



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Ο ρόλος του HPV στην εφαρμογή των μεθόδων της
Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής»**

Κωνσταντίνος Ζαχαρής

Ιατρός

ΛΑΡΙΣΑ

Σεπτέμβριος 2016

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ ΤΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ

ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ Ι. ΔΑΠΟΝΤΕ

ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΜΑΙΕΥΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Επιβλέπων: Χριστίνα Μεσσήνη, Λέκτορας Μαιευτικής και Γυναικολογίας

Μέλος: Αλέξανδρος Δαπόντε, Αναπληρωτής Καθηγητής Μαιευτικής και Γυναικολογίας

Μέλος: Μαρία Σάτρα, Εργαστηριακό Διδακτικό Προσωπικό (ΕΔΙΠ)

Περιεχόμενα

Συντομογραφίες	4
1. Εισαγωγή	5
2. Υπογονιμότητα.....	6
2.1. Γυναικεΐα υπογονιμότητα.....	7
2.2. Ανδρική υπογονιμότητα.....	9
2.3. Ανεξήγητη υπογονιμότητα.....	11
3. Υποβοηθούμενη Αναπαραγωγή.....	11
3.1. Ενδομήτρια σπερματέγχυση (IUI).....	14
3.2. Εξωσωματική γονιμοποίηση (IVF).....	14
3.3. Μικρογονιμοποίηση (ICSI).....	16
3.4. Άλλες μέθοδοι ART.....	17
4. Ιός των ανθρώπινων θηλωμάτων (Human papilloma virus-HPV)	18
4.1. Κατάταξη του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων.....	19
4.2. Δομή του ιού.....	19
4.2.1. Ιικά συστατικά και φυσικές ιδιότητες.....	19
4.2.2. Γονιδίωμα του HPV, πρωτεΐνες και κύκλος ζωής.....	20
4.3. Ταξινόμηση των HPV ιών.....	23
4.4. Κατάταξη των HPV	24
4.5. Βιολογικά χαρακτηριστικά των PV	27
4.6. Λειτουργία των ιικών πρωτεϊνών	28
4.6.1. E1.....	28
4.6.2. E2.....	29
4.6.3. E4 και E5.....	30
4.6.4. E6.....	31
4.6.5. L1.....	32
4.6.6. L2.....	33
4.7. Κύκλος ζωής του HPV.....	33
4.8. Διάγνωση της μόλυνσης.....	36
4.8.1. Εύρεση του DNA του HPV και ταυτοποίηση των γενότυπων HPV.....	36
4.8.2. Συλλογή δειγμάτων και απομόνωση των νουκλεϊκών οξέων.....	37

5. HPV και γονιμότητα.....	38
5.1. HPV και σπέρμα	38
5.2. HPV και αρχικά στάδια εμβρυογένεσης	39
5.3. HPV γυναικεία γονιμότητα και αυτόματες εκτρώσεις.....	40
6. HPV και Υποβοηθούμενη Αναπαραγωγή	40
6.1. Ενδομήτρια σπερματέγχυση.....	41
6.2. Εξωσωματική γονιμοποίηση	41
7. Βιβλιογραφικά προτεινόμενος τρόπος διαχείρισης υπογόνιμων ανδρών.....	42
8. Συμπεράσματα	43
9. Ερευνητικές προκλήσεις.....	44
9.1. Βασικά ερευνητικά ερωτήματα	45
9.2. Προτεινόμενη μεθοδολογία έρευνας.....	45
10. Συζήτηση.....	46
11. Βιβλιογραφία.....	48

Συντομογραφίες

- AH: Υποβοηθούμενη Εκκόλαψη
- AMH: Αντιμυλλέριος ορμόνη
- ART: Τεχνολογίες Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής
- BBT: Βασική θερμοκρασία σώματος
- CBAVD: Συγγενής αμφοτερόπλευρη έλλειψη σπερματικού πόρου
- CFTR: Ρυθμιστής διαμεμβρανικής αγωγιμότητας της Κυστικής Ίνωσης
- DHEA-S: Δεϋδροεπιανδροστερόνη
- ESHRE: Ευρωπαϊκή Εταιρεία Ανθρώπινης Αναπαραγωγής και Εμβρυολογίας
- FSH: Ωοθυλακιοτρόπος ορμόνη
- GIFT: Ενδοσαλπινγική μεταφορά γαμετών
- GnRH: Εκλυτική ορμόνη των γοναδοτροπινών
- HSG: Υστεροσαλπινγογραφία
- ICSI: Ενδοωαριακή έγχυση σπερματοζωαρίου
- IUI: Ενδομήτρια σπερματέγχυση
- IVF: Εξωσωματική γονιμοποίηση
- LH: Ωχρινοτρόπος ορμόνη
- LPS: Υποστήριξη ωχρινικής φάσης
- OHSS: Σύνδρομο υπερδιέγερσης ωοθηκών
- OPU: Ωοληψία
- PGD: Προεμφυτευτική γενετική διάγνωση
- PRL: Προλακτίνη
- SET: Μεταφορά ενός εμβρύου
- STI: Σεξουαλικά μεταδιδόμενη λοίμωξη
- TET: Ενδοσαλπινγική μεταφορά εμβρύου
- WHO: Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας
- ZIFT: Ενδοσαλπινγική μεταφορά ζυγωτού
- ZP: Διάφανη ζώνη ωαρίου

1. Εισαγωγή

Το τελευταίο τέταρτο του 20ου αιώνα έχει να παρουσιάσει πολλές και μεγάλες προόδους στην αναπαραγωγική ιατρική. Το 1978 οι Edwards και Steptoe γνωστοποίησαν τη γέννηση της Louise Brown, του πρώτου ανθρώπινου μωρού που προέκυψε από in vitro γονιμοποίηση. Το γεγονός αυτό αποτέλεσε ορόσημο στον συγκεκριμένο τομέα της ιατρικής και έδωσε ελπίδα σε χιλιάδες ζευγάρια που αδυνατούσαν μέχρι τότε να τεκνοποιήσουν. Υπολογίζεται ότι σήμερα, σχεδόν ένα εκατομμύριο μωρά έχουν γεννηθεί σε όλο τον κόσμο ως αποτέλεσμα της εξωσωματικής γονιμοποίησης. Ωστόσο, η εξωσωματική γονιμοποίηση δεν είναι παρά μία από τις πολλές διαδικασίες στον όλο και πιο σύνθετο και περίπλοκο τομέα της βιοϊατρικής γνωστή ως υποβοηθούμενη αναπαραγωγή. Είναι σαφές ότι οι ART έχουν ένα θετικό αντίκτυπο στις ζωές πολλών υπογόνιμων ζευγαριών, τα οποία κατάφεραν να αποκτήσουν παιδί, μέσω των μεθόδων αυτών. Από την άλλη πλευρά, αποτέλεσαν πηγή μεγάλης απογοήτευσης για εκείνα τα ζευγάρια για τους οποίους οι ART αποδείχθηκαν ανεπιτυχείς και για πολλούς άλλους ανθρώπους με προβλήματα υπογονιμότητας σε όλο τον κόσμο, οι οποίοι δεν έχουν πρόσβαση σε αυτές τις τεχνολογίες. Τα επιδημιολογικά στοιχεία αποδεικνύουν τον συνεχώς αυξανόμενο αριθμό ζευγαριών που υποβάλλονται σε τεχνικές υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Συγκεκριμένα, το ευρωπαϊκό πρόγραμμα επιτήρησης των μεθόδων υποβοηθούμενης αναπαραγωγής (European IVF Monitoring-EIM) της ESHRE (European Society of Human Reproduction and Embryology) ανέδειξε 640.144 περιπτώσεις χρήσης κάποιας μεθόδου ART μόνο για το έτος 2012. [5]

Σε πολλές χώρες, η υπογονιμότητα είναι το αποτέλεσμα της λοίμωξης του γεννητικού συστήματος από κάποια σεξουαλικά μεταδιδόμενη λοίμωξη (Sexually Transmitted Infection-STI) είτε της γυναίκας είτε του άνδρα. Στο κεφάλαιο των STI's αποκτά ολοένα και περισσότερο έδαφος η λοίμωξη με τον ιό των ανθρωπίνων θηλωμάτων (Human Papilloma Virus-HPV). Η σχέση του ιού με την πρόκληση κονδυλωμάτων και την καρκινογένεση είναι ένα ζήτημα που έχει μελετηθεί ενδελεχώς. Όμως, πολλά ερωτήματα εγείρονται γύρω από την σχέση του HPV με την ανθρώπινη γονιμότητα, τη συσχέτισή του με τις μεθόδους της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής και την επίδραση του στην έκβαση αυτών. Οι μελέτες πάνω σε αυτό το θέμα είναι περιορισμένες και απαιτείται περισσότερη έρευνα.

Σκοπός αυτής της διπλωματικής εργασίας είναι η ανασκόπηση της μέχρι τώρα βιβλιογραφίας στο ρόλο του ιού των ανθρωπίνων θηλωμάτων στην υποβοηθούμενη αναπαραγωγή. Για την περαιτέρω ανάλυση του θέματος κρίνεται σκόπιμο να περιγραφούν οι έννοιες της υπογονιμότητας, της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής καθώς και η δομή και λειτουργία του ιού των ανθρωπίνων θηλωμάτων.

2. Υπογονιμότητα

Ως υπογονιμότητα (infertility) ορίζεται η αδυναμία πραγματοποίησης κύησης μετά την παρέλευση ενός έτους ελεύθερων σεξουαλικών σχέσεων. [1] Παλαιότερα χρησιμοποιούταν και ο όρος στειρώση (sterility) αλλά για λόγους επιστημονικής ορθότητας και κοινωνικής δεοντολογίας έχει πλέον εκλείψει. Η συχνότητα της υπογονιμότητας υπολογίζεται 15% έως 20% των νιόπαντρων ζευγαριών, δηλαδή 1 στα 5 περίπου ζευγάρια αντιμετωπίζουν προβλήματα με τη γονιμότητά τους (νιόπαντρα θεωρούνται τα ζευγάρια μέχρι τη συμπλήρωση δύο χρόνων). Η υπογονιμότητα είναι, επομένως, μια κατάσταση μειωμένης αναπαραγωγικής δυνατότητας και διακρίνεται σε πρωτοπαθή και δευτεροπαθή. Πρωτοπαθή υπογονιμότητα έχουμε στις περιπτώσεις που ουδέποτε επετεύχθη κύηση. Ως δευτεροπαθής υπογονιμότητα θεωρείται η αδυναμία επίτευξης εγκυμοσύνης, με την προϋπόθεση ότι προϋπήρξε κύηση (κάθε είδους) ανεξαρτήτως αποτελέσματος. Για την πραγματοποίηση της γονιμοποίησης πρέπει να πληρούνται οι εξής προϋποθέσεις:

1. Φυσιολογική ωοθηκική λειτουργία, η οποία περιλαμβάνει την πραγματοποίηση της ωοθυλακιορρηξίας.
2. Φυσιολογική ανατομία του γεννητικού συστήματος της γυναίκας και επομένως η διαβατότητα των σαλπίγγων.
3. Ύπαρξη φυσιολογικού, ως προς τις παραμέτρους, σπέρματος. [1-3]

Επομένως κάθε αίτιο που επηρεάζει κάποια από τις παραπάνω προϋποθέσεις προκαλεί προβλήματα υπογονιμότητας. Η γονιμότητα ενός ζευγαριού επηρεάζεται από μια πληθώρα παραγόντων. Σε αυτούς περιλαμβάνονται η συχνότητα των σεξουαλικών επαφών, η ηλικία της γυναίκας, το κάπνισμα, η σωματική άσκηση, η διαίτα και οι μεταβολές του σωματικού βάρους, ψυχοσυναισθηματικοί παράγοντες, γενικές παθήσεις, σεξουαλικά μεταδιδόμενες λοιμώξεις καθώς και η χρήση φαρμάκων και ναρκωτικών ουσιών. Αναλύοντας τους παραπάνω παράγοντες παρατηρούμε ότι, όσο αυξάνεται ο αριθμός των σεξουαλικών επαφών εβδομαδιαίως, τόσο αυξάνεται το ποσοστό σύλληψης σε χρονικό διάστημα έξι μηνών. Επίσης η μεγάλη ηλικία της γυναίκας καθώς και οι καπνίστριες συγκριτικά με τις μη-καπνίστριες, μειώνουν σημαντικά τα ποσοστά των κύσεων. Το σωματικό βάρος και ειδικότερα ο δείκτης μάζας σώματος, όταν βρίσκονται εντός φυσιολογικών ορίων, αυξάνουν στο μέγιστο τη δυνατότητα γονιμοποίησης και στα δύο φύλα. Οι STI's μπορεί να προκαλέσουν υπογονιμότητα μέσω απόφραξης των σαλπίγγων, αλλά και η ίδια η παρουσία της λοίμωξης φαίνεται να εμποδίζει τη σύλληψη. Τέλος η χρήση φαρμάκων και ναρκωτικών ουσιών μπορεί να προκαλέσουν ανωοθυλακιορρηξία, διαταραχές στην στυτική λειτουργία και παθολογικές παραμέτρους σπέρματος στις γυναίκες και στους άνδρες, αντίστοιχα.

Η υπογονιμότητα μπορεί να αφορά στη γυναίκα, στον άνδρα ή και στους δύο. Σε ένα ποσοστό 40% τα αίτια οφείλονται στη γυναίκα, σε ένα άλλο 40% οφείλεται στον άνδρα, και τέλος σε ένα 20% μπορεί να ευθύνονται και οι δύο ή να είναι άγνωστης αιτιολογίας. Σε 14141 περιπτώσεις υπογόνιμων ζευγαριών από 21 δημοσιεύσεις παρατηρούμε ότι στο 27% των περιπτώσεων έχουμε διαταραχές της ωοθυλακιορρηξίας, ενώ στο 25% διαπιστώνεται μη φυσιολογικό σπέρμα και ακολουθούν η παθολογία των σαλπίνγων (22%), η ανεξήγητη υπογονιμότητα (17%), η ενδομητρίωση (5%) και άλλα αίτια (4%). [1-3]

2.1. Γυναικεία υπογονιμότητα

Από πλευράς αιτιών, που αφορούν στη γυναίκα, οι διαταραχές της ωοθυλακιορρηξίας, με κύριο εκπρόσωπο την ανωοθυλακιορρηξία, ενοχοποιούνται σε ποσοστό 15-30%, της λειτουργίας των σαλπίνγων σε ποσοστό 20-25%. Η ανεξήγητη υπογονιμότητα ανέρχεται σε ποσοστό 20-25% και ακολουθούν η ενδομητρίωση και ο τραχηλικός παράγοντας (5-10%). Τα αίτια που προκαλούν ανωοθυλακιορρηξία περιλαμβάνουν τις διαταραχές της λειτουργίας του άξονα υποθάλαμος-υπόφυση-ωοθήκες, παθολογία λοιπών ενδοκρινικών αδένων (επινεφριδίων, θυρεοειδούς αδένου) και καταστάσεις που προκαλούν υπερπρολακτιναιμία. Οι κύριες κλινικές εκδηλώσεις της ανωοθυλακιορρηξίας είναι η αμηνόρροια και η αραιομηνόρροια (διάρκεια εμμηνορρυσιακού κύκλου μεγαλύτερη από 35 ημέρες). Άλλα σημεία όπως η υπερτρίχωση και η γαλακτόρροια μπορεί να μας κατευθύνουν ως προς την αιτιολογία της ανωοθυλακιορρηξίας. Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας η ανωοθυλακιορρηξία κατατάσσεται σε τρεις ομάδες (βλ. πίνακα). Οι βλάβες των σαλπίνγων μπορεί να οφείλονται σε φλεγμονές των γεννητικών οργάνων, ή σε επεμβάσεις στην πύελο. Τέλος η ενδομητρίωση οδηγεί σε προβλήματα στη γονιμότητα της γυναίκας μέσω της δημιουργίας συμφύσεων. [1-3]

Υπογοναδοτροφικός Υπογοναδισμός	Νορμογοναδοτροφικός Υπογοναδισμός	Υπεργοναδοτροφικός Υπογοναδισμός	Υπερπρολακτιναιμία
↓ FSH, LH, E ₂	Φυσιολογικές τιμές: FSH, LH, E ₂	↑FSH, LH ↓E ₂	↑PRL ↓FSH, LH, E ₂
Αμηνόρροια Χορήγηση P₄(-)	Αμηνόρροια Χορήγηση P ₄ (+) ή Αραιομηνόρροια	Αμηνόρροια Μη ανταπόκριση στη χορήγηση P ₄	Αμηνόρροια Χορήγηση P ₄ (±) Γαλακτόρροια
WHO Group I (10%)	WHO Group II (PCOS) (85%)	WHO Group III (4-5%)	

Πίνακας: Ταξινόμηση ανωοθυλακιορρηξίας σύμφωνα με το WHO

Στη διαγνωστική διαδικασία της γυναικείας υπογονιμότητας ακρογωνιαίο λίθο αποτελεί το ιστορικό και η κλινική εξέταση. Στο γυναικολογικό ιστορικό πρέπει να σημειώνονται τα χαρακτηριστικά του εμμηνορρυσιακού κύκλου, η διάρκεια της εμμήνου ρύσης, το χρονικό διάστημα μέχρι την επόμενη έμμηνο ρύση, η πρώτη μέρα της τελευταίας έμμηνο ρύσης καθώς και η λήψη ορμονικών σκευασμάτων όπως αντισυλληπτικά δισκία. Καταγράφονται επιπλέον οι γυναικολογικές επεμβάσεις, οι προηγούμενες εγκυμοσύνες και τυχόν τεχνητές ή αυτόματες εκτρώσεις. Από το ατομικό αναμνηστικό πρέπει να αποσαφηνιστεί η συστηματική χρήση φαρμάκων, η ύπαρξη σακχαρώδους διαβήτη και διαταραχών του θυρεοειδούς αδένου. Στη συνέχεια πρέπει να διενεργείται γυναικολογική εξέταση η οποία περιλαμβάνει, την επισκόπηση των έξω γεννητικών οργάνων, την αμφίχειρη ψηλάφηση των έσω γεννητικών οργάνων καθώς και το διακολπικό υπερηχογράφημα. [1-3, 10]

Στη διερεύνηση του γυναικείου παράγοντα περιλαμβάνονται η εκτίμηση της ωοθυλακιορρηξίας και της διαβατότητας των σαλπίγγων. Η εκτίμηση της ωοθυλακιορρηξίας μπορεί να γίνει και από το ιστορικό της γυναίκας (παλαιότερη κύηση, φυσιολογικός εμμηνορρυσιακός κύκλος), από το υπερηχογράφημα (κυρίαρχο ωοθυλάκιο, ενδομήτριο «3 γραμμών»), με τη μέτρηση της βασικής θερμοκρασίας σώματος (basal body temperature-BBT) και επιβεβαιώνεται με τη μέτρηση της προγεστερόνης στο αίμα στη μέση ωχρινική φάση (>30 nmol/L την 21^η ημέρα του κύκλου σε γυναίκες με κύκλο 28 ημερών). [1] Από την άλλη πλευρά, η διαβατότητα των σαλπίγγων εκτιμάται με τρεις μεθόδους, την υστεροσαλπιγγογραφία, τη λαπαροσκόπηση και τη σαλπιγγοσκόπηση. Στην υστεροσαλπιγγογραφία (hysterosalpingography-HSG) πραγματοποιούνται ακτινογραφικές λήψεις των έσω γεννητικών οργάνων της γυναίκας μετά από έγχυση ακτινοσκιετής ουσίας διατραχηλικά στην ενδομητρική κοιλότητα. Η ουσία αυτή διαχέεται προς τις σάλπιγγες, όπου μέσω των κωδονικών στομιών εξέρχεται στην

περιτοναϊκή κοιλότητα. Με τον τρόπο αυτό απεικονίζεται η μορφολογία της ενδομητρικής κοιλότητας, αποκλείοντας συγγενείς ανωμαλίες της μήτρας που μπορεί να ευθύνονται για την υπογονιμότητα, και επιβεβαιώνεται η διαβατότητα των σαλπίνγων. Με την σαλπιγγοσκόπηση είναι δυνατός ο έλεγχος του αυλού των σαλπίνγων και επομένως της φυσιολογικής ή όχι εικόνας των πτυχών του βλεννογόνου είτε κατά τη διάρκεια της λαπαροσκόπησης είτε διακολλικά εισάγοντας την κάμερα από τον οπίσθιο κοιλικό θόλο. Σε δεύτερο επίπεδο ενδέχεται να χρειαστεί υστεροσκόπηση ή/και λαπαροσκόπηση. Η υστεροσκόπηση είναι επεμβατική μέθοδος, η οποία διενεργείται όταν υπάρχει υποψία αλλοιώσεων στην ενδομήτρια κοιλότητα (μόρφωμα-συμφύσεις). Η λαπαροσκόπηση είναι διαγνωστική και επεμβατική μέθοδος. Χρησιμοποιείται για τον έλεγχο ανατομικών ανωμαλιών της μήτρας, την ύπαρξη ενδομητρίωσης, ωοθηκικών κύστεων ή παθολογίας των σαλπίνγων. [2]

2.2. Ανδρική υπογονιμότητα

Τα αίτια μείωσης της ανδρικής γονιμότητας είναι ποικίλα και προκαλούν, είτε διαταραχές στη σπερματογένεση, είτε κώλυμα στη δίοδο του σπέρματος από το γεννητικό σύστημα κατά την εκσπερμάτιση. Οι συγγενείς ανωμαλίες, όπως η αμφοτερόπλευρη έλλειψη των σπερματικών πόρων (CBAVD) προκαλούν υπογονιμότητα. Επίσης, λοιμώξεις των γεννητικών οργάνων (όρχις, επιδιδυμίδα) και των παραγεννητικών αδένων (προστάτης, σπερματοδόχος κύστεις) έχουν ως αποτέλεσμα μείωση της κινητικότητας ή του αριθμού των σπερματοζωαρίων. Ενδοκρινικές διαταραχές ή νοσήματα του νευρικού συστήματος μπορεί να προκαλέσουν ορμική δυσλειτουργία ή αδυναμία εκσπερμάτισης. Παθήσεις όπως η κισσοκήλη, η κρυπορχία και χρωμοσωμικές ανωμαλίες (όπως το σύνδρομο Klinefelter) αποτελούν αιτίες υπογονιμότητας στον άνδρα. Τέλος, η έκθεση σε τοξικές ουσίες, η χρήση φαρμάκων, το κάπνισμο και το αλκοόλ μπορούν να επιδράσουν αρνητικά στη γονιμότητα του άνδρα. [1]

Στη διερεύνηση της ανδρικής υπογονιμότητας διενεργείται η ακόλουθη διαγνωστική διαδικασία. Όπως και στη γυναίκα, αρχικά λαμβάνεται ένα λεπτομερές ιστορικό. Πρέπει να καταγράφονται παθήσεις των γεννητικών οργάνων, ιστορικό λοίμωξης των παραγεννητικών αδένων, προηγηθείσες χειρουργικές επεμβάσεις καθώς και η χρήση φαρμάκων. Ιδιαίτερη σημασία από την πλευρά του άνδρα έχει η κατανάλωση αλκοόλ, η λοίμωξη από τον ιό της παρωτίτιδας σε εφηβική ή μεγαλύτερη ηλικία, η έκθεση σε υψηλές θερμοκρασίες της περιοχής ή σε τοξικές ουσίες. Στη συνέχεια ακολουθεί ψηλάφηση της περιοχής καθώς και υπερηχογράφημα οσχέου και διορθικό υπερηχογράφημα για τον έλεγχο του προστάτη. [2-3]

Οι βασικές εξετάσεις που έπονται του ιστορικού και τις κλινικής εξέτασης, στα πλαίσια διερεύνησης του ανδρικού παράγοντα, είναι το σπερμοδιάγραμμα και η καλλιέργεια σπέρματος. Σύμφωνα με τις τελευταίες κατευθυντήριες οδηγίες του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας το 2010, οι παράμετροι του φυσιολογικού σπέρματος διαμορφώνονται ως εξής: [7]

Parameter	Lower reference limit
Semen volume (mL)	1.5 (1.4-1.7)
Total sperm number (10^6 per ejaculate)	39 (33-46)
Sperm concentration (10^6 per mL)	15 (12-16)
Total motility (PR+NP, %)	40 (38-42)
Progressive motility (PR, %)	32 (31-34)
Vitality (live spermatozoa, %)	58 (55-63)
Sperm morphology (normal forms, %)	4 (3.0-4.0)
Other consensus threshold values	
pH	≥ 7.2
Peroxidase-positive leukocytes (10^6 per mL)	< 1.0
Optional investigations	
MAR test (motile spermatozoa with bound particles, %)	< 50
Immunobead test (motile spermatozoa with bound beads, %)	< 50
Seminal zinc ($\mu\text{mol/ejaculate}$)	≥ 2.4
Seminal fructose ($\mu\text{mol/ejaculate}$)	≥ 13
Seminal neutral glucosidase (mU/ejaculate)	≥ 20

Σε μη φυσιολογικά αποτελέσματα στο σπερμοδιάγραμμα απαιτείται περαιτέρω έλεγχος, που περιλαμβάνει τη μέτρηση ορμονών στο αίμα του άνδρα. Συνήθως μετρούνται η τεστοστερόνη, οι γοναδοτροφίνες (FSH και LH) και η προλακτίνη (PRL). Επί φυσιολογικών τιμών των παραπάνω ορμονών αποκλείονται αίτια όπως η πρωτοπαθής ορχική ανεπάρκεια, ο υπογοναδοτροφικός υπογοναδισμός, διαταραχές στη σπερματογένεση ή οι καταστάσεις υπερπρολακτιναιμίας. Από την άλλη, η καλλιέργεια σπέρματος μπορεί να αναδείξει ή να επιβεβαιώσει την ύπαρξη φλεγμονής, η οποία μπορεί να ευθύνεται για την υπογονιμότητα του άνδρα. [1-3, 7]

2.3. Ανεξήγητη υπογονιμότητα

Στις περιπτώσεις που δεν υπάρχει σαφής αιτιολογία, είτε από την πλευρά της γυναίκας είτε από την πλευρά του άνδρα, για την υπογονιμότητα τότε θεωρούμε ότι είναι ανεξήγητη. Η διάγνωσή της είναι δύσκολο να τεθεί, αν δεν προηγηθούν πρώτα οι απαραίτητες διαγνωστικές διαδικασίες διερεύνησης του ζευγαριού. Η ανεξήγητη υπογονιμότητα είναι μια κατάσταση στην οποία απαιτείται πλήρης διερεύνηση του ζευγαριού, όμως δεν υπάρχει ομοφωνία στο διαγνωστικό πρωτόκολλο που πρέπει να ακολουθείται. Χωρίς αμφιβολία μπορούμε να καταλήξουμε στο συμπέρασμα ότι η διάγνωσή της τίθεται εξ' αποκλεισμού. [1-3]

3. Υποβοηθούμενη Αναπαραγωγή

Η Υποβοηθούμενη Αναπαραγωγή είναι ένας κλάδος της ιατρικής που δημιουργήθηκε με κεντρικό της άξονα την ανθρώπινη υπογονιμότητα. Από το ξεκίνημα της ήρθε να αποτελέσει τη λύση στο πρόβλημα πολλών υπογόνιμων ζευγαριών. Σύμφωνα με τις κατευθυντήριες γραμμές του Υπουργείου Υγείας το 2008 ως Ιατρικώς Υποβοηθούμενη Αναπαραγωγή ορίζεται:

«Μια σειρά διαδικασιών και τεχνικών που συνίστανται στην επεξεργασία των ανθρώπινων ωαρίων, σπερματοζωαρίων ή εμβρύων στο πλαίσιο ενός προγράμματος για την επίτευξη εγκυμοσύνης».

Εναλλακτικά με βάση το Ανώτατο Ινστιτούτο για την Υγεία η Ιατρικώς Υποβοηθούμενη Αναπαραγωγή ορίζεται ως η σύλληψη που επέρχεται με σύζευξη των γαμετών εκτός συνουσίας.

Οι μέθοδοι υποβοηθούμενης αναπαραγωγής αυξάνουν το ποσοστά εγκυμοσύνης μεταξύ των υπογόνιμων ζευγαριών. Στα κέντρα υποβοηθούμενης αναπαραγωγής σε Ευρώπη και Αμερική το ποσοστό επίτευξης εγκυμοσύνης σε γυναίκες έως 28 ετών είναι 50%-54% ενώ για τις γυναίκες 40ετών υπολογίζεται στο 23%. [5, 6, 8]

Όταν ένα ζευγάρι με αδυναμία να τεκνοποιήσει αποφασίσει να ακολουθήσει κάποια μέθοδο υποβοηθούμενης αναπαραγωγής, και οι δύο σύντροφοι υποβάλλονται σε μια σειρά εργαστηριακών εξετάσεων. Η γυναίκα χρειάζεται να προσκομίσει γενικές και ειδικές εξετάσεις αίματος, ορμονολογικό και ιολογικό έλεγχο, τεστ κατά Παπανικολάου και καλλιέργεια κολπικού υγρού. Ο άνδρας υποβάλλεται σε γενικός και ειδικό αιματολογικό έλεγχο, αντισώματα έναντι διαφόρων σεξουαλικά μεταδιδόμενων

λοιμώξεων, σπερμοδιάγραμμα, καλλιέργεια σπέρματος και βιοχημικό έλεγχο σπέρματος. Στον πίνακα που ακολουθεί περιγράφονται αναλυτικά οι εργαστηριακές εξετάσεις και των δύο φύλων:

ΓΥΝΑΙΚΑ	ΑΝΔΡΑΣ
Προγεστερόνη (21 ^η ημέρα) PRL(νήστις 2 ώρες μετά την αφύπνιση) AMH, FSH, LH, E2 (3 ^η ημέρα) Τεστοστερόνη, DHEA-S, 17-OHP	FSH LH PRL Τεστοστερόνη
Γενική αίματος Προσδιορισμός ομάδας αίματος-Rhesus Ηλεκτροφόρηση αιμοσφαιρίνης	
HBsAg Anti-HCV HIV I, II Τρεπόνημα Ερυθρά (IgG, IgM) Τοξόπλασμα (IgG, IgM) CMV (IgG, IgM)	HBsAg Anti-HCV HIV I, II Τρεπόνημα
TSH fT3 fT4 anti-TPO anti-TSH-R	Σπερμοδιάγραμμα
Τεστ ΠΑΠ	Καλλιέργεια σπέρματος <ul style="list-style-type: none"> • Μυκόπλασμα • Χλαμύδια • Ουρεόπλασμα
Καλλιέργεια κολπικού υγρού <ul style="list-style-type: none"> • Μυκόπλασμα • Χλαμύδια • Ουρεόπλασμα } Ενδοτραχηλική λήψη	Βιοχημικός έλεγχος σπέρματος <ul style="list-style-type: none"> • L-καρνιτίνη • α-γλυκοσιδάση • Ψευδάργυρος • Κιτρικό οξύ • Όξινη φωσφατάση • Φρουκτόζη
Υστεροσαλιγγιογραφία	
Μαστογραφία (ηλικία >35 ετών)	

Συγκεκριμένα, ο ορμονικός έλεγχος της γυναίκας ελέγχει την ομαλή λειτουργία του ορμονικού άξονα υποθάλαμος-υπόφυση-ωοθήκες. Οι FSH, LH, και η PRL την λειτουργία της υπόφυσης. Οι TSH, fT3, fT4 και τα θυρεοειδικά αντισώματα τη

λειτουργία του θυρεοειδούς. Οι ορμόνες οιστραδιόλη, τεστοστερόνη, προγεστερόνη, τη λειτουργία της ωοθήκης και η DHEA-S και η 17-υδροξυπρογεστερόνη τη λειτουργία των επινεφριδίων. Η AMH καθώς παράγεται μόνο από αρχέγονα ωοθυλάκια μεγέθους 8mm, μας δείχνει τα αποθέματα των ωοθηκικών εφεδρειών. [2-3]

Σε περιπτώσεις ανεξήγητης υπογονιμότητας, επανειλημμένων αποτυχιών εξωσωματικής γονιμοποίησης καθώς και σε καθ'έξιν αποβολές απαιτείται γενετικός έλεγχος καθώς και έλεγχος θρομβοφιλίας. Ο καρυότυπος θα μας αποκαλύψει την ύπαρξη χρωμοσωμικών ανωμαλιών (αριθμητικών-δομικών) και θα βοηθήσει στην καλύτερη προσέγγιση του υπογόνιμου ζευγαριού. Ένα ζευγάρι με μη-φυσιολογικό καρυότυπο, ενός από τους δύο συντρόφους, μπορεί να καταφύγει στην προεμφυτευτική γενετική διάγνωση (PGD) προκειμένου να μεταφέρει στη μήτρα της γυναίκας το υγιές έμβρυο που θα προκύψει από την εξωσωματική γονιμοποίηση και θα μειώσει την πιθανότητα αποτυχίας της εμφύτευσης. Ένα άλλο παράδειγμα που αποδεικνύει τη χρησιμότητα του γενετικού ελέγχου είναι άνδρες με κακής ποιότητας σπέρμα, οι οποίοι θα πρέπει να ελεγχθούν για το γονίδιο της κυστικής ίνωσης (CFTR) καθώς και για μικροελλείμματα στο χρωμόσωμα Y που μπορεί να προκαλέσουν αζωοσπερμία. Στον πίνακα που ακολουθεί παρατίθεται ο προτεινόμενος έλεγχος στα ζευγάρια με επαναλαμβανόμενες αποβολές έτσι ώστε να αποκλεισθούν διαταραχές στην πηκτικότητα.

ΕΛΕΓΧΟΣ ΘΡΟΜΒΟΦΙΛΙΑΣ

Αντιθρομβίνη III
Προθρομβίνη
Χρόνος Ενεργοποίησης Μερικής Θρομβοπλαστίνης (APTT)
Ινωδογόνο
Πρωτεΐνη C
Πρωτεΐνη S

Παράγοντας XII
Παράγοντας VIII
Ομοκυστεΐνη
β2-γλυκοπρωτεΐνη (αντιβ2-GPI αντισώματα)
Αντιπυρηνικά αντισώματα (ANA)
Αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα (aPL)

- Αντιπηκτικό του λύκου (LAC)
- Αντικαρδιολιπιδικά αντισώματα (ACL)

Παράγοντας V Leiden
Προθρομβίνη (Παράγοντας II-G20210A)
MTHFR (Αναγωγή του μεθυλένο-τετραϋδροφυλλικού οξέος)
PAI-1 (Αναστολέας του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου)

Οι συχνότερα χρησιμοποιούμενες μέθοδοι υποβοηθούμενης αναπαραγωγής είναι:

- Η ενδομήτρια σπερματέγχυση (Intrauterine Insemination-IUI)
- Η εξωσωματική γονιμοποίηση και μεταφορά εμβρύων (Fertilization in vitro and Embryo Transfer-FIVET)
- Η ενδοωαριακή έγχυση σπερματοζωαρίου ή μικρογονιμοποίηση (Intracytoplasmic Sperm Injection-ICSI)

3.1. Ενδομήτρια σπερματέγχυση (IUI)

Η IUI στηρίζεται στη λογική ότι αυξάνοντας την ποσότητα των ωαρίων και των σπερματοζωαρίων στην περιοχή της γονιμοποίησης, αυξάνει η πιθανότητα επίτευξης κύησης. Η IUI μπορεί να γίνει είτε σε φυσικό κύκλο είτε να έχει προηγηθεί ήπια ωοθηκική διέγερση. Η επιλογή των ασθενών που υποβάλλονται σε σπερματέγχυση στηρίζεται στην παρουσία φυσιολογικών ή σχεδόν φυσιολογικών παραμέτρων σπέρματος, μιας τουλάχιστον διαβατής σάλπιγγας και στην μη-ύπαρξη ενδομήτριας πάθησης. Η διαδικασία περιλαμβάνει επεξεργασία του σπέρματος, τοποθέτηση του σπέρματος στη μήτρα με καθετήρα και υποστήριξη της ωχρινικής φάσης στη συνέχεια. [11]

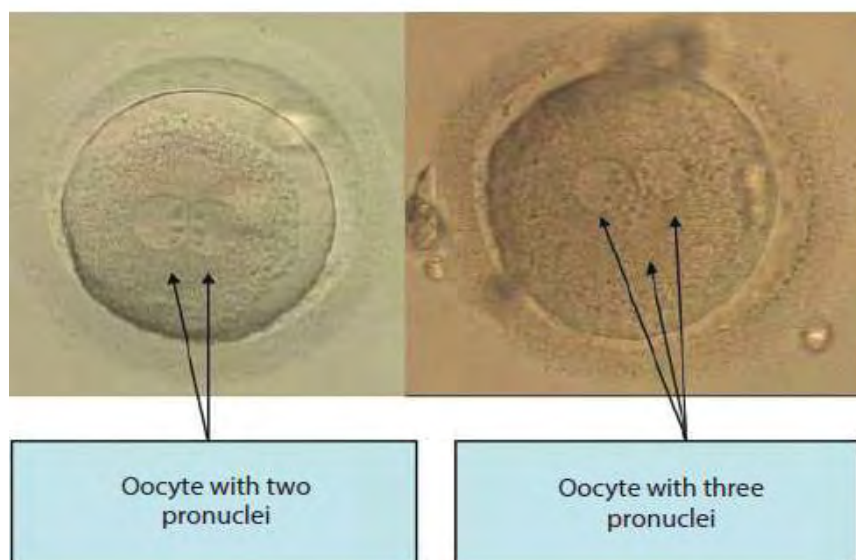
3.2. Εξωσωματική γονιμοποίηση (IVF)

Η IVF περιλαμβάνει διάφορα στάδια, που συχνά αναφέρονται ως «κύκλος θεραπείας», που λαμβάνουν χώρα σε μια περίοδο εβδομάδων: [1-3, 6, 8]

1. Ωοθηκική διέγερση: η γυναίκα λαμβάνει φάρμακα για τη διέγερση των ωοθηκών έτσι ώστε να στρατολογηθούν και να επιλεγθούν περισσότερα του ενός ωάρια (συνήθως σε κάθε εμμηνορρυσιακό κύκλο παράγεται μόνο ένα ωάριο). Συγκεκριμένα πραγματοποιείται χορήγηση γοναδοτροπινών σε συνδυασμό με GnRH αγωνιστές ή ανταγωνιστές. Το πρωτόκολλο που θα επιλεγθεί, εξαστομικεύεται για το κάθε ζευγάρι. Κατά την διέγερση των ωοθηκών γίνεται ουσιαστικά διεύρυνση του παραθύρου της FSH (FSH window).
2. Ωοληψία (Oocyte pick up): ο ιατρός αναρροφά με τη βελόνα ωοληψίας, δια του κόλπου, με την καθοδήγηση υπερήχου και υπό αναισθησία, το ωοθυλακικό υγρό, το οποίο περιέχει το σύμπλεγμα ωαρίου-διάφανης ζώνης.
3. Γονιμοποίηση των ωαρίων: το σπέρμα τοποθετείται με τα ωάρια καλύτερης ποιότητας σε τρυβλία σε ένα ελεγχόμενο περιβάλλον. Στη συνέχεια, τα

γονιμοποιημένα ωάρια τοποθετούνται σε κλίβανο καλλιέργειας και ελέγχονται μετά από 17 ± 1 ώρες, αν έχουν αναπτύξει δύο προπυρήνες. Η ύπαρξη δύο προπυρήνων μεταφράζεται σε επιτυχή γονιμοποίηση του ωαρίου. [9]

4. Εμβρυομεταφορά (Embryo Transfer): από τη 2^η έως την 6^η ημέρα μετά τη γονιμοποίηση το έμβρυο (-α) τοποθετούνται στην ενδομητρική κοιλότητα της γυναίκας μέσω ενός καθετήρα που περνά διαμέσου του τραχήλου.
5. Υποστήριξη ωχρινικής φάσης (Luteal Phase Support-LPS): Λόγω της έντονης φαρμακευτικής διέγερσης που γίνεται στην ωοθυλακική φάση παρατηρείται ωχρινική ανεπάρκεια. Έτσι, συνιστάται χορήγηση προγεστερόνης.



Εικόνα: Αριστερά: Η παρουσία των δύο προπυρήνων μετά την γονιμοποίηση στο IVF Δεξιά: η παρουσία 3 προπυρήνων οδηγεί στην απόρριψη του γονιμοποιημένου ωαρίου (Απο: Markus Montag, 2014, *A practical Guide to selecting gametes and embryos*)

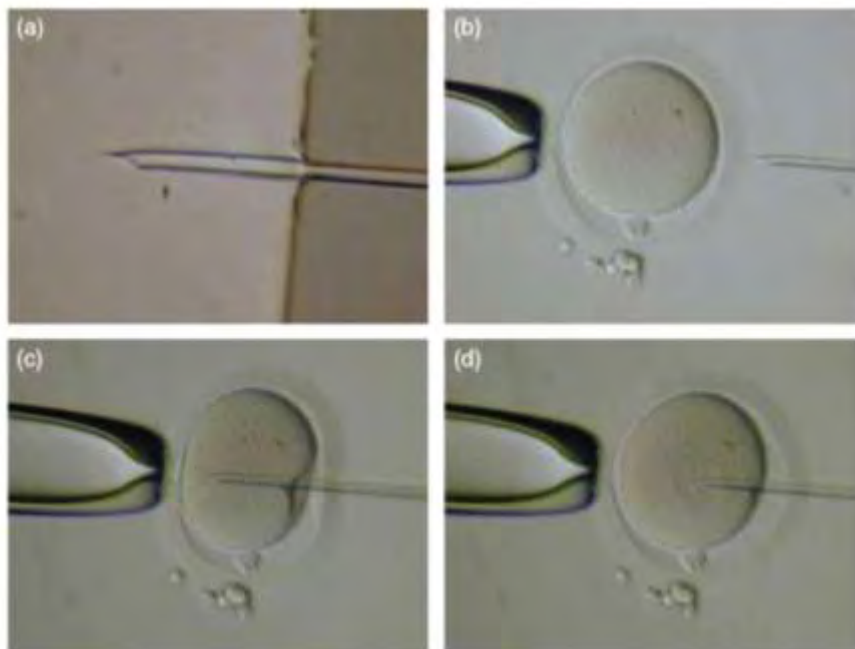
Στις μέρες μας, γίνεται προσπάθεια να υιοθετηθεί από τους κλινικούς η στάση της μεταφοράς ενός μόνο εμβρύου στη μήτρα (single embryo transfer-SET) με στόχο την αποφυγή μιας επιπλοκής της εξωσωματικής γονιμοποίησης, η οποία είναι οι πολύδυμες κύσεις καθώς και των συναφών κινδύνων για προεκλαμψία, σακχαρώδη διαβήτη κύησης, υπέρταση της κύησης, αυτόματες εκτρώσεις, μαιευτικές επιπλοκές, πρόωρο τοκετό και χαμηλό βάρος γέννησης, καθώς και η αύξηση του κόστους της υγειονομικής περίθαλψης. Στα πλαίσια της στρατηγικής μείωσης της συχνότητας των πολύδυμων κύσεων, η Εθνική Αρχή Ιατρικώς Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής καθόρισε τον αριθμό των μεταφερόμενων ωαρίων σε επί μέρους ομάδες υποβοηθούμενων προσώπων, ανάλογα με την ηλικία της γυναίκας και τις ιατρικές ενδείξεις ως εξής (ΦΕΚ 2589/Τεύχος Β/29-9-2014):

- Σε γυναίκες κάτω των 35 ετών, επιτρέπεται να μεταφέρονται ένα ή δύο έμβρυα από δικά τους ωάρια.
- Σε γυναίκες άνω των 35 ετών και κάτω των 40, επιτρέπεται να μεταφέρονται δύο έμβρυα από δικά τους ωάρια στον πρώτο και τον δεύτερο κύκλο και τρία στον τρίτο και κάθε επόμενο κύκλο.
- Σε γυναίκες ηλικίας 40 ετών επιτρέπεται να μεταφέρονται τρία έμβρυα από δικά τους ωάρια.
- Σε γυναίκες ηλικίας άνω των 40 ετών επιτρέπεται να μεταφέρονται τέσσερα έμβρυα από τα δικά τους ωάρια.
- Στην περίπτωση που τα έμβρυα προέρχονται από δωρεά ωαρίων επιτρέπεται να μεταφέρονται μέχρι δύο έμβρυα.

Τέλος, μια κατάσταση που μπορεί να επιπλέξει την διαδικασία της εξωσωματικής γονιμοποίησης είναι η εμφάνιση του συνδρόμου υπερδιέγερσης των ωοθηκών (Ovarian Hyperstimulation Syndrome-OHSS). Τα συμπτώματα περιλαμβάνουν διόγκωση των ωοθηκών, ασκίτη, ναυτία, αύξηση βάρους σώματος. Η βαρύτητα του συνδρόμου ποικίλει και η ελαφρά μορφή του είναι αρκετά συχνή, ενώ η βαριά μορφή του μπορεί να απειλήσει και τη ζωή της γυναίκας. [66]

3.3. Μικρογονιμοποίηση (ICSI)

Η μικρογονιμοποίηση είναι μια τεχνική κατά την οποία ο αρσενικός γαμέτης τοποθετείται εντός του θηλυκού γαμέτη. Ο αρσενικός γαμέτης είναι ένα ώριμο, κινητό (πριν την ακινητοποίηση), καλής μορφολογίας σπερματοζώαριο, ενώ ο θηλυκός γαμέτης είναι ένα ώριμο ΜΠ, με ένα πολικό σωματίο ωάριο. Στην πραγματικότητα, η διαδικασία του ICSI μιμείται τα τελευταία στάδια της γονιμοποίησης. Χρησιμοποιείται για τη θεραπεία κυρίως της ανδρικής υπογονιμότητας, αλλά και σε περιπτώσεις επαναλαμβανόμενων αποτυχιών IVF. Η διαδικασία περιλαμβάνει απογύμνωση του ωαρίου από τα κοκκώδη κύτταρα που το περιβάλλουν (denudation), ακινητοποίηση του σπερματοζωαρίου, αναρρόφηση του ωοπλάσματος και τελικά έγχυση του σπερματοζωαρίου στο ωάριο. Στην εικόνα που ακολουθεί απεικονίζεται η διαδικασία της μικρογονιμοποίησης. [1, 6, 8, 10]



Εικόνα: Διαδικασία ICSI: (a) Το σπερματοζώαριο ακινητοποιείται, τσακίζοντας την ουρά του και αναρροφάται από την ουρά στη βελόνα. (b) Το ωάριο ακινητοποιείται με την πιπέτα συγκράτησης με το πολικό σώματιο στην 6^η ώρα. (c) Η βελόνα εισάγεται στην 3^η ώρα για να αποφευχθεί η μιτωτική άτρακτος. (d) Το σπερματοζώαριο εγχύεται στο κέντρο του ωαρίου και η βελόνα αποσύρεται με ήπιες κινήσεις. (Από Kevin Coward & Dagan Wells, 2013, *Textbook of clinical embryology*)

3.4. Άλλες μέθοδοι ART

Άλλες τεχνικές που χρησιμοποιούνται στην υποβοηθούμενη αναπαραγωγή είναι:

- Η ενδοσαλπινγική μεταφορά γαμετών (Gamete Intrafallopian Transfer-GIFT)
- Η ενδοσαλπινγική μεταφορά ζυγωτών (Zygote Intrafallopian Transfer-ZIFT)
- Η ενδοσαλπινγική μεταφορά εμβρύων (Tubal Embryo Transfer-TET)
- Η υποβοηθούμενη εκκόλαψη (Assisted Hatching)
- Η κατάψυξη γαμετών και εμβρύων
- Η προεμφυτευτική γενετική διάγνωση (Pre-implantation Genetic Diagnosis-PGD)

Στην GIFT τα ωάρια και το σπέρμα μεταφέρονται στην σάλπιγγα. Επειδή η γονιμοποίηση ουσιαστικά συμβαίνει μέσα στο σώμα της γυναίκας η διαδικασία αυτή είναι αποδεκτή σε ορισμένες θρησκείες από ό, τι άλλες τεχνικές. Στην ZIFT το ζυγωτό

μεταφέρεται στη σάλπιγγα, ενώ στην TET το έμβρυο μεταφέρεται δύο μέρες μετά τη γονιμοποίηση (στάδιο 4 κυττάρων). Ένα μειονέκτημα των τεχνικών αυτών είναι ότι η γυναίκα πρέπει να υποβληθεί σε λαπαροσκοπική χειρουργική επέμβαση με γενική αναισθησία για να μεταφερθούν τα κύτταρα στη σάλπιγγα. Οι τεχνικές αυτές τείνουν να εγκαταλειφθούν.

Η υποβοηθούμενη εκκόλαψη (assisted hatching) είναι μια εργαστηριακή διαδικασία για να απελευθερωθεί το γονιμοποιημένο ωάριο από το εξωτερικό του περίβλημα, τη διάφανη ζώνη (zona pellucida-ZP). Η διάνοιξη της ZP γίνεται με τη χρήση χημικού διαλύματος ή μηχανικά ή με τη χρήση λέιζερ. Η μέθοδος αυτή, καθιστά ευκολότερο για την βλαστοκύστη να εμφυτευτεί στο εσωτερικό της μήτρας. Μια ανησυχία είναι η πιθανή αύξηση των πολύδυμων κυήσεων. Μελέτες που έγιναν για την αξία του AH δεν έχουν αποδείξει ότι βελτιώνει τα ποσοστά εγκυμοσύνης.

Η κατάψυξη γαμετών και εμβρύων είναι ευρέως διαδεδομένη στον τομέα της αναπαραγωγικής ιατρικής. Στη διαδικασία της κατάψυξης οι γαμέτες/ έμβρυα προστίθενται σε διαλύματα με ειδικά κρυοπροστατευτικά (κυρίως διαπερατά) διαδοχικά για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα, τοποθετούνται σε ειδικές ράβδους (straws) και μεταφέρονται στο υγρό άζωτο.

Η προεμφυτευτική γενετική διάγνωση είναι μια μέθοδος που λαμβάνει όλο και περισσότερο χώρο στον τομέα των ART. Προϋπόθεση για τη διενέργεια της PGD είναι η χρήση IVF ή ICSI. Η εργαστηριακή διαδικασία αυτή συμβάλλει στη μείωση του κινδύνου μετάδοσης κληρονομικών ασθενειών μέσω της βιοψίας είτε του πολικού σωματίου, είτε 1-2 βλαστομεριδίων, είτε κυττάρων από το στάδιο της βλαστοκύστης και ακολουθεί ανάλυση του γενετικού υλικού με διάφορες τεχνικές (PCR, FISH). Στη συνέχεια ακολουθεί μεταφορά μόνο των υγιών εμβρύων στην ενδομητρική κοιλότητα.

4. Ιός των ανθρωπίνων θηλωμάτων (Human papilloma virus-HPV)

Ο ιός των θηλωμάτων (PV) είναι ένας μικρός, μη επενδυμένος, επιθηλιοτρόπος dsDNA ιός ο οποίος ανήκει στην οικογένεια Papovaviridae που μολύνουν μια ευρεία ποικιλία σπονδυλωτών, συμπεριλαμβανομένου του ανθρώπου. Σύμφωνα με τον Nguyen et al., ο ιός μεταδίδεται με τη σεξουαλική επαφή και η συχνότητα εμφάνισης είναι μεγάλη και για τα 2 φύλα. [12] Το μολυσμένο επιθήλιο πρέπει να έρθει σε επαφή με το βλεννογόνο. Έπειτα θα πρέπει να υπάρξει τριβή και να προκύψουν μικροτραυματισμοί από τους οποίους θα μπορεί να βρει οδό ο ιός για να μολύνει το επιθήλιο. Τα σωματίδια του ιού έχουν διάμετρο 52-55 nm, δεν έχουν μεμβράνη, και τα καψίδια τους έχουν εικοσαεδρική μορφή που αποτελείται από 72 καψομερίδια. Παρουσιάζουν υψηλό βαθμό κυτταρικού τροπισμού και προσβάλλουν το πλακώδες επιθήλιο του κατώτερου γεννητικού συστήματος και των δύο φύλων, το επιθήλιο του στοματοφάρυγγα και το βλεννώδες επιθήλιο του λάρυγγα. Δεν μεταφέρονται σε απομακρυσμένα μέρη του σώματος. Ανάλογα τον τύπο του HPV, προκαλούν το σχηματισμό καλοηθών βλαβών (κονδυλώματα ή θηλώματα), και υπό ορισμένες συνθήκες και σε συνεργασία με

ορισμένους παράγοντες μπορούν να οδηγήσουν σε καρκινογένεση. Η κατανόηση της βιολογίας των papillomavirus είχε εμποδιστεί από την έλλειψη των καλλιιεργειών ιστών στις οποίες θα μπορούσε να πολλαπλασιαστεί ο ιός και την έλλειψη των ζωικών μοντέλων. Αυτό οφείλεται στην εξειδίκευση την οποία εμφανίζουν οι ιοί των ανθρώπινων θηλωμάτων, οι οποίοι μπορούν να μολύνουν μόνο ανθρώπινα κύτταρα. Ο Harald zur Hausen, το 1976 ήταν ο πρώτος που ανέφερε και μελέτησε τον HPV και τη συμμετοχή του στην καρκινογένεση. Η μοριακή κλωνοποίηση των HPV γενωμάτων στις αρχές του 1980 παρείχε την ευκαιρία να μελετηθούν μεμονωμένα τα ιικά γονίδια. Έκτοτε αρκετές επιδημιολογικές και μοριακές κλινικές μελέτες, τον έχουν καθιερώσει ως τον κύριο αιτιολογικό παράγοντα του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας. [13, 26]

4.1. Κατάταξη του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων

Ιστορικά, οι PV έχουν ομαδοποιηθεί μαζί με τον polyomavirus για να σχηματίσουν την οικογένεια Papovaviridae και θεωρούνται ανεξάρτητες υποοικογένειες των Papovaviridae. Το DNA αυτών των δύο υποοικογενειών δεν υβριδίζεται και έχει διαφορετικά αντιγονικά χαρακτηριστικά. Οι Papillomavirus έχουν μια κοινή γενετική δομή που τους διακρίνει από τους polyomavirus. Ένα κυκλικό διπλό DNA ως γονιδιώμα που κωδικοποιεί 8 πλαίσια ανοιχτής ανάγνωσης (open-reading frames, ORFs). Όλοι οι papillomavirus έχουν ένα μη επενδυμένο εικοσαεδρικό καψίδιο.

Οι PV και polyomavirus μπορούν να διακριθούν εύκολα από τις διαφορές στο μέγεθος των ισοματιών (55 nm και 40 nm) και στο γονιδιώμα (8 kb και 5 kb), αντίστοιχα. Πάνω από 200 είδη έχουν αναφερθεί με ένα μεγάλο μέρος αυτών να έχουν πλήρως ταυτοποιηθεί (περισσότεροι από 130). Ο Alba et al., το 2009 αναφέρει τους εξής ξενιστές περιλαμβάνονται: άνθρωπος (>100 τύποι), βοοειδή (6 τύποι), σκύλος (2 τύποι), κουνέλια (2 τύποι) χιμπατζής και άλογο (1 τύπος). Τέλος τύποι του ιού έχουν ανιχνευθεί σε ψάρια και πουλερικά. [13]

4.2. Δομή του ιού

4.2.1. Ιικά συστατικά και φυσικές ιδιότητες

Οι ιοί θηλώματος είναι μικροί, χωρίς περίβλημα, εικοσαεδρικοί DNA ιοί που έχουν διάμετρο 52-55 nm. Τα ιικά σωματίδια αποτελούνται από ένα μόνο δίκλωνο μόριο DNA περίπου 8.000 ζευγών βάσεων (bp) που είναι συνδεδεμένο με τις κυτταρικές ιστόνες και περιέχεται σε ένα πρωτεϊνικό καψίδιο που αποτελείται από 72 πενταμερή τμήματα. Το καψίδιο περιέχει δύο δομικές πρωτεΐνες (όψιμες)– την L1 (55 kDa σε μέγεθος, το 80% του συνόλου των ιικών πρωτεϊνών) και την L2 (70 kDa) – οι οποίες

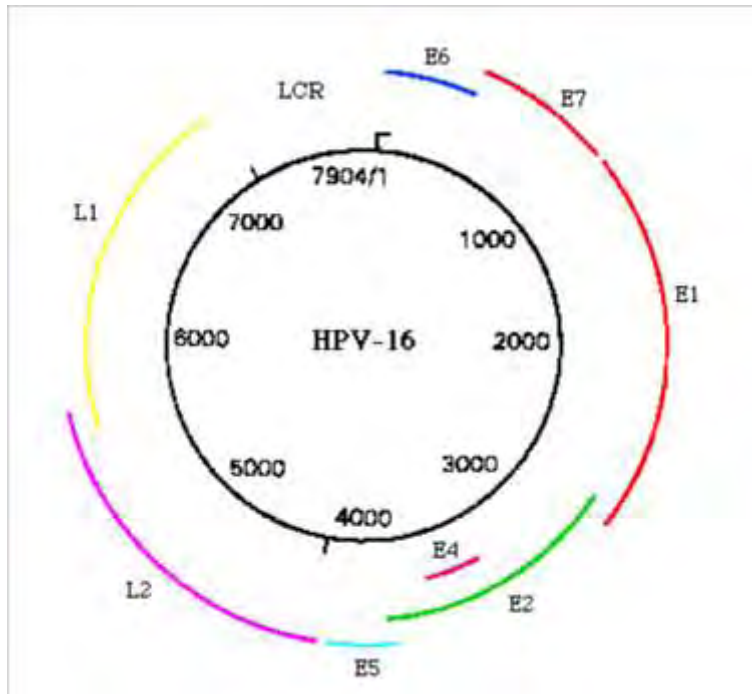
κωδικοποιούνται και οι δύο από τον ίδιο ιό. Τα σωματίδια του ιού (virus-like particles - VLPs) μπορούν να παραχθούν με την έκφραση της L1, μόνο του ή σε συνδυασμό με την L2, σε συστήματα έκφρασης θηλαστικών ή μη θηλαστικών. Το άθικτο ιοσωμάτιο έχει πυκνότητα 1,34 g/mL σε χλωριούχο καΐσιο και ένα συντελεστή καθίζησης (S20, W) των 300 μονάδων. (WHO, 2007) [26]

4.2.2. Γονιδίωμα του HPV, πρωτεΐνες και κύκλος ζωής

Το DNA του HPV είναι κυκλικό, δίκλωνο, και περιέχει περίπου 8.000 ζεύγη βάσεων (bp) με 42% περιεκτικότητα σε GC, όπως έδειξε ο προσδιορισμός της αλληλουχίας του γονιδιώματος. Φέρει 8-10 λειτουργικά γονίδια και το γονιδίωμα του μπορεί να χωριστεί σε τρεις λειτουργικές περιοχές:

- τη μη κωδικοποιούσα περιοχή ή ρυθμιστική περιοχή (Long Control Region-LCR / Upper Regulatory Region-URR) η οποία είναι απαραίτητη για την αντιγραφή και την μεταγραφή του ιικού DNA,
- την πρόιμη περιοχή (E = Early) που κωδικοποιεί τις πρωτεΐνες που είναι απαραίτητες για τον ικό πολλαπλασιασμό (E1-E7) και
- την όψιμη περιοχή (L = Late) που κωδικοποιεί τις δομικές πρωτεΐνες που χρειάζονται για την συναρμολόγηση του ιού.

Η περιοχή LCR αντιστοιχεί στο 15 τοις εκατό του ιικού γονιδιώματος είναι απαραίτητη για τον κύκλο ζωής του ιού και περιέχει τους υποκινητές, που ενεργοποιούν την αντιγραφή και τον έλεγχο της μεταγραφής. Αυτή η περιοχή διαιρείται σε δύο κύριους τομείς: τον RE2, που εξαρτάται και ρυθμίζεται από την παρουσία της πρωτεΐνης E2 και όπου βρίσκεται ο πρώιμος υποκινητής, η θέση έναρξης αντιγραφής του DNA του ιού και ο τομέας CE (cellular enhancer), ένας ισχυρός ενισχυτής της μεταγραφής που εξαρτάται αποκλειστικά από τους μεταγραφικούς παράγοντες. Ο πρώιμος υποκινητής βρίσκεται στο πεδίο RE2, από το οποίο τα ογκογονίδια E6 και E7 μεταγράφονται. Στον τομέα αυτό, η θέση της έναρξης αντιγραφής του DNA του ιού, εξαρτάται από την παρουσία της ιικής πρωτεΐνης E1 και E2. [13]



Εικόνα: Γενετικός χάρτης του ανθρώπινου ιού των θηλωμάτων τύπου 16. (Από Alba A. *et al.*, 2009.)

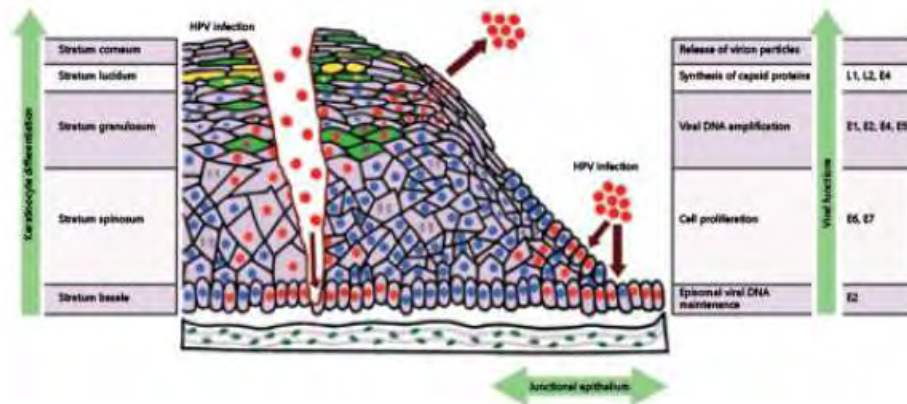
Η ιστο-ειδικότητα του HPV βρίσκεται στον τομέα CE, όπου η κοινή συμμετοχή των κυτταρικών παραγόντων προάγουν την δραστηριότητα του πρώιμου υποκινητή αποκλειστικά σε κύτταρα επιθηλιακής προέλευσης. Η πρώιμη περιοχή (E=Early) αντιπροσωπεύει το 45 τοις εκατό του γονιδιώματος και περιέχει 7 αλληλουχίες ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης (Open Reading Frames - ORFs), οι οποίες κωδικοποιούν για τις μη δομικές πρωτεΐνες E1, E2, E3, E4, E5, E6 και E7. Οι πρωτεΐνες αυτές εκφράζονται νωρίς στον κύκλο ζωής του ιού και συγκεκριμένα στα βασικά, παραβασικά και ενδιάμεσα κύτταρα. Εμπλέκονται στην αντιγραφή του DNA και προωθούν την κυτταρική διαίρεση του κυττάρου-ξενιστή: η E1 (38-65 kDa) ελέγχει την αντιγραφή του ιικού γονιδιώματος, μέσω της κωδικοποίησης ενός διαμορφωτή (E1-M), και ενός παράγοντα αναδιπλασιασμού (E1-R). Πιστεύεται ότι η πρωτεΐνη E2 (48 kDa) διαδραματίζει έναν πολύ σημαντικό ρόλο στην αντιγραφή του ιικού DNA και στον έλεγχο της γονιδιακής μεταγραφής. Κωδικοποιεί ένα κατασταλακτικό παράγοντα της μεταγραφής (E2-TR) που αναστέλλει την μεταγραφή του P97 υποκινητή, η οποία ελέγχει τη σύνθεση του E6 και E7. Ο ρόλος καθώς και το μοριακό βάρος της E3 πρωτεΐνης παραμένουν προς το παρόν άγνωστα. Η E4 (10-44 kDa) παράγει πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην ωρίμανση των ιικών σωματιδίων. Πιστεύεται ότι αυτή η πρωτεΐνη προκαλεί την αποσταθεροποίηση του δικτύου κυτοκερατινών. Αυτό το γονίδιο χάνεται όταν ενσωματώνεται το ιικό DNA στο γονιδίωμα του κυττάρου. Η E5 (14 kDa) παράγει μια μικρή πρωτεΐνη 44 αμινοξέων. Απώλεια ή μετάλλαξη αυτής της περιοχής μπλοκάρει την αντιγραφή του DNA και ευνοεί την ενσωμάτωση του DNA στο χρωμόσωμα. Οι E6 (16-18 kDa) και E7 (10 kDa)

περιοχές παράγουν δύο μετασηματικές ογκοπρωτεΐνες οι οποίες σταματούν τη ρύθμιση για φυσιολογική διαίρεση του κυττάρου-ξενιστή και επιδρούν στους ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου, κυρίως στους p105Rb και p53, αντίστοιχα. Η όψιμη περιοχή (L) αντιστοιχεί στο 40 τοις εκατό του γονιδιώματος και περιέχει δύο γονίδια που κωδικοποιούν τις δομικές πρωτεΐνες του καψίδιου L1 και L2, οι οποίες εκφράζονται όψιμα στον κύκλο ζωής του ιού, δηλαδή κατά το πακετάρισμα του ιικού γονιδιώματος και την απελευθέρωση το ιού και μόνο στα επιφανειακά κύτταρα (McIntosh et al., 2008). Η L1, παράγει μια πρωτεΐνη 54.000 d η οποία παράγεται σε μεγαλύτερη ποσότητα και η οποία είναι εξαιρετικά διατηρημένη μεταξύ των διαφόρων τύπων του HPV. Από την άλλη πλευρά η L2 παράγει μια πρωτεΐνη ειδική για κάθε τύπο ιού, η οποία διευκολύνει τη μεταφορά του γονιδιώματος του ιού στον πυρήνα του κυττάρου-ξενιστή και το οδηγεί στη μεταγραφικά ενεργή περιοχή του τομέα 10 (Day PM, 2004). Σε μια έρευνα του Bossis et al., το 2005 φάνηκε ότι η πρωτεΐνη L2 αλληλεπιδρά με μία πρωτεΐνη του ενδοπλασματικού δικτύου, την tSNARE συνταξίνη 18, η οποία θεωρείται σημαντική για τη μεταφορά του γονιδιώματος στον πυρήνα.

Οι papillomavirus είναι ιδιαίτερα επιθηλιοτρόποι. Συγκεκριμένα καθιερώνουν μια μόλυνση μόνο μέσα σε στρωματικά επιθήλια του δέρματος, σε κύτταρα του πρωκτού και του τραχήλου της μήτρας και στην στοματική κοιλότητα. Ο κύκλος ζωής των ιών είναι συνδεδεμένος με την διαφοροποίηση των μολυσμένων επιθηλιακών κυττάρων. Ο κύκλος ζωής θεωρείται ότι ξεκινά με την μόλυνση των βασικών επιθηλιακών κυττάρων, κυρίως σε σημεία τραυματισμού. Τα βασικά κύτταρα περιλαμβάνουν τα πολλαπλασιαζόμενα κυτταρικά συστατικά των στρωματοποιημένων επιθηλίων, στα οποία είναι εγκατεστημένο το ιικό γονιδίωμα όταν ένας χαμηλός αριθμός αντιγράφων, πυρηνικών πλασμιδίων και πρώιμων γονιδίων εκφράζονται κατά προτίμηση, ακόμα και σε χαμηλά επίπεδα. Η ικανότητα των HPV να εγκαθιδρύουν το γονιδίωμα τους στα βασικά κύτταρα βασίζεται στα γονίδια E1, E2, E6 και σε μερικές περιπτώσεις στο E7. [13, 26]

Όσο αφορά τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας που οφείλεται στον HPV, ο κύκλος ζωής του ιού διαταράσσεται με δύο βασικούς τρόπους. Πρώτον, οι προοδευτικές ιστοπαθολογικές μεταβολές που προκύπτουν στο τραχηλικό επιθήλιο περιλαμβάνουν την απώλεια της τελικής διαφοροποίησης. Αυτή η αναστολή της διαδικασίας διαφοροποίησης οδηγεί σε μια κυτταρική κατάσταση που δεν μπορεί να υποστηρίξει τον πλήρη ιικό κύκλο ζωής. Δεύτερον, το κυκλικό DNA του ιού, το οποίο βρίσκεται, κανονικά, ως ένα πυρηνικό πλασμίδιο, συχνά ενσωματώνεται στο γονιδίωμα του ξενιστή και με αυτόν τον τρόπο διαταράσσεται και αναδιπλασιάζεται ελαττωματικά. Το γεγονός της ενσωμάτωσης του ιού είναι, είτε η ίδια η ύπαρξη των ιικών πρωτεϊνών, είτε τυχαία γεγονότα ανασυνδυασμού τα οποία παραμένουν ασαφή. Ωστόσο, δύο συνέπειες της ενσωμάτωσης μπορεί να είναι η επιλεκτική ρύθμιση των ιικών ογκογονιδίων E6 και E7 και ένα επιλεκτικό πλεονέκτημα ανάπτυξης στα κύτταρα που φιλοξενούν το ιικό γονιδίωμα ως ένα πυρηνικό πλασμίδιο. Τα γεγονότα της ενσωμάτωσης που βρίσκονται στον τραχηλικό καρκίνο οδηγούν στην επιλεκτική έκφραση του E6 και E7 το οποίο είναι ένα σήμα κατατεθέν των καρκίνων του τραχήλου. Αν η ιική ενσωμάτωση μεταβάλλει την έκφραση των κυτταρικών γονιδίων με οποιοδήποτε τρόπο παραμένει ασαφής. Σε μια πρόσφατη ανασκόπηση, περισσότεροι από 190 αναφερθέντες γενετικοί τόποι

ενσωμάτωσης αναλύθηκαν σε σχέση με τις αλλαγές στην ιική δομή. Τα αποτελέσματα επιβεβαίωσαν ότι οι περιοχές ενσωμάτωσης του HPV είναι τυχαία κατανομημένες σε ολόκληρο το γονιδίωμα με μια σαφή προτίμηση για εύθραυστα περιοχές. Δεν υπήρξε καμία ένδειξη για στοχευμένη διάρρηξη ή λειτουργική μεταβολή των κυτταρικών γονιδίων από τις ενσωματωμένες ικές αλληλουχίες. [26]



Εικόνα: Τα γεγονότα που ακολουθούν τη μόλυνση από τον HPV-16 (κόκκινα συσσωματώματα) (Από Nguyen et al., 2014)

4.3. Ταξινόμηση των HPV ιών

Οι HPV που απομονώνονται συνήθως περιγράφονται ως «τύποι», και οι τύποι έχουν βρεθεί σε όλα τα καλά μελετημένα θηλαστικά και πτηνά, ίσως με την πιθανή εξαίρεση των ποντικών εργαστηρίων. Στον μοναδικό ξενιστή που έχει εξεταστεί εκτενώς, ο άνθρωπος, έχουν περιγραφεί περισσότεροι από 100 τύποι βασιζόμενοι στην απομόνωση του πλήρους γενώματος. Πολλοί από αυτούς τους HPV τύπους έχουν δείχθει ότι είναι παρόντες πανταχού παγκοσμίως.

Τα τελευταία 30 χρόνια, η ταξινόμηση των papillomavirus, η οποία βασίστηκε αρχικά σε γενωμικούς υβριδισμούς και πρότυπα περιορισμού, έχει αλλάξει σε ένα σύστημα που βασίζεται σε φυλογενετικούς αλγόριθμους που συγκρίνει είτε ολόκληρες αλληλουχίες γονιδιώματος του ιού είτε υπογονιδιωμικά τμήματα. Αυτή η επιστημονική πρόοδος έχει οδηγήσει σε βελτίωση, αλλά ποτέ σε αντιφάσεις των προηγούμενων ταξινομήσεων. Υπάρχουν επίσης ισχυρές ενδείξεις ότι τα γονιδιώματα θηλωμάτων είναι πολύ στατικά, και οι αλλαγές της ακολουθίας με μετάλλαξη ή ανασυνδυασμό είναι πολύ σπάνια γεγονότα. Οι μεταλλακτικές αλλαγές προφανώς συμβαίνουν με συχνότητες οι οποίες δεν διαφέρουν σημαντικά από εκείνες των γονιδιωμάτων DNA των μολυσμένων οργανισμών ξενιστών. Οι ιοί των θηλωμάτων αρχικά ομαδοποιήθηκαν με τους polyomavirus σε μία οικογένεια, την Papovaviridae. Αυτό βασίστηκε στα παρόμοια, χωρίς περίβλημα καψίδια και τα γονιδιώματα που ήταν κυκλικά δίκλιωνα DNA. Επειδή αργότερα αναγνωρίστηκε ότι οι δύο ομάδες των ιών έχουν διαφορετικά μεγέθη

γονιδιώματος, εντελώς διαφορετικές οργανώσεις γονιδιώματος και δεν έχουν ομοιότητες σε μεγάλες ακολουθίες νουκλεοτιδίων ή αμινοξέων, έχουν πλέον αναγνωριστεί επισήμως από τη Διεθνή Επιτροπή για την Ταξινόμηση των ιών (International Committee on the Taxonomy of Viruses-ICTV) ως δύο ξεχωριστές οικογένειες – την Papillomaviridae και την Polyomaviridae. [20]

Η L1 ORF περιοχή είναι η πιο καλά διατηρημένη περιοχή μέσα στο γονιδίωμα και έτσι χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση νέων τύπων papillomavirus τα τελευταία 15 χρόνια. Ένας νέος HPV αναγνωρίζεται αν ολόκληρο το γονιδίωμα κλωνοποιείται και η ακολουθία του DNA της L1 ORF διαφέρει περισσότερο από 10% από το πλησιέστερο γνωστό τύπο. Διαφορές στην ομολογία μεταξύ του 2% και 10% ορίζουν ένα υποείδος και διαφορές μικρότερες του 2% ορίζουν μια παραλλαγή. Μερικές εκατοντάδες υποθετικοί νέοι τύποι HPV έχουν ταυτοποιηθεί με την έλευση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR). Ενίσχυση των διατηρημένων περιοχών, ως επί το πλείστον εντός της L1 ORF, έχει χρησιμοποιηθεί. Αυτά τα επιμέρους θραύσματα συνήθως επισημαίνονται χρησιμοποιώντας τα αρχικά ενός ατόμου ή εργαστηρίου, που ακολουθείται από έναν εργαστηριακό αριθμό. Ένας αριθμός αυτών των βραχέων θραυσμάτων αποτελούν μερικές αλληλουχίες αργότερα καθορισμένων τύπων HPV. (de Villiers et al., 2004) [20]

Οι HPV ταξινομούνται σε κατηγορίες με βάση τις διαφορές στην αλληλουχία του γονιδίου L1.

<60% ομολογία μεταξύ των διαφόρων HPV

60-70% ομολογία μεταξύ των ειδών HPV

71-89% ομολογία μεταξύ των τύπων HPV

90-98% ομολογία μεταξύ των υποτύπων ενός τύπου HPV

>98% ομολογία μεταξύ των παραλλαγών ενός υποτύπου HPV

4.4. Κατάταξη των HPV

Η κατάταξη των HPV σύμφωνα με τον de Villiers et al., το 2004 έγινε με βάση την L1 ORF, 96 τύπων ιών ανθρωπίνων θηλωμάτων και 22 τύπων ιών θηλωμάτων των ζώων. Τα συμπλέγματα των τύπων HPV υψηλότερης τάξης έχουν κληθεί «supergroup» ή «κύριοι κλάδοι». Για αυτές τις τάξεις έχει εισαχθεί ο όρος «γένος». Διαφορετικά γένη έχουν κοινή λιγότερο από το 60% της νουκλεοτιδικής ακολουθίας της L1 ORF. Τα συμπλέγματα των τύπων HPV χαμηλότερης τάξης έχουν κληθεί «ομάδα», «υποομάδα» ή «ελάσσων κλάδος». Για αυτές τις τάξεις έχει εισαχθεί ο όρος «είδος». Είδη μέσα στα γένη μοιράζονται περίπου 60% και 70% της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας. Οι συνηθισμένοι τύποι HPV μέσα σε ένα είδος μοιράζονται περίπου 71% και 89% της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας της L1 ORF. [20]

Πίνακας: Κατάταξη των HPV [20, 21]

Γένος	Είδος	Τύπος	Άλλοι τύποι HPV
α-ΡV	1	HPV 32	HPV 42
	2	HPV 10	HPV 3 HPV 28 HPV 29 HPV 78 HPV 94
	3	HPV 61	HPV 72 HPV 81 HPV 83 HPV 84 candHPV 62 candHPV 86 candHPV 87 candHPV 89
	4	HPV 2	HPV 27 HPV 57
	5	HPV 26	HPV 51 HPV 69 HPV 82
	6	HPV 53	HPV 30 HPV 56 HPV 66
	7	HPV 18	HPV 39 HPV 45 HPV 59 HPV 68 HPV 70 candHPV 85
	8	HPV 7	HPV 40 HPV 43 candHPV 91
	9	HPV 16	HPV 31 HPV 33 HPV 35 HPV 52 HPV 58 HPV 67
	10	HPV 6	HPV 11 HPV 13 HPV 44 HPV 74

			PcPV
	11	HPV 34	-
	12	RhPV 1	-
	13	HPV 54	-
	14	candHPV 90	-
	15	HPV 71	-
β-PV	1	HPV 5	HPV 8 HPV 12 HPV 14 HPV 19 HPV 20 HPV 21 HPV 25 HPV 36 HPV 47 HPV 93
	2	HPV 9	HPV 15 HPV 17 HPV 22 HPV 23 HPV 37 HPV 38 HPV 80
	3	HPV 49	HPV 75 HPV 76
	4	HPVcand 92	-
	5	HPVcand 96	-
	γ-PV	1	HPV 4
2		HPV 48	-
3		HPV 50	-
4		HPV 60	-
5		HPV 88	-
δ-PV	1	European elk PV (EPPV)	Reindeer PV (RPV)
	2	Deer PV (DPV)	-
	3	Ovine PV 1 (OvPV1)	OvPV2
	4	Bovine PV 1 (BPV 1)	BPV 2
ε-PV	1	Bovine PV type 5 (BPV5)	-
ζ-PV	1	<i>Equus caballus</i> PV (EcPV)	-
η-PV	1	<i>Fringilla coelebs</i> PV (FcPV)	-
θ-PV	1	<i>Psittacus erithacus timneh</i> PV (PePC)	-
ι-PV	1	<i>Mastomys natalensis</i> PV	-

		(MnPV)	
κ-PV	1	Cottontail rabbit PV (CRPV)	-
	2	Rabbit oral PV (ROPV)	-
λ-PV	1	Canine oral PV (COPV)	-
	2	<i>Felis domesticus</i> PV (FdPV)	-
μ-PV	1	HPV 1	-
	2	HPV 63	-
ν-PV	1	HPV 41	-
ξ-PV	1	BPV 3	-
ο-PV	1	<i>Phocoena spinipinnis</i> PV (PsPV)	-
π-PV	1	Hamster oral PV (HaOPV)	-

4.5. Βιολογικά χαρακτηριστικά των PV

Πίνακας: Βιολογικά χαρακτηριστικά των PV ιών [20, 21]

Γένος	Βιολογικά χαρακτηριστικά
α-PV	Βλάβες του βλεννογόνου και του δέρματος σε ανθρώπους και πρωτεύοντα. Η ταξινόμηση σε υψηλού και χαμηλού κινδύνου βασίζεται στα μοριακά βιολογικά δεδομένα για τους ιούς υψηλού κινδύνου οι οποίοι αθανατοποιούν ανθρώπινα κερατινοκύτταρα (προ- και κακοήθεις βλάβες), ενώ οι ιοί χαμηλού κινδύνου (καλοήθεις βλάβες) δεν το κάνουν. Οι πρόσφατες συλλογές των επιδημιολογικών δεδομένων καταδεικνύουν πιο συχνή σύνδεση των συγκεκριμένων ειδών, όπως οι τύποι υψηλού κινδύνου.
β-PV	Δερματικές βλάβες στον άνθρωπο. Λοιμώξεις υπάρχουν σε λανθάνουσα μορφή στο γενικό πληθυσμό και ενεργοποιούνται υπό συνθήκες ανοσοκαταστολής. Επίσης είναι γνωστοί ως EV-HPV το οποίο οφείλεται στην παρουσία τους στην νόσο Ακροχορδονοειδή επιδερμοδυσπλασία (Epidermodysplasia verruciformis-EV)
γ-PV	Δερματικές βλάβες στον άνθρωπο. Ιστολογικά διακρίνονται από την ενδοκυτταροπλασματική ένταξη που είναι χαρακτηριστική για αυτό τον τύπο ιού.
δ-PV	Βλάβες σε σπληφόρα. Έχουν ιδιότητες μετασχηματισμού. Προκαλούν ινοθηλώματα στη μετάδοση στους αντίστοιχους ξενιστές. Το trans-είδος συναντάται επίσης στην επαγωγή σαρκοειδωμάτων.
ε-PV	Δερματικές βλάβες σε βοειδή.
ζ-PV	Δερματικές βλάβες σε άλογα.
η-PV	Δερματικές βλάβες σε πτηνά.

θ-PV	Δερματικές βλάβες σε πτηνά.
ι-PV	Δερματικές βλάβες σε τρωκτικά.
κ-PV	Βλάβες στο δέρμα και στους βλεννογόνους των κουνελιών.
λ-PV	Καλοήθεις βλάβες στο δέρμα και στους βλεννογόνους στα ζώα.
μ-PV	Δερματικές βλάβες στον άνθρωπο. Ιστολογικά διακρίνονται από την ενδοκυτταροπλασματική ένταξη που είναι χαρακτηριστική για αυτό τον τύπο ιού.
ν-PV	Καλοήθεις και κακοήθεις δερματικές βλάβες στον άνθρωπο.
ξ-PV	Βλάβες στο δέρμα και στους βλεννογόνους. Προκαλεί θηλώματα στον ξενιστή (βοειδή).
ο-PV	Απομονώθηκε από κυτώδη.
π-PV	Βλάβες στους βλεννογόνους των χάμστερ.

4.6. Λειτουργία των ιικών πρωτεϊνών

Η περιγραφή των πρωτεϊνικών λειτουργιών αναφέρεται στις πρωτεΐνες του HPV. Όταν πρωτεΐνες από διαφορετικούς papillomavirus έχουν ένα κοινό χαρακτηριστικό, χαρακτηρίζονται με το γενικό τίτλο «papillomavirus».

4.6.1. E1

Η πιο καλά διατηρημένη πρωτεΐνη των HPV είναι η E1. Η ιική πρωτεΐνη E1 με μέγεθος 73-kDa απαιτείται για την αντιγραφή του ιού, προσδένεται σε μια ειδική αλληλουχία DNA (E1 θέση πρόσδεσης, E1BS) στον ικό αναδιπλασιασμό και συναρμολογεί εξαμερή συμπλέγματα με τη βοήθεια μιας δεύτερης ιικής πρωτεΐνης, E2. Εκφράζεται σε μικρές ποσότητες στα θετικά ως προς HPV κύτταρα. Οι E1 πρωτεΐνες λειτουργούν τόσο όσο ATPάσες όσο ως και 3'-5' ελικάσες.

Το καρβοξυλικό τελικό μισό έχει δράση ελικάσης τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATPάση) και είναι αναγκαίο και επαρκές για ολιγομερισμό. Ένα τμήμα περίπου 160 αμινοξέων ανοδικά της περιοχής της ATPάσης/ελικάσης (από το κατάλοιπο 190 έως το κατάλοιπο 350) είναι ο τομέας δέσμευσης DNA. Ένα τμήμα περίπου 50 αμινοξέων εντός του αμινο-τελικού άκρου της E1 δρα ως ρυθμιστική περιοχή εντοπισμού (Localization Regulatory Region-LRR), που περιέχει μια δεσπόζουσα αλληλουχία πυρηνικής εξαγωγής (Nuclear Export Sequence-NES) και ένα σήμα πυρηνικού εντοπισμού (Nuclear Localization Signal-NLS), δύο εκ των οποίων ρυθμίζονται με φωσφορυλίωση.

Από την στιγμή που θα συνδεθεί η E1 με την E2 δημιουργούν εξαμερή που έχουν μεγάλη συνάφεια για το DNA. Όπως και σε άλλες ελικάσες το ικό DNA περνά διαμέσου

του κέντρου του εξαμερούς αυτού δαχτυλιδιού. Αυτά τα E1 σύμπλοκα μπορούν να ξεδιπλώνουν το υπερελικωμένο DNA με την βοήθεια τσαπερονών. Η E1 επίσης συνδέεται με την DNA πολυμεράση άλφα και βοηθά στην στρατολόγηση των συμπλόκων απαραίτητων για την αντιγραφή στο σημείο έναρξης της αντιγραφής. Η κρυσταλλογραφία έδειξε ότι το τμήμα σύνδεσης με το DNA έχει μια α-έλικα και έναν βρόγχο που είναι απαραίτητα για την αναγνώριση του DNA. [23]

Σύμφωνα με τον WHO, η E1 αλληλεπιδρά επίσης με την πρωτεΐνη αντιγραφής A (Replication Protein A-RPA), η οποία έχει ως αποτέλεσμα την ταχεία σταθεροποίηση του μονόκλωνου DNA που παράγεται από δραστηκότητα ελικάσης E1. Η αλληλεπίδραση με την H1 ιστόνη μπορεί να παίζει ένα ρόλο στην ική χρωματίνη αφαιρώντας την H1 ιστόνη πριν το ξετύλιγμα του DNA.

4.6.2. E2

Το γονίδιο E2 κωδικοποιεί ένα προϊόν περίπου 40-45 kDa, ανάλογα με τον ιό του θηλώματος. Η E2 δρα ως διμερής. Το καρβοξυτελικό τμήμα κωδικοποιεί ένα τμήμα σύνδεσης DNA το οποίο περιέχει ένα διμερές β-βαρέλι το οποίο λυγίζει το DNA. Το αμινοτελικό άκρο περιέχει μια ενεργοποιητική περιοχή, καθώς το άκρο αυτό αλληλεπιδρά με την E1. Η κρυσταλλογραφία έχει δείξει ότι το τμήμα αυτό αποτελείται από μια α-έλικα πλούσια σε γλουταμίνη η οποία πακετάρεται μέσα σε ένα β-φύλλο. [23]

Η πλειονότητα των μελετών έχουν καταδείξει ότι η έκφραση της πρωτεΐνης E2 σε διάφορα επίπεδα σε ανθρώπινα κύτταρα έχει ως αποτέλεσμα την καταστολή της μεταγραφής από τον υποκινητή ιού. Σε μια μελέτη, τα χαμηλά επίπεδα της E2 του HPV 16 έχει αποδειχθεί ότι ενεργοποιούν την μεταγραφή σε πρωτογενή ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα, αλλά η καταστολή εμφανίστηκε σε υψηλά επίπεδα. Ένας από τους μηχανισμούς που προτείνονται για την καταστολή από την E2 είναι ότι δεσμεύεται με το E2-BS δίπλα στο TATA box του LCR και έτσι παρεμβαίνει στερεοχημικώς με την πρόσδεση της πρωτεΐνης δέσμευσης TATA (TATA-binding protein-TBP). Για να υποστηριχθεί αυτή η υπόθεση, η μετάλλαξη του E2-BS πλησίον του TATA αναστέλλει μερικώς την καταστολή της μεταγραφής από την E2. [26]

Σε χαμηλές συγκεντρώσεις, η E2 ενεργοποιεί την πρόωμη γονιδιακή έκφραση, ενώ σε υψηλές συγκεντρώσεις την καταστέλλει παρεμποδίζοντας την δέσμευση των παραγόντων μεταγραφής. Αυτή η ρύθμιση της ικής έκφρασης συμβάλλει στην ρύθμιση των αριθμών των μεταγραφών στα αδιαφοροποίητα κύτταρα. Στην διαφοροποίηση, υπάρχει ένα μοριακός διακόπτης στον υποκινητή που δεν αντικαθίσταται από την E2, το οποίο οδηγεί στην αυξημένη έκφραση του E1 και E2. [23]

Η E2 διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στον διαχωρισμό των πρόσφατα αναπαραχθέντων ικών DNA από τα μιτωτικά χρωμοσώματα, η οποία εξασφαλίζει μια παρόμοια κατανομή των ικών γονιδιωμάτων στα θυγατρικά κύτταρα. Κατά τη διάρκεια της μίτωσης, η E2 συνδέεται με το DNA του ιού και με τα κυτταρικά κεντροσώματα και την μιτωτική άτρακτο μέσω του καρβοξυτελικού άκρου. Η συσχέτιση αυτή πιστεύεται ότι είναι υπεύθυνη για την στεγανοποίηση του ικού γονιδιώματος στα θυγατρικά κύτταρα. [26]

Η E2 αλληλεπιδρά με την ελάσσονα ική δομική πρωτεΐνη L2, η οποία οδηγεί σε αναστολή της ενεργοποίησης αλλά όχι την λειτουργία αντιγραφής της E2 για τις πρωτεΐνες των BPV και HPV. Αυτό μπορεί να είναι ένας μηχανισμός με τον οποίο, στα τελευταία στάδια του ικού κύκλου ζωής, οι λειτουργίες της E2 αποσύρονται από την μεταγραφή και κατευθύνεται προς την ενίσχυση του ικού DNA για να διευκολυνθεί την παραγωγή νέων ικών απογόνων. [26]

4.6.3. E4 και E5

Οι E4 και E5 ORF εκφράζονται κατά την διάρκεια των πρώτων σταδίων της ζωής του ιού αλλά μόνο ως το τρίτο και τέταρτο ORF στα πολυκιστρονικά μετάγραφα. Στα επιθηλιακά διαφοροποιημένα κύτταρα, οι E4 και E5 εκφράζονται ως το πρώτο και δεύτερο μετάγραφο. Είναι πιθανό ότι αυτές οι πρωτεΐνες συντίθενται στα μετέπειτα στάδια της ικής ζωής με την E4 να είναι η πιο άφθονα εκφραζόμενη από όλες τις πρωτεΐνες του HPV. [23]

Το γονίδιο E4 επικαλύπτεται από το E2 αλλά μεταγράφεται από δύο διαφορετικά mRNA κατά την διαφοροποίηση. Το ένα κωδικοποιεί την E1^{E4} και τελειώνει σε μια πολύ-A περιοχή, ενώ το δεύτερο κωδικοποιεί τόσο την E1^{E4} όσο και την L1 και τελειώνει σε μια πολύ-A περιοχή. Η πρωτεΐνη E4 είναι ετερογενής, είναι ένα προϊόν σύντηξης με μία αλληλουχία 5 αμινοξέων από το N-άκρο της E1 (E1^{E4}). Το ORF του E4 δεν διαθέτει το κωδικόνιο έναρξης AUG και χρησιμοποιεί αυτό της E1. Όλοι οι HPV εκφράζουν E1^{E4} πρωτεΐνες στα τελευταία στάδια του κύκλου ζωής τους αλλά έχουν ελάχιστη ομολογία. Ωστόσο, αν και η πρωτεΐνη ανιχνεύεται σε κύτταρα στα οποία η αντιγραφή ιικού DNA είναι συνεχής και σε υψηλά διαφοροποιημένα κύτταρα που εκφράζουν τα γονίδια του καψιδίου και συνθέτουν νέα ισωμάτια, η E4 δεν βρέθηκε σε ισωμάτια. Είναι αδρανής μέσα στις αλληλουχίες στο C άκρο, και αυτά τα συσσωματώματα βρέθηκαν τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και τον πυρήνα του μολυσμένου κυττάρου. [22, 23, 26]

Οι λειτουργίες της πρωτεΐνης E4 φαίνεται να ρυθμίζονται εν μέρει από μετα-μεταφραστική τροποποίηση - ολιγομερισμό, φωσφορυλίωση και πρωτεολυτική διάσπαση

- όπως στην περίπτωση των παρεμβολών της E4 στον κυτταρικό κύκλο. Οι λειτουργίες της E4 έχουν προταθεί να παίζουν ένα ρόλο στη διευκόλυνση και την υποστήριξη του ιικού γονιδιώματος, την ρύθμιση της έκφρασης των όψιμων γονιδίων, τον έλεγχο της ωρίμανσης του ιού και την μεσολάβηση της απελευθέρωσης ιού. Η πρωτεΐνη E4 δεν παίζει κανένα ρόλο στον μετασχηματισμό των κυττάρων όπως έχει αποδειχθεί, και η έκφρασή της προοδευτικά χάνεται από τις νεοπλασματικές αλλοιώσεις κατά τη διάρκεια της εξέλιξης τους για τον καρκίνο. [26]

Δεν έχουν όλοι οι ιοί HPV μια E5 ORF. Η E5 ORF και η πρωτεΐνη που κωδικοποιεί ποικίλουν σε μήκος μεταξύ των ιών του θηλώματος. Η υδρόφοβη φύση της πρωτεΐνης είναι συντηρημένη, αλλά όχι η πρωτοταγής αλληλουχία των αμινοξέων. Αυτή η πρωτεΐνη εδράζεται στην ενδοκυτταρικές μεμβράνες και στο σύμπλεγμα Golgi αλλά σε ορισμένες περιπτώσεις έχουν βρεθεί και στις κυτταρικές μεμβράνες. Η E5 από τους HPV θεωρείται ότι είναι μία πρωτεΐνη μετασχηματισμού διότι μετατρέπει τους καλλιεργημένους ινοβλάστες ποντικού και σε κερατινοκύτταρα, ενισχύει το δυναμικό αθανатоποίησης των E6 και E7 και, σε συνεργασία με την E7, διεγείρει τον πολλαπλασιασμό των πρωτογενών κυττάρων ποντικού. Οι E5 του BPV και του HPV 16 αναστέλλουν την ενδοκυτταρική επικοινωνία των χασμοσυνδέσμων και αποσύρουν τον ομοιοστατικό έλεγχο των μετασχηματισμένων κυττάρων από τα γειτονικά τους κύτταρα. Η E5 του HPV 16 μπορεί επίσης να αναστείλει την απόπτωση που επάγεται από τον Fas-συνδέτη και τον παράγοντα νέκρωσης όγκων που σχετίζονται με τον συνδέτη που επάγει την απόπτωση (Tumour necrosis factor Apoptosis-Inducing Ligand-TRAIL) και με το υπεριώδες φως (UV). Έχει υποταθεί ότι η E5 συνδέεται με τον υποδοχέα του επιδερμικού παραγόντα αύξησης (EGFR). Αυτό βασίζεται στην παρατήρηση ότι η υπερέκφραση της E5 αυξάνει την φωσφορυλίωση του EGFR καθώς και αναστέλλει την αποικοδόμηση του υποδοχέα. Η E5 φαίνεται να εκφράζεται κυρίως στα τελευταία στάδια του κύκλου ζωής σε διαφοροποιημένα επιθηλιακά κύτταρα. Η E5 φαίνεται ότι επηρεάζει ελάχιστα τα επίπεδα της φωσφορυλίωσης του EGFR τόσο σε διαφοροποιημένα όσο και σε αδιαφοροποίητα κύτταρα. Τέλος, η έλλειψη του E5 έχει ως αποτέλεσμα την ελαττωματική ενεργοποίηση των ικών λειτουργιών σε διαφοροποιημένα κύτταρα, υποδεικνύοντας την σημαντική της λειτουργία και ρόλο στα διαφοροποιημένα κύτταρα. [23, 26]

4.6.4. E6

Η E6 συνδέεται με πολυάριθμες κυτταρικές πρωτεΐνες που μπορούν να χωριστούν σε τέσσερις γενικές κατηγορίες: μεταγραφικοί συν-ενεργοποιητές, πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην κυτταρική πολικότητα και κινητικότητα, καταστολείς όγκων και

επαγωγείς απόπτωσης και αντιγραφής του DNA και παράγοντες επισκευής. Αρκετές πρωτεΐνες ανήκουν σε περισσότερες από μία κατηγορίες. [26]

Σε μια έρευνα του Nomine et al., η E6 θεωρείται ότι είναι μια ογκοπρωτεΐνη, η οποία παίζει σημαντικό ρόλο στην ογκογένεση που επάγεται από HPV. Η E6 εμφανίζεται ως μια πρωτεΐνη χαμαιλέοντας που συνδυάζει ένα συντηρημένα δομικά σκελετό με εξαιρετικά μεταβλητές επιφάνειες που συμμετέχουν στις γενικές ή εξειδικευμένες λειτουργίες του HPV. Η E6 συνδέεται με αρκετές κυτταρικές πρωτεΐνες που ρυθμίζουν τα μονοπάτια του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και συχνά προκαλεί την αποικοδόμηση τους. Ορισμένες μορφές της E6 σχηματίζουν σύμπλοκα με την κυτταρική λιγάση ουβικουτίνη (E6AP), τα οποία στοχεύουν τον καταστολέα όγκων p53 για αποικοδόμηση. Απενεργοποιώντας τον p53 ο ιός προλαμβάνει την απόπτωση των μολυσμένων κυττάρων και βοηθά την αντιγραφή του γονιδιώματός του. [25]

Η E6 επάγει την έκφραση και δραστηριότητα τελομεράσης. Αυτή η ενεργοποίηση της τελομεράσης φέρεται να είναι υπεύθυνη για την κυτταρική αθανατοποίηση με E6, αν και ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο η E6 επιτυγχάνει αυτό το αποτέλεσμα είναι ακόμα ασαφής. Μέσα από τις αλληλεπιδράσεις που περιγράφονται παραπάνω, E6 μπορεί να επηρεάσει μεταγραφικά μονοπάτια, που διαταράσσουν την κυτταρική προσκόλληση και την αρχιτεκτονική, αναστέλλουν την απόπτωση, καταργούν τις αποκρίσεις στις βλάβες στο DNA, προκαλούν αστάθεια στο γονιδίωμα. [26]

4.6.5. L1

Η πρωτεΐνη L1 (55kDa) είναι η πιο άφθονη πρωτεΐνη στο ικό καψίδιο και είναι εξαιρετικά αντιγονική. Αρκετές μελέτες έχουν βρει αντισώματα L1 σε ορούς μολυσμένων ασθενών. Η L1 έχει εκφραστεί σε μία ποικιλία συστημάτων για την παραγωγή ικών σωματιδίων (VLP) που είναι άκρως αντιγονική. Αυτά τα ικά σωματίδια σχηματίζονται αυθόρμητα και δεν απαιτούν οποιαδήποτε άλλο ικό συστατικό. Αν και η L1 μπορεί να δεσμεύει DNA, τα VLP που παράγονται μόνο με L1 είναι σε θέση να συσκευάζουν το DNA αν έχουν μια μορφολογία που μοιάζει με ανέπαφα ικά σωματίδια. Η πρωτεΐνη L2 μπορεί να εκφράζεται ταυτόχρονα με την L1, προκειμένου να σχηματιστούν VLPs που μπορούν επιλεκτικά να ενθυλακώνουν το DNA του ιού του θηλώματος. Τα τρέχοντα στοιχεία υποδηλώνουν ότι η L1 μεσολαβεί στην πρόσδεση των βιριονίων στη πλασματική μεμβράνη σύμφωνα με τον Meneses et al. [24]

Η αυστηρή έννοια των ξενιστών και της ιστικής εξειδίκευσης των HPV οδήγησαν στην αρχική υπόθεση ότι υπήρχε ένας υποδοχέας του επιθηλίου. Η ασυδοσία της δέσμευσης του ιού υποδηλώνει ότι η ειδικότητα καθορίζεται από κάποια μετα-δεσμευτική εκδήλωση. Ωστόσο, τα παραπάνω αποτελέσματα δεν αποκλείουν την

παρουσία ενός δευτερογενούς υποδοχέα ο οποίος προσδίδει εξειδίκευση σε ένα γενικά κύριο υποδοχέα, και τα στοιχεία δείχνουν ότι η L2 μπορεί να δεσμεύσει ένα δευτερεύον ιικό υποδοχέα. [26]

4.6.6. L2

Η L2 είναι η ελάσσων καψιδική πρωτεΐνη του HPV. Παρά την ένδεια της L2 στο ιικό σώμα, αυτή η πρωτεΐνη έχει δείχθει ότι έχει περισσότερες λειτουργίες από έναν καθαρά δομικό ρόλο. Η L2 συμβάλλει στην πρόσδεση των ισωματίων με τους υποδοχείς του κυττάρου, διευκολύνει την πρόσληψη του λοιμογόνου παράγοντα, παραδίδει το ιικό DNA στα κέντρα της αντιγραφής και βοηθά το πακετάρισμα του ιικού DNA στα καψίδια. [26]

Ο ρόλος της L2 έχει δείχθει ότι είναι εκείνος μιας πολυλειτουργικής πρωτεΐνης. Η L2 απαιτείται για το ιικό «πακετάρισμα» του DNA, την ιική λοίμωξη, και την πυρηνική είσοδο του DNA του ιού. Αυτές οι διάφορες λειτουργίες δείχνουν ότι η L2 μπορεί να έχει διάφορες περιοχές μέσα στην αλληλουχία του HPV που είναι υπεύθυνη για τους διαφορετικούς ρόλους. Το αμινοτελικό άκρο της L2 εμπλέκεται στη σύνδεση DNA, και ότι τα καρβοξυτελικά 9 αμινοξέα ταυτοποιήθηκαν ως ένα σήμα πυρηνικού εντοπισμού. Η L2 έχει επίσης εμπλακεί στην μετακίνηση του ιικού DNA στον πυρήνα κατά την διάρκεια μόλυνσης, και στην μετακίνηση του ιικού DNA στο καψίδιο κατά τη διάρκεια της εγκαψιδίωσης. Η L2 εμπλέκεται στην έναρξη και ενδοκυτταρική διακίνηση του ιικού καψιδίου στο ενδοπλασματικό δίκτυο. [24]

4.7. Κύκλος ζωής του HPV

Ο κύκλος αντιγραφής του ιού είναι το κλειδί για την κατανόηση της παθογένεσης και της ανοσολογίας αυτών των ιών, επειδή ο μολυσματικός κύκλος είναι από μόνος του ένας μηχανισμός ανοσοδιαφυγής αναστέλλοντας την αντίχνευση του ιού από τον ξενιστή. Οι γνώσεις μας για τη διαδικασία αυτή είναι περιορισμένες σε διάφορους βασικούς τομείς, κυρίως λόγω της αδυναμίας του HPV να μολύνει κύτταρα σε καλλιέργεια ιστών και να επιτευχθεί ένας πλήρης μολυσματικός κύκλος *in vitro* σύμφωνα με τον Stanley και τους συνεργάτες του. [15]

Στον μεγαλύτερο αριθμό των μολυσμένων ατόμων, η μόλυνση από τον HPV είναι ασυμπτωματική. Το 70% των νέων μολύνσεων υποχωρούν μετά από τον 1^ο χρόνο. Ενώ οι περισσότερες περιπτώσεις μόλυνσης από HPV υποχωρούν αυτόματα, σε σπάνιες περιπτώσεις η μόλυνση παραμένει και τελικά αναπτύσσεται καρκίνος του τραχήλου της

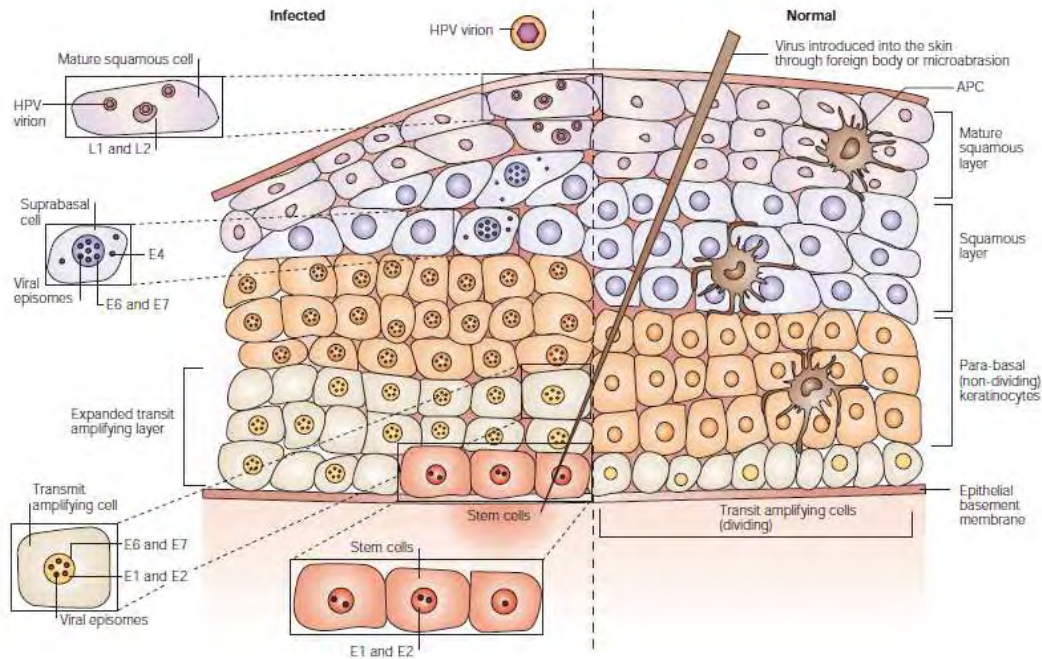
μήτρας σε μια περίοδο περίπου 12-15 ετών, μέσω μιας σειράς σταδίων: χαμηλού βαθμού (LSIL) και υψηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακές κακώσεις (HSIL) όπως αυτές φαίνονται σε κυτταρολογική εξέταση ή σε νεοπλασίες του τραχήλου (CIN) τάξης I έως III, σε ιστολογικά δείγματα. [28] Γενικά όσο ελαφρύτερη είναι η τραχηλική βλάβη (CIN 1) τόσο μεγαλύτερη είναι η πιθανότητα υποστροφής της νόσου, ενώ αντίθετα όσο σοβαρότερη είναι η βλάβη (CIN 2, 3) τόσο μεγαλύτερη είναι η πιθανότητα εξέλιξης της νόσου σε διηθητικό καρκίνο. Το ποσοστό εξέλιξης μιας υψηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακής νεοπλασίας (CIN 2, 3) σε διηθητικό καρκίνο κυμαίνεται μεταξύ 12% έως και 70% με μια μέση πιθανότητα περίπου στο 43%, ενώ ο μέσος χρόνος εξέλιξης της νόσου υπολογίζεται σε 9-10 χρόνια. [65]

Ο κύκλος ζωής των HPV ακολουθεί τη διαφοροποίηση του επιθηλίου, και είναι εξαιρετικά ιστοειδικός. Επιπλέον, η μόλυνση βρίσκεται μόνο σε διαφοροποιημένα κύτταρα του επιθηλίου, ή κερατινοκύτταρα. Οι ιοί κυρίως μολύνουν τα βασικά κερατινοκύτταρα, πιθανώς στοχεύοντας τα βλαστοκύτταρα. Είναι ενδιαφέρον ότι, οι μόνοι γνωστοί γονότυποι οι οποίοι μπορούν να μολύνουν και να επάγουν νεοπλάσματα σε πολλαπλά είδη είναι οι ιοί των θηλωμάτων των βοοειδών. Στα βασικά κύτταρα του επιθηλίου, όπου η πρωτοπαθής λοίμωξη συμβαίνει συνήθως, ένας χαμηλός αριθμός αντιγράφων των ιικών γενωμάτων διατηρείται. Η ιστοειδικότητα πιστεύεται ότι είναι εγκατεστημένη στο εν λόγω διαιρούμενα κύτταρα από τους κυτταρικούς ρυθμιστές της μεταγραφής του μολυσμένου κυττάρου. Η μόλυνση αρχίζει με την δέσμευση του ιού στην επιφάνεια των κυττάρων. Το συγκρότημα ιντεγκρίνης α6β4 έχει προταθεί ως ένας πιθανός υποδοχέας. Αυτό το σύμπλοκο του υποδοχέα εκφράζεται σε επιθηλιακά κύτταρα, μεσεγχυματικά κύτταρα και τους νευρώνες. Έχει αποδειχτεί ότι οι HPV δεσμεύουν άμεσα ηπαρίνη και επιφανειακές γλυκοζαμινογλυκάνες για τα ανθρώπινα κερατινοκύτταρα της ακροποσθίας πριν την εσωτερικοποίηση. (Menesis et al., 2005) [24]

Η έκφραση των ιικών γονιδίων είναι συνυφασμένη με τα κερατινοκύτταρα και δεν υπάρχει καμία απόδειξη ότι τα ιικά γονίδια εκφράζονται σε κανένα άλλο κύτταρο εκτός από τα κερατινοκύτταρα. Ο ιός μολύνει τα πρωταρχικά βασικά κύτταρα, που ομοιάζουν με τα βλαστοκύτταρα, με ένα μικρό αριθμό αντιγράφων. Καιρό μετά την μόλυνση, υπάρχει η αντιγραφή του ιικού DNA που φαίνεται να είναι ανεξάρτητη από τον κυτταρικό κύκλο και η οποία αυξάνει το αριθμό των ιικών αντιγράφων στα περίπου 50-100 αντίγραφα ανα κύτταρο. Αυτό κατορθώνεται με την έκφραση της ιικής πρωτεΐνης E2 και της ικανότητας αυτής να ρυθμίζει τον διαχωρισμό του ιικού DNA κατά την κυτταρική διαίρεση. Το μολυσμένο κύτταρο τότε εγκαταλείπει αυτή την πρωταρχική κατάσταση του και εισέρχεται στο πολλαπλασιαζόμενο τμήμα του επιθηλίου. Υπάρχει τότε μια φάση κατά την οποία η ιική έκφραση είναι ελάχιστη και συγκεκριμένα η έκφραση των γονιδίων E6 και E7, με τα μετάγραφα τους να είναι σχεδόν μη εμφανή. Σε αυτά τα πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα, τα όψιμα γονιδιακά προϊόντα διατηρούνται από

την ικανότητα των ικών αντιγόνων E1 και E2 να στρατολογούν τα κυτταρικά σύμπλοκα αντιγραφής στο ικό γένωμα. Οι HPV κωδικοποιούν μόνο ένα ένζυμο αντιγραφής του DNA, το E1, και εκτός από αυτό και την πρωτεΐνη E2, η αντιγραφή εξαρτάται απόλυτα από τους κυτταρικούς μηχανισμούς σύνθεσης του DNA. Το πρόβλημα για τον ιό είναι ότι οι κυτταρικές DNA πολυμεράσες και οι αντιγραφικοί παράγοντες παράγονται από μιτωτικά κύτταρα. Για να λυθεί αυτό το πρόβλημα, οι ιοί κωδικοποιούν πρωτεΐνες οι οποίες επανεργοποιούν την σύνθεση του DNA σε αυτά τα κύτταρα και καταστέλλουν την απόπτωση, δημιουργώντας ένα περιβάλλον κατάλληλο για την αντιγραφή του ικού DNA. Ενώ τα υγιή βασικά κύτταρα σταματούν τον κυτταρικό τους κύκλο κατά την διαφοροποίηση τους, τα μολυσμένα κύτταρα συνεχίζουν να διαιρούνται παρά την διαδικασία διαφοροποίησης η οποία συμβαίνει παράλληλα. Αυτό προσφέρει τα κυτταρικά «μηχανήματα» που είναι απαραίτητα για την αντιγραφή του ικού γενώματος, την μετάφραση των ικών πρωτεϊνών του καμιδίου L1 και L2 και την παραγωγή των ικών απογόνων. [15, 24]

Όταν το μολυσμένο κερατινοκύτταρο εισέρχεται στο πολλαπλασιαζόμενο τμήμα οπότε και εγκαταλείπει τον κυτταρικό κύκλο, υπάρχει μια έντονη θετική ρύθμιση της ικής γονιδιακής έκφρασης. Σε αυτό το στάδιο συμβαίνει η αντιγραφή του ικού DNA, έτσι υπάρχει η αύξηση του αριθμού των ικών αντιγράφων σε 1000 αντίγραφα ανά κύτταρο. Καθώς τα κύτταρα αυτά διαφοροποιούνται τα ώριμα ισοσώματα δημιουργούνται στα ανώτερα στρώματα. Η εξάπλωση των ιών γίνεται όταν τα κύτταρα του ανώτερου στρώματος εγκαθίστανται σε ένα περιβάλλον, όπως ο βλεννογόνος του στόματος ή ο βλεννογόνος του κόλπου, στον οποίο μπορούν να εγκαθιδρύσουν μια μόλυνση. Μικρές τριβές ή σκισίματα του επιθηλίου πιστεύεται ότι παρέχουν τη διαδρομή για τον ιό να μολύνει τα βασικά κύτταρα του επιθηλίου όπως μπορεί να συμβεί κατά τη διάρκεια της συνουσίας. Η ενσωμάτωση του γονιδιώματος μπορεί να προκύψει ως αποτέλεσμα της απορύθμισης της έκφρασης των γονιδίων E6 και E7. Αυτή η απώλεια της ρύθμισης μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη ενός αριθμού κακοηθειών. Ειδικότερα ο HPV μπορεί να προκαλέσει παθολογικές κυτταρικές βλάβες στη θέση προβολής. Η θέση της προσβολής βρίσκεται στη ζώνη μετάπλασης, τα κύτταρα της οποίας χαρακτηρίζονται από ταχεία κυτταρική διαίρεση και μοναδική ευαισθησία στην μόλυνση από τον ιό των ανθρωπίνων θηλωμάτων και στον κίνδυνο εκδήλωσης καρκίνου. [15, 24, 65]



4.8. Διάγνωση της μόλυνσης

Ο HPV δεν μπορεί να αναπτυχθεί στις συνηθισμένες κυτταρικές καλλιέργειες και η ανάλυση του ορού έχει περιορισμένη ακρίβεια. Καθώς η μόλυνση με τον HPV έχει ως επακόλουθο την ανοσολογική απόκριση ενάντια στην μείζων πρωτεΐνη του καψιδίου. Η έρευνα του Molijn et al., το 2005 έδειξε ότι τα αντισώματα παραμένουν ανιχνεύσιμα για πολλά χρόνια άρα η ανάλυση του ορού δεν είναι η κατάλληλη μέθοδος για την διάκριση των παρούσων και των παρελθοντικών μολύνσεων. Άρα, η ακριβής διάγνωση της μόλυνσης των HPV βασίζεται στην εύρεση των ικών νουκλειικών οξέων. [27]

4.8.1. Εύρεση του DNA του HPV και ταυτοποίηση των γενοτύπων HPV

Το DNA του HPV μπορεί να βρεθεί σε δείγματα του τραχήλου της μήτρας και σε δείγματα βιοψίας με διάφορες μεθόδους, στις οποίες ο *in situ* υβριδισμός είναι συμπληρωματικός της κυτταρολογίας. Αυτή η μέθοδος βασίζεται στην χρήση των σημασμένων εκκινητών που εξειδικεύονται στον υβριδισμό του ενδοκυττάριου DNA του HPV. Αν και η ευαισθησία αυτής της μεθόδου είναι περιορισμένη, επιτρέπει την εύρεση της θέσης της μόλυνσης του HPV στο δείγμα και είναι πιθανή η εύρεση της θέσης και με άλλους δείκτες. Η ταυτοποίηση των γενοτύπων απαιτεί την χρήση τυπο-ειδικών

ανιχνευτών σε πειράματα πολλαπλού in situ υβριδισμού. Το DNA του HPV μπορεί να απομονωθεί από κλινικά δείγματα και να ανιχνευθεί από Southern Blot ή dot spot υβριδισμό. Παρόλα αυτά, τέτοιες προσεγγίσεις δεν έχουν υψηλή ευαισθησία και είναι χρονοβόρες. Έτσι, οι μέθοδοι της ενίσχυσης του νουκλεϊκού οξέος έχουν αναπτυχθεί για να αυξηθεί η ευαισθησία καθώς και η εξειδίκευση της ανίχνευσης του DNA του HPV. [27]

4.8.2. Συλλογή δειγμάτων και απομόνωση των νουκλεϊκών οξέων

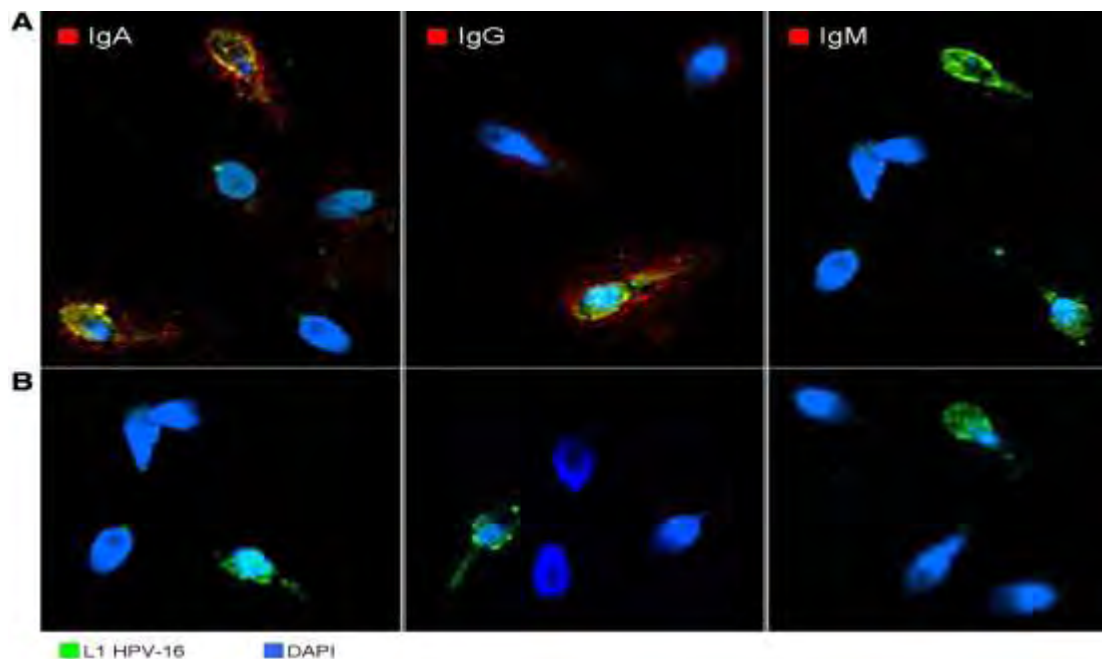
Μια βιοψία του τραχήλου της μήτρας είναι μόνο ένα μικρό δείγμα του επιθηλίου το οποίο μπορεί να επηρεάσει τις κυτταρολογικές εξετάσεις. Μόνο ένα τμήμα του επιθηλίου χρησιμοποιείται για την απομόνωση του DNA και μόνο ένα κλάσμα αυτού του απομονωμένου DNA χρησιμοποιείται για την ανίχνευση του συγκεκριμένου DNA. Έτσι, αν ένα δείγμα περιέχει μόνο ένα μικρό αριθμό αντιγράφων DNA του HPV, μπορούν να συμβούν αρκετά λάθη. Επίσης το αποτέλεσμα μιας δοκιμασίας HPV-DNA, μπορεί να ποικίλει ανάλογα με τον έμμηνο κύκλο. Αυτό δεν επηρεάζει μόνο την εύρεση της παρουσίας ή όχι του DNA του HPV, αλλά επίσης θα μπορούσε να επηρεάσει την ακρίβεια της εύρεσης HPV, ειδικά όταν πολλαπλοί τύποι HPV είναι παρόντες σε διαφορετικές συγκεντρώσεις.

Η διατήρηση της ποιότητας του δείγματος κατά τη διάρκεια της μεταφοράς και της αποθήκευσης επίσης είναι σημαντική. Το ιικό νουκλεϊκό οξύ πρέπει να διατηρηθεί για να αποφευχθούν ψευδώς-αρνητικά αποτελέσματα που οφείλονται στην αποδόμηση λόγω των ενδογενών ενδονουκλεασών. Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό για τα μετάγραφα. Για να εκτιμηθεί η ακεραιότητα του γενωμικού DNA στο δείγμα και η καταλληλότητά του για μοριακή ανάλυση και επαρκείς ελέγχους, όπως η ενίσχυση του γονιδίου της β-σφαιρίνης. Αρκετά εμπορικά διαθέσιμα κιτ δειγματοληψίας, αρχικά προορίζονται για κυτταρολογική εξέταση (π.χ. PreservCyt, Cytoc Corp.) αλλά διατηρούν επαρκώς τα νουκλεϊκά οξέα για μοριακή διάγνωση ακόμη και μετά από παρατεταμένη αποθήκευση σε θερμοκρασίες περιβάλλοντος. [27]

5. HPV και γονιμότητα

5.1. HPV και σπέρμα

Ιογενείς λοιμώξεις, όπως ο ιός της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας, ο ιός της ηπατίτιδας Β και C μπορεί να οδηγήσουν σε χρόνιες φλεγμονές του γεννητικού συστήματος του άνδρα με δευτεροπαθές αποτέλεσμα την μείωση της γονιμότητας του άνδρα. Η μείωση της γονιμότητας αντανακλάται στις διαταραγμένες παραμέτρους του σπέρματος, στον αυξημένο κατακερματισμό του DNA των σπερματοζωαρίων και στην αυξημένη συχνότητα ανευπλοειδιών στα σπερματοζωάρια [31-37]. Πιστεύεται ότι η σύνδεση του HPV στο σπερματοζωάριο γίνεται σε 2 διακριτές θέσεις κατά μήκος της ισημερινής περιοχής της κεφαλής του σπερματοζωαρίου, όπως και άλλοι ιοί που προσβάλλουν το σπέρμα. Η παρουσία των γλυκοζαμινογλυκανών ή άλλων διαλυτών παραγόντων επί της επιφάνειας του σπερματοζωαρίου φαίνεται να μεσολαβεί στην αλληλεπίδραση και δέσμευση μεταξύ του HPV και του σπέρματος. Πρόσφατα στοιχεία δείχνουν ότι η πρωτεΐνη L1 του καψιδίου του HPV και η γλυκοζαμινογλυκάνη συνδεκάνη-1 συνεντοπίζονται στην ισημερινή περιοχή της κεφαλής των σπερματοζωαρίων [38-40]. Οι Garolla et al. σε μια κλινική μελέτη το 2013 εκτίμησαν την ύπαρξη και του HPV σε δείγματα σπέρματος από ζευγάρια με προβλήματα υπογονιμότητας και τη συσχέτιση του. Από τα αποτελέσματα της μελέτης φάνηκε να υπάρχει συσχέτιση της HPV λοίμωξης με μειωμένη κινητικότητα σπερματοζωαρίων και αυξημένα ποσοστά αντισπερμικών αντισωμάτων. Σε αντίθεση με άλλες ιογενείς λοιμώξεις ο HPV δεν επηρεάζει τον αριθμό των χρωμοσωμάτων του σπερματοζωαρίου [41]. Ένας μεγάλος αριθμός μελετών τείνουν να συμφωνούν με τα προαναφερθέντα στοιχεία, δηλαδή ότι ο HPV συσχετίζεται με «κακής» ποιότητας σπέρμα. Συγκεκριμένα φαίνεται να υπάρχει μειωμένη κινητικότητα σπερματοζωαρίων, μειωμένος συνολικός αριθμός σπερματοζωαρίων, χωρίς να επηρεάζεται η φυσιολογική μορφολογία των σπερματοζωαρίων καθώς και μειωμένη ζωτικότητα αυτών. Από την άλλη πλευρά, μία πιο πρόσφατη μελέτη του Luttmer et al. το 2015 δεν παρατήρησε σχέση μεταξύ της παρουσίας HPV στο σπέρμα και αλλοίωση των παραμέτρων του σπέρματος [42]. Ίδια αποτελέσματα υπήρξαν και σε άλλες μελέτες σε άνδρες που επιθυμούσαν να ελέγξουν τις παραμέτρους του σπέρματός τους και άνδρες που έμελλε να τεκνοποιήσουν [43-45].



Εικόνα: Μικροσκοπική ανάλυση για την ύπαρξη της πρωτεΐνης L1 του HPV και των ανοσοσφαιρινών. (A) Χρώση των IgA και IgG μαζί με τις πρωτεΐνες του HPV σε ASA θετικά μολυσμένα δείγματα. (B) Έλλειψη της χρώσης των ανοσοσφαιρινών σε ASA αρνητικά μολυσμένα κύτταρα. (Από Garolla A. et al., 2013.)

5.2. HPV και αρχικά στάδια εμβρυογένεσης

Αποτελεί αδιαμφισβήτητο γεγονός ότι το σπερματοζώαριο μπορεί να μεταφέρει το DNA του ιού και πιθανώς να λειτουργεί ως ένας φορέας που μεταδίδει τον HPV στο έμβryo μέσω του γονιμοποιημένου ωαρίου. [46-49] Σε μελέτες που διενεργήθηκαν σε τρωκτικά, υπήρξε επιτυχής γονιμοποίηση των ωαρίων από τα μολυσμένα με HPV σπερματοζώαρια. Στις βλαστοκύστες που προέκυψαν παρατηρήθηκε γονιδιακή έκφραση του ιού στην έσω κυτταρική μάζα και στο τροφοεκτόδερμα. [50] Μελέτες χρησιμοποιώντας το HEPT test (ωάρια χάμστερ γονιμοποιημένα από σπερματοζώαρια ανθρώπου) έδειξαν ότι η έκφραση των γονιδίων E6, E7 και L1 και επομένως παραγωγή των αντίστοιχων πρωτεϊνών (οι οποίες έχουν συσχετιστεί με την ογκογενετική ικανότητα του ιού) έχει σαν αποτέλεσμα αυξημένο κατακερματισμό του DNA της βλαστοκύστης καθώς και θάνατο των τροφοβλαστικών κυττάρων. Ο Henneberg et al. το 2006 μελέτησαν την επίδραση του γενετικού υλικού των HPV τύπων 16 και 18 σε έμβρυα ποντικών στο στάδιο των 2 κυττάρων και στο στάδιο των 4-8 κυττάρων. Φάνηκε ότι η έκθεση στο DNA του ιού στο στάδιο των 2 κυττάρων ανέστειλε την εμβρυική ανάπτυξη, ενώ η καθυστέρηση της έκθεσης στον ιό (στάδιο 4-8 κυττάρων) είχε ως αποτέλεσμα την

περαιτέρω ανάπτυξη των εμβρύων [51]. Μια άλλη *in vitro* μελέτη σε ποντικούς (Gomez et al., 2008) έδειξε ότι τροφοβλάστες επιμολυσμένες με πλασμίδια που έφεραν τον HPV 16 οδηγούνταν σε απόπτωση με 3 έως 6 φορές μεγαλύτερη συχνότητα συγκριτικά με τροφοβλάστες επιμολυσμένες με πλασμίδια που δεν έφεραν τον ιό [52]. Σε μια έρευνα του 2016 των Garolla et al. σχετικά με την μόλυνση του σπέρματος από τον HPV και πως αυτός επηρεάζει το αποτέλεσμα της εξωσωματικής γονιμοποίησης φάνηκε ότι το ποσοστό σχηματισμού βλαστοκύστης ήταν σημαντικά μειωμένο στην ομάδα που έφερε τον ιό σε σχέση με την υγιή ομάδα. (27.3% και 54.1% αντίστοιχα) [53].

5.3. HPV γυναικεία γονιμότητα και αυτόματες εκτρώσεις

Σε αντίθεση με τις μελέτες που έχουν διενεργηθεί σχετικά με την ανδρική υπογονιμότητα και πως αυτή επηρεάζεται από τον HPV, οι μελέτες που αφορούν στην επίδραση του HPV στη γυναικεία γονιμότητα είναι περιορισμένες. Οι περισσότερες έρευνες αφορούν στην δράση του ιού στο γεννητικό σύστημα των γυναικών. Ένα αξιοσημείωτο κομμάτι ερευνών από το οποίο θα μπορούσαμε να εξάγουμε χρήσιμες πληροφορίες είναι αυτό που μελετά τη σχέση της μόλυνσης από HPV και του αποτελέσματος της κύησης. Οι μελέτες του Gomez et al. και του Hermomat et al. έδειξαν συσχέτιση του ιού με αυτόματες εκτρώσεις και πρόωρη ρήξη εμβρυικών υμένων το οποίο βέβαια δεν επιβεβαιώθηκε από αντίστοιχη έρευνα των Skoczynski et al. και Conde Feraez et al. [54]. Επίσης η μελέτη του Garolla et al. του 2016 επιβεβαιώνει και πάλι το σημαντικά αυξημένο ποσοστό αποβολών στα ζευγάρια με HPV-θετικό σπέρμα [53]. Σε αυτό το σημείο αξίζει να αναφερθεί και η ικανότητα του HPV να μειώνει την εμφύτευση των τροφοβλαστικών κυττάρων στο ενδομήτριο (Eppel et al., 2000; Matovina et al., 2004; Noventa et al., 2014) δεδομένο που μπορεί να υποδηλώνει μια τάση για μεγαλύτερο κίνδυνο αποβολών στις γυναίκες με HPV λοίμωξη [55-57].

6. HPV και Υποβοηθούμενη Αναπαραγωγή

Έχει αναφερθεί ότι όταν ο HPV είναι παρών στο σπέρμα, σε τεχνικές υποβοηθούμενης αναπαραγωγής αυτό οδηγεί σε μικρότερα ποσοστά γονιμοποίησης και μεγαλύτερα ποσοστά αποβολών. Οι ερευνητές υποθέτουν ότι κατά την διάρκεια της ART, ο HPV ίσως να επεμβαίνει στους μηχανισμούς της ακροσωμικής αντίδρασης, της αλληλεπίδρασης του σπερματοζωαρίου με το ωάριο και της σύντηξης του σπερματοζωαρίου και του ωαρίου. Αυτό σύμφωνα με τον Yang Y. et al., οφείλεται στο ότι ο HPV συνδέεται σε τμήματα της κεφαλής ή της ουράς του σπερματοζωαρίου οπότε μειώνει την λειτουργία και την ικανότητα του ακροσώματος [58].

Έχει προταθεί από αρκετούς ερευνητές η ανάγκη της εύρεσης ενός πρωτοκόλλου για τον καθαρισμό του μολυσμένου από HPV σπέρματος πριν αυτό χρησιμοποιηθεί σε ART. Σε οροθετικά ζευγάρια που υποβάλλονται σε ART έχει χρησιμοποιηθεί ένα ενζυμικό πρωτόκολλο με το οποίο «καθαρίζεται» το σπέρμα για ασφαλή σύλληψη (Garolla A. et al., 2012). [59]

6.1. Ενδομήτρια σπερματέγχυση

Πολλά ζευγάρια με προβλήματα υπογονιμότητας καταφεύγουν στη λύση της ενδομήτριας σπερματέγχυσης, ειδικά όταν η υπογονιμότητα δε σχετίζεται με ανδρικό παράγοντα και η διαβατότητα των σαλπίνγων είναι αποδεδειγμένη. Σε μια μελέτη των Depuydt et al. το 2015 παρατηρήθηκε ότι υπάρχει αρνητική συσχέτιση μεταξύ μόλυνσης με HPV και πιθανότητας εγκυμοσύνης μετά από ενδομήτρια σπερματέγχυση. Συγκεκριμένα, 590 γυναίκες υποβλήθηκαν σε 1529 κύκλους ενδομήτριας σπερματέγχυσης και οι ερευνητές κατέγραψαν ότι οι γυναίκες με HPV λοίμωξη έχουν 6 φορές λιγότερες πιθανότητες να μείνουν έγκυες (1,87%) σε σύγκριση με γυναίκες χωρίς λοίμωξη από τον ιό (11,4%). Από την παραπάνω μελέτη αξίζει να αναφέρουμε ότι υπήρχε 11% επιπολασμός του ιού σε κάθε κύκλο [60]. Σε μια πρόσφατη έρευνα των Garolla et al. το 2016 ζευγάρια με προβλήματα υπογονιμότητας χωρίστηκαν σε δύο ομάδες ανάλογα με την παρουσία ή όχι του HPV στο σπέρμα των ανδρών μετά από ανίχνευση με φθορίζον *in situ* υβριδισμό (FISH). Από τα ζευγάρια που υποβλήθηκαν σε ενδομήτρια σπερματέγχυση επιτυχές αποτέλεσμα είχαν τα 12 από τα 60 (20%) στην ομάδα χωρίς τον ιό και 2 από τα 21 (9.5%) στην ομάδα με τον HPV [53].

6.2. Εξωσωματική γονιμοποίηση

Είναι γνωστό ότι γυναίκες με προβλήματα υπογονιμότητας, οι οποίες πληρούν τα κριτήρια για εξωσωματική γονιμοποίηση, έχουν σχεδόν διπλάσια ποσοστά ανωμαλίας της κυτταρολογίας του τραχήλου που σχετίζονται με την παρουσία του HPV ή υψηλού βαθμού τραχηλικές αλλοιώσεις σε σύγκριση με τον γενικό πληθυσμό (Pereira N. et al., 2015). [61] Υπάρχουν μελέτες των οποίων τα αποτελέσματα έδειξαν ότι δεν υπάρχει συσχέτιση του HPV-16 με το αποτέλεσμα της εξωσωματικής γονιμοποίησης (Tanaka et al., 2000) [62] αλλά ούτε υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά στα ποσοστά εγκυμοσύνης μεταξύ των ζευγαριών με HPV και των υγιών ζευγαριών (Perino et al. 2011). [63] Μια από τις πρώτες μελέτες που εκτίμησε αναλυτικότερα την επίδραση του

HPV στο αποτέλεσμα της εξωσωματικής γονιμοποίησης ήταν αυτή των Spandorfer et al. το 2006. Οι ερευνητές εντόπισαν τον HPV στο 16% των ασθενών τους (106 ασθενείς). Το ποσοστό εγκυμοσύνης στις υγιείς γυναίκες που υποβλήθηκαν σε εξωσωματική γονιμοποίηση ήταν περίπου 2 φορές μεγαλύτερο σε σχέση με τις γυναίκες με HPV (57% έναντι 23.5%; χ^2 analysis, $P < 0.02$). Αξίζει να αναφέρουμε ότι δεν επηρεάστηκε ο αριθμός των ωαρίων που συλλέχθηκαν, ούτε η ποιότητα των εμβρύων διέφερε μεταξύ των δύο ομάδων. Από την άλλη πλευρά όμως δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά στα ποσοστά αποβολών μεταξύ των δύο ομάδων. Αξιοσημείωτο σε αυτή τη μελέτη είναι το γεγονός ότι όλες οι κυήσεις των HPV θετικών ζευγαριών οδήγησαν σε αυτόματη έκτρωση, ενώ στα HPV αρνητικά ζευγάρια το ποσοστό αποβολών κυμάνθηκε στο 15.9% ($P < 0.01$). [31] Στα παραπάνω δεδομένα έρχεται να προστεθεί και η μελέτη των Garolla A. et al. του 2016 κατά την οποία τα ζευγάρια χωρίστηκαν σε δύο ομάδες ανάλογα με την παρουσία ή όχι του ιού στο σπέρμα και υποβλήθηκαν σε μικρογονιμοποίηση (ICSI). Από τα υγιή ζευγάρια, επιτυχή θεραπεία είχαν τα 40 από τα 98 (40.8%), ενώ από τα ζευγάρια με HPV στο σπέρμα 6 από τα 33 (18.2%) είχαν επιτυχή θεραπεία αντίστοιχα. Σε αυτό το σημείο να σημειωθεί ότι τα ποσοστά γονιμοποίησης με τη χρήση της ICSI δεν διέφεραν μεταξύ των δύο ομάδων. Τέλος στη μελέτη αυτή η ομάδα με τα HPV-αρνητικά ζευγάρια είχε ένα ποσοστό αυτόματων κυήσεων 8.1%, σε αντίθεση με την ομάδα των HPV-αρνητικών ζευγαριών, στην οποία το ποσοστό αυτόματων κυήσεων ήταν μηδενικό. [53]

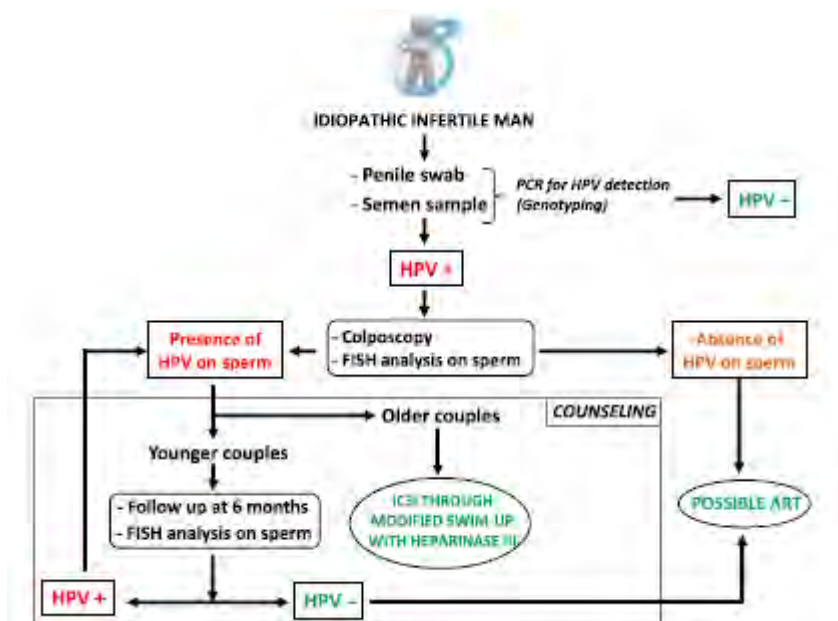
7. Βιβλιογραφικά προτεινόμενος τρόπος διαχείρισης υπογόνιμων ανδρών

Χρησιμοποιώντας όσα αναφέρθηκαν, υπάρχει η πρόταση να εξετάζεται ο άρρεν σύντροφος την παρουσία του HPV στις ακόλουθες περιπτώσεις: άρρενες με ιδιοπαθή ασθενοζωοσπερμία, παρουσία των ASA, ανεξήγητη υπογονιμότητα ζευγαριών, θετικό ιατρικό ιστορικό για ασθένειες σχετικές με τον HPV και αποδείξεις υπάρχουσας μόλυνσης από HPV, ειδικά σε άνδρες που υποβάλλονται σε ART κύκλους ή σε αποθήκευση σπέρματος σε τράπεζα σπέρματος.

Αρχικά, η διάγνωση μπορεί να γίνει με λήψη δείγματος από το πέος και με PCR στο σπέρμα. Έπειτα καλό θα ήταν να γίνει προσδιορισμός του γονοτύπου για την εξακρίβωση του HPV στελέχους. Όταν το δείγμα είναι θετικό, το δεύτερο βήμα της διάγνωσης είναι η κολποσκόπηση για να αποκλειστούν η ύπαρξη των κονδυλωμάτων των γεννητικών οργάνων και μια ανάλυση FISH για το σπέρμα ώστε να ανιχνευτεί η παρουσία DNA του HPV στην επιφάνεια του σπέρματος.

Σε περιπτώσεις υπογόνιμων ανδρών οι οποίοι δεν έχουν κανένα άλλο παράγοντα εκτός από την ύπαρξη HPV που να εξηγεί την υπογονιμότητα, προτείνεται η συμβουλευτική ζευγαριών. Εκεί μπορεί να προταθεί η ασφαλής σεξουαλική επαφή, η αποφυγή πρωκτικού και στοματικού έρωτα, η προσοχή στην προσωπική υγιεινή και η διακοπή του καπνίσματος.

Αν δεν είναι δυνατόν να αναβληθεί η έρευνα για την αιτία της υπογονιμότητας, όπως για παράδειγμα σε ζευγάρια μεγάλης ηλικίας, προτείνεται η χρήση της τεχνικής FISH για τα σπερματοζωάρια. Αν αυτή είναι αρνητική τότε μπορεί να ακολουθηθεί μια απλή IVF. Αν αυτή είναι θετική τότε πρέπει να ακολουθηθεί ICSI με πρωτύτρη διαδικασία πλύσης των σπερματοζωαρίων. Όπως είναι φανερό αυτή η προσέγγιση θα μπορούσε να αλλάξει την αντιμετώπιση της υπογονιμότητας και την ζωή των ζευγαριών. (Foresta C. et al., 2015) [64]



Εικόνα 1: Προτεινόμενος τρόπος διαχείρισης των υπογόνιμων ανδρών όπως διαμορφώνεται από τους παράγοντες κινδύνου για την σπερματική μόλυνση από HPV. (Foresta C. et al., 2015)

8. Συμπεράσματα

Από την ανάλυση των ερευνών που αφορούν τον HPV και την υπογονιμότητα μπορούμε να εξάγουμε τα ακόλουθα συμπεράσματα:

1. Υπάρχει μεγαλύτερο ποσοστό σπέρματος μολυσμένου με HPV στους άρρενες με ιδιοπαθή υπογονιμότητα σε σύγκριση με το γενικό πληθυσμό.
2. Ο HPV κυρίως εντοπίζεται στην επιφάνεια του σπερματοζωαρίου, συγκεκριμένα στην ισημερινή περιοχή και υπάρχει μια ισχυρή σύνδεση μεταξύ της ασθενοζωοσπερμίας, των ASA και της μόλυνσης του σπέρματος από HPV. Αυτό δεν επηρεάζεται από τον γενότυπο του HPV ο οποίος εντοπίζεται.
3. Βλάβες στην κινητικότητα του σπερματοζωαρίου η οποία σχετίζεται με την μόλυνση από HPV ανιχνεύεται πιο συχνά σε ιδιοπαθείς υπογόνιμους άνδρες σε σύγκριση με εκείνους που είναι γόνιμοι. Αυτό υποδεικνύει μια πιθανή σχέση αιτίου-αποτελέσματος μεταξύ της ανεξήγητης ανδρικής υπογονιμότητας και της ύπαρξης HPV στο σπέρμα.
4. In vitro έρευνες δείχνουν ότι όταν ο HPV είναι προσδεμένος στα σπερματοζωάρια τότε πιθανώς μεταφέρεται με την γονιμοποίηση στα ωοκύτταρα, στην βλαστοκύστη και στα τροφοβλαστικά κύτταρα. Συγκεκριμένα, η παρουσία του HPV στα γονιμοποιημένα ωάρια συνδέεται με ένα αυξημένο ποσοστό απόπτωσης. Επιπλέον, η παρουσία του ιού στα τροφοβλαστικά κύτταρα φαίνεται ότι συνδέεται με μειωμένη ικανότητα πρόσδεσης των τροφοβλαστικών κυττάρων. (Foresta C. et al., 2015)
5. Οι γυναίκες με HPV λοίμωξη έχουν αυξημένο κίνδυνο για αυτόματες εκτρώσεις και πρόωρη ρήξη εμβρυικών υμένων. (Souho et al., 2015)
6. Οι γυναίκες με μόλυνση από HPV σύμφωνα με έρευνες έχουν μικρότερα ποσοστά κύησης, αν συγκριθούν με υγιείς γυναίκες όταν υποβλήθηκαν σε κάποια μέθοδο εξωσωματικής γονιμοποίησης χωρίς όλες οι μελέτες να συμφωνούν με αυτό το συμπέρασμα.

9. Ερευνητικές προκλήσεις

Η περιορισμένη βιβλιογραφία στο ζήτημα του HPV και της υπογονιμότητας καθώς και των αντικρουόμενων αποτελεσμάτων μεταξύ των μελετών που ήδη υπάρχουν σχετικά με την έκβαση του αποτελέσματος των μεθόδων υποβοηθούμενης αναπαραγωγής και τη λοίμωξη του ζεύγους από τον ιό του HPV, καθιστά απαραίτητο το σχεδιασμό και την εκπόνηση νέων κλινικών και εργαστηριακών μελετών. Στα πλαίσια αυτά η κλινική μας έχει αρχίσει να οργανώνει ένα ερευνητικό πρωτόκολλο το οποίο θα μπορούσε μελλοντικά να κατέχει διαφωτιστικό χαρακτήρα στα μέχρι τότε δεδομένα για την επιρροή της HPV μόλυνσης στην εξωσωματική γονιμοποίηση. Στη συνέχεια του

κειμένου θα αναλυθούν τα βασικά ερευνητικά ερωτήματα και η προτεινόμενη μεθοδολογία έρευνας.

9.1. Βασικά ερευνητικά ερωτήματα

- Σκοπός είναι η πιθανή συσχέτιση της HPV λοίμωξης με την έκβαση των μεθόδων υποβοηθούμενης αναπαραγωγής.
- Κριτήριο επιλογής των ασθενών είναι η υποβολή τους σε τεχνικές εξωσωματικής γονιμοποίησης και η ανίχνευση ή όχι του ιού στο γενετικό υλικό τους.

9.2. Προτεινόμενη μεθοδολογία έρευνας

Για την εκπλήρωση των αντικειμενικών στόχων της μελέτης κρίνεται αναγκαία η διεξαγωγή μιας προοπτικής έρευνας. Για τα ζευγάρια που θα συμμετάσχουν, η αιτία της υπογονιμότητας θα πρέπει να είναι ανεξήγητη ή αν πρόκειται για προβλήματα γονιμότητας που οφείλονται στη γυναίκα, να είναι από παθολογία των σαλπίνγων. Ο αποκλεισμός των άλλων αιτιών της υπογονιμότητας γίνεται με στόχο την αποφυγή της επίδρασης αυτών στο αποτέλεσμα της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Παράλληλα τα ζευγάρια θα χωριστούν σε ομάδες βάσει του ιστορικού λοίμωξης από HPV. Συγκεκριμένα μια ομάδα υγιών ζευγαριών (control group-A), μια ομάδα με μόλυνση με HPV είτε του άνδρα (B1) είτε της γυναίκας (B2) καθώς και μια τρίτη ομάδα (C) με HPV λοίμωξη και στους δύο συντρόφους. Στο σημείο αυτό να σημειωθεί ότι οι ομάδες αυτές θα είναι κατηγοριοποιημένες ανάλογα με την ηλικία της γυναίκας, έτσι ώστε ο παράγοντας αυτός να μην επηρεάσει τα αποτελέσματα της έρευνας. Οι γυναίκες θα υποβάλλονται σε τεστ κατά Παπανικολάου και HPV DNA test, ενώ στους άνδρες θα γίνεται ανίχνευση του ιού στο σπέρμα με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) και υβριδισμό. Το πρωτόκολλο διέγερσης των ωθηκών που θα χρησιμοποιηθεί δεν θα διαφέρει μεταξύ των γυναικών, έτσι ώστε να μην θεωρηθεί ότι μπορεί να επηρεάσει το αποτέλεσμα. Στη συνέχεια θα εκτελείται συγκεκριμένη μέθοδος ART, ακολουθώντας το ίδιο πρωτόκολλο αντίστοιχα προσαρμοσμένο για όλα τα συμμετέχοντα ζευγάρια, τα οποία θα παρακολουθούνται μέχρι τη β-HCG αν είναι αρνητική ή αν είναι θετική θα παρακολουθούνται για την έκβαση της κύησης. Η ART μέθοδος δε θα διαφέρει μεταξύ των υποψήφιων ζευγαριών, για να μην επηρεαστεί το αποτέλεσμα. Θα καταγράφονται οι αυτόματες αποβολές αλλά και οι συνεχιζόμενες κηύσεις για κάθε ομάδα. Με τον τρόπο αυτό, θα ελέγχεται η επίδραση του HPV στην επίτευξη, αλλά και τη συνέχιση της εγκυμοσύνης. Επίσης ο διαχωρισμός των ομάδων θα διευκρινίζει την ύπαρξη συσχέτισης μεταξύ φύλου και λοίμωξης με τον ιό. Σε περιπτώσεις, δηλαδή, λοίμωξης του άνδρα με τον HPV τα αποτελέσματα της μελέτης θα αποσαφηνίσουν την ανάγκη ή όχι καθαρισμού του σπέρματος από τον ιό πριν τη χρήση στη γονιμοποίηση του ωαρίου. Τέλος στα

ζευγάρια θα χορηγούνται γραπτώς έντυπα ενημέρωσης σχετικά με τον HPV και δελτία συγκατάθεσης για συμμετοχή στη μελέτη.

10. Συζήτηση

Η υπογονιμότητα αποτελεί μια σύνθετη κατάσταση της ανθρώπινης υγείας η οποία μπορεί να επηρεάσει σε μεγάλο βαθμό την ποιότητα ζωής των ζευγαριών που τη βιώνουν. Η απόφαση ενός ζευγαριού να υποβληθεί σε μια πληθώρα διαγνωστικών εξετάσεων και στη συνέχεια σε κάποια μέθοδο υποβοηθούμενης αναπαραγωγής αποτελεί στρεσογόνο παράγοντα και για τους δύο συντρόφους. Στις μέρες μας, οι οικονομικές δυνατότητες είναι ιδιαίτερα περιορισμένες, έτσι το κόστος μπορεί να αποτελέσει τροχοπέδη στην απόφαση του ζευγαριού να ενταχθεί σε ένα πρόγραμμα ART. Ακόμη περισσότερη διστακτικότητα εμφανίζουν τα ζευγάρια που τους ζητούνται να ελεγχθούν για σεξουαλικά μεταδιδόμενα νοσήματα, όπως ο HPV, στα πλαίσια διερεύνησης της γονιμότητας τους, καθώς το κόστος των διαγνωστικών εξετάσεων για τον ιό επιβαρύνει το ίδιο το ζευγάρι.

Στη σημερινή εποχή, λοιπόν, η HPV λοίμωξη διαλάθει της προσοχής των κλινικών ιατρών και παραμένει πολλές φορές αδιάγνωστη. Παρ' όλα αυτά, η λοίμωξη με τον ιό των ανθρωπίνων θηλωμάτων φαίνεται να σχετίζεται σημαντικά με αρνητικές επιδράσεις στο γεννητικό σύστημα τόσο της γυναίκας όσο και του άνδρα και κατ' επέκταση στη φυσιολογική αναπαραγωγική λειτουργία. Με βάση τις υπάρχουσες μελέτες, φαίνεται ότι η λοίμωξη με τον ιό μπορεί να οδηγήσει σε κακής ποιότητας σπέρμα (κυρίως ασθενοζωοσπερμία) και αυξημένα ποσοστά αντισπερμικών αντισωμάτων όσον αφορά στους άνδρες. Από την άλλη πλευρά, απαιτείται περισσότερη έρευνα για τις γυναίκες και την επίδραση του στη γονιμότητα τους. Αν και τα αποτελέσματα των μελετών έρχονται σε αντίθεση, φαίνεται ότι πιθανώς τα ποσοστά των αυτόματων εκτρώσεων και η πρόωρη ρήξη των εμβρυικών υμένων σε περιπτώσεις εγκυμοσύνης είναι αυξημένα όταν υπάρχει η HPV λοίμωξη. Ο ρόλος του HPV στις μεθόδους υποβοηθούμενης αναπαραγωγής δεν είναι ακόμη σαφώς καθορισμένος. Με βεβαιότητα μπορούμε να πούμε ότι η λοίμωξη με τον ιό δεν έχει θετικές επιδράσεις στο αποτέλεσμα της IVF, καθώς οι ήδη υπάρχουσες μελέτες δείχνουν ότι επηρεάζει αρνητικά (μειώνει τα ποσοστά εγκυμοσύνης) ή δεν δείχνουν καμία συσχέτιση. Περισσότερες μελέτες και *in vitro* έρευνες σε ανθρώπινες βλαστοκύστες απαιτούνται για να εκτιμήσουμε τις επιδράσεις του HPV στα αρχικά στάδια της εμβρυογένεσης και στην περαιτέρω ανάπτυξη της βλαστοκύστης σε ένα υγιές έμβρυο, καθώς τα μέχρι τώρα δεδομένα προέρχονται από πειράματα σε ποντικούς.

Η ανίχνευση του HPV και ο προσδιορισμός του γονότυπου μπορεί να μας βοηθήσει ειδικά σε περιπτώσεις ανεξήγητης υπογονιμότητας για την επιλογή κατάλληλου θεραπευτικού πρωτόκολλου. Νέες έρευνες απαιτούνται για την αναγκαιότητα καθαρισμού του σπέρματος από τον ιό πριν τη χρήση του στις τεχνικές υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Ο εμβολιασμός τόσο των γυναικών όσο και των ανδρών κρίνεται επιτακτική ανάγκη στη σημερινή εποχή. Η ανοσοποίηση έναντι του ιού θα αποτελέσει εφελτήριο ώστε να μειωθεί ο επιπολασμός του ιού και δευτερογενώς οι επιπτώσεις που έχει γενικά στην υγεία και τη γονιμότητα και των δύο φύλων. Το βέβαιο είναι ότι στο άμεσο μέλλον, θα υπάρξουν νέα δεδομένα για τη θέση του HPV στην αναπαραγωγική ιατρική και τις επιδράσεις του στην υποβοηθούμενη αναπαραγωγή. Τα στοιχεία αυτά ενδέχεται να αλλάξουν τη στάση των κλινικών ιατρών, που ασχολούνται με την υποβοηθούμενη αναπαραγωγή, απέναντι στην HPV λοίμωξη.

11. Βιβλιογραφία

1. **Μεσσήνης Ι. (2010)**. Κεφάλαιο Στείρωση στο Μεσσήνης Ι.Ε. (επιμ.) Επίτομη Μαιευτική & Γυναικολογία (2^η Έκδοση), Έκδοση: MD communications pp 577-585.
2. **Λώλης Δ., Μεσσήνης Ι., Σοφικίτης Ν., Χατζηκυριακίδου Α., Μακρογιαννάκης Α. (2010)**. Κεφάλαιο Στείρωση στο Λώλης Δ.Ε. (επιμ.) Γυναικολογία και Μαιευτική (Γ΄ Έκδοση), Επιστημονικές Εκδόσεις ΠΑΡΙΣΙΑΝΟΥ, pp 433-472.
3. **Βλάχος Ν. (2009)**. Κεφάλαιο Υπογονιμότητα-υποβοηθούμενη αναπαραγωγή στο Κρεατσάς Γ.Κ. (επιμ.) Σύγχρονη Γυναικολογία & Μαιευτική (2^η Έκδοση), Έκδοση: Πασχαλίδης ΕΠΕ, pp 360-391.
4. **Lucinda L. Veeck (1998)**. Human Gametes and Conceptuses Illustrated στο L.L. Veeck (επιμ.) An Atlas of human gametes and conceptuses, Έκδοση: The Parthenon Publishing Group, pp 121-192.
5. **The European IVF-Monitoring Consortium (EIM) for the European Society of Human Reproduction and Embryology (2013)**. Assisted reproductive technology in Europe 2012: results generated from European registers by ESHRE, Human Reproduction, Volume 31, Issue 8, pp. 1638-1652.
6. **Effy Vayena, Patrick J. Rowe, P. David Griffin (2002)**. Current Practices and Controversies in Assisted Reproduction, Report of a meeting on “Medical, Ethical and Social Aspects of Assisted Reproduction, WHO Headquarters in Geneva, Switzerland, 17-21 September 2001, Έκδοση: WHO Press.
7. **WHO (2010)**. Semen analysis στο WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen (5th Edition), Έκδοση: WHO Press, pp 7-157.
8. **Albert Health Technologies Decision Process (2014)**. Assisted Reproductive Technologies (ARTs) Final Report, Έκδοση: University of Alberta, Διαθέσιμο στην ιστοσελίδα: <http://www.health.alberta.ca/>
9. **Martin Greuner and Markus Montgan (2014)**. Κεφάλαιο Morphological Selection of Gametes and Embryos: 2PN/Zygote στο Markus Montgan (επιμ.) A Practical Guide To Selecting Gametes And Embryos, Έκδοση: CRC Press, p 104.
10. **Kevin Cowards and Dagan Wells (2013)**. Textbook of clinical embryology, Έκδοση: Cambridge University Press, S:16, 17, 26.
11. **The ESHRE Capri Workshop Group**. Intrauterine insemination, Human Reproduction Update, 2009; Vol.15, No.3 pp. 265–277.
12. **Nguyen H.P. et al.**, The biology of human papillomaviruses. Curr Probl Dermatol, 2014, 45, 19-32.
13. **Alba A. et al.**, The Human Papillomavirus (HPV) in Human Pathology: Description, Pathogenesis, Oncogenic Role, Epidemiology and Detection Techniques. The Open Dermatology Journal, 2009, 3, 90-102.

14. **Manisha Yadav, Neha Verma, Rakesh Singh Dhanda**, Impact of sexually transmitted infections on women health, Vol.5, No.8, pp. 1216-1226 (2013).
15. **M.A. Stanley, M.R. Pett and N. Coleman**, **HPV: from infection to cancer**, Biochemical Society Transactions (2007) Volume 35, part 6 pp. 1456-1460.
16. **Roosmarijn Luttmmer, Maaïke G. Dijkstra, Peter J.F. Snijders, Peter G.A. Hompes, Divera T.M. Pronk, Isabelle Hubeek, Johannes Berkhof, Danielle A.M. Heideman¹, and Chris J.L.M. Meijer**, Presence of human papillomavirus in semen in relation to semen quality, Human Reproduction, Vol.31, No.2 pp. 280–286, 2016.
17. **Ralph P Insinga, Erik J Dasbach and Elamin H Elbasha** Epidemiologic natural history and clinical management of Human Papillomavirus (HPV) Disease: a critical and systematic review of the literature in the development of an HPV dynamic transmission model, BMC Infectious Diseases 2009, 9:119.
18. **FT Cutts, S Franceschi, S Goldie, X Castellsague, S de Sanjose, G Garnett, WJ Edmunds, P Claeys, KL Goldenthal, DM Harper & L Markowitz**, Human papillomavirus and HPV vaccines: a review, Bulletin of the World Health Organization 2007;85: pp. 719–726.
19. **Zhi-Ming Zheng and Carl C. Baker**, Papillomavirus genome structure, expression and post-transcriptional regulation, Front Biosci. ; 11: pp. 2286–2302.
20. **de Villiers E.-M. et al.**, Classification of papillomaviruses. Virology 324, 2004, pp. 17-27.
21. **Hans-Ulrich Bernard**, Taxonomy and phylogeny of papillomviruses: An overview and recent developments, Infection, Genetics and Evolution, 2013; 18: pp 357-361.
22. **Doorbar J. et al.**, The E4 protein, **The E4 protein** Human Papillomaviruses 1996, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos (1996).
23. **Longworth M.S. et al.**, Pathogenesis of Human Papillomaviruses in Differentiating Epithelia, Microbiol. Mol. Biol. Rev. June 2004 vol. 68 no. 2 pp. 362-372.
24. **Meneses P. I. et al.**, Papillomavirus biology and therapeutic approaches. Gene Ther Mol Biol 2005: 9, pp. 217-228.
25. **Nominé Y. et al.**, Structural and Functional Analysis of E6 Oncoprotein: Insights in the Molecular Pathways of Human Papillomavirus-Mediated Pathogenesis. Molecular Cell 2006: 21, pp. 665–678.
26. **World Health Organization**, Human Papillomaviruses, IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Volume 90, France 2007.
27. **Molijn A. et al.**, Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infection, Journal of Clinical Virology, 2005, S:32, pp. 43-51.
28. **Steben M. et al.**, Human papillomavirus infection: Epidemiology and pathophysiology, Gynecologic Oncology, 2007: 107: pp. 2-5.

29. **Snijders P.JF. et al.**, HPV-mediated cervical carcinogenesis: concepts and clinical implications, *J Pathol* 2006; 208: pp152-164.
30. **Frazer I.H. et al.**, Prevention of cervical cancer through papillomavirus vaccination, *Nature Rev Immunol.* 2004; 4: pp. 46-54.
31. **Spandorfer S.D. et al.**, Prevalence of cervical human papillomavirus in women undergoing in vitro fertilization and association with outcome. *Fertility and Sterility*: 86(3) : 765-767, 2006.
32. **Kehl S. et al.**, HIV-infection and modern antiretroviral therapy impair sperm quality. *Arch Gynecol Obstet*: 284: 229–33, 2011.
33. **Bujan L. et al.**, Decreased semen volume and spermatozoa motility in HIV-1-infected patients under antiretroviral treatment. *J Androl*: 28: 444–52, 2007.
34. **Safarinejad M.R. et al.**, Evaluation of semen variables, sperm chromosomal abnormalities and reproductive endocrine profile in patients with chronic hepatitis C. *BJU Int*: 105: 79–86, 2010.
35. **Zhou X.L. et al.**, Effects of hepatitis B virus S protein on human sperm function. *Hum Reprod*: 24: 1575–83, 2009.
36. **Huang J.M. et al.**, Effects of hepatitis B virus infection on human sperm chromosomes. *World J Gastroenterol*: 9: 736–40, 2003.
37. **Goldberg-Bittman L. et al.**, Random aneuploidy in chronic hepatitis C patients. *Cancer Genet Cytogenet*: 180: 20–3, 2008.
38. **Perez-Andino J et al.**, Absorption of human papillomavirus 16 to live human sperm. *PLoS ONE*, vol. 4, no. 6, Article ID e5847, 2009.
39. **Foresta C. et al.**, Human papillomavirus found in sperm head of young adult males affects the progressive motility, *Fertility and Sterility*, vol. 93, no. 3, pp. 802–806, 2010.
40. **Garolla A. et al.**, The role of human papillomavirus on sperm function, *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*, vol. 23, no. 4, pp. 232–237, 2011.
41. **Garolla A. et al.**, Association, prevalence, and clearance of human papillomavirus and antisperm antibodies in infected semen samples from infertile patients. *Fertility and Sterility*: 99(1) : 125-131, 2013.
42. **Luttmer R. et al.**, Presence of human papillomavirus in semen in relation to semen quality. *Hum Reprod*: Vol.31, no2 pp 280-28, 2016.
43. **Rintala M.A.M. et al.**, Detection of high-risk HPV DNA in semen and its association with the quality of semen. *Int J STD AIDS*: 15: 740–743, 2004.
44. **Schilaci R. et al.**, Detection of oncogenic human papillomavirus genotypes on spermatozoa of male partners of infertile couples. *Fertil Steril*: 100: 1236-1240, 2013.
45. **Golob B. et al.**, High HPV infection prevalence in men from infertile couples and lack of relationship between seminal HPV infection and sperm quality. *Biomed Res Int*: 2014: 230263, 2014.
46. **Lai Y.M. et al.**, Human papillomavirus deoxyribonucleic acid and ribonucleic acid in seminal plasma and sperm cells, *Fertility and Sterility*, vol. 65, no. 5, pp. 1026–1030, 1996.

47. **Chan P.J. et al.**, Human papillomavirus gene sequences in washed human spermdeoxyribonucleic acid,” *Fertility and Sterility*, vol. 61, no. 5, pp. 982–985, 1994.
48. **Chan P.J. et al.**, Sperm as a noninvasive gene delivery systemfor preimplantation embryos, *Fertility and Sterility*, vol. 63, no. 5, pp. 1121–1124, 1995.
49. **Rombaldi R.L. et al.**, Transplacental transmission of human papillomavirus, *Virology Journal*, vol. 5, article 106, 2008.
50. **Cabrera M. et al.**, 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, *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, vol. 14, no. 2, pp. 120–124, 1997.
51. **Henneberg A.A. et al.**, Human papilloma virus DNA exposure and embryo survival is stage-specific, *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, vol. 23, no. 6, pp. 255–259, 2006.
52. **Gomez L.M. et al.**, Placental infection with human papillomavirus is associated with spontaneous preterm delivery, *Human Reproduction*, vol. 23, no. 3, pp. 709–715, 2008.
53. **Garolla A. et al.**, Spontaneous fertility and in vitro fertilization outcome: new evidence of human papillomavirus sperm infection, *Fertility and Sterility Vol.* 105, No. 1, 2016.
54. **Souho T. et al.**, Human Papillomavirus Infection and Fertility Alteration: A Systematic Review. *PLOS ONE* :10 (9), 2015.
55. **Eppel W. et al.**, Human papillomavirus in the cervix and placenta, *Obstetrics and Gynecology*, vol. 96, no. 3, pp. 337–341, 2000.
56. **Matovina M. et al.**, Possible role of bacterial and viral infections in miscarriages, *Fertility and Sterility*, vol. 81, no. 3, pp. 662–669, 2004.
57. **Noventa M. et al.**, Is it time to shift the attention on early stages embryo development to avoid inconclusive evidence on HPVrelated infertility: debate and proposal, *Reproductive Biology and Endocrinology*, vol. 12, article 48, 2014.
58. **Yang Y. et al.**, Correlation between HPV sperm infection and male infertility. *Asian Journal of Andrology*: 15: 52, 2013.
59. **Garolla A. et al.**, Human Papillomavirus sperm infection and assisted reproduction: a dangerous hazard with a possible safe solution. *Human Reproduction*: 27(4) : 967-973, 2012.
60. **Depuydt C.E. et al.**, Human papillomavirus positivity in women undergoing intrauterine insemination has a negative effect on pregnancy rates, *Gynecologic and Obstetric Investigation*, 2015.
61. **Pereira N. et al.**, Human Papillomavirus Infection, Infertility, and Assisted Reproductive Outcomes. *Journal of Pathogenes*: Article ID 578423, 2015.
62. **Tanaka H. et al.**, Mass screening for human papillomavirus type 16 infection in infertile couples, *The Journal of Reproductive Medicine*, vol.45. no. 11, pp. 907-911, 2000.

63. **Perino A. et al.**, Human papillomavirus infection in couples undergoing in vitro fertilization procedures: impact on reproductive outcomes, *Fertility and Sterility* Vol. 95, No. 5, April 2011.
64. **Foresta C. et al.**, HPV-DNA sperm infection and infertility: from a systemic literature to a possible clinical management proposal, *Andrology* Vol. 3 Issue: 2, pp. 163-173, 2015.
65. **Διακομανώλης Ε. (2010)**. Κεφάλαιο 15 Τραχηλική ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία (CIN) στο Διακομανώλης Ε. (επιμ) *Κολποσκόπηση και παθολογία του κατώτερου γεννητικού συστήματος της γυναίκας*, Έκδοση: Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης, pp. 261-265.
66. **Bergh P.A. et al.**, Ovarian hyperstimulation syndrome: a review of pathophysiology. *J. Assist Reprod Genet*, 1992;9: pp. 429-438.