- (81) Nominé Y, Masson M, Charbonnier S, Zanier K, Ristriani T, Deryckère F, Sibling AP, Desplancq D, Atkinson RA, Weiss E, Orfanoudakis G, Kieffer B, Travé G. Structural and functional analysis of E6 oncoprotein: insights in the molecular pathways of human papillomavirus-mediated pathogenesis. *Mol Cell*. 2006 Mar 3;21(5):665-78.
- (82) Boulet G, Horvath C, Vanden Broeck D, Sahebali S, Bogers J. Human papillomavirus: E6 and E7 oncogenes. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39(11):2006-11.
- (83) Demarest SJ, Martinez-Yamout M, Chung J, Chen H, Xu W, Dyson HJ, Evans RM, Wright PE. Mutual synergistic folding in recruitment of CBP/p300 by p160 nuclear receptor coactivators. *Nature*. 2002 Jan 31;415(6871):549-53.
- (84) Pim D, Banks L. Interaction of viral oncoproteins with cellular target molecules: infection with high-risk vs low-risk human papillomaviruses. *APMIS*. 2010 Jun;118(6-7):471-93.
- (85) Fu L, Van Doorslaer K, Chen Z, Ristriani T, Masson M, Travé G, Burk RD. Degradation of p53 by human Alphapapillomavirus E6 proteins shows a stronger correlation with phylogeny than oncogenicity. *PLoS One*. 2010 Sep 17;5(9). pii: e12816.
- (86) Zanier K,ould M'hamed ould Sidi A, Boulade-Ladame C, Rybin V, Chappelle A, Atkinson A, Kieffer B, Travé G. Solution structure analysis of the HPV16 E6 oncoprotein reveals a self-association mechanism required for E6-mediated degradation of p53. *Structure*. 2012 Apr 4;20(4):604-17.
- (87) Artandi SE, Attardi LD. Pathways connecting telomeres and p53 in senescence, apoptosis, and cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005 Jun 10;331(3):881-90.
- (88) Münger K, Baldwin A, Edwards KM, Hayakawa H, Nguyen CL, Owens M, Grace M, Huh K. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *J Virol*. 2004 Nov;78(21):11451-60.

- (89) Duensing A, Spardy N, Chatterjee P, Zheng L, Parry J, Cuevas R, Korzeniewski N, Duensing S. Centrosome overduplication, chromosomal instability, and human papillomavirus oncoproteins. *Environ Mol Mutagen*. 2009 Oct;50(8):741-7.
- (90) Korzeniewski N, Treat B, Duensing S. The HPV-16 E7 oncoprotein induces centriole multiplication through deregulation of Polo-like kinase 4 expression. *Mol Cancer*. 2011 May 24;10:61.
- (91) Roman A. The human papillomavirus E7 protein shines a spotlight on the pRB family member, p130. *Cell Cycle*. 2006 Mar;5(6):567-8.
- (92) Barrow-Laing L, Chen W, Roman A. Low- and high-risk human papillomavirus E7 proteins regulate p130 differently. *Virology*. 2010 May 10;400(2):233-9.
- (93) Berezutskaya E, Yu B, Morozov A, Raychaudhuri P, Bagchi S. Differential regulation of the pocket domains of the retinoblastoma family proteins by the HPV16 E7 oncoprotein. *Cell Growth Differ*. 1997 Dec;8(12):1277-86.
- (94) Wang J, Sampath A, Raychaudhuri P, Bagchi S. Both Rb and E7 are regulated by the ubiquitin proteasome pathway in HPV-containing cervical tumor cells. *Oncogene*. 2001 Aug 2;20(34):4740-9.
- (95) Funk JO, Waga S, Harry JB, Espling E, Stillman B, Galloway DA. Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA replication by p21 is blocked by interaction with the HPV-16 E7 oncoprotein. *Genes Dev*. 1997 Aug 15;11(16):2090-100.
- (96) Nguyen CL, Münger K. Direct association of the HPV16 E7 oncoprotein with cyclin A/CDK2 and cyclin E/CDK2 complexes. *Virology*. 2008 Oct 10;380(1):21-5.
- (97) Longworth MS, Laimins LA. Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2004 Jun;68(2):362-72.
- (98) Stöppler MC, Straight SW, Tsao G, Schlegel R, McCance DJ. The E5 gene of HPV-16 enhances keratinocyte immortalization by full-length DNA. *Virology*. 1996 Sep 1;223(1):251-4.
- (99) Kivi N, Greco D, Auvinen P, Auvinen E. Genes involved in cell adhesion, cell motility and mitogenic signaling are altered due to HPV 16 E5 protein expression. *Oncogene*. 2008 Apr 17;27(18):2532-41.

- (100) Barbaresi S, Cortese MS, Quinn J, Ashrafi GH, Graham SV, Campo MS. Effects of human papillomavirus type 16 E5 deletion mutants on epithelial morphology: functional characterization of each transmembrane domain. *J Gen Virol.* 2010 Feb;91(Pt 2):521-30.
- (101) Nath R, Mant CA, Kell B, Cason J, Bible JM. Analyses of variant human papillomavirus type-16 E5 proteins for their ability to induce mitogenesis of murine fibroblasts. *Cancer Cell Int.* 2006 Aug 9;6:19.
- (102) Wetherill LF, Holmes KK, Verow M, Müller M, Howell G, Harris M, Fishwick C, Stonehouse N, Foster R, Blair GE, Griffin S, Macdonald A. High-risk human papillomavirus E5 oncoprotein displays channel-forming activity sensitive to small-molecule inhibitors. *J Virol.* 2012 May;86(9):5341-51.
- (103) Hu L, Ceresa BP. Characterization of the plasma membrane localization and orientation of HPV16 E5 for cell-cell fusion. *Virology.* 2009 Oct 10;393(1):135-43.
- (104) Hu L, Plafker K, Vorozhko V, Zuna RE, Hanigan MH, Gorbsky GJ, Plafker SM, Angeletti PC, Ceresa BP. Human papillomavirus 16 E5 induces bi-nucleated cell formation by cell-cell fusion. *Virology.* 2009 Feb 5;384(1):125-34.
- (105) Krawczyk E, Suprynowicz FA, Sudarshan SR, Schlegel R. Membrane orientation of the human papillomavirus type 16 E5 oncoprotein. *J Virol.* 2010 Feb;84(4):1696-703.
- (106) Straight SW, Hinkle PM, Jewers RJ, McCance DJ. The E5 oncoprotein of human papillomavirus type 16 transforms fibroblasts and effects the downregulation of the epidermal growth factor receptor in keratinocytes. *J Virol.* 1993 Aug;67(8):4521-32.
- (107) Zhang Y, Lehman JM, Petti LM. Apoptosis of mortal human fibroblasts transformed by the bovine papillomavirus E5 oncoprotein. *Mol Cancer Res.* 2002 Dec;1(2):122-36.
- (108) Chen SL, Huang CH, Tsai TC, Lu KY, Tsao YP. The regulation mechanism of c-jun and junB by human papillomavirus type 16 E5 oncoprotein. *Arch Virol.* 1996;141(5):791-800.

- (109) Kim SH, Oh JM, No JH, Bang YJ, Juhn YS, Song YS. Involvement of NF-kappa B and AP-1 in COX-2 upregulation by human papillomavirus 16 E5 oncoprotein. *Carcinogenesis*. 2009 May;30(5):753-7.
- (110) Ashrafi GH, Haghshenas MR, Marchetti B, O'Brien PM, Campo MS. E5 protein of human papillomavirus type 16 selectively downregulates surface HLA class I. *Int J Cancer*. 2005 Jan 10;113(2):276-83.
- (111) Ashrafi GH, Haghshenas M, Marchetti B, Campo MS. E5 protein of human papillomavirus 16 downregulates HLA class I and interacts with the heavy chain via its first hydrophobic domain. *Int J Cancer*. 2006 Nov 1;119(9):2105-12.
- (112) Shafti-Keramat S, Handisurya A, Kriehuber E, Meneguzzi G, Slupetzky K, Kirnbauer R. Different heparin sulfate proteoglycans serve as cellular receptors for human papillomaviruses. *J Virol*. 2003 Dec;77(24):13125-35.
- (113) Surviladze Z, Dziduszko A, Ozbun MA. Essential roles for soluble virion-associated heparin sulfonated proteoglycans and growth factors in human papillomavirus infections. *PLoS Pathog*. 2012 Feb;8(2):e1002519.
- (114) Culp TD, Budgeon LR, Marinkovich MP, Meneguzzi G, Christensen ND. Keratinocyte-secreted laminin 5 can function as a transient receptor for human papillomaviruses by binding virions and transferring them to adjacent cells. *J Virol*. 2006 Sep;80(18):8940-50.
- (115) Bousarghin L, Touzé A, Sizaret PY, Coursaget P. Human papillomavirus types 16, 31, and 58 use different endocytosis pathways to enter cells. *J Virol*. 2003 Mar;77(6):3846-50.
- (116) Bergant Marušič M, Ozbun MA, Campos SK, Myers MP, Banks L. Human papillomavirus L2 facilitates viral escape from late endosomes via sorting nexin 17. *Traffic*. 2012 Mar;13(3):455-67.
- (117) Schelhaas M, Shah B, Holzer M, Blattmann P, Kühling L, Day PM, Schiller JT, Helenius A. Entry of human papillomavirus type 16 by actin-dependent, clathrin- and lipid raft-independent endocytosis. *PLoS Pathog*. 2012;8(4):e1002657.

- (118) Maglennon GA, McIntosh P, Doorbar J. Persistence of viral DNA in the epithelial basal layer suggests a model for papillomavirus latency following immune regression. *Virology*. 2011 Jun 5;414(2):153-63.
- (119) McBride AA. Replication and partitioning of papillomavirus genomes. *Adv Virus Res*. 2008;72:155-205.
- (120) Pyeon D, Pearce SM, Lank SM, Ahlquist P, Lambert PF. Establishment of human papillomavirus infection requires cell cycle progression. *PLoS Pathog*. 2009 Feb;5(2):e1000318.
- (121) Parish JL, Bean AM, Park RB, Androphy EJ. ChlR1 is required for loading papillomavirus E2 onto mitotic chromosomes and viral genome maintenance. *Mol Cell*. 2006 Dec 28;24(6):867-76.
- (122) Hoffmann R, Hirt B, Bechtold V, Beard P, Raj K. Different modes of human papillomavirus DNA replication during maintenance. *J Virol*. 2006 May;80(9):4431-9.
- (123) Doorbar J. The E4 protein; structure, function and patterns of expression. *Virology*. 2013 Oct;445(1-2):80-98.
- (124) Middleton K, Peh W, Southern S, Griffin H, Sotlar K, Nakahara T, El-Sherif A, Morris L, Seth R, Hibma M, Jenkins D, Lambert P, Coleman N, Doorbar J. Organization of human papillomavirus productive cycle during neoplastic progression provides a basis for selection of diagnostic markers. *J Virol*. 2003 Oct;77(19):10186-201.
- (125) McIntosh PB, Laskey P, Sullivan K, Davy C, Wang Q, Jackson DJ, Griffin HM, Doorbar J. E1-E4-mediated keratin phosphorylation and ubiquitylation: a mechanism for keratin depletion in HPV16-infected epithelium. *J Cell Sci*. 2010 Aug 15;123(Pt 16):2810-22.
- (126) Roberts S, Ashmole I, Rookes SM, Gallimore PH. Mutational analysis of the human papillomavirus type 16 E1-E4 protein shows that the C terminus is dispensable for keratin cytoskeleton association but is involved in inducing disruption of the keratin filaments. *J Virol*. 1997 May;71(5):3554-62.

- (127) Lehr E, Hohl D, Huber M, Brown D. Infection with Human Papillomavirus alters expression of the small proline rich proteins 2 and 3. *J Med Virol*. 2004 Mar;72(3):478-83.
- (128) Markowitz LE, Tsu V, Deeks SL, Cubie H, Wang SA, Vicari AS, Brotherton JM. Human papillomavirus vaccine introduction-the first five years. *Vaccine*. 2012 Nov 20;30 Suppl 5:F139-48.
- (129) Noronha AS, Markowitz LE, Dunne EF. Systematic review of human papillomavirus vaccine coadministration. *Vaccine*. 2014 May 13;32(23):2670-4.
- (130) Jemal A, Simard EP, Dorell C, Noone AM, Markowitz LE, Kohler B, Ehemann C, Saraiya M, Bandi P, Saslow D, Cronin KA, Watson M, Schiffman M, Henley SJ, Schymura MJ, Anderson RN, Yankey D, Edwards BK. Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, 1975-2009, featuring the burden and trends in human papillomavirus (HPV)-associated cancers and HPV vaccination coverage levels. *J Natl Cancer Inst*. 2013 Feb 6;105(3):175-201.
- (131) Jeudin P, Liveright E, Del Carmen MG, Perkins RB. Race, ethnicity, and income factors impacting human papillomavirus vaccination rates. *Clin Ther*. 2014 Jan 1;36(1):24-37.
- (132) Castellsagué X. Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer. *Gynecol Oncol*. 2008 Sep;110(3 Suppl 2):S4-7.
- (133) Kjaer SK, Chackerian B, van den Brule AJ, Svare EI, Paull G, Walbomers JM, Schiller JT, Bock JE, Sherman ME, Lowy DR, Meijer CL. High-risk human papillomavirus is sexually transmitted: evidence from a follow-up study of virgins starting sexual activity (intercourse). *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2001 Feb;10(2):101-6.
- (134) Dunne EF, Markowitz LE, Saraiya M, Stokley S, Middleman A, Unger ER, Williams A, Iskander J; Centers for Disease Control and Prevention (CDC). CDC grand rounds: Reducing the burden of HPV-associated cancer and disease. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2014 Jan 31;63(4):69-72.

- (135) Antonsson A, Karanfilovska S, Lindqvist PG, Hansson BG. General acquisition of human papillomavirus infections of skin occurs in early infancy. *J Clin Microbiol.* 2003 Jun;41(6):2509-14.
- (136) Muñoz N, Méndez F, Posso H, Molano M, van den Brule AJ, Ronderos M, Meijer C, Muñoz A; Instituto Nacional de Cancerología HPV Study Group. Incidence, duration, and determinants of cervical human papillomavirus infection in a cohort of Colombian women with normal cytological results. *J Infect Dis.* 2004 Dec 15;190(12):2077-87.
- (137) Vaccarella S, Herrero R, Dai M, Snijders PJ, Meijer CJ, Thomas JO, Hoang Anh PT, Ferreccio C, Matos E, Posso H, de Sanjosé S, Shin HR, Sukvirach S, Lazcano-Ponce E, Ronco G, Rajkumar R, Qiao YL, Muñoz N, Franceschi S. Reproductive factors, oral contraceptive use, and human papillomavirus infection: pooled analysis of the IARC HPV prevalence surveys. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006 Nov;15(11):2148-53.
- (138) Stanley M. Pathology and epidemiology of HPV infection in females. *Gynecol Oncol.* 2010 May;117(2 Suppl):S5-10.
- (139) Garcia-Chacon R, Velasco-Ramirez SF, Flores-Romo L, Daneri-Navarro A. Immunobiology of HPV Infection. *Arch Med Res.* 2009 Aug;40(6):443-8.
- (140) Stanley M. Immunobiology of HPV and HPV vaccines. *Gynecol Oncol.* 2008 May;109(2 Suppl):S15-21.
- (141) Cuschieri KS, Cubie HA, Whitley MW, Gilkison G, Arends MJ, Graham C, McGoogan E. Persistent high risk HPV infection associated with development of cervical neoplasia in a prospective population study. *J Clin Pathol.* 2005 Sep;58(9):946-50.
- (142) Liaw KL, Hildesheim A, Burk RD, Gravitt P, Wacholder S, Manos MM, Scott DR, Sherman ME, Kurman RJ, Glass AG, Anderson SM, Schiffman M. A prospective study of human papillomavirus (HPV) type 16 DNA detection by polymerase chain reaction and its association with acquisition and persistence of other HPV types. *J Infect Dis.* 2001 Jan 1;183(1):8-15.

- (143) Cobos C, Figueroa JA, Mirandola L, Colombo M, Summers G, Figueroa A, Aulakh A, Konala V, Verma R, Riaz J, Wade R, Saadeh C, Rahman RL, Pandey A, Radhi S, Nguyen DD, Jenkins M, Chiriva-Internati M, Cobos E. The role of human papilloma virus (HPV) infection in non-anogenital cancer and the promise of immunotherapy: a review. *Int Rev Immunol*. 2014 Oct;33(5):383-401.
- (144) Zandberg DP, Bhargava R, Badin S, Cullen KJ. The role of human papillomavirus in nongenital cancers. *CA Cancer J Clin*. 2013 Jan;63(1):57-81.
- (145) Fakhry C, Westra WH, Li S, Cmelak A, Ridge JA, Pinto H, Forastiere A, Gillison ML. Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial. *J Natl Cancer Inst*. 2008 Feb 20;100(4):261-9.
- (146) Ragin CC, Taioli E. Survival of squamous cell carcinoma of the head and neck in relation to human papillomavirus infection: review and meta-analysis. *Int J Cancer*. 2007 Oct 15;121(8):1813-20.
- (147) Ang KK, Harris J, Wheeler R, Weber R, Rosenthal DI, Nguyen-Tân PF, Westra WH, Chung CH, Jordan RC, Lu C, Kim H, Axelrod R, Silverman CC, Redmond KP, Gillison ML. Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *N Engl J Med*. 2010 Jul 1;363(1):24-35.
- (148) Srinivasan M, Taioli E, Ragin CC. Human papillomavirus type 16 and 18 in primary lung cancers-a meta-analysis. *Carcinogenesis*. 2009 Oct;30(10):1722-8.
- (149) Ciotti M, Giuliani L, Ambrogi V, Ronci C, Benedetto A, Mineo TC, Syrjänen K, Favalli C. Detection and expression of human papillomavirus oncogenes in non-small cell lung cancer. *Oncol Rep*. 2006 Jul;16(1):183-9.
- (150) Aglianò AM, Gradilone A, Gazzaniga P, Napolitano M, Vercillo R, Albonici L, Naso G, Manzari V, Frati L, Vecchione A. High frequency of human papillomavirus detection in urinary bladder cancer. *Urol Int*. 1994;53(3):125-9.
- (151) Kapranos N, Petrakou E, Anastasiadou C, Kotronias D. Detection of herpes simplex virus, cytomegalovirus, and Epstein-Barr virus in the semen of men attending an infertility clinic. *Fertil Steril*. 2003 Jun;79 Suppl 3:1566-70.

- (152) Souho T, Benlemlih M, Bennani B. Human papillomavirus infection and fertility alteration: a systematic review. *PLoS One*. 2015 May 18;10(5):e0126936.
- (153) Bachir BG, Jarvi K. Infectious, inflammatory, and immunologic conditions resulting in male infertility. *Urol Clin North Am*. 2014 Feb;41(1):67-81.
- (154) Gizzo S, Ferrari B, Noventa M, Ferrari E, Patrelli TS, Gangemi M, Nardelli GB. Male and couple fertility impairment due to HPV-DNA sperm infection: update on molecular mechanism and clinical impact-systematic review. *Biomed Res Int*. 2014;2014:230263.
- (155) Depuydt CE, Criel AM, Benoy IH, Arbyn M, Vereecken AJ, Bogers JJ. Changes in type-specific human papillomavirus load predict progression to cervical cancer. *J Cell Mol Med*. 2012 Dec;16(12):3096-104.
- (156) Schillaci R, Capra G, Bellavia C, Ruvolo G, Scazzone C, Venezia R, Perino A. Detection of oncogenic human papillomavirus genotypes on spermatozoa from male partners of infertile couples. *Fertil Steril*. 2013 Nov;100(5):1236-40.
- (157) Lai YM, Yang FP, Pao CC. Human papillomavirus deoxyribonucleic acid and ribonucleic acid in seminal plasma and sperm cells. *Fertil Steril*. 1996 May;65(5):1026-30.
- (158) Olatunbosun O, Deneer H, Pierson R. Human papillomavirus DNA detection in sperm using polymerase chain reaction. *Obstet Gynecol*. 2001 Mar;97(3):357-60.
- (159) Bezold G, Politch JA, Kiviat NB, Kuypers JM, Wolff H, Anderson DJ. Prevalence of sexually transmissible pathogens in semen from asymptomatic male infertility patients with and without leukocytospermia. *Fertil Steril*. 2007 May;87(5):1087-97.
- (160) Nielson CM, Flores R, Harris RB, Abrahamsen M, Papenfuss MR, Dunne EF, Markowitz LE, Giuliano AR. Human papillomavirus prevalence and type distribution in male anogenital sites and semen. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2007 Jun;16(6):1107-14.
- (161) Nielson CM, Harris RB, Flores R, Abrahamsen M, Papenfuss MR, Dunne EF, Markowitz LE, Giuliano AR. Multiple-type human papillomavirus infection in male

anogenital sites: prevalence and associated factors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009 Apr;18(4):1077-83.

(162) Aynaud O, Poveda JD, Huynh B, Guillemotonia A, Barrasso R. Frequency of herpes simplex virus, cytomegalovirus and human papillomavirus DNA in semen. *Int J STD AIDS.* 2002 Aug;13(8):547-50.

(163) Pérez-Andino J, Buck CB, Ribbeck K. Adsorption of human papillomavirus 16 to live human sperm. *PLoS One.* 2009 Jun 9;4(6):e5847.

(164) Foresta C, Garolla A, Zuccarello D, Pizzol D, Moretti A, Barzon L, Palù G. Human papillomavirus found in sperm head of young adult males affects the progressive motility. *Fertil Steril.* 2010 Feb;93(3):802-6.

(165) Garolla A, Pizzol D, Foresta C. The role of human papillomavirus on sperm function. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2011 Aug;23(4):232-7.

(166) Foresta C, Patassini C, Bertoldo A, Menegazzo M, Francavilla F, Barzon L, Ferlin A. Mechanism of human papillomavirus binding to human spermatozoa and fertilizing ability of infected spermatozoa. *PLoS One.* 2011 Mar 7;6(3):e15036.

(167) Lai YM, Lee JF, Huang HY, Soong YK, Yang FP, Pao CC. The effect of human papillomavirus infection on sperm cell motility. *Fertil Steril.* 1997 Jun;67(6):1152-5.

(168) Connelly DA, Chan PJ, Patton WC, King A. Human sperm deoxyribonucleic acid fragmentation by specific types of papillomavirus. *Am J Obstet Gynecol.* 2001 May;184(6):1068-70.

(169) Brossfield JE, Chan PJ, Patton WC, King A. Tenacity of exogenous human papillomavirus DNA in sperm washing. *J Assist Reprod Genet.* 1999 Jul;16(6):325-8.

(170) Garolla A, Lenzi A, Palù G, Pizzol D, Bertoldo A, De Toni L, Foresta C. Human papillomavirus sperm infection and assisted reproduction: a dangerous hazard with a possible safe solution. *Hum Reprod.* 2012 Apr;27(4):967-73.

(171) Foresta C, Pizzol D, Moretti A, Barzon L, Palù G, Garolla A. Clinical and prognostic significance of human papillomavirus DNA in the sperm or exfoliated

cells of infertile patients and subjects with risk factors. *Fertil Steril*. 2010 Oct;94(5):1723-7.

(172) Foresta C, Noventa M, De Toni L, Gizzo S, Garolla A. HPV-DNA sperm infection and infertility: from a systematic literature review to a possible clinical management proposal. *Andrology*. 2015 Mar;3(2):163-73.

(173) Lee CA, Huang CT, King A, Chan PJ. Differential effects of human papillomavirus DNA types on p53 tumor-suppressor gene apoptosis in sperm. *Gynecol Oncol*. 2002 Jun;85(3):511-6.

(174) Rintala MA, Grénman SE, Pöllänen PP, Suominen JJ, Syrjänen SM. Detection of high-risk HPV DNA in semen and its association with the quality of semen. *Int J STD AIDS*. 2004 Nov;15(11):740-3.

(175) Chan PJ, Su BC, Kalugdan T, Seraj IM, Tredway DR, King A. Human papillomavirus gene sequences in washed human sperm deoxyribonucleic acid. *Fertil Steril*. 1994 May;61(5):982-5.

(176) Chan PJ, Kalugdan T, Su BC, Whitney EA, Perrott W, Tredway DR, King A. Sperm as a noninvasive gene delivery system for preimplantation embryos. *Fertil Steril*. 1995 May;63(5):1121-4.

(177) Rombaldi RL, Serafini EP, Mandelli J, Zimmermann E, Losquiavo KP. Transplacental transmission of Human Papillomavirus. *Virology*. 2008 Sep 25;5:106.

(178) Chan PJ, Su BC, Tredway DR, Seraj M, Seraj IM, King A. Uptake of exogenous human papilloma virus L1 DNA by oocytes and detection by the polymerase chain reaction. *J Assist Reprod Genet*. 1992 Dec;9(6):531-3.

(179) Cabrera M, Chan PJ, Kalugdan TH, King A. Transfection of the inner cell mass and lack of a unique DNA sequence affecting the uptake of exogenous DNA by sperm as shown by dideoxy sequencing analogues. *J Assist Reprod Genet*. 1997 Feb;14(2):120-4.

(180) You H, Liu Y, Carey MJ, Lowery CL, Hermonat PL. Defective 3A trophoblast-endometrial cell adhesion and altered 3A growth and survival by human papillomavirus type 16 oncogenes. *Mol Cancer Res*. 2002 Nov;1(1):25-31.

- (181) Calinisan JH, Chan SR, King A, Chan PJ. Human papillomavirus and blastocyst apoptosis. *J Assist Reprod Genet.* 2002 Mar;19(3):132-6.
- (182) Henneberg AA, Patton WC, Jacobson JD, Chan PJ. Human papilloma virus DNA exposure and embryo survival is stage-specific. *J Assist Reprod Genet.* 2006 Jun;23(6):255-9.
- (183) Gomez LM, Ma Y, Ho C, McGrath CM, Nelson DB, Parry S. Placental infection with human papillomavirus is associated with spontaneous preterm delivery. *Hum Reprod.* 2008 Mar;23(3):709-15.
- (184) Noventa M, Andrisani A, Gizzo S, Nardelli GB, Ambrosini G. Is it time to shift the attention on early stages embryo development to avoid inconclusive evidence on HPV-related infertility: debate and proposal. *Reprod Biol Endocrinol.* 2014 May 31;12:48.
- (185) Eppel W, Worda C, Frigo P, Ulm M, Kucera E, Czerwenka K. Human papillomavirus in the cervix and placenta. *Obstet Gynecol.* 2000 Sep;96(3):337-41.
- (186) Matovina M, Husnjak K, Milutin N, Ciglar S, Grce M. Possible role of bacterial and viral infections in miscarriages. *Fertil Steril.* 2004 Mar;81(3):662-9.
- (187) Hong LJ, Oshiro BT, Chan PJ. HPV-16 exposed mouse embryos: a potential model for pregnancy wastage. *Arch Gynecol Obstet.* 2013 Jun;287(6):1093-7.
- (188) Hermonat PL, Han L, Wendel PJ, Quirk JG, Stern S, Lowery CL, Rehtin TM. Human papillomavirus is more prevalent in first trimester spontaneously aborted products of conception compared to elective specimens. *Virus Genes.* 1997;14(1):13-7.
- (189) Skoczyński M, Goździcka-Józefiak A, Kwaśniewska A. Prevalence of human papillomavirus in spontaneously aborted products of conception. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2011 Dec;90(12):1402-5.
- (190) Conde-Ferrández L, Chan May Ade A, Carrillo-Martínez JR, Ayora-Talavera G, González-Losa Mdel R. Human papillomavirus infection and spontaneous abortion: a case-control study performed in Mexico. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2013 Oct;170(2):468-73.

- (191) Depuydt CE, Verstraete L, Berth M, Beert J, Bogers JP, Salembier G, Vereecken AJ, Bosmans E. Human Papillomavirus Positivity in Women Undergoing Intrauterine Insemination Has a Negative Effect on Pregnancy Rates. *Gynecol Obstet Invest.* 2016;81(1):41-6.
- (192) van Hamont D, Nissen LH, Siebers AG, Hendriks JC, Melchers WJ, Kremer JA, Massuger LF. Abnormal cervical cytology in women eligible for IVF. *Hum Reprod.* 2006 Sep;21(9):2359-63.
- (193) AbdullGaffar B, Kamal MO, Hasoub A. The prevalence of abnormal cervical cytology in women with infertility. *Diagn Cytopathol.* 2010 Nov;38(11):791-4.
- (194) Tanaka H, Karube A, Kodama H, Fukuda J, Tanaka T. Mass screening for human papillomavirus type 16 infection in infertile couples. *J Reprod Med.* 2000 Nov;45(11):907-11.
- (195) Spandorfer SD, Bongiovanni AM, Fasioulotis S, Rosenwaks Z, Ledger WJ, Witkin SS. Prevalence of cervical human papillomavirus in women undergoing in vitro fertilization and association with outcome. *Fertil Steril.* 2006 Sep;86(3):765-7.
- (196) Perino A, Giovannelli L, Schillaci R, Ruvolo G, Fiorentino FP, Alimondi P, Cefalù E, Ammatuna P. Human papillomavirus infection in couples undergoing in vitro fertilization procedures: impact on reproductive outcomes. *Fertil Steril.* 2011 Apr;95(5):1845-8.
- (197) Comar M, Monasta L, Zanotta N, Vecchi Brumatti L, Ricci G, Zauli G. Human papillomavirus infection is associated with decreased levels of GM-CSF in cervico-vaginal fluid of infected women. *J Clin Virol.* 2013 Oct;58(2):479-81.
- (198) Wang Y, Wang C, Qiao J, Wang L, Liang S. Relationship of cytopathology and cervical infection to outcome of in-vitro fertilization and embryo transfer. *Int J Gynaecol Obstet.* 2008 Apr;101(1):21-6.
- (199) Yang R, Wang Y, Qiao J, Liu P, Geng L, Guo YL. Does human papillomavirus infection do harm to in-vitro fertilization outcomes and subsequent pregnancy outcomes? *Chin Med J (Engl).* 2013 Feb;126(4):683-7.

- (200) Foresta C, Pizzol D, Bertoldo A, Menegazzo M, Barzon L, Garolla A. Semen washing procedures do not eliminate human papilloma virus sperm infection in infertile patients. *Fertil Steril*. 2011 Nov;96(5):1077-82.
- (201) Garolla A, Pizzol D, Bertoldo A, Ghezzi M, Carraro U, Ferlin A, Foresta C. Testicular cancer and HPV semen infection. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2012 Dec 21;3:172.
- (202) Park H, Lee SW, Lee IH, Ryu HM, Cho AR, Kang YS, Hong SR, Kim SS, Seong SJ, Shin SM, Kim TJ. Rate of vertical transmission of human papillomavirus from mothers to infants: relationship between infection rate and mode of delivery. *Virol J*. 2012 Apr 12;9:80.
- (203) Cho G, Min KJ, Hong HR, Kim S, Hong JH, Lee JK, Oh MJ, Kim H. High-risk human papillomavirus infection is associated with premature rupture of membranes. *BMC Pregnancy Childbirth*. 2013 Sep 6;13:173.
- (204) Bonde U, Joergensen JS, Mogensen O, Lamont RF. The potential role of HPV vaccination in the prevention of infectious complications of pregnancy. *Expert Rev Vaccines*. 2014 Nov;13(11):1307-16.
- (205) Zuo Z, Goel S, Carter JE. Association of cervical cytology and HPV DNA status during pregnancy with placental abnormalities and preterm birth. *Am J Clin Pathol*. 2011 Aug;136(2):260-5.
- (206) Hong JN, Berggren EK, Campbell SL, Smith JS, Rahangdale L. Abnormal cervical cancer screening in pregnancy and preterm delivery. *Paediatr Perinat Epidemiol*. 2014 Jul;28(4):297-301.
- (207) Huang QT, Zhong M, Gao YF, Huang LP, Huang Q, Wang W, Wang ZJ, Yu YH. Can HPV vaccine have other health benefits more than cancer prevention? A systematic review of association between cervical HPV infection and preterm birth. *J Clin Virol*. 2014 Nov;61(3):321-8.
- (208) Stanley M, Gissmann L, Nardelli-Haeffliger D. Immunobiology of human papillomavirus infection and vaccination-implications for second generation vaccines. *Vaccine*. 2008 Aug 19;26 Suppl 10:K62-7.

(209) Kaspersen MD, Larsen PB, Ingerslev HJ, Fedder J, Petersen GB, Bonde J, Höllsberg P. Identification of multiple HPV types on spermatozoa from human sperm donors. *PLoS One*. 2011 Mar 29;6(3):e18095.

(210) Bosch FX, Broker TR, Forman D, Moscicki AB, Gillison ML, Doorbar J, Stern PL, Stanley M, Arbyn M, Poljak M, Cuzick J, Castle PE, Schiller JT, Markowitz LE, Fisher WA, Canfell K, Denny LA, Franco EL, Steben M, Kane MA, Schiffman M, Meijer CJ, Sankaranarayanan R, Castellsagué X, Kim JJ, Brotons M, Alemany L, Albero G, Diaz M, de Sanjosé S. Comprehensive control of human papillomavirus infections and related diseases. *Vaccine*. 2013 Dec 29;31 Suppl 5:F1-31.

(211) Cid Arregui A, Gariglio P, Kanda T, Doorbar J. ONCOGENIC HUMAN PAPILOMAVIRUSES: High-Risk Human Papillomaviruses: Towards a Better Understanding of the Mechanisms of Viral Transformation, Latency and Immune-Escape. *Open Virol J*. 2012;6:160-2.

(212) Barzon L, Militello V, Pagni S, Franchin E, Dal Bello F, Mengoli C, Palù G. Distribution of human papillomavirus types in the anogenital tract of females and males. *J Med Virol*. 2010 Aug;82(8):1424-30.

(213) Boone JD, Erickson BK, Huh WK. New insights into cervical cancer screening. *J Gynecol Oncol*. 2012 Oct;23(4):282-7.

(214) Gizzo S, Noventa M, Nardelli GB. Gardasil administration to hr-HPV-positive women and their partners. *Trends Pharmacol Sci*. 2013 Sep;34(9):479-80.

(215) Saccardi C, Gizzo S, Noventa M, Anis O, Di Gangi S, Patrelli TS, D'Antona D, Nardelli GB. High-risk human papillomavirus DNA test: could it be useful in low-grade cervical lesion triage? Five-year follow-up. *Reprod Sci*. 2014 Feb;21(2):198-203.

(216) Giuliano AR, Nyitray AG, Kreimer AR, Pierce Campbell CM, Goodman MT, Sudenga SL, Monsonego J, Franceschi S. EUROGIN 2014 roadmap: differences in human papillomavirus infection natural history, transmission and human papillomavirus-related cancer incidence by gender and anatomic site of infection. *Int J Cancer*. 2015 Jun 15;136(12):2752-60.

- (217) Lenzi A, Mirone V, Gentile V, Bartoletti R, Ficarra V, Foresta C, Mariani L, Mazzoli S, Parisi SG, Perino A, Picardo M, Zotti CM. Rome Consensus Conference-statement; human papilloma virus diseases in males. *BMC Public Health*. 2013 Feb 7;13:117.
- (218) Foresta C, Ferlin A, Bertoldo A, Patassini C, Zuccarello D, Garolla A. Human papilloma virus in the sperm cryobank: an emerging problem? *Int J Androl*. 2011 Jun;34(3):242-6.
- (219) Garolla A, Pizzol D, Bertoldo A, De Toni L, Barzon L, Foresta C. Association, prevalence, and clearance of human papillomavirus and antisperm antibodies in infected semen samples from infertile patients. *Fertil Steril*. 2013 Jan;99(1):125-31.
- (220) Yang Y, Jia CW, Ma YM, Zhou LY, Wang SY. Correlation between HPV sperm infection and male infertility. *Asian J Androl*. 2013 Jul;15(4):529-32.
- (221) Laprise C, Trottier H, Monnier P, Coutlée F, Mayrand MH. Prevalence of human papillomaviruses in semen: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod*. 2014 Apr;29(4):640-51.
- (222) Rintala MA, Pöllänen PP, Nikkanen VP, Grénman SE, Syrjänen SM. Human papillomavirus DNA is found in the vas deferens. *J Infect Dis*. 2002 Jun 1;185(11):1664-7.
- (223) Hernandez BY, Wilkens LR, Zhu X, McDuffie K, Thompson P, Shvetsov YB, Ning L, Goodman MT. Circumcision and human papillomavirus infection in men: a site-specific comparison. *J Infect Dis*. 2008 Mar 15;197(6):787-94.
- (224) Kero K, Rautava J, Syrjänen K, Grenman S, Syrjänen S. Human papillomavirus genotypes in male genitalia and their concordance among pregnant spouses participating in the Finnish Family HPV study. *J Sex Med*. 2011 Sep;8(9):2522-31.
- (225) Didelot-Rousseau MN, Diafouka F, Yayo E, Kouadio LP, Monnet D, Segondy M. HPV seminal shedding among men seeking fertility evaluation in Abidjan, Ivory Coast. *J Clin Virol*. 2007 Jun;39(2):153-5.

- (226) Reich O, Auner H, Puerstner P. Should human papillomavirus testing be performed in men participating in protocols of assisted reproduction? *Int J Androl.* 2012 Feb;35(1):102.
- (227) Kaspersen MD, Bungum M, Fedder J, Bonde J, Larsen PB, J Ingerslev H, Höllsberg P. No increased sperm DNA fragmentation index in semen containing human papillomavirus or herpesvirus. *Andrology.* 2013 May;1(3):361-4.
- (228) Garolla A, De Toni L, Bottacin A, Valente U, De Rocco Ponce M, Di Nisio A, Foresta C. Human Papillomavirus Prophylactic Vaccination improves reproductive outcome in infertile patients with HPV semen infection: a retrospective study. *Sci Rep.* 2018 Jan 17;8(1):912.
- (229) Chan PJ, Seraj IM, Kalugdan TH, King A. Evidence for ease of transmission of human papillomavirus DNA from sperm to cells of the uterus and embryo. *J Assist Reprod Genet.* 1996 Jul;13(6):516-9.
- (230) You H, Liu Y, Agrawal N, Prasad CK, Chiriva-Internati M, Lowery CL, Kay HH, Hermonat PL. Infection, replication, and cytopathology of human papillomavirus type 31 in trophoblasts. *Virology.* 2003 Nov 25;316(2):281-9.
- (231) Henneberg AA, Patton WC, Jacobson JD, Chan PJ. Human papilloma virus DNA exposure and embryo survival is stage-specific. *J Assist Reprod Genet.* 2006 Jun;23(6):255-9.
- (232) Boulenouar S, Weyn C, Van Noppen M, Moussa Ali M, Favre M, Delvenne PO, Bex F, Noël A, Englert Y, Fontaine V. Effects of HPV-16 E5, E6 and E7 proteins on survival, adhesion, migration and invasion of trophoblastic cells. *Carcinogenesis.* 2010 Mar;31(3):473-80.
- (233) Weyn C, Vanderwinden JM, Rasschaert J, Englert Y, Fontaine V. Regulation of human papillomavirus type 16 early gene expression in trophoblastic and cervical cells. *Virology.* 2011 Mar 30;412(1):146-55.
- (234) Skoczyński M, Goździcka-Józefiak A, Kwaśniewska A. Prevalence of human papillomavirus in spontaneously aborted products of conception. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2011 Dec;90(12):1402-5.

(235) Ticconi C, Pietropolli A, Fabbri G, Capogna MV, Perno CF, Piccione E. Recurrent miscarriage and cervical human papillomavirus infection. *Am J Reprod Immunol.* 2013 Nov;70(5):343-6.