ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΗ – ΑΝΑΓΕΝΝΗΤΙΚΗ ΙΑΤΡΙΚΗ»

Διεύθυνση Προγράμματος: Καθηγητής Πέτρος Δρακάκης

«Η ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ DAZL ΣΕ ΤΡΑΧΗΛΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΣΕ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟΥΣ ΤΡΑΧΗΛΟΥΣ ΚΑΙ ΣΕ ΤΡΑΧΗΛΟΥΣ ΜΕ HPV ΛΟΙΜΩΞΗ»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΤΟΥ

ΘΕΟΦΑΝΗ Σ. ΣΤΑΘΗ

Α΄ Μαιευτική - Γυναικολογική Κλινική Πανεπιστημίου Αθηνών, Νοσοκομείο «Αλεξάνδρα»

Διευθυντής: Καθηγητής Δημήτριος Λουτράδης

Αθήνα, 2020

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ (ACKNOWLEDGEMENTS)

Μετά το πέρας του μεταπτυχιακού προγράμματος «Αναπαραγωγική – Αναγεννητική Ιατρική» και ορμώμενος από τη διπλωματική μου εργασία, οφείλω να εκφράσω την εκτίμηση και τις ευχαριστίες μου στη συντονιστική επιτροπή αλλά και στους υπολοίπους συντονιστές του προγράμματος αυτού, στο οποίο είχα την τιμή να φοιτήσω.

Πιο συγκεκριμένα, οφείλω να εκφράσω την εκτίμηση και το σεβασμό μου τόσο στον Καθηγητή Μαιευτικής-Γυναικολογίας και Διευθυντή της Α΄ Μαιευτικής-Γυναικολογικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Αθηνών κο. Δημήτριο Λουτράδη, όσο και στον Καθηγητή Μαιευτικής-Γυναικολογίας και Πρόεδρο του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών κο. Πέτρο Δρακάκη, διότι στελέχωσαν ένα άρτια δομημένο πρόγραμμα σπουδών το οποίο διευρύνει ζωτικά τους γνωστικούς ορίζοντες του σύγχρονου μαιευτήρα-γυναικολόγου και όχι μόνο.

Τέλος, δεν θα ήθελα να παραλείψω την πολύτιμη βοήθεια του αναπληρωτή Καθηγητή Μαιευτικής-Γυναικολογίας κου. Κωνσταντίνου Στεφανίδη για την καθοδήγηση και τις πολύτιμες συμβουλές του, κατά τη διάρκεια της συγγραφής της εργασίας μου, ο οποίος στάθηκε αρωγός σε όλη τη διάρκεια της φοίτησής μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Εισαγωγή: Το γονίδιο DAZL εδράζεται στο χρωμόσωμα 3, διαθέτει μόνο μία DAZ επανάληψη και ονομάζεται DAZL1 ή DAZLA. Το DAZL είναι εξαιρετικά ομόλογο προς το γονίδιο DAZ. Και τα δύο γονίδια εκφράζονται στο μεγαλύτερο μέρος της ζωής των γεννητικών κυττάρων και απαιτούνται για την ανάπτυξη των αρχέγονων γεννητικών κυττάρων, καθώς και τη διαφοροποίηση και την ωρίμανση των γεννητικών κυττάρων.

Σκοπός: Σκοπός της παρούσας έρευνας ήταν η βιβλιογραφική ανασκόπηση σχετικά με το γονίδιο DAZL, καθώς και η ανεύρεση της έκφρασης του γονιδίου στα τραχηλικά κύτταρα, σε φυσιολογικούς τραχήλους, καθώς και σε τραχήλους με HPV λοίμωξη.

Υλικό και Μέθοδος: Το δείγμα της έρευνας αποτελούνταν από 70 γυναίκες ηλικίας 20 έως 64 ετών, οι οποίες χωρίστηκαν σε δύο ομάδες. Στην ομάδα Α εντάχθηκαν 35 γυναίκες, με ιστολογικά επιβεβαιωμένη λοίμωξη HPV στον τράχηλο (σε διάφορα στάδια εξέλιξης). Η ομάδα Β αποτελούνταν από 35 υγιείς γυναίκες (ιστολογικά επιβεβαιωμένος φυσιολογικός τράχηλος). Έγινε ανοσοϊστοχημικός έλεγχος στο δείγμα της βιοψίας και ανάλυση των αποτελεσμάτων του ερωτηματολογίου που συμπλήρωσαν.

Αποτελέσματα: Προέκυψε ότι το γονίδιο DAZL δεν εκφράζεται στα τραχηλικά κύτταρα ούτε των υγιών, ούτε των παθολογικών τραχήλων. Από το ερωτηματολόγιο, προέκυψαν συσχετίσεις της λοίμωξης από τον ιό HPV με αρκετούς γνωστούς παράγοντες κινδύνου, με κυριότερη τη συνέπεια στη χρήση προφυλακτικού κατά τη σεξουαλική επαφή.

Συμπεράσματα: Το γονίδιο DAZL δεν εκφράζεται στα κύτταρα των φυσιολογικών τραχήλων και των τραχήλων με HPV λοίμωξη.

Λέξεις – κλειδιά: DAZ, DAZL, HPV λοίμωξη, ανοσοϊστοχημεία.

ABSTRACT

Introduction: DAZL gene is located on chromosome 3, has only one DAZ repetition and is called DAZL1 or DAZLA. DAZL gene is highly homologous to DAZ gene. Both DAZ and DAZL genes are expressed during most of the lifetime of germ cells and are required for the development of primordial germ cells, the differentiation and maturation of germ cells.

Purpose: The purpose of this study was to review literature on DAZL gene and τo determine whether DAZL gene is expressed in cervical cells, in normal cervices and in cervices with HPV infection.

Material and Methods: Our sample consisted of 70 women aged 20-64 years, who were divided into two groups. Group A included 35 women, with histologically confirmed cervical HPV infection (in various stages). Group B consisted of 35 healthy women (histologically confirmed normal cervix). Immunohistochemical control was performed in the biopsy sample and the answers of the questionnaire were also analyzed.

Results: DAZL gene is not expressed in the cervical cells neither of healthy, nor of HPV infected cervices. From the questionnaire, correlations of HPV infection to several known risk factors were established, the most important being the consistency in the use of condoms during sexual intercourse.

Conclusions: DAZL gene is not expressed in the cells of normal cervices and cervices with HPV infection.

Keywords: DAZ, DAZL, HPV infection, immunohistochemistry.

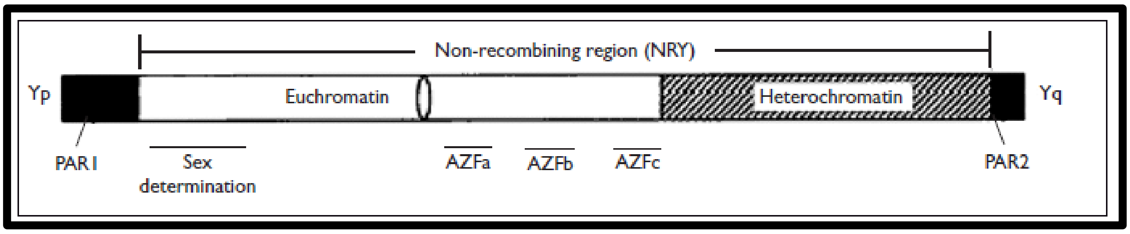
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1ο: ΧΡΩΜΟΣΩΜΑ Υ

Στο πρώτο κεφάλαιο της εργασίας παρουσιάζονται η δομή του χρωμοσώματος Υ, ενώ περιγράφονται και ορισμένες ειδικές περιοχές του (MSY – PARs – NSY).

1.1. Γενικά για τη δομή του χρωμοσώματος Υ

Το χρωμόσωμα Υ αποτελεί ένα από τα μικρότερα ανθρώπινα χρωμοσώματα.[1,2] Είναι ένα ακροκεντρικό χρωμόσωμα που αποτελείται ένα βραχύ και ένα μακρύ βραχίονα, που συμβολίζονται Yp και Yq αντίστοιχα, και την ενδιάμεση των δύο περιοχή του κεντομέρους.[3] Χαρακτηρίζει το άρρεν φύλο, δρα σαν ένας γενετικός καθοριστής των αντρικών χαρακτηριστικών και έχει μέγεθος 60Mb. Παρόλο που αποτελείται από 60 εκατομμύρια νουκλεοτίδια, έχει το μικρότερο αριθμό γονιδίων συγκριτικά με οποιοδήποτε άλλο χρωμόσωμα. Από τα 27 γονίδια που έχουν προσδιοριστεί στο χρωμόσωμα Υ, τα 9 ανευρίσκονται στο βραχύ του σκέλος (Yp), ενώ τα υπόλοιπα 18 στο μακρύ σκέλος (Yq).[1,2] Στην ***Εικόνα 1***, παρουσιάζεται μία σχηματική αναπαράσταση του χρωμοσώματος Υ.[1,4]



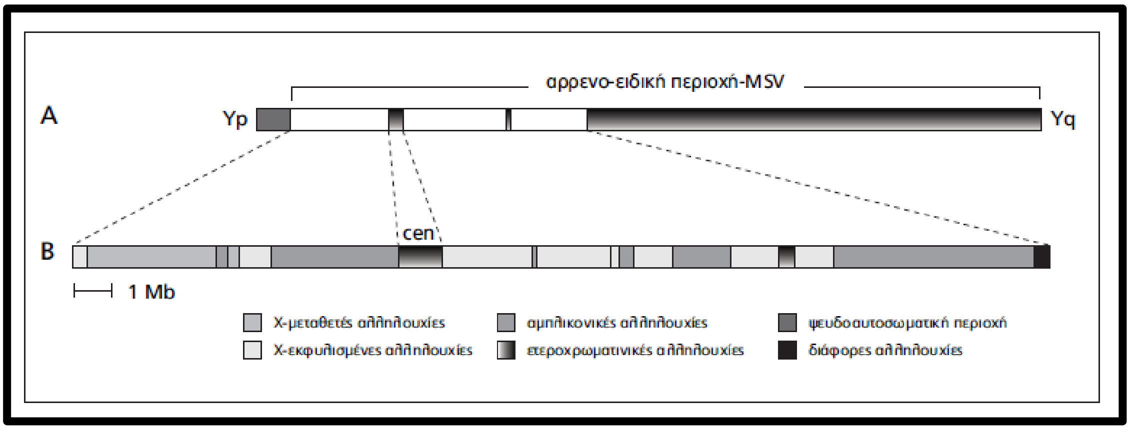
Εικόνα 1. Σχηματική αναπαράσταση του χρωμοσώματος Υ.[1,4]

Το χρωμόσωμα Υ είναι ένα ιδιαίτερο χρωμόσωμα το οποίο εμπλέκεται συχνά σε δομικές ανωμαλίες διακριτές στο μοριακό ή στο κυτταρογενετικό επίπεδο, που αφορούν αποκλειστικά τη γονιμότητα και τη φυλετική διαφοροποίηση. Οι μεταθέσεις και τα μικροελλείμματα αποτελούν τις συχνότερες δομικές του ανωμαλίες. Οι μεταθέσεις μεταξύ του χρωμοσώματος Υ και των αυτοσωματικών χρωμοσωμάτων αφορούν συνήθως τα χρωμοσώματα 1, 3 και 11 και έχουν βλαπτική επίδραση στη σπερματογένεση. Άλλες ανωμαλίες του χρωμοσώματος Υ, όπως το δακτυλιοειδές Υ και το δικεντρικό βραχύ σκέλος του Υ, παρεμποδίζουν τη σπερματογένεση, με αποτέλεσμα την έλλειψη διαφοροποίησης των σπερματογονίων.[2]

1.2. Περιοχή MSY

Το 2003 περιγράφηκε η πλήρης αλληλουχία του τμήματος της ευχρωματίνης, στην οποία αναγνωρίστηκε και ορίστηκε μία ειδική περιοχή που σχετίζεται με το άρρεν φύλο, η οποία καλείται αρρενο – ειδική περιοχή MSY (Male Specific region of the Y).[1,2,5] (***Εικόνα 2***) Η περιοχή MSY περιβάλλεται και από τις δύο πλευρές από ψευδοαυτοσωμικές περιοχές, όπου ο ανασυνδυασμός ανάμεσα στα χρωμοσώματα X και Y είναι ένα συχνό και φυσιολογικό γεγονός κατά τη μείωση στους άνδρες.[2,5]

Η περιοχή αυτή αποτελεί το 95% του χρωμοσώματος Υ, αντιπροσωπεύει ένα μωσαϊκό ετεροχρωματινικών και ευχρωματινικών αλληλουχιών και δε γίνεται ανασυνδυασμός ανάμεσα στα χρωμοσώματα Χ και Υ. Η ευχρωματινική περιοχή της MSY καλύπτει στο σύνολο περίπου 23Mb, εκ των οποίων τα 8Mb ανευρίσκονται στο βραχύ βραχίονα Yp και τα 14,5Mb στο μακρύ βραχίονα του Yq.[1,2,5]



Εικόνα 2. Η αρρενο – ειδική περιοχή του χρωμοσώματος Υ:

Α) Σχηματική απεικόνιση ολόκληρου του χρωμοσώματος Υ, περιλαμβανομένης και της ψευδοαυτοσωμικής και ετεροχρωματινικής περιοχής.

Β) Μεγέθυνση της περιοχής μήκους 24Mb της MSY όπου απεικονίζονται και οι τρεις τάξεις ευχρωματινικών αλληλουχιών, όπως επίσης και οι ετεροχρωματινικές περιοχές. (όπου cen: κεντρομερίδιο)[1,2,5]

1.2.1. Γονίδια και μεταγραφόμενες μονάδες της περιοχής MSY

Μέχρι σήμερα, έχουν ταυτοποιηθεί 156 μεταγραφόμενες γονιδιακές μονάδες, από τις οποίες οι 78 προέρχονται από γονίδια που κωδικοποιούν 27 πρωτεΐνες. (***Πίνακας 1***) Από τις 8 μεγάλες παλίνδρομες αλληλουχίες που έχουν ταυτοποιηθεί στο χρωμόσωμα Υ, οι 6 περιέχουν ζωτικής σημασίας – ειδικά για τη σπερματογένεση – γονίδια.[1,2,5]

Οι 156 μεταγραφόμενες γονιδιακές μονάδες που ταυτοποιήθηκαν βρίσκονται σε ευχρωματινικές περιοχές. Δεν υπάρχουν ενδείξεις για την ύπαρξη μεταγραφής στην ετεροχρωματίνη της περιοχής MSY. Από τις 78 μονάδες που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, περίπου 60 είναι μέλη εννέα διαφορετικών, MSY – ειδικών, οικογενειών – γονιδίων, καθεμία από τις οποίες είναι ταυτόσημη νουκλεοτιδική αλληλουχία σε ποσοστό >98%. Τα υπόλοιπα 18 γονίδια υπάρχουν σε ένα μόνο αντίγραφο. Έτσι, η περιοχή MSY φαίνεται να κωδικοποιεί τουλάχιστον 27 διακριτές πρωτεΐνες ή οικογένειες πρωτεϊνών. Επιπρόσθετα, η περιοχή MSY περιλαμβάνει 78 μεταγραφόμενες μονάδες, από τις οποίες φαίνεται πως οι περισσότερες δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνες.[1,2]

Τάξη Αλληλουχίας της MSY	Σύμβολο Γονιδίου	Όνομα γονιδίου	Αριθμός αντιγρά-φων	Ιστοειδική έκφραση	X – συνδεδεμένα ομόλογα	Αυτοσω-μικά ομόλογα
X – μεταθετές αλληλουχίες	TGIFLY	TGF(beta) – induced transcription factor 2 – like Y	1	Όρχεις	TGF2LX	–
	PCDH11Y	Protocadherin 11 Y	1	Εμβρυϊκός εγκέφαλος, εγκέφαλος	PCDH11X	–
X – εκφυλισμένες αλληλουχίες	SRY	Sex determining region Y	1	Κυρίως στους όρχεις	SOX3	–
	RPS4Y1	Ribosomal protein S4 Y isoform 1	1	Καθολική	RPS4X	–
	ZFY	Zinc finger 1	1	Καθολική	ZFX	–
	AMELY	Amelogenin Y	1	Δόντια	AMELX	–
	TBL1Y	Transducin (beta) – like 1 protein Y	1	Εμβρυϊκός εγκέφαλος, προστάτης	TBL1X	–
	PRKY	Protein kinase Y	1	Καθολική	PRKX	–
	USP9Y	Ubiquitin – specific protease 9 Y	1	Καθολική	USP9X	–
	DBY	Dead box Y	1	Καθολική	DBX	–
	UTY	Ubiquitous TPR motif Y	1	Καθολική	UTX	–
	TMSB4Y	Thymosin (beta) – 4 Y	1	Καθολική	TMSB4X	–
	NLGN4Y	Neuroligin 4 isoform Y	1	Εμβρυϊκός εγκέφαλος, εγκέφαλος, προστάτης, όρχεις	NLGN4X	–
	CYorf15A	Chromosome Y open reading frame 15A	1	Καθολική	Cyorf15	–
	Cyorf15B	Chromosome Y open reading frame 15B	1	Καθολική	Cyorf15	–
	SMCY	SMC (mouse) homologue, Y	1	Καθολική	SMCX	–
	EF1AY	Translation initiation factor 1AY	1	Καθολική	EIF1AX	–
	RPS4Y2	Ribosomal protein S4 Y isoform2	1	Καθολική	RPS4X	–
Αμπλικονικές αλληλουχίες	TSPY	Testis – specific protein Y	~35	Όρχεις	–	–
	VCY	Variable charge Y	2	Όρχεις	VCX	–
	XKRY	XK related Y	2	Όρχεις	–	–
	CDY	Chromodomain Y	4	Όρχεις	–	CDYL
	HSFY	Heatshock transcription factor Y	2	Όρχεις	–	–
	RBMY	RNA – binding motif Y	6	Όρχεις	RBMX	–
	PRY	PTP – BL related Y	2	Όρχεις	–	–
	BPY2	Basic protein Y 2	3	Όρχεις	–	–
	DAZ	Deleted in azoospermia	4	Όρχεις	–	DAZL
Ολικό άθροισμα	~78					

Πίνακας 1. Γονίδια και οικογένειες γονιδίων της περιοχής MSY, τα οποία φαίνεται να κωδικοποιούν πρωτεΐνες.[2]

Σε σύγκριση με τα αυτοσωμικά χρωμοσώματα, το Y χρωμόσωμα διαθέτει το μικρότερο αριθμό γονιδίων αλλά το μεγαλύτερο αριθμό επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών. Ειδικότερα, έχουν προσδιοριστεί 220 γονίδια, εκ των οποίων τα 104 κωδικοποιούν πρωτεϊνικά μόρια, τα 111 είναι ψευδογονίδια και τα υπόλοιπα 5 δεν έχουν κατηγοριοποιηθεί. Μεταξύ αυτών, 16 πρωτεΐνες κωδικοποιούνται από γονίδια που εδράζονται στις AZF περιοχές και εμπλέκονται στη διαδικασία της σπερματογένεσης.[3,6]

Τα γονίδια του χρωμοσώματος Y ταξινομούνται σε τρεις διακριτές ομάδες με βάση τη θέση τους στο Y χρωμόσωμα, τον αριθμό των αντιγράφων τους και το πρότυπο έκφρασής τους:

i. Ψευδοαυτοσωμικά γονίδια (όπως ASMTL, MIC2 και IL9R), των οποίων η αλληλουχία είναι όμοια στο X και το Y χρωμόσωμα και, με ορισμένες εξαιρέσεις, εκφράζονται σε διαφορετικούς ιστούς.
ii. Γονίδια τα οποία εδράζονται στην NRY περιοχή (όπως USP9Y, DBY και UTY). Αυτά τα γονίδια έχουν ομόλογα στο X χρωμόσωμα, κωδικοποιώντας πρωτεϊνικά μόρια με υψηλό βαθμό ταυτοσημίας. Επίσης, τα γονίδια αυτά εκφράζονται σε όλους τους ιστούς ενώ ορισμένα εκφράζονται και ιστοειδικά στους όρχεις.
iii. Οικογένειες γονιδίων ειδικών για το Y χρωμόσωμα (Y specific) (όπως DAZ, CDY και TSPY). Αποτελούν γονίδια που απαντώνται σε πολλαπλά αντίγραφα, τα οποία μπορεί να είναι είτε διασπαρμένα είτε ομαδοποιημένα στο Y χρωμόσωμα και εκφράζονται αποκλειστικά στους όρχεις. Εξαίρεση στην παραπάνω ομαδοποίηση αποτελεί το γονίδιο SRY, το οποίο είναι απαραίτητο για την ανάπτυξη των όρχεων, βρίσκεται μόνο σε ένα αντίγραφο και παρουσιάζει διαφορετικό πρότυπο έκφρασης (εκφράζεται στα κύτταρα της γενετικής ακρολοφίας – genital ridge, το έμβρυο και τα κύτταρα Sertoli του ενήλικα, καθώς και στα προγονικά κύτταρα των γονάδων).[3]

1.2.2. Κατηγορίες αλληλουχιών της περιοχής MSY

Σχεδόν όλες οι ευχρωματινικές αλληλουχίες της περιοχής MSY ανήκουν σε τρεις κατηγορίες, οι οποίες έχουν ονομαστεί X – μεταθετές, X – εκφυλισμένες και αμπλικονικές.

I. Οι X – μεταθετές αλληλουχίες είναι κατά 99% ταυτόσημες με αλληλουχίες DNA στο χρωμόσωμα X. Η ονομασία αυτών των αλληλουχιών οφείλεται στην παρουσία τους στην ανθρώπινη περιοχή MSY. Είναι το αποτέλεσμα μαζικών μεταθέσεων από το χρωμόσωμα X στο Y, οι οποίες συνέβησαν πριν από 3 – 4 εκατομμύρια χρόνια, μετά τη γενεαλογική απόκλιση του ανθρώπου από το χιμπαντζή.[2,7,8]

II. Οι X – εκφυλισμένες αλληλουχίες της περιοχής MSY περιέχουν γονίδια που βρίσκονται σε ένα μόνο αντίγραφο ή ψευδογονίδια, ομόλογα με 27 γονίδια, που εντοπίζονται στο χρωμόσωμα X. Οι παραπάνω αλληλουχίες επιδεικνύουν 60% έως 96% νουκλεοτιδική ταυτότητα με τις ομόλογές τους αλληλουχίες στο χρωμόσωμα X. Μοιάζουν να είναι κατάλοιπα αρχέγονων αυτοσωματικών χρωμοσωμάτων από τα οποία εξελίχθηκαν τα χρωμοσώματα X και Y.[2]

III. Τα αμπλικονικά τμήματα είναι μεγάλες σε μήκος επαναλαμβανόμενες μονάδες, οι αλληλουχίες των οποίων επιδεικνύουν αξιοσημείωτη ομοιότητα (έως και 99% ταυτότητα σε έκταση δεκάδων ή και εκατοντάδων χιλιοβάσεων). Το πιο ουσιώδες δομικό χαρακτηριστικό των αμπλικονικών περιοχών του χρωμοσώματος Y είναι οι οχτώ παλίνδρομες αλληλουχίες, οι οποίες αποτελούν το 25% της ευχρωματίνης στην MSY. Είναι αλληλουχίες DNA που περιέχουν την ίδια 5’ προς 3’ αλληλουχία και στις δύο αλυσίδες (για παράδειγμα 5’ GAATTC 3’ – 5’ CTTAAG 3’). Και οι 8 παλίνδρομες αλληλουχίες έχουν υψηλό ποσοστό συμμετρίας στα άκρα, με νουκλεοτιδική ομοιότητα από άκρο σε άκρο της τάξης του 99,94% – 99,97%.[2]

1.2.3. Περιοχές PARs και NRY

Στα τελομεριδιακά τμήματα των βραχιόνων του Y χρωμοσώματος υπάρχουν περιοχές νουκλεοτιδικής ταυτότητας με το χρωμόσωμα X, οι οποίες επιτρέπουν το ζευγάρωμα και τον ανασυνδυασμό κατά τη μείωση στους άντρες και περιβάλλουν την περιοχή MSY. Για αυτό το λόγο, αναφέρονται σαν ψευδοαυτοσωματικές περιοχές (PARs: pseudoautosomal regions).[1,2,4] Οι περιοχές αυτές (PAR1 και PAR2) καταλαμβάνουν μία έκταση 2,6Mb και 320bp, αντίστοιχα.[3,6] Απώλεια της PAR1 περιοχής οδηγεί σε στειρότητα, εξαιτίας της μη σύναψης των φυλετικών χρωμοσωμάτων.[3,9]

Η περιοχή μετά τις ψευδοαυτοσωματικές περιοχές, που διαφεύγει από τον ανασυνδυασμό, αναφέρεται ως μη – ανασυνδυαζόμενη περιοχή του χρωμοσώματος Y

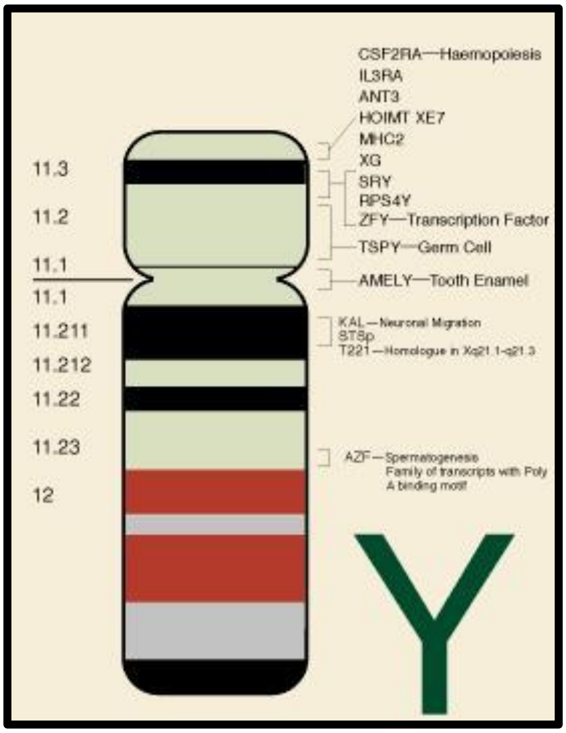
(NRY: non – recombining region of the Y chromosome). Η τελευταία αυτή περιοχή περικλείει μερικές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες, οι οποίες είναι είτε ομόλογες με περιοχές στο χρωμόσωμα X, είτε ειδικές για το χρωμόσωμα Y.[1,2,4] Η Yp αλλά και η κεντρομεριδιακή περιοχή του Yq αποτελούνται από ευχρωματίνη, ενώ το τελομεριδιακό τμήμα του Yq αποτελείται από ετεροχρωματίνη. Η συγκεκριμένη περιοχή ποικίλλει γενικά σε μήκος και φυσιολογικά αποτελεί το 1/2 ή τα 2/3 του Yq. Έτσι, ο μακρύς βραχίονας του χρωμοσώματος Y διχοτομείται κυτταρογενετικά σε μία ευχρωματινική κεντρική περιοχή (την Yq11, η οποία υποδιαιρείται στις περιοχές Yq11.1, 11.21, 11.22 και 11.23) και σε μία ετεροχρωματινική τελομεριδιακή περιοχή (Yq12).

Η NRY συνιστά το 95% του μήκους του Y χρωμοσώματος και καταλαμβάνει μία έκταση 63Mb, εκ των οποίων οι 23Mb περιλαμβάνουν ενεργά μεταγραφόμενα γονίδια.[3,10] Η NRY περιοχή υποδιαιρείται στα παρακάτω επιμέρους τμήματα:

i. το βραχύ βραχίονα του Y χρωμοσώματος (ευχρωματινική περιοχή)
ii. την περιοχή του κεντρομερούς
iii. την κεντρική περιοχή του μακρού βραχίονα του Y χρωμοσώματος (ευχρωματινική περιοχή)
iv. την ετεροχρωματινική περιοχή, η οποία καταλαμβάνει την απομακρυσμένη Yq περιοχή. Αυτή η περιοχή είναι πολυμορφική και θεωρείται ότι είναι γενετικά ανενεργή. Συνίσταται από δύο οικογένειες επαναλαμβανόμενων αλληλουχίων, τις DYZ1 και DYZ2. Καθεμία από αυτές τις δύο διαθέτει από 5.000 και 2.000 αντίγραφα, αντίστοιχα.[3]

Η πλειοψηφία των γονιδίων που απαντώνται στην NRY/MSY περιοχή του Y χρωμοσώματος εμπλέκονται στον καθορισμό και τη διαφοροποίηση του φύλου (SRY – Sex determining Y), καθώς και στη διαδικασία της σπερματογένεσης (γονίδια των AZF περιοχών – Azoospermia Factor).[3,4,6,10]

Με τη χρήση μοριακών τεχνικών, το χρωμόσωμα Y υποδιαιρείται σε επτά διαστήματα και καθένα από αυτά διαιρείται περαιτέρω σε υποδιαστήματα (A, B, C, κ.ο.κ.). Συνολικά, το χρωμόσωμα Y διαιρείται σε επτά διαστήματα και 43 υποδιαστήματα, συγκροτώντας το σημερινό ευρύτερα χρησιμοποιούμενο χάρτη του χρωμοσώματος Υ. (***Εικόνα 3***) Ο βραχύς βραχίονας Yp και η κεντρομεριδιακή περιοχή περιέχουν τα πρώτα τέσσερα τμήματα. Η ευχρωματινική περιοχή του μακρού βραχίονα Yq αντιπροσωπεύεται από τα τμήματα 5 και 6, ενώ η ετεροχρωματινική περιοχή προς το τελομεριδιακό άκρο του χρωμοσώματος Υ θεωρείται διάστημα 7.[1,2,11]



Εικόνα 3. Ο χάρτης του χρωμοσώματος Υ του ανθρώπου.[12]

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^{ο}: ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΑΖΩΟΣΠΕΡΜΙΑΣ (AZF)

Στο δεύτερο κεφάλαιο της εργασίας δίνονται γενικές πληροφορίες για τον παράγοντα αζωοσπερμίας (AZF), ενώ παρουσιάζονται και τα υποθετικά μοντέλα σχετικά με τη διάταξή του στο χρωμόσωμα Y. Επίσης, αναλύονται όλες οι περιοχές (AZFa, AZFb, AZFc) του παράγοντα.

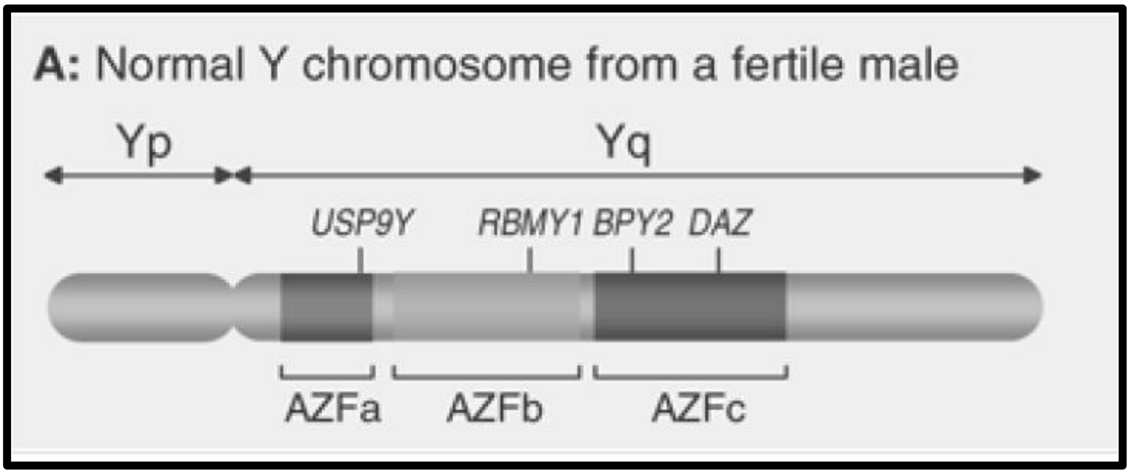
2.1. Γενικά για τον AZF

Οι πρώτες υποψίες για την εμπλοκή του Υ χρωμοσώματος στην αντρική υπογονιμότητα δημιουργήθηκαν από κυτταρογενετικές ενδείξεις, πριν από 27 περίπου έτη.[12,13] Κατά τη διερεύνηση της αντρικής υπογονιμότητας, ανευρέθηκε πιθανή σύνδεση μεταξύ της αδυναμίας για σπερματογένεση και ενός γενετικού υποστρώματος. Έτσι, διαπιστώθηκε μικροσκοπικά η ύπαρξη ανιχνεύσιμων ελλειμμάτων στην περιοχή του Yq σε έξι αζωοσπερμικούς άνδρες από ένα μαζικό έλεγχο 1.170 περιπτώσεων. Σε όλους αυτούς τους ασθενείς, το μόνο παρατηρηθέν σύμπτωμα ήταν η απουσία σπερματοζωαρίων στο σπερματικό πλάσμα. Το γεγονός αυτό υποδήλωνε ότι οι παράγοντες που σχετίζονταν με την ανθρώπινη σπερματογένεση βρίσκονταν σε αυτήν την περιοχή (Yq 11), που αργότερα ονομάστηκε «παράγοντας αζωοσπερμίας» (azoospermia factor – AZF).[2,12,13]

Αργότερα, σε έλεγχο 370 ανδρών με ιδιοπαθή ολιγοσπερμία ή αζωοσπερμία για 76 γενετικούς τόπους στην περιοχή Yq11, εντοπίστηκαν 12 άτομα που παρουσίαζαν de novo μικροελλείμματα και έναν ασθενή που είχε ένα κληρονομικό έλλειμμα, που αντιστοιχούσαν σε διαφορετικές υποπεριοχές μέσα στην Yq11.[2]

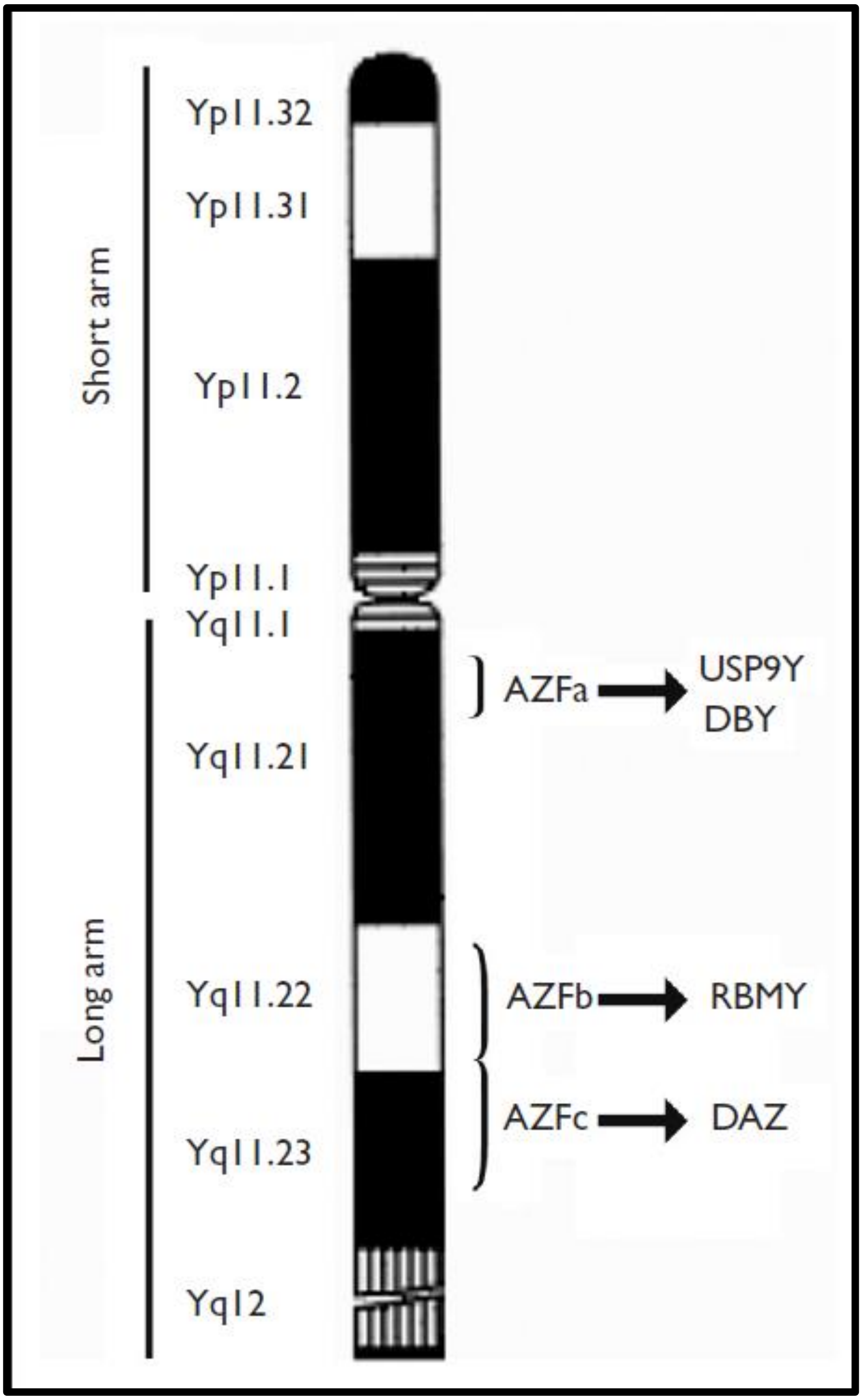
Αυτά τα ευρήματα οδήγησαν στο χαρακτηρισμό τριών περιοχών που απαιτούνται για τη σπερματογένεση, τα οποία καθιερώθηκε να αναφέρονται σαν AZFa, AZFb, AZFc. (***Εικόνα 4***) Ο πρώτος από αυτούς τους παράγοντες αζωοσπερμίας

(AZFa) βρίσκεται στο κεντρικό τμήμα του διαστήματος 5 (υποδιάστημα 5C). Ο παράγοντας AZFb εκτείνεται από την τελομεριδιακή περιοχή του διαστήματος του 5 στο κεντρομεριδιακό τμήμα του 6 (υποδιαστήματα 5O-6B). Ο AZFc βρίσκεται ακριβώς δίπλα στην ετεροχρωματινική περιοχή του Y χρωμοσώματος, ανάμεσα στα υποδιαστήματα 6C και 6E.



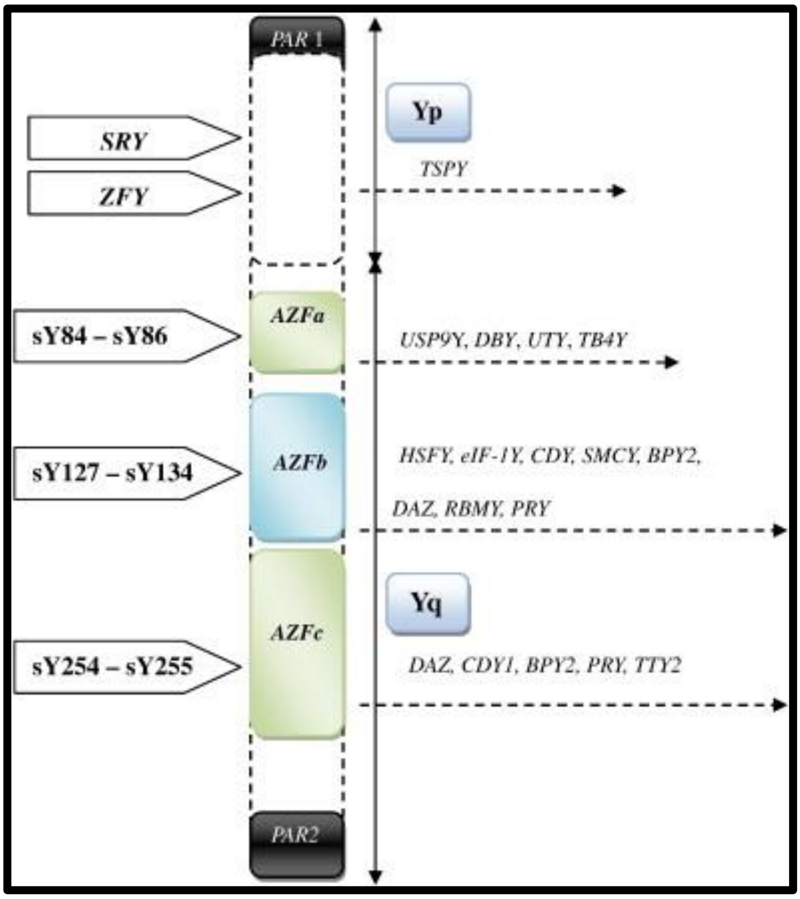
Εικόνα 4. Σχηματική απεικόνιση του Y χρωμοσώματος και της θέσης των περιοχών AZF σε αυτό.[3,14]

Παράλληλα, προτάθηκε και η ύπαρξη και μίας τέταρτης AZFd περιοχής μεταξύ των AZFb και AZFc, αλλά αυτό το εύρημα χρήζει περαιτέρω διερεύνησης. Στις AZF περιοχές εντοπίζονται αρκετά γονίδια, τα οποία εμπλέκονται στη διαδικασία της σπερματογένεσης και εκφράζονται ιστοειδικά στους όρχεις.[3,4,15] Μεταξύ των υποπεριοχών του AZF υπάρχει αξιοσημείωτη επικάλυψη που περικλείει ένα πλήθος γονιδίων και μεταγραφόμενων και μη μεταφραζόμενων μονάδων. (***Εικόνα 5***)



Εικόνα 5. Σχηματική αναπαράσταση του Υ χρωμοσώματος. Ο βραχύς βραχίονας αναφέρεται ως Yp11 και ο μακρύς βραχίονας ως Yq11. Παρουσιάζονται οι θέσεις των AZF a,b,c περιοχών και των γονιδίων που συναντώνται σε κάθε μία από αυτές.[1,3,10]

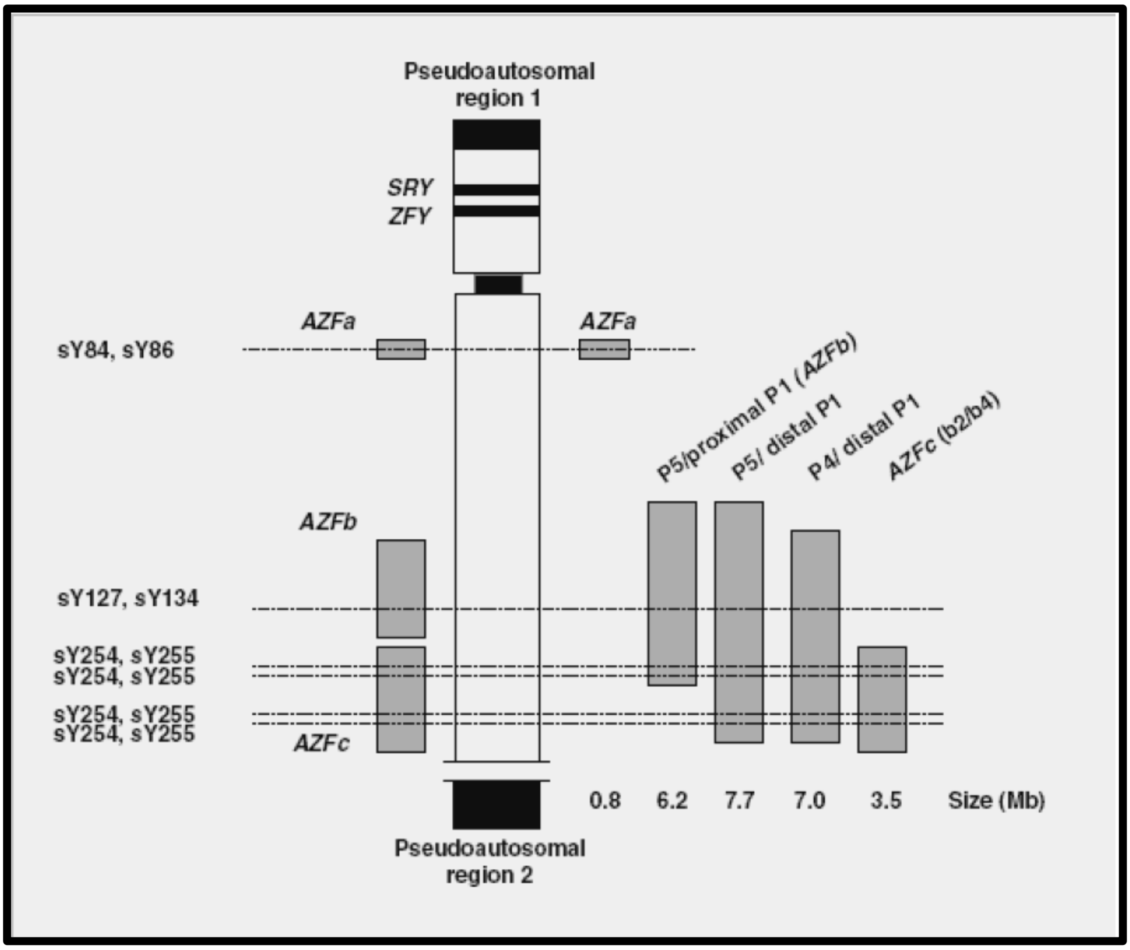
Η ανάλυση της περιοχής AZF οδήγησε στην απομόνωση αρκετών γονιδίων. Ορισμένα εκφράζονται, γενικά, στον οργανισμό (ubiquitous or housekeeping genes) και έχουν ένα ομόλογο στο X, που δεν αδρανοποιείται, ενώ άλλα εκφράζονται αποκλειστικά στον όρχι. Τα πρώτα υπάρχουν σε ένα αντίγραφο και είναι τα: Drosophila fats facets related Y (DFFRY/USP9Y), dead box Y (DBY), UTY (Ubiquitous Transcribed tetratrico – peptide repeat gene on the Y), eukaryotic translation – initiation – factor 1A Y – isoform (elf – 1AY), selected mouse Cdna – Y (SMCY) και η ισομορφή thymosin β4 – Y(Tβ4Y).[12,16] Τα δεύτερα, είναι, γενικώς, παρόντα σε πολλαπλά αντίγραφα και δεν έχουν ομόλογο στο X. Πρόκειται για τα γονίδια της οικογένειας RBMY (RNA binding motif – Y), το γονίδιο DAZ (Deleted in Azoospermia), τα γονίδια chromodomain – Y (CDY), XK – related Y (XKRY), Protein – Tyrosine phosphatase BAS – like (PTB – BL) – related Y (PRY) και τα γονίδια που κωδικοποιούν τις βασικές πρωτεΐνες Y1 και Y2 (BPY1, BPY2). Στην ***Εικόνα 6***, φαίνεται η θέση των γονιδίων αυτών στο μακρό σκέλος του Y χρωμοσώματος, σε σχέση με την περιοχή AZF.[12]



Εικόνα 6. Τα γονίδια της περιοχής AZF.[12,17]

2.2. Υποθετικά μοντέλα για τον AZF

Οι τρεις περιοχές AZFa, AZFb, AZFc αρχικά χαρακτηρίστηκαν μετά από προσεκτική χαρτογράφηση της MSY σε ένα μεγάλο αριθμό αντρών που έφεραν ελλείμματα, όταν ακόμα η πλήρης αλληλουχία του Y χρωμοσώματος δεν ήταν γνωστή.[15] Πρόσφατα, προσδιορίστηκε ένα νέο μοντέλο σύμφωνα με το οποίο οι AZFb και AZFc περιοχές είναι αλληλοεπικαλυπτόμενες.[3,18] Στην ***Εικόνα 7,*** παρουσιάζονται τα δύο πιθανά μοντέλα που έχουν προταθεί για τη διάταξη των AZF περιοχών.[3,19]

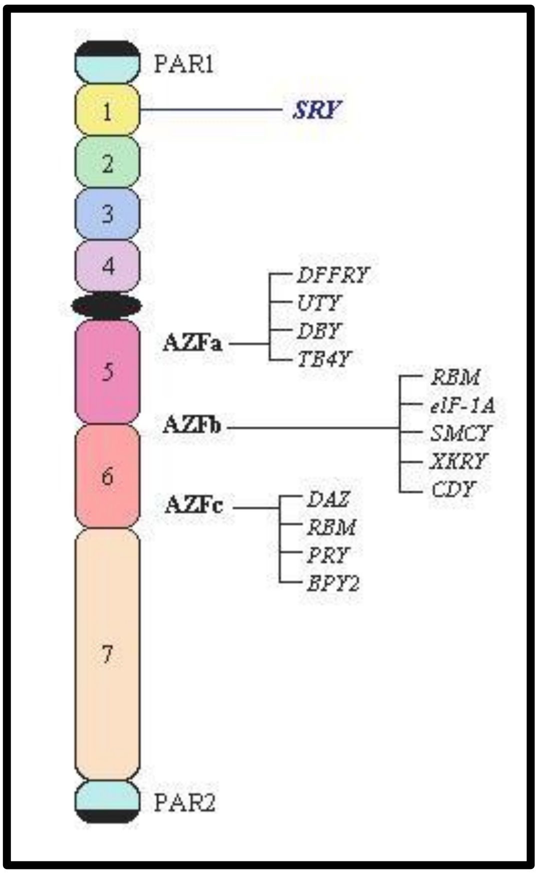


Εικόνα 7. Σχηματική αναπαράσταση του Y χρωμοσώματος και των δύο υποθετικών διατάξεων των AZF περιοχών κατά τους Vogt et al.,1996 (αριστερά) και Repping et al.,2002 (δεξιά). Παράλληλα, παρουσιάζονται και τα ζεύγη των ειδικών εκκινητών STS για κάθε AZF περιοχή.[3,19]

2.3. Περιοχές AZF

2.3.1. Περιοχή AZFa

Η AZFa εντοπίζεται στην κεντρική Yq11 περιοχή, βρίσκεται κοντά στο κεντρομερίδιο (Yq11.2) και το μέγεθός της εκτιμάται μεταξύ 1 – 3Mb.[3,12] Διαφέρει από τις περιοχές AZFb και AZFc επειδή δεν περιέχει επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες.[12] Σε αυτήν, έχουν προσδιοριστεί τέσσερα γονίδια που απαντώνται σε ένα μόνο αντίγραφο, το ομόλογο της Drosophila DFFRY (Drosophila Developmental gene Fats Facets) ή USP9Y (Ubiquitin-specific protease 9, Y chromosome), το DBY (Dead Box Y chromosome), το UTY (Ubiquitous TPR motif Y chromosome) και το TB4Y (Tymosin B4Y isoform). Από τα τέσσερα αυτά γονίδια, τα DFFRY ή USP9Y και DBY φαίνεται να διαδραματίζουν σπουδαιότερο ρόλο.[3,12,20] (***Εικόνα 8***)



Εικόνα 8. Τα γονίδια της περιοχής AZFa.[12,21]

Το γονίδιο DFFRY ή USP9Y ήταν το πρώτο γονίδιο που προσδιορίστηκε στην AZFa περιοχή και αποδείχτηκε ότι απουσίαζε από υπογόνιμους άντρες. Αυτό το γονίδιο κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη, της οποίας το καρβοξυτελικό άκρο έχει δράση υδρολάσης της ουβικουϊτίνης και υπάγεται στην οικογένεια των C19 πεπτιδασών κυστεΐνης (ενδοκυτταρικές πεπτιδάσες). Οι πεπτιδάσες αυτές απομακρύνουν μόρια ουβικουϊτίνης από πολϋουβικουϊτινιλιωμένα πεπτίδια. Έτσι, η πρωτεΐνη USP9Y φαίνεται να κατέχει σπουδαίο ρόλο στη ρύθμιση του χρόνου ημιζωής πρωτεϊνικών μορίων, παρεμποδίζοντας την αποικοδόμησή τους μέσω του πρωτεασώματος. Επίσης, απαντάται σε ένα μόνο αντίγραφο, διαθέτει ομόλογο στο X χρωμόσωμα το οποίο δεν απενεργοποιείται και εκφράζεται σε ποικιλία ιστών.[3,4,10,12]

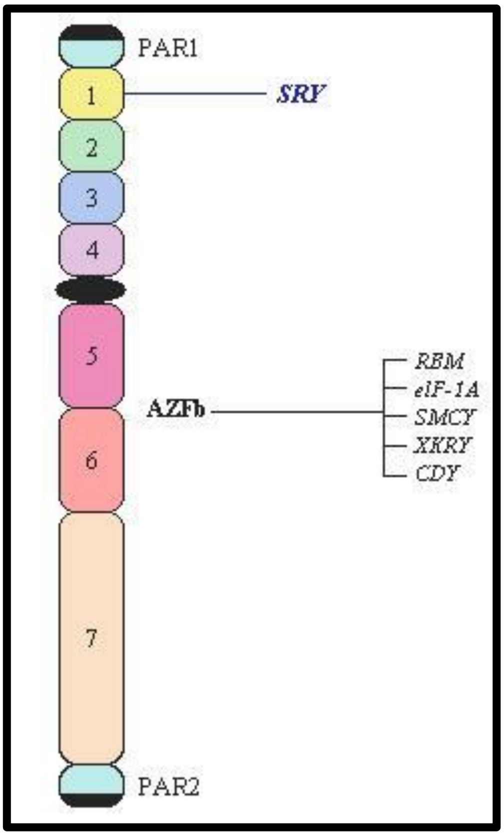
Η πιθανή εμπλοκή του γονίδιου DBY στη διαδικασία της σπερματογένεσης υποστηρίχθηκε εξαιτίας της υψηλής ομολογίας του με το γονίδιο PL10 του ποντικού, το οποίο εκφράζεται ιστοειδικά στους όρχεις. Στον άνθρωπο, το γονίδιο DBY απαντάται μόνο σε ένα αντίγραφο στο Y χρωμόσωμα, αποτελείται από 17 εξόνια, κωδικοποιεί μία ATP – εξαρτώμενη RNA ελικάση και υπάγεται στην οικογένεια των Dead Box πρωτεϊνών. Οι πρωτεΐνες Dead Box δομούνται από 9 συντηρημένα μοτίβα και διαδραματίζουν σπουδαίο ρόλο στην ωρίμανση πρόδρομων μορίων RNA, καθώς και στη βιογένεση του ριβοσώματος. In vitro, έχει αποδειχτεί ότι πρωτεΐνες που υπάγονται σε αυτήν την οικογένεια έχουν δράση ATP – εξαρτώμενης RNA ελικάσης. Παρόλα αυτά, η ακριβής λειτουργία της παραγόμενης πρωτεΐνης δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί.[3,4,19]

Το γονίδιο UTY απαντάται μόνο σε ένα αντίγραφο στο Y χρωμόσωμα και το ομόλογό του στο ποντίκι κωδικοποιεί ένα H – Y αντιγόνο. Τέλος, το γονίδιο TB4Y κωδικοποιεί μία ισομορφή της πρωτεΐνης tymosin B4, η οποία πιθανώς εμπλέκεται στην αποικοδόμηση της ακτίνης.[3,4,19]

Οι ελλείψεις της AZFa δεν προκαλούν SCOS (Sertoli Cell Only Syndrome), παρά μόνο όταν μαζί με το USP9Y λείπει και το γειτονικό του DBY (Dead Box Y). Αντίθετα, όταν προσβάλλεται μόνο το ένα γονίδιο (για παράδειγμα το USP9Y), όπως στην περίπτωση της προαναφερθείοας σημειακής μετάλλαξης, το αποτέλεσμα είναι μία ηπιότερη φαινοτυπική αναστολή της ωρίμανσης των σπερματογονίων, αφού σε μερικά σπερματικά σωληνάρια παρατηρούνται λίγα σπερματοκύτταρα στο στάδιο της παχυταινίας.[12,22] Συνεπώς, η έλλειψη των δύο γονιδίων της AZFa επιτείνει τη διαταραχή στη σπερματογένεση, πράγμα που συμφωνεί με προηγούμενες παρατηρήσεις, κατά τις οποίες μεγαλύτερες ελλείψεις που αφορούν περισσότερα γονίδια του Y ελαττώνουν τις πιθανότητες ανεύρεσης σπερματοζωαρίων για ICSI.[12,23]

2.3.2. Περιοχή AZFb

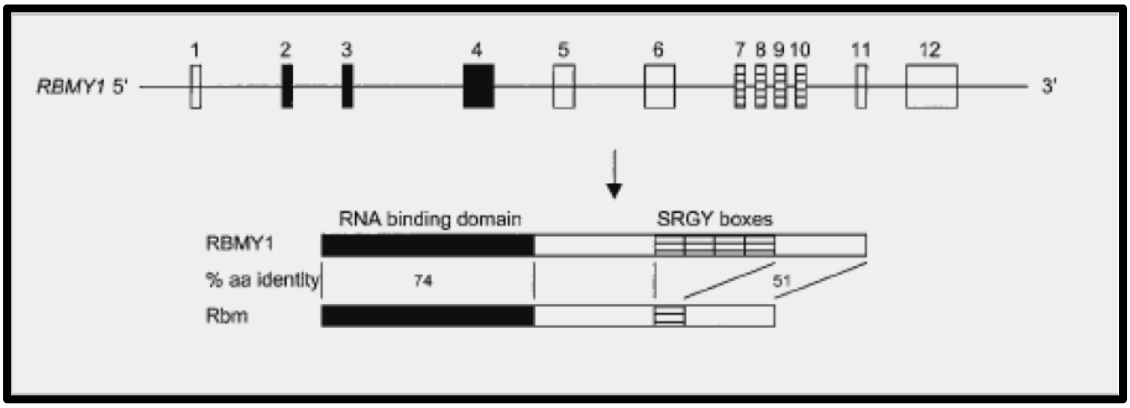
Η AZFb εντοπίζεται μεταξύ των AZFa και AZFc, κεντρικότερα στην Yq11 περιοχή και, σύμφωνα με πρόσφατα δεδομένα, εξαιτίας της παρουσίας δυο πιθανών θέσεων ανασυνδυασμού, η έκτασή της κυμαίνεται από 6,2Mb έως 7,7Mb.[3,10,12] Σε αυτήν, έχουν προσδιοριστεί οκτώ γονίδια, το eIF – 1A (eukaryotic translation initiation factor 1A), το SMCY (Selected mouse cDNA on the Y chromosome), το HSFY (Heat Shock Factor Y chromosome), που απαντώνται μόνο στην AZFb, καθώς και ένα αντίγραφο του BPY2 γονιδίου και του CDY (Chromodomain Y) και δύο αντίγραφα του DAZ γονιδίου που βρίσκονται στην αλληλοεπικαλυπτόμενη περιοχή με την AZFc. Επίσης, στην AZFb απαντώνται και δύο οικογένειες γονιδίων σε πολλαπλά αντίγραφα, το RBM (RNA binding motif) και το PRY.[3,10] (***Εικόνα 9***)



Εικόνα 9. Τα γονίδια της περιοχής AZFb.[12,21]

Το γονίδιο eIF – 1A κωδικοποιεί μία ισομορφή του eIF – 1A εναρκτήριου παράγοντα της μετάφρασης και διαθέτει ομόλογο στο X χρωμόσωμα (eIF – 1AX), το οποίο εκφράζεται σε όλους τους ιστούς, με υψηλότερα επίπεδα έκφρασης στους όρχεις. Ο ρόλος του στη σπερματογένεση δεν έχει διευκρινιστεί, ενώ δεν έχει προσδιοριστεί κάποιο έλλειμμα στο οποίο να απομακρύνεται αποκλειστικά το συγκεκριμένο γονίδιο.[3,4,10]

Περισσότερα από 30 γονίδια και ψευδογονίδια RBM είναι διασκορπισμένα και στους δύο βραχίονες του Y χρωμοσώματος. Στην AZFb περιοχή υπάρχει τουλάχιστον ένα λειτουργικό αντίγραφο του γονιδίου RBM. Το γονίδιο RBM είναι το πρώτο που προσδιορίστηκε στην AZFb περιοχή, κλωνοποιήθηκε και υπάγεται στην οικογένεια των RBMY γονιδίων. Η οικογένεια αυτή υποδιαιρείται σε 6 υποοικογένειες, εκ των οποίων η RBMY – I περιλαμβάνει γονίδια τα οποία μεταγράφονται. (***Εικόνα 10***) Το γονίδιο αυτό απαντάται σε πολλαπλά αντίγραφα σε όλα τα πλακουντοφόρα θηλαστικά και αποτελείται από 12 εξόνια. Οι πρωτεΐνες RBMY δομούνται από μία περιοχή δέσμευσης RNA (RNA binding domain) στο αμινοτελικό άκρο τους και ένα καρβοξυτελικό άκρο που αποτελείται από 4 επαναλήψεις 37 αμινοξέων. Αυτή η περιοχή ονομάζεται SRGY box και περιέχει την αλληλουχία σερίνη – αργινίνη – γλυκίνη – τυροσίνη. Το γονίδιο RBMY εκφράζεται αποκλειστικά στα πρόδρομα κύτταρα των σπερματοζωαρίων στους όρχεις (σπερματογόνια, σπερματοκύτταρα και κυλινδρικές σπερματίδες). Ο πραγματικός ρόλος του RBMY στη σπερματογένεση δεν έχει αποσαφηνιστεί. Ωστόσο, το γεγονός ότι πρόκειται για πυρηνική πρωτεΐνη που απαντάται σε όλα τα πρόδρομα κύτταρα δείχνει ότι ενδεχομένως να διαθέτει πολλαπλούς ρόλους που σχετίζονται με την εναλλακτική συναρμογή πρόδρομων μορίων RNA. Το γονίδιο RBM θεωρείται σημαντικό υποψήφιο γονίδιο για την εμπλοκή του στη σπερματογένεση εξαιτίας τόσο της ιστοειδικότητας της έκφρασής του, όσο και του γεγονότος ότι η απώλεια του ομολόγου του στο ποντίκι (mouse Rbm) οδηγεί σε στειρότητα.[3]



Εικόνα 10. Σχηματική αναπαράσταση της δομής του γονιδίου και της πρωτεΐνης RBMY1. Τα εξόνια 2 – 4 σημαίνονται με μαύρο και κωδικοποιούν την περιοχή δέσμευσης του RNA, ενώ κάθε ένα από τα εξόνια 7 – 10 κωδικοποιεί το SRGY box της πρωτεΐνης. Η ομολογία μεταξύ των πρωτεϊνών του ανθρώπου και του ποντικού παρουσιάζεται στο κατώτερο τμήμα της εικόνας.[3,4]

Το γονίδιο RBM διαθέτει μία περιοχή σύνδεσης με το RNA.[12,24,25] Η περιοχή αυτή αποτελείται από δύο κουτιά, RNP1 και RNP2, τα οποία απαντούν και σε άλλες πρωτεΐνες που εμπλέκονται στο μεταβολισμό των RNA, όπως η πρωτεΐνη hnRNP G (heterogenous nuclear RiboNucleoProtein G), με την οποία παρουσιάζουν ισχυρή ομολογία. Φαίνεται ότι η οικογένεια των γονιδίων RBM περιλαμβάνει τουλάχιστον 30 μέλη, τα οποία κατανέμονται σε όλο το μήκος του Y, ιδιαίτερα στο Yq, καθώς και στην περικεντρική ζώνη του Yp. Μεταξύ αυτών αναφέρονται τα RBM1 και RBM2. Ωστόσο, τα περισσότερα δεν κωδικοποιούν καμία πρωτεΐνη, άρα είναι ψευδογονίδια. Μόνο το ή τα αντίγραφα που εντοπίζονται στην περιοχή AZFb εκφράζονται ως πυρηνική πρωτεΐνη σύνδεσης στο RNA.[12,26] Έτσι εξηγείται γιατί, μεταξύ πενήντα φυσιολογικών ατόμων του ιαπωνικού πληθυσμού, δε βρέθηκε ποτέ το αντίγραφο RBM2.[12,27] Ο πολυμορφισμός αυτός, με απουσία του αντιγράφου σε υπογόνιμους αλλά και σε γόνιμους άντρες, παρατηρείται και σε άλλα έθνη αλλά σε μικρότερη συχνότητα.[12]

Η αποτύπωση κατά Northern έδειξε ότι η έκφραση των γονιδίων αυτών περιορίζεται στους όρχεις και, μετά την εφαρμογή του κατάλληλου αντισώματος αντι – RBM, ανιχνεύτηκε η πρωτεΐνη στους πυρήνες των σπερματογονίων Α και Β, τα σπερματοκύτταρα και τις στρογγυλές σπερματίδες.[12,28,29] Αντίδραση δεν παρατηρήθηκε στις επιμήκεις σπερματίδες ή τα σωματικά κύτταρα του όρχι. Η εντόπιση της RBM συμπίπτει με την αιχμή της μεταγραφικής δραστηριότητας των γεννητικών κυττάρων, τα οποία μεταγράφουν τα γονίδια τους μόνο κατά τα πρώτα στάδια της μείωσης. Η έκφραση του RBM παρατηρείται, επίσης και στους εμβρυϊκούς και άνηβους όρχεις, γεγονός που υποδηλώνει ότι το γονίδιο παίζει ρόλο στα αρχικά στάδια της μείωσης αλλά και στην ανάπτυξη των γεννητικών κυττάρων.[12]

Οι ελλείψεις των γονιδίων αυτών μελετήθηκαν με αποτύπωση κατά Southern και PCR.[12,24,30,31,32,33] Αλλά, επειδή τα RBM1 και RBM2 είναι διάσπαρτα στο μακρό και το βραχύ σκέλος του Y δεν είναι εύκολη η ερμηνεία των αρνητικών αποτελεσμάτων της PCR. Για να υπερπηδηθεί αυτή η αμφιβολία, ο Vogt και οι συνεργάτες του έκαναν και τα δύο, δηλαδή PCR και Southern blotting με Cdna του RBM1 και επιβεβαίωσαν τις ελλείψεις του RBM1.[12,34] Αλλά, αυτό δε χρειάζεται όταν υπάρχουν δείκτες ειδικοί για κάθε γονίδιο RBM.[5,12,20,34,35,36]

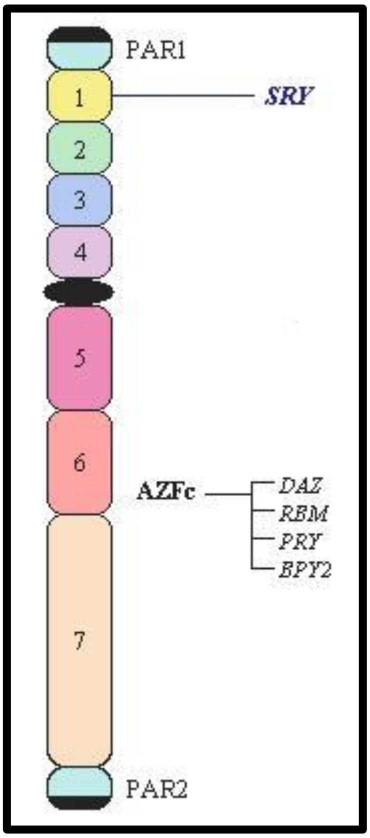
Δύο λειτουργικά αντίγραφα του γονιδίου PRY απαντώνται στην αλληλοεπικαλυπτόμενη AZFbc περιοχή. Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί μία πρωτεϊνική φωσφατάση, η οποία πιθανόν εμπλέκεται στην απόπτωση ελλαττωματικών σπερματοζωαρίων και εκφράζεται στις σπερματίδες και τα ώριμα σπερματοζωάρια.[3]

Υπάρχουν δύο αντίγραφα του γονιδίου HSFY. Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί μία νέα πρωτεΐνη θερμικού σοκ (heat shock protein). Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη εκφράζεται ιστοειδικά στα κύτταρα Sertoli και τα γεννητικά κύτταρα και εμφανίζει μία σταδιοεξαρτώμενη μεταφορά από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα κατά τη σπερματογένεση. Το γονίδιο αυτό διαθέτει ένα ομόλογο, το HSP2 που εντοπίζεται στην θέση 6p22, και κωδικοποιεί ένα μεταγραφικό παράγοντα θερμικού σοκ.[3]

Η βιολογική λειτουργία του προϊόντος του γονιδίου SMCY παραμένει άγνωστη αλλά κωδικοποιεί ένα ειδικό αντιγόνο ιστοσυμβατότητας που απαντάται στα αρσενικά άτομα.[3]

2.3.3. Περιοχή AZFc

Η AZFc εντοπίζεται κοντά στην ετεροχρωματινική περιοχή του Yq και το μέγεθός της εκτιμάται στις 3,5Mb.[3,12] Σε αυτήν έχουν προσδιοριστεί πέντε γονίδια, το DAZ (Deleted in Azoospermia), το CDY (Chromodomain Y1), το BPY2 (Basic protein Y2), το PRY(PTA – BL related Y) και το TTY2 (testis transcript Y2).[3] (***Εικόνα 11***)



Εικόνα 11. Τα γονίδια της περιοχής AZFc.[12,21]

Το 2001, δημοσιεύτηκε η πλήρης νουκλεοτιδική αλληλουχία της AZFc, η οποία παρουσιάζει ιδιαίτερη δομή και γενετική σύνθεση.[12,37] Αποτελείται από δύο μείζονα παλίνδρομα (επαναλαμβανόμενες παλινδρομικές αλληλουχίες, η μεγαλύτερη των οποίων είναι 3Mb), που περιέχουν έξι οικογένειες ενισχυμένων επαναλήψεων (amplicons). Πιθανώς, τα παλίνδρομα δημιουργήθηκαν κατά τη διάρκεια της εξέλιξης, με τυχαίο διπλασιασμό και αναστροφή. Ο ομόλογος ανασυνδυασμός μεταξύ δύο επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών, στην περίμετρο της περιοχής AZFc, είναι το άμεσο αίτιο της έλλειψης αυτής της περιοχής και ο λόγος για τον οποίο το μήκος της έλλειψης είναι ίδιο, σε πολλούς άντρες. Το μέγεθος της περιοχής AZFc είναι περίπου 3,5Mb και περιλαμβάνει επτά ξεχωριστές οικογένειες γονιδίων με, συνολικά, 19 μεταγραφικές μονάδες, που εκφράζονται αποκλειστικά στους όρχεις. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η έλλειψη ολόκληρης της περιοχής δε δημιουργεί κανένα άλλο πρόβλημα, εκτός της διαταραχής της σπερματογένεσης, γεγονός που υποδηλώνει την απόλυτη ειδίκευση αυτής, για τη συγκεκριμένη λειτουργία.[12]

Τα γονίδια CDY, BPY2 και PRY απαντώνται στην αλληλοεπικαλυπτόμενη AZFbc περιοχή. Η λειτουργία του προϊόντος του γονιδίου TTY2, το οποίο απαντάται σε τρία αντίγραφα, παραμένει άγνωστη. Τα γονίδια αυτά εκφράζονται ιστοειδικά στους όρχεις και είναι ειδικά του Υ χρωμοσώματος.[3]

Το γονίδιο DAZ απαντάται σε πολλαπλά αντίγραφα εντός της AZFc περιοχής και θα αναλυθεί στο Κεφάλαιο 3.

Το γονίδιο CDY κωδικοποιεί μία πυρηνική πρωτεΐνη, η οποία απαντάται στις σπερματίδες και έχει δράση ακετυλοτρανσφεράσης (ειδικά στην H4 ιστόνη). Το γονίδιο αυτό διαθέτει ένα ομόλογο στο χρωμόσωμα 6, το οποίο εκφράζεται σε όλους τους ιστούς, σε αντίθεση με το CDY που εκφράζεται ιστοειδικά στους όρχεις.[3]

Το γονίδιο BPY2 εκφράζεται ιστοειδικά στους όρχεις και η ανάλυση της τρισδιάστατης δομής της πρωτεΐνης έδειξε την πιθανή ισχυρή αλληλεπίδραση με το DNA ή το RNA.[3]

Οι ελλείψεις της περιοχής AZFc αποτελούν το 3,5 έως 18% των περιπτώσεων εκκριτικής αζωοσπερμίας και ολιγοζωοσπερμίας. Η αναγωγή στο γενικό πληθυσμό καταλήγει σε 1/10.000 γεννήσεις αρρένων, φορέων της έλλειψης, de novo, που αντιστοιχεί στην πλέον αυξημένη συχνότητα ελλείψεων, στη γενετική του ανθρώπου.[12,38]

Οι ελλείψεις της περιοχής AZFc ελαττώνουν τόσο πολύ τον αριθμό των σπερματοζωαρίων στο σπέρμα, ώστε η υπογονιμότητα ή η στειρότητα, που προκαλείται, να είναι ο κανόνας και η φυσιολογική τεκνοποίηση η εξαίρεση. Παρατηρούνται συχνότερα από τις ελλείψεις των δύο άλλων περιοχών AZF, σε ποσοστό περίπου 13% των αζωοσπερμικών (12/89) και 6% των ολιγοζωοσπερμικών αντρών.[12,20,34,37,38]

Συνοπτικά, στον ***Πίνακα 2***, παρουσιάζονται τα γονίδια των περιοχών AZF.[1]

Περιοχή	**Μήκος**	**Συχνότητα**	**Κυριότερα γονίδια**	**Γονότυπος/φαινότυπος**
AZFa	792kb	1% – 2%	DFFRY, UPS6Y, DBY	Σύνδρομο SCO
AZFb	1 – 3Mb (< 3,2Mb)	Ενδιάμεση, Μεταξύ AZFa και AZFc	RBMY	Διακοπή παραγωγής σπερματοκυττάρων
AZFc	3,5Mb	2% – 10%	DAZ, CDY	Ήπια/σοβαρή ολιγοσπερμία, αζωοσπερμία
AZFd		Μη καθορισμένη		Ήπια ολιγοσπερμία ή φυσιολογικός αριθμός σπερματοζωαρίων με ανώμαλη μορφολογία

Πίνακας 2. Γονίδια των περιοχών AZF.[1,2]

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3ο: ΓΟΝΙΔΙΟ DAZ

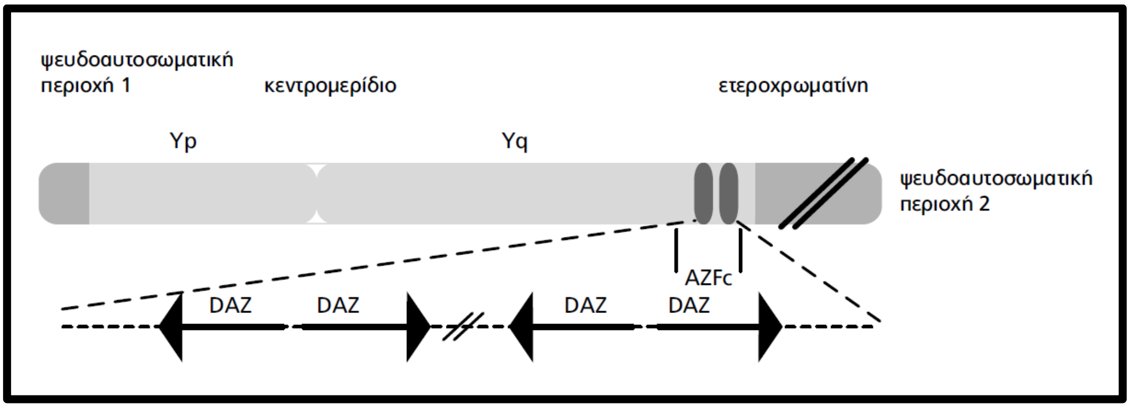
Στο τρίτο κεφάλαιο της εργασίας παρουσιάζονται πληροφορίες σχετικά με τη δομή και τη χρησιμότητα του γονιδίου DAZ.

Στην οικογένεια των πρωτεϊνών DAZ ανήκουν οι BOULE, DAZL και DAZ. Οι DAZL και DAZ εμπλέκονται στην ανάπτυξη των βλαστικών γεννητικών κυττάρων, τη διαφοροποίηση και την ωρίμανση αυτών, ενώ η BOULE είναι απαραίτητη, αποκλειστικά, για την εξέλιξη της μείωσης. Τα αρσενικά της Δροσόφιλα που φέρουν μεταλλάξεις του γονιδίου Boule είναι στείρα και η μείωση των σπερματοκύτταρων έχει διακοπεί στη φάση μετάφασης.[12,39,40,41,42,43] Στον άνθρωπο, το γονίδιο BOULE δεν εκφράζεται στα σπερματογόνια αλλά ανιχνεύεται στο κυτταρόπλασμα των σπερματοκυττάρων, κατά το στάδιο της παχυταινίας. Τονίζεται ότι η έκφρασή του συνεχίζεται στις στρογγυλές σπερματίδες και τα σπερματοζωάρια Το γονίδιο DAZL εκφράζεται στις γονάδες και των δύο φυλών, ενώ το DAZ, δεδομένου ότι εντοπίζεται στο Y χρωμόσωμα, βρίσκεται μόνο στους όρχεις. Οι πρωτεΐνες DAZL και DAZ, κατά τη διάρκεια της μείωσης, μεταφέρονται από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα. Τα ποντίκια που είναι ομόζυγα για μηδενική μετάλλαξη του γονιδίου Dazl (δεν παράγεται καθόλου το γονίδιο) είναι στείρα και στα δύο φύλα.[12,39,44] Στον άνθρωπο, παρατηρείται ελαττωμένη έκφραση όλων των μελών της οικογένειας DAZ σε υπογόνιμους άντρες με ανεπαρκή σπερματογένεση.[12,45]

Η οικογένεια των γονιδίων DAZ (Deleted in Azoospermia), που είναι μία από τις επτά οικογένειες της περιοχής AZFc, αποτελεί την πρώτη που ανακαλύφθηκε στο Y χρωμόσωμα και της αποδόθηκε ρόλος σχετικός με τη σπερματογένεση.[12,39,46] Το ίδιο γονίδιο περιγράφηκε και από τον Vogt και τους συνεργάτες του και ονομάστηκε SPGY (Spermatogenesis Gene Y).[12,34] Τα ομόλογα του DAZ, σε άλλα είδη, είναι το Boule στη Drosophila, το Dazl στο ποντίκι, το Xdazl στα αμφίβια, το daz – l στους νηματώδεις σκώληκες.[12,40,44,47,48,49,50] Σε αντίθεση προς το γονίδιο DAZ, τα Boule, Dazl, Xdazl, daz – l, απαντούν σε ένα μόνο αντίγραφο και εντοπίζονται σε αυτοσώματα.[12]

Στον άνθρωπο, το γονίδιο DAZ υπάρχει σε τέσσερα, σχεδόν ίδια, αντίγραφα, διευθετημένα σαν δύο ομάδες από ανεστραμμένα ζεύγη (3'<—5':: 5'—>3').[1,12,37,42,51] Στην αρχή, θεωρήθηκε ότι υπήρχε ένα μόνο αντίγραφο του γονιδίου DAZ αλλά, αργότερα, από την ένταση των ταινιών στην αποτύπωση κατά Southern και από τη μελέτη των πολυμορφισμών της περιοχής AZFc, αποδείχτηκε ότι υπάρχουν τέσσερα αντίγραφα γονιδίων DAZ. |Στο χρωμόσωμα 3, υπάρχει, επίσης, το γονίδιο DAZL και είναι γνωστό ότι, κατά τη διάρκεια της εξέλιξης, τα γονίδια DAZ προήλθαν από μετάθεση στο Y και μεταγενέστερες τροποποιήσεις ενός προγονικού γονιδίου του DAZLA 1 (DAZ like – autosomal 1) του χρωμοσώματος 3 του ανθρώπου.[1,12,42,52]

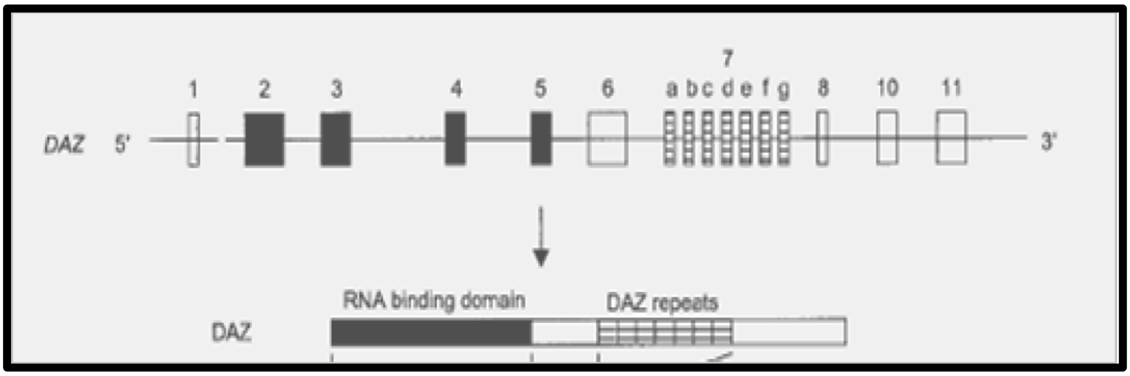
Το γονίδιο DAZ έχει μέγεθος περίπου 380kb.[1] Εντοπίζεται στο μακρό βραχίονα του Y χρωμοσώματος και κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη, η οποία διαθέτει μία δεσμευτική περιοχή για το RNA (RNA binding domain) στο αμινοτελικό της άκρο και μία επαναλαμβανόμενη αλληλουχία 24 αμινοξέων που ονομάζεται DAZ επαναλήψεις στο καρβοξυτελικό άκρο.[2,53] (***Εικόνα 12***)



Εικόνα 12. Σχηματική απεικόνιση της χωροταξικής τοποθέτησης των γονιδίων DAZ πάνω στο χρωμόσωμα Y.[2,54]

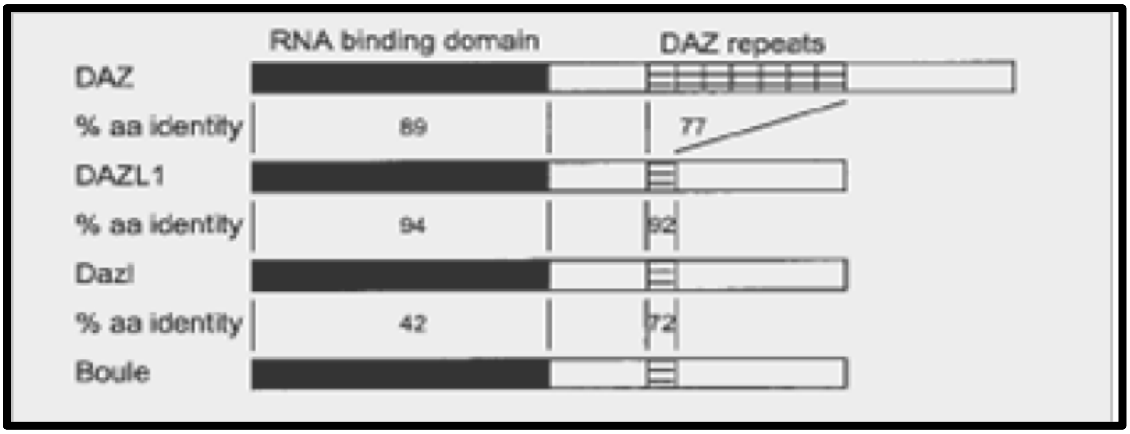
Αν και η γενωμική του δομή και οι μηχανισμοί που προκαλούν τα ελλείμματα έχουν πλέον αποσαφηνιστεί[2,37], η βιολογική του λειτουργία είναι ακόμα υπό διερεύνηση. Υπάρχουν 4 αντίτυπα του γονιδίου DAZ με ομολογία πάνω από 99,9%. Τα γονίδια DAZ1, DAZ2, DAZ3, DAZ4 φαίνεται να διαφέρουν μεταξύ τους στον αριθμό των επαναλήψεων του εξονίου 7. Ο Yen και οι συνεργάτες του έδειξαν επίσης ότι τα γονίδια DAZ παρουσιάζουν υψηλό ποσοστό πολυμορφισμού στις επαναλαμβανόμενες περιοχές του DAZ.[2,52] Τα μέλη της οικογένειας DAZ είναι οργανωμένα σε ζεύγη με τα αντίτυπα του ζεύγους DAZ1/DAZ2 και του ζεύγους DAZ3/DAZ4 να έχουν αντίθετο προσανατολισμό. (***Εικόνα 12***) Το κάθε ζεύγος χωρίζεται από μία μη – επαναλαμβανόμενη αλληλουχία 20kb που είναι η περιοχή του υποκινητή των γονιδίων. Η οικογένεια DAZ, όπως και η RBMY, κωδικοποιεί για μία ορχεο – ειδική πρωτεΐνη που περιέχει ένα μοναδικό δεσμευτικό παράγοντα του RNA και 8 ως 24 αντίγραφα από μία αλληλουχία αμινοξέων που ονομάζεται «DAZ επαναλαμβανόμενη μονάδα».[2,53,54]

Το γονίδιο δομείται από τουλάχιστον 16 εξόνια και η έκταση που καταλαμβάνει είναι 42kb. Στο εξόνιο 1 απαντάται το κωδικόνιο έναρξης, τα εξόνια 2 – 5 κωδικοποιούν τη δεσμευτική περιοχή για το RNA και τα εξόνια 7a – 7g κωδικοποιούν τις DAZ επαναλήψεις. (***Εικόνα 13***)



Εικόνα 13. Σχηματική αναπαράσταση της δομής του γονιδίου και της πρωτεΐνης DAZ. Τα εξόνια 2 – 5 σημαίνονται με μαύρο και κωδικοποιούν την περιοχή δέσμευσης για το RNA, ενώ κάθε ένα από τα εξόνια 7a – 7g κωδικοποιεί τις DAZ επαναλήψεις της πρωτεΐνης.[3,4]

Το γονίδιο DAZ εκφράζεται αποκλειστικά στα προγονικά κύτταρα των γονάδων των αρσενικών ατόμων. Είναι ομόλογο ενός αυτοσωμικού γονιδίου, το οποίο θα αναλυθεί στο Κεφάλαιο 4. Επίσης, εμφανίζει υψηλή ομολογία με το γονίδιο boule της Drosophila, του οποίου οι μεταλλάξεις οδηγούν σε διακοπή της σπερματογένεσης. (***Εικόνα 14***)



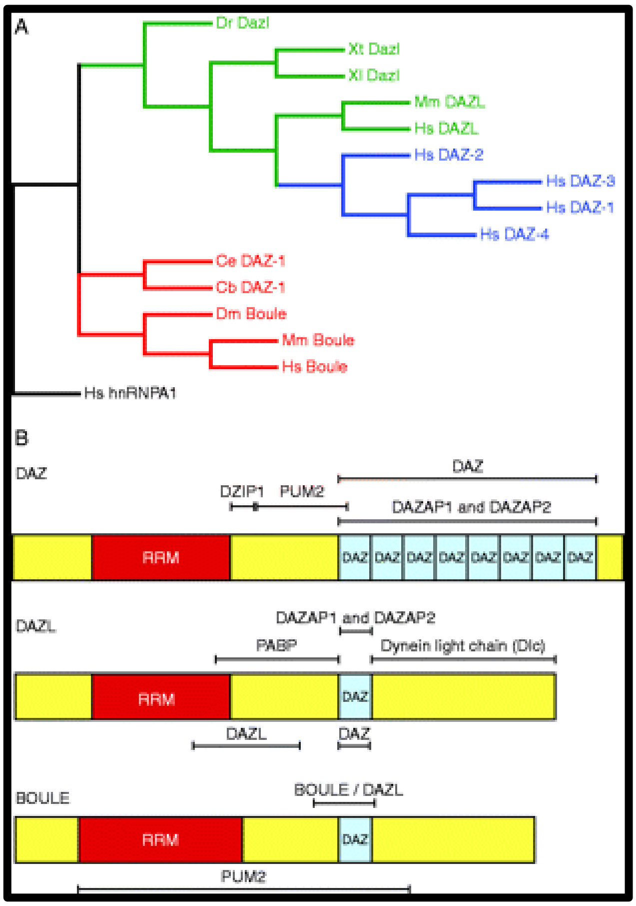
Εικόνα 14. Ποσοστό ταυτοσημίας μεταξύ των πρωτεϊνών DAZ (human), DAZL1 (human), Dazl1 (mouse) και boule (Drosophila).[3,4]

Τα γονίδια της οικογένειας DAZ έχουν ενοχοποιηθεί για το 10 έως 15% των περιπτώσεων αντρικής στειρότητας στους ανθρώπους.[41,55,56] Τα γονίδια DAZ είναι παρόντα μόνο σε πρωτεύοντα θηλαστικά, συμπεριλαμβανομένου των πιθήκων και των ανθρώπων.[41]

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4ο: ΓΟΝΙΔΙΟ DAZL

Στο τέταρτο κεφάλαιο της εργασίας παρουσιάζονται πληροφορίες σχετικά με τη δομή και τη χρησιμότητα του γονιδίου DAZL.

Το γονίδιο DAZL εδράζεται στο χρωμόσωμα 3 (3p24), διαθέτει μόνο μία DAZ επανάληψη και ονομάζεται DAZL1 ή DAZLA (DAZ like autosomal 1). Προτάθηκε ότι το γονίδιο DAZ έχει προέλθει μετά από μετάθεση ενός αντιγράφου του DAZL1 και μεταγενέστερες τροποποιήσεις ενός προγονικού γονιδίου του DAZLA 1 (DAZ like – autosomal 1) του χρωμοσώματος 3 του ανθρώπου.[1,3,4,52] Εκφράζεται ιστοειδικά στους όρχεις. (***Εικόνα 15***)



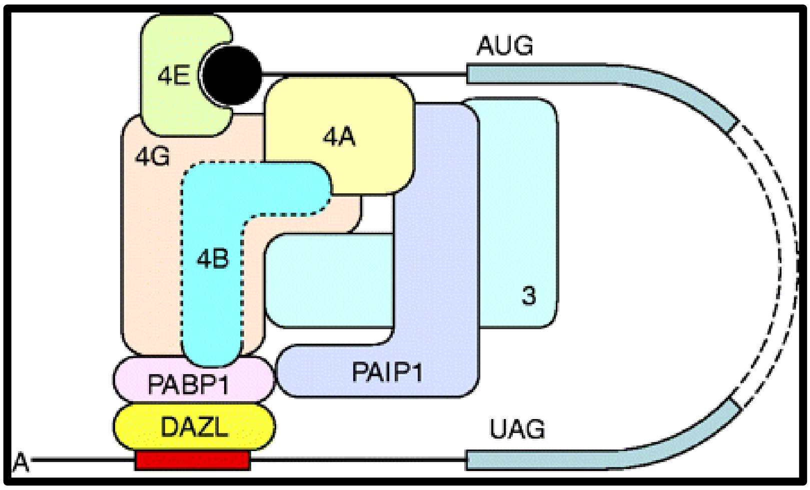
Εικόνα 15. Η εξέλιξη των γονιδίων DAZL και οι κυριότερες αλληλεπιδράσεις τους.[57]

Τα γονίδια DAZ και DAZL εκφράζονται στο μεγαλύτερο μέρος της ζωής των γεννητικών κυττάρων. Απαιτούνται για την ανάπτυξη των αρχέγονων γεννητικών κυττάρων, καθώς και τη διαφοροποίηση και την ωρίμανση των γεννητικών κυττάρων.[39]

Το γονίδιο DAZL είναι εξαιρετικά ομόλογο προς το γονίδιο DAZ, με 83% ομοιότητα στην περιοχή του cDNA. Τόσο το γονίδιο DAZ όσο και το DAZL αποτελούν δεσμευτικές πρωτεΐνες του RNA.[1,58] Πιστεύεται πως το γονίδιο DAZL είναι ο πατέρας του γονιδίου DAZ και προέκυψε 30.000.000 έως 40.000.000 χρόνια πριν.[1]

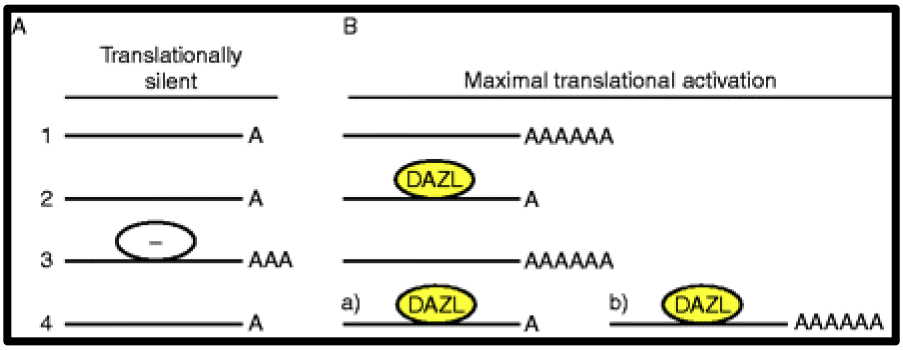
Το 1994, ο Lilford και οι συνεργάτες του θεώρησαν ότι μέχρι και το 60% των μη διαγνωσμένων περιπτώσεων αντρικής στειρότητας προκύπτει από αυτοσωματικές υπολειπόμενες μεταλλάξεις.[1,59] Μία νέα μετάλλαξη στο νουκλεοτίδιο 386 στο εξόνιο 3 του γονιδίου DAZL, ταυτοποιήθηκε σε ορισμένους υπογόνιμους άντρες. Η μετάλλαξη βρίσκεται εντός της περιοχής του RNA που συνδέεται με το γονίδιο DAZL και οδηγεί σε μεταβολή της δομής του τελευταίου.[1,60] Ωστόσο, δεν έχουν αναφερθεί περιπτώσεις μεταλλάξεων στο γονίδιο DAZL στους υπογόνιμους άντρες στην Ινδία.[1,61]

Η ομοζυγωτία στο γονίδιο DAZL οδηγεί σε παρεμπόδιση της ανάπτυξης των σπερματοκυττάρων, λόγω αδυναμίας σύναψης των χρωμοσωμάτων κατά τη μετάβασή τους από το στάδιο της λεπτοταινίας σε ζυγοταινία.[41,62] Τα mRNAs που κωδικοποιούν μία κύρια πρωτεΐνη του συμπλέγματος, την SYCP3, και το DEAD – box RNA ελικάση (DDX4/MVH) έχουν αναγνωριστεί ως στόχοι του γονιδίου DAZL.[41,55,63] Το γονίδιο DAZL ενεργοποιεί τη μετάφραση των SYCP3 και DDX4/MRNA MVH.[41] (***Εικόνα 16***)



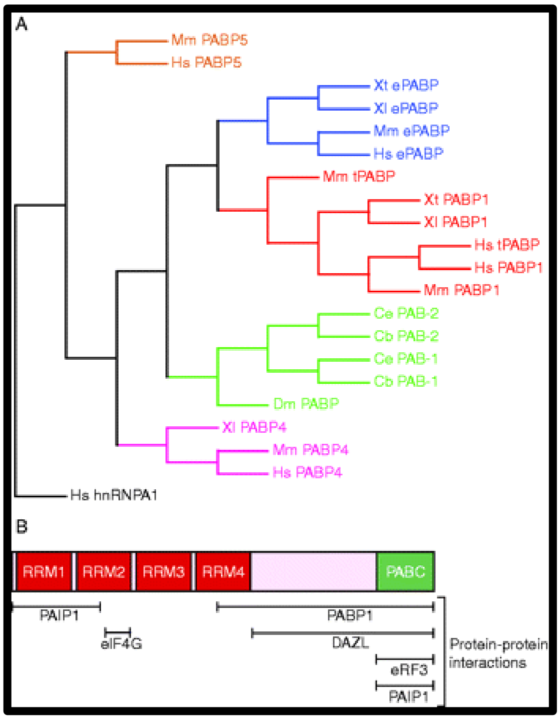
Εικόνα 16. Μοντέλο για τη μεσολάβηση του γονιδίου DAZL στη μεταγραφική διέγερση των mRNAs των πρωτεϊνών – στόχων.[57]

Ο Collier και οι συνεργάτες του ανέλυσαν το μηχανισμό με τον οποίο το γονίδιο DAZL διεγείρει τη μετάφραση του mRNA μέσω ανάλυσης της πρόσδεσής σε ωοκύτταρα του Xenopus. Σε αυτήν την ανάλυση, χρησιμοποιήθηκαν συνθετικά μόρια mRNAs εγχύθηκαν μέσα σε ωοκύτταρα Xenopus. Η ανάλυση ανέδειξε ότι το γονίδιο DAZL σε Xenopus, ποντίκι και άνθρωπο οδηγεί σε ενεργοποίηση της διαδικασίας χωρίς να επηρεάζει ιδιαίτερα τη σταθερότητα του mRNA.[41,64] (***Εικόνα 17***)



Εικόνα 17. Μεταγραφική ενεργοποίηση του mRNA κατά τη γαμετογένεση.[57]

Οι ίδιοι ερευνητές απέδειξαν ότι, προκειμένου να ενεργοποιηθεί η διαδικασία της μετάφρασης, απαιτείται σύνδεση του γονιδίου DAZL με την πρωτεΐνη PABP [poly(A) – binding protein].[41,64] (***Εικόνα 18***)



Εικόνα 18. Η εξέλιξη των γονιδίων PABP και οι κυριότερες αλληλεπιδράσεις τους.[57]

Στον ***Πίνακα 3***, αναφέρονται συνοπτικά οι κυριότερες λειτουργίες των πρωτεϊνών PABPs, με τις οποίες αλληλεπιδρά το γονίδιο DAZL.[57]

Πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά με το γονίδιο DAZL	Μοριακή λειτουργία
PABPs	Παράγοντας έναρξης της μετάφρασης
	Σταθερότητα του mRNA
	Παράγοντας καταστολής της μεταγραφής

Πίνακας 3. Λειτουργίες των PABPs.[57,64]

Στον ποντικό δεν υπάρχει γονίδιο DAZ στο Y χρωμόσωμα παρά μόνο το αυτοσωμικό DAZL1. Στοχευμένες μεταλλάξεις στο γονίδιο DAZL1 στον ποντικό οδηγούν σε μη παραγωγή γαμετών τόσο στους όρχεις, όσο και στις ωοθήκες. Το γεγονός αυτό αποδεικνύει τον ουσιώδη ρόλο του γονιδίου αυτού στην ανάπτυξη και την επιβίωση των πρόδρομων κυττάρων των γονάδων.[3,44] Στον άνθρωπο, σε αυτό το γονίδιο έχει αναφερθεί η αλλαγή μίας βάσης (SNP T54A), η οποία αποδείχτηκε ότι δε διαδραματίζει ρόλο στην υπογονιμότητα.[3,65]

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^{ο}: ΧΡΗΣΙΜΟΤΗΤΑ ΓΟΝΙΔΙΟΥ DAZL

Στο πέμπτο κεφάλαιο της εργασίας αναφέρεται η χρησιμότητα του γονιδίου DAZL, σύμφωνα με τα δεδομένα της τρέχουσας βιβλιογραφίας.

Η αντρική υπογονιμότητα αποτελεί ένα από τα κλινικά χαρακτηριστικά ορισμένων συνδρόμων, όπως η πρωτοπαθής ακινησία των μαστιγίων (σύνδρομο Kartagener), ή μεμονωμένο εύρημα μίας γενετικής βλάβης, όπως η συγγενής αμφοτερόπλευρη απουσία του σπερματικού πόρου (ΣΑΑΣΠ) που οφείλεται σε μεταλλάξεις του γονιδίου διαμεμβρανικού ρυθμιστική αγωγιμότητας της κυστικής ίνωσης (CFTR).

Οι χρωμοσωματικές ανωμαλίες έχουν συσχετιστεί επίσης με την αντρική υπογονιμότητα. Το 4,2% των υπογόνιμων αντρών έχει χρωμοσωματικές ανωμαλίες που εμφανίζονται στα φυλετικά χρωμοσώματα, ενώ το 1,5% των υπογόνιμων αντρών έχει χρωμοσωματικές ανωμαλίες των αυτοσωματικών χρωμοσωμάτων. Αυτές διακρίνονται σε μεταθέσεις αυτοσωματικών χρωμοσωμάτων, σε μεταθέσεις κατά Robertson, σε δομικές ανωμαλίες του χρωμοσώματος Χ, σε αναστροφές χρωμοσωμάτων και σε ανευπλοειδίες των φυλετικών χρωμοσωμάτων, όπως το σύνδρομο Klinefelter και το σύνδρομο ΧΥΥ.[2,66]

Η πιθανή συσχέτιση ανάμεσα στις χρωμοσωμικές ανωμαλίες και την αντρική υπογονιμότητα έγινε εμφανής από τα αποτελέσματα των πρώτων μεγάλων μελετών καρυοτύπων υπογόνιμων αντρών. Παρατηρήθηκε ότι, σε σύγκριση με το γενικό πληθυσμό, οι υπογόνιμοι άντρες παρουσίαζαν υψηλότερο ποσοστό χρωμοσωμικών ανωμαλιών (5,8% έναντι 0,6%).

Η αντρική υπογονιμότητα οφείλεται επίσης σε μονογονιδιακές γενετικές βλάβες, σε μεγάλο αριθμό γονιδίων των αυτοσωματικών ή των φυλετικών χρωμοσωμάτων. Στο χρωμόσωμα Υ, που είναι το μικρότερο χρωμόσωμα του ανθρώπου, υπάρχουν περισσότερα από 150 ενεργά γονίδια, ορισμένα από τα οποία απουσιάζουν σε υπογόνιμους άντρες. Οι μονογονιδιακές γενετικές βλάβες μπορεί να έχουν χαρακτήρα συνδρόμου με πολλαπλές κλινικές εκδηλώσεις ή μπορεί να αποτελούν μεμονωμένες εκδηλώσεις που εστιάζονται αποκλειστικά στην υπογονιμότητα.[2]

Οι γενετικές αιτίες της αντρικής υπογονιμότητας μπορούν να χωριστούν σε τρεις κατηγορίες:

Α) Μονογονιδιακές γενετικές βλάβες

1. Συγγενής αμφοτερόπλευρη απουσία του σπερματικού πόρου (ΣΑΑΣΠ) που οφείλεται σε μεταλλάξεις του γονιδίου διαμεμβρανικού ρυθμιστική αγωγιμότητας της κυστικής ίνωσης (CFTR)
2. Πρωτοπαθής ακινησία των μαστιγίων (σύνδρομο Kartagener) και άλλες μονομορφικές ανωμαλίες των σπερματοζωαρίων
3. Γενετικές ανωμαλίες με ενδοκρινικές ή νευρολογικές εκδηλώσεις (όπως το σύνδρομο Kallman, η μυοτονική δυστροφία, το σύνδρομο ευθραύστου Χ και το σύνδρομο Kennedy)

Β) Δομικές και αριθμητικές ανωμαλίες των χρωμοσωμάτων

1. Μεταθέσεις αυτοσωματικών χρωμοσωμάτων
2. Μεταθέσεις κατά Robertson
3. Το σύνδρομο Klinefelter: 47,XXY
4. Σύνδρομο XYY: 47, XYY
5. Δομικές ανωμαλίες του χρωμοσώματος Χ (όπως μικρά ελλείμματα ή μεταθέσεις που αφορούν το χρωμόσωμα Χ και ένα αυτοσωματικό χρωμόσωμα)[2]
6. Αναστροφές χρωμοσωμάτων (περικεντρικές και παρακεντρικές) των χρωμοσωμάτων 1, 3, 5, 6, 9, 10 ή 21.[2,67]

Γ) Μικροελλείμματα στο χρωμόσωμα Υ

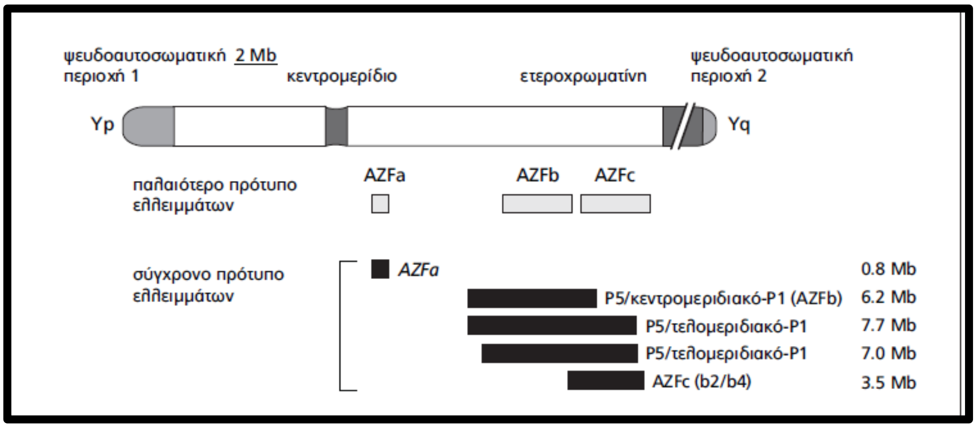
Το χρωμόσωμα Υ είναι ένα ιδιαίτερο χρωμόσωμα που εμπλέκεται συχνά σε δομικές ανωμαλίες διακριτές στο μοριακό ή το κυτταρογενετικό επίπεδο, που αφορούν αποκλειστικά τη γονιμότητα και τη φυλετική διαφοροποίηση. Οι μεταθέσεις και τα μικροελλείμματα αποτελούν τις πιο συχνές δομικές του ανωμαλίες. Οι μεταθέσεις μεταξύ του χρωμοσώματος Υ και των αυτοσωματικών χρωμοσωμάτων αφορούν συνήθως τα χρωμοσώματα 1, 3 και 11 και έχουν βλαπτική επίδραση στη σπερματογένεση. Άλλες ανωμαλίες του χρωμοσώματος Y, όπως το δακτυλιοειδές Y και το δικεντρικό βραχύ σκέλος του Y, παρεμποδίζουν τη σπερματογένεση με αποτέλεσμα την έλλειψη διαφοροποίησης των σπερματογονίων.[2]

Η υπογονιμότητα, όπως επίσης και αρκετές γονιδιακές δυσλειτουργίες του παρακρινικού ελέγχου στον άντρα, έχουν αποδοθεί σε γονίδια του χρωμοσώματος Y, καθώς επίσης και σε γονίδια αυτοσωματικών χρωμοσωμάτων. Ιδιαίτερα, ελλείμματα ενός ή και των τριών υποπεριοχών του παράγοντα αζωοσπερμίας (AZFa, AZFb, AZFc) έχουν σαν αποτέλεσμα την αντρική υπογονιμότητα.[2]

Πιο συγκεκριμένα, στην AZFa και την περιοχή Yq11 ταυτοποιήθηκε μία μεγάλη σε μήκος (10kb) ρετρο-ϊική αλληλουχία, η οποία σχετιζόταν με τον ανθρώπινο ενδογενή ρετροϊό 15 (HERV15). Η αλληλουχία αυτή βρίσκεται σε δύο αντίτυπα στο κεντρομεριδιακό και τελομεριδιακό τμήμα της περιοχής AZFa (HERVyq1 και HERV15yq2). Φαίνεται πως αυτή η ρετρο-ϊική αλληλουχία ευθύνεται για τα ελλείμματα στην περιοχή AZFa, που είναι αποτέλεσμα ομόλογου ανασυνδυασμού ανάμεσα στις δύο ταυτόσημες αλληλουχίες HERV15.[2,68]

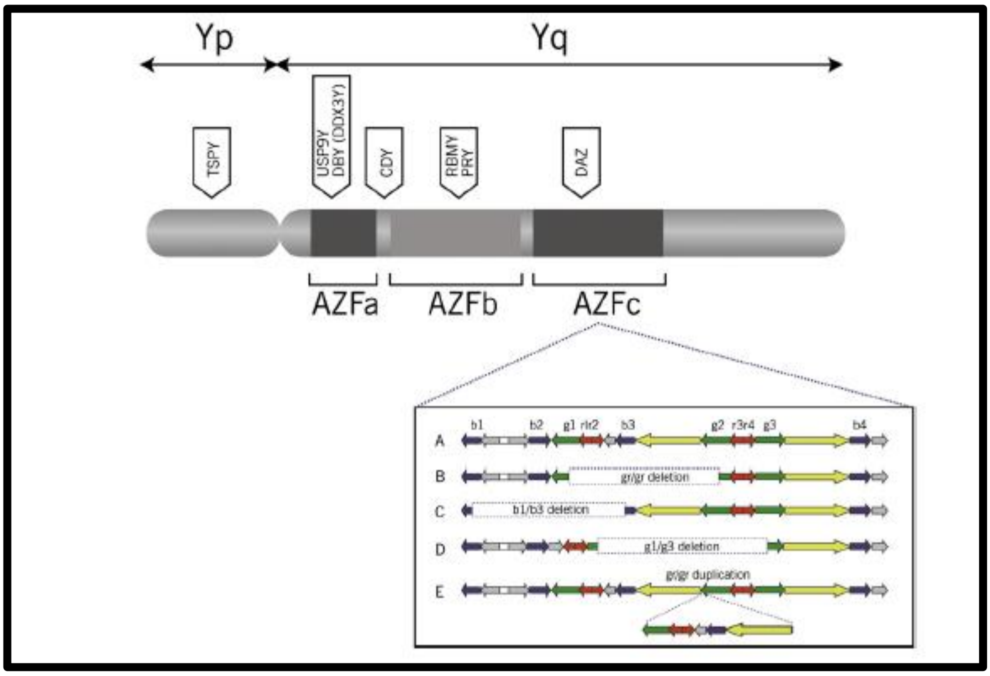
Το πλήρες έλλειμμα της περιοχής AZFb απομακρύνει τμήμα του χρωμοσώματος Y μεγέθους 6,2Mb και αποτελεί συνέπεια του ομόλογου ανασυνδυασμού ανάμεσα στα παλίνδρομα P5/κεντρομεριδιακό P1.[2,18]

Τα συχνά ελλείμματα που ανιχνεύονται στην περιοχή AZFc οφείλονται στη δομή των αμπλικονίων που εντοπίζονται σε αυτήν την περιοχή. Το πιο συχνό έλλειμμα στην περιοχή AZFc αφορά την απομάκρυνση 3,5Mb ανάμεσα στα αμπλικόνια b2/b4, στα παλίνδρομα P3 και P1 αντίστοιχα και αφαιρεί 21 γονίδια και μεταγραφόμενες μονάδες.[2,37] Μερικό έλλειμμα της περιοχής αυτής, που χαρακτηρίζεται gr/gr (g1/g2, r1/r3, r2/r4), έχει περιγραφεί σε υπογόνιμους άντρες με διάφορες ανωμαλίες σπερματογένεσης. Με το έλλειμμα αυτό απομακρύνεται η μισή περιοχή AZFc, μεγέθους 1,6Mb. Το έλλειμμα b2/b3, δε φαίνεται να έχει επίπτωση στη σπερματογένεση.[2,69] (***Εικόνα 19***)



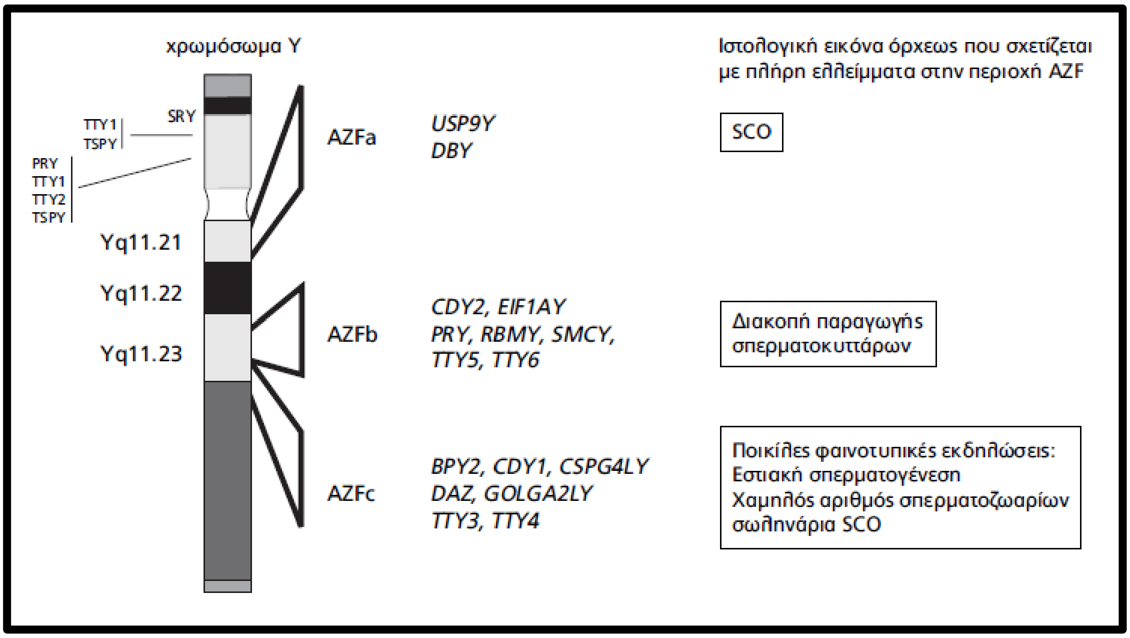
Εικόνα 19. Παλαιότερο και σύγχρονο πρότυπο ελλειμμάτων του χρωμοσώματος Υ.[2,18]

Τα ελλείμματα των περιοχών AZFb και AZFbc είναι αποτέλεσμα τριών τουλάχιστον διαφορετικών προτύπων ελλειμμάτων.[2,18] Έχουν προταθεί δύο κύριοι μηχανισμοί σύμφωνα με τους οποίους τα ελλείμματα αυτά είναι αποτέλεσμα ομόλογου ανασυνδυασμού ανάμεσα στα παλίνδρομα P5/P1 (7,7Mb και απομακρύνονται 42 μεταγραφικές μονάδες) ή μεταξύ των P4/P1 (7Mb και απομακρύνονται 38 μεταγραφικές μονάδες).[2,18] (***Εικόνα 20***)



Εικόνα 20. Εικόνα του χρωμοσώματος Υ, όπου απεικονίζονται οι περιοχές AZF και τα γονίδιά τους. Στη μεγενθυμένη εικόνα, απεικονίζονται τα συχνότερα μικρο – ελλείμματα. (A: Φυσιολογική περιοχή AZFc – B: έλλειμμα gr/gr – C: έλλειμμα b1/b3 – D: έλλειμμα g1/g3 – E: διπλασιασμός gr/gr).[20]

Στην ***Εικόνα 21***, παρουσιάζονται τρία διαφορετικά μικροελλείμματα που ανιχνεύονται στο χρωμόσωμα Yq11 και έχουν χαρακτηριστεί “de novo” σε άντρες με ιδιοπαθή υπογονιμότητα. Στην περιοχή AZFa, σχετίζεται με την ύπαρξη του συνδρόμου Sertoli-cell-only (SCOS), στην περιοχή AZFb σχετίζεται με το φαινότυπο της πλήρους διακοπής παραγωγής σπερματοκυττάρων (Complete Spermatocyte Arrest) και στην περιοχή AZFc σχετίζεται με ευρύ φάσμα φαινοτυπικών εκδηλώσεων.[2,34]



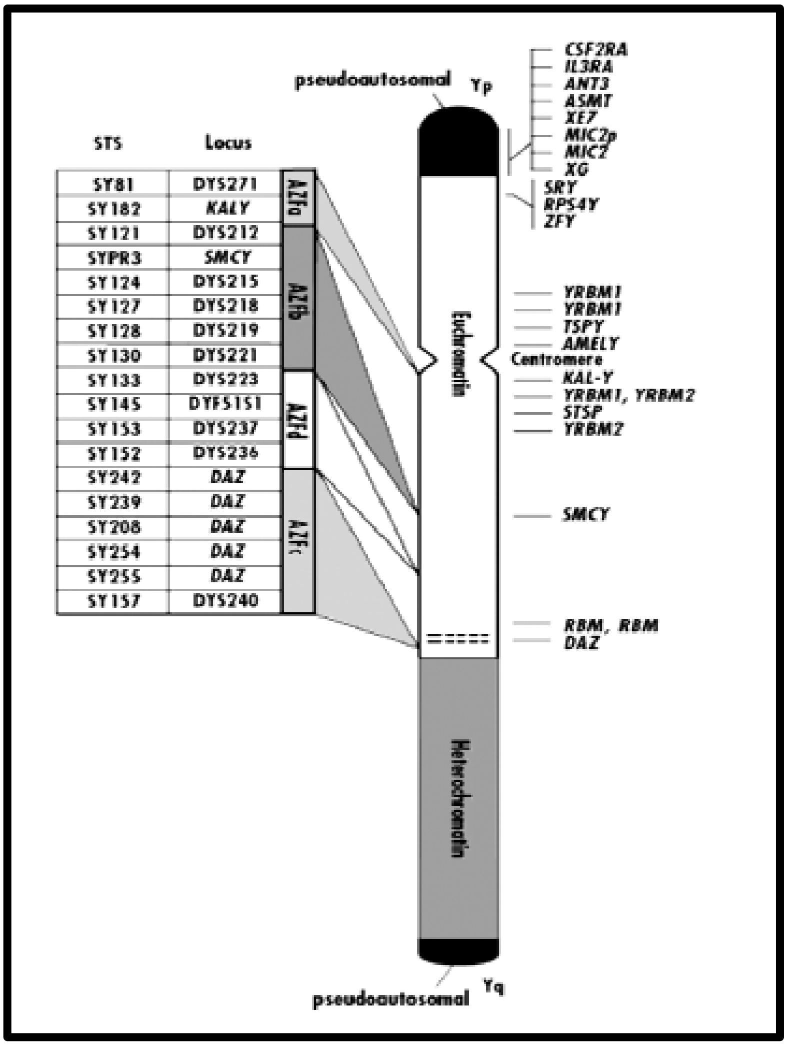
Εικόνα 21. Τρία διαφορετικά μικροελλείμματα που ανιχνεύονται στο χρωμόσωμα Yq11 και έχουν χαρακτηριστεί “de novo” σε άντρες με ιδιοπαθή υπογονιμότητα.[2,34]

Η μοριακή ανάλυση της περιοχής AZFa γίνεται με τη χρήση των δύο ανώνυμων μοριακών δεικτών STS sY84 και sY86. Σύμφωνα με το μηχανισμό προέλευσης των ελλειμμάτων και την τρέχουσα εμπειρία, από τη στιγμή που εντοπίζεται ένα έλλειμμα και στους δύο δείκτες STS's, η πιθανότητα να πρόκειται για πλήρες έλλειμμα προσεγγίζει το 100%. Ωστόσο, καθώς τα ελλείμματα της περιοχής AZFa είναι σπάνια, δε μπορεί να αποκλειστεί η πιθανότητα να ανιχνευτούν ακόμα πιο σπάνια πρότυπα ελλειμμάτων, τα οποία και θα πρέπει να αναλυθούν εκτενέστερα. Εάν μόνο ένας από τους δύο δείκτες STS (μόνο ο sY84 ή μόνο ο sY86) έχει διαγραφεί και έχουν αποκλειστεί σφάλματα στη διαδικασία της ενίσχυσης, η περιοχή AZFa θα πρέπει να εξετάζεται με μεγαλύτερη προσοχή για την παρουσία ή απουσία των δύο γονιδίων της περιοχής AZFa (DBY και USP9Y).[2,19]

Στην περιοχή AZFb, οι δύο ανώνυμοι δείκτες sY127 και sY134 βρίσκονται στο μεσαίο και τελομεριδιακό τμήμα της. Έλλειψη και των δύο δεικτών υποδηλώνει την ύπαρξη πλήρους έλλειψης της περιοχής AZFb.

Στην περιοχή AZFc, οι δύο δείκτες sY254 και sY255 είναι ειδικοί για το γονίδιο DAZ, το οποίο έχει τέσσερα αντίγραφα. Τα μέλη της οικογένειας DAZ είναι οργανωμένα σε ζεύγη με τα αντίτυπα του ζεύγους DAZ1/DAZ2 και του ζεύγους DAZ3/DAZ4 να έχουν αντίθετο προσανατολισμό. Η απουσία και των δύο δεικτών υποδηλώνει έλλειμμα ολόκληρης της περιοχής AZFc, που απομακρύνει όλα τα αντίγραφα του DAZ. Σύμφωνα με την υπάρχουσα γνώση, το έλλειμμα ενός μόνο από αυτούς τους δείκτες σημαίνει πως υπάρχει κάποιο σφάλμα στη μεθοδολογία. Ελλείμματα σε καθένα από τα αντίγραφα του γονιδίου DAZ είναι πιθανό να συμβαίνουν αλλά δε μπορούν να διερευνηθούν με αυτό το πρωτόκολλο. Ελλείμματα μόνο δύο αντιγράφων του DAZ έχουν αναφερθεί και σε υπογόνιμους αλλά και σε γόνιμους άντρες.[2,18,54]

Το πλήρες έλλειμμα των περιοχών AZFb και AZFc ανιχνεύεται με την έλλειψη και των τεσσάρων δεικτών sY127, sY134, sY254 και sY255. Η χρήση περισσότερων ειδικών δεικτών καθορίζει εάν το έλλειμμα αντιστοιχεί στο πρότυπο πλήρους ελλείμματος.[2] (***Εικόνα 22***)



Εικόνα 22. Γενετικός χάρτης του χρωμοσώματος Υ όπου φαίνονται οι δείκτες STS στο Yq.[2,70]

Συμπερασματικά, το γονίδιο DAZL διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στη σπερματογένεση στον άνθρωπο και αξίζει διερεύνησης. Λαμβάνοντας υπόψη αυτά τα στοιχεία του λειτουργικού πλεονασμού των γονιδίων DAZ, θα ήταν δελεαστικό να υποθέσουμε ότι τα γονίδια DAZL και DAZ λειτουργούν ενδεχομένως με συνεργικό τρόπο κατά τη διάρκεια της σπερματογένεσης στον άνθρωπο. Σε αυτήν την περίπτωση, το γονίδιο DAZL φαίνεται να είναι ένας ελκυστικός υποψήφιος για αυτοσωματική υπολειπόμενη στειρότητα.[1,43]

ΣΚΟΠΟΣ – ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

Η παρούσα έρευνα έχει επικεντρωθεί στην έκφραση του γονιδίου dazl στα κύτταρα του τραχήλου, σε φυσιολογικούς τραχήλους καθώς και σε τραχήλους με HPV λοίμωξη.

Η συγκεκριμένη προοπτική μελέτη κοόρτης (prospective cohort study) διεξήχθη το χρονικό διάστημα Σεπτέμβριος του 2013 έως και Απρίλιο του 2016. Στην έρευνα συμπεριλήφθηκαν 70 γυναίκες ηλικίας 20 έως 64 ετών, οι οποίες χωρίστηκαν σε δύο ομάδες. Στην ομάδα Α εντάχθηκαν 35 γυναίκες, οι οποίες παρουσίαζαν για πρώτη φορά παθολογία στο τεστ Παπανικολάου ή/και ύποπτη κολποσκοπική εικόνα και, με βιοψία ιστού, επιβεβαιώθηκε λοίμωξη HPV στον τράχηλο (σε διάφορα στάδια εξέλιξης: απλή παρουσία HPV, CIN1, CIN2, CIN3 και καρκίνο τραχήλου). Η ομάδα Β αποτελούνταν από 35 υγιείς γυναίκες χωρίς προηγούμενη παθολογία σε τεστ Παπανικολάου, με πρωτοεμφανιζόμενη παθολογία στο τεστ Παπανικολάου ή/και ύποπτη κολποσκοπική εικόνα και, με βιοψία ιστού, επιβεβαιώθηκε ότι ο τράχηλος ήταν φυσιολογικός/χωρίς παθολογικά ευρήματα (control group).

Τα κριτήρια εισαγωγής στην παρούσα έρευνα περιλαμβάνουν: γυναίκες ηλικίας 20 έως 64 ετών, οι οποίες ήταν σεξουαλικά ενεργείς, προσήλθαν στο ιατρείο κολποσκόπησης λόγω πρωτοεμφανιζόμενης παθολογίας στο τεστ Παπανικολάου, υποβάλλονταν στον ετήσιο γυναικολογικό έλεγχο και δεν είχαν υποβληθεί σε καμία παρακολούθηση ή θεραπεία στο παρελθόν λόγω παθολογίας στον τράχηλο.

Τα κριτήρια αποκλεισμού από την παρούσα έρευνα περιλαμβάνουν: την κύηση, το γνωστό ιστορικό προϋπάρχουσας παθολογίας στον τράχηλο (παθολογικό τεστ Παπανικολάου), το ιστορικό προηγηθείσας επέμβασης στον τράχηλο [κρυοθεραπεία, CO_2 Laser Ablation, LEEP (Loop Electrosurgical Excision Procedure), CKC (Cold Knife Conization), CO_2 Laser Conization], το ιστορικό νεοπλασματικής νόσου εντοπιζόμενη σε άλλο όργανο, το ιστορικό στειρότητας και το ιστορικό πρώιμης ωοθηκικής ανεπάρκειας.

Η συλλογή δεδομένων, στην παρούσα έρευνα, διενεργήθηκε από το Σεπτέμβριο του 2013 έως και τον Απρίλιο του 2016. Συγκεκριμένα, αναζητήθηκαν γυναίκες ηλικίας 20 έως 64 ετών που προσήλθαν στα εξωτερικά γυναικολογικά ιατρεία και το ιατρείο κολποσκόπησης του Γ.Ν.Α. «ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ», προκειμένου να είναι παρόμοιο το κοινωνικο-οικονομικό επίπεδο των γυναικών που συμμετείχαν στην έρευνα (δείγμα ευκολίας).

Η επιβεβαίωση της διάγνωσης και του σταδίου της HPV λοίμωξης βασίστηκε στο αποτέλεσμα της ιστολογικής εξέτασης των ιστοτεμαχίων τραχήλου, που ελήφθησαν με βιοψία, κατά τη διάρκεια της κολποσκοπικής εξέτασης.

Τα εργαλεία συλλογής δεδομένων, σε αυτή τη μελέτη, ήταν τα ιστοτεμάχια τραχήλου (υπό μορφή κύβων παραφίνης) που ελήφθησαν κατά τη διάρκεια της επίσκεψής τους στα ιατρεία. Από το υλικό των κύβων παραφίνης, ελήφθησαν τομές για ανοσοϊστοχημική χρώση πάχους 4μm. Οι τομές αποπαραφινώθηκαν στους 37^oC. Η ανάκτηση της αντιγονικότητας επιτεύχθηκε με τη θέρμανση των πλακιδίων στα 800W για χρονικό διάστημα 20 λεπτών σε διάλυμα κιτρικού οξέος 0,1Μ σε pH=9. Ακολούθως, εφαρμόστηκε το πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης DAZL (LSBio, clone LS31286) σε αραίωση 1:200 και αφέθηκε για ολονύχτιο διάστημα. Το αντίσωμα ανιχνεύθηκε με τεχνική δύο βημάτων (Envision Flex K-8002, Dako, GLostrup, Denmark). Ως χρωστικό μέσο χρησιμοποιήθηκε η διαμινοβενζιδίνη και, ως αντίχρωση, η αιματοξυλίνη. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε τομή από φυσιολογικό ορχικό παρέγχυμα. Τα πλακίδια επικαλύφθηκαν και δώθηκαν προς ιστολογική εξέταση.

Παράλληλα, στις γυναίκες που συμμετείχαν στην έρευνα, δώθηκε ένα ερωτηματολόγιο με ερωτήσεις ανοικτού και κυρίως κλειστού τύπου, που διαμορφώθηκε ειδικά για αυτό το σκοπό. (***Παράρτημα 1***). Συγκεκριμένα, τα δεδομένα αυτά αφορούσαν το ατομικό ιστορικό καπνίσματος, κατανάλωσης αλκοόλ, κυήσεων στο παρελθόν, εμβολιασμού έναντι του ιού HPV, λήψης αντισυλληπτικών δισκίων, της ηλικίας της πρώτης σεξουαλικής επαφής, του αριθμού των σεξουαλικών συντρόφων, της συνέπειας στη χρήση προφυλακτικού, του αριθμού των εβδομαδιαίων σεξουαλικών επαφών και του ιστορικού σεξουαλικώς μεταδιδόμενων νοσημάτων. Επίσης, σε όλες τις συμμετέχουσες στην έρευνα αποδόθηκε ένας κωδικός, προκειμένου να διασφαλιστεί η ανωνυμία τους.

Η ανάλυση των δεδομένων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του λογισμικού SPSS v.20.0 statistical software (IBM Corp. Released 2011. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0. Armonk, NY: IBM Corp). Η περιγραφή των δημογραφικών χαρακτηριστικών του δείγματος έγινε με τη χρήση μέτρων της περιγραφικής στατιστικής ανάλυσης. Άλλες δοκιμασίες της αναλυτικής στατιστικής ανάλυσης (χ^2, t – test) χρησιμοποιήθηκαν για την ανεύρεση πιθανών συσχετίσεων μεταξύ των διαφόρων στοιχείων του ιστορικού και της έκφρασης του γονιδίου DAZL, καθώς και για τη σύγκριση μεταξύ των δύο ομάδων πληθυσμού του δείγματος της έρευνας.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

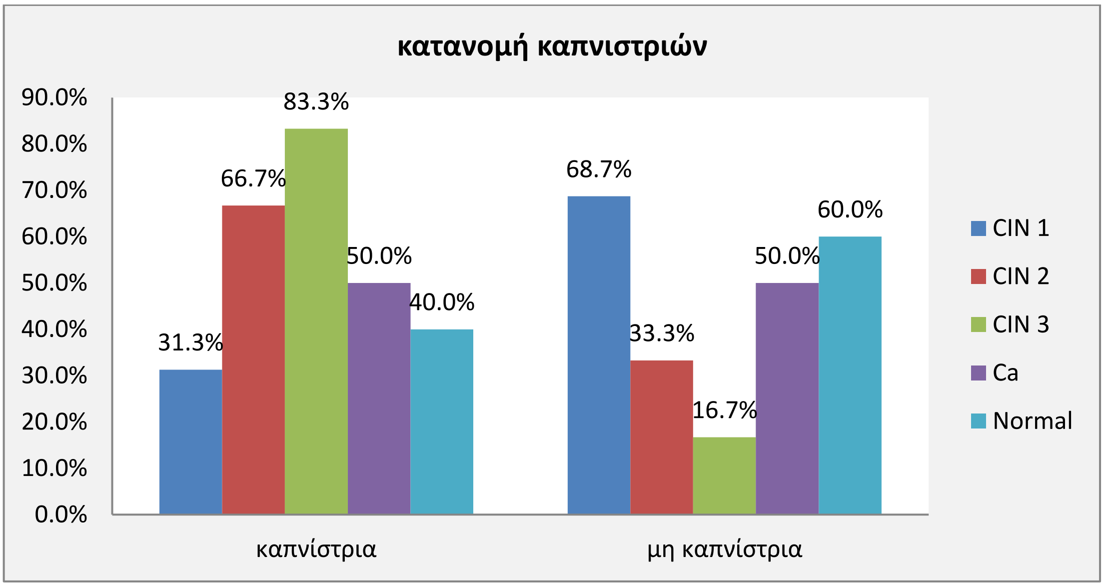
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6^{ο}: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΕΡΕΥΝΑΣ

Στο έκτο κεφάλαιο της εργασίας, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας, περιγραφικά και σχηματικά, με τη χρήση της περιγραφικής και της αναλυτικής στατιστικής.

Το δείγμα της παρούσας μελέτης αποτελείται από 70 γυναίκες ηλικίας 20 έως 64 ετών, οι οποίες χωρίστηκαν σε δύο ομάδες. Ο μέσος όρος ηλικίας του δείγματος συνολικά ήταν 36,4 έτη. Ο μέσος όρος του παθολογικού είναι 37,03 έτη, ενώ του υγιούς πληθυσμού είναι 35,77 έτη. Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στην ηλικία μεταξύ των ασθενών και μαρτύρων (p-value = 0.610 > 5%)

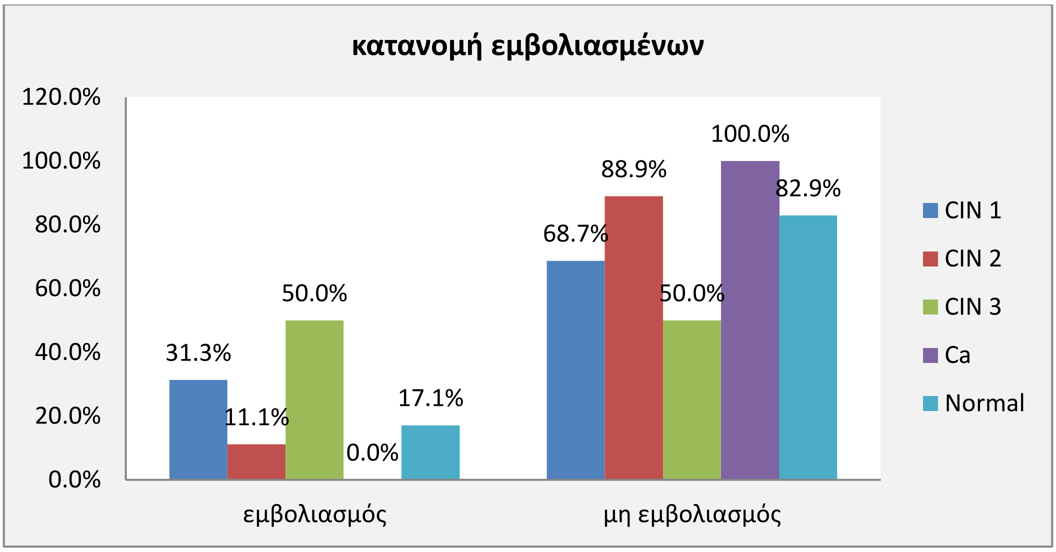
Στην ομάδα Α (παθολογικός πληθυσμός) εντάχθηκαν 35 γυναίκες, οι οποίες παρουσίαζαν για πρώτη φορά παθολογία στο τεστ Παπανικολάου ή/και ύποπτη κολποσκοπική εικόνα και, με βιοψία ιστού, επιβεβαιώθηκε λοίμωξη HPV στον τράχηλο (σε διάφορα στάδια εξέλιξης: απλή παρουσία HPV, CIN1, CIN2, CIN3 και καρκίνο τραχήλου). Η ομάδα Β (υγιής πληθυσμός) αποτελούνταν από 35 υγιείς γυναίκες χωρίς προηγούμενη παθολογία σε τεστ Παπανικολάου, με πρωτοεμφανιζόμενη παθολογία στο τεστ Παπανικολάου ή/και ύποπτη κολποσκοπική εικόνα και, με βιοψία ιστού, επιβεβαιώθηκε ότι ο τράχηλος ήταν φυσιολογικός/χωρίς παθολογικά ευρήματα (control group).

Κατά την ανάλυση των αποτελεσμάτων του ερωτηματολογίου, προέκυψαν κάποια ενδιαφέροντα συμπεράσματα σχετικά με τον ιό HPV. Αρχικά, κατά τη συσχέτιση του καπνίσματος με τον ιό HPV παρατηρήθηκαν τα εξής. Στον υγιή πληθυσμό, το 60% δεν ήταν καπνίστριες, ενώ το 40% ήταν. Όσον αφορά τον παθολογικό πληθυσμό, παρατηρήθηκε ότι, στο CIN1, το 68,7% δεν κάπνιζε, ενώ μόλις το 31,3% κάπνιζε. Σημαντική μεταβολή παρατηρείται στις γυναίκες με CIN2 και CIN3. Πιο συγκεκριμένα, στις πάσχουσες από CIN2, το 66,7% κάπνιζε, ενώ το 33,3% δεν κάπνιζε. Στις πάσχουσες από CIN3, το 83,3% κάπνιζε, ενώ το 16,7% δεν κάπνιζε. Στην ομάδα με τον καρκίνο τραχήλου, παρατηρήθηκε, στο δείγμα μας, ισότιμη κατανομή (50%) ανάμεσα στις καπνίστριες και τις μη καπνίστριες. (p-value=0.148) (***Εικόνα 23***)



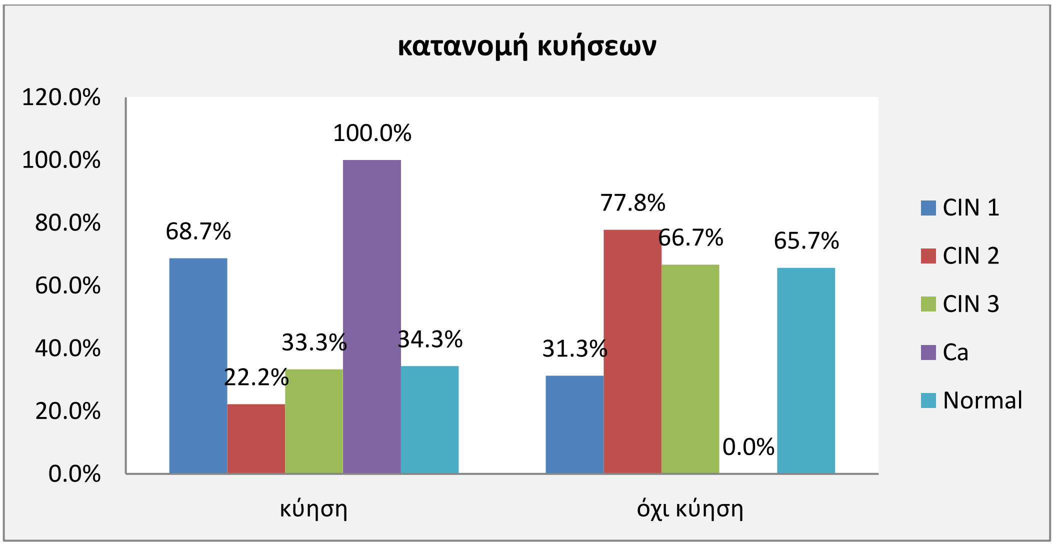
Εικόνα 23. Κατανομή του καπνίσματος στο δείγμα μας.

Η επόμενη παράμετρος που μελετήθηκε ήταν ο εμβολιασμός κατά του ιού HPV. Στον υγιή πληθυσμό, το 82,9% δεν είχε εμβολιαστεί και μόλις το 17,1% ανέφερε ότι είχε εμβολιαστεί. Στην πάσχουσα ομάδα και συγκεκριμένα την υπο – ομάδα με το CIN1, μόλις το 31,3% είχε εμβολιαστεί, ενώ το 68,7% δεν είχε εμβολιαστεί. Παρόμοια εικόνα παρατηρείται και στην ομάδα με το CIN2, όπου το 11,1% ανέφερε εμβολιασμό στο παρελθόν, ενώ το 88,9% δεν ανέφερε. Στην ομάδα του CIN3, οι γυναίκες μοιράζονται ισόποσα μεταξύ εκείνων που εμβολιάστηκαν και εκείνων που δεν εμβολιάστηκαν (50%). Πολύ χαρακτηριστική είναι η εικόνα της υπο-ομάδας με τον καρκίνο του τραχήλου, όπου το 100% των γυναικών ανέφεραν ότι δεν έχουν εμβολιαστεί κατά του ιού HPV. (p-value=0.231) (***Εικόνα 24***)



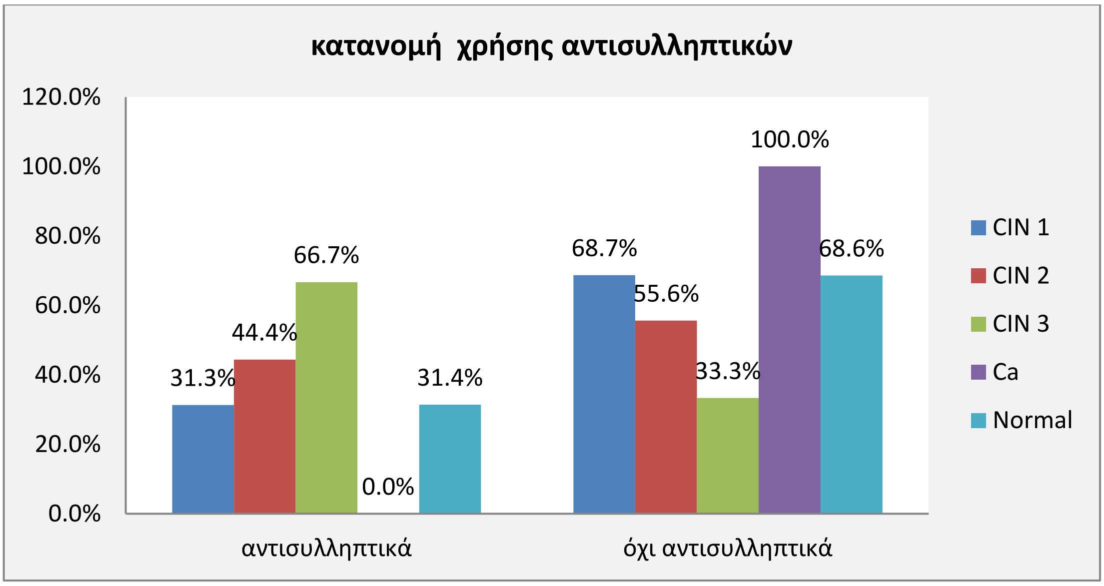
Εικόνα 24. Κατανομή του εμβολιασμού κατά του ιού HPV στο δείγμα μας.

Στη συνέχεια, ο παράγοντας που αναλύθηκε στις γυναίκες του δείγματος ήταν οι κυήσεις. Στον υγιή πληθυσμό, το 34,3% δεν είχε καμία κύηση, ενώ το 65,7% είχε. Αντίθετα, στην πάσχουσα υπο-ομάδα με CIN1, το 68,7% είχε στο ιστορικό του κύηση, ενώ το 31,3% δεν είχε. Στην υπο-ομάδα με το CIN2, το 22,2% είχε κυοφορήσει, ενώ το 77,8% δεν είχε. Παρομοίως, στην υπο-ομάδα του CIN3, το 33,3% είχε κυοφορήσει στο παρελθόν, ενώ το 66,7% δεν είχε. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η υπο-ομάδα με τον καρκίνο τραχήλου όπου όλες οι γυναίκες ανέφεραν ότι είχαν κυοφορήσει στο παρελθόν. (p-value=0.012) (***Εικόνα 25***)



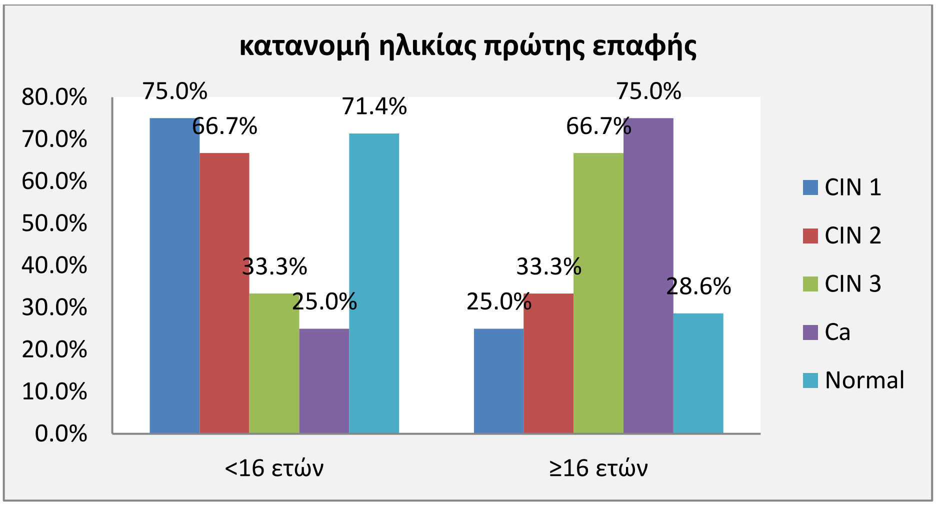
Εικόνα 25. Κατανομή του ιστορικού κυήσεων στο δείγμα μας.

Μία άλλη παράμετρος που μελετήθηκε ήταν η χρήση αντισυλληπτικών δισκίων. Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων, προκύπτει ότι, στον υγιή πληθυσμό, το 31,4% ανέφερε λήψη αντισυλληπτικών, ενώ το 68,6% όχι. Στις πάσχουσες από CIN1, το 31,3% ανέφερε χρήση αντισυλληπτικών, ενώ το 68,7% δεν ανέφερε. Στην υπο-ομάδα των CIN2 και CIN3, ανέφεραν αντίστοιχα ότι 44,4% και το 66,7% είχαν χρησιμοποιήσει αντισυλληπτικά δισκία. Τέλος, στην υπο-ομάδα του καρκίνου του τραχήλου, όλες οι γυναίκες του δείγματός μας ανέφεραν ότι δεν είχαν κάνει χρήση αντισυλληπτικών δισκίων. (p-value=0.264) (***Εικόνα 26***)



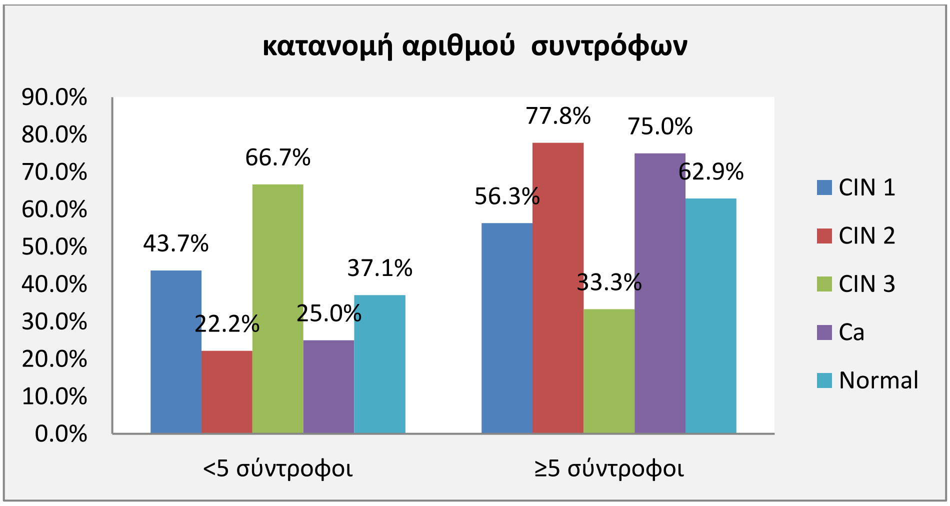
Εικόνα 26. Κατανομή της χρήσης αντισυλληπτικών δισκίων στο δείγμα μας.

Ένας άλλος παράγοντας που έχει βρεθεί ότι σχετίζεται με την HPV λοίμωξη είναι η ηλικία έναρξης των σεξουαλικών επαφών. Στον υγιή πληθυσμό τοιυ δείγματός μας, το 71,4% ανέφερε έναρξη της σεξουαλικής τους ζωής σε ηλικία κάτω των 16 ετών, ενώ το 28,6% σε ηλικία μεγαλύτερη ή ίση των 16 ετών. Στον παθολογικό πληθυσμό, παρατηρείται ότι οι γυναίκες με CIN1 και CIN2 ανέφεραν έναρξη της σεξουαλικής τους ζωής σε ηλικία μικρότερη των 16 ετων, σε ποσοστα 75% και 66,7% αντίστοιχα. Η αντίθετη εικόνα παρατηρείται στις υπο-ομάδες με CIN3 και καρκίνο του τραχήλου. Αναλυτικότερα, παρατηρείται ότι το 66,7% των γυναικών με CIN3 και το 75% των γυναικών με καρκίνο του τραχήλου ανέφεραν ότι η ηλικία της πρώτης σεξουαλικής επαγής τους ήταν μεγαλύτερη ή ίση των 16 ετών. (p-value=0.153) (***Εικόνα 27***)



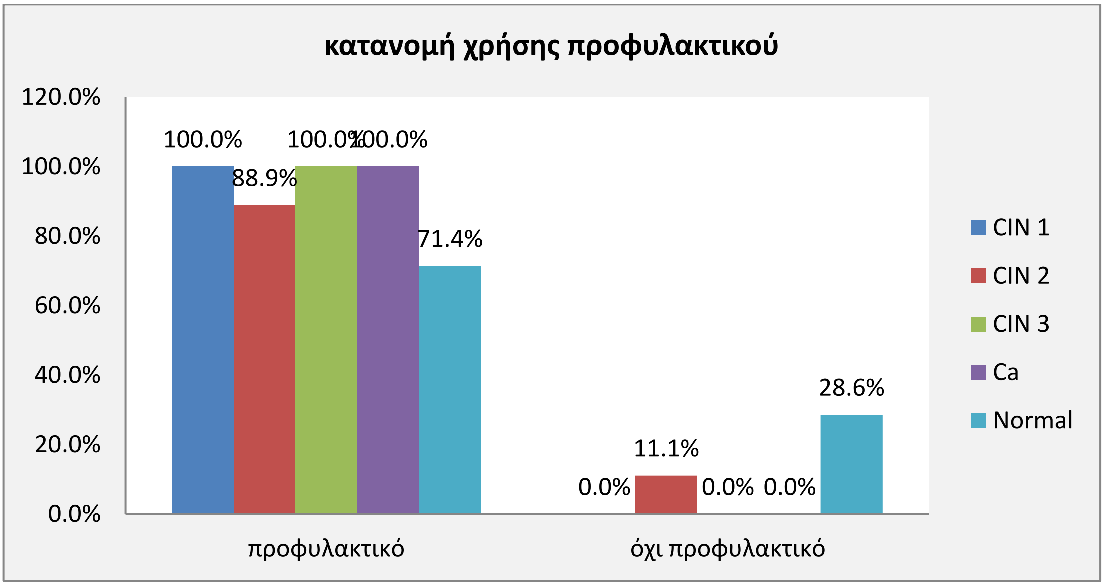
Εικόνα 27. Κατανομή της ηλικίας της πρώτης σεξουαλικής επαφής στο δείγμα μας.

Ακολούθως, αναλύθηκε η κατανομή του αριθμού των συντρόφων με το στάδιο της νόσου. Στον υγιή πληθυσμό, το 62,9% του δείγματος ανέφερε περισσότερους από 5 ερωτικούς συντρόφους και το 37,1% λιγότερους από 5. Στην υπο-ομάδα με το CIN1, το 43,7% των γυναικών είχε λιγότερους από 5 συντρόφους και το 56,3% περισσότερους. Στις γυναίκες με το CIN2, το 22,2% ανέφερε ότι το 22,2% είχε λιγότερους από 5 συντρόφους και το 77,8% ότι είχε περισσότερους από 5. Οι γυναίκες με CIN3 ανέφεραν ότι σε ποσοστό 66,7% είχαν λιγότερους από 5 συντρόφους και σε ποσοστό 33,3% περισσότερους. Τέλος, στην υπο-ομάδα του καρκίνου του τραχήλου, το 25% ανέφερε ότι είχε λιγότερους από 5 και το 75% ότι είχε περισσότερους από 5 ερωτικούς συντρόφους. (p-value=0.527) (***Εικόνα 28***)



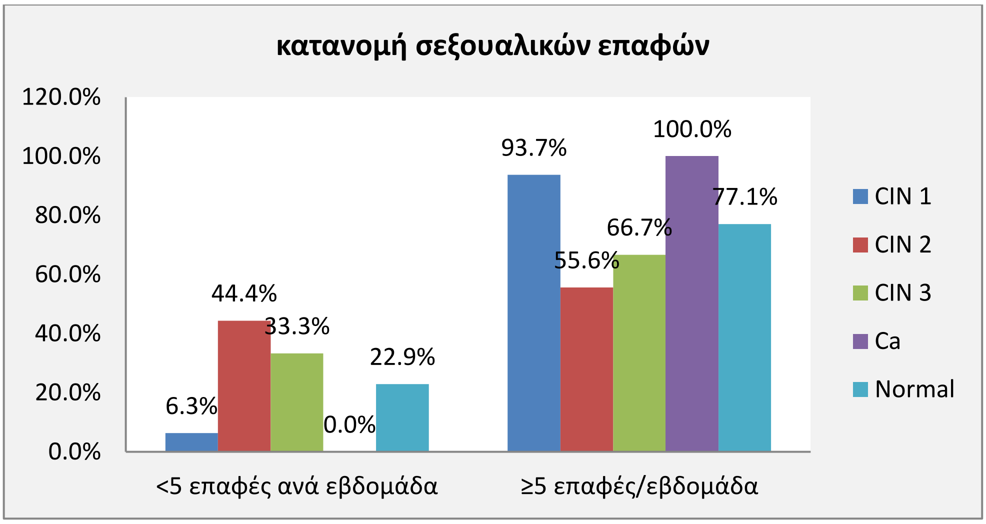
Εικόνα 28. Κατανομή του αριθμού των ερωτικών συντρόφων στο δείγμα μας.

Όσον αφορά τη χρήση προφυλακτικού, παρατηρήθηκε ότι η πλειονότητα των γυναικών του δείγματος ανέφεραν χρήση προφυλακτικού. Συγκεκριμένα, όλες οι γυναίκες με CIN1, CIN3 και καρκίνο τραχήλου ανέφεραν ότι χρησιμοποιούσαν πάντα προφυλακτικό κατά τη διάρκεια της σεξουαλικής επαφής, ενώ το 88,9% των γυναικών με CIN2 και το 71,4% του υγιούς πληθυσμού ανέφερε ότι κάνει πάντα χρήση προφυλακτικού. (p-value=0.061) (***Εικόνα 29***)



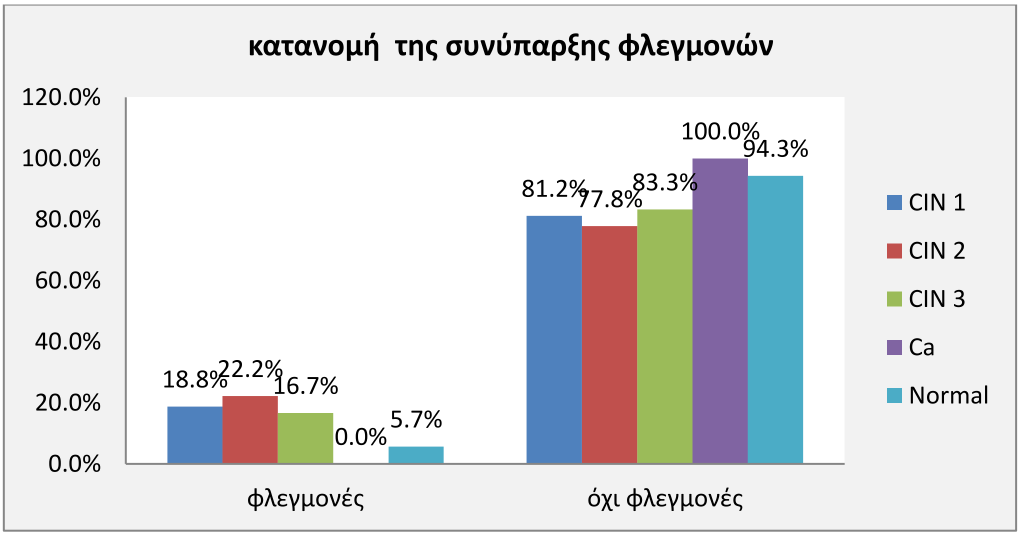
Εικόνα 29. Κατανομή της χρήσης ή μη προφυλακτικού κατά τη σεξουαλική επαφή στο δείγμα μας.

Μία άλλη παράμετρος που μελετήθηκε στην παρούσα έρευνα ήταν ο αριθμός των εβδομαδιαίων σεξουαλικών επαφών. Στον υγιή πληθυσμό, το 77,1% ανέφερε περισσότερες από 5 επαφές την εβδομάδα, ενώ το 22,9% λιγότερες. Στον παθολογικό πληθυσμό, το 93,7% των γυναικών με CIN1, το 55,6% των γυναικών με CIN2, το 66,7% των γυναικών με CIN3 και όλες οι γυναίκες του δείγματος με καρκίνο του τραχήλου ανέφεραν περισσότερο από 5 σεξουαλικές επαφές ανά εβδομάδα. (p-value=0.141) (***Εικόνα 30***)



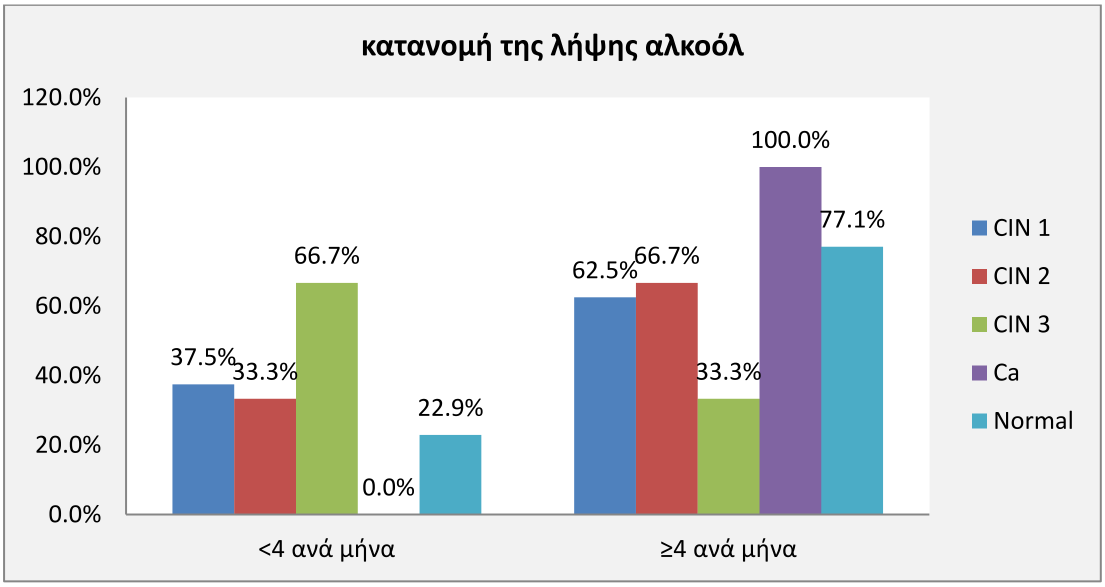
Εικόνα 30. Κατανομή του αριθμού των εβδομαδιαίων σεξουαλικών επαφών στο δείγμα μας.

Σημαντικός παράγοντας που έχει συσχετιστεί με την HPV λοίμωξη είναι και η συνύπαρξη άλλων φλεγμονών του γεννητικού συστήματος. Στο μεγαλύτερο μέρος τους, οι γυναίκες του δείγματος δεν ανέφεραν γνωστό ιστορικό προηγηθείσας φλεγμονής στο γεννητικό σύστημα. Αναλυτικότερα, το 81,2% των γυναικών με CIN1, το 77,8% των γυναικών με CIN2, το 83,3% των γυναικών με CIN3, όλες οι πάσχουσες από καρκίνο του τραχήλου της μήτρας και το 94,3% του υγιούς πληθυσμού δεν ανέφεραν ιστορικό φλεγμονής. (p-value=0.338) (***Εικόνα 31***)



Εικόνα 31. Κατανομή του ιστορικού φλεγμονών του γυναικείου αναπαραγωγικού συστήματος στο δείγμα μας.

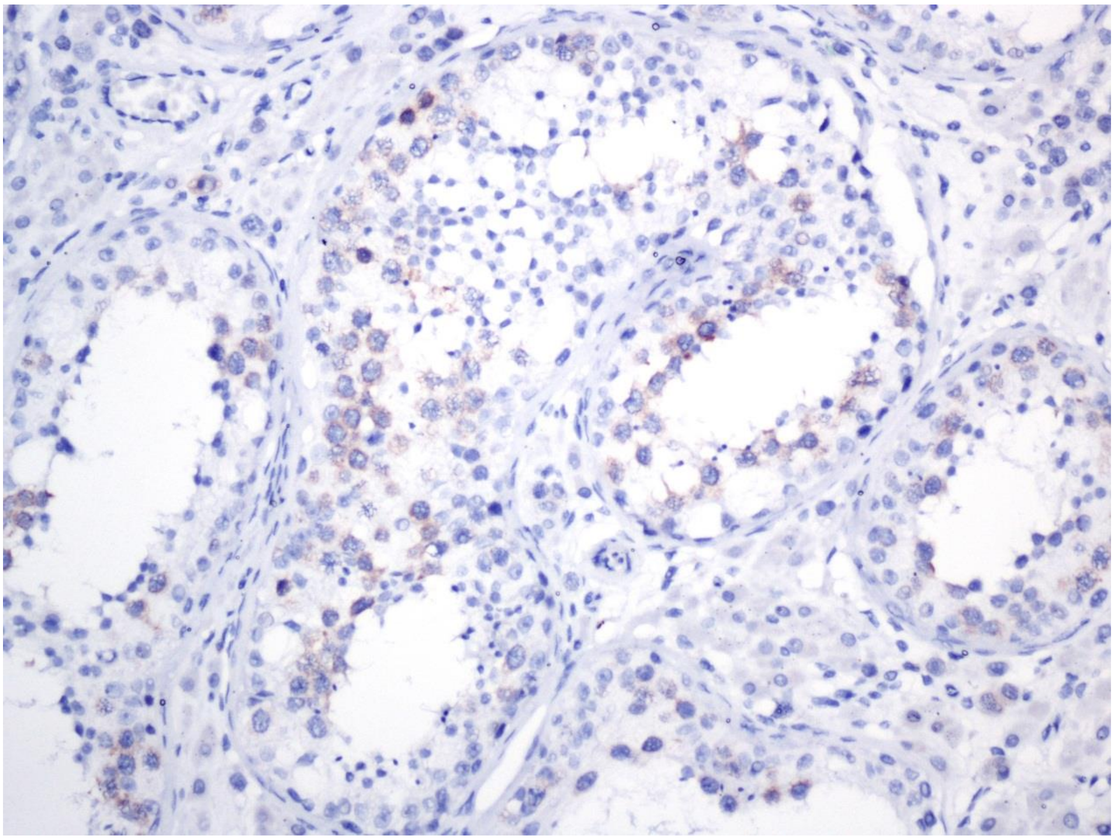
Στη συνέχεια, μελετήθηκε η κατανάλωση αλκοόλ. Στον υγιή πληθυσμό, το 77,1% ανέφερε κατανάλωση αλκοόλ περισσότερες από 4 φορές το μήνα, ενώ το 22,9% λιγότερες από 4. Στον παθολογικό πληθυσμό, το 62,5% των γυναικών με CIN1, το 66,7% των γυναικών με CIN2 και όλες οι γυναίκες με καρκίνο του τραχήλου της μήτρας ανέφεραν κατανάλωση αλκοόλ περισσότερες από 4 φορές μηνιαίως. Αντίθετα, στις γυναίκες με CIN3, το 66,7% των γυναικών ανέφερε λήψη αλκοόλ λιγότερες από 4 φορές ανά μήνα. (p-value=0.157) (***Εικόνα 32***)



Εικόνα 32. Κατανομή του αριθμού των φορών κατανάλωσης αλκοόλ ανά μήνα στο δείγμα μας.

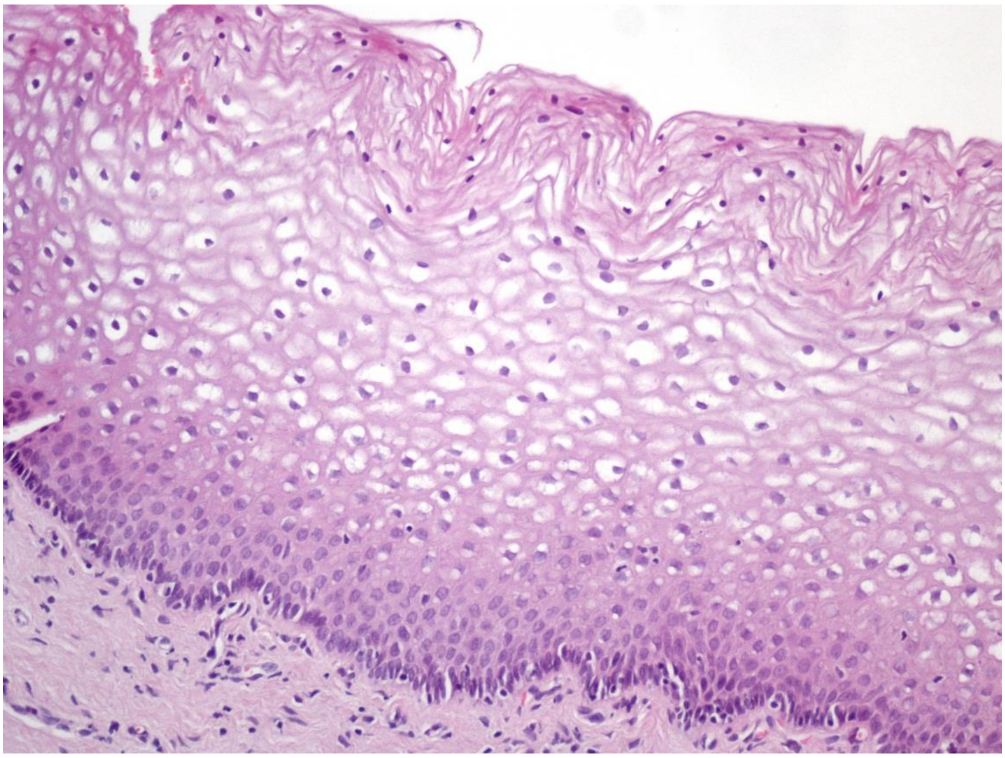
Πέρα από την ανάλυση των παραμέτρων του ερωτηματολογίου σχετικά με τον ιό HPV, στην παρούσα έρευνα αναζητήθηκε και το γονίδιο DAZL στους τραχήλους των γυναικών του δείγματος. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, κατά την περιγραφή της μεθόδου της έρευνας, χρησιμοποιήθηκαν τα ιστοτεμάχια τραχήλου που λαμβάνονταν για βιοψία, κατά τη διάρκεια της κολποσκοπικής εξέτασης, υπό μορφή κύβων παραφίνης. Από το υλικό των κύβων παραφίνης, ελήφθησαν τομές για ανοσοϊστοχημική χρώση πάχους 4μm. Οι τομές αποπαραφινώθηκαν στους $37^{o}C$. Η ανάκτηση της αντιγονικότητας επιτεύχθηκε με τη θέρμανση των πλακιδίων στα 800W για χρονικό διάστημα 20 λεπτών σε διάλυμα κιτρικού οξέος 0,1M σε pH=9. Ακολούθως, εφαρμόστηκε το πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης DAZL

(LSBio, clone LS31286) σε αραίωση 1:200 και αφέθηκε για ολονύχτιο διάστημα. Το αντίσωμα ανιχνεύθηκε με τεχνική δύο βημάτων (Envision Flex K-8002, Dako, GLostrup, Denmark). Ως χρωστικό μέσο χρησιμοποιήθηκε η διαμινοβενζιδίνη και, ως αντίχρωση, η αιματοξυλίνη. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε τομή από φυσιολογικό ορχικό παρέγχυμα. Τα πλακίδια επικαλύφθηκαν και δώθηκαν προς ιστολογική εξέταση. (***Εικόνα 33***)

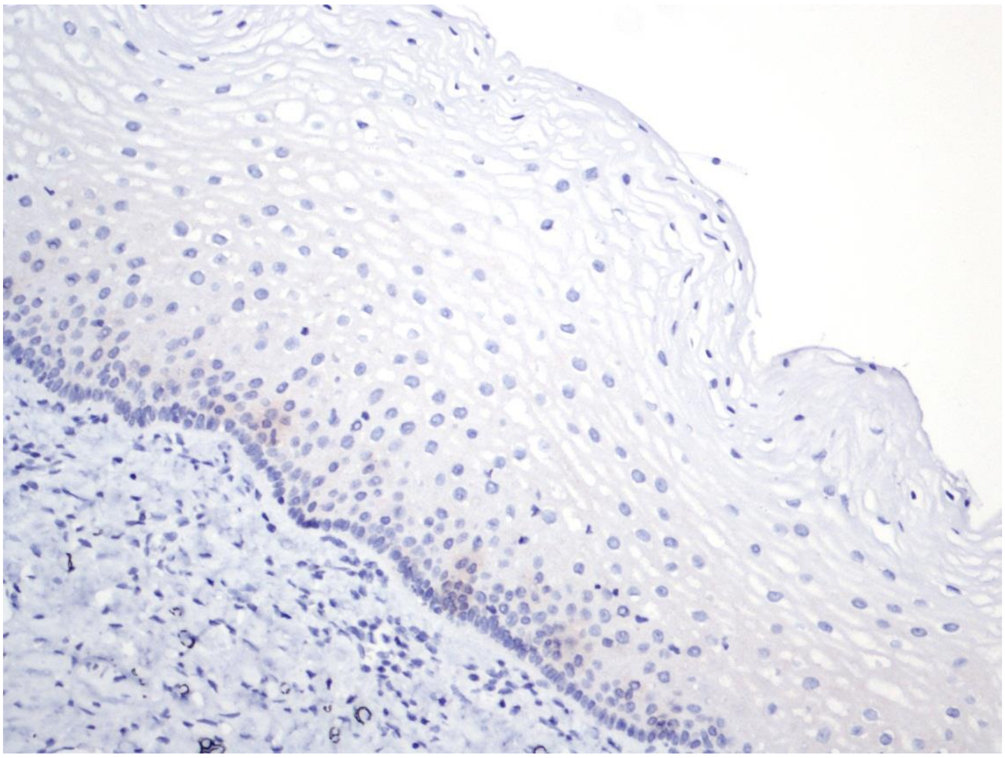


Εικόνα 33. Φυσιολογικό ορχικό παρέγχυμα. Χρώση διαμινοβενζιδίνης. Μεγέθυνση 200x. Θετικό στη χρώση για τον παράγοντα DAZL.

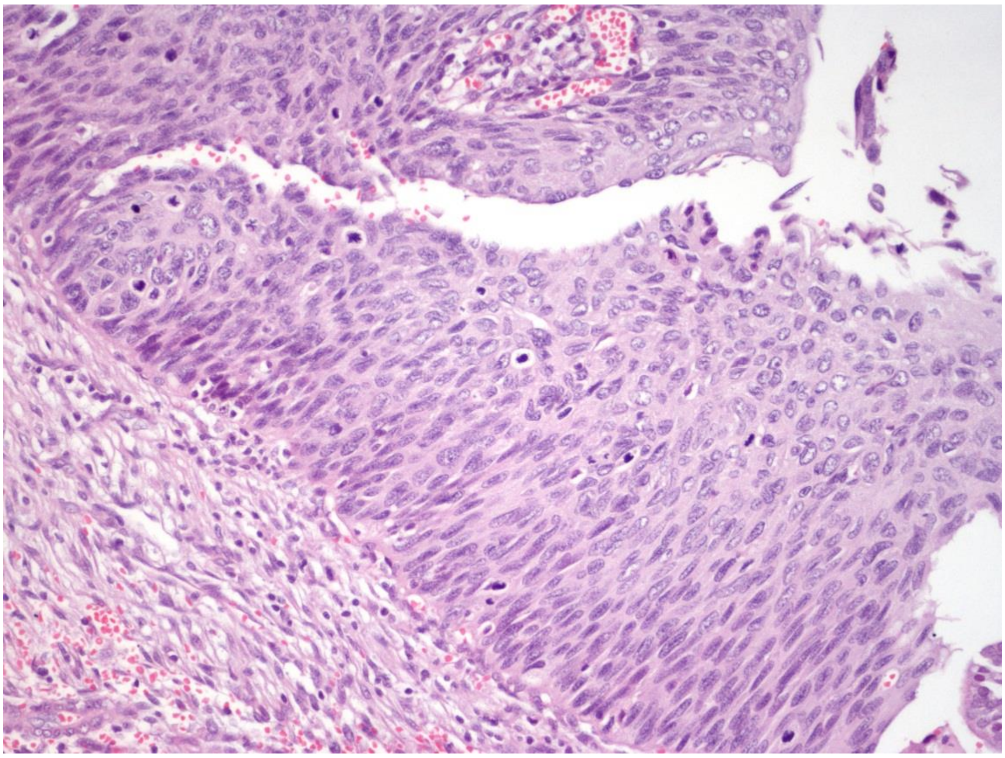
Κατά την ανίχνευση του πολυκλωνικού αντισώματος έναντι της πρωτεΐνης DAZL, δεν παρατηρήθηκε η παρουσία του γονιδίου στους τραχήλους του δείγματός μας. Δηλαδή δεν εντοπίστηκε η παρουσία του γονιδίου DAZL ούτε στους τραχήλους των υγιών γυναικών (control group), ούτε στους τραχήλους του παθολογικού πληθυσμού. Επίσης, δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση της παρουσίας του γονιδίου DAZL με το στάδιο της HPV λοίμωξης, καθώς δεν ανιχνεύτηκε ούτε στις γυναίκες με προκαρκινικές αλλοιώσεις (CIN1, CIN2 και CIN3), ούτε και στις γυναίκες με καρκίνο του τραχήλου της μήτρας. (***Εικόνες 34 – 44***)



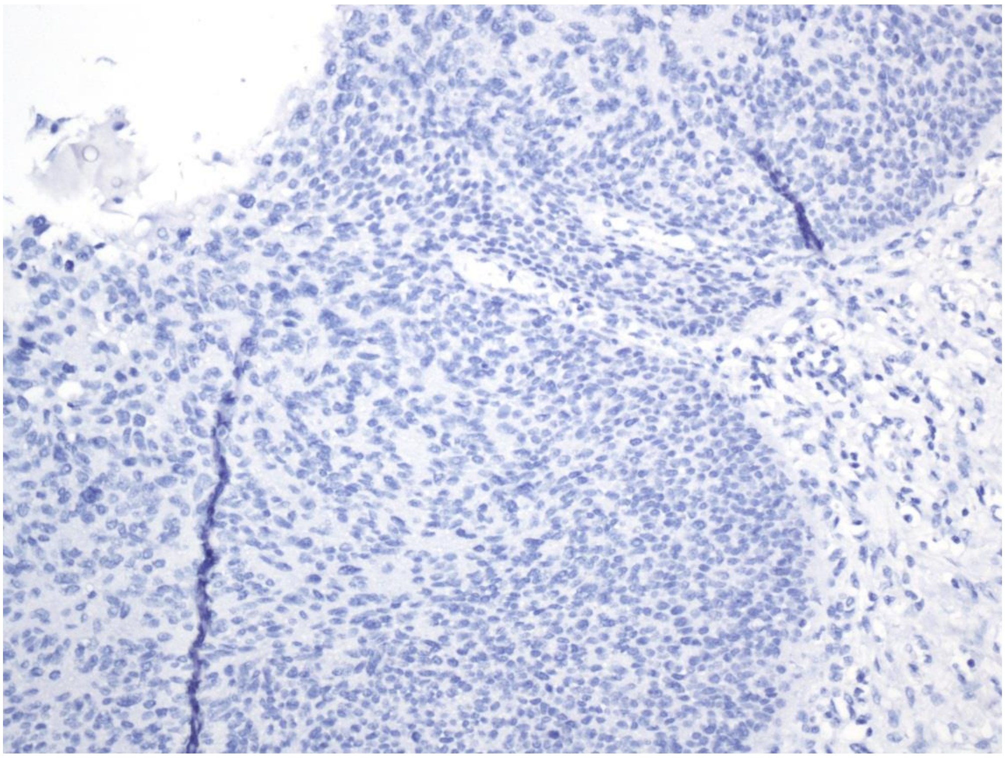
Εικόνα 34. Φυσιολογικό τραχηλικό επιθήλιο. Χρώση ηωσίνης – αιματοξυλίνης. Μεγέθυνση 200x. Αρνητική έκφραση για τον παράγοντα DAZL.



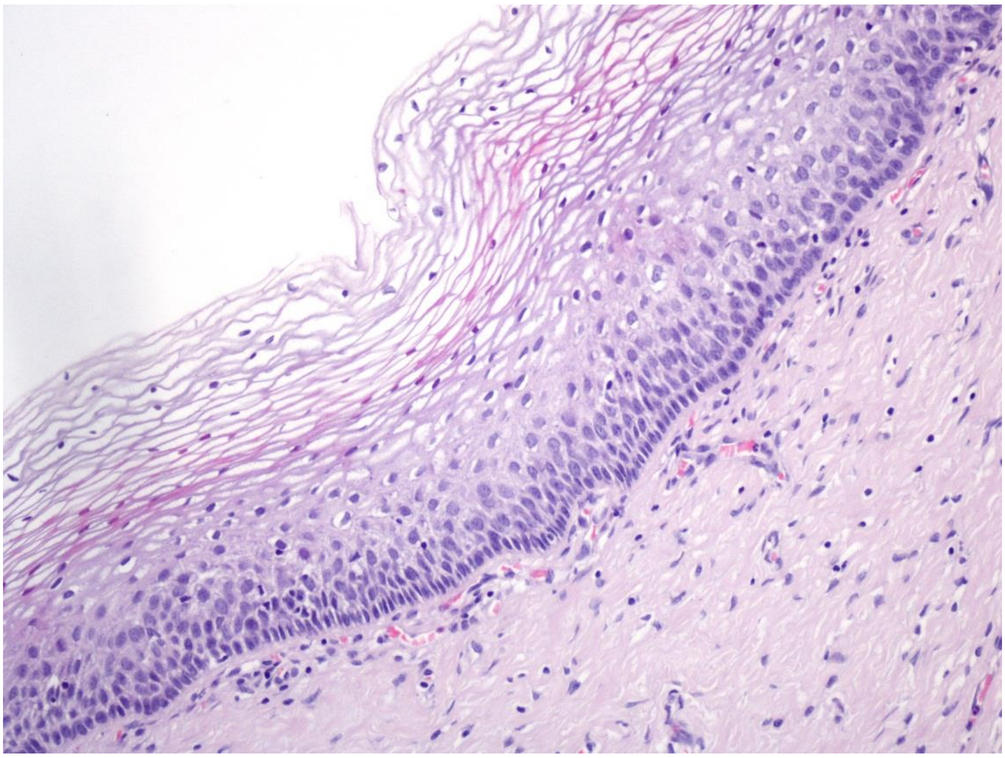
Εικόνα 35. Φυσιολογικό τραχηλικό επιθήλιο. Χρώση διαμινοβενζιδίνης. Μεγέθυνση 200x. Αρνητική έκφραση για τον παράγοντα DAZL.



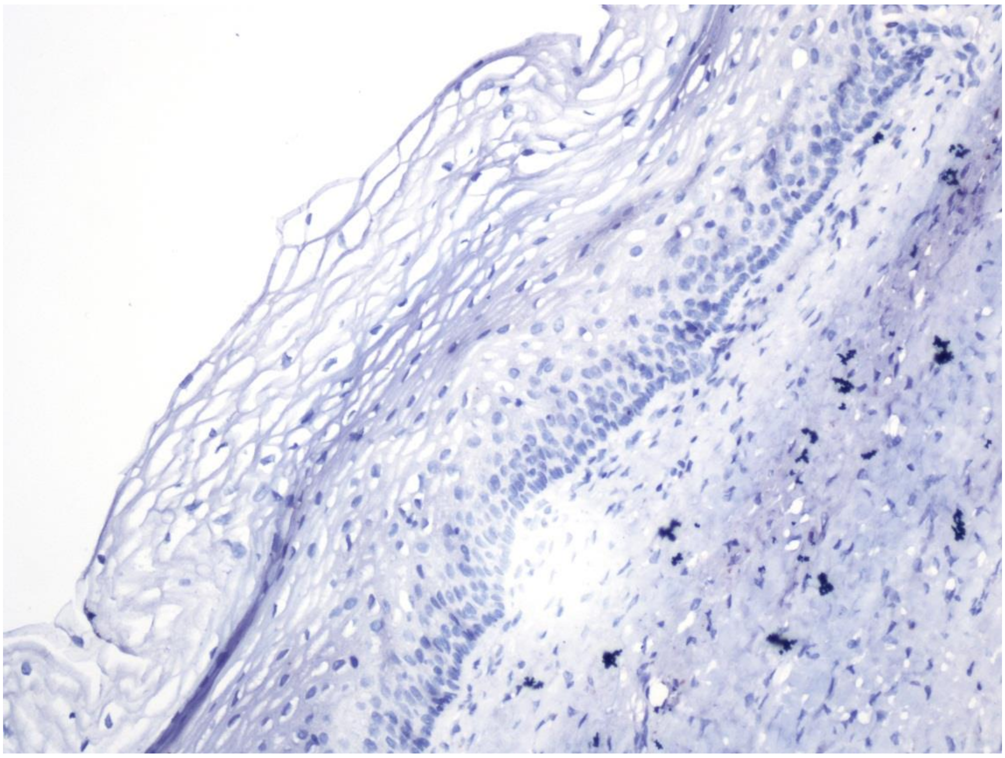
Εικόνα 36. Χαμηλόβαθμη ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία (CIN-1). Χρώση ηωσίνης - αιματοξυλίνης. Μεγέθυνση 200x. Αρνητική έκφραση για τον παράγοντα DAZL.



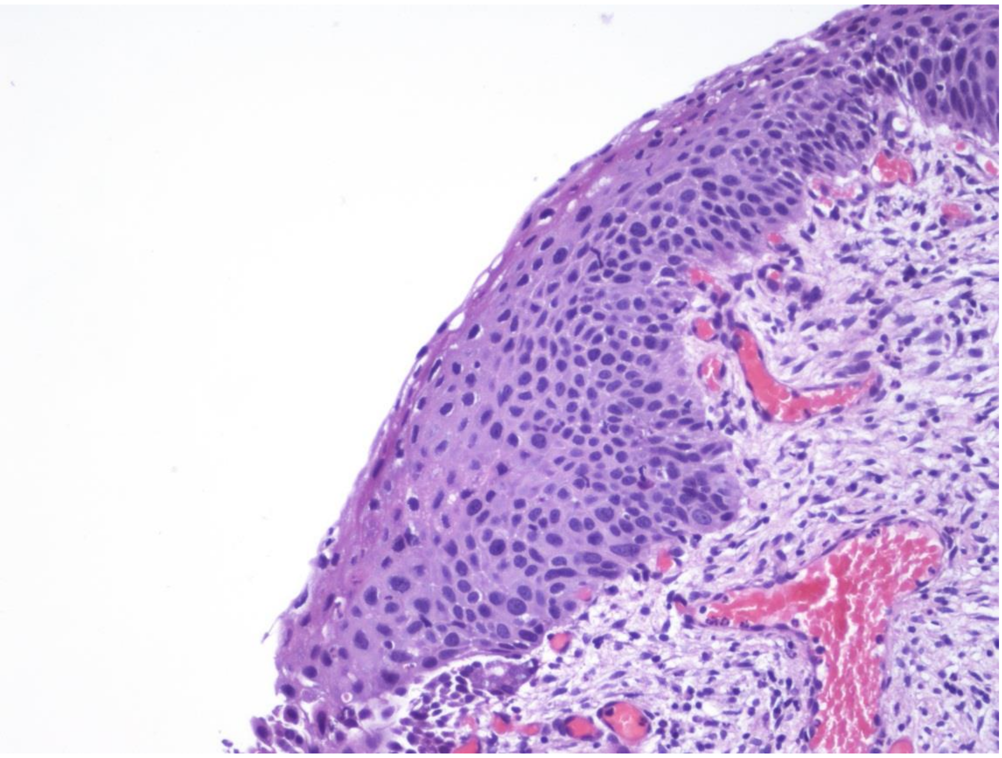
Εικόνα 37. Χαμηλόβαθμη ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία (CIN-1). Χρώση διαμινοβενζιδίνης. Μεγέθυνση 200x. Αρνητική έκφραση για τον παράγοντα DAZL.



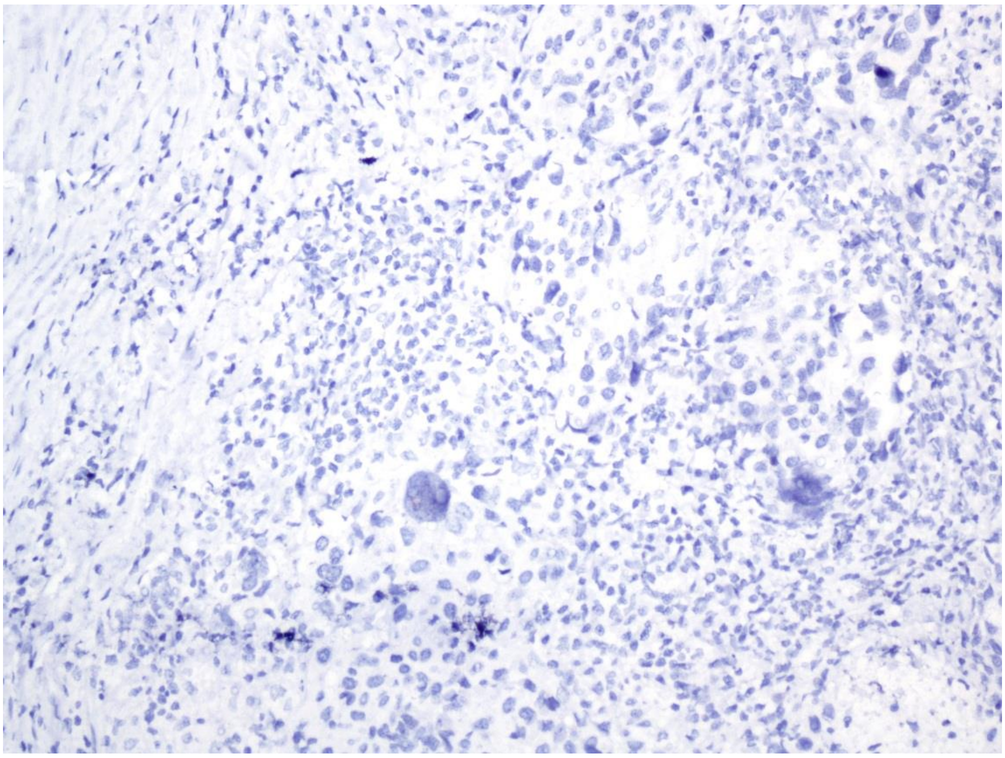
Εικόνα 38. Υψηλόβαθμη ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία (CIN-2). Χρώση ηωσίνης - αιματοξυλίνης. Μεγέθυνση 200x. Αρνητική έκφραση για τον παράγοντα DAZL.



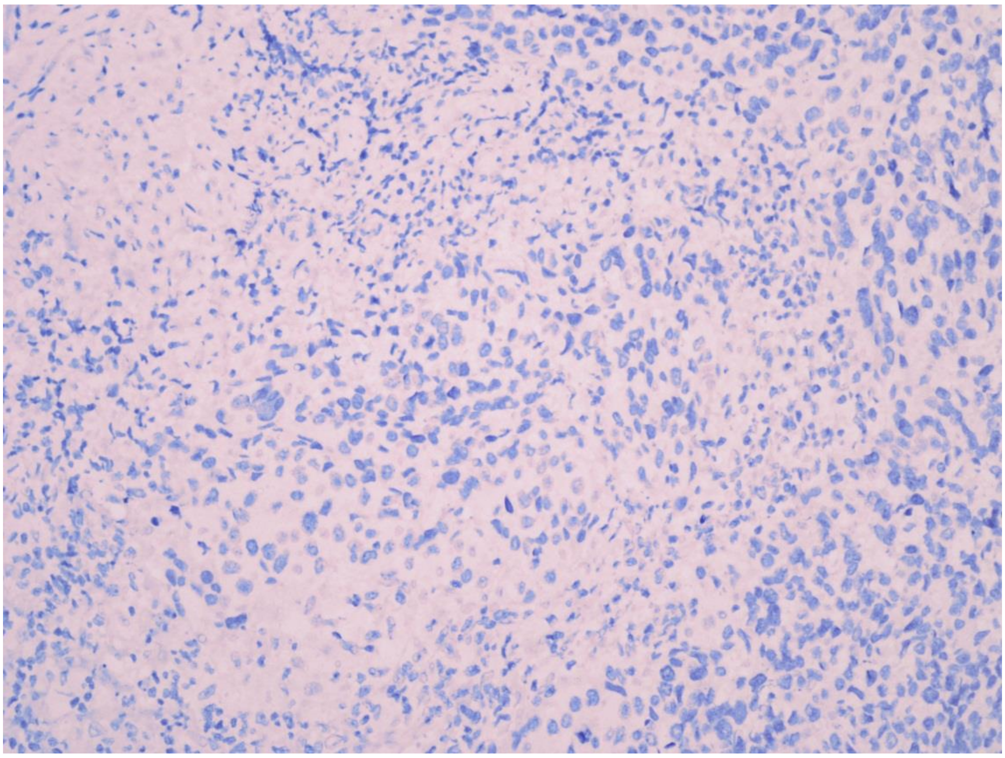
Εικόνα 39. Υψηλόβαθμη ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία (CIN-2). Χρώση διαμινοβενζιδίνης. Μεγέθυνση 200x. Αρνητική έκφραση για τον παράγοντα DAZL.



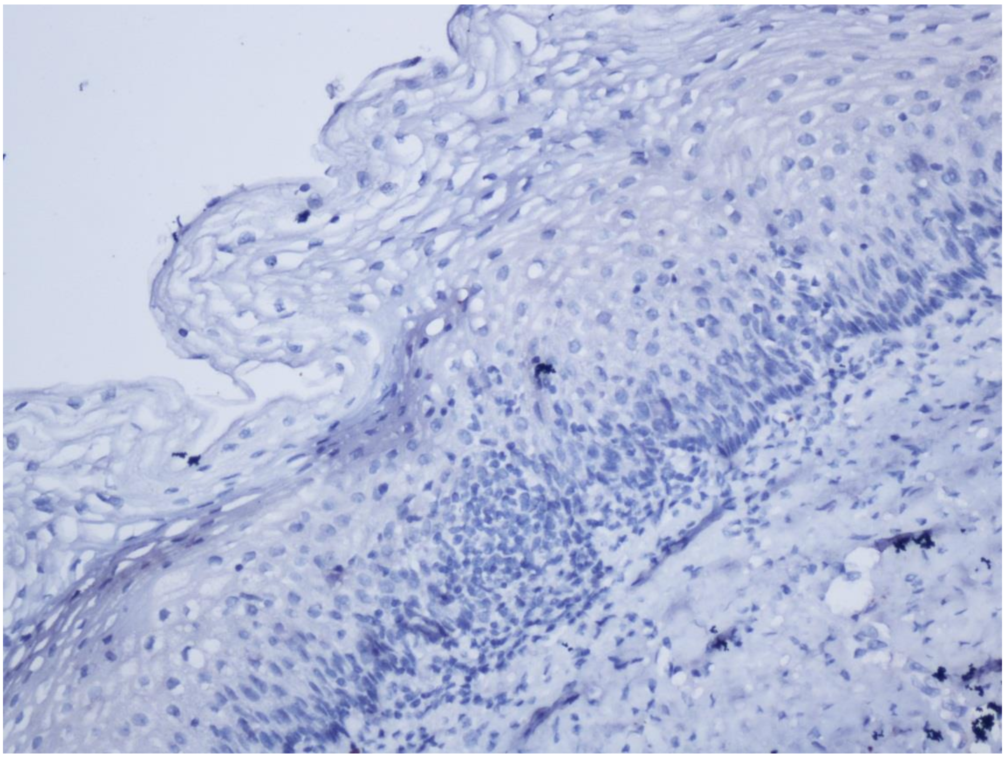
Εικόνα 40. Υψηλόβαθμη ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία (CIN-3). Χρώση ηωσίνης - αιματοξυλίνης. Μεγέθυνση 200x. Αρνητική έκφραση για τον παράγοντα DAZL.



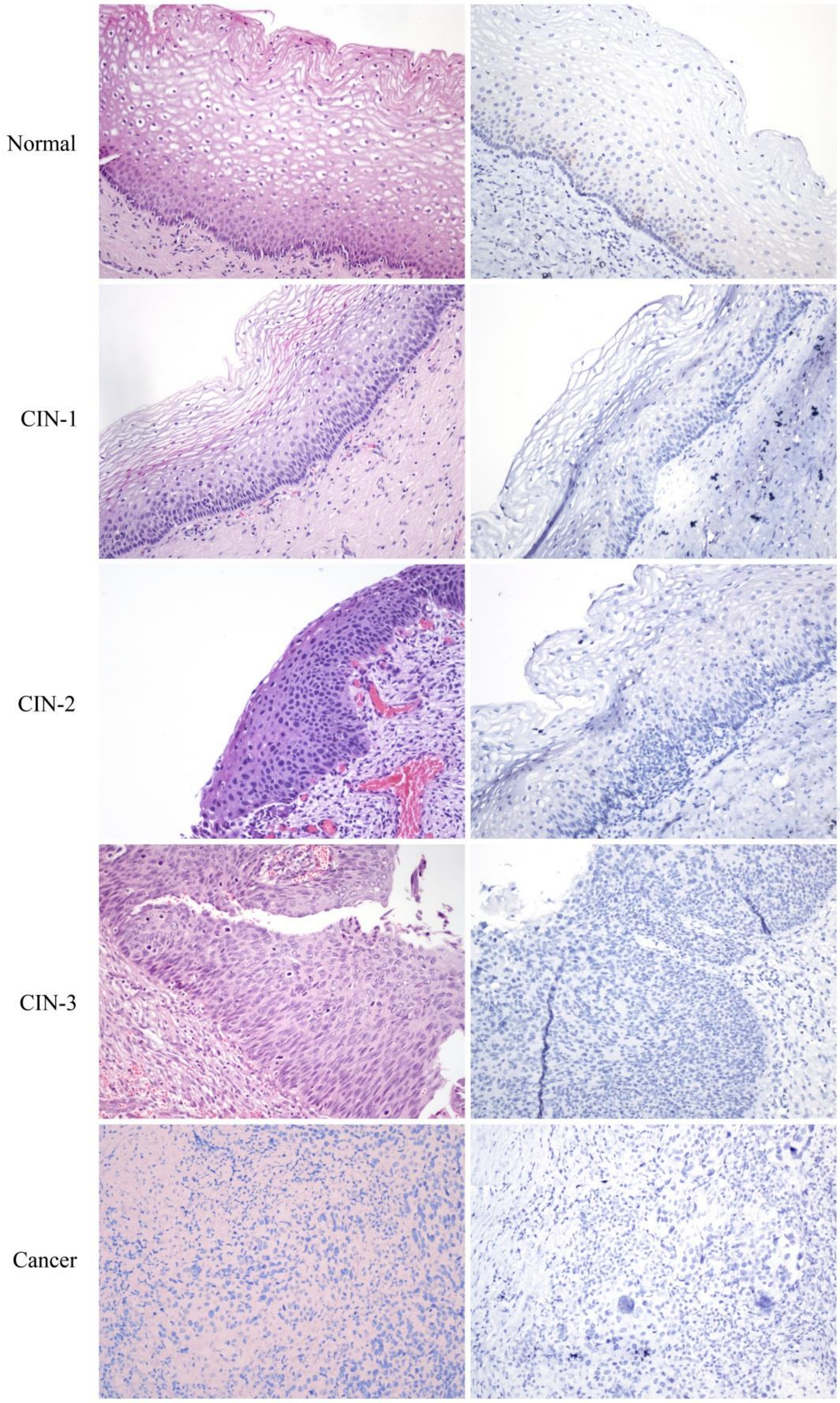
Εικόνα 41. Υψηλόβαθμη ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία (CIN-3). Χρώση διαμινοβενζιδίνης. Μεγέθυνση 200x. Αρνητική έκφραση για τον παράγοντα DAZL.



Εικόνα 42. Διηθητικό καρκίνωμα τραχήλου. Χρώση ηωσίνης - αιματοξυλίνης. Μεγέθυνση 200x. Αρνητική έκφραση για τον παράγοντα DAZL.

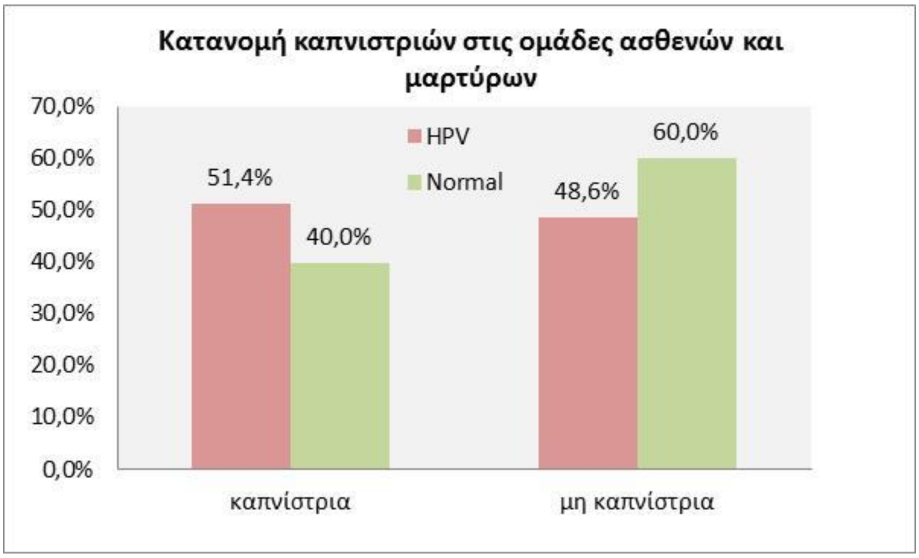


Εικόνα 43. Διηθητικό καρκίνωμα τραχήλου. Χρώση διαμινοβενζιδίνης. Μεγέθυνση 200x. Αρνητική έκφραση για τον παράγοντα DAZL.



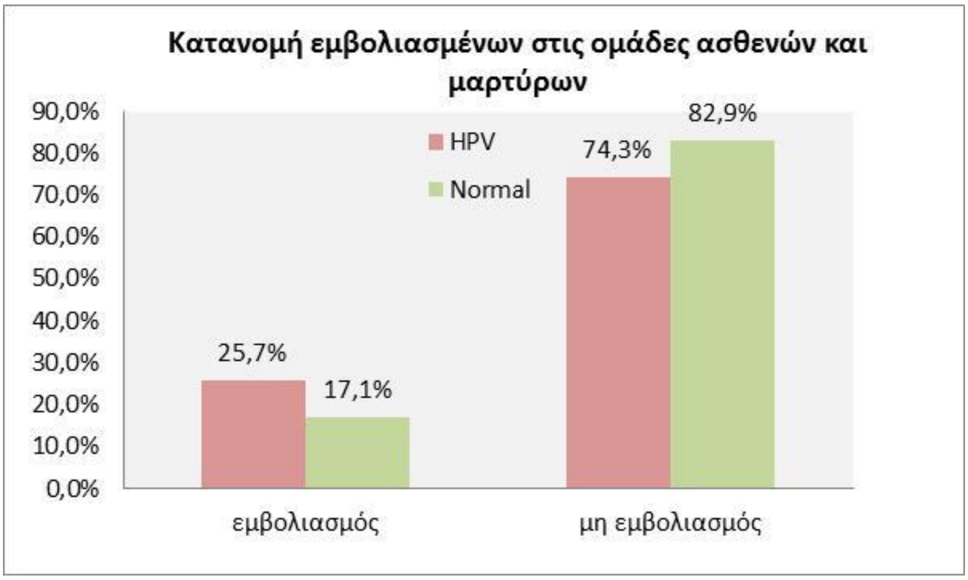
Εικόνα 44. Αρνητική έκφραση για τον παράγοντα DAZL. Διαδοχικές εικόνες από φυσιολογικό τραχηλικό επιθήλιο, χαμηλόβαθμη ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία (CIN-1), υψηλόβαθμη ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία (CIN-2 και CIN-3), διηθητικό καρκίνωμα τραχήλου. Χρώση ηωσίνης – αιματοξυλίνης (αριστερή στήλη). Χρώση διαμινοβενζιδίνης (δεξιά στήλη). Μεγέθυνση 200x.

Στη συνέχεια της παρούσας μελέτης, έγινε έλεγχος της μεμονωμένης επίδρασης κάθε παράγοντα στην εμφάνιση της νόσου. Αρχικά, έγινε κατανομή των καπνιστριών στις δύο ομάδες: ασθενείς και υγιείς. Η σύγκριση ανέδειξε ότι οι καπνίστριες έχουν 1,59 φορές μεγαλύτερη σχετική πιθανότητα για HPV σε σύγκριση με τις μη καπνίστριες (Odds Ratio 1,59). Η τιμή αυτή δεν είναι στατιστικά σημαντική, καθώς το 95% Διάστημα Εμπιστοσύνης του Odds Ratio περιλαμβάνει τη μονάδα [95% Confidence Interval (0,62 - 4,09)]. (***Εικόνα 45***)



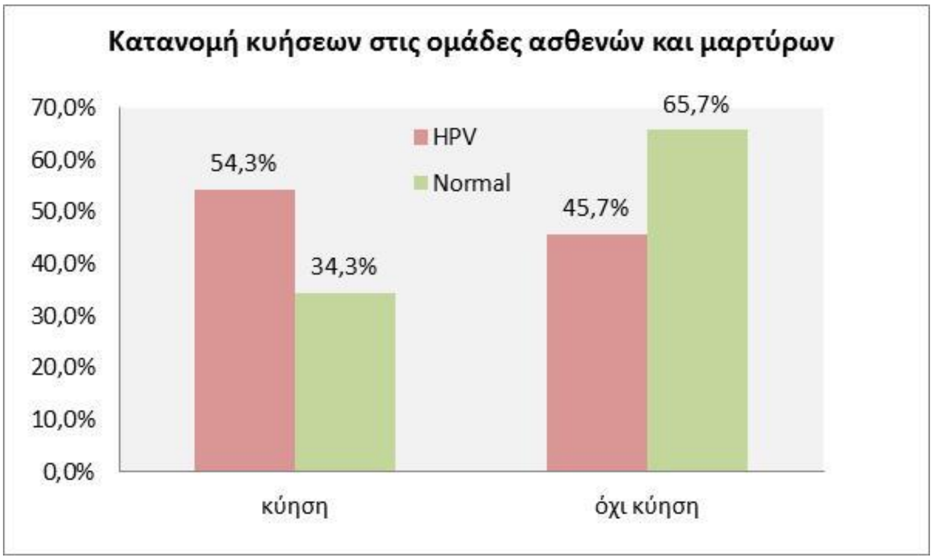
Εικόνα 45. Κατανομή καπνιστριών στις ομάδες ασθενών και μαρτύρων.

Η επόμενη σύγκριση που πραγματοποιήθηκε στην παρούσα έρευνα αφορούσε την κατανομή των εμβολιασμένων γυναικών στις δύο ομάδες του δείγματος. Το συμπέρασμα που προέκυψε ανέδειξε ότι οι γυναίκες που δεν είχαν εμβολιαστεί έχουν 1,67 φορές μεγαλύτερη σχετική πιθανότητα για HPV σε σύγκριση με εκείνες που είχαν εμβολιαστεί (Odds Ratio 1,67). Η τιμή αυτή δεν είναι στατιστικά σημαντική, καθώς το 95% Διάστημα Εμπιστοσύνης του Odds Ratio περιλαμβάνει τη μονάδα [95% Confidence Interval (0,52 - 5,34)]. (***Εικόνα 46***)



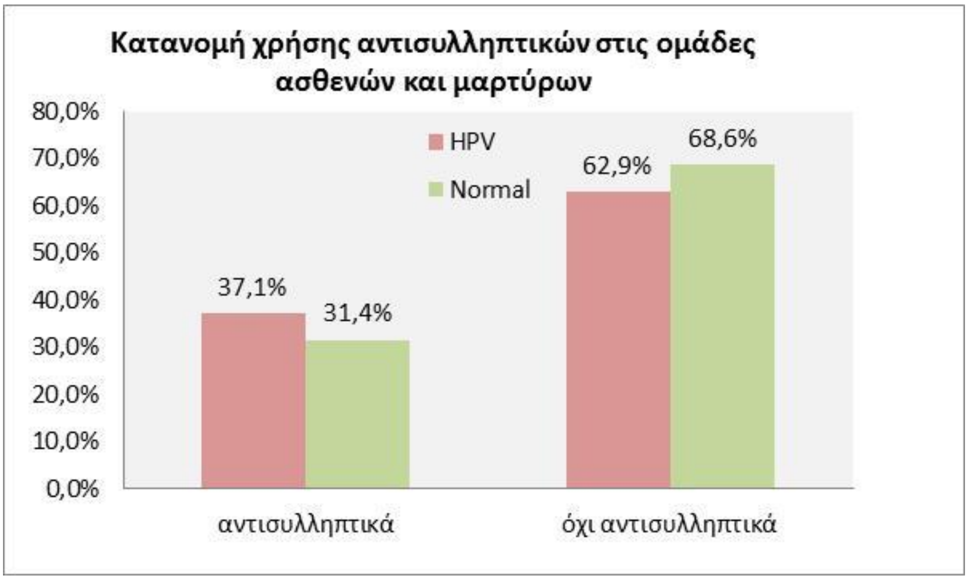
Εικόνα 46. Κατανομή εμβολιασμών στις ομάδες ασθενών και μαρτύρων.

Άλλη μία παράμετρος που αναλύθηκε ήταν η επίδραση των κυήσεων στην πορεία και εκδήλωση της HPV λοίμωξης. Η σύγκριση έδειξε ότι οι γυναίκες που δεν έχουν κυοφορήσει έχουν 2,28 φορές μεγαλύτερη σχετική πιθανότητα για HPV σε σύγκριση με εκείνες που έχουν κυοφορήσει (Odds Ratio 2,28). Η τιμή αυτή δεν είναι στατιστικά σημαντική, καθώς το 95% Διάστημα Εμπιστοσύνης του Odds Ratio περιλαμβάνει τη μονάδα [95% Confidence Interval (0,87 - 5,97)]. (***Εικόνα 47***)



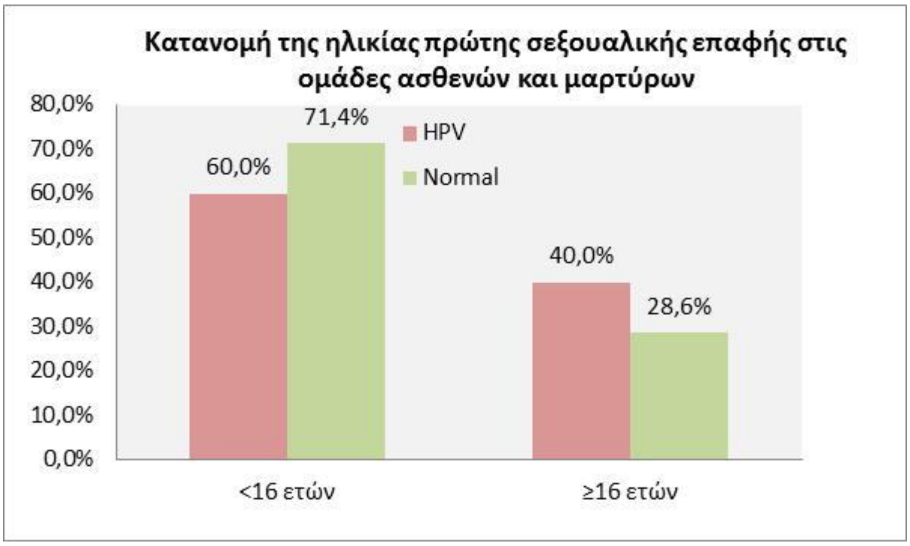
Εικόνα 47. Κατανομή κυήσεων στις ομάδες ασθενών και μαρτύρων.

Όσον αφορά τη λήψη αντισυλληπτικών, η κατανομή στις ομάδες ασθενών και μαρτύρων ανέδειξε ότι οι γυναίκες που δεν έχουν λάβει αντισυλληπτικά έχουν 1,29 φορές μεγαλύτερη σχετική πιθανότητα για HPV σε σύγκριση με εκείνες που είχαν λάβει αντισυλληπτικά (Odds Ratio 1,29). Η τιμή αυτή δεν είναι στατιστικά σημαντική, καθώς το 95% Διάστημα Εμπιστοσύνης του Odds Ratio περιλαμβάνει τη μονάδα [95% Confidence Interval (0,48 - 3,47)]. (***Εικόνα 48***)



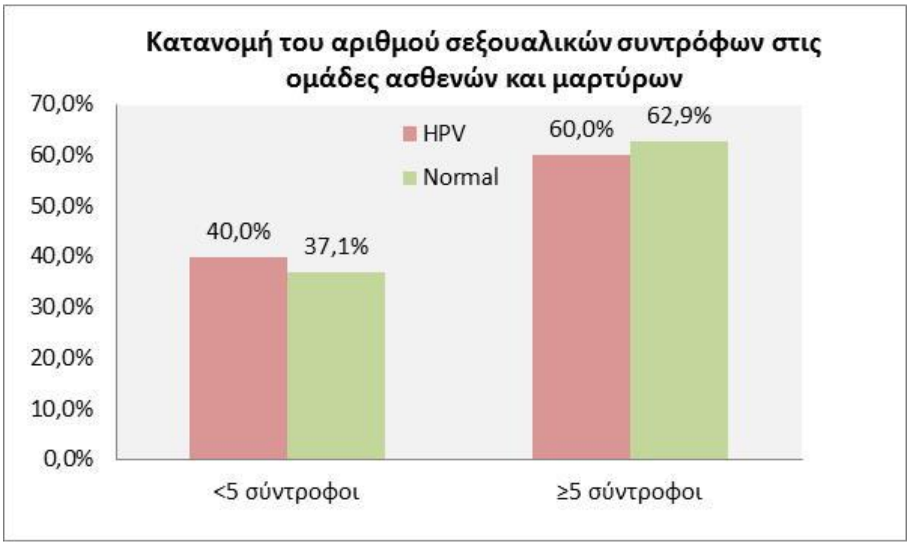
Εικόνα 48. Κατανομή της χρήσης αντισυλληπτικών δισκίων στις ομάδες ασθενών και μαρτύρων.

Επίσης, στην έρευνα, αναλύθηκε η σχέση μεταξύ της ηλικίας της πρώτης σεξουαλικης επαφής και της εμφάνισης HPV. Ανευρέθηκε ότι οι γυναίκες που είχαν την πρώτη τους σεξουαλική επαφή σε ηλικία μικρότερη των 16 ετών έχουν 0,6 φορές μεγαλύτερη σχετική πιθανότητα για HPV σε σύγκριση με εκείνες που είχαν την πρώτη τους σεξουαλική επαφή σε ηλικία μεγαλύτερη των 16 ετών (Odds Ratio 0,6). Η τιμή αυτή δεν είναι στατιστικά σημαντική, καθώς το 95% Διάστημα Εμπιστοσύνης του Odds Ratio περιλαμβάνει τη μονάδα [95% Confidence Interval (0,22 - 1,63)]. (***Εικόνα 49***)



Εικόνα 49. Κατανομή της ηλικίας της πρώτης σεξουαλικής επαφής στις ομάδες ασθενών και μαρτύρων.

Παράλληλα, μελετήθηκε και η επίπτωση του αριθμού των συντρόφων και της εμφάνισης HPV. Η σύγκριση ανέδειξε ότι οι γυναίκες που είχαν περισσότερους από 5 σεξουαλικούς συντρόφους έχουν 1,13 φορές μεγαλύτερη σχετική πιθανότητα για HPV σε σύγκριση με εκείνες που είχαν λιγότερους από 5 σεξουαλικούς συντρόφους (Odds Ratio 1,13). Η τιμή αυτή δεν είναι στατιστικά σημαντική, καθώς το 95% Διάστημα Εμπιστοσύνης του Odds Ratio περιλαμβάνει τη μονάδα [95% Confidence Interval (0,43 - 2,96)]. (***Εικόνα 50***)

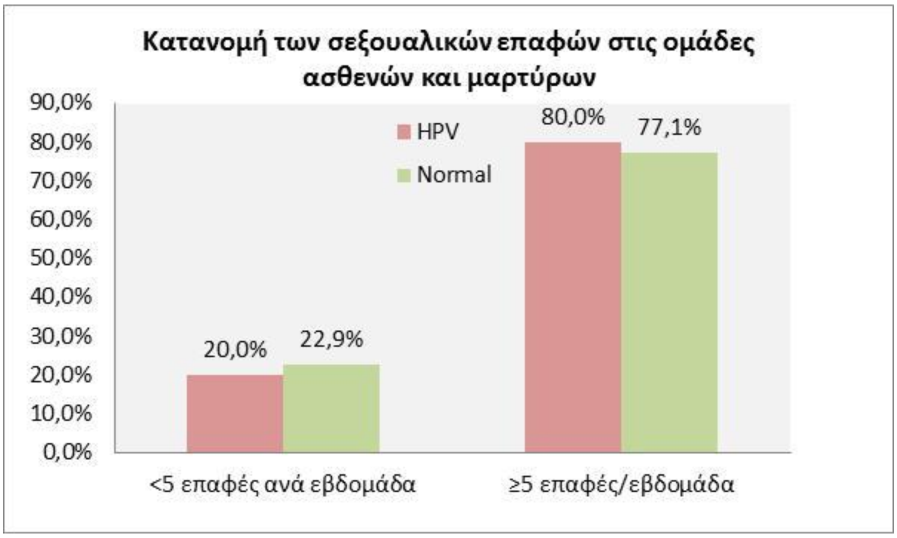


Εικόνα 50. Κατανομή του αριθμού των σεξουαλικών συντρόφων στις ομάδες ασθενών και μαρτύρων.

Ακολούθως, αναζητήθηκε η σχέση μεταξύ της χρήσης προφυλακτικού και της εμφάνισης HPV. Το αποτέλεσμα έδειξε ότι οι γυναίκες που δεν κάνουν πάντα (ή καθόλου) χρήση προφυλακτικού έχουν 13,6 φορές μεγαλύτερη σχετική πιθανότητα για HPV σε σύγκριση με εκείνες που κάνουν πάντα χρήση (Odds Ratio 13,6). Η τιμή αυτή είναι στατιστικά σημαντική καθώς το 95% Διάστημα Εμπιστοσύνης του Odds Ratio δεν περιλαμβάνει τη μονάδα. [95% Confidence Interval (1,63 - 113,2)]. (***Εικόνα 51***)

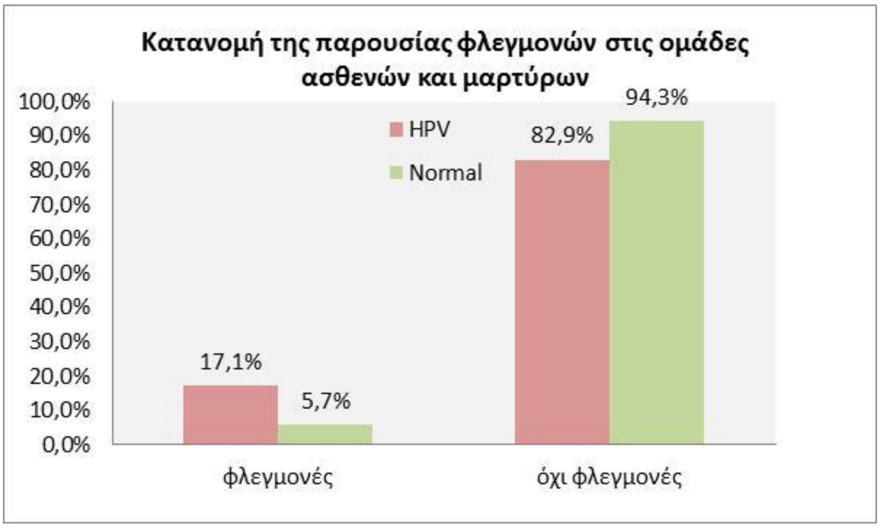
Εικόνα 51. Κατανομή της χρήσης προφυλακτικού στις ομάδες ασθενών και μαρτύρων.

Σχετικά με τη συχνότητα των σεξουαλικών επαφών, έγινε κατανομή στις δύο ομάδες του δείγματος. Η σύγκριση ανέδειξε ότι οι γυναίκες που είχαν περισσότερες από 5 σεξουαλικές επαφές την εβδομάδα έχουν 0,84 φορές μεγαλύτερη σχετική πιθανότητα για HPV σε σύγκριση με εκείνες που έχουν λιγότερες από 5 σεξουαλικές επαφές την εβδομάδα (Odds Ratio 0,84). Η τιμή αυτή δεν είναι στατιστικά σημαντική, καθώς το 95% Διάστημα Εμπιστοσύνης του Odds Ratio περιλαμβάνει τη μονάδα [95% Confidence Interval (0,27 - 2,65)]. (***Εικόνα 52***)



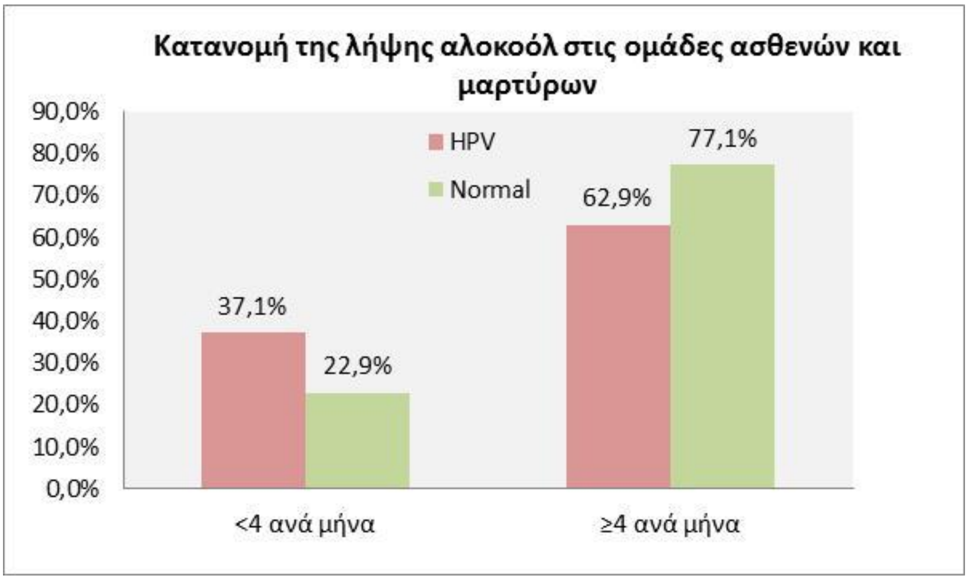
Εικόνα 52. Κατανομή του αριθμού των σεξουαλικών επαφών ανά εβδομάδα στις ομάδες ασθενών και μαρτύρων.

Μία ακόμα παράμετρος που αναλύθηκε γιατί έχει συσχετιστεί με HPV είναι η παρουσία άλλων φλεγμονών στο γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα. Πιο συγκεκριμένα, προέκυψε το συμπέρασμα ότι οι γυναίκες με συνύπαρξη νοσημάτων/φλεγμονών έχουν 241% (ή 3,41 φορές) μεγαλύτερο σχετικό κίνδυνο για HPV σε σύγκριση με εκείνες που δεν έχουν άλλες φλεγμονές (Odds Ratio 3,41). Η τιμή αυτή δεν είναι στατιστικά σημαντική καθώς το 95% Διάστημα Εμπιστοσύνης του OR περιλαμβάνει τη μονάδα [95% Confidence Interval (0,64 - 18,2)]. (***Εικόνα 53***)



Εικόνα 53. Κατανομή της παρουσίας φλεγμονών του γυναικείου αναπαραγωγικού συστήματος στις ομάδες ασθενών και μαρτύρων.

Τέλος, αναλύθηκε η κατανάλωση αλκοόλ στις δύο ομάδες ασθενών. Οι γυναίκες που πίνουν περισσότερο από 4 φορές στο μήνα έχουν διπλάσιο σχετικό κίνδυνο για HPV σε σύγκριση με εκείνες που κάνουν χρήση αλκοόλ λιγότερο από 4 φορές/μήνα (Odds Ratio 1,99). Η τιμή αυτή δεν είναι στατιστικά σημαντική καθώς το 95% Δ.Ε του OR περιλαμβάνει τη μονάδα [95% Confidence Interval (0,70 - 5,67)]. (***Εικόνα 54***)



Εικόνα 54. Κατανομή της κατανάλωσης αλκοόλ στις ομάδες ασθενών και μαρτύρων.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7ο: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΕΡΕΥΝΑΣ

Στο έβδομο κεφάλαιο της εργασίας, παρουσιάζονται τα συμπεράσματα της παρούσας έρευνας, με βάση τα όσα αναλύθηκαν παραπάνω.

Από την παρούσα έρευνα, προκύπτουν τα ακόλουθα συμπεράσματα:

1. θετική συσχέτιση μεταξύ της λοίμωξης από τον ιό HPV και του καπνίσματος, η οποία ωστόσο δεν ανευρέθηκε στατιστικά σημαντική
2. αρνητική συσχέτιση μεταξύ της λοίμωξης από τον ιό HPV και του εμβολιασμού κατά του ιού, η οποία ωστόσο δεν ανευρέθηκε στατιστικά σημαντική
3. αρνητική συσχέτιση μεταξύ της λοίμωξης από τον ιό HPV και του ιστορικού κυήσεων, όπου συνήθως παρουσιάζει υποστροφή, η οποία ωστόσο δεν ανευρέθηκε στατιστικά σημαντική
4. αρνητική συσχέτιση μεταξύ της λοίμωξης από τον ιό HPV και και του ιστορικού λήψης αντισυλληπτικών δισκίων, τα οποία έχει επιβεβαιωθεί και από άλλες μελέτες ότι δρουν προστατευτικά έναντι του καρκίνου του τραχήλου. Ωστόσο, η συσχέτιση δεν ανευρέθηκε στατιστικά σημαντική
5. θετική συσχέτιση μεταξύ της λοίμωξης από τον ιό HPV και της ηλικίας της πρώτης σεξουαλικής επαφής (κυρίως στις γυναίκες με CIN1 και CIN2), η οποία ωστόσο δεν ανευρέθηκε στατιστικά σημαντική
6. θετική συσχέτιση μεταξύ της λοίμωξης από τον ιό HPV και του αριθμού των σεξουαλικών συντρόφων, η οποία ωστόσο δεν ανευρέθηκε στατιστικά σημαντική
7. θετική συσχέτιση μεταξύ της λοίμωξης από τον ιό HPV και του αυξημένου αριθμού σεξουαλικών επαφών, η οποία ωστόσο δεν ανευρέθηκε στατιστικά σημαντική

8. θετική συσχέτιση μεταξύ της λοίμωξης από τον ιό HPV και της κατανάλωσης αλκοόλ, η οποία ωστόσο δεν ανευρέθηκε στατιστικά σημαντική
9. θετική συσχέτιση μεταξύ της λοίμωξης από τον ιό HPV και της συνύπαρξης άλλων φλεγμονών του γυναικείου αναπαραγωγικού συστήματος, η οποία ωστόσο δεν ανευρέθηκε στατιστικά σημαντική
10. θετική συσχέτιση μεταξύ της λοίμωξης από τον ιό HPV και της συνέπειας στη χρήση προφυλακτικού, η οποία ανευρέθηκε στατιστικά σημαντική
11. το γονίδιο DAZL δεν εκφράζεται ούτε στους τραχήλους των γυναικών με λοίμωξη από τον ιό HPV, ούτε και στους τραχήλους της ομάδας των μαρτύρων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8ο: ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕ ΑΛΛΕΣ ΕΡΕΥΝΕΣ – ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Στο όγδοο κεφάλαιο της εργασίας, παρουσιάζονται στοιχεία από άλλες έρευνες που αφορούν το γονίδιο DAZL.

Η παρούσα έρευνα ήταν η μοναδική έρευνα, κατά το ξεκίνημα της, που αφορούσε την έκφραση του γονιδίου DAZL σε κύτταρα φυσιολογικών τραχήλων και σε κύτταρα τραχήλων με HPV λοίμωξη. Ωστόσο, από την έρευνα που πραγματοποιήθηκε, δυστυχώς δεν επιβεβαιώθηκε η έκφρασή του στα τραχηλικά κύτταρα.

Κατά την αναζήτηση στη βιβλιογραφία, ανευρέθηκε μία ακόμα έρευνα του 2015 που αφορούσε την έκφραση των OCT – 4 και DAZL σε τραχήλους με προκαρκινικές αλλοιώσεις και τραχήλους με HPV λοίμωξη. Τα συμπεράσματα της συγκεκριμένης έρευνας επιβεβαιώνουν τα συμπεράσματα της δικής μας, όσον αφορά το γονίδιο DAZL. Αναφέρουν ότι το γονίδιο δεν εκφράζεται ούτε σε φυσιολογικούς τραχήλους, αλλά ούτε σε τραχήλους με HPV λοίμωξη ή προκαρκινική αλλοίωση.[71]

Το γονίδιο DAZL διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στη σπερματογένεση στον άνθρωπο και φαίνεται να είναι ένας ελκυστικός υποψήφιος για αυτοσωματική υπολειπόμενη στειρότητα.[1,43]

Άλλες πιθανές χρησιμότητες του γονιδίου DAZL αφορούν τα ακόλουθα:

1. Ενδεχομένως, να επιδρά στην ηλικία της φυσικής εμμηνόπαυσης. Οι έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί, επί του παρόντος, και επιβεβαιώνουν αυτήν την υπόθεση αφορούν 251 Καυκάσιες, στις οποίες μελετήθηκε ο πολυμορφισμός DAZL 260A/G στο γονίδιο DAZL (P – value = 0.97).[72]
2. Πιθανόν, να εμπλέκεται και στη γυναικεία στειρότητα, μέσω βλάβης στον πολλαπλασιασμό των ωοκυττάρων. Έχει, επομένως, υποτεθεί ότι το ανθρώπινο ομόλογο μπορεί να παίζει ρόλο στην ανάπτυξη των γεννητικών

κυττάρων, ωογονίων και σπερματογονίων, παρόλο που, στην περίπτωση αυτή, η σημειακή μετάλλαξη του 1/5P9Y δεν προκαλεί παρά διακοπή της ωρίμανσης των περισσοτέρων γεννητικών κυττάρων, στο στάδιο της μείωσης.[12,22,73,74]

3. Μία άλλη πιθανή χρησιμότητα του γονιδίου αφορά τη χρήση του για τη διάγνωση του επιθηλιακού καρκίνου των ωοθηκών.[75]
4. Τέλος, διερευνάται και το ενδεχόμενο το γονίδιο DAZL να αποτελεί ένα δείκτη της πρώιμης ωοθηκικής ανεπάρκειας (Premature ovarian failure – POF).[76]

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Poongothai J, Gopenath TS, Manonayaki S. Genetics of human male infertility. Singapore Med J 2009; 50(4): 336 – 347.
2. Γεωργίου Ι, Μπούμπα Ι, Λάζαρος Λ, Χατζή Ε, Σύρρου Μ. Γενετική βάση της ανδρικής υπογονιμότητας. ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ & ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΑ 18(4): 316-333, 2006. Διαθέσιμο στο: http://www.iatrikionline.gr/ELL_M_4_2006/316-333%20Georgiou.pdf. Ανακτήθηκε την 01/07/2014.
3. Παπαδημητρίου Σ. Διευρεύνηση των περιοχών AZF του Y χρωμοσώματος και του πολυμορφισμού SNP G197T του γονιδίου της πρωταμίνης-1 σε υπογόνιμους άνδρες της Δυτικής Ελλάδας. Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών Στις Βασικές Ιατρικές Επιστήμες: Διπλωματική Εργασία. Πάτρα, 2008. Διαθέσιμο στο: http://nemertes.lis.upatras.gr/jspui/bitstream.pdf. Ανακτήθηκε την 01/07/2014.
4. Foresta C, Moro E, Ferlin A. Y chromosome microdeletions and alterations of spermatogenesis. Endocr Rev. 2001 Apr; 22(2): 226-39. Διαθέσιμο στο: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11294825. Ανακτήθηκε την 01/07/2014.
5. Skaletsky H, Kuroda-Kawaguchi T, Minx PJ, Cordum HS, Hillier L, Brown LG et al. The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. Nature 2003; 423: 825-837. Διαθέσιμο στο: http://www.nature.com/nature/journal/v423/n6942/abs/nature01722.html. Ανακτήθηκε την 01/07/2014.
6. Zheng Li et al. “Micro-deletions’’ of the human Y chromosome and their relationship with male infertility, J. Genet. Genomics, 35: 193 – 199. 2008.
7. Munne S, Fung J, Cassel MJ, Marquez C, Weier HU. Preimplantation genetic analysis of translocations: case-specific probes for interphase cell analysis. Hum Genet 1998; 102: 663-674.
8. Page DC, Harper ME, Love J, Botstein D. Occurrence of a transposition from the X-chromosome long arm to the Y-chromosome short arm during human evolution. Nature 1984; 311: 119-123.
9. Mangs H. et al. The human Pseudoautosomal Region (PAR): Origin,Function and Future, Current Genomics, 8(2): 129-136. 2007.
10. Krausz et al. Y chromosome and male infertility: Update 2006, Frontiers in Bioscience, 11: 3049-3061. 2006.

11. Vollrath D, Foote S, Hilton A, Brown LG, Beer-Romero P, Bogan JS, Page DC. The human Y chromosome: a 43-interval map based on naturally occuring deletions. Science 1992; 258: 52-59.
12. Αγγελοπούλου Ρ. Γονίδια στη Σπερματογένεση. ΑΝΗΡ. Διαθέσιμο στο: http://hel-soc-andro.org/anir/downloads/files/Anir33-2006.3.pdf. Ανακτήθηκε την 01/07/2014.
13. Tiepolo L, Zuffardi O. Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y chromosome long arm. Hum Genet 1976, 34: 119-124.
14. Cram D. et al. Y chromosome microdeletions: implications for assisted conception, The Medical Journal of Australia, 185(5): 433-434. 2006
15. Vogt et al. Report of the Third International Workshop on Y Chromosome Mapping 1997. Cytogenet Cell Genet, 79: 1–20. 1997.
16. Siffroi JP, Le Bourhis C, Krausz C et al. Infertilité masculine: des anomalies moléculaires aux possibilités thérapeutiques. Med Sci 2000, 16: 307-317.
17. Αρκούλης Θ. Μικροελλείψεις στο Υ χρωμόσωμα. Διαθέσιμο στο: http://www.mitosis.gr. Ανακτήθηκε την 01/07/2014.
18. Repping et al, Recombination between palindromes P5 and P1 on the human Y chromosome causes massive deletions and spermatogenic failure. American Journal of Human Genetics, 71, 906–922. 2002.
19. Simoni et al. EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of Y chromosomal microdeletions. State of the art 2004, International Journal of Andrology, 27: 240-249. 2004.
20. O’Flynn O’Brien K, Varghese A, Agarwal A. The genetic causes of male factor infertility: A review. Fertility and Sterility, Vol. 93, No. 1, January 2010.
21. Πλαστήρα Ν, Αγγελοπούλου Ρ. Ανδρική υπογονιμότητα. Διαθέσιμο στο: http://panacea.med.uoa.gr/topic.aspx?id=655. Ανακτήθηκε την 01/07/2014.
22. Sun C, Skaletsky H, Birren B et al. An azoospermic man with a de novo point mutation in the Y-chromosomal gene USP9Y. Nature Genet 1999, 23, 429-432.
23. Smith PE, Engle ET. Experimental evidence of the role of anterior pituitary in development and regulation of gonads. Am J Anat 1927, 40: 159-161.

24. Ma K, Inglis JD, Sharkey A et al. A Y chromosome gene family with RNA-binding protein homology: candidates for the azoospermia factor AZF controlling human spermatogenesis. Cell 1993, 75: 1287-1295.
25. Foote S, Vollrath D, Hilton A et al. The human Y chromosome: overlapping DNA clones spanning the euchromatic region. Science 1992, 258: 60-66.
26. Chai NN, Salido EC, Yen PH. Multiple functional copies of the RBM gene family, a spermatogenesis candidate on the human Y chromosome. Genomics 1997, 45: 355-361.
27. Nakahori Y, Kobayashi K, Komaki R et al. A locus of the candidate gene family for azoospermia factor (YRRM2) is polymorphic with a null allele in Japanese males. Hum Mol Genet 1994, 3: 1709.
28. Elliott DJ, Ma K, Kerr SM et al. An RBM homologue maps to the mouse Y chromosome and is expressed in germ cells. Hum Mol Genet 1996, 5: 869-874.
29. Elliott DJ, Millar MR, Oghene K et al. Expression of RBM in the nuclei of human germ cells is dependent on a critical region of the Y chromosome long arm. Proc Natl Acad Sci USA 1997, 94: 3848-3853.
30. Pryor JL, Kent-First M, Muallem A, et al. Microdeletions in the Y chromosome of infertile men. N Engl J Med 1997, 336: 534-539.
31. Kobayashi K, Mizuno K, Hida A et al. PCR analysis of the Y chromosome long arm in azoospermic patients: evidence for a second locus required for spermatogenesis. Hum Mol Genet 1994, 3: 1965-1967.
32. Nakahori Y, Kobayashi K, Komaki R et al. The Y chromosome region essential for spermatogenesis. Hormone Res 1996, 46: 20-23.
33. Foresta C, Ferlin A, Garolla A. Y-chromosome deletions in idiopathic severe testiculopathies. J Clin Endocrinol Metab 1997, 82: 1075-1080.
34. Vogt PH, Edelmann A, Kirsch S, Henegariu O, Hirschmann P, Kiesewetter F, et al. Human Y chromosome azoospermia factors(AZF) mapped to different subregions in Yq11. Hum Mol Genet 1996, 5: 933-943.
35. Kostiner DR, Turek PJ, Reijo RA. Male infertility: analysis of the markers and genes on the human Y chromosome. Hum Reprod 1998, 13: 3032-3038.
36. Nuti F, Krausz C. Gene polymorphisms/mutations relevant to abnormal spermatogenesis. Reprod Biomed Online 2008; 16: 504–13.

37. Kuroda-Kawaguchi T, Skaletsky H et al. The AZFc region of the Y chromosome features massive palindromes and uniform recurrent deletions in infertile men. Nature Genet 2001, 29: 279-286.
38. Reijo R, Lee TY, Salo P et al. Diverse spermatogenic defects in humans caused by Y chromosome deletions encompassing a novel RNA-binding protein gene. Nature Genet 1995, 10: 383-393.
39. Yen PH. Putative biological functions of the DAZ family. Int J Androl. 2004 Jun; 27(3): 125-9. Διαθέσιμο στο: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15139965. Ανακτήθηκε την 01/07/2014.
40. Eberhar C G, Maines J Z, Wasserman S A. Meiotic cell cycle requirement for a fly homologue of human Deleted in Azoospermia. Nature 1996, 381: 783-785.
41. Kleene K. Connecting cis-elements and trans-factors with mechanisms of developmental regulation of mRNA translation in meiotic and haploid mammalian spermatogenic cells. Διαθέσιμο στο: http://www.reproduction-online.org/content/146/1/R1.long. Ανακτήθηκε την 01/07/2014.
42. Διαδικτυακή εγκυκλοπαίδεια Wikipedia. DAZ1. Διαθέσιμο στο: http://en.wikipedia.org/wiki/DAZ1. Ανακτήθηκε την 01/07/2014.
43. Reynolds N, Cooke HJ. Role of the DAZ genes in male fertility. Reprod Biomed Online. 2005 Jan; 10(1): 72-80. Διαθέσιμο στο: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15705297. Ανακτήθηκε την 01/07/2014.
44. Ruggiu M, Speed R, Taggart M, McKay SJ, Kilanowski F, Saunders P et al. The mouse Dazla gene encodes a cytoplasmic protein essential for gametogenesis. Nature 1997, 389: 73-77.
45. Kuo PL, Wang ST, Lin YM, Lin YH, Teng YN, Hsu CC. Expression profiles of the DAZ gene family in human testis with and without spermatogenic failure. Fertil Steril 2004, 81: 1034-1040.
46. Saxena R, Brown LG, Hawkins T et al. The DAZ gene cluster on the human Y chromosome arose from an autosomal gene that was transposed, repeatedly amplified and pruned. Nat Genet 1996, 14: 292-299.
47. Hackstein JH, Hochstenbach R. The elusive fertility genes of Drosophila: the ultimate haven for selfish genetic elements. Trends Genet 1995, 11: 195-200.

48. Cooke HJ, Lee M, Kerr S et al. A murine homologue of the human DAZ gene is autosomal and expressed only in male and female gonads. Hum. Mol. Genet 1996, 5: 513-516.
49. Karashima T, Sugimoto A, Yamamoto MA. A C. elegans homologue of DAZ/boule is involved in progression through meiosis during oogenesis. Worm Breeder's Gazette 1997, 15: 65.
50. Houston DW, Zhang J, Maines JZ et al. A Xenopus DAZ-like gene encodes an RNA component of germ plasm and is a functional homologue of Drosophila boule. Development 1998, 125: 171-180.
51. Saxena R, de Vries JW, Repping S et al. Four DAZ genes in two clusters found in the AZFc region of the human Y chromosome. Genomics 2000, 67: 256-267.
52. Yen PH, Chai NN, Salido EC. The human autosomal gene DAZLA: testis specificity and a candidate for male infertility. Hum Mol Genet 1996, 5: 2013-2017.
53. Reijo R et al. Severe oligozoospermia resulting from deletions of azoospermia factor gene on Y chromosome. Lancet 1996; 347:1290-1293.
54. De Vries JW, Repping S, Van Daalen SK, Korver CM, Leschot NJ, Van Der Veen F. Clinical relevance of partial AZFc deletions. Fertil Steril 2002; 74: 1209-1214.
55. Reynolds N, Cooke HJ. Role of the DAZ genes in male fertility. Reproductive BioMedicine Online 10 72–80. 2005.
56. VanGompel MJ, Xu EY. The roles of the DAZ family in spermatogenesis: more than just translation? Spermatogenesis 1 36–46. 2011.
57. Brook M, Smith J, Gray N. The DAZL and PABP families: RNA-binding proteins with interrelated roles in translational control in oocytes. Διαθέσιμο στο: http://www.reproduction-online.org/content/137/4/595.long. Ανακτήθηκε την 01/07/2014.
58. Tsui S, Dai T, Roettger S, et al. Identification of two novel proteins that interact with germ-cell-specific RNA-binding proteins DAZ and DAZL1.Genomics 2000; 65: 266-73.
59. Lilford R, Jones AM, Bishop DT, et al. Case-control study of whether subfertility in men is familial. Br Med J 1994; 309: 570-3.

60. Teng YN, Lin YM, Lin YH, et al. Association of a single-nucleotide polymorphism of the deleted-in-azoospermia-like gene with susceptibility to spermatogenic failure. J Clin Endocrinol Metab 2002; 87: 5258-64.
61. Thangaraj K, Deepa SR, Pavani K, et al. A to G transitions at 260, 386 and 437 in DAZL gene are not associated with spermatogenic failure in Indian population. Int J Androl 2006; 29: 510-4.
62. Saunders PT, Turner JM, Ruggiu M, Taggart M, Burgoyne PS, Elliott D, Cooke HJ. Absence of mDazl produces a final block on germ cell development at meiosis. Reproduction 126 589–597. 2003.
63. Venables JP, Ruggiu M, Cooke HJ. The RNA-binding specificity of the mouse Dazl protein. Nucleic Acids Research 29 2479–2483. 2001.
64. Collier B, Gorgoni B, Loveridge C, Cooke HJ, Gray NK. The DAZL family proteins are PABP-binding proteins that regulate translation in germ cells. EMBO Journal 24 2656–2666. 2005.
65. Bartoloni et al. Lack of the T54A polymorphism of the DAZL gene in infertile Italian patients, Molecular Human Reproduction, 10(8): 613-615. 2004.
66. Καρκαλέτση Μ, Χατζάκη Α, Βελισσαρίου Β. Γενετική της υπογονιμότητας. Διαθέσιμο στο: http://m.iatronet.gr/article.aspx?id=20433. Ανακτήθηκε την 01/07/2014.
67. Meschede D, Froster UG, Bergmann M, Nieschlag E. Familial pericentric inversion of chromosome 1(p34q23) and male infertility with stage specific spermatogenic arrest. J Med Genet 1994; 31: 573-575.
68. Hurles ME, Willey D, Metthews L, Hussain SS. Origins of chromosomal rearrangement hotspots in the human genome: evidence from the AZFa deletion hotspots. Enome Biol 2004; 5(8):R55.
69. Giachini C, Guarducci E, Longepied G, Degl'Innocenti S, Becherini L, Forti G, Mitchell MJ, Krausz C. The gr/gr deltion(s): a new gentic test in male infertitlity? J Med Genet 2005; 42(6): 497-502.
70. Καρκαλέτση Μ, Χατζάκη Α, Βελισσαρίου Β. Γενετική της υπογονιμότητας. Διαθέσιμο στο: http://www.hygeia.gr/page.aspx?p_id=965. Ανακτήθηκε την 01/07/2014.

71. Stefanidis K, Pergialiotis V, Christakis D, Patta J, Stefanidi D, Loutradis D. OCT-4 and DAZL expression in precancerous lesions of the human uterine cervix. J Obstet Gynaecol Res. 2015 May;41(5):763-7. Διαθέσιμο στο: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=J+Obstet+Gynaecol+Res.+2015+May%3B41(5)%3A763-7. Ανακτήθηκε την 20/02/2017.
72. Βλαχάδης Ν. Εμμηνόπαυση: Γενετική και Εξελικτική Προσέγγιση. Διαθέσιμο στο: http://www.ethnopharmacology.gr/images/stories/ekdiloseis/2010_10/menopause_vlachadis.pdf. Ανακτήθηκε την 01/07/2014.
73. Kang M, Han S. Post-transcriptional and post-translational regulation during mouse oocyte maturation. BMB reports. Διαθέσιμο στο: http://bmbreports.org. Ανακτήθηκε την 01/07/2014.
74. Cotinot C, Pailhoux E, Jaubert F, Fellous M. Molecular Genetics of Sex Determination. Semin Reprod Med. 2002; 20(3). Διαθέσιμο στο: http://www.medscape.com/viewarticle/444686_5. Ανακτήθηκε την 01/07/2014.
75. Pitman J, Mcneilly A, Mcneilly J, Hays L, Bagby jr G, Sawyer H, Mcnatty K. The fate of granulosa cells following premature oocyte loss and the development of ovarian cancers. Int. J. Dev. Biol. 56: 949-958 (2012).
76. Fassnacht W, Mempel A, Strowitzki T, Vogt PH. Premature ovarian failure (POF) syndrome: towards the molecular clinical analysis of its genetic complexity. Curr Med Chem. 2006; 13(12): 1397-410. Διαθέσιμο στο: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16719785. Ανακτήθηκε την 01/07/2014.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Παράρτημα 1

Προσωπικά Στοιχεία Ασθενούς	
Επώνυμο:	**Όνομα:**
Πατρώνυμο:	

Κωδικός Ασθενή:

Κριτήρια Επιλογής

Ηλικία: 20 – 64 έτη

Φύλο: Θήλυ

Ποια είναι η ηλικία σας;		
Είστε καπνίστρια;	ΝΑΙ	ΟΧΙ
Έχετε εμβολιαστεί έναντι του HPV;	ΝΑΙ	ΟΧΙ
Έχετε παιδιά;	ΝΑΙ	ΟΧΙ
Έχετε πάρει αντισυλληπτικά;	ΝΑΙ	ΟΧΙ
Σε ποια ηλικία είχατε την πρώτη σεξουαλική επαφή;	Κάτω των 16 ετών	Άνω των 16 ετών
Πόσους σεξουαλικούς συντρόφους είχατε στη ζωή σας;	Κάτω των 5	Άνω των 5
Κάνετε χρήση προφυλακτικού;	Πάντα	Όχι πάντα/καθόλου
Πόσες σεξουαλικές επαφές έχετε την εβδομάδα;	Κάτω των 5	Άνω των 5
Έχετε ιστορικό με άλλα σεξουαλικώς μεταδιδόμενα νοσήματα ή φλεγμονές;	ΝΑΙ	ΟΧΙ
Πόσες φορές κάνετε λήψη αλκοόλ το μήνα;	Κάτω των 4	Άνω των 4

Προσωπικά Στοιχεία Ασθενούς		
Ημερομηνία: / /		
Ημερομηνία Γέννησης: / /		**Ηλικία:**
Επώνυμο:		
Όνομα:	**Όνομα Πατέρα:**	
Διεύθυνση:	**Αριθμός:**	
Περιοχή:	**Πόλη:**	
Νομός:	**Τ.Κ.:**	
Χώρα:		
Τηλέφωνο Οικίας:		
Τηλέφωνο Εργασίας:		
Fax:		
Διεύθυνση Ηλεκτρονικού Ταχυδρομείου (E-mail):		

Κωδικός Ασθενή: