



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΗΤΕΡΑΣ-ΠΑΙΔΙΟΥ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ ΔΑΠΟΝΤΕ

Διδακτορική Διατριβή

**«ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ HUMAN PAPILLOMAVIRUS (HPV) ΣΤΙΣ
ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΥΣ ΤΟΥ ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ ΚΑΙ Η
ΑΝΙΧΝΕΥΣΙΜΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΜΕΤΑ ΤΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΤΗΣ
ΥΑΛΟΠΟΙΗΣΗΣ»**

υπό

ΜΑΡΙΑΣ ΑΝΑΓΝΩΣΤΟΥ

Βιοχημικός-Βιοτεχνολόγος

*Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους
των απαιτήσεων για την απόκτηση του
Διδακτορικού Διπλώματος*

Λάρισα, 2023

© 2023 ΜΑΡΙΑ ΑΝΑΓΝΩΣΤΟΥ

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα (σύμφωνα με τις διατάξεις του άρθρου 202, παράγραφος 2 του Ν.5343/1932).

Εγκρίθηκε από τα Μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής (13^η/31-05-2023 ΓΣΕΣ):

1^{ος} Εξεταστής (Επιβλέπων)	Γεώργιος- Σπυρίδων Ανυφαντής Αναπληρωτής Καθηγητής Εμβρυολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
2^{ος} Εξεταστής	Αλέξανδρος Δαπόντε Καθηγητής Μαιευτικής- Γυναικολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
3^{ος} Εξεταστής	Γεώργιος Κουκούλης Ομότιμος Καθηγητής Παθολογικής Ανατομικής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
4^{ος} Εξεταστής	Σαμαρά Μαρία Μόνιμη Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής με έμφαση στη Μοριακή Ιστοπαθολογία, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
5^{ος} Εξεταστής	Θόδου Ελένη- Ειρήνη Επίκουρη Καθηγήτρια Κυτταρολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
6^{ος} Εξεταστής	Μεσσήνη Χριστίνα Μόνιμη Επίκουρη Καθηγήτρια Μαιευτικής- Γυναικολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
7^{ος} Εξεταστής	Γκαράς Αντώνιος Μόνιμος Επίκουρος Καθηγητής Μαιευτικής- Γυναικολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η εκπόνηση της παρούσας διδακτορικής διατριβής πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Μητέρας-Παιδιού και στο Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής του Τμήματος Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, με Επιβλέποντα τον Αναπληρωτή Καθηγητή Εμβρυολογίας κ. Γεώργιο- Σπυρίδωνα Ανυφαντή. Νιώθω χαρούμενη που έχω την ευκαιρία να ευχαριστήσω τους ανθρώπους, που με βοήθησαν για την ολοκλήρωση της συγκεκριμένης διατριβής. Πρωτίστως, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές ευχαριστίες μου στον Επιβλέποντα μου, κ. Γεώργιο- Σπυρίδων Ανυφαντή, ο οποίος μου πρόσφερε τις γνώσεις και τις συμβουλές του. Ως υποψήφιος διδάκτορας εκτίμησα ιδιαίτερα την προσπάθεια του για την δική μου πρόοδο, μέσω καθοδήγησης των βημάτων μου.

Στη συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Μαιευτικής- Γυναικολογίας κ. Αλέξανδρο Δαπόντε, ο οποίος συνεπίβλεψε την παρούσα διατριβή, συνεισφέροντας στην οργάνωση και την διεξαγωγή των πειραματικών διαδικασιών. Ιδιαίτερα ευχαριστώ τον Ομότιμο Καθηγητή κ. Γεώργιο Κουκούλη, που συμμετείχε στην τριμελή συμβουλευτική μου επιτροπή και είχε πάντα την προθυμία να συνεισφέρει στην ερευνητική μελέτη.

Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμότερες ευχαριστίες μου στη Μόνιμη Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής, κα. Μαρία Σαμαρά, η συμβολή της οποίας υπήρξε καθοριστική στην διεξαγωγή και ολοκλήρωση της παρούσας διδακτορικής διατριβής. Χάρη στην προτροπή της, στη δυναμική της και στην ευγένεια του χαρακτήρα της υπήρξε για μένα πρότυπο, παρακινώντας με να προσπαθώ ακόμη περισσότερο. Δεν έχω λόγια να εκφράσω την εκτίμηση μου.

Παράλληλα, ευχαριστώ πολύ τα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής, που με τίμησαν και αφιέρωσαν χρόνο στην διόρθωση του κειμένου και στην παρουσίαση της διατριβής μου.

Θέλω να ευχαριστήσω ιδιαίτερα όλη την οικογένεια μου. Ευχαριστώ τους γονείς μου, Σπύρο και Άσπα, για όλα όσα μου πρόσφεραν προκειμένου να σπουδάσω, για την ακλόνητη πίστη τους στις δικές μου δυνατότητες και την απίστευτη αγάπη τους. Ευχαριστώ την αδερφή μου, που είναι η καλύτερη φίλη μου. Η οικογένεια είναι η βάση για την ευτυχία κάθε ανθρώπου.

Τέλος, ευχαριστώ τον άντρα μου, Δήμο, που είναι το στήριγμα μου σχεδόν τη μισή μου ζωή και δίχως τη παρουσία του και την πολύτιμη συναισθηματική ασφάλεια που μου προσφέρει, δεν θα είχα κάνει ούτε τα μισά από όσα έχω επιτύχει. Όσα ευχαριστώ και αν πω σε σένα δεν θα είναι αρκετά. Αυτό το αφιερώνω με όλη μου την αγάπη σε εσένα και στο κορίτσι μας.

Αναγνώστου Μαρία

ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ

Προσωπικά στοιχεία:

Ονοματεπώνυμο: Μαρία Αναγνώστου

Ηλεκτρονικό ταχυδρομείο:

Αφαίρεση προσωπικών δεδομένων
(Υπηρεσία Βιβλιοθήκης &
Πληροφόρησης Πανεπιστημίου
Θεσσαλίας)

Εκπαίδευση:

02/2019- σήμερα Διδακτορικό Δίπλωμα

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Ιατρικής

Τίτλος: «Η επίδραση του Human Papillomavirus (HPV) στις παραμέτρους του σπέρματος και η ανιχνευσιμότητα του μετά τη διαδικασία της υαλοποίησης»

02/2021- 03/2023 Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης

Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης, Τμήμα Ιατρικής

Τίτλος: «Βιοηθική»

10/2017- 11/2018 Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Ιατρικής

Τίτλος: «Βιολογία της Αναπαραγωγής»

09/2013- 11/2017 Πτυχίο Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας,

Τμήμα Βιοχημείας- Βιοτεχνολογίας

Εργασιακή εμπειρία:

02/2021- 05/2023: Βιολόγος

ΕΛΚΕ, έργο Τ2ΕΔΚ-03079, ΕΠΑνΕΚ 2014-2020

Τίτλος Έργου: «Ένα σύστημα υποβοήθησης λήψης απόφασης βασισμένο σε κλινική διαγνωστική και θεραπευτική για αποδοτική και εξατομικευμένη διαχείριση των παθήσεων του νεφροκυτταρικού καρκίνου (RenArray)»

07/2015- 08/2015: Βιοχημικός- Βιοτεχνολόγος

Εκπαιδευόμενη σε πρακτική άσκηση σε Μικροβιολογικό Εργαστήριο Λάρισας

Δημοσιεύσεις:

Anagnostou M, Samara M, Thodou E, Messini CI, Dafopoulos K, Chatzemeletiou K, et al. The impact of cryopreservation on both sperm HPV-negative and positive subtypes. *Systems Biology in Reproductive Medicine*. 2023;0(0):1–8.

Vlachostergios PJ, Tamposis IA, **Anagnostou M**, Papathanassiou M, Mitrakas L, Zachos I, et al. Hypoxia-Inducible Factor-2-Altered Urothelial Carcinoma: Clinical and Genomic Features. *Curr Oncol*. 2022; 29(11):8638-49.

Mitsogiannis IC, Mitsogianni M, Papathanassiou M, **Anagnostou M**, Tamposis I, Mitrakas L, et al. Current Options for Second-Line Systematic Therapy in Metastatic Renal Cell Carcinoma. *J Kidney Cancer VHL*. 2022; 9(3):29-40.

Samara M, Papathanassiou M, Farmakioti I, **Anagnostou M**, Satra M, Mitrakas L, et al. Renin-Angiotensin System Single Nucleotide Polymorphisms Are Associated with Bladder Cancer Risk. *Curr Oncol*. 2021;28(6):4702-8.

Garagounis C, Tsikou D, Plitsi P, Psarrakou IS, Avramidou M, Stedel C, **Anagnostou M**, Georgopoulou ME, Papadopoulou KK. Lotus SHAGGY like kinase 1 is required to suppress nodulation in *Lotus japonicus*. *The Plant Journal*. 2019;98:228- 242.

Υποτροφίες- Διακρίσεις:

05/2022- 06/2023: Η υλοποίηση της διδακτορικής διατριβής συγχρηματοδοτήθηκε από την Ελλάδα και την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση», 2014-2020, στο πλαίσιο της Πράξης «Ενίσχυση του ανθρώπινου δυναμικού μέσω της υλοποίησης διδακτορικής έρευνας Υποδράση 2: Πρόγραμμα χορήγησης υποτροφιών ΙΚΥ σε υποψηφίους διδάκτορες των ΑΕΙ της Ελλάδας»



Επιχειρησιακό Πρόγραμμα
Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού,
Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση
Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



10/2019-10/2020: Υποτροφία για Υποψήφιους Διδάκτορες από τη Δομή Έρευνας, Καινοτομίας και Αριστείας (ΔΕΚΑ) του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, χρονικής διάρκειας ενός έτους.

Δεξιότητες:

Πτυχίο Αγγλικής Γλώσσας:

University of Michigan, Certificate of Proficiency in English

Πτυχίο Γαλλικής Γλώσσας:

CERTIFICAT DE LANGUE FRANCAISE-SORBONNE B2

Πτυχίο Γερμανικής Γλώσσας:

Κρατικό Πιστοποιητικό Γλωσσομάθειας B2

Πιστοποιητικό επάρκειας γνώσης υπολογιστών:

Πιστοποιητικό Γνώσης Πληροφορικής ή Χειρισμού H/Y UNICERT PRIMARY
(Windows, Word, Excel, Outlook, Access, Powerpoint)

**«ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ HUMAN PAPILLOMAVIRUS (HPV) ΣΤΙΣ
ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΥΣ ΤΟΥ ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ ΚΑΙ Η
ΑΝΙΧΝΕΥΣΙΜΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΜΕΤΑ ΤΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΤΗΣ
ΥΑΛΟΠΟΙΗΣΗΣ»**

MARIA ΑΝΑΓΝΩΣΤΟΥ

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Ιατρικής, 2023

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. **Γεώργιος-Σπυρίδων Ανυφαντής** Αναπληρωτής Καθηγητής Εμβρυολογίας, Τμήμα
Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (**Επιβλέπων**)
2. **Αλέξανδρος Δαπόντε** Καθηγητής Μαιευτικής- Γυναικολογίας, Τμήμα Ιατρικής,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
3. **Γεώργιος Κουκούλης** Ομότιμος Καθηγητής Παθολογικής Ανατομικής, Τμήμα
Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Περίληψη

Οι ιοί των ανθρώπινων θηλωμάτων (HPV) είναι οι πιο συχνά σεξουαλικά μεταδιδόμενοι ιοί και ενοχοποιούνται για ορισμένους καρκίνους στον άνθρωπο. Διάφοροι υπότυποι του ιού HPV, είτε υψηλού είτε χαμηλού κινδύνου, έχουν βρεθεί σε δείγματα σπέρματος. Επίσης, έχει αποδειχθεί ότι οι παράμετροι του σπέρματος μπορεί να επηρεάζονται αρνητικά, όταν υπάρχει μόλυνση από τον HPV στο δείγμα σπέρματος. Βέβαια, τα δεδομένα για την επίδραση του ιού στις παραμέτρους του σπέρματος είναι αντικρουόμενα. Εκτός από όλα αυτά, δεν είναι ακόμα γνωστή η επίδραση της κρυοσυντήρησης στην ευαισθησία και στην αντοχή του ιού HPV, αν και η κρυοαντίσταση άλλων ιών έχει αποσαφηνιστεί εδώ και πολύ καιρό. Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι να αξιολογηθεί, πρώτα, ο επιπολασμός του HPV (υπότυποι χαμηλού και υψηλού κινδύνου) και, δεύτερον, να διευκρινιστεί εάν η κρυοσυντήρηση των δειγμάτων σπέρματος, που είναι θετικά για τον ιό, έχει κάποια επίδραση στη βιωσιμότητα του HPV. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκαν εβδομήντα οχτώ (78) δείγματα σπέρματος από αντίστοιχο αριθμό ασθενών, οι οποίοι προσήλθαν στην ΜΙΥΑ της Μαιευτικής και Γυναικολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας για διερεύνηση της γονιμότητά τους. Αφού δόθηκε ενημερωμένη συγκατάθεση των ασθενών, πραγματοποιήθηκε ανάλυση σπέρματος σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες του Παγκοσμίου Οργανισμού Υγείας του 2010. Μετά τη ρευστοποίηση του δείγματος και την μικροσκοπική του εκτίμηση, κάθε δείγμα σπέρματος χωρίστηκε σε τέσσερα ίσα τμήματα. Το πρώτο (που θεωρήθηκε ως φρέσκο) αξιολογήθηκε για τον επιπολασμό του HPV, ενώ τα άλλα τρία τμήματα του δείγματος κρυοσυντηρήθηκαν με την προσθήκη ίσης ποσότητας κρυοπροστατευτικού διαλύματος και βυθίστηκαν στο υγρό άζωτο (LN₂). Καθένα από τα τρία τμήματα αποψύχθηκε τρεις, έξι και δώδεκα μήνες αργότερα, αντίστοιχα, ώστε να αξιολογηθεί εάν υπάρχει περίοδος χρονικής ανθεκτικότητας του επιπολασμού του HPV. Η παρουσία DNA του ιού και ο προσδιορισμός του υποτύπου πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (RT-PCR). Η λοίμωξη από τον ιό HPV βρέθηκε σε έντεκα δείγματα σπέρματος, καταδεικνύοντας επιπολασμό του HPV στο 14,1% (11/78). Μεταξύ των HPV-θετικών δειγμάτων, 6/11 ήταν θετικά για υψηλού κινδύνου υπότυπους, ενώ τα υπόλοιπα δείγματα (5/11) για

χαμηλού κινδύνου υπότυπους. Οι παράμετροι του σπέρματος δεν διέφεραν μεταξύ των θετικών και αρνητικών δειγμάτων για τον ιό. Επιπλέον, τα φρέσκα δείγματα με HR-HPV παρουσίασαν υψηλότερες τιμές κινητικότητας των σπερματοζωαρίων σε σύγκριση με τα δείγματα LR-HPV ($60\% \pm 2,7$ vs $45,6\% \pm 3,7$, $p < 0,05$), ενώ ο όγκος του σπέρματος στα δείγματα HR-HPV ήταν σημαντικά χαμηλότερος από τον αντίστοιχο όγκο των δειγμάτων με LR-HPV ($2,26 \pm 0,2\text{ml}$ vs $3,5 \pm 0,6\text{ml}$, $p < 0,05$). Είναι ενδιαφέρον ότι η κρυοσυντήρηση των HPV-θετικών δειγμάτων είχε ως αποτέλεσμα τη βιωσιμότητα και τη χρονική αντοχή του HPV σε όλα τα δείγματα HR-HPV, κάτι που δεν συνέβη στην περίπτωση των δειγμάτων με LR-HPV. Συμπερασματικά, αν και ο αριθμός των δειγμάτων της μελέτης είναι σχετικά μικρός, τα δείγματα σπέρματος, που είχαν μολυνθεί από HR-HPV, επιδεικνύουν χαμηλότερες τιμές στις παραμέτρους του σπέρματος και δραστηριότητα αντοχής στο χρόνο κατά την κρυοσυντήρηση.

Abstract

Human papillomavirus (HPV) is the most commonly sexually transmitted virus and is responsible for carcinogenesis in human. It is well known that various human papillomavirus (HPV) genotypes, either of high or low risk, are present in semen specimens. Also, it has been demonstrated that sperm parameters might be negatively affected when HPV infection is present in the sperm sample. The data on the effect of the HPV on sperm parameters are controversial. Besides all these, the effect of cryopreservation on HPV sensitivity and resistance is not known, although the cryo-resistance of other viruses has been elucidated a long time ago. The aim of the present study is to evaluate first the prevalence of HPV (both high and low-risk genotypes) and secondly to elucidate whether cryopreservation of sperm HPV-positive samples has any effect on the viability of HPV. For this purpose, a cohort of seventy-eight (78) sperm specimens was used from a respective number of patients, under investigation for fertility. After giving informed consent, semen analysis was performed according to World Health Organization Guidelines 2010. After liquefaction of sperm, each sperm sample was divided into four equal aliquots. The first one (considered fresh) was evaluated for the prevalence of HPV, while the other three aliquots were cryopreserved by adding an equal quantity of cryoprotectant and plunged into the Liquid Nitrogen (LN2). Each of the three aliquots was thawed three, six, and twelve months later, respectively, so as to evaluate whether there is a time-resistance period of HPV prevalence. We performed real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) for HPV detection in semen samples. HPV infection was found to be in eleven sperm samples, demonstrating a 14.1% (11/78) HPV prevalence. Among the HPV-positive samples, six of them (6/11) were high-risk and the remaining (5/11) were low-risk genotypes. This study did not observe an association between HPV presence in semen and impairment of semen quality. Moreover, the high-risk fresh samples demonstrated higher motility values than the low-risk samples ($60\% \pm 2.7$ vs $45.6\% \pm 3.7$, $p < 0.05$), while semen volume in the high-risk samples was significantly lower than the respective volume in the low-risk samples ($2.26 \pm 0.2\text{ml}$ vs $3.5 \pm 0.6\text{ml}$, $p < 0.05$). Interestingly, cryopreservation of the HPV-positive samples resulted in the sustainability and time-resistance of HPV in all high-risk HPV positive samples,

something that was not the case with the low-risk HPV positive samples. Conclusively, although the cohort sample is relatively small, sperm samples infected with high-risk HPV, demonstrate lower sperm parameters and time-resistance activity during cryopreservation.

Συντομογραφίες

ACIP: Advisory Committee on Immunization Practices
AIDS: Acquired Immune Deficiency Syndrome
ART: Assisted Reproductive Technology
BBV: Blood-borne virus
bp: base pairs
Brd4: Bromodomain containing protein 4
COSHH: Association of Clinical Embryologist's and Control of Substances Hazardous to Health
DBD: DNA binding domain
E2BS: E2-binding sites
EGFR: epidermal growth factor receptor
ESHRE: European Society of Human Reproduction and Embryology
FADD: Fas-associated death domain
HBV: Hepatitis B virus
HCV: Hepatitis C virus
HFEA: Human Fertilisation and Embryology Authority
HGFR: Hepatocyte growth factor receptor
HIV: Human immunodeficiency virus
HSPG: Heparan Sulfate Proteoglycans
HPV: Human Papillomavirus
IARC: International Agency for Research on Cancer
ICSI: Intracytoplasmic sperm injection
ICTV: International Committee on Taxonomy of Viruses
IUI: Intrauterine Insemination
IVF: In vitro fertilization
LCR: Long Control Region
LN₂: Liquid Nitrogen
MAGI-1: Membrane-associated guanylate kinase with inverted orientation 1
MAPK: mitogen- activated protein kinase
MCM7: Minichromosome Maintenance Complex Component 7
MHC: Major histocompatibility complexes
MUPP1: Multiple PD2 protein 1

NES: Nuclear export signal
NLS: Nuclear localization
ORFs: Open reading frames
PESA: Percutaneous epididymal sperm aspiration
PUFA: Polyunsaturated fatty acids
PV: Papilloma Virus
RCF: Replication factor C
RDR: Recombination-dependent replication
ROS: Reactive Oxygen Species
RRP: Respiratory papillomatosis
TESA: Testicular sperm aspiration
TESE: Testicular sperm extraction
TRAIL: tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand
VLPs: Virus-like particles
XRCC1: X-ray repair cross complementing 1

Πίνακας Περιεχομένων

Εισαγωγή

Κεφάλαιο 1 Κρυοσυντήρηση σπέρματος... Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.

1.1	Βασικές αρχές κρυοσυντήρησης σπέρματος	19
1.2	Κλινική εφαρμογή της κατάψυξης του σπέρματος	22
1.3	Τεχνικές κατάψυξης και απόψυξης σπέρματος	23
1.4	Επίδραση της κατάψυξης στις παραμέτρους του σπέρματος.....	26
1.5	Κρυοσυντήρηση και ποσοστό κύησης	28
1.6	Κατάψυξη σπέρματος σε ασθενείς με αιματογενώς μεταδιδόμενους ιούς.....	29

Κεφάλαιο 2 Ο ιός των ανθρώπινων θηλωμάτων (HPV)

2.1	Ταξινόμηση των ιών Papilloma.....	34
2.2	Δομή του HPV ιού.....	36
2.2.1	Η πρωτεΐνη L1 του ιού	37
2.2.2	Η πρωτεΐνη L2 του ιού	38
2.3	Οργάνωση του γονιδιώματος του ιού	39
2.3.1	Η πρωτεΐνη E1 του ιού	41
2.3.2	Η πρωτεΐνη E2 του ιού	43
2.3.3	Η πρωτεΐνη E4 του ιού	44
2.3.4	Η πρωτεΐνη E5 του ιού	45
2.3.5	Οι πρωτεΐνες E6 και E7 του ιού	46
2.4	Ο κύκλος ζωής του ιού	49
2.4.1	Είσοδος του ιού στο κύτταρο-ξενιστή	50
2.4.2	Αντιγραφή του ιού	51
2.4.3	Μεταγραφή του ιού	53

2.4.4	Συσκευασία του ιϊκού γονιδιώματος και απελευθέρωση των ιϊκών σωματιδίων.....	53
2.5	Ανίχνευση του HPV στο σπέρμα	54
2.5.1	Συχνότητα του ιού HPV στους άρρενες	54
2.5.2	Επίδραση του ιού HPV στις παραμέτρους του σπέρματος	57
2.5.3	Επίδραση του ιού HPV στη γονιμοποίηση και στα ποσοστά κύησης.....	57
2.6	Εμβολιασμός.....	58
	Κεφάλαιο 3 Σκοπός.....	60
	Κεφάλαιο 4 Υλικά και Μέθοδοι	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.61
4.1	Ομάδα μελέτης	61
4.2	Συλλογή σπέρματος και επεξεργασία.....	61
4.3	Απομόνωση DNA	63
4.4	Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός του DNA.....	64
4.5	Ανίχνευση του HPV ιού.....	67
4.5.1	Ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (Quantitative Real Time PCR, QRT-PCR).....	68
4.5.2	Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την εύρεση του γονοτύπου του ιού	73
4.5.3	PCR με τη χρήση ειδικών εκκινητών και ηλεκτροφόρηση	74
4.6	Στατιστική ανάλυση	75
	Κεφάλαιο 5 Αποτελέσματα	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.77
5.1	Επιδημιολογικά στοιχεία	77
5.2	Ανίχνευση και τυποποίηση του ιού HPV	78
5.2.1	Ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (Quantitative Real Time PCR, QRT-PCR).....	78

5.2.2 PCR με τη χρήση ειδικών εκκινήτων	81
5.3 Επίδραση του ιού στις παραμέτρους του σπέρματος πριν και μετά την κατάψυξη	84
Κεφάλαιο 6 Συζήτηση	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.89
Κεφάλαιο 7 Σύνοψη διατριβής- Συμπεράσματα	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.96
Βιβλιογραφία	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.97

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

1. Κρυοσυντήρηση σπέρματος

Η κρυοσυντήρηση του σπέρματος εντάσσεται στον ευρύτερο τομέα της κρυοβιολογίας. Τα τελευταία χρόνια, η ανάπτυξη τεχνικών κατάψυξης, οι οποίες παρέχουν νέες ευκαιρίες για αναπαραγωγή στον άνθρωπο και στα ζώα, έχει οδηγήσει σε σημαντική πρόοδο στον τομέα αυτό. Ο όρος «κρυοβιολογία» αναφέρεται στην επιστήμη που εξετάζει τις επιδράσεις που έχει η υπό του μηδενός θερμοκρασία στα κύτταρα και μελετά τη συντήρηση κυττάρων/οργανισμών σε χαμηλές θερμοκρασίες. Αξίζει να σημειωθεί ότι η συντήρηση των κυττάρων και ορισμένων ιστών πραγματοποιείται στις θερμοκρασίες από -80°C έως -196°C , ενώ η συντήρηση των οργάνων γίνεται συνήθως σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες του μηδενός και μικρότερες των 37°C .

Όσον αφορά την κρυοβιολογία των αναπαραγωγικών κυττάρων (ωοκυττάρων και σπερματοζωαρίων), η κρυοσυντήρηση του σπέρματος οδήγησε σε αλματώδη ανάπτυξη του τομέα και έχει πλέον ευρεία χρήση στην αναπαραγωγική ιατρική, λόγω της μεγάλης κρυοανθεκτικότητας. Σημαντικό πλεονέκτημα της τεχνολογίας της κρυοβιολογίας είναι ότι «παγώνει» το χρόνο και με τον τρόπο αυτό, συμβάλλει στην αντιμετώπιση προβλημάτων που οφείλονται στην ηλικία ή την απώλεια γονιμότητας. Μία άλλη εφαρμογή της κρυοβιολογίας αφορά την προσπάθεια διατήρησης της γονιμότητας των γυναικών και μείωσης του ποσοστού των πολύδυμων κήσεων (Tiitinen *et al.* 2012).

1.1 Βασικές αρχές κρυοσυντήρησης σπέρματος

Η κρυοσυντήρηση σπέρματος αναφέρεται στη διαδικασία διατήρησης των σπερματοζωαρίων σε θερμοκρασίες υπό το μηδέν για ορισμένο χρονικό διάστημα. Για να επιτευχθεί η μακροχρόνια αποθήκευση των κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων και των σπερματοζωαρίων, ο μεταβολισμός τους πρέπει να διακοπεί και να

καθυστερήσουν οι κυτταρικές τους αντιδράσεις. Αυτό καθίσταται εφικτό με τη χρήση του υγρού αζώτου (LN_2)¹, στους -196°C , καθώς σε τόσο εξαιρετικά χαμηλές θερμοκρασίες δεν είναι δυνατή η βιοχημική δραστηριότητα των κυττάρων λόγω ανεπάρκειας θερμικής ενέργειας. Επιπρόσθετα, στη θερμοκρασία αυτή οι μεταβολικές δραστηριότητες των κυττάρων περιορίζονται λόγω της απουσίας του υγρού νερού (5). Η αποθήκευση σε υγρό άζωτο αποτελεί τη βασική προσέγγιση για την κατάψυξη του σπέρματος. Σημειώνεται ότι το μεγαλύτερο χρονικό διάστημα επιτυχούς κρυοσυντήρησης του ανθρώπινου σπέρματος είναι τα 21 έτη.

Κάνοντας μία ιστορική αναδρομή, οι πρώτες προσπάθειες επιτυχημένης κρυοσυντήρησης σπέρματος πραγματοποιήθηκαν από τον Spallanzani (1776). Με το πέρασμα των χρόνων, βελτιώθηκαν οι συνθήκες κατάψυξης με αποτέλεσμα να επιτευχθεί η επιβίωση των σπερματοζωαρίων σε τόσο χαμηλές θερμοκρασίες. Ωστόσο, η πρόκληση εξακολουθούσε να υπάρχει, καθώς ο επόμενος στόχος ήταν τα κύτταρα να αντέχουν σε αλλαγές θερμοκρασίας κατά τη διαδικασία της ψύξης- απόψυξης καθώς οι ωσμωτικές αλλαγές που λάμβαναν χώρα κατά την απόψυξη οδηγούσαν σε μεγάλο βαθμό στην καταστροφή των σπερματοζωαρίων. Προσπάθειες επίλυσης του συγκεκριμένου προβλήματος έγιναν το 1949, όταν ο Polge παρατήρησε ότι η γλυκερόλη (διαπερατό διάλυμα για την κυτταρική μεμβράνη) έχει προστατευτικό ρόλο για τα κύτταρα στις χαμηλές θερμοκρασίες. Η συγκεκριμένη ανακάλυψη χαρακτηρίστηκε καθοριστικής σημασίας για την καθιέρωση της σύγχρονης κρυοβιολογίας του σπέρματος. Οι Sherman και Bunge (1953) έκαναν απλή ψύξη των σπερματοζωαρίων αλλά και αποθήκευση τους σε ξηρό πάγο (-75°C). Στα πλαίσια βελτίωσης των μεθόδων κατάψυξης, ο Sherman συνέχισε τις έρευνες και το 1963 πραγματοποιώντας κρυοσυντήρηση σπέρματος σε υγρό άζωτο, διαπίστωσε την υπεροχή της νέας αυτής τεχνικής λόγω αποφυγής της δραματικής μείωσης της κινητικότητας των σπερματοζωαρίων. Στα χρόνια που ακολούθησαν μέχρι σήμερα, συνεχίστηκε η βελτιστοποίηση των υπάρχοντων πρωτοκόλλων.

Τα σπερματοζωάρια έχουν μικρό μέγεθος με μεγάλη επιφάνεια. Περιέχουν σημαντική ποσότητα νερού και παρουσιάζουν υψηλού βαθμού ρευστότητα στη μεμβράνη τους, λόγω της υψηλής περιεκτικότητας της μεμβράνης σε στερόλη.

¹ LN_2 : Liquid Nitrogen

Επιπρόσθετα, διαθέτουν υψηλές ποσότητες σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA)², γεγονός που τους επιτρέπει να επιβιώνουν στις ραγδαίες πτωτικές μεταβολές της θερμοκρασίας, καθώς τα υψηλά επίπεδα χοληστερόλης σταθεροποιούν τις μεμβράνες τους κατά τη διαδικασία της ψύξης. Η λιπιδική σύνθεση της μεμβράνης των σπερματοζωαρίων αποτελεί επομένως σημαντικό παράγοντα για την κρυανοχή αλλά και την ευαισθησία τους στο κρύο (Hezavehei *et al.* 2018). Ωστόσο, η κυτταρική επιβίωση εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό και από τον ρυθμό ψύξης/απόψυξης που πραγματοποιείται η διαδικασία της κρυοσυντήρησης. Αναλυτικότερα, ο βαθμός ψύξης πρέπει να είναι αρκετά αργός, ώστε να αποφεύγεται ο σχηματισμός ενδοκυττάρων κρυστάλλων πάγου, αλλά και αρκετά γρήγορος, ώστε να αποφεύγεται η αφυδάτωση των κυττάρων που ακολουθείται από το γρήγορο ρυθμό απόψυξης. Οι κρυσταλλικές δομές (πάγος) είναι ελαφρύτερες και καταλαμβάνουν μεγαλύτερο όγκο συγκριτικά με το υγρό νερό. Η διαστολή των κρυστάλλων πάγου κατά τη στερεοποίηση του νερού προκαλεί βλάβη στα ενδοκυττάρια οργάνδια (Indian Fertility Society 2017).

Καθώς το νερό στερεοποιείται, οι διαλυμένες σε αυτό ουσίες αποκλείονται από τον σχηματιζόμενο πάγο, οδηγώντας σε μείωση του σημείου πήξης του υπόλοιπου διαλύματος. Με τον τρόπο αυτό, το διάλυμα συμπυκνώνεται σε σημαντικό βαθμό με την παροδική πτώση της θερμοκρασίας, με αποτέλεσμα να επέρχεται το ωσμωτικό σοκ. Περαιτέρω βλάβη μπορεί να συμβεί στο κύτταρο λόγω διαφοράς στην ωσμωτικότητα, προκαλώντας την απελευθέρωση δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS)³ που είναι εξαιρετικά επιζήμιες για τα σπερματοζώαρια (Indian Fertility Society 2017). Η διαδικασία ψύξης-απόψυξης, ειδικά στο εύρος θερμοκρασιών από -10°C έως -60°C, μπορεί να είναι θανατηφόρα για τα κύτταρα (Isachenko *et al.* 2011). Πιο συγκεκριμένα, τα σπερματοζώαρια πρέπει να υποστούν αυτή τη μεταβολή της θερμοκρασίας δύο φορές κατά την διαδικασία ψύξης-απόψυξης. Κατά την απόψυξη, το νερό εισέρχεται ξανά στο σπερματοζώαριο και έτσι ο ενδοκυτταρικός όγκος αποκαθίσταται με το ρίσκο ωστόσο να σχηματιστούν κρύσταλλοι πάγου και να επέλθει κυτταρική βλάβη. Ως εκ τούτου, οποιοδήποτε πρωτόκολλο κρυοσυντήρησης που εξασφαλίζει καλή βιωσιμότητα του σπέρματος μετά την απόψυξη θα πρέπει να στοχεύει στον ελεγχόμενο

² PUFA: Polyunsaturated fatty acids

³ ROS: Reactive Oxygen Species

όγκο των κυττάρων και να αποτρέπει τη βλάβη της μεμβράνης (Indian Fertility Society 2017).

1.2 Κλινική εφαρμογή της κατάψυξης του σπέρματος

Η κρυοσυντήρηση σπέρματος χρησιμοποιείται ευρέως ως τεχνική ρουτίνας για τη διατήρηση της γονιμότητας, τη θεραπεία της υπογονιμότητας και τη δημιουργία τράπεζας δωρητών. Στις μέρες μας, οι άνδρες έρχονται αντιμέτωποι με ορισμένες αντίξοες καταστάσεις που δυνητικά απειλούν τη γονιμότητα τους, όπως το άγχος, η παχυσαρκία, η μη ισορροπημένη διατροφή αλλά και συνήθειες του τρόπου ζωής τους (αλκοόλ, κάπνισμα). Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι οι παραπάνω συνήθειες επιδρούν αρνητικά στην ποιότητα του σπέρματος.

Ωστόσο, η διατήρηση του σπέρματος με τη διαδικασία της κρυοσυντήρησης μπορεί να επιλέγεται και για λόγους υγείας, σε περιπτώσεις όπως:

- Διατήρηση του σπέρματος σε ασθενείς με καρκίνο πριν την έναρξη θεραπείας. Η χημειο- και η ακτινοθεραπεία ενδέχεται να οδηγήσουν σε υπογονιμότητα ή/και μόνιμη στειρότητα ενός άνδρα (Williams 2010).
- Πριν την υποβολή σε χειρουργική επέμβαση που μπορεί να επηρεάσει τη λειτουργία των όρχεων ή να οδηγήσει σε οποιαδήποτε μορφή σεξουαλικής δυσλειτουργίας (Ajala *et al.* 2010).
- Παρουσία κάποιου αυτοάνοσου νοσήματος ή AIDS⁴ που επηρεάζει τη γονιμότητα.
- Στα πλαίσια πραγματοποίησης υποβοηθούμενης αναπαραγωγής, το σπέρμα καταψύχεται και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για IUI⁵ ή για εξωσωματική γονιμοποίηση μέσω IVF⁶ ή ICSI⁷. (Poongothai 2013, Sheykhhasan *et al.* 2016)
- Σε ασθενείς με χαμηλή ποιότητα σπέρματος (όπως ολιγοζωοσπερμία) (Ragheb *et al.* 2010).
- Χειρουργική ανάκτηση σπερματοζωαρίων, όπως η διαδερμική αναρρόφηση σπερματοζωαρίων από την επιδιδυμίδα (PESA)⁸, η αναρρόφηση

⁴ AIDS: Acquired Immune Deficiency Syndrome

⁵ IUI: Intrauterine Insemination

⁶ IVF: In vitro fertilization

⁷ ICSI: Intracytoplasmic sperm injection

⁸ PESA: Percutaneous epididymal sperm aspiration

σπερματοζωαρίων από τον όρχι (TESA)⁹ ή η βιοψία όρχεως για τη λήψη σπερματοζωαρίων (TESE)¹⁰ (Gangrade 2013).

- Σε ασθενείς με κάκωση του νωτιαίου μυαλού όπου γίνεται υποβοηθούμενη εκσπερμάτωση (Indian Fertility Society 2017).
- Σε υψηλού κινδύνου επαγγέλματα, που υπάρχει έκθεση σε χημικές ουσίες, υψηλές θερμοκρασίες ή/ και ακτινοβολία.
- Σε περιπτώσεις άγχους ή απουσίας του συζύγου. Η κρυοσυντήρηση του σπέρματος δίνει τη δυνατότητα στη σύζυγο να συνεχίσει τον αναπαραγωγικό προγραμματισμό ακόμα και όταν ο σύζυγος απουσιάζει, π.χ. για επαγγελματικούς λόγους. Επιπρόσθετα, το άγχος ενδέχεται να αποτελέσει ανασταλτικό παράγοντα, που μπορεί να οδηγήσει σε προβλήματα συλλογής σπέρματος σε μία δεδομένη χρονική στιγμή, όπως είναι η στιγμή της ωοληψίας.

Σημειώνεται επίσης, ότι η κατάψυξη του σπέρματος αποτελεί μία εναλλακτική οδό απόκτησης απογόνων στα υπογόνιμα ζευγάρια, καθώς το κατεψυγμένο σπέρμα από υγιείς και γόνιμους δότες μπορεί να οδηγήσει σε επιτυχή εγκυμοσύνη (Di Santo *et al.* 2012).

1.3 Τεχνικές κατάψυξης και απόψυξης σπέρματος

Οι τεχνικές κατάψυξης που χρησιμοποιούνται για το σπέρμα περιλαμβάνουν δύο βασικές προσεγγίσεις: τη συμβατική κατάψυξη και την υαλοποίηση. Στις συμβατικές μεθόδους κατάψυξης, περιλαμβάνονται η αργή και η γρήγορη (ή ταχεία) κατάψυξη. Η αργή κατάψυξη μπορεί να είναι χειροκίνητη ή αυτόματη και λαμβάνει χώρα σταδιακά. Τα σπερματοζωάρια υποβάλλονται σε προοδευτική ψύξη σε διάστημα εντός 2- 4 ωρών με τη χρήση αυτοματοποιημένου ή μη καταψύκτη (Di Santo *et al.* 2012).

Η γρήγορη κατάψυξη πραγματοποιείται σε χρονικό διάστημα που δεν ξεπερνά τα 30 λεπτά. Στο διάστημα αυτό, προστίθεται στο δείγμα σπέρματος ίσος όγκος κρυοπροστατευτικού παράγοντα (CPA)¹¹ με τη μορφή σταγόνων και στη συνέχεια το μίγμα φορτώνεται σε περιέκτες (καλαμάκια ή κρυοφιαλίδια). Ακολουθεί περαιτέρω

⁹ TESA: Testicular sperm aspiration

¹⁰ TESE: Testicular sperm extraction

¹¹ CPA: Cryoprotective agent

επώαση στους 4°C για 10 λεπτά και τοποθέτηση 15-20 cm πάνω από το επίπεδο του LN₂ για 15 λεπτά (-80°C) (Indian Fertility Society 2017). Η διαδικασία ολοκληρώνεται με βύθιση του δείγματος στο υγρό άζωτο.

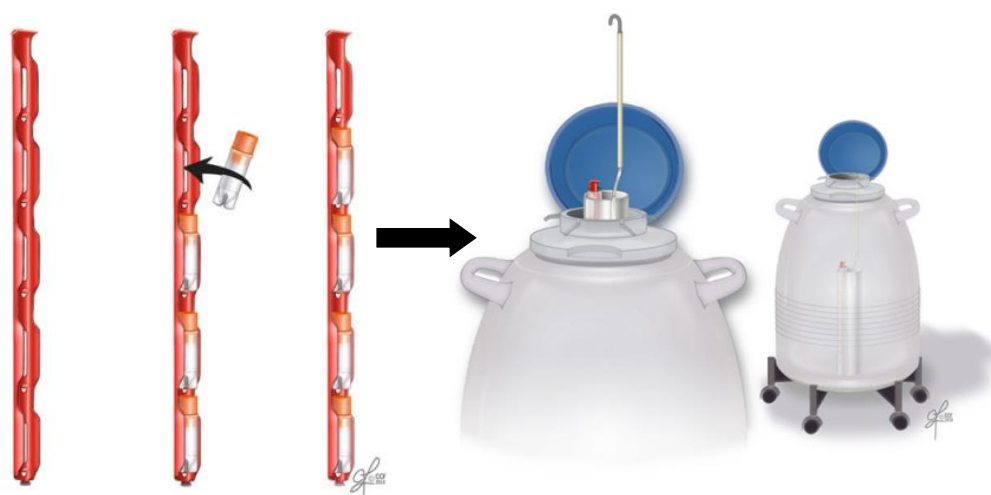
Σε περιπτώσεις αυτοματοποιημένου συστήματος κατάψυξης, χρησιμοποιούνται προγραμματισμένοι καταψύκτες, με λογισμικό το οποίο επιτυγχάνει ψύξη από τους 20°C στους -80°C με ρυθμό αρχικά 1,5°C/λεπτό και στη συνέχεια 6°C/λεπτό. Μόλις ολοκληρωθεί η διαδικασία της κατάψυξης, τα καλαμάκια βυθίζονται στους -196°C. Είναι γνωστό ότι η συμβατική αργή κατάψυξη οδηγεί σε βλάβη των σπερματοζωαρίων λόγω σχηματισμού κρυστάλλων πάγου, συρρίκνωσής τους ή λόγω ωσμωτικών αλλαγών (Hezavehei *et al.* 2018). Αξίζει να σημειωθεί ότι οι διαφορές μεταξύ των δύο μεθόδων συμβατικής κατάψυξης (αργή και ταχεία) έγκεινται στον χρόνο εκτέλεσης, στο ρυθμό κατάψυξης και στη συγκέντρωση των κρυοπροστατευτικών υλικών.

Στα πλαίσια βελτίωσης και εξάλειψης των προβλημάτων που δημιουργούνται κατά τη χρήση της αργής κατάψυξης, επιτεύχθηκε μία πιο γρήγορη προσέγγιση στην κρυοσυντήρηση που καλείται υαλοποίηση. Η τεχνική εφαρμόστηκε αρχικά σε έμβρυα και ωάρια και στη συνέχεια και σε σπερματοζωάρια (Konc *et al.* 2014, Le *et al.* 2019, Berkovitz *et al.* 2018). Σε προηγούμενες μελέτες αναφέρονται πρωτόκολλα, που χρησιμοποιούν διαφορετικούς φορείς και μεθόδους τυποποίησης της διαδικασίας υαλοποίησης. Ανεξάρτητα από το πρωτόκολλο, που έχει χρησιμοποιηθεί, η διαδικασία βασίζεται στην κατάψυξη του σπέρματος με άμεση εμβάπτιση του στο υγρό άζωτο (Indian Fertility Society 2017). Η άμεση εμβάπτιση αποτρέπει το σχηματισμό ενδοκυττάρων κρυστάλλων πάγου και συνεπώς την επακόλουθη βλάβη. Στην υαλοποίηση, το νερό στερεοποιείται ως άμορφη δομή που μοιάζει με γυαλί και όχι ως πάγος (Isachenko *et al.* 2011). Η υαλοποίηση απαιτεί εξαιρετικά υψηλούς ρυθμούς ψύξης (>100.000°C/λεπτό), γεγονός που αποτρέπει την ωσμωτική βλάβη και τη συρρίκνωση των κυττάρων και επιτυγχάνεται με ειδικά σχεδιασμένα μέσα, όπως τα ανοιχτά καλαμάκια, το Cryotop και το Cryoleaf (Indian Fertility Society 2017).

Όσον αφορά στη σύγκριση μεταξύ των μεθόδων ταχείας κατάψυξης και υαλοποίησης, μέχρι στιγμής είναι άγνωστο ποια από τις δύο μεθόδους είναι καλύτερη για την κρυοσυντήρηση του ανθρώπινου σπέρματος. Παλιότερες μελέτες έχουν δείξει συγκρίσιμα αποτελέσματα ως προς την κινητικότητα του σπέρματος, την ικανότητα γονιμοποίησης και την ακεραιότητα του DNA (Isachenko *et al.* 2005, Isachenko *et al.*

2011, Agha-Rahimi *et al.* 2014). Ωστόσο, σε μία μελέτη των Liu και συνεργατών (2016) βρέθηκε ότι το σπέρμα, που επωάστηκε αρχικά σε ατμούς υγρού αζώτου (ταχεία κατάψυξη), είχε μεγαλύτερη κινητικότητα μετά την απόψυξη συγκριτικά με εκείνο που βυθίζεται απευθείας σε υγρό άζωτο (υαλοποίηση). Η ταχεία κατάψυξη και η υαλοποίηση φαίνεται ότι είναι πιο αποδοτικές από άποψης χρόνου, επεξεργασίας και κόστους, και με καλύτερα αποτελέσματα συγκριτικά με την αργή κατάψυξη ως προς την κρυοπροστασία, αλλά και στην επίδραση που έχουν στην κινητικότητα και στην ακεραιότητα του DNA των σπερματοζωαρίων (Slabbert *et al.* 2015, Aizpurua *et al.* 2017).

Η κατάψυξη των σπερματοζωαρίων, ανεξαρτήτως της μεθόδου που επιλέγεται, πραγματοποιείται σε κρυοφιαλίδια (ή αμπούλες) ή ράβδους-καλαμάκια (Εικόνα 1). Τα κρυοφιαλίδια τοποθετούνται σε μεταλλικές ράβδους, οι οποίες βρίσκονται μέσα σε κάνιστρα εντός του δοχείου με υγρό άζωτο. Τα περισσότερα εργαστήρια πραγματοποιούν την ταχεία κατάψυξη σπέρματος σε κρυοφιαλίδια. Η μέθοδος αυτή δίνει σημαντικά ποσοστά επιβίωσης μετά την απόψυξη, παρουσιάζει, ωστόσο, ως μειονέκτημα μη-ομοιόμορφο ρυθμό κατάψυξης τόσο εντός όσο και μεταξύ των κρυοφιαλιδίων του ίδιου δείγματος.



Εικόνα 1. Τα κρυοφιαλίδια στερεώνονται σε μεταλλικές ράβδους, οι οποίες στη συνέχεια τοποθετούνται σε κάνιστρα μέσα στο δοχείο με υγρό άζωτο (Zsolt *et al.* 2017).

Η διαδικασία της απόψυξης, θεωρείται εξίσου σημαντική με την κατάψυξη. Το εργαστηριακό πρωτόκολλο που χρησιμοποιείται για την απόψυξη ενδέχεται να διαφοροποιείται μεταξύ των εργαστηρίων, δεν ξεπερνά ωστόσο τα 15-20 λεπτά σε διάρκεια. Κατά την απόψυξη, το κύτταρο πρέπει να έχει το χρόνο να ανακτήσει τις φυσιολογικές βιολογικές του λειτουργίες, αποφεύγοντας τις απότομες θερμοκρασιακές μεταβολές, που μπορεί να προκαλέσουν κάποια βλάβη.

1.4 Επίδραση της κατάψυξης στις παραμέτρους του σπέρματος

Τα σπερματοζωάρια είναι λιγότερο επιρρεπή στις βλάβες της κατάψυξης συγκριτικά με άλλους τύπους κυττάρων. Ωστόσο, έχουν αναφερθεί σημαντικές δομικές και λειτουργικές βλάβες στο σπέρμα μετά την κρυοσυντήρηση. Οι βλάβες που προκαλούνται στα σπερματοζωάρια από τη διαδικασία της κρυοσυντήρησης αφορούν κατά κύριο λόγο:

- A) στο θερμικό σοκ λόγω δραστικών θερμοκρασιακών μεταβολών,
- B) στο ωσμωτικό σοκ,
- Γ) στην αφυδάτωση των κυττάρων και
- Δ) στο σχηματισμό ενδοκυττάρων κρυστάλλων πάγου.

Όλοι οι προαναφερθέντες παράγοντες οδηγούν αναπόφευκτα σε σημαντική μείωση της κινητικότητας με κυριότερο αίτιο τις αλλαγές στη μεμβράνη των σπερματοζωαρίων και τον εκφυλισμό του ακροσώματος. Πολλές μελέτες αναφέρουν σταθερή μείωση στην κινητικότητα των σπερματοζωαρίων μετά την απόψυξη (Lukaszewicz *et al.* 2003, Oberoi *et al.* 2014, Darsini *et al.* 2019).

Βλάβη στα σπερματοζωάρια ενδέχεται να προκληθεί από την υπεροξείδωση των λιπαρών οξέων που υπάρχουν στην πλασματική μεμβράνη. Η οξείδωση των λιπιδίων αναστέλλει την οξειδωτική φωσφορυλίωση και οδηγεί σε απώλεια των ενδοκυτταρικών ενζύμων. Οι υπερδομές των μιτοχονδρίων και της πλασματικής μεμβράνης του σπερματοζωαρίου είναι ιδιαίτερα επιρρεπείς σε βλάβες από την κατάψυξη, όπως καταδεικνύεται σε μελέτες που χρησιμοποιούν ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (Indian Fertility Society 2017). Οι παράγοντες που ευθύνονται για την εκτεταμένη βλάβη των κυττάρων είναι: i) η αλλοίωση των μιτοχονδριακών

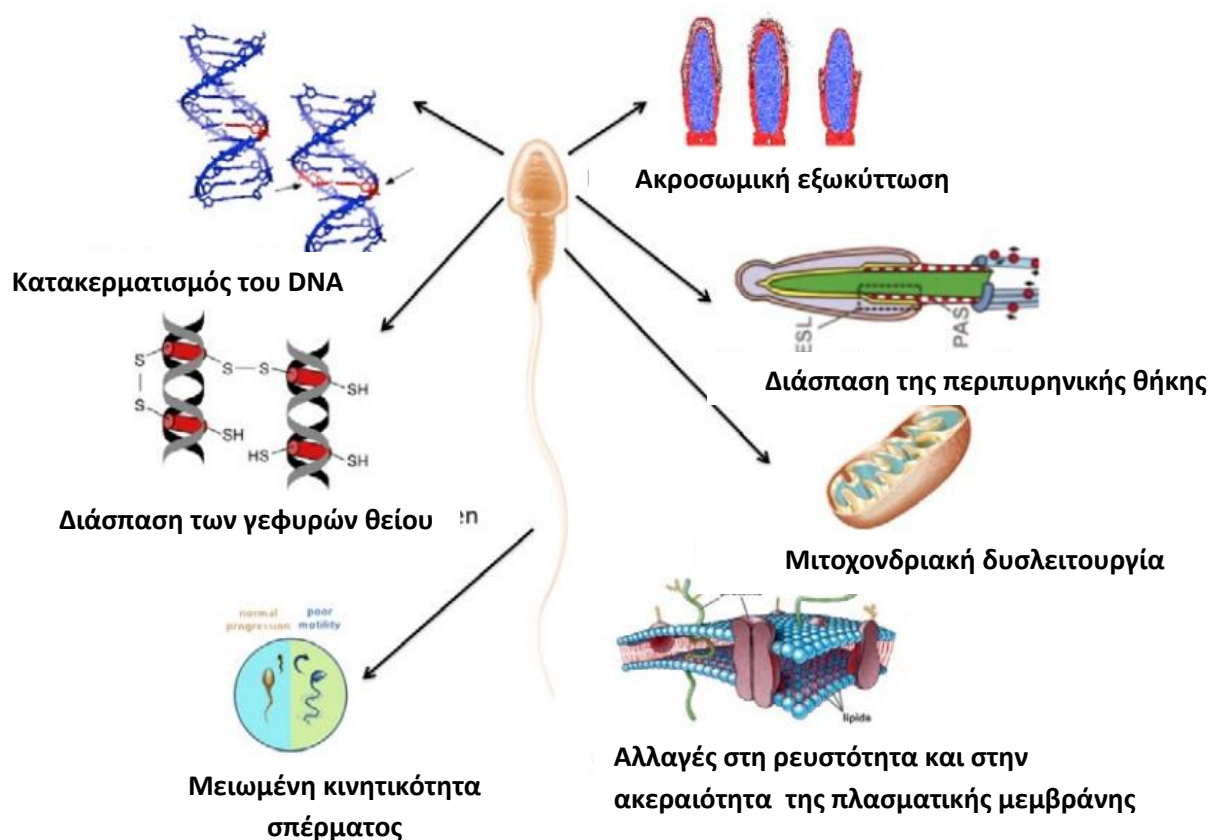
λειτουργιών λόγω σημαντικής καταστροφής της μιτοχονδριακής μεμβράνης και ii) η μεταβολή της ρευστότητας της μεμβράνης που οδηγεί σε απελευθέρωση ROS (Koppers *et al.* 2008).

Οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου είναι γνωστοί επιβλαβείς παράγοντες, καθώς προκαλούν συχνά θραύσματα στο DNA. Επάγουν στο κύτταρο αποπτωτικές οδούς λόγω χαμηλής δραστηριότητας των αντιοξειδωτικών ενζύμων, γεγονός που οδηγεί σε μειωμένη βιωσιμότητα του σπέρματος (Chris *et al.* 2001). Αξίζει να σημειωθεί ότι η διατήρηση της ακεραιότητας της κυτταρικής μεμβράνης είναι ιδιαίτερα σημαντική για τη διατήρηση των κυτταρικών λειτουργιών μετά την απόψυξη. Οι χαμηλές θερμοκρασίες δεν ευνοούν την ακεραιότητα της μεμβράνης, καθώς προκαλούν αλλαγές στις μεμβρανικές πρωτεΐνες και στις δομές των υδατανθράκων αυτής, είτε μέσω αλλαγών στην ωσμωτικότητα, είτε κατά τον σχηματισμό ενδοκυττάρων κρυστάλλων πάγου (Indian Fertility Society 2017). Οι επιπτώσεις των ανωτέρω αλλαγών ενδέχεται να επηρεάσουν αρνητικά τη μεταφορά των ιόντων και τον μεταβολισμό του κυττάρου, προκαλώντας μείωση της βιωσιμότητας των σπερματοζωαρίων και της ικανότητας γονιμοποίησής τους (Vilagran *et al.* 2014).

Μία άλλη παράμετρος που επηρεάζεται σημαντικά από την κατάψυξη είναι η μορφολογία του σπερματοζωαρίου, ως αποτέλεσμα της παραμόρφωσης της δομής της μεμβράνης από την άτακτη εισροή υγρών (Isachencko *et al.* 2011, Darsini *et al.* 2019, Erdem-Öztürk *et al.* 2019). Επιπρόσθετα, η κατάψυξη μπορεί να οδηγήσει σε μερική ή πλήρη αποσύνθεση της ακροσωμικής μεμβράνης με εξάντληση του περιεχομένου του ακροσώματος αλλά και αραίωση της περιοχής μεταξύ της κυτταρικής μεμβράνης και του ακροσωμίου (Indian Fertility Society 2017). Μελέτες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης αναφέρουν σημαντική αύξηση των βλαβών, που αφορούν τη μορφολογία της κεφαλής και της ουράς των σπερματοζωαρίων μετά την κατάψυξη, με συχνότερο εύρημα τις τυλιγμένες ουρές (Ozkavukcu *et al.* 2008).

Αν και οι επιβλαβείς επιπτώσεις των διαδικασιών κατάψυξης-απόψυξης σε παραμέτρους του σπέρματος έχουν αποσαφηνιστεί, ωστόσο υπάρχει διχογνωμία ως προς τις βλάβες του DNA που προκαλούνται από αυτές. Ένα σύνολο παλαιότερων μελετών υποστηρίζει ότι η κρυοσυντήρηση του σπέρματος έχει αρνητική επίπτωση στην ακεραιότητα του DNA, καθώς προκαλείται κατακερματισμός αυτού, λόγω του οξειδωτικού στρες από τα ROS (Chohan *et al.* 2004, De Paula *et al.* 2006, Hosseini *et*

al. 2018). Ωστόσο, ορισμένες μελέτες υποστηρίζουν ότι η ακεραιότητα του DNA των σπερματοζωαρίων δεν επηρεάζεται από τις διαδικασίες κατάψυξης-απόψυξης (Isachenko *et al.* 2004, Lusignan *et al.* 2018). Η ασυμφωνία μεταξύ των μελετών αυτών ενδέχεται να είναι αποτέλεσμα διαφορών στην κρυοανθεκτικότητα του κάθε δείγματος, στο πρωτόκολλο που ακολουθείται για την κρυοσυντήρηση και στη μέθοδο που επιλέγεται για την αξιολόγηση της ακεραιότητας του DNA. Οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στην πρόκληση βλάβης κατά τη διαδικασία της κατάψυξης- απόψυξης συνοψίζονται στην Εικόνα 2.



Εικόνα 2. Απεικόνιση των αιτιών που προκαλούν βλάβες στο σπερματοζωάριο κατά τη διαδικασία της κατάψυξης- απόψυξης (Indian Fertility Society 2017).

1.5 Κρυοσυντήρηση και ποσοστό κήσης

Η κρυοσυντήρηση, όπως προαναφέρθηκε, επηρεάζει την κινητικότητα των σπερματοζωαρίων και μειώνει την ικανότητα γονιμοποίησης λόγω επιβλαβών επιπτώσεων στην πλασματική μεμβράνη, στη δομή του ακροσώματος και στη δραστηριότητα της ακροσίνης (Cross NL *et al.* 1991). Επιπρόσθετα, μπορεί να δρ

αρνητικά και στην χρωματινική δομή του DNA (Royere *et al.* 1991), οδηγώντας σε πιθανή μείωση του ποσοστού γονιμοποίησης. Γίνεται επομένως αντιληπτό, ότι οι διαδικασίες των IUI και IVF, που χρησιμοποιούν σπερματοζωάρια μετά από διαδικασίες κατάψυξης-απόψυξης, θα δίνουν ενδεχομένως χαμηλότερα ποσοστά κύησης συγκριτικά με τη χρήση φρέσκου σπέρματος (Di Santo *et al.* 2012). Για το λόγο αυτό, η κρυοσυντήρηση δεν συνίσταται πριν από την ενδομήτρια σπερματέγχυση ή τη συμβατική εξωσωματική γονιμοποίηση. Στην περίπτωση της ICSI, δεν ισχύουν τα παραπάνω, καθώς η συγκεκριμένη διαδικασία απαιτεί μικρό αριθμό κινητών σπερματοζωαρίων για επιτυχή γονιμοποίηση.

Στη βιβλιογραφία αναφέρονται αρκετές μελέτες που συγκρίνουν τη χρήση φρέσκου και κατεψυγμένου σπέρματος σε ICSI διαδικασίες. Αναφορικά με το ποσοστό κύησης που προκύπτει συγκριτικά, το αποτέλεσμα ποικίλει αναλόγως της προέλευσης των χρησιμοποιούμενων σπερματοζωαρίων. Ωστόσο, η διαφορά εστιάζει κυρίως στην αύξηση της συχνότητας των αυτόματων αποβολών, στις περιπτώσεις που χρησιμοποιείται κατεψυγμένο σπέρμα. Αξίζει να σημειωθεί ότι είναι πολύ δύσκολο να γίνει απόλυτη σύγκριση μεταξύ των διαφορετικών μελετών ως προς τα ποσοστά κύησης, καθώς στην πλειονότητα των μελετών καταγράφονται πολυάριθμες διαφορετικές μεταβλητές, οι οποίες συνήθως δεν προσδιορίζονται λεπτομερώς. Ορισμένες από τις μεταβλητές, που επηρεάζουν τα ποσοστά της κύησης, είναι το πειραματόζωο που χρησιμοποιείται στην έρευνα, η ποιότητα του παραγόμενου σπέρματος, ο αριθμός των σπερματοζωαρίων που τοποθετείται σε κάθε περιέκτη προς κατάψυξη, τα πρωτόκολλα κατάψυξης-απόψυξης, καθώς επίσης ο αριθμός και η αναπαραγωγική ικανότητα των θηλυκών ατόμων που χρησιμοποιούνται. Σημειώνεται ότι η γονιμότητα ενός αρσενικού ατόμου είναι σε μεγάλο βαθμό εξαρτημένη από τη γονιμότητα του θηλυκού ατόμου που θα χρησιμοποιηθεί επίσης και κρίνεται αναγκαίο να μην αξιολογείται ανεξάρτητα από του θηλυκού ατόμου (Amann 2005).

1.6 Κατάψυξη σπέρματος σε ασθενείς με αιματογενώς μεταδιδόμενους ιούς

Τα τελευταία χρόνια, η ζήτηση για τεχνολογίες υποβοηθούμενης αναπαραγωγής από ασθενείς που έχουν προσβληθεί από κάποιο ιό που μεταδίδεται μέσω της κυκλοφορίας του αίματος, όπως για παράδειγμα ο ιός Ηπατίτιδας Β-HBV, ο ιός Ηπατίτιδας C-HCV και ο ιός ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας-HIV, έχει αυξηθεί

ραγδαία. Η παροχή τεχνολογιών υποβοηθούμενης αναπαραγωγής σε ζευγάρια, στα οποία ο ένας ή και οι δύο σύντροφοι έχουν προσβληθεί από τον ιό HIV, υπήρξε αρκετά αμφιλεγόμενο θέμα από ηθικής άποψης. Το πρόβλημα αυτό έχει λυθεί πλέον με πολλές ευρωπαϊκές χώρες να συμφωνούν ότι πρέπει να δίνεται η δυνατότητα και στα άτομα αυτά να αποκτήσουν παιδιά με ασφάλεια, θέτοντας ως προτεραιότητα την αποφυγή μόλυνσης του μη μολυσμένου συντρόφου ή του μελλοντικού παιδιού μέσω οριζόντιας ή κάθετης μετάδοσης (Englert *et al.* 2001, Gillling-Smith 2003, Ohl *et al.* 2003).

Σε αντίθεση με τις HIV περιπτώσεις, θέματα ηθικής για τα υπογόνιμα ζευγάρια με HBV ή HCV προέκυψαν σε μικρότερο βαθμό. Αυτό μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός ότι υπάρχει διαθέσιμο εμβόλιο, 90% ανοσογόνο κατά του HBV, και μπορεί να παρέχει προστασία στους εργαζομένους στον τομέα της υγείας, στους συντρόφους που δεν έχουν μολυνθεί και στα νεογέννητα άτομα. Στην περίπτωση του HCV, δεν υπάρχει μέχρι στιγμής αποτελεσματικό εμβόλιο.

Μέχρι σήμερα, οι οδηγίες για τον τρόπο διαχείρισης των μολυσματικών δειγμάτων με τους προαναφερόμενους ιούς είναι περιορισμένες. Στο Ηνωμένο Βασίλειο, ο κώδικας πρακτικής από την Αρχή Ανθρώπινης Γονιμοποίησης και Εμβρυολογίας (Human Fertilisation and Embryology Authority, HFEA) επισημαίνει ότι κάθε αδειοδοτημένο κέντρο πρέπει να ακολουθεί την καλή εργαστηριακή πρακτική, αλλά και να έχει πλήρη επίγνωση των μικροβιολογικών κινδύνων ώστε να συμμορφώνεται με τους κανονισμούς της Ένωσης Κλινικών Εμβρυολόγων και Ελέγχου Επικίνδυνων για την Υγεία Ουσιών (Association of Clinical Embryologist's and Control of Substances Hazardous to Health, COSHH). Το 2004, το Ευρωπαϊκό Κοινοβούλιο και το Συμβούλιο της Ευρωπαϊκής Ένωσης επισήμανε ότι είναι αναγκαία η υιοθέτηση ενός συστήματος ποιότητας για τη διαχείριση των περιστατικών με λοίμωξη από όλα τα κέντρα που εμπλέκονται στον χειρισμό ανθρώπινων κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των γαμετών και των εμβρύων.

Τα κέντρα υποβοηθούμενης αναπαραγωγής, προκειμένου να εξασφαλίσουν την αποτελεσματική διαχείριση των ασθενών με λοίμωξη BBV, πρέπει να εφαρμόζουν ένα αποτελεσματικό σύστημα ταυτοποίησης των συγκεκριμένων ασθενών πριν ξεκινήσει κάποια θεραπεία. Η Ευρωπαϊκή Εταιρία Ανθρώπινης Αναπαραγωγής και Εμβρυολογίας (European Society of Human Reproduction and Embryology, ESHRE) και η HFEA συνιστούν τον έλεγχο όλων των ασθενών για τους HIV, HBC και HBV

ιούς πριν από οποιαδήποτε διαδικασία εξωσωματικής γονιμοποίησης, γεγονός που αποτελεί πλέον κοινή πρακτική στις κλινικές γονιμότητας (Van den Eede 1995, Abusheikha *et al.* 1999, Hart *et al.* 2001). Η εν λόγω προσέγγιση παρουσιάζει πολλά πλεονεκτήματα, καθώς εντοπίζοντας έγκαιρα τους ασθενείς με λοίμωξη BBV, μπορούν να ληφθούν μέτρα για την ενημέρωσή τους, την πρόγνωση και τη θεραπεία τους, αλλά και να λάβουν γνώση για τις επιλογές αναπαραγωγής που έχουν (Englert *et al.* 2001). Η αναπαραγωγική φροντίδα των ασθενών αυτών πρέπει να στοχεύει στην ελαχιστοποίηση του κινδύνου μετάδοσης στο μη-μολυσμένο σύντροφο ή στο νεογέννητο, μέσω επεξεργασίας του σπέρματος στην περίπτωση μολυσμένων ανδρών και στον πρώιμο εμβολιασμό κατά τη γέννηση (Ministry of Health, French Republic 2002). Επιπρόσθετα, ο έλεγχος των ασθενών για μολυσματικούς ιούς ελαχιστοποιεί τον κίνδυνο μετάδοσής τους και διαφυλάσσει την ασφάλεια του προσωπικού στο χώρο της υγείας.

Όσον αφορά την κρυοσυντήρηση δειγμάτων σπέρματος με λοίμωξη BBV, η λήψη προληπτικών μέτρων για την αποφυγή του κινδύνου διασταυρούμενης μόλυνσης από HIV, HBV και HCV σε δείγματα μη μολυσμένων ασθενών κρίνεται απαραίτητη. Αν και δεν υπάρχουν πλήρως τεκμηριωμένα στοιχεία για διασταυρούμενη μόλυνση των κρυοσυντηρημένων δειγμάτων, για λόγους ασφάλειας συνίσταται η επεξεργασία των δειγμάτων από φορείς ιών να γίνεται σε ξεχωριστό εργαστήριο ή σε καθορισμένο χώρο εντός του κυρίου εργαστηρίου. Επιπλέον, οι ιοί HIV, HCV και HBV και πιθανώς και άλλοι, έχει βρεθεί ότι μπορούν να επιβιώσουν στο υγρό άζωτο, γεγονός που καθιστά δυνατή τη διασταυρούμενη μόλυνση των δειγμάτων σε δοχείο υγρού αζώτου, αν και ο κίνδυνος αυτός θεωρείται χαμηλός. Ο κίνδυνος μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι τα καλαμάκια ενδέχεται να καταστραφούν ή να θρυμματιστούν κατά την κατάψυξη ή να ανοίξουν κατά την απόψυξη (Russel *et al.* 1997). Για το λόγο αυτό, προτάθηκε από την HFEA η αποθήκευση των μολυσμένων κατεψυγμένων δειγμάτων να γίνεται σε ξεχωριστά δοχεία υγρού αζώτου (Tedder *et al.* 1995). Βέβαια, αυτό αυξάνει τις απαιτήσεις από άποψη κόστους και επάρκειας χώρου, γεγονός που στην πράξη οδήγησε σε μείωση των κέντρων που μπορούν να προσφέρουν κρυοσυντήρηση σε ασθενείς με γνωστή BBV λοίμωξη.

Ανακεφαλαιώνοντας, για την προστασία των κρυοσυντηρημένων δειγμάτων από τον προαναφερόμενο εν δυνάμει κίνδυνο, έχουν προταθεί τα ακόλουθα μέτρα:

- Φύλαξη δειγμάτων μολυσμένων από ιούς HIV, HBV και HCV σε ξεχωριστά δοχεία (Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine 2020).
- Χρήση κατάλληλων περιεκτών για τα δείγματα (κρυοφιαλίδια, καλαμάκια), με εγγύηση του κατασκευαστή για αντοχή στις θερμοκρασίες κατάψυξης και απόψυξης.
- Χρήση συσκευών κατάψυξης κλειστού συστήματος ή τεχνικών σφράγισης των συσκευών για την αποφυγή της άμεσης επαφής της συσκευής κατάψυξης με το υγρό άζωτο.
- Αποθήκευση δειγμάτων σε ατμούς υγρού αζώτου αντί στην υγρή φάση του υγρού αζώτου. Μελέτες έχουν δείξει ότι η χρήση των ατμών υγρού αζώτου για την αποθήκευση και κατάψυξη ωαρίων και σπερματοζωαρίων μπορεί να είναι μία βιώσιμη εναλλακτική αποθήκευσης γαμετών ή/και εμβρύων (Cobo *et al.* 2010, Lim *et al.* 2010). Ωστόσο, η προσέγγιση αυτή μπορεί να θέσει σε μεγαλύτερο κίνδυνο την ακεραιότητα του δείγματος, εάν διακυβευτούν οι συνθήκες αποθήκευσης.
- Χρήση τεχνικών πλύσης του σπέρματος για μείωση του ιϊκού φορτίου πριν από την κατάψυξη των δειγμάτων σπέρματος (Englert *et al.* 2004).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

2. Ο ιός των ανθρώπινων θηλωμάτων (HPV)

Οι ιοί των ανθρώπινων θηλωμάτων (Human Papilloma Viruses, HPVs) είναι μικροί ιοί, φέρουν ένα δίκλωνο κυκλικό μόριο DNA ως γονιδίωμα και διαθέτουν ως περίβλημα ένα εικοσαεδρικό καψίδιο με διάμετρο περίπου 55 nm. Ενοχοποιούνται για την ανάπτυξη του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας καθώς και πολλών άλλων τύπων καρκίνου του γεννητικού συστήματος. Μέχρι σήμερα, έχουν βρεθεί περισσότεροι από 400 τύποι ιών HPV, εκ των οποίων οι μισοί περίπου έχουν ταξινομηθεί από την Διεθνή Επιτροπή ταξινομίας των Ιών (ICTV) και προσβάλλουν την γεννητική οδό (Pastrana *et al.* 2018). Ορισμένοι τύποι HPV αποτελούν αίτια ανάπτυξης καρκίνων του άνω γεννητικού συστήματος και κυρίως του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας (zur Hausen 2009), ενώ άλλοι δεν έχουν ογκογόνο δράση, γεγονός που οδήγησε στην κατάταξή τους σε δύο κατηγορίες, υψηλού κινδύνου (High Risk, HR) και χαμηλού κινδύνου (Low Risk, LR) αντίστοιχα. Οι HR-HPV μπορούν να προκαλέσουν δυσπλασίες με ενδεχόμενη εξέλιξη αυτών σε όγκους, ενώ οι LR-HPV ιοί ευθύνονται κυρίως για την ανάπτυξη κονδυλωμάτων και δεν οδηγούν σε καρκινογένεση. Οι συχνότεροι HR-HPV υπότυποι είναι οι HPV16, 18, 31, 33, 35 και 45, με τον HPV16 υπότυπο να ανιχνεύεται σε περισσότερο από το 50% των καρκίνων του τραχήλου της μήτρας. Ο HPV18 είναι ο δεύτερος συχνότερος υπότυπος, ενώ οι υπόλοιποι υπότυποι εμφανίζονται με μικρότερη συχνότητα (Zur Hausen 2009). Στους LR-HPV υπότυπους, οι συχνότεροι είναι οι HPV6 και HPV11. Αξίζει να σημειωθεί ότι εκτός από τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας, οι HR-HPVs, και κυρίως ο υπότυπος HPV16, ανιχνεύονται σε ποσοστό της τάξης 60% περίπου των καρκίνων του στοματοφάρυγγα (Chaturvedi *et al.* 2011, Castellsague *et al.* 2016).

Τα 2/3 περίπου των νεαρών ενήλικων ατόμων προσβάλλονται από HPV λοιμώξεις κατά τα πρώτα χρόνια της σεξουαλικής τους δραστηριότητας (Forhan *et al.* 2009, Stokley *et al.* 2014). Στις περισσότερες περιπτώσεις, οι λοιμώξεις αυτές θα εξαλειφθούν από το ανοσοποιητικό σύστημα του ατόμου σε χρονικό διάστημα 1-2 ετών. Ωστόσο, ένα μικρό ποσοστό γυναικών φαίνεται ότι αδυνατεί να εξαλείψει τις λοιμώξεις από τους HR-HPV υπότυπους του ιού. Η εμμένουσα λοίμωξη από HR-HPV

υποτύπους φαίνεται να αυξάνει τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του τραχήλου της μήτρας εντός της δεκαετίας (zur Hausen 2009).

Ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας αποτελεί παγκοσμίως τον τέταρτο σε συχνότητα καρκίνο μεταξύ των θήλεων ατόμων, με αυξημένη επίπτωση κυρίως στις αναπτυσσόμενες χώρες (Arbyn *et al.* 2020). Αναφορικά με τον αριθμό των γυναικών που νοσούν στις δυτικές χώρες, τα τελευταία χρόνια καταγράφεται σημαντική μείωση του, γεγονός που αποδίδεται στη χρήση του τεστ Παπανικολάου στα πλαίσια προληπτικού ελέγχου, το οποίο δίνει τη δυνατότητα εντοπισμού προκαρκινικών αλλοιώσεων και στα προγράμματα εμβολιασμού που εφαρμόζονται. Η απουσία αποτελεσματικού προσυμπτωματικού ελέγχου στις αναπτυσσόμενες χώρες ευθύνεται πιθανώς σε σημαντικό βαθμό για την υψηλή συχνότητα εμφάνισης της νόσου που προκαλείται παγκοσμίως από τον HPV ιό (Albert *et al.* 2020).

2.1 Ταξινόμηση των ιών Papilloma

Οι ιοί των θηλωμάτων (PVs) έχουν ανιχνευθεί στα θηλαστικά, αλλά και σε άλλους ξενιστές, όπως τα πτηνά και τα ερπετά, με πιθανή εξαίρεση τα εργαστηριακά ποντίκια (Bravo *et al.* 2010). Ο άνθρωπος έχει μελετηθεί εκτενώς, γεγονός που έχει επιτρέψει την ανίχνευση και ταυτοποίηση περισσότερων από 400 υπότυπους βάσει χαρτογράφησης του γονιδιώματός τους. Οι ιοί papilloma είχαν αρχικά ομαδοποιηθεί μαζί με τους polyoma ιούς σε μία κοινή οικογένεια, τους Papovaviridae. Η ομαδοποίηση αυτή έγινε με βάση την παρουσία καψιδίων χωρίς εξωτερικό περίβλημα και των κυκλικών δίκλωνων μορίων DNA, που εμφανίζουν και οι δύο ομάδες ιών. Στη συνέχεια, βάσει διαφορών ως προς το μέγεθος, την οργάνωση του γονιδιώματος και την αλληλουχία των νουκλεοτιδίων και αμινοξέων, η Διεθνής Επιτροπή Ταξινόμησης των Ιών (ICTV) ταξινόμησε τους ιούς σε δύο διακριτές οικογένειες, των Papillomaviridae και Polyomaviridae (de Villiers *et al.* 2004).

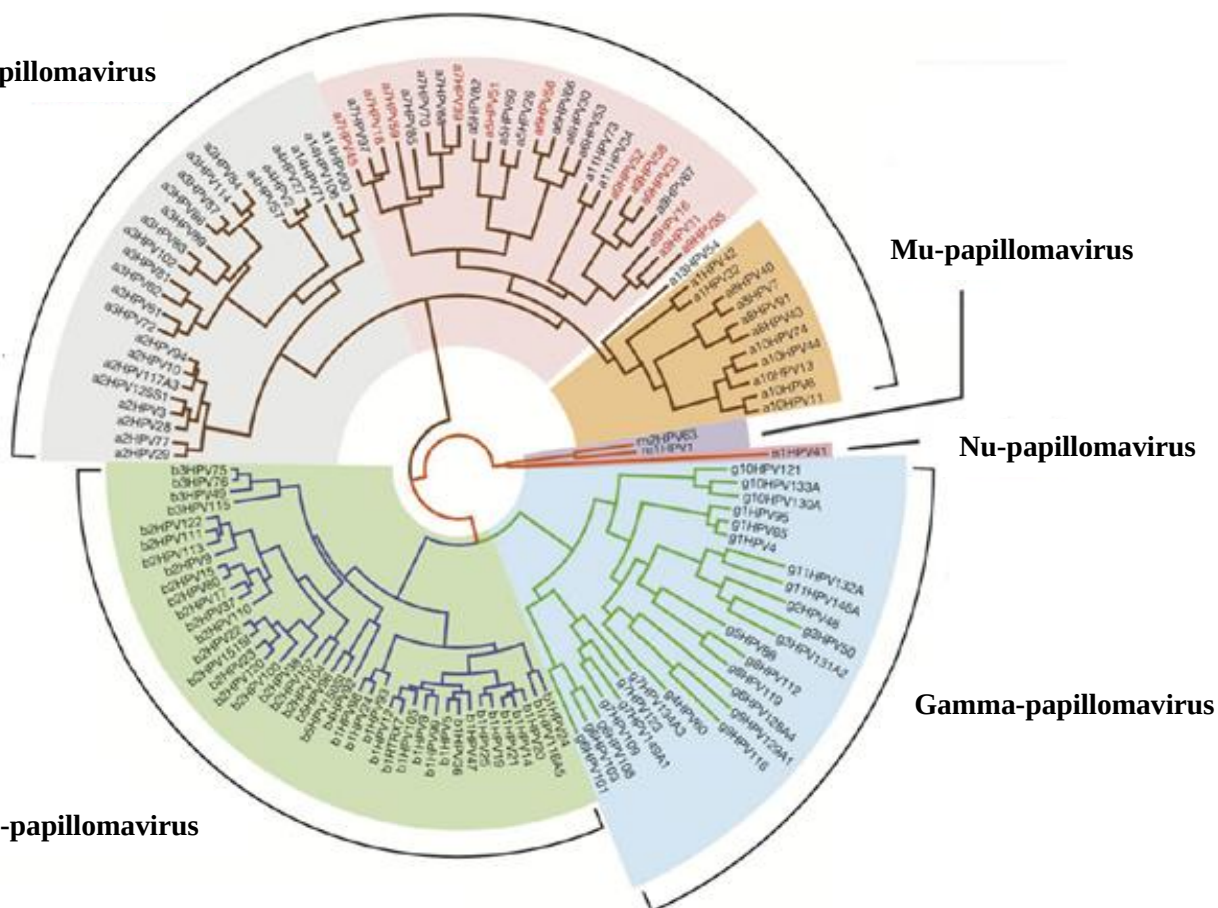
Η περαιτέρω αξιολόγηση των Papillomaviridae, τα τελευταία δεκαπέντε έτη, έγινε με βάση τις διαφορές που εντοπίζονται στην πιο συντηρημένη περιοχή του HPV γονιδιώματος, την περιοχή του ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης L1 (Open Reading Frame, ORF). Το ιϊκό γονίδιο L1 είναι αρκετά συντηρημένο και δεν φαίνεται να ανασυνδυάζεται μεταξύ των διαφόρων τύπων PV. Με βάση την L1 αλληλουχία, ως νέος τύπος HPV χαρακτηρίζεται όταν η αλληλουχία του διαφέρει περισσότερο από 10% από τον πλησιέστερο γνωστό τύπο. Εάν καταγράφονται διαφορές μεταξύ 2-10%

στην αλληλουχία τότε χαρακτηρίζεται ως νέος υπότυπος, ενώ διαφορές της τάξης του 2% και μικρότερες χαρακτηρίζουν μία νέα παραλλαγή (de Villiers 2013).

Οι τύποι του ιού των θηλωμάτων που συναντώνται στον άνθρωπο έχουν κατηγοριοποιηθεί σε πέντε γένη (Alpha, Beta, Gamma, Mu και Nu) με βάση την ανάλυση της αλληλουχίας του DNA τους. Οι διαφορετικοί τύποι φαίνεται να έχουν διαφορετικά χαρακτηριστικά όσον αφορά τον κύκλο ζωής τους, αλλά και διαφορετικές συσχετίσεις με ασθένειες (Doorbar 2006, Ekström *et al.* 2011) (Εικόνα 3). Τα τελευταία χρόνια, έχει αποσαφηνιστεί ότι πολλοί HPV τύποι, συμπεριλαμβανομένης της πλειοψηφίας αυτών που περιέχονται στα γένη Beta και Gamma, προκαλούν ασυμπτωματικές μόνο λοιμώξεις και μπορούν να εντοπιστούν σε επιχρίσματα δέρματος και σε εκπλύσεις βλεννογόνων για ορισμένους τύπους Gamma (Nindl *et al.* 2007, Gottschling *et al.* 2009, Ekström *et al.* 2010). Οι εν λόγω ιοί είναι καλά προσαρμοσμένοι στον ξενιστή τους, μπορούν να ολοκληρώσουν τον κύκλο ζωής τους και διατηρούνται στον πληθυσμό χωρίς να προκαλούν εμφανή νόσο (Forslund 2007, Ekström *et al.* 2011).

Οι τύποι HPV, που προκαλούν ορατά θηλώματα, εμφανίζονται σε σημεία της στοματικής κοιλότητας ή των γεννητικών οργάνων. Η υποτροπή μετά τη θεραπεία αποτελεί ένα σημαντικό πρόβλημα καθώς το ένα τρίτο σχεδόν των ατόμων που προσέρχονται για θεραπεία κονδυλωμάτων των γεννητικών οργάνων εξακολουθούν να φέρουν αλλοιώσεις ακόμη και 3 μήνες αργότερα (Lacey *et al.* 2006). Οι ιοί που ανήκουν στο γένος Alpha προκαλούν αλλοιώσεις στο βλεννογόνο και στο επιθήλιο της επιδερμίδας και διακρίνονται σε HR- και LR-HPV ιούς. Οι LR-HPV τύποι του γένους Alpha που προκαλούν τις αλλοιώσεις αυτές (HPV6 και HPV11) εμπλέκονται επίσης στην ανάπτυξη της αναπνευστικής θηλωμάτωσης (Respiratory papillomatosis, RRP) (Major *et al.* 2005). Αν και είναι σπάνιο, το νεανικό RRP επηρεάζει περίπου 4 ανά 100.000 παιδιά και αποτελεί σοβαρή κατάσταση, η οποία μπορεί να αντιμετωπιστεί μόνο με χειρουργική επέμβαση. Σε ένα ποσοστό της τάξης του 5% των παιδιών μπορεί να εξελιχθεί σε καρκίνο, κυρίως στον πνεύμονα (Hsueh 2009). Οι HPV τύποι του γένους Alpha, που ενοχοποιούνται και για την ανάπτυξη καρκίνου του τραχήλου της μήτρας, είναι οι καλύτερα μελετημένοι (Doorbar 2006, zur Hausen 2009).

Alpha-papillomavirus



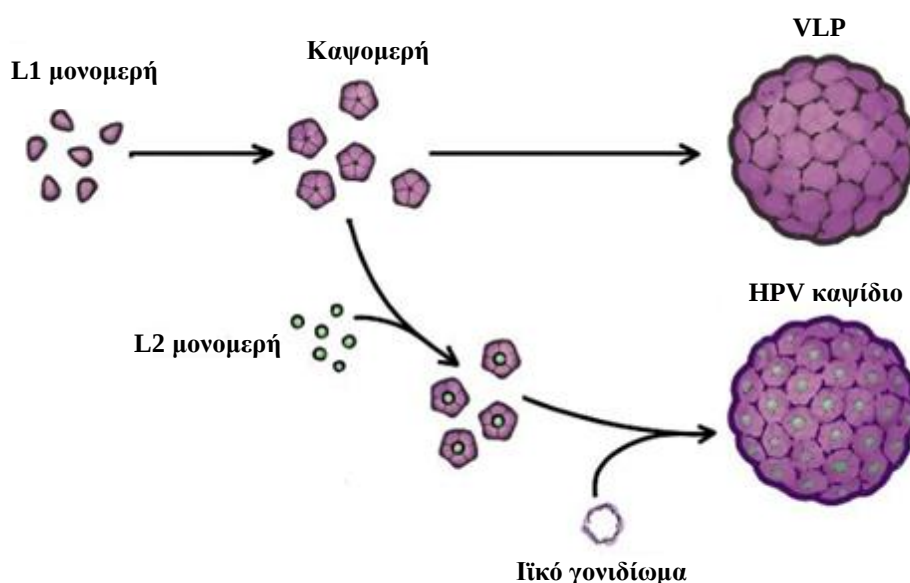
Εικόνα 3. Σχηματική απεικόνιση των 5 γενών του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων. Οι HPV τύποι του γένους Alpha περιλαμβάνουν α) τους LR-HPV ιούς που προσβάλλουν το βλεννογόνο (με πορτοκαλί σκιασμένο χρώμα) και προκαλούν κονδυλώματα των γεννητικών οργάνων, β) τους HR-HPV ιούς που προσβάλλουν το βλεννογόνο (με ροζ σκιασμένο χρώμα) και προκαλούν δυσπλασίες με πιθανή εξέλιξη σε νεοπλασία και γ) HPV τύποι (γκρι σκιασμένο χρώμα) που προσβάλλουν το επιθήλιο της επιδερμίδας. Οι τύποι Beta (πράσινο σκιασμένο χρώμα) προσβάλλουν επίσης το επιθήλιο της επιδερμίδας και ορισμένοι έχουν εμπλακεί στην ανάπτυξη μελανώματος (NMSC) σε ανοσοκατεσταλμένα άτομα. Το γένος Gamma περιλαμβάνει επίσης HPV τύπους που προσβάλλουν το επιθήλιο της επιδερμίδας (με θαλασσί σκιασμένο χρώμα) (Doorbar *et al.* 2012).

2.2 Δομή του HPV ιού

Οι ιοί των ανθρώπινων θηλωμάτων (HPV) είναι μικροί DNA ιοί που διαθέτουν ένα εικοσαεδρικό καψίδιο χωρίς εξωτερικό περίβλημα και έχουν διάμετρο 52 με 55 nm. Τα ιϊκά τους σωματίδια αποτελούνται από ένα δίκλωνο κυκλικό μόριο DNA μήκους

περίπου 8.000 ζευγών βάσεων (base space, bp), που περιέχεται σε ένα πρωτεϊνικό καψίδιο αποτελούμενο από 72 πενταμερή καψομερή. Όταν το κάθε καψομερές απαρτίζεται μόνο από 5 μονομερή της L1 πρωτεΐνης, δημιουργούνται τα VLPs (σωματίδια που μοιάζουν με τους ιούς, Virus-like particles). Όταν το καψομερές περιέχει και τις δύο δομικές πρωτεΐνες, L1 και L2, τότε σχηματίζονται τα αυθεντικά πρωτεϊνικά καψίδια του ιού. Αυτό πραγματοποιείται με την ενσωμάτωση του μονομερούς L2 στο πενταμερές των L1 πρωτεϊνών (Εικόνα 4) (WHO 2007).

Οι πρωτεΐνες L1 και L2 κωδικοποιούνται από το γονιδίωμα του ιού και χρειάζονται την παρουσία συνοδών πρωτεϊνών (chaperones) για τη συναρμολόγηση των καψιδίων του ιού. Αξίζει να σημειωθεί ότι εντός του καψιδίου ενδέχεται να υπάρχουν και άγνωστες πρωτεΐνες (ϊικές ή κυτταρικές), όπως οι καρνοφαιρίνες, που μπορεί να παίζουν ρόλο στη τελική οργάνωση των καψιδίων των HPV ιών (Bird *et al.* 2008, Conway *et al.* 2009).



Εικόνα 4. Απεικόνιση της διαδικασίας σύνθεσης του αυθεντικού καψιδίου του HPV ιού και του VLP (Yu 2017).

2.2.1 Η πρωτεΐνη L1 του ιού

Η βασική πρωτεΐνη του καψιδίου του HPV, L1 πρωτεΐνη, έχει μέγεθος περίπου 55 kD και δυνατότητα να αυτοσυναρμολογείται αυθόρμητα σε VLPs. Η εξωτερική επιφάνεια των VLPs δεν παρουσιάζει διακριτές διαφορές από τα αυθεντικά ιοσωμάτια του HPV ιού (Schiller and Lowy 2012). Η ανακάλυψη της ισχυρής ανοσογονικότητας

των συγκεκριμένων VLPs έθεσε τα θεμέλια για την ανάπτυξη των εμβολίων που χρησιμοποιούνται σήμερα στον άνθρωπο για προστασία από τη λοίμωξη έναντι των υψηλού κινδύνου HPV16 και HPV18 τύπων.

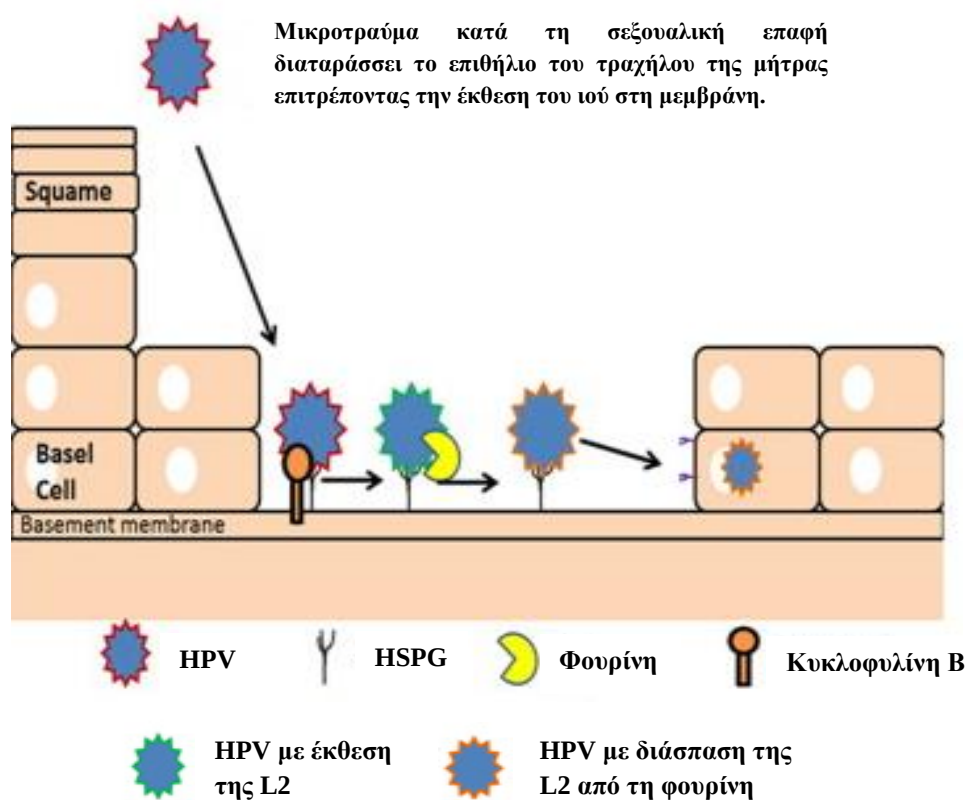
Η L1 πρωτεΐνη παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην αρχική αλληλεπίδραση με τον ξενιστή. Έχει αναφερθεί σε προηγούμενες μελέτες ότι η L1 πρωτεΐνη αλληλεπιδρά με τους υδρατάνθρακες της θειϊκής ηπαράνης (HS) που εμφανίζονται στις πρωτεογλυκάνες (Giroglou *et al.* 2001, Johnson *et al.* 2009). Ακολουθεί η αλληλεπίδραση της L1 και με άλλους υποδοχείς της μεμβράνης έως ότου να επιτευχθεί η απελευθέρωση του γονιδιώματος του ιού στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου (de Villiers 2013), το οποίο μέσω ενδοκυττάρων οδών μετακινείται προς τον πυρήνα (McBride 2017). Μετά το πέρας της διαδικασίας εισόδου του ιού, η συμβολή της L1 πρωτεΐνης ολοκληρώνεται.

2.2.2 Η πρωτεΐνη L2 του ιού

Η πρωτεΐνη L2 αποτελείται από περίπου 500 αμινοξέα και έχει μέγεθος σχεδόν ισοδύναμο με αυτό της L1 πρωτεΐνης (55 KDa). Η πρωτεΐνη L2 έχει πολλούς λειτουργικούς ρόλους και αλληλεπιδρά με πλήθος πρωτεϊνών, όπως η φουρίνη, η κυκλοφιλίνη B και η συνταξίνη 18. Έχει την ικανότητα να μεταφέρει συστατικά του ιού σε συγκεκριμένες θέσεις στον πυρήνα, που ορίζονται ως ND-10. Επιπρόσθετα, υποστηρίζεται ότι η L2 συνεντοπίζει και οργανώνει τις L1 και E2 πρωτεΐνες, καθώς και το ιϊκό γονιδίωμα διευκολύνοντας την ενθυλάκωση του γονιδιώματος και τη συναρμολόγηση του ιϊκού σωματιδίου (Day *et al.* 1998, Florin *et al.* 2006), αν και η E2 πρωτεΐνη δεν απαιτείται για τη διαδικασία συσκευασίας του ιϊκού καψιδίου (Buck *et al.* 2004).

Κατά την είσοδο του ιού στο κύτταρο-ξενιστή, η L2 πρωτεΐνη είναι αρχικά εγκλωβισμένη μέσα στο καψίδιο και απαιτείται μία αλλαγή στη διαμόρφωση του μορίου προκειμένου να εκτεθεί στην επιφάνεια. Αυτή η αλλαγή επέρχεται με τη δέσμευση του καψιδίου στους υδρατάνθρακες της θειϊκής ηπαράνης των πρωτεογλυκανών (HSPG) στην εξωκυτταρική μεμβράνη μέσω της πρωτεΐνης L1. Η σύνδεση αυτή σε συνδυασμό με την αλληλεπίδραση με την πρωτεΐνη κυκλοφιλίνη B του κυττάρου-ξενιστή οδηγεί στην έκθεση του αμινοτελικού άκρου της L2 (Bienkowska-Haba *et al.* 2009). Η διάσπαση ενός μοτίβου στο αμινοτελικό άκρο της

L2 από τη φουρίνη είναι αναγκαία ώστε να εσωτερικευτεί ο ιός και να επέλθει η μόλυνση (Day and Schiller 2009, Johnson *et al.* 2009) (Εικόνα 5).



Εικόνα 5. Απεικόνιση των πρώιμων γεγονότων της μόλυνσης από τον HPV ιό. Η έκθεση της μεμβράνης από μικροτραύμα δίνει τη δυνατότητα σύνδεσης του HPV ιού με τη θεϊκή ηπαράνη στις πρωτεογλυκάνες (HSPG). Η σύνδεση και η αλληλεπίδραση με την κυκλοφυλίνη B του κυττάρου-ξενιστή προκαλεί αλλαγή στη δομή του καψιδίου και έκθεση της L2 πρωτεΐνης. Ακολουθεί η διάσπαση της L2 από τη φουρίνη και η εσωτερίκευση του ιϊκού σωματίου στο κύτταρο (Wang and Roden 2013).

2.3 Οργάνωση του γονιδιώματος του ιού

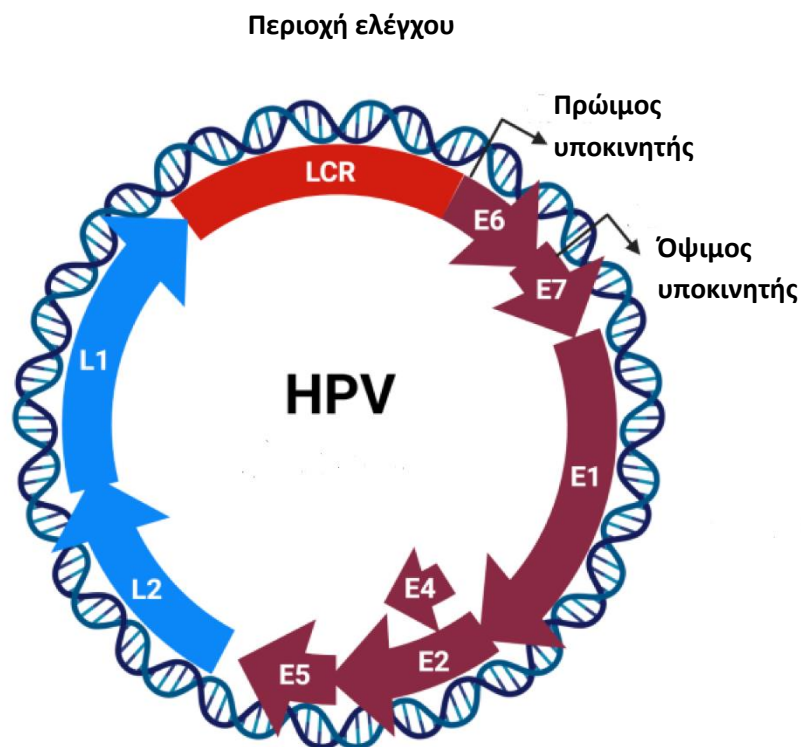
Το γονιδίωμα όλων των τύπων HPV περιέχει οχτώ ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης (ORFs), που μεταγράφονται από έναν κλώνο DNA και κατανέμονται σε τρεις βασικές περιοχές: την πρώιμη, την όψιμη περιοχή και τη περιοχή ελέγχου (Locus Control Region, LCR). Η πρώιμη περιοχή καταλαμβάνει πάνω από το 50% του γονιδιώματος του ιού και περιέχει τα ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης, που κωδικοποιούν τις μη δομικές

πρωτεΐνες του ιού, E1 έως E7, οι οποίες ευθύνονται για την αντιγραφή και τον κύκλο ζωής του ιού. Στην περιοχή αυτή, εντοπίζεται επίσης και το πλαίσιο ανάγνωσης της E8 πρωτεΐνης, το οποίο, όπως αποδείχθηκε μεταγενέστερα, εντοπίζεται μόνο στον ιό HPV31 και κωδικοποιεί την πρωτεΐνη E8⁺ E2C, η οποία δρα ως αρνητικός ρυθμιστής της αντιγραφής και της μεταγραφής του ιού (Stubenrauch *et al.* 2000, Stubenrauch *et al.* 2001). Στην όψιμη περιοχή, η οποία καταλαμβάνει το 40% σχεδόν του HPV γονιδιώματος, περιέχονται τα γονίδια, που κωδικοποιούν τις L1 και L2 δομικές πρωτεΐνες του ιού, L1 και L2 και που απαιτούνται για το σχηματισμό του ιϊκού σωματιδίου, τη μετάδοση και την εξάπλωση του HPV ιού (Alp 2012) (Εικόνα 6).

Η περιοχή LCR είναι ένα τμήμα DNA μήκους περίπου 850 ζευγών βάσεων (10% του γονιδιώματος). Ένα μεγάλο τμήμα της δεν κωδικοποιείται, αλλά περιέχει στοιχεία *cis* απαραίτητα για την αντιγραφή και μεταγραφή του ιϊκού DNA. Η περιοχή LCR διαθέτει επίσης θέσεις δέσμευσης πολλών μεταγραφικών παραγόντων, σημαντικές για τη ρύθμιση της μεταγραφής που επάγεται από την RNA πολυμεράση II (Bernard 2002). Οι θέσεις δέσμευσης περιλαμβάνουν μοτίβα για μεταγραφικούς παράγοντες, όπως οι AP1, NF1, TEF1, OCT1, YY1, BRN-31, NF-kB, GATA3 (Thierry *et al.* 1992, Bernard 2002, Sichero *et al.* 2012). Στο γονιδίωμα του HPV ιού εντοπίζονται δύο κατηγορίες υποκινητών, οι πρώιμοι και οι όψιμοι, οι οποίοι διαφοροποιούνται αναλόγως του τύπου του HPV ιού. Οι υποκινητές P97 και P105 είναι οι πρώιμοι υποκινητές των HPV16 και HPV18 αντίστοιχα και είναι οι καλύτερα μελετημένοι στη βιβλιογραφία. Στους χαμηλού κινδύνου υποτύπους HPV6 και HPV11, οι αντίστοιχοι υποκινητές είναι οι P90 και P270 (Ribeiro *et al.* 2018).

Συνοπτικά, οι βιολογικές λειτουργίες της κάθε πρωτεΐνης του ιού είναι οι ακόλουθες:

- E1 και E2 πρωτεΐνες: εμπλέκονται στην αντιγραφή και την μεταγραφή,
- E3 πρωτεΐνη: άγνωστη λειτουργία,
- E4 πρωτεΐνη: συμμετέχει στην παραγωγή των ιϊκών σωματιδίων,
- E5, E6 και E7 πρωτεΐνες: έχουν ογκογόνο δράση.



Εικόνα 6. Απεικόνιση της οργάνωσης του γονιδιώματος του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων (HPV). Το γονιδίωμα του είναι ένα δίκλωνο κυκλικό μόριο DNA οργανωμένο σε τρεις περιοχές. Με μπλε χρώμα απεικονίζεται η όψιμη περιοχή, όπου εδράζονται τα γονίδια των δομικών πρωτεϊνών L1 και L2. Με μωβ χρώμα απεικονίζεται η πρώιμη περιοχή, όπου βρίσκονται τα γονίδια των πρωτεϊνών E1-E7, υπεύθυνων για την αντιγραφή, τη μεταγραφή και την αναπαραγωγή του ιού. Η περιοχή ελέγχου LCR απεικονίζεται με κόκκινο χρώμα (Blanco *et al.* 2021).

2.3.1 Η πρωτεΐνη E1 του ιού

Η πρωτεΐνη E1 κωδικοποιείται εντός της πρώιμης περιοχής και εντοπίζεται σε πυρηνικά και κυτταροπλασματικά τμήματα. Το μέγεθος της εξαρτάται από τον τύπο του ιού και φαίνεται να κυμαίνεται από 600 έως 650 αμινοξέα. Είναι εξαιρετικά συντηρημένη μεταξύ των διαφορετικών τύπων HPV, το οποίο οφείλεται ενδεχομένως στο γεγονός ότι είναι η μοναδική πρωτεΐνη του ιού με ενζυμική δραστηριότητα και είναι απαραίτητη για την αντιγραφή του ιϊκού επισώματος (Bergvall *et al.* 2013).

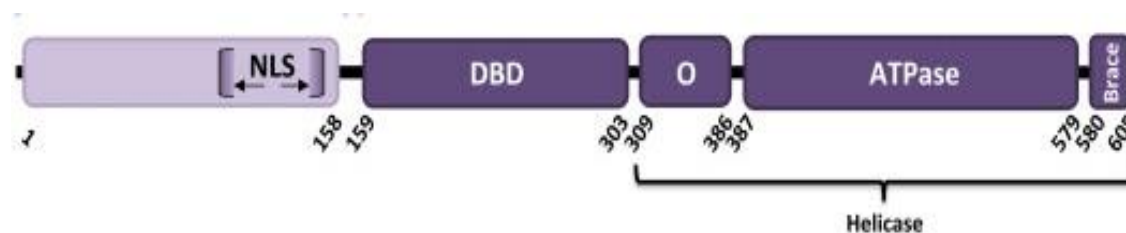
Η αλληλουχία των αμινοξέων της μπορεί να χωριστεί σε τρεις λειτουργικές περιοχές (Εικόνα 7):

α) την αμινο-τελική περιοχή (περίπου 200 αμινοξέα), η οποία αποτελεί τη λιγότερο συντηρημένη περιοχή της πρωτεΐνης και περιέχει τη θέση πυρηνικού εντοπισμού

(NLS) και ένα σήμα πυρηνικής εξαγωγής (Nuclear export signal, NES), τα οποία βοηθούν στην μεταφορά της E1 μεταξύ του πυρήνα και του κυτταροπλάσματος, β) το κεντρικό τμήμα (περίπου 160 αμινοξέα, που φιλοξενεί μια περιοχή δέσμευσης του DNA (DNA binding domain, DBD), η οποία αποτελεί τη θέση έναρξης της αντιγραφής (ori), και γ) την καρβοξυ-τελική περιοχή, η οποία έχει δραστηριότητα ελικάσης τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATPάσης), αλλά περιέχει και αλληλουχίες που εμπλέκονται στον ολιγομερισμό της πρωτεΐνης για τη συγκρότηση εξαμερών (Cote-Martin *et al.* 2008, Bergvall *et al.* 2013).

Η κύρια λειτουργία της E1 πρωτεΐνης είναι η συμμετοχή της στην αντιγραφή του DNA του ιού HPV (Egawa *et al.* 2012). Η αντιγραφή του γονιδιώματος του ιού εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την ικανότητα της E1 να αλληλεπιδρά με αρκετές κυτταρικές πρωτεΐνες του μηχανισμού της αντιγραφής, όπως η α -DNA πολυμεράση, οι τοποϊσομεράσες I και II, και ο παράγοντας αντιγραφής C (RFC) (Bergvall *et al.* 2013). Πιο συγκεκριμένα, για την έναρξη της αντιγραφής, η E1 αλληλοεπιδρά με την πρωτεΐνη E2, γεγονός που συμβάλλει στη στρατολόγησή της στη θέση έναρξης της αντιγραφής (Porter *et al.* 2017). Μετά τον σχηματισμό του συμπλόκου E1-E2 στη θέση ori επιστρατεύονται περισσότερα μόρια E1 για το σχηματισμό εξαμερών, τα οποία ξεδιπλώνουν το υπερελικωμένο DNA. Παράλληλα, η E1 έχει την ικανότητα να συνδέεται με την α -DNA πολυμεράση οδηγώντας στη στρατολόγηση των αναγκαίων συμπλόκων για την έναρξη της αντιγραφής (Longworth *et al.* 2004). Αξίζει να σημειωθεί ότι η E1 διατηρεί την ικανότητα αντιγραφής του ιού και ανεξάρτητα από την E2 αλλά με πολύ χαμηλότερη απόδοση (Bonne- Andrea *et al.* 1997).

Τέλος, έχει αποδειχθεί ότι η E1 αλληλοεπιδρά και με άλλα κυτταρικά στοιχεία ανεξάρτητα από την αντιγραφή του ιού και εμπλέκεται σε λειτουργίες που ευνοούν έμμεσα την αντιγραφή του ιού μέσω ρύθμισης επιγενετικών διεργασιών, όπως πρωτεΐνες του συμπλόκου αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης SWI/SNF (Lee *et al.* 1999).



Εικόνα 7. Απεικόνιση της δομής της ιϊκής πρωτεΐνης E1. Επισημαίνονται οι περιοχές της E1 και τα όρια των αμινοξέων των διαφορετικών περιοχών. Η N-τελική περιοχή απεικονίζεται με ανοιχτό μωβ, ενώ οι περιοχές που απαιτούνται για την αντιγραφή του DNA του ιού απεικονίζονται με σκούρο μωβ και συμπεριλαμβάνουν την περιοχή με δραστικότητα ελικάσης. NLS: θέση σήματος πυρηνικού εντοπισμού, DBD: περιοχή δέσμευσης του DNA, O: περιοχή ελάχιστου ολιγομερισμού (Bergvall *et al.* 2013).

2.3.2 Η πρωτεΐνη E2 του ιού

Η πρωτεΐνη E2 (μοριακού βάρους 40- 45 KDa) αποτελείται όπως και η πρωτεΐνη E1 από τρεις περιοχές, 1) Το καρβοξυτελικό της άκρο περιλαμβάνει τη περιοχή διμερισμού, η οποία οδηγεί στο σχηματισμό ομοδιμερών, που αναγνωρίζουν αλληλουχίες DNA ανοδικά της LCR περιοχής (γνωστές ως E2-BSs) (WHO 2007), 2) Η αμινοτελική περιοχή συμμετέχει στη ρύθμιση της αντιγραφής και της μεταγραφής του DNA του ιού μέσω αλληλεπίδρασης με την E1 πρωτεΐνη, 3) Το ενδιάμεσο τμήμα, που ονομάζεται «άρθρωση», καθώς συνδέει την καρβοξυτελική με την αμινοτελική περιοχή, ρυθμίζει τη σταθερότητα ορισμένων E2 πρωτεϊνών και καθορίζει τον πυρηνικό εντοπισμό τους (Zou *et al.* 2000).

Οι E2 πρωτεΐνες εμπλέκονται σε πολλές διεργασίες, που αφορούν κυρίως την αντιγραφή και τη μεταγραφή του ιϊκού γονιδιώματος. Η πρωτεΐνη E2 είναι ρυθμιστής της μεταγραφής, καθώς ανάλογα με τα επίπεδα έκφρασής της επάγεται ή καταστέλλεται η μεταγραφή. Ο Bouvard και οι συνεργάτες του (1994) έδειξαν ότι χαμηλά επίπεδα της HPV16 E2 πρωτεΐνης ενεργοποιούν τη μεταγραφή, ενώ σημειώθηκε καταστολή της μεταγραφής στην περίπτωση υψηλών επιπέδων έκφρασής της. Αυτό αποτελεί ένα βρόγχο αρνητικής ανατροφοδότησης (negative feedback loop) για τον έλεγχο της έκφρασης των ογκοπρωτεϊνών E6 και E7. Ένας άλλος ρόλος της E2 πρωτεΐνης είναι η συμμετοχή της στο διαχωρισμό του αναδιπλασιασμένου ιϊκού DNA με τα μιτωτικά χρωμοσώματα, ώστε να επιτευχθεί παρόμοια κατανομή των γονιδιωμάτων στα θυγατρικά κύτταρα που θα προκύψουν (Van Tine *et al.* 2004). Όσον αφορά στην αντιγραφή του DNA, η E2 πρωτεΐνη στρατολογεί την E1 στη θέση έναρξης της αντιγραφής. Τέλος, αλληλοεπιδρά με τη δομική πρωτεΐνη L2, οδηγώντας στην αναστολή της μεταγραφής αλλά όχι της αντιγραφής. Πρόκειται για έναν μηχανισμό, που εφαρμόζεται ενδεχομένως στα τελευταία στάδια του κύκλου ζωής του ιού, ώστε

να ενισχυθεί το ιϊκό DNA για την παραγωγή νέων ιϊκών σωματιδίων (McBride AA 2013, McKinney *et al.* 2016).

2.3.3 Η πρωτεΐνη E4 του ιού

Η πρωτεΐνη E4 εμφανίζει αρκετή ετερογένεια, καθώς είναι προϊόν σύντηξης με την πρωτεΐνη E1 ($E1^{\wedge}E4$). Το γονίδιο E4, βρίσκεται στην πρώιμη περιοχή του γονιδιώματος και επικαλύπτεται με το γονίδιο E2. Ωστόσο, προκύπτουν δύο διαφορετικές πρωτεΐνες, καθώς η μεταγραφή κάθε γονιδίου καθορίζεται από διαφορετικό πλαίσιο ανάγνωσης. Αν και πρόκειται για μία πρώιμη πρωτεΐνη, εκφράζεται κατά κύριο λόγο σε μεταγενέστερα στάδια και αποτελεί την πιο άφθονη πρωτεΐνη του ιού καθ' όλη της διάρκεια του κύκλου ζωής του. Η πρωτεΐνη E4 ανιχνεύεται σε κύτταρα όπου έχει λάβει χώρα η έναρξη της αντιγραφής του ιού, ενώ σε ορισμένα άλλα κύτταρα που εκφράστηκαν τα όψιμα γονιδια, η E4 δεν εντοπίζεται στα ιοσωμάτια (Roberts *et al.* 1997).

Προκειμένου να καταστεί λειτουργική η πρωτεΐνη, χρειάζεται να υποστεί μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, δηλαδή ολιγομερισμό, φωσφορυλίωση και πρωτεολυτική διάσπαση. Οι λειτουργίες της E4 πρωτεΐνης αφορούν κατά κύριο λόγο τις ακόλουθες διαδικασίες:

- 1) διευκόλυνση και υποστήριξη της ενίσχυσης του γονιδιώματος,
- 2) ρύθμιση της όψιμης γονιδιακής έκφρασης,
- 3) έλεγχο της ωρίμανσης του ιού και μεσολάβηση της απελευθέρωσης του ιού.

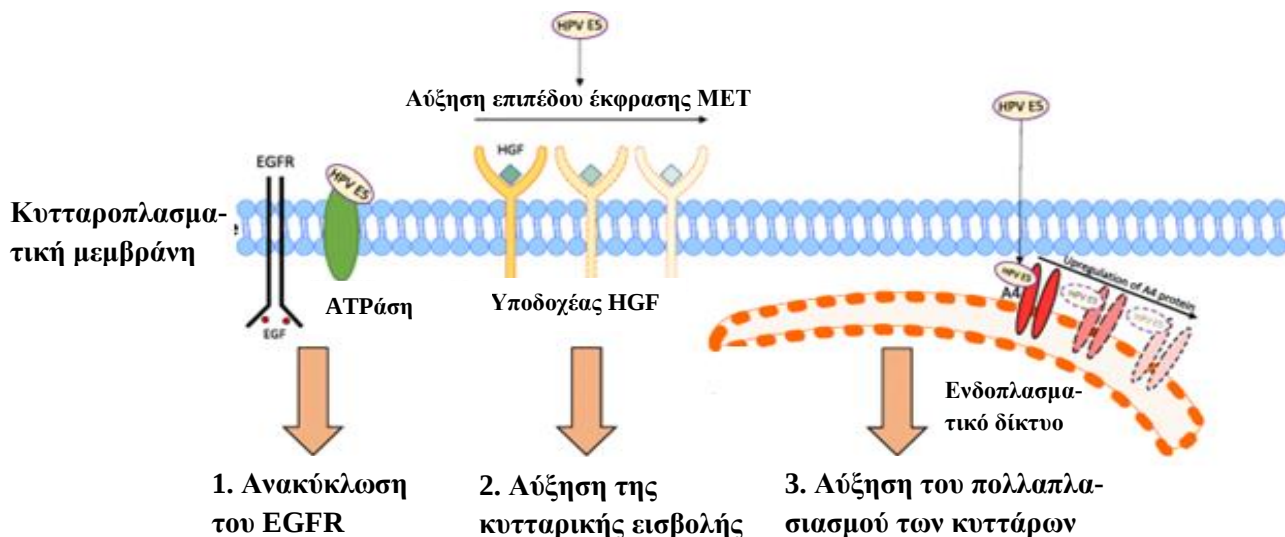
Συνοψίζοντας, η E4 πρωτεΐνη προκαλεί διακοπή της G2 φάσης του κυτταρικού κύκλου και καταστέλλει την κυτταρική ανάπτυξη. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω μίας πλούσιας σε λευκίνη αλληλουχίας κοντά στο αμινοτελικό άκρο της E4 (Knight *et al.* 2004) και οφείλεται στη δέσμευση και διατήρηση συμπλεγμάτων της ενεργοποιημένης κυκλίνης B1 με δεσμίδες E4-κερατίνης στο κυτταρόπλασμα των επιθηλιακών κυττάρων (Wang *et al.* 2004). Επιπρόσθετα, η E4 συνδέεται με τον κυτταροσκελετό μέσω του πλούσιου σε λευκίνη μοτίβου (Roberts *et al.* 1994). Στο καρβοξυτελικό άκρο υπάρχει μία υδρόφοβη αλληλουχία, που συμμετέχει στη διάσπαση του κυτταροσκελετού (Roberts *et al.* 1997). Η καταστροφή του κυτταροσκελετού επιτρέπει το εύκολο «σπάσιμο» των κυττάρων με στόχο την απελευθέρωση των ιϊκών σωματιδίων (Doorbar *et al.* 1991). Η συμβολή της E4 πρωτεΐνης στην ενίσχυση του γονιδιώματος δεν είναι ξεκάθαρη. Θεωρείται πιθανόν να επιτυγχάνεται με την

αλληλεπίδρασή της με κινάσες, τη σύνδεσή της με την E2 πρωτεΐνη και τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου (Nakahara *et al.* 2002).

2.3.4 Η πρωτεΐνη E5 του ιού

Οι πρωτεΐνες E5 είναι μικρές υδρόφοβες πρωτεΐνες μήκους 40 έως 85 αμινοξέων αναλόγως του HPV υπότυπου. Είναι πρωτεΐνες που έχουν εντοπιστεί κυρίως στις ενδοκυττάρειες μεμβράνες του συστήματος Golgi, του ενδοπλασματικού δικτύου και σπανιότερα στον πυρηνικό φάκελο (DiMaio and Mattoon 2001). Οι E5 πρωτεΐνες δεν έχουν εγγενή ενζυμική δραστηριότητα, αλλά η δράση τους βασίζεται κυρίως στη ρύθμιση της δραστηριότητας πολυάριθμων κυτταρικών πρωτεϊνών. Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι η E5 πρωτεΐνη μπορεί να σχηματίσει σύμπλοκο με τον υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (Epidermal growth factor receptor, EGFR) και να ενισχύσει τη δραστηριότητά του (Kim *et al.* 2010). Μέσω της ενεργοποίησης του EGFR υποδοχέα, η E5 πρωτεΐνη μπορεί να παρέμβει σε διάφορες οδούς μεταγωγής σήματος, συμπεριλαμβανομένου του μονοπατιού της MAP κινάσης (Crusius *et al.* 1997). Επιπλέον, αναστέλλει την διακυτταρική επικοινωνία (Oezle *et al.* 1995), αναστέλλει τη διακίνηση των συμπλόκων μείζονος ιστοσυμβατότητας τάξης I (MHC) προς την επιφάνεια του κυττάρου (Ashrafi *et al.* 2005) και αλληλοεπιδρά με την ATPάση των χυμοτοπίων (Adam *et al.* 2000). Η E5 πρωτεΐνη μπορεί, επίσης, να αναστείλει την εξωγενή οδό της απόπτωσης, μέσω του συνδέτη Fas και του παράγοντα νέκρωσης του όγκου (Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL) (Εικόνα 8) (Kabsch and Alonso 2002).

Μέσω της ογκογόνου δράσης της, η E5 πρωτεΐνη ενισχύει τη δυνατότητα αθανатоποίησης των E6 και E7 πρωτεϊνών (Stöppler *et al.* 1996) και σε συνδυασμό με την E7, διεγείρει τον πολλαπλασιασμό των πρωτογενών κυττάρων του ποντικού (Valle and Banks 1995). Οι E5 πρωτεΐνες δεν κωδικοποιούνται σε όλους τους τύπους HPV, γεγονός που σημαίνει ότι ο ρόλος τους είναι περισσότερο συμπληρωματικός (Ferhmann F *et al.* 2003).



Εικόνα 8. Απεικόνιση των λειτουργιών της ιϊκής πρωτεΐνης E5. 1. Η αλληλεπίδραση με την ATPάση ενισχύει την ανακύκλωση του EGFR υποδοχέα. 2. Η σύνδεση της E5 πρωτεΐνης στον υποδοχέα του αυξητικού παράγοντα των ηπατοκυττάρων (Hepatocyte growth factor receptor, HGFR) αυξάνει τα επίπεδα έκφρασης του Met και προάγει το μετασχηματισμό των κυττάρων. 3. Η E5 συνδέεται, επίσης, με μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη του ενδοπλασματικού δικτύου και ρυθμίζει τον πολλαπλασιασμό των μολυσμένων κυττάρων (Hemmat and Baghi 2018).

2.3.5 Οι πρωτεΐνες E6 και E7 του ιού

Η πρωτεΐνη E6 είναι μία ογκοπρωτεΐνη μήκους περίπου 150 αμινοξέων. Αποτελείται από δύο θέσεις δέσμησης ψευδαργύρου στο καρβοξυτελικό άκρο της, αναγκαίες για το μετασχηματισμό και την αθανатоποίηση των κυττάρων που έχουν προσβληθεί από τον ιό (Nomine *et al.* 2006).

Η κύρια ιδιότητα των πρωτεϊνών E6 των HR-HPV ιών είναι η ικανότητα αποικοδόμησης της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης p53 μέσω της στρατολόγησης της E3 λιγάσης της ουβικιτίνης, πρωτεΐνης που σχετίζεται με την E6 (E6-AP) (Huibregtse *et al.* 1993). Αυτό επιτυγχάνεται μέσω σχηματισμού του συμπλόκου E6/E6-AP/p53, που οδηγεί στην αναστολή της μεταγραφικής δράσης της p53 και την επακόλουθη αναστολή της απόπτωσης (Jones *et al.* 1997, Narisawa- Saito and Kiyono 2007). Το TP53 είναι ένα ογκοκατασταλτικό γονίδιο που ενεργοποιεί την απόπτωση των κυττάρων μετά από βλάβες του DNA και συμβάλλει επίσης στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου G1/S και G2/M. Η E6 ογκοπρωτεΐνη παρεμβαίνει και σε άλλες

προαποπτωτικές πρωτεΐνες, όπως είναι η Bak, η FADD και η προκασπάση 8 (Thomas *et al.* 1999, Garnett *et al.* 2006). Οι LR-HPV E6 πρωτεΐνες δεν παρουσιάζουν την ίδια ικανότητα αποικοδόμησης της p53, πιθανώς λόγω της χαμηλότερης συγγένειας πρόσδεσης που έχουν συγκριτικά με τους HR-HPV ιούς (Mittal and Banks 2017).

Η E6 πρωτεΐνη συνδέεται με μία πληθώρα κυτταρικών πρωτεϊνών, οι οποίες μπορούν να ταξινομηθούν σε τέσσερις βασικές κατηγορίες: 1) μεταγραφικοί συν-ενεργοποιητές, 2) πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην πολικότητα και στην κινητικότητα των κυττάρων, 3) καταστολείς του όγκου και επαγωγείς της απόπτωσης και 4) παράγοντες αντιγραφής και επιδιόρθωσης βλαβών του DNA. Πολλές από τις πρωτεΐνες αυτές μπορεί να ανήκουν σε περισσότερες από μία κατηγορίες. Παραδείγματα πρωτεϊνών που ανήκουν στις προαναφερθείσες κατηγορίες παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.

Πίνακας 1. Απεικόνιση χαρακτηριστικών πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη E6 και ταξινόμηση ανάλογα με τον μηχανισμό δράσης τους.

Κατηγορίες πρωτεϊνών	Πρωτεΐνες	Αναφορά
1. Μεταγραφικοί συν-ενεργοποιητές	p300	(Zimmermann <i>et al.</i> 1999)
	Myc	(Gross-Mesilaty <i>et al.</i> 1998)
2. Πρωτεΐνες για πολικότητα και κινητικότητα κυττάρων	Paxillin	(Vande Pol <i>et al.</i> 1998)
	MAGI-1	(Glaunsinger <i>et al.</i> 2000)
	MUPP1	(Lee <i>et al.</i> 2000)
3. Καταστολείς όγκου και επαγωγείς απόπτωσης	p53	(Scheffner <i>et al.</i> 1990)
	Bak	(Thomas and Banks 1999)
4. Παράγοντες αντιγραφής και επιδιόρθωσης DNA	mcm7	(Kukimoto <i>et al.</i> 1998)
	XRCC1	(Iftner <i>et al.</i> 2002)

Η E6 πρωτεΐνη επάγει την έκφραση και τη δράση της τελομεράσης, η οποία προάγει την αθανатоποίηση των κυττάρων, μέσω αποικοδόμησης του καταστολέα της

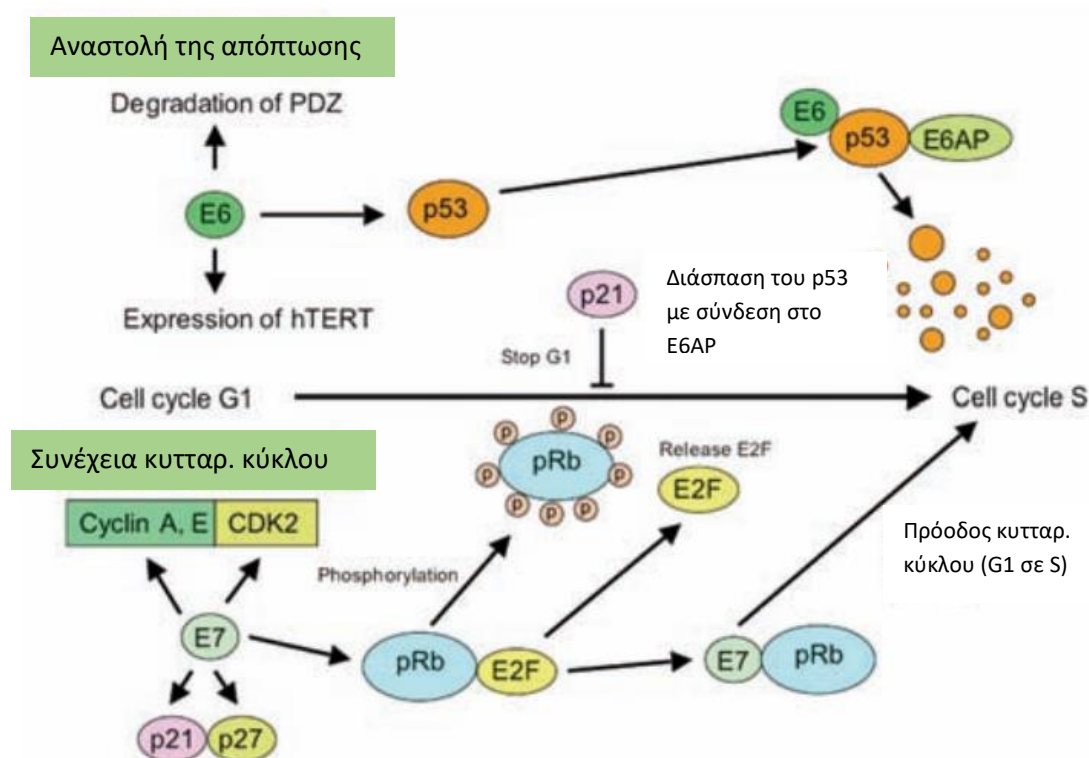
μεταγραφής της (Oh *et al.* 2001, Veldman *et al.* 2001). Μέσω των αλληλεπιδράσεων αυτών, η E6 πρωτεΐνη επηρεάζει μεταγραφικές οδούς, διαταράσσει την αρχιτεκτονική των κυττάρων, αναστείλει την απόπτωση και ενδέχεται να επιφέρει αστάθεια του γονιδιώματος (Vande and Klingelutz 2013).

Η πρωτεΐνη E7 μεσολαβεί στην έναρξη της σύνθεσης του DNA και επάγει τη συνεχή ανάπτυξη των κυττάρων. Με τον τρόπο αυτό, προκαλεί γενετικές διαταραχές που αυξάνουν την πιθανότητα κακοήθους εξαλλαγής. Ο βασικός συνεργάτης της E7 είναι η πρωτεΐνη pRb. Πρόκειται για μία ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη, η οποία δρα ως αρνητικός ρυθμιστής και αναστέλλει το πέρασμα στη φάση S της κυτταρικής διαίρεσης, σταματώντας με τον τρόπο αυτό τον κυτταρικό κύκλο. Το σύμπλοκο pRb/E2F δρα ως μεταγραφικός καταστολέας. Στα φυσιολογικά κύτταρα, η διάσπαση του συγκεκριμένου συμπλόκου πυροδοτείται από τη φωσφορυλίωση της pRb που προκαλείται από τις κυκλινο-εξαρτώμενες κινάσες cdk4/6 και cdk2. Η ελεύθερη E2F πρωτεΐνη δρα ως μεταγραφικός ενεργοποιητής των γονιδίων που σχετίζονται με την είσοδο στη φάση S και τη συνέχιση του κυτταρικού κύκλου (McLaughlin- Drubin and Münger 2009).

Στην περίπτωση που τα κύτταρα έχουν προσβληθεί από HR-HPV ιό, η αλληλεπίδραση της E7 με την pRb πρωτεΐνη προκαλεί την υποβάθμιση της τελευταίας (Boyer *et al.* 1996), και οδηγεί σε αλλαγή της στερεοδιαμόρφωσης και απελευθέρωση του E2F μεταγραφικού παράγοντα (Chellappan *et al.* 1992). Απουσία φωσφορυλίωσης, ο συνδυασμός E7 και pRb ενεργοποιεί το μεταγραφικό παράγοντα E2F, ο οποίος με τη σειρά του ενεργοποιεί την έκφραση των γονιδίων απαραίτητων για την αντιγραφή του DNA και την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου. Ταυτόχρονα, η φωσφορυλίωση της pRb από κινάσες απελευθερώνει τον E2F, που οδηγεί σε εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου στη φάση S. Η E7 πρωτεΐνη συνδέεται μόνο με τη μη φωσφορυλιωμένη pRb και επομένως μπορεί να προκαλέσει την πρόωρη είσοδο των κυττάρων στη φάση S με διάσπαση των συμπλεγμάτων pRb-E2F (Εικόνα 9) (Berezutskaya *et al.* 1997, zur Hausen 2002, Garnett *et al.* 2006).

Η E7 πρωτεΐνη παρουσιάζει και άλλες λειτουργίες. Οι αποακετυλάσες των ιστονών και οι μεταγραφικοί συν-καταστολείς αλληλεπιδρούν με την E7, εξασφαλίζοντας την προώθηση της κυτταρικής ανάπτυξης. Η E7 αλληλοεπιδρά επίσης με το σύμπλεγμα κυκλίνης E/CDK2, ενώ δεσμεύεται επίσης στις πρωτεΐνες p27 και p21, αναστολείς της

CDK, συμβάλλοντας με τον τρόπο αυτό στη συνέχιση του κυτταρικού κύκλου (zur Hausen 2000, Nguyen *et al.* 2002).



Εικόνα 9. Απεικόνιση των λειτουργιών των πρωτεϊνών E6 και E7 και του ρόλου τους στην καρκινογένεση. Οι E6 και E7 πρωτεΐνες αλληλοεπιδρούν με τις ογκοκατασταλτικές πρωτεΐνες p53 και pRb αντίστοιχα, επάγωντας την αθανатоποίηση των κυττάρων, τον μετασχηματισμό τους και οδηγούν σε επακόλουθη καρκινογένεση. Η E7 πρωτεΐνη αναστέλλοντας τη δράση της pRb και ενεργοποιώντας τον E2F μεταγραφικό παράγοντα επάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Η E6 πρωτεΐνη αναστέλλει την απόπτωση αποδομώντας την p53 πρωτεΐνη και καθώς δεν επιδιορθώνονται οι βλάβες στο DNA, συσσωρεύονται γενετικές αλλαγές που προκαλούν αστάθεια αστάθεια του γονιδιώματος (Senba and Mori 2012).

2.4 Ο κύκλος ζωής του ιού

Η λοίμωξη από τον HPV ιό προσβάλλει το πολύστιβο επιθήλιο. Στο φυσιολογικό πολύστιβο επιθήλιο, το κύτταρο που συνδέεται στη βασική μεμβράνη είναι το μόνο με αναγεννητική ικανότητα. Διαιρείται και στη συνέχεια διαφοροποιείται ανεβαίνοντας παράλληλα προς τα επιφανειακά στρώματα του επιθηλίου. Τα θυγατρικά κύτταρα, που δημιουργούνται, εξέρχονται από τον κυτταρικό κύκλο και τροποποιούν το μοτίβο της

γονιδιακής έκφρασης, γεγονός που οδηγεί στη τελική διαφοροποίηση και στην αποκόλληση από το επιθήλιο (Jones *et al.* 2007). Ο κύκλο ζωής του HPV ιού, όπως περιγράφεται στη συνέχεια, ρυθμίζεται αυστηρά από το πρόγραμμα διαφοροποίησης που λαμβάνει χώρα στα κύτταρα-ξενιστές.

2.4.1 Είσοδος του ιού στο κύτταρο-ξενιστή

Η είσοδος του HPV ιού μέσα στο κύτταρο- ξενιστή πραγματοποιείται μέσω κατεστραμμένων περιοχών του επιθηλίου, που πιθανώς προκλήθηκαν από μικροτραυματισμό, και προκαλεί τη λοίμωξη των κυττάρων της βασικής στοιβάδας του επιθηλίου. Αν και έχουν αναφερθεί αρκετοί πιθανοί υποδοχείς, δεν είναι σαφές ποιος από αυτούς παίζει σημαντικότερο ρόλο στη διαδικασία της εισόδου του ιού.

Αρχικά, τα ιϊκά σωματίδια προσκολλώνται στην HSPG της βασικής μεμβράνης, μεταφέρονται στον υποδοχέα, που εκφράζεται στα κερατινοκύτταρα με στόχο την επούλωση του τραύματος και εισέρχονται στη συνέχεια στα κύτταρα (Kines *et al.* 2009). Με την είσοδο και απελευθέρωση του HPV ιού, το DNA του μεταφέρεται στον πυρήνα και διατηρείται εκεί σε χαμηλό αριθμό αντιγράφων (περίπου 50 έως 100 αντίγραφα/ κύτταρο). Η κατάσταση αυτή χαρακτηρίζεται ως λανθάνουσα φάση και δεν παράγονται ιϊκά σωματίδια (Moody and Laimins 2010). Το γονιδίωμα του ιού πρέπει να διατηρηθεί με τη μορφή επισώματος προκειμένου να ξεκινήσει η πρώιμη φάση του κύκλου ζωής του (McBride *et al.* 2006). Στην ανώτερη στιβάδα, καθώς τα θυγατρικά κύτταρα κινούνται προς την επιφάνεια και υπόκεινται σε διαφοροποίηση, γίνεται συντονισμός της έναρξης της αντιγραφής του ιού και παράλληλη έκφραση των πρωτεϊνών του καψιδίου, με σκοπό την παραγωγή ιϊκών σωματιδίων. Η απελευθέρωση των ώριμων ιϊκών σωματιδίων πραγματοποιείται από τα τελικώς διαφοροποιημένα κερατινοκύτταρα. Ο παραγωγικός κύκλος του ιού δεν συνδέεται με τον κυτταρικό θάνατο ή τη λύση των κυττάρων και επομένως δεν προκαλείται φλεγμονή ή παραγωγή προφλεγμονωδών κυτοκινών (Yugawa and Kiyono 2009).

Ανακεφαλαιώνοντας, η αρχική αλληλεπίδραση του ιού με το κύτταρο-στόχο αποδίδεται κατά κύριο λόγο σε αλληλεπιδράσεις μεταξύ της L1 πρωτεΐνης και των πρωτεογλυκανών θεϊκής ηπαράνης (Johnson *et al.* 2009). Η σύνδεση αυτή σε συνδυασμό με την αλληλεπίδραση με την πρωτεΐνη κυκλοφυλίνη B του κυττάρου-ξενιστή οδηγεί στην αλλαγή της διαμόρφωσης της δομής του καψιδίου και έκθεση του

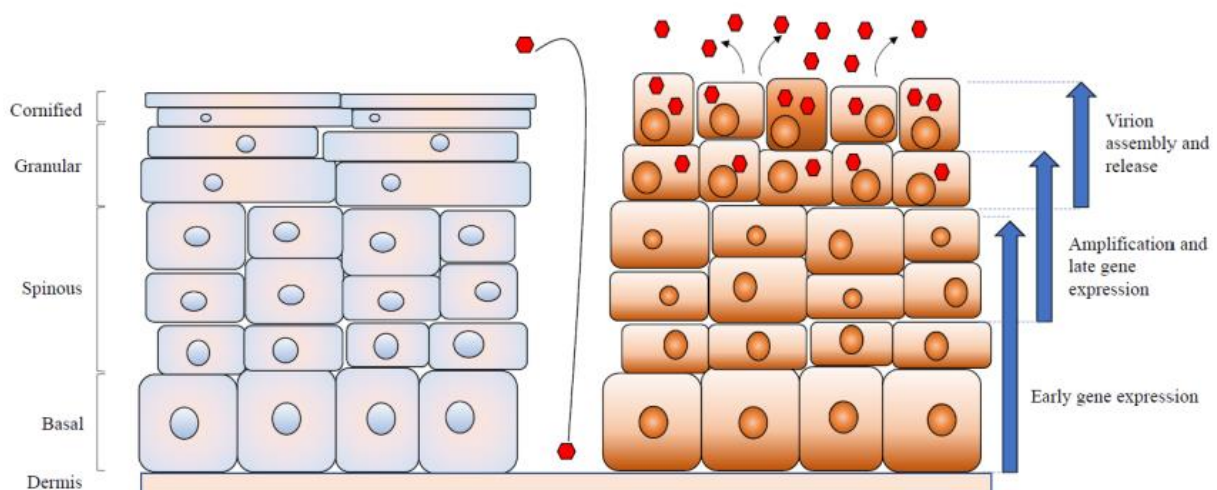
αμινοτελικού άκρου της L2 πρωτεΐνης (Bienkowska-Haba *et al.* 2009). Η επακόλουθη διάσπαση ενός μοτίβου στο αμινοτελικού άκρο της L2 πρωτεΐνης από τη φουρίνη κρίνεται αναγκαία, προκειμένου να εισέλθει ο ιός και να επέλθει η μόλυνση (Day and Schiller 2009, Johnson *et al.* 2009). Μετά την είσοδο του ιού στο κύτταρο, ο ιός μεταφέρεται στο ενδόσωμα και στη συνέχεια διασχίζει το κυτταρόπλασμα με τη μορφή συμπλόκου L2/ϊικού DNA με τελικό προορισμό τον πυρήνα (McBride 2017).

2.4.2 Αντιγραφή του ιού

Η αντιγραφή του DNA του ιού προϋποθέτει να έχει προηγηθεί η μετακίνηση των θυγατρικών κυττάρων από τη βασική μεμβράνη με σκοπό τη διαφοροποίησή τους. Για την αντιγραφή του γονιδιώματος του ιού, απαιτείται ο μηχανισμός αντιγραφής του DNA του κυττάρου-ξενιστή. Το γονιδίωμα του HPV ιού αντιγράφεται με τρεις διαφορετικούς μηχανισμούς κατά τη διάρκεια του παραγωγικού κύκλου ζωής του στο πολύστιβο επιθήλιο (Εικόνα 10) (Moody and Laimins 2009, Orav *et al.* 2015).

1. Κατά την πρώτη φάση (αρχική ενίσχυση), λίγο μετά την είσοδο του HPV στον πυρήνα του κυττάρου, υπάρχει μία ταχεία αύξηση της αντιγραφής του ιικού DNA με σκοπό την επακόλουθη αύξηση του αριθμού των αντιγράφων του εξωχρωμοσωμικού στοιχείου (επίσωμα). Η φάση αυτή καθορίζεται σε μεγάλο βαθμό από τις πρωτεΐνες E1 και E2, οι οποίες κατευθύνουν τον μηχανισμό της αντιγραφής του κυττάρου προς όφελος του ιικού γονιδιώματος (Albert and Laimins 2020).
2. Στη δεύτερη φάση της αντιγραφής του ιικού DNA, φάση σταθερής συντήρησης, διατηρείται ένας σταθερός αριθμός αντιγράφων του ιικού γονιδιώματος, τα οποία κατανέμονται στα θυγατρικά κύτταρα κατά την διαίρεση των κυττάρων. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω αμφίδρομης αντιγραφής των ιικών επισωμάτων, που λαμβάνει χώρα παράλληλα με τη χρωμοσωμική αντιγραφή (Flores and Lambert 1997). Αυτός ο τρόπος αναπαραγωγής του ιού χαρακτηρίζεται από κυκλικά μόρια, που διαθέτουν διχάλες αντιγραφής δυο κατευθύνσεων, που ξεκινούν από το Ori και προχωρούν σε αντίθετες κατευθύνσεις. Η διαδικασία αυτή εξαρτάται επίσης από τις πρωτεΐνες E1 και E2 (Albert and Laimins 2020).
3. Η τρίτη φάση (εκθετική ενίσχυση) χαρακτηρίζεται από την ταχεία παραγωγή υψηλού αριθμού ιικών γονιδιωμάτων και πραγματοποιείται μόνο σε

διαφοροποιημένα κύτταρα. Ο μηχανισμός αντιγραφής γίνεται με δύο τρόπους, τόσο με αμφίδρομη αντιγραφή, όσο και με εξαρτώμενη από τον ανασυνδυασμό αντιγραφή (Recombination-dependent replication, RDR) (Orav *et al.* 2015). Να σημειωθεί ότι το RDR αποτελεί ένα μηχανισμό αναπαραγωγής του ιού, κατά τον οποίο απουσιάζουν συγκεκριμένες αλληλουχίες *ori* και η αντιγραφή μπορεί να ξεκινήσει από διάφορες περιοχές του HPV γονιδιώματος. Σε αντίθεση με την αμφίδρομη αντιγραφή, ο RDR μηχανισμός αφορά μία διχάλα αντιγραφής μονής κατεύθυνσης (Orav *et al.* 2015, Sakakibara *et al.* 2013). Η έκφραση των E6, E7 πρωτεϊνών ή η E1 από μόνη της μπορεί να ενεργοποιήσει τα μονοπάτια επάγοντας το αντιγραφικό στρες (Orav *et al.* 2015, Mehta and Laimins 2018).



Εικόνα 10. Απεικόνιση του κύκλου ζωής του HPV ιού. Αριστερά απεικονίζονται τα φυσιολογικά κερατινοκύτταρα, ενώ τα μολυσμένα από τον HPV ιό κερατινοκύτταρα απεικονίζονται δεξιά στην εικόνα. Τα ιϊκά σωματίδια προσβάλλουν τα βασικά κύτταρα έπειτα από κάποιον μικροτραυματισμό. Μετά την είσοδο, εγκαθίσταται στα αδιαφοροποίητα κύτταρα χαμηλός αριθμός αντιγράφων του επισώματος και μεταδίδονται στα θυγατρικά κύτταρα, ένα από τα οποία διαφοροποιείται. Κατά τη διαδικασία διαφοροποίησης, επάγεται η ενίσχυση του γονιδιώματος, μαζί με την ενεργοποίηση του όψιμου υποκινητή. Τέλος, γίνεται συναρμολόγηση του ιϊκού σωματιδίου και απελευθέρωση του HPV ιού (Albert and Laimins 2020).

2.4.3 Μεταγραφή του ιού

Οι HR-HPV ιοί μεταγράφουν τα γονίδια τους με τη βοήθεια των δύο υποκινητών, του πρώιμου και του όψιμου υποκινητή. Ο πρώιμος υποκινητής βρίσκεται ανοδικά από το E6 ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης και ευθύνεται για τη σύνθεση μετάργραφων που μεταφράζονται νωρίς στον κύκλο ζωής του ιού και λειτουργεί ανεξάρτητα από τη φάση διαφοροποίησης του κυττάρου. Ο όψιμος υποκινητής εντοπίζεται εντός του E7 ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης και εξαρτάται από τη φάση διαφοροποίησης του κυττάρου. Στον υπότυπο HPV16, για παράδειγμα, οι P97 και P670 έχουν ταυτοποιηθεί ως πρώιμος και όψιμος υποκινητής, αντίστοιχα (Wang *et al.* 2011, Kajitani *et al.* 2012).

Η μεταγραφική δραστηριότητα ελέγχεται κατά κύριο λόγο από την LCR περιοχή. Εντός της συγκεκριμένης περιοχής, βρίσκεται ένας μεταγραφικός ενισχυτής, με τον οποίο μπορούν να αλληλοεπιδράσουν πολλοί μεταγραφικοί παράγοντες. Οι θέσεις που είναι διαθέσιμες για τη δέσμευση του ρυθμιστή της μεταγραφής του ιού εξαρτώνται από την κατάσταση πληρότητας των θέσεων δέσμευσης της E2 (E2BS), που ελέγχονται από τη κυτταρική κατάσταση διαφοροποίησης (Hadaschik *et al.* 2003). Η E2 μπορεί να αλληλοεπιδρά με την κυτταρική πρωτεΐνη Brd4, γεγονός που επιτρέπει την ενεργοποίηση της μεταγραφής με τη μεσολάβηση της E2 πρωτεΐνης (McPhillips *et al.* 2006, Wu *et al.* 2012). Ο μεταγραφικός παράγοντας, Sp1, αποτελεί σημαντικό ρυθμιστή της έκφρασης του HPV γονιδιώματος, καθώς τροποποιεί τη δομή της χρωματίνης στην HPV16 LCR, παρέχοντας προσβασιμότητα στους μεταγραφικούς παράγοντες (Stünkel and Bernard 1999).

2.4.4 Συσκευασία του ιϊκού γονιδιώματος και απελευθέρωση των ιϊκών σωματιδίων

Η σύνθεση των πρωτεϊνών του καψιδίου ενεργοποιείται στα τελικώς διαφοροποιημένα κύτταρα. Οι πρωτεΐνες του καψιδίου έχουν την ικανότητα πρόσδεσης στο DNA και με τον τρόπο αυτό, βοηθούν στην ενθυλάκωση του γονιδιώματος του ιού από το καψίδιο. Οι πρωτεΐνες L1 και L2 διαθέτουν στο καρβοξυτελικό τους άκρο αλληλουχίες με θετικά φορτισμένα κατάλοιπα, δηλαδή περιοχές πρόσδεσης στο DNA. Η είσοδος του ιϊκού DNA στο ιϊκό σωματίδιο, πραγματοποιείται με τη βοήθεια της E2 πρωτεΐνης (Wang and Roden 2013). Αφού ολοκληρωθεί η δημιουργία των

νεοσυντιθέμενων ιϊκών σωματιδίων, αυτά απελευθερώνονται μαζί με τα αποφολιδωμένα κερατινοκύτταρα (Kajitani *et al.* 2012).

2.5 Ανίχνευση του HPV στο σπέρμα

Ο ιός των ανθρώπινων θηλωμάτων (HPV) αποτελεί ένα σημαντικό παράγοντα τόσο για την ανάπτυξη καρκίνου, όσο και για την εμφάνιση υπογονιμότητας σε άνδρες και γυναίκες παγκοσμίως (Schiller *et al.* 2012, Souho *et al.* 2015). Ο επιπολασμός του HPV στο γενικό πληθυσμό είναι της τάξης του 40% (Bosch *et al.* 2013).

Η μόλυνση των ανδρών από τον HPV ιό θεωρείται παροδική και υποχωρεί συνήθως αυθόρμητα με την πάροδο του χρόνου. Ο ιός ενδέχεται να ανιχνευθεί όχι μόνο κατά μήκος της γεννητικής οδού, δηλαδή στους όρχεις, στην επιδιδυμίδα και στον σπερματικό πόρο, (Bayasgalan *et al.* 2004, Foresta *et al.* 2011), αλλά και στο σπέρμα (Nielson *et al.* 2007, Laprise *et al.* 2014), όπου εντοπίζεται κυρίως στην κεφαλή των σπερματοζωαρίων (Foresta *et al.* 2008).

Όσον αφορά στα κλινικά ευρήματα, ο ιός εμφανίζεται με τη μορφή κονδυλωμάτων του πέους στα εξωτερικά γεννητικά όργανα και μέχρι σήμερα δεν υπάρχει κάποια αποτελεσματική θεραπεία αντιμετώπισής του. Οι επιπτώσεις της προσβολής του γεννητικού συστήματος του άρρενος από τον ιό HPV είναι το επίκεντρο του ερευνητικού ενδιαφέροντος. Η παρουσία του HPV ιού στο σπέρμα έχει συσχετιστεί με μειωμένη κινητικότητα των σπερματοζωαρίων και φαίνεται να αποτελεί σημαντικό παράγοντα υπογονιμότητας (Schillaci *et al.* 2013, Foresta *et al.* 2015). Ο προσδιορισμός του γονοτύπου του ιού θεωρείται ύψιστης σημασίας για τη διάγνωση της υπογονιμότητας (Souho *et al.* 2015), καθώς σε ασθενείς που προσβλήθηκαν από τον ιό, έχει βρεθεί σημαντικά υψηλότερος αριθμός σπερματοζωαρίων θετικών έναντι αντι-σπερματικών αντισωμάτων (Garolla *et al.* 2013). Ένα άλλο ζήτημα που απασχολεί τους κλινικούς εμβρυολόγους και γιατρούς είναι οι πιθανές επιζήμιες επιπτώσεις του HPV στις τεχνολογίες ART σε ζευγάρια με μολυσμένους άνδρες- συντρόφους.

2.5.1 Συχνότητα του ιού HPV στους άρρενες

Η λοίμωξη από τον ιό HPV απαντάται σε συχνότητα 38,1% στο σπέρμα και είναι η πιο διαδεδομένη από τα σεξουαλικά μεταδιδόμενα νοσήματα. Βιβλιογραφικά

δεδομένα ως προς την αξιολόγηση του επιπολασμού του HPV ιού σε δείγματα σπέρματος τόσο στο γενικό όσο και στον υπογόνιμο πληθυσμό ανέδειξαν την ύπαρξη 30 εργασιών κατά το χρονικό διάστημα 1991 έως 2014, σε σύνολο 5265 ατόμων (Foresta *et al.* 2015) (Πίνακας 2).

Πίνακας 2. Ενδεικτικές μελέτες σχετικά με τη συχνότητα εμφάνισης του ιού HPV στο σπέρμα σε γενικό και σε υπογόνιμο πληθυσμό, καθώς και ο αριθμός των ατόμων αλλά και των στελεχών του ιού HPV που μελετήθηκαν σε κάθε περίπτωση.

Συγγραφείς (έτος)	Αριθμός ασθενών	Πληθυσμός	Στελέχη HPV	Συχνότητα (%)
Rintala <i>et al.</i> 2004	65	Γενικός πληθυσμός	12 (όλοι HR-HPV)	10/65 (15,4)
Nielson <i>et al.</i> 2009	337	Γενικός πληθυσμός	36 (LR & HR-HPV)	18/337 (5,3)
Giuliano <i>et al.</i> 2007	463	Γενικός πληθυσμός	37 (LR & HR-HPV)	9/463 (4,8)
Hernandez <i>et al.</i> 2008	197	Γενικός πληθυσμός	40 (LR & HR-HPV)	15/63 (23,8)
Penino <i>et al.</i> 2011	199	Άνδρες σύζυγοι γυναικών για IVF	40 (LR & HR-HPV)	19/199 (9,5)
Kaspersen <i>et al.</i> 2011	188	Δότες σπέρματος	35 (LR & HR-HPV)	30/188 (16)
Garolla <i>et al.</i> 2012	155	Καρκινοπαθείς	36 (LR & HR-HPV)	15/155 (9,7)
	84	Γόνιμοι άνδρες		2/84 (2,4)
Yang <i>et al.</i> 2013	615	Υπογόνιμοι άνδρες	24 (LR & HR-HPV)	107/615 (17,4)
	523	Γόνιμοι άνδρες		35/523 (6,7)
Schillaci <i>et al.</i> 2013	308	Άνδρες σύζυγοι γυναικών για IVF	40 (LR & HR-HPV)	24/308 (7,8)
Golob <i>et al.</i> 2014	316	Άνδρες σύζυγοι γυναικών για IVF	37 (LR & HR-HPV)	43/316 (13,6)

Σύμφωνα με το Foresta και τους συνεργάτες του, η συχνότητα εμφάνισης του ιού HPV είναι 53,8% σε ασθενείς με κονδυλώματα των γεννητικών οργάνων, 40,9% σε

άνδρες με συντρόφους θετικές στον ιό, 10,2% σε υπογόνιμους άνδρες και 2,2% σε γόνιμους άνδρες (Foresta *et al.* 2010). Μία βιβλιογραφική ανασκόπηση των τελευταίων δύο δεκαετιών έδειξε ότι τα ποσοστά λοίμωξης από τον ιό HPV σε υπογόνιμους άνδρες είναι υψηλότερα σε σύγκριση με τα αντίστοιχα ποσοστά των γόνιμων ανδρών και ενδέχεται να υπάρχει πιθανή συσχέτιση της λοίμωξης με την ανεξήγητη ανδρική υπογονιμότητα (Foresta *et al.* 2015). Στην ίδια μελέτη, η συχνότητα εμφάνισης του ιού HPV στους άνδρες κυμαινόταν μεταξύ 10% με 35,7% στις περιπτώσεις με ανεξήγητη υπογονιμότητα. Σε μία άλλη μελέτη, στην οποία συμμετείχαν 1.138 άνδρες, βρέθηκε ότι είχε προσβληθεί από HPV ιό το 6,7% των γόνιμων ανδρών (n= 523) και το 17% των ιδιοπαθών υπογόνιμων ανδρών (n=615) (Yang *et al.* 2013).

Με βάση την πιο πρόσφατη επιδημιολογική ταξινόμηση των HPV ιών, οι γονότυποι ταξινομούνται σε χαμηλού και υψηλού κινδύνου (ογκογόνοι) (Bouvard *et al.* 2009). Στις περισσότερες περιπτώσεις λοίμωξης από τον ιό HPV, ανιχνεύονται στους άρρενες οι ογκογόνοι τύποι του ιού (Laprise *et al.* 2014). Ο Kaspersen και οι συνεργάτες του (2011) ανέφεραν ότι ποσοστό της τάξης του 66,7% των ασθενών προσβάλλονται από HR-HPV τύπους. Αντιθέτως, στη μελέτη των Gimenes και των συνεργατών του (2014) το ποσοστό αυτό ανέρχεται στο 82,7% των ασθενών. Μεταξύ των HR-HPV τύπων, ο HPV16 είναι ο συχνότερος τύπος (23,4%), ακολουθούμενος από τους HPV31, HPV51 και HPV56 (κάθε τύπος ανιχνεύθηκε στο 10,9% των ανδρών) και HPV42 (9,4%) (Luttmer *et al.* 2016). Λοίμωξη με δύο ή και περισσότερους γονότυπους του ιού HPV ταυτόχρονα καταγράφεται σε ποικίλα ποσοστά. Συγκεκριμένα, στη μελέτη των Kaspersen και συνεργατών (2011), ποσοστό της τάξης του 5,3% των περιπτώσεων φέρει πολλαπλή λοίμωξη, ποσοστό το οποίο φτάνει στο 34% των περιπτώσεων στη μελέτη των Foresta και συνεργατών (2011) και στο 58,6% των περιπτώσεων στη μελέτη των Glimes και συνεργατών (2014).

Σημειώνεται ότι ο επιπολασμός του HPV σε συγκεκριμένες ομάδες ασθενών χρειάζεται να επιβεβαιωθεί σε μεγαλύτερο αριθμό ασθενών και σε διαφορετικούς πληθυσμούς με την ύπαρξη μίας δοκιμασίας, η οποία να είναι επικυρωμένη για τη χρήση του σε δείγματα σπέρματος. Δυστυχώς, μέχρι σήμερα δεν υπάρχει ανάλογη διαδικασία ανίχνευσης στους άρρενες. Το πρόβλημα που εντοπίζεται στην προκειμένη περίπτωση είναι ότι το σπέρμα περιέχει πολλούς αναστολείς και τα διαθέσιμα εμπορικά τεστ δεν έχουν επικυρωθεί για χρήση σε δείγματα σπέρματος. Ο πιο αξιόπιστος τρόπος για την ανίχνευση της πιθανής μόλυνσης του σπέρματος θεωρείται η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Foresta *et al.* 2010). Το DNA του ιού, που περιέχεται στο

πλάσμα του σπέρματος, αντιπροσωπεύει ένα μέρος μόνο του ανιχνεύσιμου DNA του ιού, καθώς ο ιός έχει ανιχνευθεί τόσο στο σπέρμα, όσο και στα σπερματοζωάρια και συγκεκριμένα στην κεφαλή αυτών (Foresta *et al.* 2008). Σε περιπτώσεις υπογονιμότητας, ιδιαίτερα σε άρρενες που υποβάλλονται σε ART (Artificial Reproductive Technology), η ανίχνευση του ιού HPV στο σπέρμα ενδέχεται να αποτελεί στο μέλλον απαραίτητη προϋπόθεση για την αποσαφήνιση των αποτελεσμάτων.

2.5.2 Επίδραση του ιού HPV στις παραμέτρους του σπέρματος

Η επίδραση του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων στο σπέρμα περιγράφηκε για πρώτη φορά από τους Lai και συνεργάτες (1997), σε μία κλινική μελέτη, στην οποία συμμετείχαν 24 ασθενείς. Η συγκεκριμένη μελέτη απέδειξε ότι η συχνότητα εμφάνισης ασθενοζωοσπερμίας στους μολυσμένους από HPV16 και HPV18 ασθενείς ήταν σημαντικά υψηλότερη συγκριτικά με τους υγιείς μάρτυρες (75% έναντι 8%). Έκτοτε, ακολούθησαν αρκετές μελέτες, οι οποίες επιβεβαίωσαν τα προηγούμενα αποτελέσματα (Lee *et al.* 2002, Foresta *et al.* 2010, Garolla *et al.* 2012). Το 2010, σε μία μελέτη, στην οποία αξιολογήθηκε μία ομάδα 200 δοτών σπέρματος, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της κινητικότητας των σπερματοζωαρίων σε ασθενείς θετικούς για τον HPV, ανεξαρτήτως γονοτύπου του ιού (Foresta *et al.* 2010). Επιπρόσθετα, μία άλλη μελέτη σε 1138 ασθενείς επιβεβαίωσε τη μείωση της κινητικότητας του σπέρματος, καθώς και της φυσιολογικής μορφολογίας των σπερματοζωαρίων των ασθενών με HPV σε σύγκριση με υγιείς μάρτυρες (Yang *et al.* 2013). Ωστόσο, τα προαναφερόμενα αποτελέσματα δεν επιβεβαιώθηκαν σε μεταγενέστερες μελέτες, καθώς δεν προσδιορίστηκε καμία αλλαγή στις παραμέτρους του σπέρματος ως αποτέλεσμα της παρουσίας του ιού HPV στο σπέρμα (Connelly *et al.* 2001, Rintala *et al.* 2004, Schillaci *et al.* 2013, Kaspersen *et al.* 2013). Μέχρι σήμερα, υπάρχει ασυμφωνία μεταξύ των μελετών ως προς την επίδραση του ιού στις παραμέτρους του σπέρματος, γεγονός που καθιστά αναγκαία την περαιτέρω έρευνα.

2.5.3 Επίδραση του ιού HPV στη γονιμοποίηση και στα ποσοστά κύησης

Σήμερα, είναι πολύ γνωστό ότι τα σπερματοζωάρια έχουν την ικανότητα να μεταφέρουν το DNA του ιού HPV στο έμβρυο κατά τη διαδικασία της γονιμοποίησης

(Chan *et al.* 1994, Lai *et al.* 1996, Zacharis *et al.* 2018). Μελέτες, στις οποίες έχουν χρησιμοποιηθεί τρωκτικά, έδειξαν επιτυχή γονιμοποίηση των ωαρίων από μολυσμένα με τον HPV ιό σπερματοζωάρια (Foresta *et al.* 2011). Σε μία άλλη μελέτη, στην οποία έγινε γονιμοποίηση ωαρίων προερχόμενων από Χάμστερ από ανθρώπινα σπερματοζωάρια, βρέθηκε ότι η έκφραση των γονιδίων E6, E7 και L1 οδήγησε σε αυξημένο κατακερματισμό του DNA των βλαστοκύστεων και σε απόπτωση των τροφοβλαστών (Cabrera *et al.* 1997).

Όσον αφορά στα ποσοστά εμφύτευσης, η μόλυνση από τον HPV ιό οδήγησε σε μείωση του ποσοστού εμφύτευσης κατά 37% σε έμβρυα ποντικών (Hong *et al.* 2013). Σε περιπτώσεις ICSI στον άνθρωπο, τα ποσοστά κύησης ήταν σημαντικά μικρότερα σε ζευγάρια θετικά για τον ιό συγκριτικά με μη μολυσμένα (38% έναντι 14%) (Garolla *et al.* 2016). Ανάλογα αποτελέσματα προέκυψαν και στην προοπτική μελέτη των Perino και συνεργατών (2011), κατά την οποία διερευνήθηκαν υπογόνιμα ζευγάρια θετικά για τον HPV ιό, τα οποία είχαν υποβληθεί σε τεχνολογίες ART. Στην περίπτωση της ενδομήτριας σπερματέγχυσης (IUI), η πιθανότητα για σύλληψη ήταν 6 φορές μικρότερη σε γυναίκες με λοίμωξη από τον HPV ιό συγκριτικά με μη προσβεβλημένες γυναίκες (Depuydt *et al.* 2016). Τα δεδομένα σχετικά με τη θετικότητα του HPV και τα ποσοστά κύησης είναι πολύ περιορισμένα. Μέχρι στιγμής υποδηλώνουν μία τάση προς μικρότερα ποσοστά κύησης, χρειάζονται ωστόσο περισσότερα δεδομένα για να εξάγουμε ασφαλή συμπεράσματα.

2.6 Εμβολιασμός

Ο ιός HPV αποτελεί για τον άνθρωπο σημαντικό παράγοντα καρκινογένεσης και συγκαταλέγεται στην ομάδα με τίτλο «Καρκινογόνα των ανθρώπων» από το Διεθνή Οργανισμό Έρευνας για τον Καρκίνο (International Agency for Research on Cancer, IARC). Τα τελευταία χρόνια, η δημιουργία και χρήση εμβολίων κατά του HPV συνέβαλλε σημαντικά στην μείωση των λοιμώξεων. Σήμερα, υπάρχουν διαθέσιμα εμβόλια που στοχεύουν από 2 έως και 9 στελέχη του ιού. Το εμβόλιο, που στοχεύει 2 στελέχη του ιού, έχει αποδειχθεί πιο αποτελεσματικό στις γυναίκες, ενώ στους άνδρες μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα φαίνεται να έχει το εμβόλιο που καλύπτει τα 9 στελέχη. Ο εμβολιασμός των γυναικών ξεκίνησε το 2006 για τις γυναίκες, ενώ ο εμβολιασμός των ανδρών άρχισε το 2011. Με βάση τη Συμβουλευτική Επιτροπή Πρακτικής Εμβολιασμού (Advisory Committee on Immunization Practices, ACIP),

συστίνεται ο εμβολιασμός αντρών και γυναικών άνω των 26 και 21 ετών αντίστοιχα (Markowitz *et al.* 2016, Meites *et al.* 2016).

Το όφελος του εμβολίου στους άνδρες επιβεβαιώνεται σε πλήθος μελετών. Ωστόσο, καταγράφεται έντονο πρόβλημα, λόγω της άρνησης των ανδρών για εμβολιασμό. Μια μελέτη, στην οποία συμμετείχαν 298 Έλληνες με HR-HPV ιούς, έδειξε ότι το 90% των ατόμων γνώριζε ότι ενδέχεται να προσβληθούν τόσο άνδρες όσο και γυναίκες, αλλά δεν γνώριζε για την προστασία που προσφέρει το εμβόλιο, καθώς και ότι ο HPV ιός μπορεί να ευθύνεται για καρκινογένεση. Επιπρόσθετα, η απροθυμία των συμμετεχόντων οφειλόταν στο φόβο για τις επιπτώσεις του εμβολίου, στην ανεπαρκή ενημέρωση και στο πιθανό υψηλό κόστος του εμβολίου. Το αισιόδοξο μήνυμα ήταν ότι οι Έλληνες άνδρες, μετά από ενημέρωση, έδειξαν σημαντικό βαθμό αποδοχή της διαδικασίας του εμβολιασμού κατά του ιού HPV, τόσο για τους ίδιους όσο και για τους γιούς τους (Hoefler *et al.* 2018).

Κεφάλαιο 3 Σκοπός

Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι η διερεύνηση του επιπολασμού του HPV ιού (υπότυποι χαμηλού και υψηλού κινδύνου) σε δείγματα σπέρματος και η ανίχνευση πιθανών επιδράσεων του ιού στις παραμέτρους του σπέρματος. Δεύτερος στόχος είναι να διευκρινιστεί εάν η κρυοσυντήρηση των δειγμάτων σπέρματος, που είναι θετικά για τον ιό, έχει κάποια επίδραση στη βιωσιμότητα του HPV.

.

Κεφάλαιο 4 Υλικά και Μέθοδοι

4.1 Ομάδα μελέτης

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή, 78 άντρες προσήλθαν στην Μονάδα Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής της Μαιευτικής και Γυναικολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας κατά το χρονικό διάστημα Ιανουάριος 2019 έως Μάρτιος 2020 και υποβλήθηκαν εθελοντικά σε ανάλυση σπέρματος-σπερμοδιάγραμμα στο εργαστήριο της Μαιευτικής και Γυναικολογικής Κλινικής (Μητέρας- Παιδιού). Τα δείγματα λήφθηκαν μετά από έγγραφη συναίνεση όλων των συμμετεχόντων. Η μελέτη εγκρίθηκε από την Επιτροπή Ηθικής και Δεοντολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (Αριθμός Πρωτοκόλλου 28/13.03.2019). Επιδημιολογικά δεδομένα όπως η ηλικία, το βάρος, το ύψος καθώς επίσης συνήθειες, όπως το κάπνισμα και η κατανάλωση αλκοόλ, καταγράφηκαν για όλους τους συμμετέχοντες. Η αρχική επεξεργασία των δειγμάτων σπέρματος (πριν και μετά την απόψυξη αυτών) καθώς και η απομόνωση του γενετικού υλικό πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Μητέρας-Παιδιού και η μοριακή ανάλυσή τους στο Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

4.2 Συλλογή σπέρματος και επεξεργασία

Η συλλογή των δειγμάτων σπέρματος πραγματοποιήθηκε σε ειδικό χώρο ακριβώς δίπλα από το εργαστήριο της εξωσωματικής γονιμοποίησης, εξασφαλίζοντας την άμεση επεξεργασία των δειγμάτων. Τα δείγματα σπέρματος συλλέχθηκαν σε ειδικά αποστειρωμένα δοχεία αφού είχε προηγηθεί σύσταση για 2 έως 5 ημέρες αποχής από σεξουαλική επαφή. Τα δοχεία αυτά είχαν κατάλληλη σήμανση, επιτρέποντας την κωδικοποίηση των ατόμων και εξασφαλίζοντας τόσο την ταυτοποίηση των δειγμάτων, όσο και τη διασφάλιση των προσωπικών δεδομένων των συμμετεχόντων ατόμων.

Σε κάθε δείγμα σπέρματος πραγματοποιήθηκε ρευστοποίηση σε θερμοκρασία δωματίου για τουλάχιστον 20 λεπτά. Στη συνέχεια, ακολούθησε η εκτίμηση των βασικών παραμέτρων του σπέρματος, δηλαδή ο καθορισμός του όγκου, της συγκέντρωσης και της κινητικότητας των σπερματοζωαρίων σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (World Health Organization, WHO 2010). Η διαδικασία που πραγματοποιήθηκε είναι η ακόλουθη:

- Μακροσκοπική εξέταση του δείγματος
- Καθορισμός της συγκέντρωσης και της κινητικότητας των σπερματοζωαρίων με την εναπόθεση μίας σταγόνας ρευστοποιημένου δείγματος σπέρματος (10μl) στο κέντρο της βάσης του Makler.
- Καταμέτρηση των σπερματοζωαρίων με τη χρήση οπτικού μικροσκοπίου (Wang BioMedical) σε μεγέθυνση 25x.

Όσον αφορά στην κινητικότητα των σπερματοζωαρίων, αυτή εκφράζεται με τη μορφή ποσοστού σύμφωνα με την ακόλουθη κατάταξη: σπερματοζωάρια που επιτελούν ταχεία προωθητική κίνηση (a), βραδεία προωθητική κίνηση (b), επιτόπια κίνηση (c) και ακινησία (d).

Μετά τον υπολογισμό των προαναφερθέντων παραμέτρων, ένα μέρος του φρέσκου δείγματος σπέρματος (~200μl) χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση και τυποποίηση του HPV υποτύπου. Η υπόλοιπη ποσότητα (~200μl) του αρχικού φρέσκου δείγματος υπεβλήθη σε κατάψυξη και παρέμεινε στο υγρό άζωτο για το χρονικό διάστημα των 3 έως 12 μηνών με σκοπό την εκτίμηση της επίδρασης της κατάψυξης στην ανιχνευσιμότητα του ιού στο σπέρμα. Χρησιμοποιήθηκε η ταχεία μέθοδος κατάψυξης, κατά την οποία μία ποσότητα κάθε δείγματος τοποθετείται σε κρυοφιαλίδιο και αναμιγνύεται με ίσο όγκο κρυοπροστατευτικού διαλύματος (Sidney IVF Sperm Cryopreservation buffer, COOK medical). Η προσθήκη του κρυοπροστατευτικού διαλύματος γίνεται αργά, με τη μορφή σταγόνων, και ακολουθεί επώαση του μίγματος σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά. Για κάθε δείγμα σπέρματος χρησιμοποιούνται 3 κρυοφιλίδια, εξασφαλίζοντας την κατάψυξη του δείγματος σε υγρό άζωτο για χρονικό διάστημα 3, 6 και 12 μηνών. Τα κρυοφιαλίδια τοποθετούνται σε μεταλλική ράβδο και ακολουθεί βύθισή τους στο υγρό άζωτο (- 196 °C), αφού προηγουμένως έχουν καταγραφεί η ημερομηνία κατάψυξης και το κάνιστρο αποθήκευσης των κρυοφιαλιδίων στο υγρό άζωτο.

Μετά το πέρας των χρονικών διαστημάτων των 3, 6 και 12 μηνών, το αντίστοιχο κρυοφιαλίδιο του εκάστοτε δείγματος αποψύχεται με την εναπόθεσή του σε υδατόλουτρο στους 37°C για περίπου 10-15 λεπτά. Μετά την απόψυξη, εκτιμάται εκ

νέου η κινητικότητα των σπερματοζωαρίων και ακολουθεί η απομόνωση του DNA με σκοπό τον έλεγχο της παρουσίας του ιού σε κάθε αποψυγμένο δείγμα.

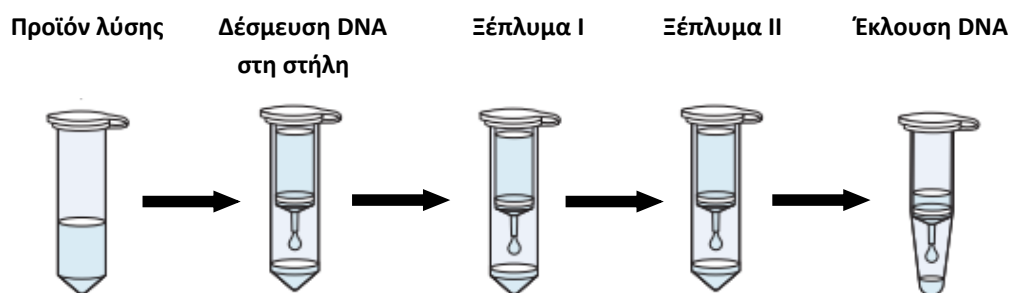
4.3 Απομόνωση DNA

Η απομόνωση DNA από τα σπερματοζωάρια πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το PureLink® Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Loughborough, UK) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Πριν την απομόνωση του DNA, κάθε δείγμα σπέρματος (φρέσκο ή αποψυγμένο) φυγοκεντρήθηκε στις 2000 στροφές (rpm) για 5 λεπτά, προκειμένου να γίνει διαχωρισμός του σπερματικού πλάσματος από τα σπερματοζωάρια. Στη συνέχεια, το ίζημα ξεπλύθηκε δύο φορές με 1ml διαλύματος 1x PBS (Phosphate-Buffered Saline) και το υπερκείμενο αφαιρέθηκε. Στο ίζημα των σπερματοζωαρίων πραγματοποιήθηκε η απομόνωση του DNA σύμφωνα με την ακόλουθη διαδικασία:

- Προσθήκη 180μl διαλύματος λύσης (PureLink Genomic Digestion Buffer) και 20μl πρωτεϊνάσης K στο ίζημα κάθε δείγματος.
- Επώση του μίγματος στους 55°C για τουλάχιστον 19 ώρες προκειμένου να επιτευχθεί η λύση των κυττάρων.
- Φυγοκέντρηση του μίγματος στις 14.000 στροφές (rpm) για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να αφαιρεθούν τυχόν σωματιδιακά υπολείμματα.
- Μεταφορά του υπερκείμενου διαλύματος σε νέο, αποστειρωμένο φιαλίδιο τύπου Eppendorf χωρητικότητας 1,5ml και προσθήκη 20μl RNase A.
- Σύντομη ανακίνηση (vortex) και επώση για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Προσθήκη 200μl διαλύματος λύσης/ πρόσδεσης (PureLink Genomic Lysis/ Binding Buffer) και έντονη ανακίνηση (vortex) για 5 δευτερόλεπτα.
- Προσθήκη 200μl διαλύματος απόλυτης αιθυλικής αλκοόλης (100%) και καλή ανακίνηση (vortex).
- Ο συνολικός όγκος των 640μl του προϊόντος λύσης τοποθετείται σε στήλη με φίλτρο (Spin PureLink) και ακολουθεί φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία δωματίου στις 14.000 στροφές (rpm) για 1 λεπτό.

- Η στήλη μεταφέρεται σε νέο σωληνάριο συλλογής και ακολουθούν δύο διαδοχικές πλύσεις της στήλης με την προσθήκη 500μl ρυθμιστικών διαλυμάτων πλύσης 1 και 2 (Wash Buffers 1, 2 αντίστοιχα).
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση της στήλης για 3 λεπτά στις 14.000 στροφές (rpm) σε θερμοκρασία δωματίου.
- Με την ολοκλήρωση των πλύσεων, η στήλη μεταφέρεται σε σωληνάριο τύπου Eppendorf χωρητικότητας 1,5ml και προστίθενται σε αυτή 25μl δις απεσταγμένου νερού (ddH₂O).
- Επώαση της στήλης για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρηση στις 14.000 στροφές (rpm) για 1 λεπτό με σκοπό την έκλυση του DNA (Εικόνα 11).

Για τη βέλτιστη απόδοση κατά την έκλυση του DNA, πραγματοποιήθηκε ένα δεύτερο βήμα έκλυσης, κατά το οποίο ο συνολικός όγκος έκλυσης μεταφέρθηκε ξανά στην στήλη και επώαστηκε εκ νέου για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την επώαση, ακολουθεί φυγοκέντρηση σε μέγιστη ταχύτητα (16.000 στροφές, rpm) για 2 λεπτά. Το εκλούμενο DNA διαλυμένο σε δις απεσταγμένο νερό φυλάσσεται στους 4°C ή στους -20°C για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα μέχρι να αναλυθεί περαιτέρω.



Εικόνα 11. Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας απομόνωσης του DNA από το δείγμα των σπερματοζωαρίων (Purelink Genomic DNA mini kit manual).

4.4 Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός του DNA

Η συγκέντρωση και η καθαρότητα του DNA που απομονώθηκε από τα σπερματοζωάρια εκτιμήθηκε με δύο διαφορετικές διαδικασίες: α) με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης και β) με φωτομέτρηση σε φασματοφωτόμετρο.

A) Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.

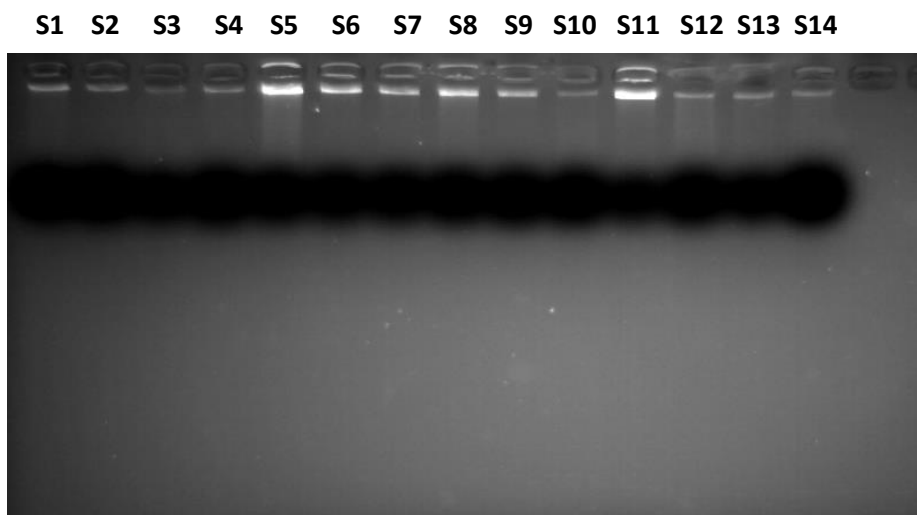
Η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων DNA που απομονώθηκαν από τα δείγματα σπέρματος πραγματοποιήθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης 2% w/v, προκειμένου να εκτιμηθεί η ακεραιότητα και η ποιότητα των δειγμάτων, υπό την επίδραση υπεριώδους ακτινοβολίας (UV).

Η παρασκευή του πηκτώματος αγαρόζης 2% w/v έγινε σύμφωνα με την ακόλουθη διαδικασία:

1. Μέτρηση σε ζυγό ακριβείας 6 γραμμαρίων αγαρόζης (UltraPure™ Agarose, Invitrogen, Life Technologies) και μεταφορά της σε ογκομετρική φιάλη.
2. Προσθήκη 300ml ρυθμιστικού διαλύματος 1x TBE (TRIS-BORIC-EDTA) και ήπια ανάδευση.
3. Τοποθέτηση της ογκομετρικής φιάλης σε φούρνο μικροκυμάτων και θέρμανση του μίγματος, ώστε να διαλυθεί η αγαρόζη και να γίνει διαυγές το διάλυμα.
4. Προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου στο μίγμα (τυπικά 0,5μg/ml). Η ένωση αυτή εισχωρεί στις βάσεις του DNA (γνωστός μεταλλαξογόνος παράγοντας) και φθορίζει παρουσίας υπεριώδους ακτινοβολίας (UV).
5. Ανάδευση του μίγματος και τοποθέτηση του περιεχομένου σε κατάλληλο εκμαγείο με ειδικά χτενάκια προσαρμοσμένα για τη δημιουργία βοθρίων.
6. Παραμονή σε απαγωγό μέχρι να πολυμεριστεί η αγαρόζη και να δημιουργηθεί το πήκτωμα.
7. Αφαίρεση του πηκτώματος από το εκμαγείο και αποθήκευση του στο ψυγείο, αφού προηγουμένως το καλύψουμε διαδοχικά με μεμβράνη και αλουμινόχαρτο, εμποδίζοντας την αφυδάτωση και έκθεσή του σε φως αντίστοιχα, μέχρι τη χρήση του.

Όσον αφορά στη διαδικασία της ηλεκτροφόρησης, 10μl δείγματος DNA προστίθενται σε 7μl χρωστικής μπλε της βρωμοφαινόλης. Η χρωστική που

χρησιμοποιείται εξυπηρετεί την οπτικοποίηση των δειγμάτων κατά την ηλεκτροφόρηση, καθώς είναι ορατή στο φως και επιτρέπει την παρακολούθηση της πορείας της ηλεκτροφόρησης. Επιπρόσθετα, η συγκεκριμένη χρωστική περιέχει γλυκερόλη, ουσία που προσδίδει μεγαλύτερη πυκνότητα στο DNA και αποτρέπει τη διάχυση του στο διάλυμα της ηλεκτροφόρησης. Τα δείγματα των νουκλεϊκών οξέων έχουν αρνητικό φορτίο λόγω των φωσφορικών τους ομάδων με αποτέλεσμα να μετακινούνται από την κάθοδο (-) προς την άνοδο (+) κατά μήκος της ηλεκτροφόρησης. Με την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα αγαρόζης μεταφέρεται σε συσκευή υπεριώδους ακτινοβολίας (DNR Bio-Imaging Systems MiniBIS Pro), η οποία συνδέεται με ηλεκτρονικό υπολογιστή. Η εικόνα της ηλεκτροφόρησης εμφανίζεται στην οθόνη του υπολογιστή και αποθηκεύεται ως αρχείο επιτρέποντας την αξιολόγηση των ζωνών του εκάστοτε δείγματος και τον έλεγχο της ποιότητας του DNA (Εικόνα 12).

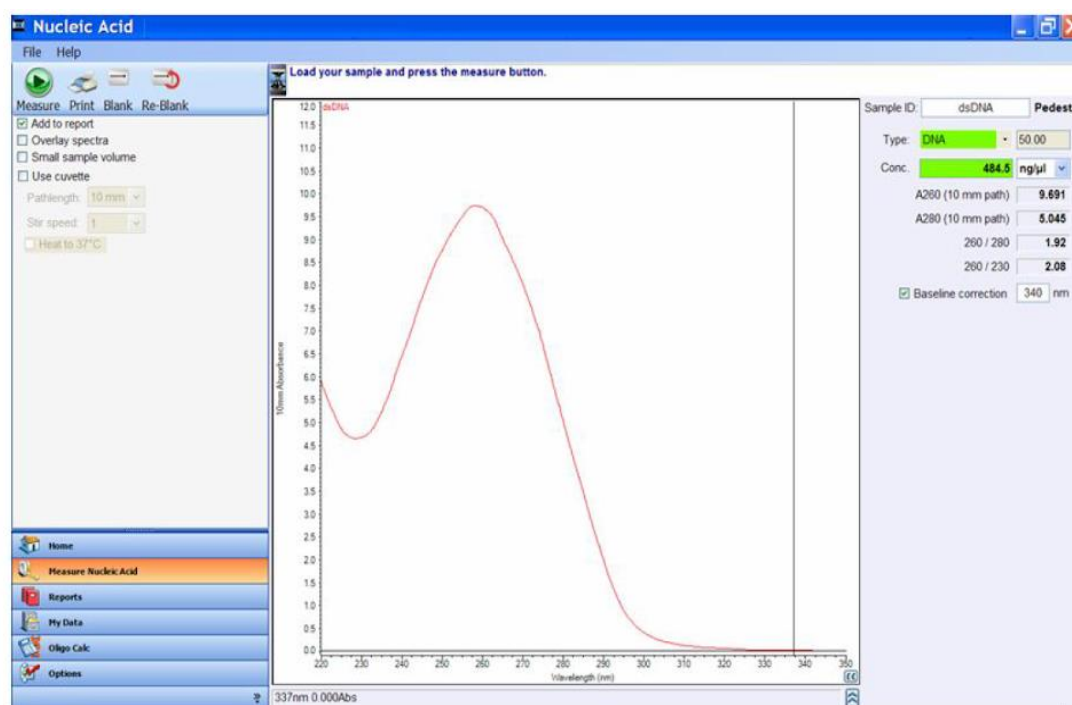


Εικόνα 12. Ηλεκτροφόρηση DNA, που έχει απομονωθεί από δείγματα σπέρματος, σε πήκτωμα αγαρόζης 2% w/v.

B) Φωτομέτρηση

Η φωτομέτρηση είναι μία διαδικασία που χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης των νουκλεϊκών οξέων (DNA ή RNA) και βασίζεται στην ιδιότητα των νουκλεϊκών οξέων να απορροφούν ακτινοβολία. Η φωτομέτρηση των δειγμάτων DNA έγινε στα 260/280nm και ο λόγος της οπτικής πυκνότητας (OD_{260}/OD_{280}) απεικονίζει

την καθαρότητα των DNA μορίων. Να σημειωθεί ότι η απορρόφηση σε μήκος κύματος 260nm αντιστοιχεί στα νουκλεϊκά οξέα, ενώ η απορρόφηση σε μήκος κύματος 280nm αντιστοιχεί στις πρωτεΐνες που περιέχονται στο διάλυμα. Οι τιμές του λόγου OD που υποδηλώνουν καθαρό DNA κυμαίνονται από 1,7 έως 1,9. Στην περίπτωση που ο λόγος OD βρίσκεται εκτός του συγκεκριμένου ορίου τιμών, το δείγμα περιέχει προσμίξεις με φαινόλη ή πρωτεΐνες (λόγος $OD < 1,7$) ή άλλα μακρομόρια (λόγος $OD > 1,9$). Το φωτόμετρο που χρησιμοποιείται στη συγκεκριμένη διδακτορική διατριβή είναι το Nanodrop™ 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific). Με την ολοκλήρωση της διαδικασίας της φωτομέτρησης, καθώς η συσκευή συνδέεται με ηλεκτρονικό υπολογιστή, οι μετρήσεις αποθηκεύονται με τη μορφή αρχείου (report) (Εικόνα 13).



Εικόνα 13. Απεικόνιση ενδεικτικού αρχείου καταγραφής των μετρήσεων κατά τη φωτομέτρηση δείγματος DNA. Καταγράφονται εκτός από το γράφημα, ο τύπος του νουκλεϊκού οξέος (DNA), η συγκέντρωσή του (ng/μl) και ο λόγος OD_{260}/OD_{280} που δείχνει την καθαρότητα του μορίου.

4.5 Ανίχνευση του HPV ιού

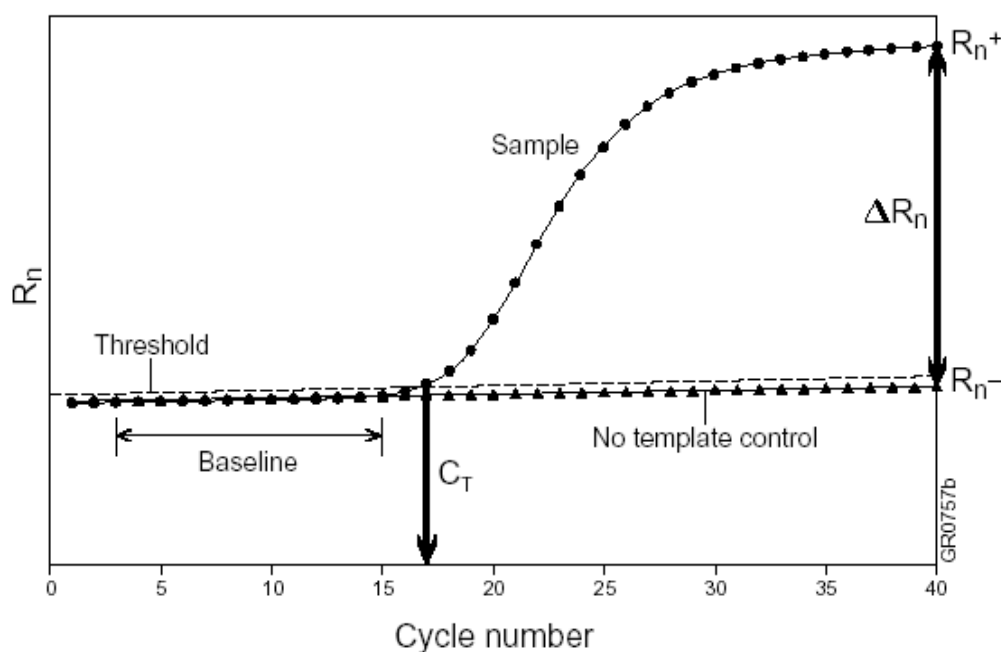
Η ανίχνευση του HPV ιού προϋποθέτει την ενίσχυση των γονιδιακών αντιγράφων του ιού και για το λόγο αυτό πραγματοποιείται η αντίδραση της αλυσιδωτής

αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR). Στην παρούσα διδακτορική διατριβή έγινε εφαρμογή μία παραλλαγή της μεθόδου και συγκεκριμένα η ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Quantitative Real Time PCR, QRT-PCR), η αρχή λειτουργίας της οποίας περιγράφεται στη συνέχεια.

4.5.1 Ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (Quantitative Real Time PCR, QRT-PCR)

Η ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (QRT-PCR) είναι μια εξαιρετικά ευαίσθητη μέθοδος, η οποία επιτρέπει την ανίχνευση και την ποσοτικοποίηση των προϊόντων, τα οποία παράγονται στη διάρκεια του κάθε κύκλου της διαδικασίας. Η ποσοτικοποίηση του δείγματος καθίσταται δυνατή με τη χρήση μίας ή περισσότερων χρωστικών/ων, οι οποίες προσδένονται στο δίκλωνο μόριο DNA και έχουν την ικανότητα να φθορίζουν σε συγκεκριμένο μήκος κύματος, όπως για παράδειγμα οι χρωστικές FAM, HEX και CY5 φθορίζουν στα 520nm, 556nm και 633nm, αντίστοιχα. Η διαδικασία μέτρησης του φθορισμού για κάθε κύκλο έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός διαγράμματος (Amplification Plot). Μέσω του συγκεκριμένου διαγράμματος εκτιμάται ο αριθμός των κύκλων της PCR αντίδρασης [«κατώφλι κύκλου» (cycle threshold, Ct)], οι οποίοι απαιτούνται για την επίτευξη ενός συγκεκριμένου επιπέδου φθορισμού. Το σήμα του φθορισμού είναι ανάλογο της συγκέντρωσης των PCR προϊόντων που παράγονται κατά την αντίδραση.

Η ένταση του σήματος φθορισμού αυξάνει εκθετικά κατά την εκθετική φάση της PCR αντίδρασης. Με βάση την ένταση του φθορισμού χωρίς ειδικότητα (background), καθορίστηκε το διαχωριστικό σημείο ή ουδός (cut-off level) για τον ειδικό φθορισμό. Αυτό το όριο (ή γραμμή μετάπτωσης) χρησιμοποιείται για να υπολογιστεί ο κύκλος μετάπτωσης (Ct) κάθε δείγματος, που είναι ο κύκλος της αντίδρασης PCR στον οποίο ο φθορισμός υπερβαίνει για πρώτη φορά την ουδό μετάβασης. Η τιμή μετάπτωσης είναι ευθέως ανάλογη προς το ποσό της αλληλουχίας- στόχου που περιέχεται στο δείγμα (Εικόνα 14).



Εικόνα 14. Ανίχνευση του σήματος φθορισμού. Το σημείο κατά το οποίο το κάθε δείγμα εισέρχεται στην εκθετική φάση της αντίδρασης ορίζεται ως το «κατώφλι» μεταβολής του ρυθμού αύξησης της συγκέντρωσης του παραγόμενου προϊόντος (Threshold Cycle ή C_T), το οποίο είναι στατιστικά σημαντικό και αποτυπώνεται (μετράται) ως σήμα φθορισμού. Η μεταβολή αυτή της συγκέντρωσης γίνεται σε συγκεκριμένο κύκλο και εξαρτάται απόλυτα από την αρχική συγκέντρωση του κάθε δείγματος.

Ένα δείγμα μπορεί να θεωρηθεί θετικό, εάν η ελάχιστη τιμή μετάπτωσης ενός ή περισσότερων αντιγράφων του δείγματος αυτού είναι καθαρά εκτός κλίμακας των τιμών μετάπτωσης των αρνητικών δειγμάτων (π.χ. τουλάχιστον κατά έναν κύκλο χαμηλότερα από την κατώτερη ένδειξη που παρουσιάζει ένα μη ειδικά πολυμερισμένο δείγμα) και σε ορισμένη απόσταση (π.χ. τέσσερις κύκλοι) από το τελικό στάδιο διάλυσης που χρησιμοποιείται για να εξασφαλίσει μέγιστη ευαισθησία.

Ένα δείγμα μπορεί να θεωρηθεί αρνητικό, εφόσον δεν παρατηρείται καθόλου ενίσχυση και όταν η κατώτερη τιμή μετάπτωσης του συγκεκριμένου δείγματος βρίσκεται εντός ή κοντά στην κλίμακα τιμών μετάπτωσης των αρνητικών δειγμάτων.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή, χρησιμοποιήθηκε το AmoyDx® Human Papillomavirus (HPV) Genotyping Detection Kit (Amoy Diagnostics Co., Ltd, Xiamen, China). Το συγκεκριμένο kit βασίζεται σε μεθοδολογία PCR πραγματικού χρόνου και επιτρέπει την ανίχνευση και τυποποίηση 21 συνολικά στελεχών του HPV ιού. Συγκεκριμένα, ανιχνεύονται και τυποποιούνται 19 στελέχη υψηλού κινδύνου (HPV16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 70 και 72) και 2 στελέχη χαμηλού κινδύνου (HPV6 και 11) (Πίνακας 3). Με τη χρήση του συγκεκριμένου kit ενισχύεται επιλεκτικά τμήμα του γονιδίου L1 των HPV ιών. Ειδικότερα, η περιοχή αυτή ενισχύεται επιλεκτικά με τη βοήθεια ειδικών για τα προαναφερόμενα στελέχη εκκινητών και ανιχνεύεται με τη χρήση ανιχνευτών φθορισμού. Για να διασφαλιστεί η αξιοπιστία της διαδικασίας, στο μίγμα της PCR αντίδρασης εμπεριέχεται ένας μη ανταγωνιστικός εσωτερικός μάρτυρας (control). Τα αντιδραστήρια που παρέχονται από τον κατασκευαστή περιλαμβάνουν:

- 8 μίγματα PCR αντίδρασης, τα οποία περιλαμβάνουν κατιόντα μαγνησίου (Mg^{2+}), δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs), κατάλληλους εκκινητές και ειδικούς φθορίζοντες ανιχνευτές για το HPV DNA κάθε στελέχους του ιού. Όσον αφορά στο 8^ο PCR μίγμα, συμπεριλαμβάνει και τον εσωτερικό μάρτυρα. Συγκεκριμένα, υπάρχουν εκκινητές σημασμένοι με FAM ανιχνευτές ειδικούς για το στέλεχος χαμηλού κινδύνου HPV6, άλλοι σημασμένοι με CY5 ανιχνευτή ειδικό για το επίσης χαμηλού κινδύνου στέλεχος HPV11 και άλλοι σημασμένοι με HEX ανιχνευτή ειδικό για τον εσωτερικό μάρτυρα. Το σύστημα εσωτερικού μάρτυρα έχει σχεδιαστεί ώστε να ανιχνεύει ένα housekeeping γονίδιο ως γονίδιο αναφοράς, επιτρέποντας με τον τρόπο αυτό την ανίχνευση αναστολέων και εξασφαλίζοντας την εγκυρότητα της πειραματικής διαδικασίας.
- ένα μίγμα ενζύμων, το οποίο περιέχει την Taq πολυμεράση καθώς και την ουρακίλη-N-γλυκοζυλάση, η οποία λειτουργεί σε θερμοκρασία δωματίου για την αποτροπή επιμολύνσεων από τη μεταφορά με το προϊόν της PCR.
- ένας θετικός μάρτυρας (control). Ο θετικός μάρτυρας είναι ένα ανασυνδυασμένο γονίδιο με πλασμιδικό DNA του HPV ιού.

Όσον αφορά στο γονότυπο του HPV ιού που ανιχνεύεται σε ένα δείγμα, αποτελεί συνάρτηση των εξής παραγόντων: i) του μίγματος της αντίδρασης που ανιχνεύθηκε το σήμα φθορισμού, και ii) της χρωστικής, της οποίας το σήμα ανιχνεύθηκε.

Πίνακας 3. Αντιστοίχιση του γονοτύπου του HPV ιού με βάση το μίγμα της αντίδρασης και το χρώμα του φθορισμοχρώματος που ανιχνεύεται (FAM: πράσινο, CY5: μπλε, HEX/VIC: πορτοκαλί).

PCR Μίγμα		Σήμα Φθορισμού		
		FAM	CY5	HEX/VIC
1	HPV Μίγμα Αντίδρασης 1	HPV16	HPV18	-
2	HPV Μίγμα Αντίδρασης 2	HPV58	HPV52	-
3	HPV Μίγμα Αντίδρασης 3	HPV33	HPV31	HPV26
4	HPV Μίγμα Αντίδρασης 4	HPV51	HPV82	HPV53
5	HPV Μίγμα Αντίδρασης 5	HPV45	HPV39	HPV73
6	HPV Μίγμα Αντίδρασης 6	HPV56	HPV35	HPV66
7	HPV Μίγμα Αντίδρασης 7	HPV59	HPV68	HPV70
8	HPV Μίγμα Αντίδρασης 8	HPV6	HPV11	Εσωτερικός μάρτυρας

Όσον αφορά τη διαδικασία προετοιμασίας της QRT-PCR, δημιουργούνται 8 διαφορετικά μίγματα, στο καθένα από τα οποία προστίθενται 25μL του αντίστοιχου μίγματος της αντίδρασης και 0,3μL του μίγματος των ενζύμων. Τα μίγματα αυτά κατανέμονται σε ειδικά σωληνάρια χωρητικότητας 0,1mL (RotorGene Thermal Cyclers tubes) και στη συνέχεια προστίθενται 4,7μL DNA του κάθε δείγματος. Τα σωληνάρια τοποθετούνται στο θερμικό κυκλοποιητή Rotor-GeneTM 6000 (Corbett Life Science) και οι συνθήκες που εφαρμόστηκαν για την PCR αντίδραση παρατίθενται παρακάτω (Πίνακας 4).

Πίνακας 4. Συνθήκες της Real-Time PCR για την ανίχνευση και τυποποίηση του HPV ιού. min: λεπτά, s: δευτερόλεπτα.

Στάδιο	Αριθμός κύκλων	Θερμοκρασία	Διάρκεια	Μέτρηση φθορισμού
1	1	50 °C	2 min	-
		95 °C	5 min	-
2	10	95	25 s	-
		60	20 s	-
		72	20 s	-
3	31	95	25 s	-
		60	35 s	FAM, HEX/VIC, CY5
		72	20 s	-

Σχετικά με την ερμηνεία των αποτελεσμάτων της QRT-PCR, ένα δείγμα θεωρείται HPV-θετικό όταν οποιοδήποτε από τα σήματα FAM, CY5 και HEX/VIC έχει τιμή $C_t \leq 25$. Ο γονότυπος του ιού, όπως απεικονίζεται στον Πίνακα 3, εξαρτάται από το μίγμα της αντίδρασης και από το φθορισμοχρώμα που ανιχνεύεται. Αντιστοίχως, ένα δείγμα θεωρείται αρνητικό για τον HPV ιό ή ο ιός θεωρείται μη ανιχνεύσιμος (όριο ανίχνευσης 100 αντίγραφα του ιού) όταν οι τιμές C_t είναι μεγαλύτερες του 25. Για την αξιοπιστία της μεθόδου θα πρέπει να ισχύουν τα ακόλουθα κριτήρια:

A) το αρνητικό δείγμα ελέγχου (αρνητικός μάρτυρας) θα πρέπει να έχει τιμές $C_t \geq 31$. Εάν δεν συμβεί αυτό, τα δεδομένα θεωρούνται μη αξιόπιστα και η διαδικασία πρέπει να επαναληφθεί.

Β) το θετικό δείγμα ελέγχου (θετικός μάρτυρας) θα πρέπει να έχει τιμές $Ct \leq 23$.

Γ) το σήμα φθορισμού στα HEX/VIC φθορισμοχρώματα θα πρέπει να έχει τιμές $Ct \leq 29$. Στην περίπτωση που το Ct έχει τιμή μεγαλύτερη του 29, αυτό υποδηλώνει την παρουσία αναστολέων της PCR ή ανεπαρκή ποσότητα DNA. Συνίσταται επανέλεγχος του δείγματος με μεγαλύτερη ποσότητα DNA ή εκ νέου απομόνωση DNA από το δείγμα.

4.5.2 Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την εύρεση του γονοτύπου του ιού

Εκτός από το kit AmoyDx® Human Papillomavirus (HPV) Genotyping Detection Kit (Amoy Diagnostics Co., Ltd, Xiamen, China), που χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση και τυποποίηση του HPV ιού με τη μεθοδολογία της Real-Time PCR, σχεδιάστηκαν επίσης ειδικοί εκκινητές για την εύρεση των πιο συχνών γονοτύπων του ιού. Πιο συγκεκριμένα, οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν επιλέχθηκαν από την υπάρχουσα βιβλιογραφία και αφορούσαν τα στελέχη χαμηλού κινδύνου, HPV6, HPV11, καθώς επίσης και τα στελέχη υψηλού κινδύνου HPV16 και HPV18 του HPV ιού. Οι 5'→3' αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν και το μέγεθος του προϊόντος της PCR αντίδρασης απεικονίζονται στον ακόλουθο Πίνακα (Πίνακας 5). Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ελέγχθηκαν μέσω του προγράμματος Primer-Blast (Primer Designing Tool- NCBI) και επιλέχθηκαν με βάση τις ακόλουθες παραμέτρους: α) το μήκος των εκκινητών κυμαίνεται από 20 έως 22 βάσεις και β) το ποσοστό των βάσεων G/C να μην ξεπερνά το 60%.

Πίνακας 5. Ειδικοί εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση και τυποποίηση συγκεκριμένων στελεχών του HPV ιού. bp: ζεύγη βάσεων.

Όνομα	Αλληλουχία 5'→3'	Προϊόν PCR
6/11A	5'- ATGTTATGGCAGCACAGTTA -3'	306bp
6/11B	5'- TTGCACTATAGGCGTAGCTG -3'	
16A	5'- GTGGACCGGTTCGATGTATGT -3'	

16B	5'- CATGCAATGTAGGTGTATCT -3'	93bp
18A	5'- GCAGCACAGAAAACAGTCCA -3'	185bp
18B	5'- CGCCATTTGTAGTTACCTGA -3'	

4.5.3 PCR με τη χρήση ειδικών εκκινητών και ηλεκτροφόρηση

Με τη μεθοδολογία της PCR επιτρέπεται η ενίσχυση ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA, το οποίο καθορίζεται από το ζεύγος των εκκινητών που χρησιμοποιούνται. Στην συγκεκριμένη περίπτωση, όπως έχει ήδη αναφερθεί, χρησιμοποιήθηκαν 3 ζεύγη εκκινητών ειδικών για τα στελέχη του HPV 6/11, 16 και 18 του HPV ιού.

Η αντίδραση της PCR πραγματοποιήθηκε σε σωληνάρια τύπου Eppendorf χωρητικότητας 0,2ml με τελικό όγκο αντίδρασης 50μl. Για κάθε δείγμα προετοιμάζεται μίγμα όγκου 45μl σύμφωνα με τον παρακάτω Πίνακα 6. Ακολουθεί η προσθήκη 5μl DNA ανά δείγμα στο αντίστοιχο σωληνάριο. Η αντίδραση λαμβάνει χώρα σε θερμικό κυκλοποιητή Eppendorf- Mastercycler και οι συνθήκες που επιλέγονται απεικονίζονται στον Πίνακα 7.

Πίνακας 6. Αντιδραστήρια και ποσότητες που χρησιμοποιούνται για την προετοιμασία της PCR αντίδρασης. dNTPs: δεοξυριβονουκλεοτίδια, ddH₂O: δις απεσταγμένο νερό.

Αντιδραστήρια	Ποσότητες
10x ρυθμιστικό διάλυμα	5 μl
Διάλυμα MgCl₂ (50mM)	1,5 μl
dNTPs (40mM)	2 μl
6/11 ή 16 ή 18 εκκινητής A	2 μl
6/11 ή 16 ή 18 εκκινητής B	2 μl
Platinum Taq DNA πολυμεράση	0,5 μl
ddH₂O	37 μl

Πίνακας 7. Απεικόνιση των συνθηκών της PCR αντίδρασης για όλα τα είδη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν, min: λεπτά, s: δευτερόλεπτα.

Διαδικασία	Αριθμός κύκλων	Συνθήκες αντίδρασης PCR
Αρχική αποδιάταξη DNA	1	94°C για 5 min
Αποδιάταξη DNA		94°C για 5 min
Υβριδισμό των εκκινητών	40	55°C για 60 s
Επιμήκυνση των κλώνων		72°C για 90 s
Τελική επιμήκυνση	1	72°C για 10 min

Τα προϊόντα της PCR αντίδρασης ελέγχονται περαιτέρω για την παρουσία των συγκεκριμένων στελεχών του HPV ιού με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης κατάλληλης σύστασης. Για τα στελέχη 6/11 και 18 χρησιμοποιείται πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 3%, ενώ για το στέλεχος 16 συγκέντρωσης 4%. Αυτή η διαφορά οφείλεται στο γεγονός ότι το αναμενόμενο μέγεθος των PCR προϊόντων για τα στελέχη 6/11 και 18 ήταν 306 και 185 ζεύγη βάσεων αντίστοιχα, ενώ στην περίπτωση του στελέχους 16 ήταν μόλις 93 ζεύγη βάσεων.

Το πήκτωμα αγαρόζης παρασκευάζεται σύμφωνα με την προαναφερθείσα διαδικασία. Στη συνέχεια, 10 μ l PCR προϊόντος αναμιγνύονται με 7 μ l χρωστικής μπλε της βρωμοφαινόλης και το μίγμα φορτώνεται στις ειδικές θέσεις (βοθρία) του πηκτώματος. Κατά την ηλεκτροφόρηση προστίθεται μάρτυρας γνωστού μεγέθους και μοριακού βάρους (100bp ladder, Fastgene), προκειμένου να ελεγχθεί εάν είναι σωστό το μέγεθος των PCR προϊόντων. Με το πέρας της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα αγαρόζης εκτίθεται σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV) και η εικόνα καταγράφεται και

αποθηκεύεται ως αρχείο στον συνδεδεμένο υπολογιστή, επιτρέποντας την ανίχνευση των συγκεκριμένων στελεχών του HPV ιού στα δείγματα της μελέτης μας.

4.6 Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του SPSS v. 29. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέσος όρος με το τυπικό σφάλμα ($\text{mean} \pm \text{standard error}$). Υπολογίζεται το διάστημα εμπιστοσύνης 95% για τη συσχέτιση των παραμέτρων. Πραγματοποιείται σύγκριση των δημογραφικών χαρακτηριστικών καθώς και των παραμέτρων του σπέρματος μεταξύ των θετικών και αρνητικών για τον ιό δειγμάτων χρησιμοποιώντας τις δοκιμασίες Mann-Whitney και το τεστ χ^2 . Επιπρόσθετα, γίνεται σύγκριση των παραμέτρων μεταξύ των υποομάδων των θετικών δειγμάτων (υψηλού κινδύνου και χαμηλού κινδύνου υπότυποι) με τη χρήση της δοκιμασίας Kruskal-Wallis. Ακολουθούν αναλύσεις προκειμένου να αξιολογηθούν οι συσχετίσεις μεταξύ των διαφόρων κλινικών μεταβλητών (όπως η ηλικία, ο δείκτης μάζας σώματος, η συνήθεια του καπνίσματος) και της κινητικότητας του σπέρματος. Όλες οι δοκιμές ήταν διπλής όψης (two-sided) και το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας καθορίζεται ως μικρότερο ή ίσο με το 0,05 ($p \leq 0,05$). Αξίζει να σημειωθεί ότι αρχικά η συνήθεια του καπνίσματος των συμμετεχόντων διερευνήθηκε σύμφωνα με το ιστορικό πακέτου/χρόνο και έγινε κατηγοριοποίησή τους σε τρεις ομάδες ως εξής: μη καπνιστές, μέτριοι καπνιστές (1 πακέτο/χρόνο) και εντατικοί καπνιστές (> 1 πακέτο/χρόνο). Ωστόσο, στα πλαίσια ορθότερης στατιστικής ανάλυσης των αποτελεσμάτων, οι συμμετέχοντες με βάση τη συνήθεια του καπνίσματος ομαδοποιήθηκαν σε μη καπνιστές και ενεργούς καπνιστές (μετρίου και υψηλού βαθμού καπνιστές). Ομοίως, αναφορικά με το αλκοόλ, οι συμμετέχοντες κατηγοριοποιήθηκαν ως μη πότες (μηδενική κατανάλωση αλκοόλ) και πότες μετρίου και υψηλού βαθμού (μέτρια κατανάλωση: 2 ποτά/ημέρα και μεγάλη κατανάλωση: >2 ποτά/ημέρα).

Κεφάλαιο 5 Αποτελέσματα

5.1 Επιδημιολογικά στοιχεία

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή συμμετείχαν 78 άρρενα άτομα, τα οποία προσήλθαν στην Κλινική Εξωσωματικής Γονιμοποίησης του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας κατά το χρονικό διάστημα Ιανουάριος 2019 έως Μάρτιος 2020 και υπεβλήθησαν εθελοντικά σε ανάλυση σπέρματος- σπερμοδιάγραμμα. Ακολούθησε η συλλογή των δειγμάτων και η απομόνωση του γενετικού υλικού. Μετά τον ποιοτικό και ποσοτικό έλεγχο των δειγμάτων DNA, ελέγξαμε την παρουσία του ιού HPV και την περαιτέρω τυποποίηση του. Ο ιός HPV ανιχνεύθηκε σε 11/78 άρρενα άτομα (14,1%), ενώ στα υπόλοιπα 67 άρρενα άτομα (67/78, 85,9%) δεν ανιχνεύθηκε η παρουσία του ιού HPV. Για όλους του συμμετέχοντες καταγράψαμε επιδημιολογικά δεδομένα όπως η ηλικία, το βάρος, το ύψος και συνήθειες, όπως το κάπνισμα και η κατανάλωση αλκοόλ. Η μέση ηλικία των ατόμων, στους οποίους ανιχνεύθηκε η παρουσία του ιού HPV ήταν $41,8 \pm 2$ έτη, ενώ η ηλικία των αρρένων ατόμων στα οποία δεν αναδείχθηκε η παρουσία του ιού HPV ήταν $40,2 \pm 0,8$ έτη, διαφορά στατιστικώς μη σημαντική ($p > 0,05$). Στον Πίνακα 8 γίνεται σύγκριση των μέσων όρων των δημογραφικών χαρακτηριστικών μεταξύ των ανδρών που ήταν θετικοί για τον HPV και των ανδρών που ήταν αρνητικοί για τον HPV.

Όσον αφορά το κάπνισμα μεταξύ των αρρένων ατόμων στα οποία δεν ανιχνεύθηκε ο ιός HPV, 47,4% των ανδρών ήταν καπνιστές και 52,6% μη καπνιστές. Στα άτομα που ανιχνεύθηκε ο ιός HPV, 33,3% των ανδρών ήταν καπνιστές και 66,7% μη καπνιστές. Ανάλογα ευρήματα προκύπτουν εξετάζοντας την κατανάλωση του αλκοόλ στους συμμετέχοντες στη μελέτη. Συγκεκριμένα, στα άτομα στα οποία δεν ανιχνεύθηκε ο ιός HPV, 29,8% δεν κατανάλωναν αλκοόλ, ενώ 70,2% των ανδρών δήλωσαν μετρίου ή υψηλού βαθμού κατανάλωση αλκοόλ. Στα 11 θετικά για τον ιό HPV άτομα, 28,6% δεν κατανάλωναν αλκοόλ, ενώ 71,4% ήταν πότες. Δεν αναδεικνύονται στατιστικώς σημαντικές συσχετίσεις ως προς το κάπνισμα και την κατανάλωση αλκοόλ (Πίνακας 8).

Πίνακας 8. Επιδημιολογικά στοιχεία (μέσος όρος $\pm$ τυπικό σφάλμα SE) των ατόμων της μελέτης μεταξύ των HPV θετικών και HPV αρνητικών ατόμων της μελέτης.

	Σύνολο	HPV-	HPV+	P-value
Αριθμός ατόμων	78	67	11	
Ηλικία (έτη)	40,4 $\pm$ 0,7	40,2 $\pm$ 0,8	41,8 $\pm$ 2,0	>0,05
Δείκτης Μάζας Σώματος (kg/m²)	27,6 $\pm$ 0,5	27,5 $\pm$ 0,4	28,9 $\pm$ 1,8	>0,05
Κάπνισμα (%)				
Μη καπνιστές	54	52,6	66,7	>0,05
Καπνιστές	46	47,4	33,3	>0,05
Κατανάλωση αλκοόλ, (%)				
Μη καταναλωτές	70,3	70,2	71,4	>0,05
Πότες μετρίου/ υψηλού βαθμού	29,7	29,8	28,6	>0,05

5.2 Ανίχνευση και τυποποίηση του ιού HPV

5.2.1 Ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (Quantitative Real Time PCR, QRT-PCR)

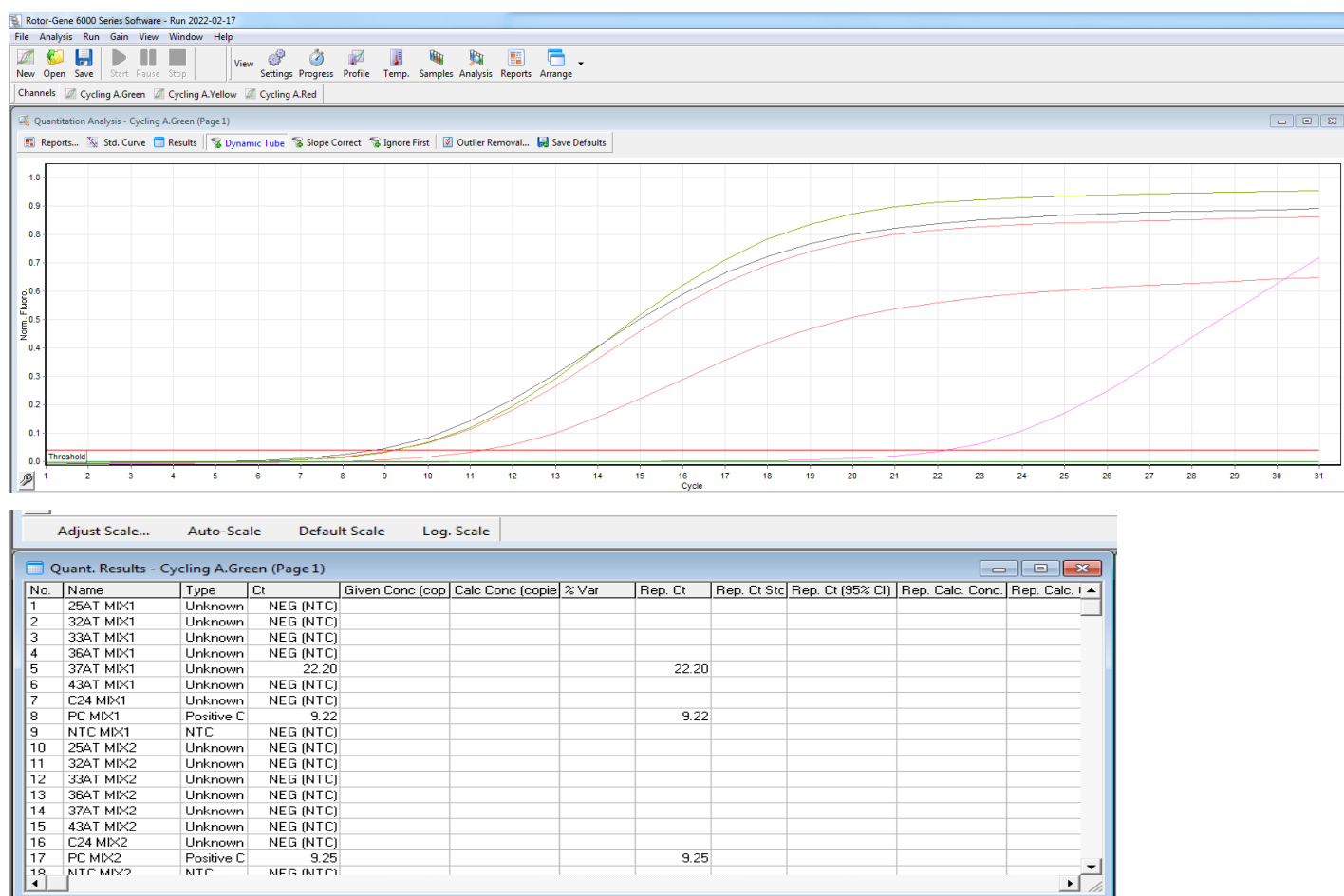
Για την ανίχνευση και τυποποίηση του ιού HPV στα δείγματα σπέρματος χρησιμοποιήθηκε το AmoyDx® Human Papillomavirus (HPV) Genotyping Detection Kit (Amoy Diagnostics Co., Ltd, Xiamen, China). Με τη χρήση του εν λόγω IVD (In vitro Diagnostic use) κιτ ανιχνεύονται και τυποποιούνται 19 στελέχη υψηλού κινδύνου (HPV16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 70 και 72) και 2 στελέχη χαμηλού κινδύνου (HPV6 και 11). Η αξιοπιστία της διαδικασίας διασφαλίζεται με την προσθήκη ενός μη ανταγωνιστικού εσωτερικού μάρτυρα (control) στο μίγμα της αντίδρασης PCR.

Με τη συγκεκριμένη μεθοδολογία, ένα δείγμα θεωρείται θετικό όταν οποιοδήποτε από τα σήματα FAM, CY5 και HEX/VIC έχει τιμή $Ct \leq 25$. Αντιστοίχως, ένα δείγμα θεωρείται αρνητικό για τον HPV ιό ή ο ιός θεωρείται μη ανιχνεύσιμος (<100 αντίγραφα

ϊϊκού γονιδιώματος), όταν οι τιμές Ct >25. Η μέτρηση του φθορισμού γίνεται σε κάθε κύκλο και έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός διαγράμματος (Amplification Plot), μέσω του οποίου εκτιμάται ο αριθμός των κύκλων της PCR αντίδρασης [«κατώφλι κύκλου» (cycle threshold, Ct)], οι οποίοι απαιτούνται για την επίτευξη ενός συγκεκριμένου επιπέδου φθορισμού (Εικόνα 15). Οι τιμές των Ct για τα θετικά δείγματα απεικονίζονται στον Πίνακα 9.

Πίνακας 9. Απεικόνιση του Cycle Threshold ή Ct των θετικών για τον HPV δειγμάτων με βάση το χρώμα του φθορισμοχρώματος που ανιχνεύεται (FAM: πράσινο, CY5: μπλε, HEX/VIC: πορτοκαλί).

Δείγμα	Cycle Threshold (Ct)		
	FAM	CY5	HEX/VIC
1	24,2		
2			24,72
3	21,26		
4	22,37		
5	23,13		
6	22,01/ 21,6		
7	23,25	22,97	
8	16,72	15,87	16,72
9	19,5		
10	21,16		
11	24,2		



Εικόνα 15. Απεικόνιση της καμπύλης και των μετρήσεων κατά τη διεξαγωγή της Real-Time PCR. Καταγράφονται εκτός από τη καμπύλη, η κωδικοποίηση των δειγμάτων σπέρματος, ο τύπος του δείγματος και το Ct.

Στα θετικά δείγματα, σε 5/11 άτομα (45,5%) ανιχνεύθηκαν χαμηλού κινδύνου HPV στελέχη, σε άλλα 5/11 άτομα (45,5%) υψηλού κινδύνου HPV στελέχη, ενώ σε ένα άτομο (9%) είχαμε πολλαπλή λοίμωξη από χαμηλού και υψηλού κινδύνου στελέχη του ιού HPV (Πίνακας 10). Κατά την στατιστική επεξεργασία των δειγμάτων, το δείγμα με την πολλαπλή λοίμωξη εντάχθηκε με τα υπόλοιπα δείγματα που φέρουν υψηλού κινδύνου στελέχη HPV.

Στην πλειοψηφία των HPV-θετικών δειγμάτων σπέρματος, ανιχνεύθηκε ένας μεμονωμένος υπότυπος HPV (8/11, 72,7%). Η κατανομή των υποτύπων του ιού HPV στα δείγματα που εξετάστηκαν απεικονίζεται στον Πίνακα 11. Στο σύνολο των 11 θετικών για τον ιό δειγμάτων, 3 δείγματα (27,3%) ήταν θετικά για τον HPV16, 2

(18,2%) για τον HPV31 υπότυπο, 2 (18,2%) για τον HPV33, 2 δείγματα είχαν τον υπότυπο HPV26 και 6 δείγματα έφεραν το στέλεχος HPV6 (54.5%).

Πίνακας 10. Απεικόνιση του αριθμού/ ποσοστού των HPV-θετικών δειγμάτων.

Παρουσία HPV στα δείγματα σπέρματος		Ποσοστό
Σύνολο HPV		
Υψηλού και χαμηλού κινδύνου υπότυποι HPV	11/78	14,1%
Αποκλειστικά υψηλού κινδύνου υπότυποι HPV	5/11	45,5%
Αποκλειστικά χαμηλού κινδύνου υπότυποι HPV	5/11	45,5%
Συνύπαρξη χαμηλού και υψηλού κίνδυνου HPV	1/11	9%

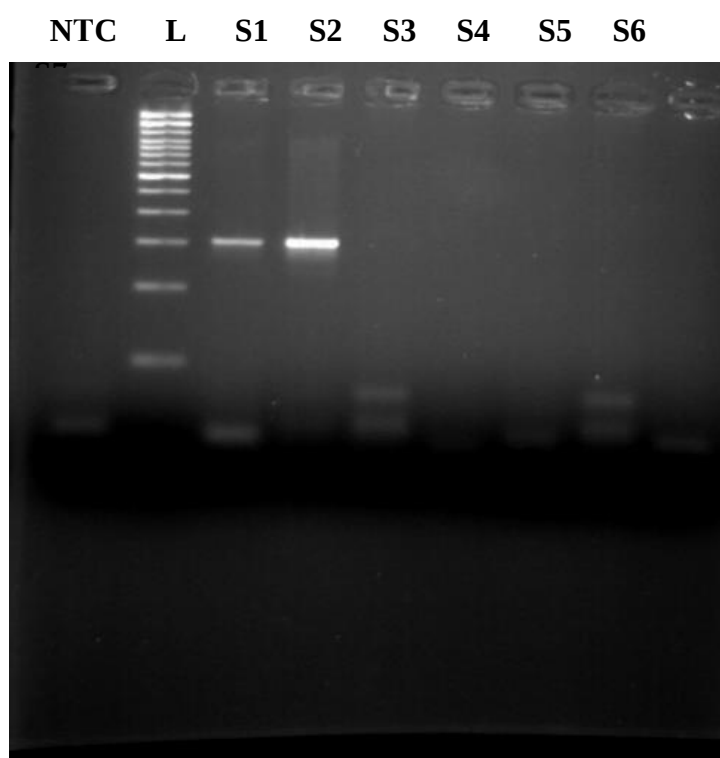
Πίνακας 11. Κατανομή των υποτύπων HPV στα θετικά δείγματα σπέρματος (μονήρεις και πολλαπλές λοιμώξεις).

HPV υπότυποι		n	Ποσοστό
Υψηλού κινδύνου	16	3	27,3%
	31	2	18,2%
	33	2	18,2%
	26	2	18,2%
Χαμηλού κινδύνου	6	6	54,5%

5.2.2 PCR με τη χρήση ειδικών εκκινητών

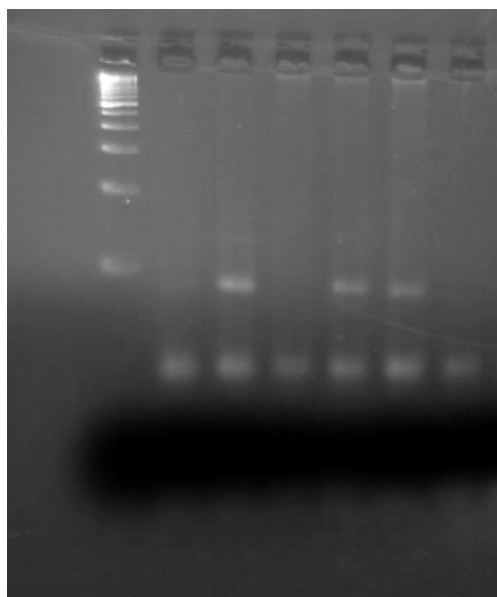
Εκτός από το kit AmoyDx® Human Papillomavirus (HPV) Genotyping Detection Kit, που χρησιμοποιήθηκε για την τυποποίηση του HPV ιού με τη μεθοδολογία της Real-Time PCR, πραγματοποιήθηκε επίσης PCR με ειδικούς εκκινητές για την ταυτοποίηση των συχνότερων γονοτύπων υψηλού και χαμηλού κινδύνου του ιού και

συγκεκριμένα των HPV6/11, 16 και 18. Τα προϊόντα της PCR αντίδρασης ελέγχθηκαν για την παρουσία των συγκεκριμένων στελεχών με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης. Το αναμενόμενο μέγεθος των PCR προϊόντων για τα στελέχη 6/11, 16 και 18 ήταν 306, 93 και 185 ζεύγη βάσεων αντίστοιχα. Οι ηλεκτροφορήσεις των προϊόντων της PCR για τους HPV6/11, 16 και 18 υποτύπους μήκους 306, 93 και 185 ζεύγη βάσεων αντίστοιχα, απεικονίζονται παρακάτω (Εικόνες 16, 17, 18 αντίστοιχα). Σημειώνεται επίσης ότι τα δείγματα, τα οποία βγήκαν θετικά για τους συγκεκριμένους υποτύπους με τη μεθοδολογία της Real-Time PCR, επιβεβαιώθηκαν με τη χρήση της συμβατικής PCR, που χρησιμοποιεί ειδικούς για το κάθε στέλεχος εκκινητές επιβεβαιώνοντας την αξιοπιστία των τεχνικών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία.



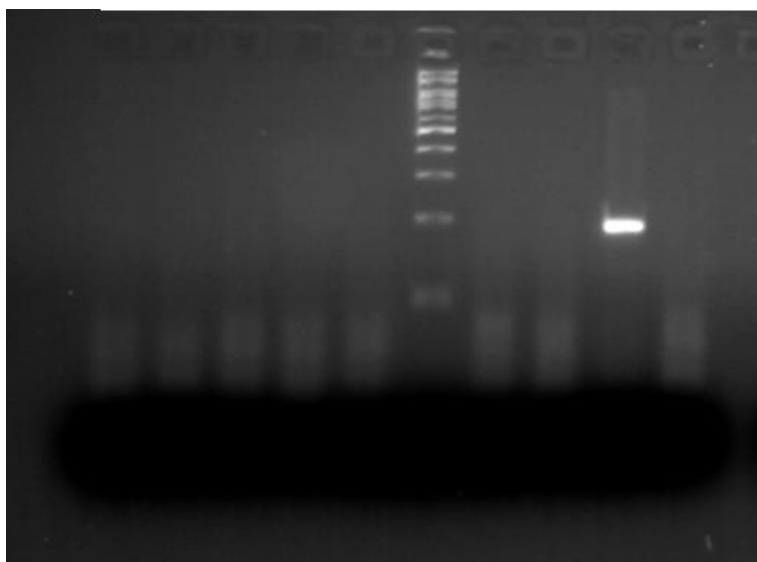
Εικόνα 16. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR, μήκους 306 ζεύγη βάσεων, με ειδικούς εκκινητές για τα στελέχη HPV6/11 σε πήκτωμα αгарόζης 3% w/v. NTC, Non-template control: αρνητικός μάρτυρας, L: μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους 100bp ladder, S1, S2: Δείγματα θετικά για τα στελέχη HPV6/11 του ιού, S3-S7: αρνητικά δείγματα για τα συγκεκριμένα στελέχη.

L S1 S2 S3 S4 S5 NTC



Εικόνα 17. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR, μήκους 93 ζεύγη βάσεων, με ειδικούς εκκινητές για το στελέχος HPV16 σε πήκτωμα αγαρόζης 4% w/v. NTC, Non-template Control: αρνητικός μάρτυρας, L: μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους 100bp ladder, S2, S4, S5: Δείγματα θετικά για το στέλεχος HPV16 του ιού, S1, S3: αρνητικά δείγματα για το συγκεκριμένα στέλεχος.

S1 S2 S3 S4 S5 L S6 S7 S8 NTC



Εικόνα 18. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR, μήκους 185 ζεύγη βάσεων, με ειδικούς εκκινητές για το στέλεχος HPV18 σε πήκτωμα αγαρόζης 3% w/v. NTC: αρνητικός μάρτυρας, L: μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους 100bp ladder, S1-S7:

αρνητικά δείγματα για το στέλεχος HPV18 του ιού, S8: θετικός μάρτυρας για το συγκεκριμένο στέλεχος.

5.3 Επίδραση του ιού στις παραμέτρους του σπέρματος πριν και μετά την κατάψυξη

Οι βασικές παράμετροι του σπέρματος πριν την κατάψυξη των δειγμάτων απεικονίζονται στον Πίνακα 16. Ο όγκος του σπέρματος, η συγκέντρωση και η κινητικότητα των σπερματοζωαρίων δε διέφεραν μεταξύ των HPV-θετικών και HPV-αρνητικών δειγμάτων σπέρματος.

Πίνακας 16. Απεικόνιση των παραμέτρων του σπέρματος (μέσος όρος $\pm$ τυπικό σφάλμα SE) μεταξύ των φρέσκων HPV-θετικών και HPV-αρνητικών δειγμάτων σπέρματος.

	Σύνολο	HPV-	HPV+	P-value
Αριθμός ατόμων	78	67	11	
Όγκος σπέρματος (ml)	3,0 $\pm$ 0,1	3,0 $\pm$ 0,1	2,8 $\pm$ 0,3	>0,05
Συγκέντρωση (10⁶/ml)	42 $\pm$ 3,5	43,4 $\pm$ 3,9	33,6 $\pm$ 6,7	>0,05
A+B κινητικότητα (%)	54,1 $\pm$ 1,4	54,1 $\pm$ 1,5	53,5 $\pm$ 3,1	>0,05
C κινητικότητα (%)	17,5 $\pm$ 0,8	17,3 $\pm$ 0,8	18,9 $\pm$ 2,4	>0,05
Απουσία κινητικότητας (%)	28,4 $\pm$ 1,3	28,6 $\pm$ 1,4	27,6 $\pm$ 3,0	>0,05

Η σύγκριση των προαναφερθέντων παραμέτρων μεταξύ των LR- και HR-HPV στα φρέσκα δείγματα, έδειξε στατιστικώς σημαντική διαφορά τόσο στον όγκο του σπέρματος ($p=0,03$), όσο και στην προωθητική κινητικότητα των σπερματοζωαρίων (A+B κινητικότητα) ($p=0,03$) (Πίνακας 17).

Πίνακας 17. Επιδημιολογικά χαρακτηριστικά και παράμετροι του σπέρματος (μέσος όρος $\pm$ τυπικό σφάλμα SE) μεταξύ των θετικών για τον ιό HPV φρέσκων δειγμάτων χαμηλού κινδύνου (LR-HPV) και υψηλού κινδύνου (HR-HPV) και των αρνητικών για την παρουσία του ιού δειγμάτων.

	HPV-	LR-HPV	HR-HPV	P-value
Αριθμός ατόμων	67	5	6	
	Φρέσκα Δείγματα			
Ηλικία (έτη)	40,2 $\pm$ 0,8	43,8 $\pm$ 3,1	40,2 $\pm$ 1,8	>0,05 >0,05
Δείκτης Μάζας Σώματος (Kg/m²)	27,5 $\pm$ 0,4	26,7 $\pm$ 3,4	30,0 $\pm$ 2,2	
Συγκέντρωση (10⁶/ml)	43,4 $\pm$ 3,9	31,6 $\pm$ 13,4	35,3 $\pm$ 6,5	>0,05
Όγκος σπέρματος (ml)	3,0 $\pm$ 0,1	3,5 $\pm$ 0,6	2,26 $\pm$ 0,2	<0.05
A+B κινητικότητα (%)	54,1 $\pm$ 1,5	45,6 $\pm$ 3,7	60 $\pm$ 2,7	<0.05
C κινητικότητα (%)	17,3 $\pm$ 0,8	19,2 $\pm$ 4,1	18,7 $\pm$ 3,2	>0,05
Απουσία κινητικότητας (%)	28,6 $\pm$ 1,4	35,2 $\pm$ 4,6	21,3 $\pm$ 0,8	>0,05

Όσον αφορά στην επίδραση του ιού στην κινητικότητα του σπέρματος μετά την κατάψυξη, οι τιμές της κινητικότητας των σπερματοζωαρίων μεταξύ LR- και HR-HPV θετικών δειγμάτων δεν παρουσίασαν διαφορές στα χρονικά διαστήματα που εξετάσαμε (Πίνακας 18). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η μείωση της κινητικότητας των σπερματοζωαρίων στα αρνητικά για τον ιό δείγματα ήταν παρόμοια (με ανάλογο τρόπο) με εκείνη των LR- και HR-HPV θετικών δειγμάτων. Η παρατήρηση αυτή δηλώνει ότι η κρυοσυντήρηση επηρεάζει την κινητικότητα των σπερματοζωαρίων ανεξάρτητα από την παρουσία του ιού HPV. Επιπρόσθετα, παρατηρήθηκε μια μικρή μείωση στην κινητικότητα των σπερματοζωαρίων (όχι στατιστικώς σημαντική) στα αρνητικά αλλά και στα θετικά δείγματα για τον ιό, γεγονός που μπορεί να θεωρηθεί φυσιολογικό λόγω της διαδικασίας της κρυοσυντήρησης του σπέρματος (Πίνακας 18).

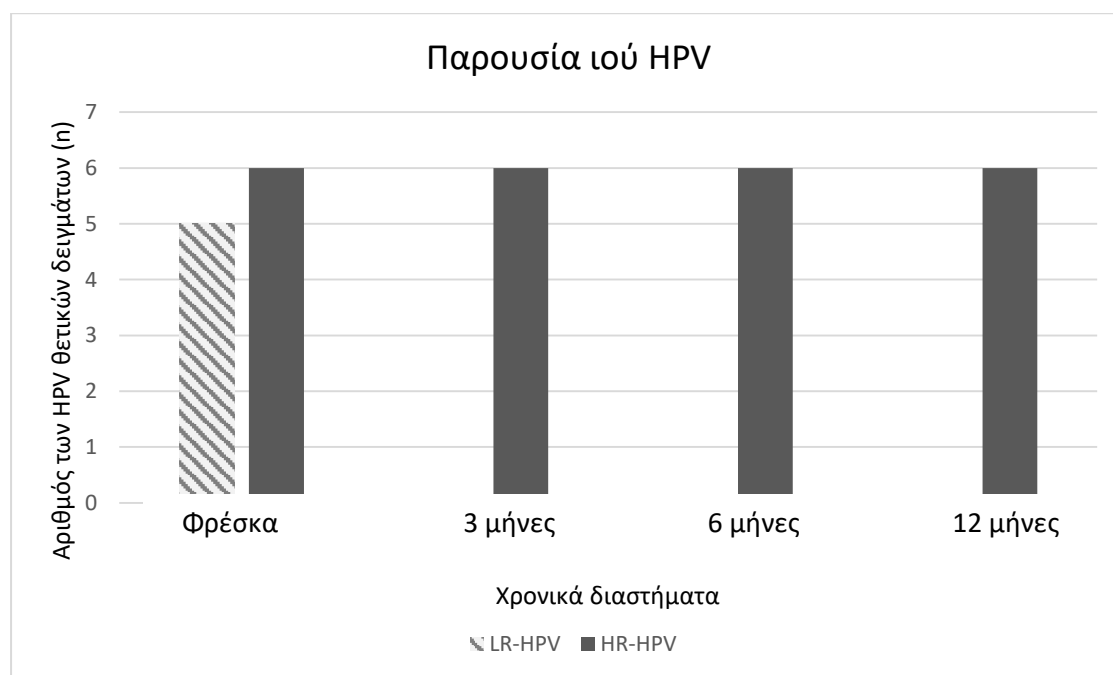
Πίνακας 18. Απεικόνιση των τιμών της κινητικότητας των σπερματοζωαρίων (μέσος όρος $\pm$ τυπικό σφάλμα SE) μεταξύ HPV-, LR-HPV και HR-HPV δειγμάτων στους 3, 6 και 12 μήνες μετά την απόψυξη. Οι τιμές της κινητικότητας των LR-HPV θετικών δειγμάτων συγχωνεύτηκαν με εκείνες των αρνητικών δειγμάτων στα αντίστοιχα χρονικά διαστήματα, επειδή οι χαμηλού κινδύνου υπότυποι δεν ανιχνεύονται στα αποψυγμένα δείγματα και επομένως αξιολογούνται ως αρνητικά.

	HPV-	LR-HPV	HR-HPV	P-value
Αριθμός συμμετεχόντων	67	5	6	
3 μήνες μετά την απόψυξη				
	HPV-	HR-HPV		
Αριθμός ατόμων	72	6		
A+B κινητικότητα (%)	46,7 ± 1,6	50,5 ± 5,3		>0,05
C κινητικότητα (%)	23,9 ± 0,7	18,3 ± 2,3		>0,05
Απουσία κινητικότητας (%)	30,5 ± 2,0	30,5 ± 5,1		>0,05
6 μήνες μετά την απόψυξη				
A+B κινητικότητα (%)	45,4 ± 1,5	48,8 ± 3,6		>0,05
C κινητικότητα (%)	17,0 ± 0,8	13,3 ± 2,3		>0,05
Απουσία κινητικότητας (%)	37,2 ± 1,8	38,5 ± 4,4		>0,05
12 μήνες μετά την απόψυξη				
A+B κινητικότητα (%)	42,9 ± 1,3	43,0 ± 2,2		>0,05
C κινητικότητα (%)	22,7 ± 1,4	26,0 ± 0,9		>0,05
Απουσία κινητικότητας (%)	35,3 ± 2,2	31,0 ± 2,8		>0,05

Σε μία προσπάθεια αξιολόγησης της ανιχνευσιμότητας του ιού HPV μετά τη διαδικασία της κρυοσυντήρησης, το σύνολο των θετικών (11) για τον ιό φρέσκων δειγμάτων αξιολογήθηκε για την παρουσία του ιού στα χρονικά διαστήματα των 3, 6 και 12 μηνών μετά την απόψυξη. Η εκτέλεση πειραμάτων συμβατικής και Real-Time

PCR έδειξε ότι 6/11 δείγματα (54,5%) παρέμειναν θετικά για τον ιό μετά τη διαδικασία της κρυοσυντήρησης. Αξίζει να σημειωθεί ότι μόνο τα ιϊκά σωματίδια των υψηλού κινδύνου υποτύπων παρέμειναν άθικτα σε όλα τα χρονικά διαστήματα. Αντιθέτως, τα ιϊκά σωματίδια των χαμηλού κινδύνου υποτύπων, που ανιχνεύθηκαν στα φρέσκα δείγματα σπέρματος, ήταν μη ανιχνεύσιμα μετά την απόψυξη σε όλα τα χρονικά διαστήματα (Γράφημα 1). Επιπρόσθετα, στο δείγμα που είχε πολλαπλή λοίμωξη από χαμηλού και υψηλού κινδύνου υποτύπους, ο LR-HPV υπότυπος ήταν μη ανιχνεύσιμος, ενώ τα HR-HPV ιϊκά σωματίδια διατηρήθηκαν σε όλα τα χρονικά διαστήματα κατά τη διάρκεια της κρυοσυντήρησης.

Στα πλαίσια αξιολόγησης του πιθανού κινδύνου διασταυρούμενης μόλυνσης κατά τη διάρκεια της κρυοσυντήρησης σε όλα τα χρονικά διαστήματα εξετάστηκε επίσης η παρουσία HPV σε αρκετά HPV- αρνητικά δείγματα. Τα HPV-αρνητικά δείγματα βρίσκονταν τοποθετημένα στους κάδους υγρού αζώτου κοντά σε HPV-θετικά δείγματα κατά τη διάρκεια της κρυοσυντήρησης. Η ανάλυσή τους έδειξε ότι παρέμειναν αρνητικά σε όλα τα χρονικά διαστήματα που εξετάστηκαν, γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η αποθήκευση σε δοχεία υγρού αζώτου δεν εγκυμονεί κινδύνους διασταυρούμενης μόλυνσης στην περίπτωση που κάποια δείγματα σπέρματος είναι θετικά για τον ιό HPV.



Γράφημα 1. Συχνότητα του ιού HPV (χαμηλού και υψηλού κινδύνου στελέχη) στα φρέσκα δείγματα και στα δείγματα 3, 6, και 12 μήνες μετά την απόψυξη. Οι χαμηλού κινδύνου υπότυποι HPV (LR-HPV) είναι μη ανιχνεύσιμοι μετά τη διαδικασία της κατάψυξης σε όλα τα χρονικά διαστήματα. Αντιθέτως, οι υψηλού κινδύνου υπότυποι του ιού (HR-HPV) εμμένουν μετά τη κρυοσυντήρηση σε όλα τα χρονικά διαστήματα που εξετάστηκαν.

Κεφάλαιο 6 Συζήτηση

Τα σεξουαλικά μεταδιδόμενα νοσήματα ενδέχεται να επηρεάσουν τη γονιμότητα των θήλεων και άρρενων ατόμων. Η λοίμωξη από τον ιό HPV αποτελεί τον συχνότερο τρόπο μόλυνσης, μέσω της σεξουαλικής επαφής (Graziottin and Serafini 2009, Oh et al. 2009, Nyitray et al. 2011). Στη πρόσφατη βιβλιογραφία, ενισχύονται ολοένα και περισσότερο τα στοιχεία που δείχνουν υψηλή συχνότητα προσβολής του σπέρματος των σεξουαλικά ενεργών ανδρών από τον ιό HPV (Rintala et al. 2004, Foresta et al. 2010 a, b). Είναι γνωστό ότι οι γυναίκες που έχουν προσβληθεί από τον HPV ιό μπορούν να τον μεταδώσουν στο έμβρυο μέσω διαπλακουντιακών μηχανισμών (Rombaldi et al. 2008). Αντιθέτως, ο ρόλος των μολυσμένων σπερματοζωαρίων, ως φορείς μετάδοσης του ιού, δεν είναι ακόμη γνωστός. Αναφέρεται ωστόσο σε μία μελέτη η ύπαρξη συσχέτισης μεταξύ της ανδρικής λοίμωξης από τον HPV ιό και του αυξημένου κινδύνου απώλειας εμβρύου, όταν έχουν χρησιμοποιηθεί τεχνολογίες υποβοηθούμενης αναπαραγωγής (Perino et al. 2011).

Μελέτες για τον επιπολασμό του HPV ιού σε δείγματα σπέρματος υπογόνιμων ασθενών ανέδειξαν συχνότητα της τάξης του 16% (Laprise et al. 2014). Όσον αφορά στις παραμέτρους του σπέρματος, σε σχετικά πρόσφατες μελέτες, η παρουσία του HPV ιού στο σπέρμα έχει συσχετιστεί με μειωμένη κινητικότητα των σπερματοζωαρίων και με αυξημένο ποσοστό κατακερματισμού του DNA των σπερματοζωαρίων, γεγονός που υποδεικνύει έμμεσα τη συσχέτιση της παρουσίας του ιού με την ανδρική υπογονιμότητα (Connelly et al. 2001, Schillaci et al. 2013, Foresta et al. 2015, Weinberg et al. 2020). Η παρουσία και η πιθανή κρυο-ανθεκτικότητα του HPV ιού κατά την διάρκεια της κρυοσυντήρησης δεν έχει μελετηθεί μέχρι σήμερα. Μελέτη σχετικά με την παρουσία του HPV ιού σε σπερματοζωάρια ογκολογικών ασθενών, τα οποία είχαν αποθηκευτεί σε κρυοφιαλίδια, έδειξε ότι υψηλό ποσοστό σπερματοζωαρίων ήταν μολυσμένα από τον ιό HPV (Foresta, Felin et al. 2011). Ωστόσο, παραμένει άγνωστο εάν ο ιός διατηρεί τη μολυσματικότητά του μετά την κρυοσυντήρηση, καθώς επίσης και εάν είναι σε θέση να μολύνει άλλα δείγματα, τα οποία είναι αποθηκευμένα σε κρυοφιαλίδια στον ίδιο χώρο αποθήκευσης.

Η παρούσα μελέτη στοχεύει στη διερεύνηση του επιπολασμού του ιού HPV σε 78 δείγματα σπέρματος σε άτομα που προσήλθαν για έλεγχο γονιμότητας, προκειμένου

να ανιχνευθούν τυχόν πιθανές επιπτώσεις του ιού HPV στις βασικές παραμέτρους του σπέρματος. Επιπρόσθετα, θα διερευνηθεί η πιθανή κρυο-αντίσταση του ιού HPV κατά τη διάρκεια της κρυοσυντήρησης.

Στη μελέτη αυτή, ελέγχθηκε για πρώτη φορά η παρουσία του ιού HPV σε κρυοσυντηρημένα δείγματα στα χρονικά διαστήματα των 3, 6 και 12 μηνών μετά την αρχική κατάψυξη. Η συχνότητα των HPV θετικών δειγμάτων μεταξύ των ασθενών που προσέρχονται σε μία κλινική γονιμότητας ήταν 14,1%, ποσοστό που είναι σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες στη βιβλιογραφία (Laprise *et al.* 2014). Επομένως, διαφαίνεται ότι η παρουσία του HPV ιού σε δείγματα σπέρματος ενδέχεται να σχετίζεται με προβλήματα γονιμότητας. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι μεταξύ θετικών για τον HPV ιό και αρνητικών δειγμάτων σπέρματος δεν αναδείχθηκαν διαφορές ως προς τις παραμέτρους του σπέρματος. Το εύρημα αυτό είναι σε συμφωνία με ανάλογες μελέτες στην βιβλιογραφία (Rintala *et al.* 2004, Kaspersen *et al.* 2013, Schillaci *et al.* 2013, Luttmmer *et al.* 2016, Cortes-Gutierrez *et al.* 2017).

Ωστόσο, τα μέχρι τώρα δεδομένα που αναφέρονται στην βιβλιογραφία είναι αντικρουόμενα, καθώς υπάρχουν αρκετές μελέτες, οι οποίες διερευνώντας το ρόλο του HPV στις παραμέτρους του σπέρματος καταγράφουν ισχυρή συσχέτιση μεταξύ του επιπολασμού του ιού και της μειωμένης κινητικότητας των σπερματοζωαρίων (Lee *et al.* 2002, Foresta *et al.* 2010, Garolla *et al.* 2012, Yang *et al.* 2013). Μία πρόσφατη μετα-ανάλυση ανέδειξε στατιστικώς σημαντική συσχέτιση μεταξύ της παρουσίας του HPV ιού στο σπέρμα με τη μειωμένη συγκέντρωση και κινητικότητα του σπέρματος. Φαίνεται να επηρεάζεται επίσης η μορφολογία των σπερματοζωαρίων, όχι όμως ο όγκος του σπέρματος (Weinberg *et al.* 2020). Σε συμφωνία με την προηγούμενη μετα-ανάλυση, μία πρόσφατη επίσης μετα-ανάλυση έδειξε ότι η μόλυνση του σπέρματος από τον HPV συνδέεται με μειωμένες τιμές στις παραμέτρους του σπέρματος, καθώς επίσης και με αυξημένο κίνδυνο αποβολών (Moreno-Sepulveda *et al.* 2021). Μία πιθανή εξήγηση, όσον αφορά στο μηχανισμό δράσης του ιού HPV στο σπέρμα, αναφερόταν στα αντισπερματικά αντισώματα στο σπέρμα, και συγκεκριμένα συνέδεε την παρουσία του ιού στο σπέρμα με ανάλογη παρουσία IgA και IgG αντισωμάτων (Garolla *et al.* 2013). Επιπρόσθετα, μία *in vitro* μελέτη έδειξε ότι το DNA των σπερματοζωαρίων, τα οποία διαμολύνθηκαν με εξωγενή τρόπο με E6/E7 HPV DNA, είχε υψηλότερα ποσοστά κατακερματισμού σε σύγκριση με τα μη μολυσμένα από τον ιό δείγματα ελέγχου (Connelly *et al.* 2001). Οι Cao και συνεργάτες κατέδειξαν ότι η

μόλυνση του σπέρματος από τον ιό HPV σχετίζεται σε σημαντικό βαθμό με μείωση της προοδευτικής κινητικότητας (Cao et al. 2020), υποδηλώνοντας ότι ο ιός HPV αποτελεί σημαντικό παράγοντα κινδύνου για την ανδρική γονιμότητα και η ανίχνευσή του μπορεί να αποτελέσει χρήσιμο εργαλείο στα πλαίσια ελέγχου της αναπαραγωγικής ικανότητας των άρρενων ατόμων.

Όλα τα παραπάνω ευρήματα, συμπεριλαμβανομένης της παρούσας μελέτης, επιβεβαιώνουν ότι η επίδραση του ιού HPV στην κινητικότητα των σπερματοζωαρίων είναι αρκετά αμφιλεγόμενη μέχρι σήμερα. Ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίον ο HPV ιός επηρεάζει την κινητικότητα του σπέρματος παραμένει ακόμη και σήμερα ασαφής.

Όσον αφορά τους LR- και HR-HPV υποτύπους, στο σύνολο των 11/78 θετικών δειγμάτων, 5/11 δείγματα (45,5%) βρέθηκαν θετικά αποκλειστικά για HPV υποτύπους χαμηλού κινδύνου, 5/11 δείγματα (45,5%) ήταν θετικά αποκλειστικά για HPV υποτύπους υψηλού κινδύνου (μεμονωμένες ή πολλαπλές λοιμώξεις) και ένα δείγμα (1/11, 9%) είχε πολλαπλή μόλυνση από χαμηλού και υψηλού κινδύνου στελέχη. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έδειξαν ότι τα δείγματα σπέρματος με HR-HPV εμφανίζουν στατιστικώς σημαντικά χαμηλότερους όγκους σπέρματος σε σύγκριση με τα αντίστοιχα δείγματα με LR-HPV ($p=0,03$), γεγονός που ενδεχομένως υποδεικνύει ότι οι HR-HPV υπότυποι μειώνουν με κάποιο μηχανισμό τον όγκο του σπέρματος.

Εάν ληφθεί υπόψη ότι το μεγαλύτερο μέρος του όγκου του σπέρματος προέρχεται από τον προστάτη, θα μπορούσε ενδεχομένως να θεωρηθεί ότι η μόλυνση του σπέρματος από HR-HPV υποτύπους επηρεάζει αρνητικά τη λειτουργία του προστάτη ή μειώνει πιθανόν τις εκκρίσεις του. Λαμβάνοντας υπόψη τη γραμμική συσχέτιση που υπάρχει μεταξύ του συνολικού αριθμού των σπερματοζωαρίων και της γονιμοποίησης, αναμένεται μειωμένη παραγωγή του συνολικού αριθμού των σπερματοζωαρίων. Ωστόσο, στην μελέτη μας, τα HR-HPV θετικά δείγματα σπέρματος έδειξαν υψηλότερες τιμές έναντι των LR-HPV θετικών δειγμάτων ως προς την κινητικότητα των σπερματοζωαρίων. Αν και αυτό το εύρημα μπορεί να είναι τυχαίο και να μην επιβεβαιωθεί ενδεχομένως σε μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων, ωστόσο, δεν μπορεί να αποκλειστεί το γεγονός ότι οι LR- και HR-HPV υπότυποι δρουν στα σπερματοζωάρια μέσω διαφορετικών μηχανισμών και οδών, ασκώντας με τον τρόπο αυτό διαφορετικές επιδράσεις στα σπερματοζωάρια. Η βιβλιογραφία για το συγκεκριμένο θέμα είναι αρκετά περιορισμένη και τα δεδομένα παραμένουν αμφιλεγόμενα.

Πρόσφατες μελέτες έχουν αποδείξει ότι οι HR-HPV υπότυποι έχουν υψηλότερου βαθμού αρνητική επίδραση στην κινητικότητα του σπέρματος σε σύγκριση με τους LR-HPV υποτύπους (Boeri et al. 2019). Επιπρόσθετα, η λοίμωξη από HR-HPV στελέχη φαίνεται ότι σχετίζεται με μειωμένη κινητικότητα των σπερματοζωαρίων και αυξημένο κίνδυνο κατακερματισμού του DNA τους (Cannarella et al. 2022).

Σχετικά με την κρυοσυντήρηση του σπέρματος και την επίδραση του ιού κατά τη διάρκεια αυτής, παρατηρήθηκε σταδιακή, στατιστικώς μη σημαντική, μείωση της κινητικότητας των σπερματοζωαρίων κατά τη διάρκεια της κρυοσυντήρησης τόσο στα αρνητικά όσο και στα θετικά για τον ιό δείγματα. Το εύρημα αυτό υποδηλώνει ότι η κρυοσυντήρηση επηρεάζει την κινητικότητα των σπερματοζωαρίων, ανεξαρτήτως της παρουσίας του ιού HPV. Η μεταβολή της κινητικότητας των σπερματοζωαρίων κατά την κρυοσυντήρηση του σπέρματος προέρχεται από την ίδια τη διαδικασία και όχι από την παρουσία του ιού στο σπέρμα. Η ερμηνεία της συγκεκριμένης παρατήρησης βασίζεται στο γεγονός ότι τα περισσότερα πρωτόκολλα κρυοσυντήρησης σπέρματος περιλαμβάνουν την ανάμιξη ίσου όγκου δείγματος με κρυοπροστατευτικά διαλύματα, εξαλείφοντας έτσι την παρουσία ή τη μολυσματικότητα του ιού. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η πλύση του σπέρματος είναι μία άλλη μέθοδος που μπορεί να χρησιμοποιηθεί πριν από οποιαδήποτε διαδικασία της ART για την εξάλειψη αρκετών ιών ή/και τη μείωση του ιϊκού τους φορτίου (Mocanu et al. 2021). Ωστόσο, η διαδικασία της πλύσης φαίνεται ότι δεν είναι αποδοτική στην περίπτωση λοίμωξης από τον HPV ιό, καθώς σε προηγούμενη μελέτη αναφέρεται ότι στους υπογόνιμους ασθενείς ο ιός δεν εξαλείφεται μέσω πλύσεων του σπέρματος (πλύση με διαβάθμιση συγκέντρωσης ή με swim-up) (Foresta, Pizzol et al. 2011). Μία άλλη προσέγγιση είναι η θεραπεία με Ηπαρίνη-III, η οποία φαίνεται να μην επηρεάζει τα σπερματοζωάρια και θα μπορούσε ενδεχομένως να χρησιμοποιηθεί κατά την προετοιμασία του σπέρματος ασθενών μολυσμένων από τον HPV, προκειμένου να μειωθεί ο κίνδυνος της μόλυνσης κατά τη χρήση τεχνικών υποβοηθούμενης αναπαραγωγής (Garolla et al. 2012).

Στη παρούσα μελέτη, εξετάσαμε τον επιπολασμό των LR- και HR-HPV στα φρέσκα και κρυοσυντηρημένα θετικά δείγματα 3, 6 και 12 μήνες μετά την απόψυξη. Στην περίπτωση των LR-HPV υποτύπων, ο ιός ήταν μη ανιχνεύσιμος κατά τη διάρκεια της κρυοσυντήρησης σε όλα τα χρονικά διαστήματα και σε όλα τα LR-HPV θετικά δείγματα. Αντιθέτως, οι HR-HPV υπότυποι παρέμειναν σε όλη τη διάρκεια της

κρυοσυντήρησης και ανιχνεύθηκαν σε όλα τα HR-HPV θετικά δείγματα. Το εύρημα αυτό καταγράφεται για πρώτη φορά, καθώς δεν υπάρχουν ανάλογες αναφορές στη βιβλιογραφία. Ιδιαίτερα ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι στην περίπτωση του δείγματος που εμφάνιζε πολλαπλή λοίμωξη από LR- και HR-HPV υποτύπους, η χρήση τόσο της RT-PCR όσο και της συμβατικής PCR, ανίχνευσε την παρουσία μόνο των HR-HPV υποτύπων στα χρονικά διαστήματα 3, 6 και 12 μήνες μετά την απόψυξη.

Αν και δεν υπάρχουν μέχρι σήμερα δεδομένα σχετικά με τη μολυσματικότητα του HPV ιού μετά την κατάψυξη, στην παρούσα μελέτη προκύπτει σημαντική παρουσία του ιού σε κρυοσυντηρημένα δείγματα σπέρματος από την τράπεζα σπερματοζωαρίων, τα οποία, ωστόσο αποθηκεύτηκαν σύμφωνα με τις διεθνείς οδηγίες (Practice Committee ASRM, 2008) μετά από αρνητικό έλεγχο για τον ιό HIV και τους ιούς της ηπατίτιδας B (HBV) και C (HCV) προς αποφυγή διασταυρούμενης μόλυνσης.

Επιπρόσθετα, δεν υπάρχουν, ακόμα και σήμερα, μελέτες που να έχουν διερευνήσει τις πιθανές διαφορές στον εντοπισμό των υποτύπων LR- και HR-HPV στα σπερματοζωάρια. Ορισμένες μελέτες εφαρμόζοντας τη μεθοδολογία του φθορίζοντος in situ υβριδισμού (Fluorescence In Situ Hybridization, FISH) ανέδειξαν έναν σαφή εντοπισμό του HPV ιού στην ισημερινή περιοχή της κεφαλής του σπερματοζωαρίου σε μολυσμένα δείγματα (Foresta et al. 2010, Schillaci et al. 2013). Το εύρημα αυτό υποδεικνύει την πιθανή παρέμβαση του ιού στην ικανότητα των σπερματοζωαρίων να δεσμεύονται και να διεισδύουν στο ωάριο (Foresta, Patassini et al. 2011). Ωστόσο, το εύρημα αυτό δεν μπορεί να εξηγήσει τα αποτελέσματα της δικής μας μελέτης, καθώς στην περίπτωση αυτή θα έπρεπε να ήταν μη ανιχνεύσιμοι και οι δύο υπότυποι μετά τη διαδικασία της απόψυξης.

Ο ακριβής μηχανισμός δράσης των υποτύπων LR- και HR-HPV στα σπερματοζωάρια κατά τη διάρκεια της κρυοσυντήρησης δεν έχει αποσαφηνιστεί. Ως εκ τούτου, μπορούμε να υποθέσουμε ότι οι υψηλού και χαμηλού κινδύνου υπότυποι ακολουθούν διαφορετικό τρόπο δράσης στα σπερματοζωάρια. Μία πιθανή ερμηνεία είναι ότι οι HR-HPV υπότυποι μπορούν να διεισδύουν στο κυτταρόπλασμα του σπερματοζωαρίου ή να ενσωματώνονται στο DNA του σπερματοζωαρίου, γεγονός που τους παρέχει προστασία από τη διαδικασία της κρυοσυντήρησης. Δεν είναι γνωστό εάν συμβαίνει κάτι αντίστοιχο με τους LR-HPV υποτύπους, καθώς η χαμηλή ογκογόνος δραστηριότητα τους δεν αποτελεί πεδίο ενδιαφέροντος για τους επιστήμονες. Οι

βλάβες που προκαλούνται από τους LR-HPV υποτύπους αυτοπεριορίζονται και συνήθως εξαλείφονται από το ίδιο το ανοσοποιητικό σύστημα (Egawa and Doorbar 2017). Η ιδέα ότι ο HR-HPV ιός ενδέχεται να ενσωματωθεί στο DNA του σπερματοζωαρίου δεν πρέπει να αποκλειστεί, καθώς σε αρκετούς καρκίνους που σχετίζονται με τον HPV, οι HPVs έχουν ανιχνευθεί ενσωματωμένοι στο DNA του κυττάρου ξενιστή, σε επισωματική μορφή ή και τα δύο (Kristiansen et al. 1994, McBride and Warburton 2017).

Μία άλλη πιθανή εξήγηση είναι η παρουσία διαφορετικών ιϊκών φορτίων. Είναι πιθανόν τα ιϊκά φορτία των LR-HPV υποτύπων στα δείγματα σπέρματος να ήταν σχετικά χαμηλά και σε συνδυασμό με τη διαδικασία της κρυοσυντήρησης, η οποία περιλαμβάνει απότομη κρυστάλλωση του δείγματος, να εξαλείφθηκαν ή να μειώθηκαν σε μη ανιχνεύσιμο επίπεδο. Αντιθέτως, η παρουσία υψηλού ιϊκού φορτίου στους HR-HPV υπότυπους ενδέχεται να μην επηρεάστηκε κατά τη διαδικασία της κρυοσυντήρησης, επιτρέποντας την ανιχνευσιμότητα των ιών σε όλη τη διάρκεια της κρυοσυντήρησης. Και οι δύο προαναφερθείσες υποθέσεις θα μπορούσαν να ερμηνεύσουν τον επιπολασμό των HR-HPV υποτύπων στα δείγματα σπέρματος μετά τη διαδικασία της απόψυξης.

Η παρουσία του ιού στο σπέρμα ενέχει θεωρητικώς «κίνδυνο» διασταυρούμενης μόλυνσης κατά την κρυοσυντήρηση, αν και δεν έχει καταγραφεί προηγουμένως με άλλους ιούς (Anifandis et al. 2021). Ωστόσο, δεν υπάρχουν δεδομένα και χρήζει περαιτέρω διερεύνησης. Στην παρούσα μελέτη διερευνήσαμε την πιθανή διασταυρούμενη επιμόλυνση των αρνητικών για τον HPV ιό δειγμάτων, που συνυπήρχαν αποθηκευμένα στον ίδιο χώρο με θετικά δείγματα. Τα αποτελέσματά μας δεν ανέδειξαν παρουσία του HPV στα αρνητικά δείγματα, υποδηλώνοντας ότι δεν υπάρχει «κίνδυνος» διασταυρούμενης μόλυνσης εφόσον τηρηθούν τα απαραίτητα πρωτόκολλα για τον χειρισμό των δειγμάτων σπέρματος.

Συνοψίζοντας, η παρούσα εργασία είναι η πρώτη που μελετά τους υποτύπους του ιού HPV και την κρυοσυντήρηση του σπέρματος. Ο επιπολασμός των θετικών δειγμάτων για τον ιό ήταν 14,1%, που είναι σε συμφωνία με τα διεθνή επιδημιολογικά δεδομένα. Οι παράμετροι του σπέρματος ήταν συγκρίσιμοι μεταξύ των αρνητικών και των θετικών για τον ιό. Τα LR-HPV δείγματα εμφάνιζαν μεγαλύτερο όγκο σπέρματος σε σύγκριση με τα HR-HPV δείγματα. Ο ρόλος του HPV στην τροποποίηση των

παραμέτρων του σπέρματος καθιστά επιτακτική την ανάγκη τυποποίησης των τεχνικών, που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση του ιού, ώστε να παρουσιάζουν μεγάλη ευαισθησία και ειδικότητα. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι το DNA των HR-HPV υποτύπων ήταν ανιχνεύσιμο σε όλα τα χρονικά διαστήματα που εξετάστηκαν κατά τη διαδικασία της κρυοσυντήρησης. Ο προσυμπτωματικός έλεγχος για την ανίχνευση HR-HPV υποτύπων φαίνεται να είναι απαραίτητη προϋπόθεση για το σπέρμα δότη. Δεν είναι ξεκάθαρο εάν το σπέρμα που είναι μολυσμένο από HPV είναι σε θέση να μολύνει άλλα γειτονικά αποθηκευμένα κρυοφιαλίδια. Στην παρούσα μελέτη δεν καταδεικνύεται κάτι τέτοιο, απαιτούνται, ωστόσο, περαιτέρω μελέτες για να ρίξουν φως στην επίδραση της κρυοσυντήρησης σε δείγματα σπέρματος θετικά για τους LR- και HR-HPV υποτύπους.

Λαμβάνοντας υπόψη την τρέχουσα βιβλιογραφία, καθώς και τα ευρήματα της δικής μας μελέτης, προτείνεται να γίνεται έλεγχος όλων των δειγμάτων σπέρματος για την πιθανή παρουσία του ιού HPV πριν από την κατάψυξη σε τράπεζα σπέρματος ή τη χρήση τεχνικών υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Επιπρόσθετα, καθώς φαίνεται ότι η λοίμωξη από τον ιό HPV, ιδιαίτερα από τους HR-HPV υποτύπους, επηρεάζει τις παραμέτρους του σπέρματος, κρίνεται σκόπιμος ο έλεγχος των σπερματοζωαρίων για την πιθανή παρουσία του ιού, καθώς ο ιός HPV ενδέχεται να αποτελεί μία νέα αιτία ανδρικής υπογονιμότητας.

Κεφάλαιο 7 Σύνοψη διατριβής- Συμπεράσματα

- ❖ Η μόλυνση από τον ιό HPV αποτελεί τον πιο κοινό τρόπο μόλυνσης, μέσω της σεξουαλικής επαφής, με όλο και περισσότερα δεδομένα στη βιβλιογραφία για την ύπαρξη υψηλής συχνότητας μόλυνσης του σπέρματος των σεξουαλικά ενεργών ανδρών από τον ιό HPV.
- ❖ Η συχνότητα των HPV θετικών δειγμάτων για τον ιό στην παρούσα μελέτη ήταν 14,1%, γεγονός που είναι σύμφωνο με προηγούμενες μελέτες στη βιβλιογραφία.
- ❖ Τα θετικά δείγματα σπέρματος για τον ιό είχαν συγκρίσιμα αποτελέσματα (σχετικά με τις παραμέτρους του σπέρματος) με τα δείγματα σπέρματος που ήταν αρνητικά για τον ιό. Με άλλα λόγια, δεν βρέθηκε αλλαγή στις παραμέτρους του σπέρματος που να οφείλεται στην παρουσία του ιού.
- ❖ Τα δείγματα σπέρματος με HR-HPV ιό εμφανίζουν στατιστικώς σημαντικά χαμηλότερους όγκους σπέρματος σε σύγκριση με τα αντίστοιχα δείγματα με LR-HPV, γεγονός που μπορεί να σημαίνει ότι οι υπότυποι HR-HPV μειώνουν με κάποιο μηχανισμό τον όγκο του σπέρματος.
- ❖ Η ανίχνευση του DNA των HR-HPV παρέμεινε μέσω της διαδικασίας της κρυοσυντήρησης σε όλα τα χρονικά διαστήματα που μελετήθηκαν.
- ❖ Προτείνεται ο έλεγχος για τον HPV ιό όλων των δειγμάτων σπέρματος πριν από την κατάψυξη σε τράπεζα σπέρματος ή πριν από την χρήση τεχνικών υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Λαμβάνοντας υπόψη ότι η λοίμωξη από τον HPV ιό έχει προταθεί ότι επηρεάζει τις παραμέτρους του σπέρματος, προτείνεται οι άνδρες να ελέγχονται για την παρουσία του ιού στο σπέρμα καθώς ο HPV μπορεί να αντιπροσωπεύει μια νέα αιτία ανδρικής υπογονιμότητας.

Βιβλιογραφία

Abusheikha N, Akagbosu F, Marcus S, Lass A, Cousins C, Brinsden P. Viral screening and assisted conception treatment – the Bourn Hall experience. *J Assist Reprod Genet.* 1999; 16: 337- 339.

Adam JL, Briggs MW, McCance DJ. A mutagenic analysis of the E5 protein of human papillomavirus type 16 reveals that E5 binding to the vacuolar H⁺-ATPase is not sufficient for biological activity, using mammalian and yeast expression systems. *Virology.* 2000; 272: 315- 325.

Agha-Rahimi A, Khalili MA, Nabi A, Ashourzadeh S. Vitrification is not superior to rapid freezing of normozoospermic spermatozoa: effects on sperm parameters, DNA fragmentation and hyaluronan binding. *Reprod Biomed Online.* 2014; 28:352– 358.

Aizpurua J, Medrano L, Enciso M, Sarasa J, Romero A, Ferná'ndez MA, Go'mez-Torres MJ. New permeable cryoprotectant-free vitrification method for native human sperm. *Hum Reprod.* 2017; 32: 2007– 2015.

Ajala T, Rafi J, Larsen-Disney P. and Howell R. Fertility preservation for cancer patients: a review. *ObstetGynecol Int.* 2010; 2010: 160386.

Albert E, Laimins L. Regulation of the Human Papillomavirus Life Cycle by DNA Damage Repair Pathways and Epigenetic Factors. *Viruses.* 2020; 12: 744; doi:10.3390/v12070744.

Alp Avci G. Genomic organization and proteins of human papillomavirus. *Mikrobiyol Bul.* 2012; 46: 507- 515.

Amann RP. Weakness in reports of fertility for horses and other species. *Therigenol.* 2005; 63: 698- 715.

Arbyn M, Weiderpass E, Bruni L, de Sanjose S, Saraiya M, Ferlay J, Bray F. Estimates of incidence and mortality of cervical cancer in 2018: A worldwide analysis. *Lancet Glob. Health.* 2020; 8: e191- e203.

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; 113: 276- 283.

- Bayasgalan G, Naranbat D, Radnaabazar J, Lhagvasuren T, Rowe PJ. Male infertility: risk factors in Mongolian men. *Asian J Androl*. 2004; 6: 305- 311.
- Berezutskaya E, Yu B, Morozov A, et al. Differential regulation of the pocket domains of the retinoblastoma family proteins by the HPV16 E7 oncoprotein. *Cell Growth Diff*. 1997; 8: 1277- 1286.
- Bergvall M, Melendy T, Archambault J. The E1 proteins. *Virology*. 2013; 445: 35- 56.
- Bernard HU. Gene expression of genital human papillomaviruses and considerations on potential antiviral approaches. *Antivir Ther*. 2002; 7: 219- 237.
- Berkovitz A, Miller N, Silberman M, Belenky M, Itsykson P. A novel solution for freezing small numbers of spermatozoa using a sperm vitrification device. *Hum Reprod*. 2018; 33(11): 1975- 1983.
- Bienkowska-Haba M, Patel HD, Sapp M. Target cell cyclophilins facilitate human papillomavirus type 16 infection. *PLoS pathogens*. 2009; 5:e1000524.
- Bird G, O'Donnell M, Moroianu J, Garcea RL. A possible role for cellular karyopherins in regulating polyomavirus and papillomavirus capsid assembly. *J Virol* 2008; 82: 9848- 9857.
- Blanco R, Carrillo- Beltrán D, Munoz PJ, Carvalán HA, Calaf MG, Aguayo F. Human Papillomavirus in Breast Carcinogenesis: A Passenger, a Cofactor, or a Causal Agent? *Biology*. 2021; 10(8): 804.
- Bonne-Andrea C, Tillier F, McShan GD, Wilson VG, Clertant P. Bovine papillomavirus type 1 DNA replication: the transcriptional activator E2 acts in vitro as a specificity factor. *J Virol*. 1997; 71(9): 6805- 6815.
- Bosch FX, Broker TR, Forman D, Moscicki AB, Gillison ML, Doorbar J, et al. Comprehensive control of human papillomavirus infections and related diseases. *Vaccine*. 2013; 31(Suppl 7): H1- H31.
- 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; 13: 5451- 5459.
- Bouvard V, Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan B, El Ghissassi F, et al. A review of human carcinogens-Part B: biological agents. *Lancet Oncol*. 2009; 10: 321- 322.

- Boyer SN, Wazer DE, Band V. E7 protein of human papilloma virus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway. *Cancer Res.* 1996; 56: 4620- 4624.
- Bravo IG, de Sanjosé S, Gottschling M. The clinical importance of understanding the evolution of papillomaviruses. *Trends in microbiology.* 2010; 18(10): 432– 438.
- Buck CB, Pastrana DV, Lowy DR, Schiller JT. Efficient intracellular assembly of papillomaviral vectors. *Journal of virology.* 2004; 78: 751- 757.
- 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; 14: 120–124.
- Castellsague X, Alemany L, Quer M, Halc G, Quiros B, Tous S, Clavero O, Alos L, Biegner T, Szafarowski T, et al. HPV involvement in Head and Neck Cancers: Comprehensive Assessment of Biomarkers in 3680 Patients. *J. Natl Cancer Inst.* 2016; 108: djv403.
- Chan PJ, Su BC, Kalugdan T, Seraj IM, Tredway DR, King A. Human papillomavirus gene sequences in washed human spermdeoxyribonucleic acid. *Fertil. Steril.* 1994; 61: 982– 985.
- Chaturvedi AK, Engels EA, Pfeiffer RM, Hernandez BY, Xiao W, Kim E, Jiang B, Goodman MT, Sibug- Saber M, Cozen W, et al. Human papillomavirus and rising oropharyngeal cancer incidence in the United States. *J Clin Oncol.* 2011; 29: 4294- 4301.
- Chellapan S, Kraus VB, Kroger B, Munger K, Howley PM, Phelps WC, Nevins JR. Adenovirus E1A, simian virus 40 tumor antigen, and human papillomavirus E7 protein share the capacity to disrupt the interaction between transcription factor E2F and the retinoblastoma gene product. *Proc. natl Acad Sci. USA.* 1992; 89: 4549- 4553.
- Chohan K, Griffin J, Carrell D. Evaluation of chromatin integrity in human sperm using acridine orange staining with different fixatives and after cryopreservation. *Andrologia.* 2004; 36(5): 321- 326.
- Chris W, Ford L. Reactive oxygen species and sperm. *Hum Fertil.* 2001; 4(2): 77- 78.
- Cobo A, Romero JL, Perez S, de los Santos MJ, Meseguer M, Remohi J. Storage of human oocytes in the vapor phase of nitrogen. *Fertil Steril.* 2010; 94: 1903- 1907.

Connelly DA, Chan PJ, Patton WC & King A. Human sperm deoxyribonucleic acid fragmentation by specific types of papillomavirus. *Am J Obstet Gynecol*. 2001; 184: 1068– 1070.

Conway MJ, Meyers C. Replication and Assembly of Human Papillomaviruses. *J Dent Res*. 2009; 88(4): 307- 317.

Corte-Martin A, et al. Human papillomavirus E1 helicase with the WD repeat protein p80 to promote maintenance of the viral genome in keratinocytes. *J Virol*. 2008; 82: 1271- 1283.

Cross NL, Hanks SE. Effects of cryopreservation on human sperm acrosomes. *Human Reprod*. 1991; 6(9): 1279- 1283.

Crusius K, Auvinen E, Alonso A. Enhancement of EGF- and PMA- mediated MAP kinase activation in cells expressing the human papillomavirus type 16 E5 protein. *Oncogene*. 1997; 15: 1437- 1444.

Darsini N, Hamidah B, Suyono S, et al. Human Sperm Motility, Viability, and Morphology Decreased after Cryopreservation. *Folia Medica Indonesia*. 2019; 55(3): 198.

Day PM, Roden RB, Lowy DR, Schiller JT. The papillomavirus minor capsid protein, L2, induces localization of the major capsid protein, L1, and the viral transcription/replication protein, E2, to PML oncogenic domains. *Journal of virology*. 1998; 72: 142- 150.

Day PM, Schiller JT. The role of furin in papillomavirus infection. *Future microbiology*. 2009; 4: 1255- 1262.

de Paula T, Bertolla R, Spaine D, Cunha M, Schor N, Cedenho A. Effect of cryopreservation on sperm apoptotic deoxyribonucleic acid fragmentation in patients with oligozoospermia. *Fertil Steril*. 2006; 86(3): 597- 600.

Depuydt CE, Verstraete L, Berth M, Beert J, Bogers JP, Salembier G, et al. Human Papillomavirus Positivity in Women Undergoing Intrauterine Insemination Has a Negative Effect on Pregnancy Rates. *Gynecol Obstet Invest* 2016; 81: 41-46.

de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology*. 2004; 324: 17- 27.

de Villiers EM. Cross-roads in the classification of papillomaviruses. *Virology*. 2013; 445 (1-2): 2-10.

DiMaio D, Mattoon D. Mechanisms of cell transformation by papillomavirus E5 proteins. *Oncogene*. 2001; 20: 7866- 7873.

Di Santo M, Tarozzi N, Nadalini M, and Borini A. Human Sperm Cryopreservation: Update on Techniques, Effect on DNA Integrity, and Implications for ART. *Adv Urol*. 2012; 2012: 1- 12.

Doorbar J, Ely S, Sterling J, McLean C, Crawford L. Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature*. 1991; 352: 824- 827.

Doorbar J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci (Lond)*. 2006; 110(5): 525– 541.

Egawa N, et al. The E1 protein of human papillomavirus type 16 is dispensable for maintenance replication of the viral genome. *J. Virol*. 2012; 86: 3276- 3283.

Ekström J, Bzhalava D, Svenback D, Forslund O, Dillner J. High throughput sequencing reveals diversity of Human Papillomaviruses in cutaneous lesions. *Int J Cancer*. 2011; 129(11): 2643– 2650.

Ekstrom J, Forslund O, Dillner J. Three novel papillomaviruses (HPV109, HPV112 and HPV114) and their presence in cutaneous and mucosal samples. *Virology*. 2010; 397(2): 331– 336.

Englert Y, Lesage B, Van Vooren JP, Liesnard C, Place I, Vannin AS, et al. Medically assisted reproduction in the presence of chronic viral diseases. *Hum Reprod Update*. 2004; 10: 149- 162.

Englert Y, Van Vooren JP, Place I, Liesnard C, Laruelle C, Delbaere A. ART in HIV-infected couples. Has the time come for a change in attitude? *Hum Reprod*. 2001; 16: 1309- 1315.

Erdem-Öztürk A, Numan-Bucak M, Bodu M, Baspinar N, Celik İ, Shu Z, Keskin N, and Dayong G. Cryobiology and Cryopreservation of Sperm, Cryopreservation-Current Advances and Evaluations, Marian Quain, IntechOpen. 2019. Available from: <https://www.intechopen.com/books/cryopreservation-current-advances-and-evaluations/cryobiology-and-cryopreservation-of-sperm>.

Fehrmann F, Klumpp DJ, Laimins LA. Human papillomavirus type31 E5 protein supports cell cycle progression and activates late viral functions upon epithelial differentiation. *J. Virol.* 2003; 77: 2819- 2831.

Flores ER, Lambert PF. Evidence for a switch in the mode of human papillomavirus type 16 DNA replication during the viral life cycle. *J. Virol.* 1997; 71: 7167- 7179.

Florin L, Becker KA, Lambert C, Nowak T, Sapp C, Strand D, Steeck RE, Sapp M. Identification of a dynein interaction domain in the papillomavirus minor capsid protein L2. *Journal of virology.* 2006; 80: 6691- 6696.

Foresta C, Garolla A, Zuccarello D, Pizzol D, Moretti A, Barzon L, et al. Human papillomavirus found in sperm head of young adult males affects the progressive motility. *Fertil. Steril.* 2008; 93: 802- 806.

Foresta C, Patassini C, Bertoldo A, Menegazzo M, Francavilla F, Barzon L, et al. Mechanism of human papillomavirus binding to human spermatozoa and fertilizing ability of infected spermatozoa. *PLoS One* 2011; 6: e15036.

Foresta C, Pizzol D, Moretti A, Barzon L, Palu 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; 94: 1723- 1727.

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; 3: 163- 173.

Forhan SE, Gottlieb SL, Sternberg MR, Xu F, Datta SD, McQuillan GM, Berman SM, Markowitz LE. Prevalence of sexually transmitted infections among female adolescents aged 14 to 19 in the United States. *Pediatrics.* 2009; 24: 1505– 1512.

Forslund O. Genetic diversity of cutaneous human papillomaviruses. *J Gen Virol.* 2007; 88(10): 2662– 2669.

Gangrade BK. Cryopreservation of testicular and epididymal sperm: techniques and clinical outcomes of assisted conception. *Clinics (Sao Paulo).* 2013; 68 Suppl1 (Suppl1):131- 140.

Garnett TO, Filippova M, Duerksen-Hughes PJ. Accelerated degradation of FADD and procaspase 8 in cells expressing human papilloma virus 16 E6 impairs TRAIL-mediated apoptosis. *Cell Death Diff.* 2006; 13: 1915- 1926.

Garolla A, Lenzi A, Palu 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; 27: 967–973.

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; 99: 125- 131.

Garolla A, Engl B, Pizzol D, Ghezzi M, Bertoldo A, Bottacin A, et al. Spontaneous fertility and in vitro fertilization outcome: new evidence of human papillomavirus sperm infection. *Fertil Steril* 2016; 105: 65-72.

Gilling-Smith C and Almeida P. HIV, Hepatitis B and Hepatitis C and Infertility: Reducing Risk Educational Bulletin, sponsored by the Practice and Policy Committee of the BFS. *Hum Fertil.* 2003; 6: 106- 112.

Gimenes F, Medina FS, Abreu AL, Irie MM, Esquiçati IB, Malagutti N, et al. Sensitive simultaneous detection of seven sexually transmitted agents in semen by multiplex-PCR and of HPV by single PCR. *PLoS One* 2014; 9: e98862.

Giroglou T, Florin L, Schafer F, Steeck RE, Sapp M. Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate. *J Virol.* 2001; 75: 1565- 1570.

Giuliano AR, Nielson CM, Flores R, Dunne EF, Abrahamsen M, Papenfuss MR, Markowitz LE, Smith D & Harris RB. The optimal anatomic sites for sampling heterosexual men for human papillomavirus (HPV) detection: the HPV detection in men study. *J Infect Dis.* 2007; 15: 1146– 1452.

Glaunsinger BA, Lee SS, Thomas M, Banks L, Javier R. Interactions of the PDZ-protein MAGI-1 with adenovirus E4-ORF1 and high-risk papillomavirus E6 oncoproteins. *Oncogene.* 2000; 19: 5270- 5280.

Golob B, Poljak M, Verdenik I, Kolbezen Simoniti M, Vrtacnik Bokal E & Zorn B. High HPV infection prevalence in men from infertile couples and lack of relationship between seminal HPV infection and sperm quality. *Biomed Res Int.* 2014; doi:10.1155/2014/956901.

Gottschling M, Göker M, Köhler A, Lehmann MD, Stockfleth E, Nindl I. Cutaneotropic human beta-/gamma-papillomaviruses are rarely shared between family members. *J Invest Dermatol.* 2009; 129(10): 2427– 2434.

Gross-Mesilaty S, Reinstein E, Bercovich B, Tobias KE, Schwartz AL, Kahana C, Ciechanover A. Basal and human papillomavirus E6 oncoprotein- induced degradation of Myc proteins by the ubiquitin pathway. *Proc. natl Acad. Sci. USA*. 1998; 95: 8058-8063.

Hadaschik D, Hinterkeuser K, Oldak M, Pfister HJ, Smola-Hess S. The papillomavirus E2 protein binds to and synergizes with C/EBP factors involved in keratinocyte differentiation. *J. Virol*. 2003; 77: 5253– 5265.

Hart R, Khalaf Y, Lawson R, Bickerstaff H, Taylor A, Braude P. Screening for HIV, hepatitis B and C infection in a population seeking assisted reproduction in an inner London hospital. *Br J Obstet Gynecol*. 2001; 108: 654- 656.

Hemmat N, Baghi BH. Human papillomavirus E5 protein, the undercover culprit of tumorigenesis. *Infectious Agents and Cancer*. 2018; 13: 31.

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; 198: 787– 794.

Hezavehei M, Sharafi M, Kouchesfahani HM, et al. Sperm cryopreservation: A review on current molecular cryobiology and advanced approaches. *Reprod Biomed Online*. 2018; 37 (3): 327- 339.

Hoefer L, Tsikis S, Bethimoutis G, Nicolaidou E, Pappas V, Antoniou C, Kanelleas A, Chardalias L, Stavropoulos GE, Schneider J, Charnot-Katsikas A. HPV vaccine acceptability in high-risk Greek men. *Hum Vaccin Immunother*. 2018; 14: 134-139.

Hong LJ, Oshiro BT, Chan PJ. HPV-16 exposed mouse embryos: a potential model for pregnancy wastage. *Arch Gynecol Obstet* 2013; 287: 1093- 1097.

Hosseini A, Khalili M, Talebi A, Agha-Rahimi A, Ghasemi-Esmailabad S, Woodward B, et al. Cryopreservation of Low Number of Human Spermatozoa: Which is Better: Vapor Phase or Direct Submerging in Liquid Nitrogen? *Hum Fertil*. 2018; 22(2): 126-132.

Hsueh PR. Human papillomavirus, genital warts, and vaccines. *J Microbiol Immunol Infect*. 2009; 42(2): 101–106.

Huibregtse JM, Scheffner M, Howley PM. Localization of the E6-AP regions that direct human papillomavirus E6 binding, association with p53, and ubiquitination of associated proteins. *Mol. Cell. Biol.* 1993; 13: 4918- 4927.

Iftner T, Elbel M, Schopp B, Hiller T, Loizou JI, Caldecott KW, Stubernrauch F. Interference of papillomavirus E6 protein with single-strand break repair by interaction with XRCC1. *EMBO J.* 2002; 21: 4741- 4748.

Indian Fertility Society. Semen Freezing Past, Present & Future. 2017, Available from https://indianfertilitysociety.org/pdf/nexus_4_Final_29.01.17_8.15pm.pdf (Accessed June 3, 2020).

Isachenko E, Isachenko V, Katkov II, et al. DNA integrity and motility of human spermatozoa after standard slow freezing versus cryoprotectant-free vitrification. *Hum Reprod.* 2004; 19(4): 932- 939.

Isachenko V, Isachenko E, Montag M, Zaeva V, Krivokharchenko I, Nawroth F, Dessole S, Katkov II, van der Ven H. Clean technique for cryoprotectant-free vitrification of human spermatozoa. *Reprod Biomed Online.* 2005; 10: 350– 354.

Isachenko E, Rahimi G, Mallmann P et al. Novel Approaches to the Cryopreservation of Human Spermatozoa: History and Development of the Spermatozoa Vitrification Technology. *JRSCB.* 2011; 2 (2):128- 145.

Johnson KM, Kines RC, Roberts JN, Lowy DR, Schiller JT, Day PM. Role of herpetic sulfate in attachment to and infection of the murine female genital tract by human papillomavirus. *J Virol.* 2009; 83: 2067- 2074.

Jones DL, Thompson DA, Munger K. Destabilization of the RB tumor suppressor protein and stabilization of p53 contribute to HPV type 16 E7-induced apoptosis. *Virology.* 1997; 239: 97- 107.

Kabsch K, Alonso A. The human papillomavirus type 16 E5 protein impairs TRAIL0 and FasL- mediated apoptosis in HaCaT cells by different mechanisms. *J. Virol.* 2002; 76: 12162- 12172.

Kajitani N, Satsuka A, Kawate A, Sakai H. Productive lifecycle of human papillomaviruses that depends upon squamous epithelial differentiation. *Frontiers in Microbiology. Virology.* 2012; 3: 152.

Kaspersen MD, Larsen PB, Ingerslev HJ, Fedder J, Petersen GB, Bonde J, et al. Identification of multiple HPV types on spermatozoa from human sperm donors. *PLoS One* 2011; 6: e8095.

Kaspersen MD, Bungum M, Fedder J, Bonde J, Larsen PB, J Ingerslev H, Hollsberg P. No increased sperm DNA fragmentation index in semen containing human papillomavirus or herpesvirus. *Andrology*. 2013; 1: 361– 364.

Kim MK, Kim HS, Kim SH, Oh JM, Han JY, Lim JM, et al. Human papillomavirus type 16 E5 oncoprotein as a new target for cervical treatment. *Biochem Pharmacol*. 2010; 80(12): 1930- 1935.

Kines RC, Thompson CD, Lowy DR, Schiller JT, Day PM. The initial steps leading to papillomavirus infection occur on the basement membrane prior to cell surface binding. *Proc Natl. Acad. Sci. USA*. 2009; 106: 20458- 20463.

Knight GL, Grainger JR, Gallimore PH, Roberts S. Cooperation between different forms of the human papillomavirus type 1 E4 protein to block cell cycle progression and cellular DNA synthesis. *J. Virol*. 2004; 78: 13920- 13933.

Konc J, Kanyó K, Kriston R, et al. Cryopreservation of embryos and oocytes in human assisted reproduction. *Biomed Res Int*. 2014; 2014: 307268 (1-9).

Koppers AJ, De Iullis GN, Finnie JM, McLaughlin EA, Aitken RJ. Significance of mitochondrial reactive species in the generation of oxidative stress in spermatozoa. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008; 93(8): 3199- 3207.

Kukimoto I, Aihara S, Yoshiike K, Kanda T. Human papillomavirus oncoprotein E6 binds to the C-terminal region of human minichromosome maintenance 7 protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 1998; 249: 258- 262.

Lacey CJ, Lowndes CM, Shah KV. Chapter 4: Burden and management of noncancerous HPV-related conditions: HPV-6/11 disease. *Vaccine*. 2006; 24(Suppl3): S3/35-41.

Lai YM, Yang FP, Pao CC. Human papillomavirus deoxyribonucleic acid and ribonucleic acid in seminal plasma and sperm cells. *Fertil. Steril*. 1996; 65: 1026–1030.

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; 67: 1152– 1155.

- 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; 29: 640- 651.
- Lee D, Sohn H, Kalpana GV, Choe J. Interaction of E1 and hSNF5 proteins stimulates replication of human papillomavirus DNA. *Nature*. 1999; 399: 487- 491.
- Lee SS, Glaunsinger B, Mantovani F, Banks L, Javier RT. Multi-PDZ domain protein MUPP1 is a cellular target for both adenovirus E4-ORF1 and high-risk papillomavirus type 18 E6 oncoproteins. *J. Virol.* 2000; 74: 9680- 9693.
- 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; 85: 511- 516.
- Le MT, Nguyen TTT, Nguyen TT, et al. Cryopreservation of human spermatozoa by vitrification versus conventional rapid freezing: Effects on motility, viability, morphology and cellular defects. *Eur J ObstetgynecolReprod Biol.* 2019; 234: 14- 20.
- Leptak C, Ramon y Cajal S, Horwitz BH, Riese DJ II, Dotto GP, DiMaio D. Tumorigenic transformation of murin keratinocytes by the E5 genes of bovine papillomavirus type 1 and human papillomavirus type 16. *J. Virol.* 1991; 65: 7078- 7083.
- Lim JJ, Shin TE, Song SH, Bak CW, Yoon TK, Lee DR. Effect of liquid nitrogen storage vapor storage on the motility, viability, morphology, deoxyribonucleic acid integrity, and mitochondrial potential of frozen- thawed human spermatozoa. *Fertil Steril.* 2010; 94: 2736- 2741.
- Liu J, Tanrikut C, Wright DL, Lee GY, Toner M, Biggers JD, Toth TL. Cryopreservation of human spermatozoa with minimal non-permeable cryoprotectant. *Cryobiology.* 2016; 73:162– 167.
- Longworth MS, et al. Pathogenesis of Human Papillomavirus in Differentiating Epithelia. *Microbiol Mol. Biol. Rev.* 2004; 68(2): 362- 372.
- Lukaszewicz E, Kruszynski W. Evaluation of fresh and frozen-thawed semen of individual ganders by assessment of spermatozoa motility and morphology. *Theriogenology.* 2003; 59(7): 1627- 1640.

Lusignan M, Li X, Herrero B, et al. Effects of different cryopreservation methods on DNA integrity and sperm chromatin quality in men. *J Androl*. 2018; 6(6): 829- 835.

Luttmer R, Dijkstra MG, Snijders PJ, Hompes PG, Pronk DT, Hubeek I, et al. Presence of human papillomavirus in semen in relation to semen quality. *Hum Reprod* 2016; 31: 280-6.

Major T, Szarka K, Sziklai I, Gergely L, Czeglédy J. The characteristics of human papillomavirus DNA in head and neck cancers and papillomas. *J Clin Pathol*. 2005; 58(1): 51– 55.

Markowitz LE, Meites E, Unger ER. Two vs three doses of human papillomavirus vaccine: New policy for the second decade of the vaccination program. *JAMA*. 2016; 316: 2370-2372.

McBride AA. Mechanisms and strategies of papillomavirus replication. *Biol Chem*. 2017; 398(8): 919- 927.

McBride AA. The Papillomavirus E2 proteins. *Virology*. 2013; 445(1-2): 57- 79.

McBride AA, Oliveila JC, McPhillips MG. Partitioning viral genomes in mitosis: same idea, different targets. *Cell Cycle*. 2006; 5: 1499- 1502.

McKinney CC, Kim MJ, Chen D, McBride AA. Brd4 Activates Early Viral Transcription upon Human Papillomavirus 18 Infection of Primary Keratinocytes. *mBio*. 2016; 7(6): e01644-16.

McLaughlin-Drubin EM, Münger K. The Human Papillomavirus E7 Oncoprotein. 2009; 384(2): 335- 344.

McPhillips MG, Oliveira JG, Spindler JE, Mitra R, McBride AA. Brd4 is required for E2-mediated transcriptional activation but not genome partitioning of all papillomavirus. *J. Virol*. 2006; 80: 9530– 9543.

Mehta K, Laimins L. Human Papillomaviruses Preferentially Recruit DNA Repair Factors to Viral Genomes for Rapid Repair and Amplification. *mBio*. 2018; 9.

Meites E, Kempe A, Markowitz LE. Use of a 2-dose schedule for human papillomavirus vaccination-updated recommendations of the advisory committee on immunization practices. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2016; 65: 1405- 1408.

Ministry of Health, French Republic. Prise en charge des personnes infectées par le VIH. Recommendations du groupe d' experts. Rapport 2002. Médecins-sciences, Flammarion, Paris. 2002; 223- 238.

Mittal S, Banks L. Molecular mechanisms underlying human papillomavirus E6 and E7 oncoprotein- induced cell transformation. *Mutat Res Rev Mutat Res*. 2017; 772: 23-35.

Moody CA, Laimins LA. Human papillomaviruses activate the ATM DNA damage pathway for viral genome amplification upon differentiation. *PLoS Pathol*. 2009; 5, e1000605.

Nakahara T, Nishimura A, Tanaka M, Ueno T, Ishimoto A, Sakai H. Modulation of the Cell Division Cycle by Human Papillomavirus Type 18 E4. *J Virol*. 2002; 76 (21): 10914- 10920.

Narisawa-Saito M, Kiyono T. Basic mechanisms of high-risk papillomavirus induced carcinogenesis: Roles of E6 and E7 proteins. *Cancer Sci*. 2007; 98(10): 1505- 1511.

Nielson CM, Flores R, Harris RB, Abrahamsen M, Papenfuss MR, Dunne EF, et al. Human papillomavirus prevalence and type distribution in male genital sites and semen. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2007; 16: 1107- 1114.

Nielson CM, Harris RB, Flores R, Abrahamsen M, Papenfuss MR, Dunne EF, Markowitz LE, Giuliano AR. (2009) Multiple-type human papillomavirus infection in male anogenital sites: prevalence and associated factors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009; 18: 1077– 1083.

Nguyen DX, Westbrook TF, McCance DJ. Human papillomavirus type 16 E7 maintains elevated levels of the cdc25A tyrosine phosphatase during deregulation of cell cycle arrest. *J Virol*. 2002; 76: 619- 632.

Nindl I, Gottschling M, Stockfleth E. Human papillomaviruses and nonmelanoma skin cancer: basic virology and clinical manifestations. *Dis Markers*. 2007; 23(4): 247– 259.

Nomine Y, Masson M, Charbonnier S, Zanier K, Ristriani T, Deryckere F, Sibler AP, Desplancq D, Atkinson RA, Weiss E, Orfanoudakis G, Kieffer B, Trave G. Structural and Functional Analysis of E6 Oncoprotein; Insights in the Molecular Pathways of Human Papillomavirus-Mediated Pathogenesis. *Mol Cell*. 2006; 21(5): 665- 678.

- Oberoi B, Kumar S, Talwar P. Study of human sperm motility post cryopreservation. *Med J Armed Forces India*. 2014; 70(4): 349- 353.
- Oelze I, Kartenbeck J, Crusius K, Alonso A. Human papillomavirus type 16 E5 protein affects cell-cell communication in an epithelial cell line. *J. Virol*. 1995; 69: 4489- 4494.
- Oh ST, Kyo S, Laimins LA. Telomerase activation by human papillomavirus type 16 E6 protein: Induction of human telomerase reverse transcriptase expression through Myc and GC-rich Sp1 binding sites. *J. Virol*. 2001; 75: 5559- 5566.
- Ohl J, Partisani M, Wittemer C, Schmitt MP, Cranz C, Stoll-Keller F, Rongieres C, Battahar-Lebugle K, Lang JM, Nisand I. Assisted reproduction techniques for HIV serodiscordant couples: 18 months of experience. *Hum Reprod*. 2003; 18: 1244- 1249.
- Orav M, Geimanen J, Sepp EM, Henno L, Ustav E, Ustav M. Initial amplification of the HPV18 genome proceeds via two distinct replication mechanisms. *Sci Rep*. 2015; 5: 15952.
- Ozkavukcu S, Erdemli E, Isik A, et al. Effects of cryopreservation on sperm parameters and ultrastructural morphology of human spermatozoa. *J Assist Reprod Genet*. 2008; 25(8): 403- 411.
- Pastrana DV, Peretti A, Welch NL, Borgogna C, Olivero C, Badolato R, Notarangelo LD, Gariglio M, FitzGerald PC, McIntosh CE, et al. Metagenomic Discovery of 83 New Human Papillomavirus Types in Patients with Immunodeficiency. *mSphere*. 2018; 3.
- Perino A, Giovannelli L, Schillaci R, Ruvolo G, Fiorentino FP, Alimondi P, Cefal UE, Ammatuna P. Human papillomavirus infection in couples undergoing in vitro fertilization procedures: impact on reproductive outcomes. *Fertil Steril*. 2011; 95: 1845– 1848.
- Poongothai J. Etiology, investigation and treatment of Human men's infertility. *J. Infertil. Biol*. 2013; 1(2): 31- 36.
- Porter SS, Stepp WH, Stamos JD, McBride AA. Host cell restriction factors that limit transcription and replication of human papillomavirus. *Virus Res*. 2017; 231: 10- 20.
- Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Recommendations for reducing the risk of viral transmission during fertility treatment

with the use of autologous gametes: a committee opinion. *Fertil Steril*. 2020; 114: 1158-1164.

Ragheb AM, Sabanegh ES. Male fertility-implications of anticancer treatment and strategies to mitigate gonadotoxicity. *Anticancer Agents Med Chem*. 2010; 10: 92–102.

Ribeiro AL, Caodaglio AS, Sichero L. Regulation of HPV transcription. *Clinics*. 2018; 73(Suppl. 1): e486s.

Rintala MA, Gr_enman SE, Pollanen PP, Suominen JJ, Syrjanen SM. Detection of high-risk HPV DNA in semen and its association with the quality of semen. *Int J STD AIDS*. 2004; 15: 740– 743.

Roberts S, Ashmole I, Gibson LJ, Rookes SM, Barton GJ, Gallimore PH. Mutational analysis of human papillomavirus E4 proteins: Identification of structural features important in the formation of cytoplasmic E4/cytokeratin networks in epithelial cells. *J Virol*. 1994; 68: 6432- 6445.

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; 71: 3554- 3562.

Royere D, Hamamah S, Nicolle JC, Lansac J. Chromatin alterations induced by freeze-thawing influence the fertilizing ability of human sperm. *Int J Androl*. 1991; 14(5): 328-332.

Russel PHm Lyaruu VH, Millar JD et al. The potential transmission of infectious agents by semen packaging during storage for artificial insemination. *Anim Reprod Sci*. 1997; 47: 337- 342.

Sakakibara N, Chen D, McBride AA. Papillomaviruses use recombination-dependent replication to vegetatively amplify their genomes in differentiated cells. *PLoS Pathog*. 2013; 9: e1003321.

Scheffener M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ, Howley PM. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell*. 1990; 63: 1129- 1136.

Schillaci R, Capra G, Bellavia C, Ruvolo G, Scazzone C, Venezia R, et al. Detection of oncogenic human papillomavirus genotypes on spermatozoa from male partners of infertile couples. *Fertil Steril*. 2013; 100: 1236- 1240.

Schiller JT, Lowy DR. Understanding and learning from the success of prophylactic human papillomavirus vaccines. *Nature reviews Microbiology*. 2012; 10: 681- 692.

Senba M, Mori N. Mechanisms of virus immune evasion lead to development from chronic inflammation to cancer formation associated with human papillomavirus infection. *Oncology Reviews*. 2012; 6: e17.

Sheykhasan M, Ghias M. Semen quality and age-dependent changes among male participants with normal sperm count in Qom, Iran. *J. Infertil. Reprod. Biol*. 2016; 4(2): 35- 39.

Sichero L, Sobrinho JS, Villa LL. Identification of novel cellular transcription factors that regulate early promoters of human papillomavirus types 18 and 16. *Infect Dis*. 2012; 206(6): 867- 874.

Slabbert M, Du Plessis SS, Huyser C. Large volume cryoprotectant-free vitrification: an alternative to conventional cryopreservation for human spermatozoa. *Andrologia*. 2015; 47: 594– 599.

Souho T, Benlemlih M, Bennani B. Human papillomavirus infection and fertility alteration: a systematic review. *PLoS One*. 2015; 10: e0126936.

Stokley S, Jeyarajah J, Yankey D, Cano M, Gee J, Roark J, Curtis RC, Markowitz L. Immunization Services Division NCfI, Respiratory Diseases CDC, et al. Human papillomavirus vaccination coverage among adolescents, 2007-2013, and postlicensure vaccine safety monitoring, 2006-2014—United States. *Mmwr Morb. Mortal Wkly Rep*. 2014; 63: 620– 624.

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; 223: 251- 254.

Stubenrauch F, Hummel M, Iftner T, Laimins LA. The E8E2C protein, a negative regulator of viral transcription and replication, is required for extrachromosomal maintenance of human papillomavirus type 31 in keratinocytes. *J Virol*. 2000; 74: 1178- 1186.

Stubenrauch F, Zobel T, Iftner T. The E8 domain confers a novel long-distance transcriptional repression activity on the E8E2C protein of high-risk human papillomavirus type 31. *J Virol*. 2001; 75: 4139- 4149.

Stünkel, W, Bernard HU. The chromatin structure of the long control region of human papillomavirus type 16 represses viral oncoprotein expression. *J. Virol*. 1999; 73: 1918– 1930.

Tedder RS, Zuckerman MA, Goldstone AH, Hawkins AE, Fielding A, Briggs EM, Irwin D, Blair S, Forman Am, Patterson KG et al. Hepatitis B transmission from contaminated cryopreservation tank. *Lancet*. 1995; 346: 137- 140.

Thierry F, Spyrou G, Yaniv M, Howley P. Two AP1 sites binding JunB are essential for human papillomavirus type 18 transcription in keratinocytes. *J Virol*. 1992; 66(6): 3740- 3748.

Thomas M, Banks L. Human papillomavirus (HPV) E6 interactions with Bak are conserved amongst E6 proteins from high and low risk HPV types. *J. gen. Virol*. 1999; 80: 1513- 1517.

Thomas M, Pim D, Banks L. The role of the E6-p53 interaction in the molecular pathogenesis of HPV. *Oncogene*. 1999; 18: 7690- 7700.

Tiitinen A. Prevention of multiple pregnancies in infertility treatment. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2012; 26: 829– 840.

Valle GF, Banks L. The human papillomavirus (HPV)-6 and HPV-16 E5 proteins cooperate with HPV-16 E7 in the transformation of primary rodent cells. *J. gen. Virol*. 1995; 76: 1239- 1245.

Van den Eede B. Investigation and treatment of infertile couples: ESHRE guidelines for good clinical and laboratory practice. *Hum Reprod*. 1995; 10: 1246- 1271.

Vande Pol SB, Brown MC, Turner CE. Association of bovine papillomavirus type 1 E6 oncoprotein with the focal adhesion protein paxillin through a conserved protein interaction motif. *Oncogene*. 1998; 16: 43- 52.

Vande Pol SB, Klingelhutz AJ. Papillomavirus E6 oncoproteins. *Virology*. 2013; 445 (1-2): 115- 137.

- Van Tine BA, Dao LD, Wu SY, Sonbuchner TM, Lin BY, Zou N, Chiang CM, Broker TR, Chow LT. Human papillomavirus (HPV) origin-binding protein associates with mitotic spindles to enable viral DNA partitioning. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2004; 101: 4030- 4035.
- Veldman T, Horikawa I, Barrett JC, Schlegel R. Transcriptional activation of the telomerase hTERT gene by human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein. *J. Virol*. 2001; 75: 4467- 4472.
- Vilagran I, Yeste M, Sancho S, Casas I, Rivera Del Alamo MM, Bonet S. Relationship of sperm small heat-shock protein 10 and voltage-dependent anion channel 3 with semen freezability in boars. *Theriogenology*. 2014; 82: 418- 426.
- Wang Q, Griffin H, Southern S, Jackson D, Martin A, McIntosh P, Davy C, Masterson PJ, Walker PA, Laskey P, Omary MB, Doorbar J. Functional analysis of the human papillomavirus type 16 E1=E4 protein provides a mechanism for in vivo and in vitro keratin filament reorganization. *J. Virol*. 2004; 78: 821- 833.
- Wang X, Meyers C, Wang HK, Chow LT, Zheng ZM. Construction of a Full Transcription Map of Human Papillomavirus Type 18 during Productive Viral Infection. *J Virol*. 2011; 85(16): 8080- 8092.
- Wang WJ, Roden BSR. L2, the minor capsid protein of papillomavirus. *Virology*. 2013; 445: 175- 186.
- Williams DH. Sperm banking and the cancer patient. *TherAdv Urol*. 2010; 2(1): 19- 34.
- World Health Organization, Human Papillomaviruses, IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Volume 90, France 2007.
- Wu SY, Lee AY, Hou SY, Kemper JK, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Chiang, CM. Brd4 links chromatin targeting to HPV transcriptional silencing. *Genes Dev*. 2012; 20: 2383– 2396.
- Yang Y, Jia CW, Ma YM, Zhou LY, Wang SY. Correlation between HPV sperm infection and male infertility. *Asian J Androl* 2013; 15: 529-32.
- Yu JM. Rethinking Human Papillomavirus Vaccine for Oral and Oropharyngeal Cancer Prevention and Global Implementation. *Jemi- Pearls*. 2017; 2: 1- 8.

Yugawa T, Kiyono T. Molecular mechanisms of cervical carcinogenesis by high-risk human papillomaviruses: novel functions of E6 and E7 oncoproteins. *Rev Med Virol.* 2009; 19(2): 97- 113.

Zacharis K, Messini C, Anifandis G, Koukoulis G, Satra M, Daponte A. Human Papillomavirus (HPV) and Fertilization: A Mini Review. *Medicina.* 2018; 54 (50): doi:10.3390/medicina54040050.

Zimmermann H, Degenkolbe R, Bernard HU, O'Connor MJ. The human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein can down-regulate p53 activity by targeting the transcriptional coactivator CBP/p300. *J. Virol.* 1999; 73: 6209- 6219.

Zou N, Lin BY, Duan F, Lee KY, Jin G, Guan R, Yao G, Lefkowitz EJ, Broker TR, Chow LT. The hinge of the human papillomavirus type 11 E2 protein contains major determinants for nuclear localization and nuclear matrix association. *J Virol.* 2000; 74: 3761- 3770.

Zsolt Peter Nagy, Alex C. Varghese, Ashok Agarwal. Cryopreservation of Mammalian Gametes and Embryos: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology) vol 1568. Springer Science+Business Media LLC. 2017; doi: 10.1007/978-1-4939-6828-2_5.

zur Hausen H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst.* 2000; 92: 690- 698.

zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer.* 2002; 2: 342- 350.

zur Hausen. H. Papillomaviruses in the causation of human cancers- a brief historical account. *Virology.* 2009; 384: 260- 265.