



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ –
ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΣΤΗ ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ
ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΑ – ΠΕΡΙΓΕΝΝΗΤΙΚΗ ΙΑΤΡΙΚΗ»

Διευθυντής ΠΜΣ : Καθηγητής ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ Ι. ΔΑΠΟΝΤΕ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

<<ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ FAM19A4 ΣΕ ΗΡV
ΘΕΤΙΚΕΣ ΓΥΝΑΙΚΕΣ ΜΕ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΤΡΑΧΗΛΟΥ ΤΗΣ ΜΗΤΡΑΣ>>

ΧΙΩΤΗ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ
ΤΕΧΝΟΛΟΓΟΣ ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΩΝ

Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των
απαιτήσεων για την απόκτηση του
Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης

ΛΑΡΙΣΑ

Οκτώβριος 2019

Εγκρίθηκε από τα Μέλη της Εξεταστικής Επιτροπής:

1^{ος} Εξεταστής Σαμαρά Μαρία

(Επιβλέπων) Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής Πανεπιστημίου
Θεσσαλίας

2^{ος} Εξεταστής Σάτρα Μαρία

ΕΔΙΠ Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

3^{ος} Εξεταστής Δαπόντε Αλέξανδρος

Καθηγητής Μαιευτικής και Γυναικολογίας Πανεπιστημίου
Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω αρχικά τον Καθηγητή Μαιευτικής και Γυναικολογίας κύριο Αλέξανδρο Δαπόντε που με δέχτηκε στο μεταπτυχιακό πρόγραμμα σπουδών <<Βιολογία της Αναπαραγωγής-Βιοδείκτες στη Μαιευτική και Γυναικολογία-Περιγεννητική Ιατρική>>.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή Παθολογικής Ανατομικής κύριο Γεώργιο Κουκούλη, που με δέχτηκε στο εργαστήριό του, όπως και για την ερευνητική του ανατροφοδότηση.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω προσωπικά την Επιβλέπουσα Καθηγήτρια μου, Επίκουρη Καθηγήτρια, κυρία Μαρία Σαμαρά, για τη συνεχή καθοδήγηση και υποστήριξη που μου προσέφερε καθ' όλη τη διάρκεια, καθώς και για τις προκλήσεις που μου έθεσε, ώστε να ξεπεράσω τον εαυτό μου.

Το συγκεκριμένο εγχείρημα δε θα ήταν εφικτό χωρίς τη συμβολή της οικογένειάς μου. Για το λόγο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου, την αδερφή μου, τον αδερφό μου και τους υπόλοιπους συγγενείς και φίλους που στάθηκαν στο πλάι μου και στήριξαν την προσπάθειά μου.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τις υποψήφιες διδάκτορες του εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής, κυρίες Μαρία Παπαθανασίου και Αικατερίνη Χατζούλη, για την πολύτιμη βοήθειά τους, την καθοδήγηση που μου προσέφεραν όλο αυτό το διάστημα και την άψογη συνεργασία μας που συνέβαλλε καθοριστικά στην ολοκλήρωση της συγκεκριμένης εργασίας.

ΧΙΩΤΗ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ

ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ

ΧΙΩΤΗ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ

Ημερομηνία Γέννησης: 21/4/1995

ΣΠΟΥΔΕΣ

- Απόφοιτη ΤΕΙ Θεσσαλίας-Τμήμα Τεχνολόγων Ιατρικών Εργαστηρίων
Σεπτέμβριος 2013-Δεκέμβριος 2017
- Μεταπτυχιακή φοιτήτρια Πανεπιστημίου Θεσσαλίας-Τμήμα Ιατρικής-Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών σπουδών <<ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ-ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΣΤΗ ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΑ-ΠΕΡΙΓΕΝΝΗΤΙΚΗ ΙΑΤΡΙΚΗ>>
Σεπτέμβριος 2019-Νοέμβριος 2019

ΣΥΝΕΧΙΖΟΜΕΝΗ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ-ΚΑΤΑΡΤΙΣΗ

- 2^ο Συνέδριο Αναπαραγωγικής Ιατρικής Κεντρικής Ελλάδας
30/11-2/12/2018-Λάρισα
- Σεμινάριο για τα Διαγνωστικά στην <<Υγεία της Γυναίκας>>-Roche Diagnostics Hellas. 30/9-2/10/2019-Αθήνα

ΕΡΓΑΣΙΕΣ- ΜΕΛΕΤΕΣ

- Πτυχιακή εργασία: <<Μυελογενείς λευχαιμίες και ο Εργαστηριακός Έλεγχος τους>>
- Διπλωματική εργασία: <<Μελέτη επιπέδων μεθυλίωσης του γονιδίου FAM19A4 σε HPV θετικές γυναίκες με καρκίνο του τραχήλου της μήτρας>>

**<<ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ FAM19A4 ΣΕ ΗΡV
ΘΕΤΙΚΕΣ ΓΥΝΑΙΚΕΣ ΜΕ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΤΡΑΧΗΛΟΥ ΤΗΣ ΜΗΤΡΑΣ>>**

ΧΙΩΤΗ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Τμήμα Ιατρικής, 2018

**ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ ΤΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ
ΣΠΟΥΔΩΝ**

ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ Ι. ΔΑΠΟΝΤΕ

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΜΑΙΕΥΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Επιβλέπων: Σαμαρά Μαρία

Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Σύμβουλος : Σάτρα Μαρία

ΕΔΙΠ Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Μέλος : Δαπόντε Αλέξανδρος

Καθηγητής Μαιευτικής και Γυναικολογία Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Περίληψη

Ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας αποτελεί τη συχνότερη κακοήθεια στις γυναίκες και εμφανίζει αυξημένη συχνότητα στις ανεπτυγμένες χώρες. Πρόκειται για μια ιδιαίτερα ετερογενή νόσο με ποικίλα βιολογικά και παθολογοανατομικά χαρακτηριστικά, διαφορετική έκβαση και ανταπόκριση στις εφαρμοζόμενες θεραπείες. Την τελευταία δεκαετία η έρευνα έχει στραφεί στη μελέτη των επιγενετικών αλλαγών γονιδίων επιγενετικές αλλαγές γονιδίων που μπορεί να εμπλέκονται στην καρκινογένεση διαφόρων τύπων καρκίνου, μεταξύ των οποίων και ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας. Πλήθος μελετών έχει εντοπίσει μεγάλο αριθμό μεθυλιωμένων γονιδίων, που εμπλέκονται σε κρίσιμες κυτταρικές διεργασίες, χωρίς ωστόσο μέχρι σήμερα να έχουμε οδηγηθεί στην εύρεση κάποιου προγνωστικού ή προβλεπτικού επιγενετικού βιοδείκτη. Στην παρούσα εργασία θελήσαμε να μελετήσουμε τα επίπεδα μεθυλίωσης των CpG νησίδων των υποκινητών του FAM19A4 γονιδίου σε γυναίκες με καρκίνο του τραχήλου της μήτρας, προκειμένου να δούμε το ρόλο των επιγενετικών αλλαγών στα γονίδια αυτά και την πιθανή επίδρασή τους στην καρκινογένεση του τραχήλου. Στη μελέτη συμμετείχαν 30 γυναίκες ασθενείς με καρκίνο του τραχήλου της μήτρας ή υψηλόβαθμες αλλοιώσεις (CINIII). Τα επίπεδα μεθυλίωσης των FAM19A4_01 και FAM19A4_03 αναλύθηκαν με τη μέθοδο της πυροαλληλούχισης και η στατιστική ανάλυση έγινε με το λογισμικό IBM SPSS v22. 17/30 ασθενείς (56.7%) έφεραν απλή λοίμωξη HPV για το στέλεχος 16. 13/30 ασθενείς (43.3%) διαγνώστηκαν με πολλαπλές λοιμώξεις και έφεραν τα στελέχη 6, 11, 16 ή 16, 31 ή 16, 31, 33.. Τα επίπεδα μεθυλίωσης κυμάνθηκαν στο $13.25 \pm 6.4\%$ με εύρος (7-24,75) και $14.6 \pm 7\%$ με εύρος (5,3-39,7) αντίστοιχα. Τα ευρήματα ήταν παρόμοια και δεν αναδείχθηκε κάποια στατιστικώς σημαντική συσχέτιση.

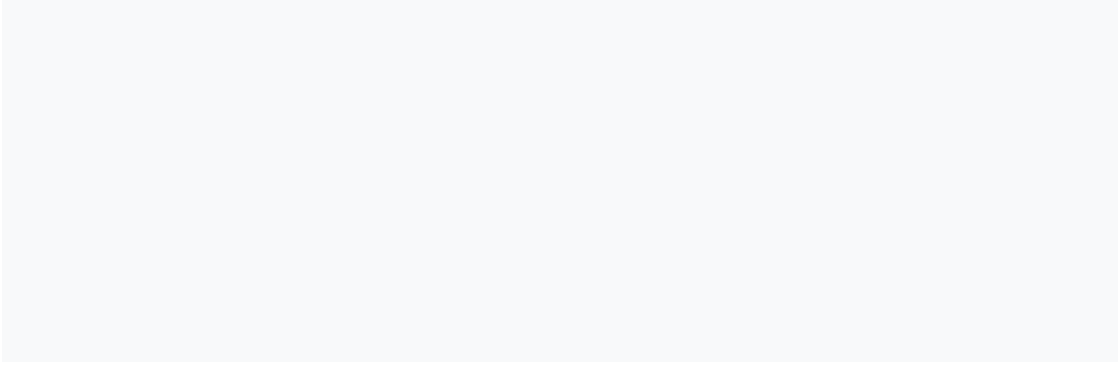
Στην παρούσα μελέτη αναλύθηκαν τα επίπεδα μεθυλίωσης δύο περιοχών του γονιδίου FAM19A4 σε ασθενείς υψηλού κινδύνου δυσπλασίας και καρκίνου. Δεν αναδείχθηκε κάποια στατιστικώς σημαντική συσχέτιση με τις παραμέτρους που μελετήθηκαν. Ωστόσο, δεδομένου απαιτείται μελέτη μεγαλύτερου αριθμού δειγμάτων σε συνδυασμό με το γεγονός ότι η μεθυλίωση του FAM19A4 γονιδίου φαίνεται να διαδραματίζει ρόλο στην καρκινογένεση του τραχήλου της μήτρας ανοίγουν το δρόμο

προς την έρευνα και την εξέταση του γονιδίου FAM19A4 ως υποψήφιου μελλοντικού βιοδείκτη.

Summary

Cervical cancer is the most common malignancy in women and has increased frequency in the Western world. It is a highly heterogeneous disease with a variety of biological and pathological characteristics, different outcome and response to the treatments applied. In the last decade, research has focused on epigenetic changes in genes that are putatively contributing to the carcinogenesis of various types of cancer, including cervical cancer. Many studies have identified a large number of methylated genes involved in critical cellular processes, but to date we have not been able to find any prognostic or predictive epigenetic biomarkers. In this work we studied the methylation levels of CpG islets of FAM19A4 gene promoters in women with cervical cancer in order to evaluate the role of epigenetic changes in these genes and their possible effect on tracheal carcinogenesis. The study included 30 female patients with cervical cancer or high grade lesions (CINIII). Methylation levels of FAM19A4_01 and FAM19A4_03 were analyzed by the sequencing method and the statistical analysis was done with IBM SPSS v22 software. 17/30 patients (56.7%) were positive for HPV 16. 13/30 patients (43.3%) were multiple HPV positive for 6, 11, 16 or 16, 31 or 16, 31, 33 subtypes. Methylation levels were calculated at $13.25 \pm 6.4\%$ (7-24,75) and $14.6 \pm 7\%$ (5,3-39,7) respectively. Methylation levels didn't differ and no statistically significant correlations arose.

In this study, we analyzed methylation levels for two FAM19A4 regions in CINIII and cervical cancer patients. No statistically significant correlations were detected with studied parameters. Nevertheless, further studies are required with larger sample sizes. Given that FAM19A4 methylation levels play a part in cervical cancer carcinogenesis, a new research path of FAM19A4 testing as a potential biomarker can open.



ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

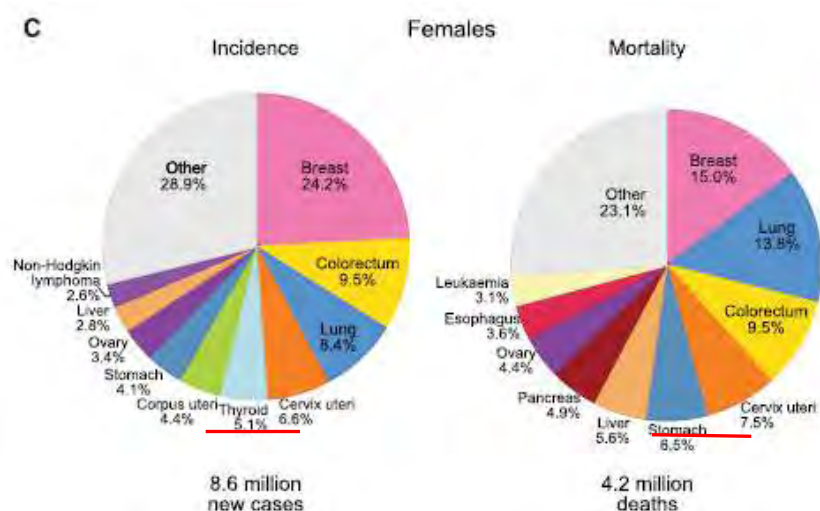
1.1 Επιδημιολογικά Στοιχεία.....σελ	11
1.2 Ανατομία του Τραχήλου.....σελ	14
1.3 Φυσιολογία Τραχήλου.....σελ	15
1.4 Ιστολογία του τραχήλου της μήτρας.....σελ	15
1.5 Καρκίνος του Τραχήλου της μήτρας.....σελ	16
1.5.1 Αιτιολογικοί παράγοντες.....σελ	16
1.5.2 Κλινική εικόνα-Συμπτώματα.....σελ	17
1.5.3 Ιστολογική ταξινόμηση.....σελ	18
1.5.4 Σταδιοποίηση.....σελ	20
1.5.5 Διάγνωση.....σελ	25
1.5.6 Θεραπεία.....σελ	26
1.6 Επιγενετική.....σελ	28
1.7 Μεθυλίωση του DNA και Καρκίνος του Τραχήλου της Μήτρας.....σελ	30
1.7.1 Το γονίδιο FAM19A4.....σελ	30
Κεφάλαιο 2 Ειδικό Μέρος	
2.1 Σκοπός.....σελ	31
2.2 Υλικά Μελέτης.....σελ	31
2.2.1 Απομόνωση DNA από FFPE ιστό(DNAextraction).....σελ	32
2.2.2 Ποιοτικός και Ποσοτικός Προσδιορισμός DNA.....σελ	34
2.2.2.1 Φωτομέτρηση.....σελ	34
2.2.2.2 Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων.....σελ	34
2.3 Παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης.....σελ	35
2.3.1 Διαδικασία Ηλεκτροφόρησης.....σελ	36
2.4 Τροποποίηση με διθειφιδικό νάτριο των μη-μεθυλιωμένων κυτοσινών του DNA (Sodium Bisulfite Conversion of Unmethylated Cytosines in DNA).....σελ	37
2.5 Καθαρισμός του τροποποιημένου DNA (bisulfite converted).....σελ	40

2.6 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης PCR για ενίσχυση του υπό μελέτη γονιδιακού τμήματος	σελ 41
2.6.1 Ηλεκτροφόρηση των PCR προϊόντων του εξεταζόμενου γονιδίου FAM19A4.....	σελ 46
2.7 Αρχή της λειτουργίας της μεθόδου πυροαλληλούχισης (Pyrosequencing).....	σελ 48
2.7.1 Αντιδράσεις πυροαλληλούχισης των προϊόντων του εξεταζόμενου γονιδίου FAM19A4.....	σελ 51
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	σελ 58
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	σελ 63
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	σελ 66

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

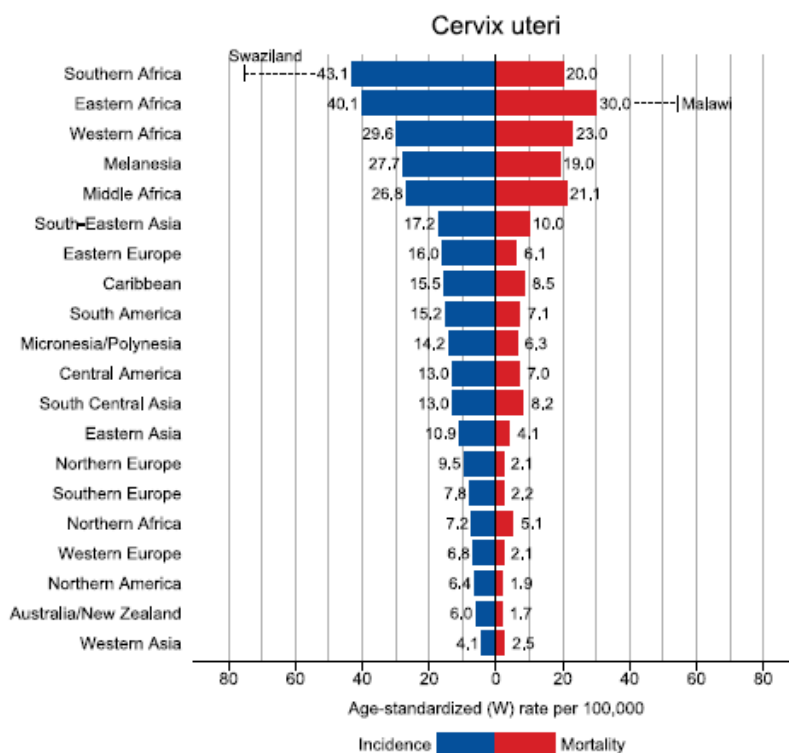
1.1 Επιδημιολογικά στοιχεία

Ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας είναι ο τέταρτος σε συχνότητα γυναικολογικός καρκίνος και αποτελεί την τρίτη συχνότερη αιτία θανάτου από καρκίνο στις γυναίκες παγκοσμίως. Το 2018 καταγράφηκαν 569.847 νέες περιπτώσεις και 311.365 θάνατοι από το συγκεκριμένο καρκίνο. (Bray et al, 2018 / Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. Freddie Bray, Jacques Ferlay, Isabelle Soerjomataram, Rebecca L. Siegel, Lindsey A. Torre, Ahmedin Jemal, CA: Cancer J Clin. 2018;68:394-424.) (Εικόνα 1).



Εικόνα 1. Κατανομή νέων περιπτώσεων και θανάτων των δέκα συχνότερων παγκοσμίως καρκίνων στα θήλα άτομα (2018), Πηγή: Bray F et al, 2018)

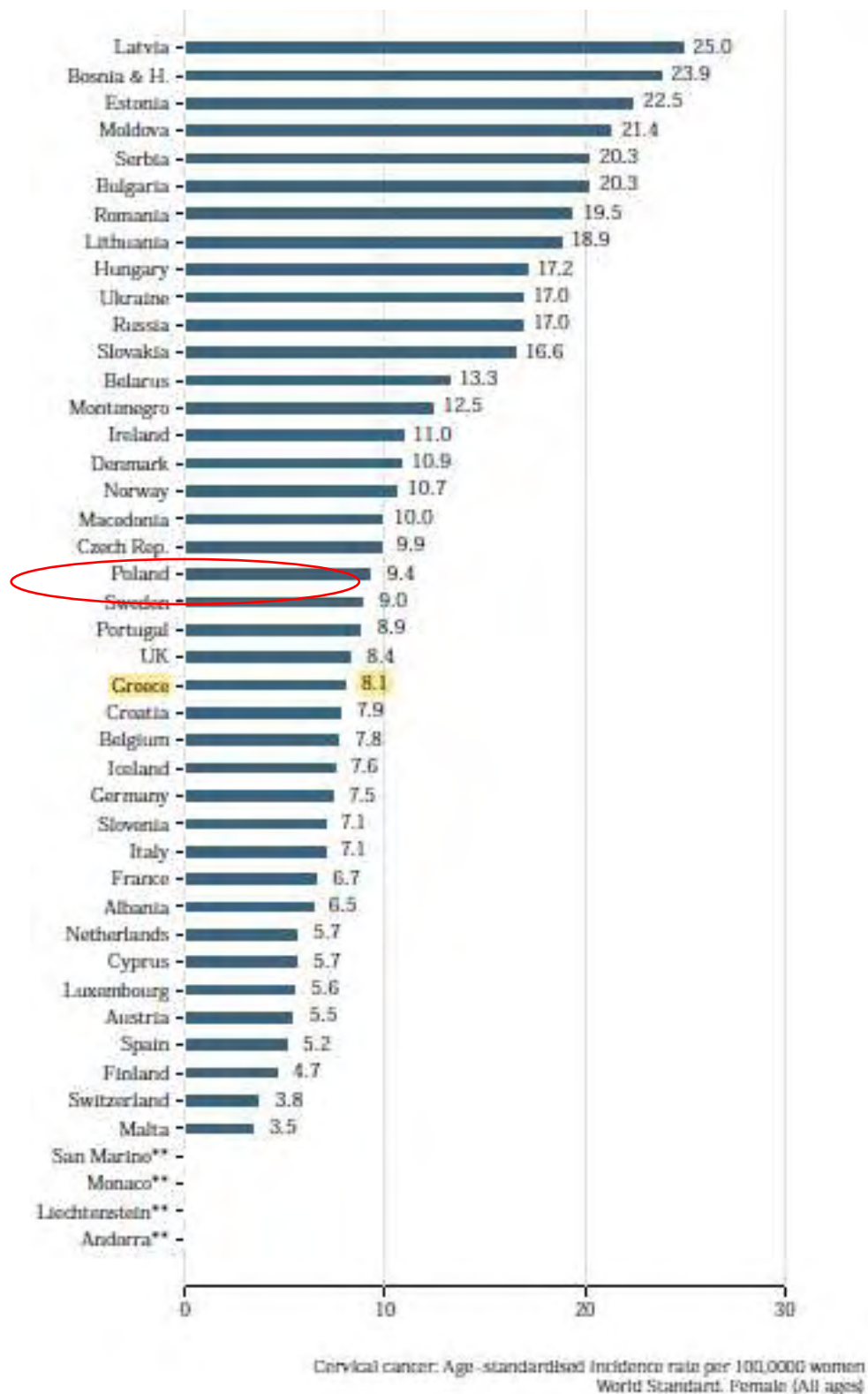
Ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας παρουσιάζει υψηλότερα ποσοστά εμφάνισης στις λιγότερο αναπτυγμένες χώρες. Περιοχές όπως η Νότια Αμερική, η Νότια Αφρική και η Νότια Κεντρική Ασία παρουσιάζουν τα υψηλότερα ποσοστά εμφάνισης, με πάνω από 25 ανά 100.000 γυναίκες. (Εικόνα 2). Το υψηλότερο ποσοστό εμφάνισης αναφέρθηκε στην Αϊτή (64 ανά 100.000 γυναίκες), ενώ το χαμηλότερο ποσοστό εμφάνισης ήταν στην Ευρώπη και συγκεκριμένα στη Φιλανδία (6.2 ανά 100.000 γυναίκες)(Alves et al.,2010, Bray F et al, 2018).



Εικόνα 2. Συχνότητες εμφάνισης και θνησιμότητας από καρκίνο του τραχήλου της μήτρας σε ποικίλες γεωγραφικές περιοχές (2018). Πηγή: Bray F et al, 2018)

Σύμφωνα, με τη Διεθνή υπηρεσία έρευνας της Παγκόσμιας Οργάνωσης Υγείας (IARC), ο ιός των ανθρωπίνων θηλωμάτων (Human Papilloma Virus, HPV) αποτελεί απαραίτητη αλλά όχι επαρκή αιτία πρόκλησης καρκίνου. Επιδημιολογικοί παράγοντες όπως το κάπνισμα, ο μεγάλος αριθμός κηρίσεων, η εναλλαγή πολλών ερωτικών συντρόφων, η χρήση αντισυλληπτικών χαπιών δια του στόματος και η ανοσοκαταστολή δρουν ως συμπαραγοντες (Herrero R, Murillo R. Cervical cancer. In: Thun MJ, Linet MS, Cerhan JR, Haiman CA, Schottenfeld D, eds. Cancer Epidemiology and Prevention. 4th ed. New York: Oxford)

University Press; 2018:925-946). Στην Ελλάδα, η συχνότητα εμφάνισης ανά 100.000 γυναίκες κυμαίνεται σε ποσοστό της τάξης του 8.1 (Bray F et al, 2018) (Εικόνα 3)

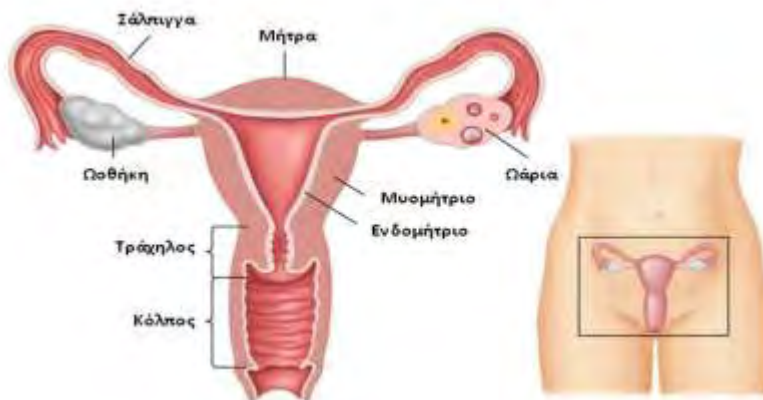


Εικόνα 3. Συχνότητα εμφάνισης καρκίνου του τραχήλου της μήτρας οφειλόμενου στον ιό HPV ανά χώρα στην Ευρώπη (2018), ICO/IARC HPV Information Centre, 2019)

1.2 Ανατομία του τραχήλου της μήτρας

Το γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα αποτελείται από τα έξω και έσω γεννητικά όργανα. Τα έξω είναι το εφήβαιο, τα μεγάλα και μικρά χείλη του αιδοίου, η κλειτορίδα, ο πρόδρομος του κόλπου και οι βαρθολίνειοι αδένες. Τα έσω γεννητικά όργανα περιλαμβάνουν τις ωοθήκες, τις σάλπιγγες, τον κόλπο, τη μήτρα και τον τράχηλο. Ο τράχηλος είναι το κατώτερο τμήμα της μήτρας που συνδέεται με τον κόλπο, παίζει σπουδαίο ρόλο στην αναπαραγωγή και παραμένει κλειστός κατά την διάρκεια της εγκυμοσύνης (Alex Ferenczy, 1977).

Το σχήμα του τραχήλου είναι κυλινδρικό και ενώνεται με το σώμα της μήτρας. Χωρίζεται σε δυο τμήματα, το κολπικό και το εξωκολπικό. Το κολπικό τμήμα προβάλλει μέσα στο θόλο του κόλπου. οι στενώσεις που υπάρχουν στον τραχηλικό αυλό (ενδοτράχηλος) είναι δυο, μία στο ύψος του έσω τραχηλικού στομίου και μία στο ύψος του έξω τραχηλικού στομίου. Το σχήμα του είναι κυλινδρικό, το μήκος του είναι 2,5 έως 3 cm και η θέση του είναι ελαφρώς γωνιακή προς τα κάτω και προς τα πίσω. (Δαβίδ Ρούσσοσ και συνεργάτες, 2016).



Εικόνα 4. Ανατομία Γυναικείου Αναπαραγωγικού Συστήματος. Πηγή: Alex Ferenczy,1977

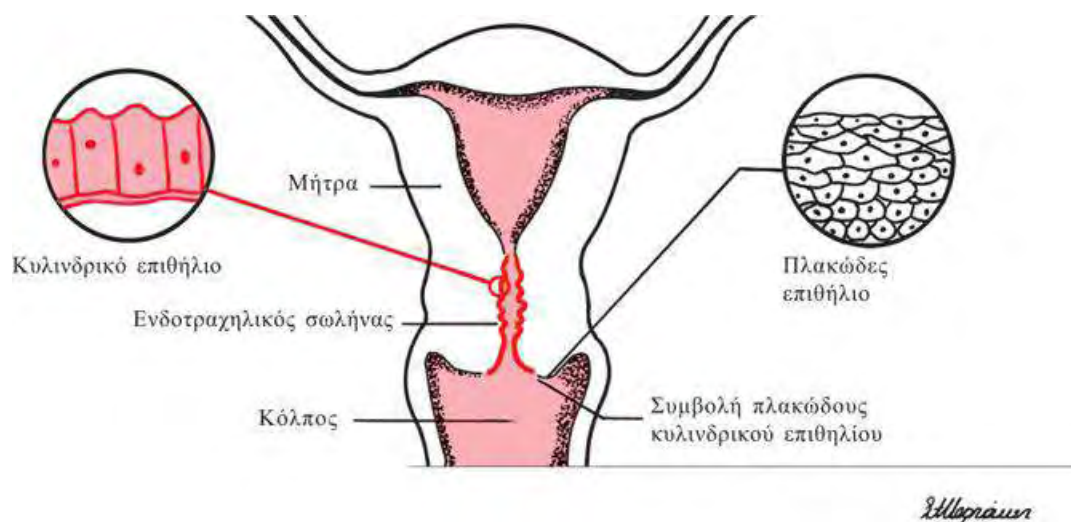
1.3 Φυσιολογία του τραχήλου της μήτρας

Οι αδένες του ενδοτράχηλου παράγουν βλέννα, η οποία αποτελεί διάδρομο και “φίλτρο” για τα σπερματοζωάρια. Κατά τη διάρκεια του κύκλου, υπό την επίδραση οιστρογόνων και προγεστερόνης, η βλέννα υπόκειται σε αλλαγές ως προς την ποσότητα, τη σύσταση και την πυκνότητα. Οι αλλαγές αυτές πραγματοποιούνται ώστε να δημιουργηθούν οι κατάλληλες συνθήκες για τη διέλευση των σπερματοζωαρίων στη φάση της ωοθυλακιορρηξίας. Η ύπαρξη των αντισπερματικών αντισωμάτων στην τραχηλική βλέννα εμποδίζει τη διέλευσή τους. (Ευγονία, Μονάδα Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής).

1.4 Ιστολογία του τραχήλου της μήτρας

Ιστολογικά, ο τράχηλος αποτελείται από ίνες κολλαγόνου και λείες μυικές ίνες σε αναλογία που τροποποιείται με βάση την ηλικία της γυναίκας. Ο ενδοτραχηλικός αυλός επενδύεται από υψηλό μονόστιβο κυλινδρικό βλεννοεκκριτικό επιθήλιο που σχηματίζει πτυχές δημιουργώντας σύνθετους αδένες και κρύπτες. Ο εξωτράχηλος, που περιλαμβάνει την εξωτερική επιφάνεια του τραχήλου, που προβάλλει στον αυλό του κόλπου καλύπτεται από μη κερατινοποιημένο πολύστιβο πλακώδες επιθήλιο [Διακομανώλης Ε, 2010] (Εικόνα 5).

Η περιοχή στην οποία ενώνονται τα δύο είδη του επιθηλίου καλείται ζώνη μετασχηματισμού, όπου τα κυλινδρικά κύτταρα μετατρέπονται σε πλακώδη με μια διαδικασία που συντελείται σε όλη τη διάρκεια ζωής της γυναίκας. Στη ζώνη μετάπτωσης τα άωρα κυλινδρικά κύτταρα αντικαθίστανται από νέο ώριμο μεταπλαστικό επιθήλιο.



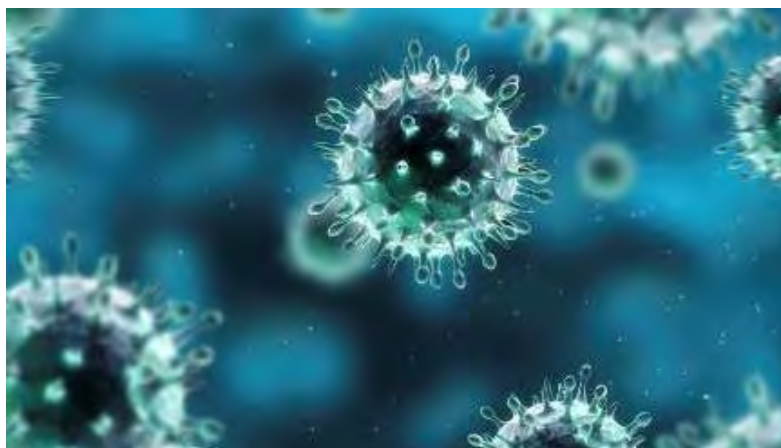
Εικόνα 5. Απεικόνιση της ζώνης μετάπλασης και των δύο ειδών του επιθηλίου στον τράχηλο της μήτρας. Πηγή: Μορτάκης Α. Μόλυνση από τους HPV στο κατώτερο γεννητικό σύστημα της γυναίκας. Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσας. Αθήνα, 1999.

1.5 Καρκίνος του τραχήλου της μήτρας

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (World Health Organization, 2014) ως καρκίνος του τραχήλου της μήτρας θεωρείται ο ανεξέλεγκτος και παθολογικός πολλαπλασιασμός των κυττάρων που λαμβάνει χώρα στη ζώνη μετάπλασης του τραχήλου της μήτρας. Τα κύτταρα υπόκεινται σε ιστολογικές μεταβολές που καλούνται δυσπλασίες.

1.5.1 Αιτιολογικοί παράγοντες

Ο κύριος λόγος που συμβαίνει αυτή η αλλαγή είναι η ενσωμάτωση του γονιδιώματος του ιού HPV στον πυρήνα των κυττάρων αυτών. Η αλλαγή αυτή έχει ως αποτέλεσμα τα προσβεβλημένα από τον ιό κύτταρα να μην αποπίπτουν όπως τα φυσιολογικά, αλλά αντιθέτως να μετατρέπονται σε καρκινικά, να πολλαπλασιάζονται ταχύτατα και να συσσωρεύονται σε ένα σημείο δημιουργώντας όγκο. Το 1974 αποδείχθηκε για πρώτη φορά ότι οι HPV ιοί μεταδίδονται σεξουαλικά και σχετίζονται με τα κακοήθη νεοπλάσματα της γεννητικής οδού. Ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας φαίνεται να είναι αποτέλεσμα μιας μακροχρόνιας HPV λοίμωξης από υψηλού κινδύνου στελέχη του ιού HPV με κυριότερο εκπρόσωπο το στέλεχος 16 (Sankaranarayanan R et al, 2015). Η λοίμωξη από τον ιό HPV αποτελεί τον μοναδικό ανεξάρτητο παράγοντα πρόκλησης κακοήθειας (Tota JE et al, 2017).



Εικόνα 6. Ο ιός των ανθρωπίνων θηλωμάτων (Human Papilloma Virus-HPV).

Πηγή: <https://www.obgyn.gr>

Η προσβολή από τον ιό δεν επαρκεί από μόνη της για την επαγωγή της καρκινογένεσης, αλλά συνηγορούν κι άλλοι παράγοντες με σημαντικότερο εξ αυτών το κάπνισμα. Η διάρκεια του καπνίσματος και η ποσότητα που καταναλώνεται παίζουν σημαντικό ρόλο (Gadduci et al, 2011). Επιπρόσθετα, η ηλικία έναρξης της σεξουαλικής δραστηριότητας παίζει σημαντικό ρόλο. Η έναρξη της σεξουαλικής δραστηριότητας σε ηλικία μικρότερη των 17 ετών και η εναλλαγή πολλών ερωτικών συντρόφων αυξάνουν τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του τραχήλου της μήτρας. Σύμφωνα με επιδημιολογικές μελέτες, σημαντικό αλλά όχι ανεξάρτητο παράγοντα αποτελεί η μακροχρόνια χρήση αντισυλληπτικών δισκίων καθώς η χρήση τους αποτρέπει την ανεπιθύμητη κύηση αλλά ταυτόχρονα “επιτρέπει” την ελεύθερη σεξουαλική σχέση που από μόνη της αποτελεί παράγοντα κινδύνου (Μεσσήνης, 2010).

1.5.2 Κλινική Εικόνα-Συμπτώματα

Η παρουσία μικροσκοπικής διήθησης ή μικρού διηθητικού καρκινώματος (Στάδιο Ia), σπάνια παρουσιάζει συμπτώματα. Οι περισσότερες από αυτές τις περιπτώσεις διαγιγνώσκονται με το κυτταρολογικό τεστ Παπανικολάου, την κολποσκόπηση και την κωνοειδή εκτομή. Η κολπική αιμόρροια ή η κολπική υπερέκκριση παρατηρούνται σε περιπτώσεις πραγματικής διήθησης. Κατά την κλινική εξέταση, εάν η εικόνα του καρκινώματος είναι καθαρή (Στάδιο Ib) είναι δυνατόν να παρουσιαστεί μητρορραγία, εάν η βλάβη εξελκωθεί. Το ίδιο σύμπτωμα μπορεί να εμφανισθεί επίσης μετά από σεξουαλική επαφή ή γυναικολογική εξέταση, ακόμη κι αν δεν υπάρχει εμφανής κλινική εικόνα καρκίνου, καθώς ο διηθητικός καρκίνος δημιουργεί εύθρυπτο επιθήλιο. Η αιμορραγία αποτελεί σοβαρό σύμπτωμα του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας και μπορεί να έχει μεγάλη έκταση με άμεσο κίνδυνο για τη ζωή της γυναίκας. Σε περίπτωση που υπάρξει νέκρωση των ιστών, το πιο σύνηθες σύμπτωμα είναι η δύσοσμη κολπική υπερέκκριση. Το άλγος αποτελεί ένα λιγότερο συχνό σύμπτωμα και εμφανίζεται μόνο σε περιπτώσεις προχωρημένου καρκίνου. Παρουσιάζεται χαμηλά στην πύελο και προς την ιερά περιοχή και μπορεί να επεκτείνεται κατά μήκος του ισχιακού νεύρου και στα κάτω άκρα. Τέλος κάποια συμπτώματα, που συσχετίζονται κυρίως με προχωρημένο καρκίνο, είναι η δυσουρία, η αιματουρία και η αιμορραγία από το έντερο ή η δυσκοιλιότητα που οφείλονται στην επέκταση του όγκου στα αντίστοιχα όργανα (Μεσσήνης, 2010).

1.5.3 Ιστολογική ταξινόμηση

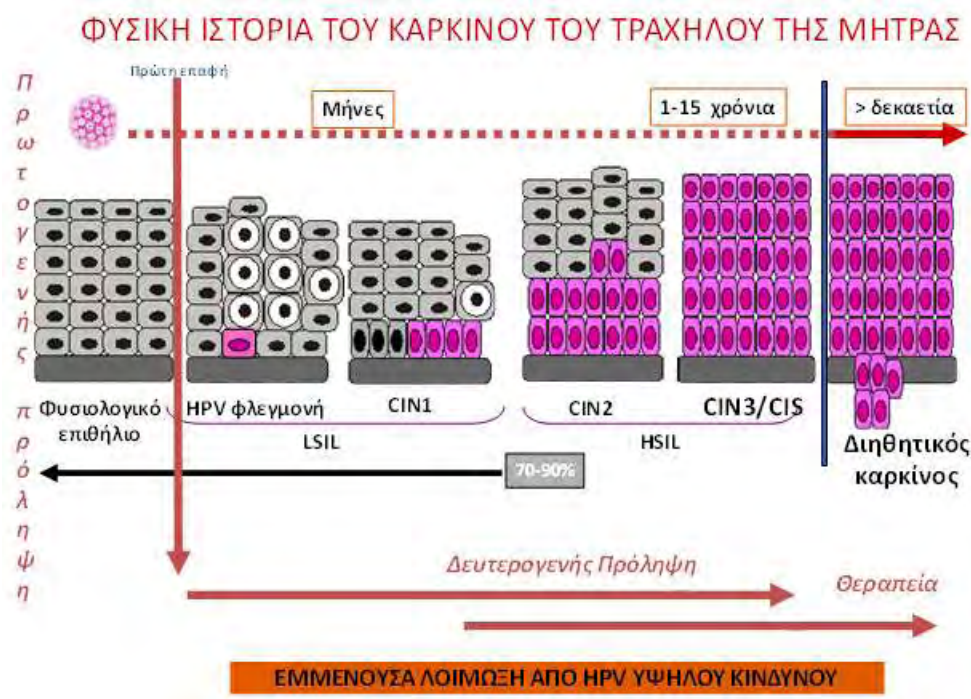
Η τραχηλική νεοπλασία προέρχεται συχνότερα από το πλακώδες επιθήλιο και κυρίως από το πλακώδως μεταπλασθέν κυλινδρικό επιθήλιο. Όταν τα κύτταρα του πλακώδους επιθηλίου εμφανίσουν ατυπία, η μετάπλαση αυτή οδηγεί στην ανάπτυξη CIN (Cervical Intraepithelial Neoplasia, CIN), που αν αφεθεί χωρίς θεραπεία ενδέχεται να εξελιχθεί μέσα από τα στάδια CIN II και CIN III σε διηθητικό καρκίνο.

Υπάρχει επίσης και η ταξινόμηση κατά Bethesda, η οποία έχει δύο (2) διαβαθμίσεις ανάλογα με το βαθμό δυσπλασίας του τραχήλου. Η πρώτη διαβάθμιση χαρακτηρίζεται ως χαμηλή LG-SIL (Low Grade Squamous Intraepithelial Lesion), και περιλαμβάνει τις ήπιες αλλοιώσεις CIN I. Ενώ η δεύτερη είναι η υψηλή διαβάθμιση HG-SIL (High Grade Squamous Intraepithelial Lesion), και περιλαμβάνει τις CIN II και CIN III κατηγορίες.

Οι τραχηλικές ενδοεπιθηλιακές νεοπλασίες CIN κατηγοριοποιούνται ανάλογα με το βαθμό δυσπλασίας σε τρεις βαθμίδες:

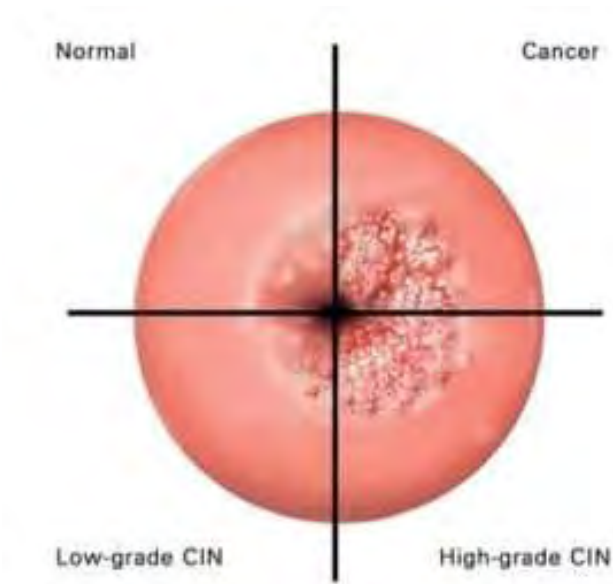
- CIN I : Ηπίου βαθμού δυσπλασία
- CIN II : Μετρίου βαθμού δυσπλασία
- CIN III : Σοβαρού βαθμού δυσπλασία και in situ καρκίνωμα

Ελάχιστες βλάβες CIN (SIL) θα εξελιχθούν σε διηθητικό καρκίνο της τάξης του 1-5%. Η πλειοψηφία των περιπτώσεων υποστρέφει εντός 12-18 μηνών, ή σπανιότερα παραμένει σταθερή χωρίς να δημιουργηθούν καρκινικές βλάβες, όπως απεικονίζεται (Εικόνα 7).



Εικόνα 7. Χρονική εξέλιξη του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας. Πηγή: *Μορτάκης Α.*

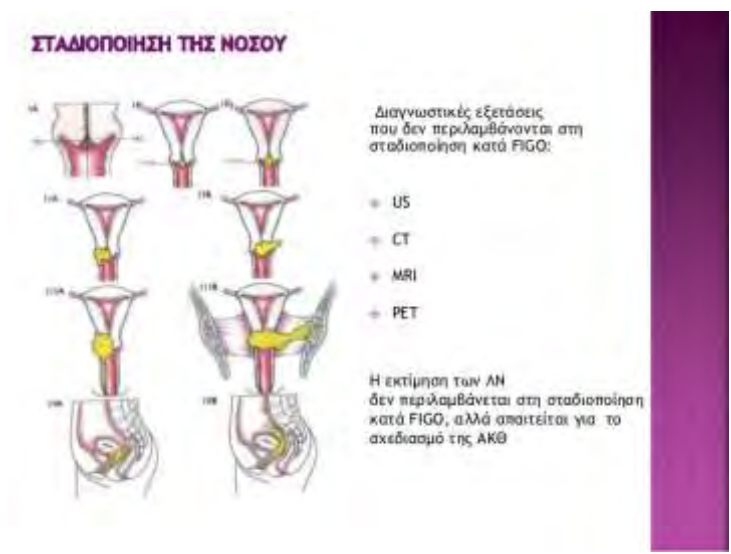
Οι αλλοιώσεις του τραχήλου της μήτρας ανιχνεύονται με το γνωστό τεστ Παπανικολάου, το οποίο αποτελεί κυτταρολογική εξέταση. Εάν το τεστ ΠΑΠ είναι παθολογικό η ασθενής προχωρά σε κολποσκόπηση και βιοψία για τον προσδιορισμό του βαθμού αλλοίωσης (Δαβίδ Ρούσσος, 2016).



Εικόνα 8. Αποτύπωση Φυσιολογικού Τραχήλου-με προκαρκινικές Αλλοιώσεις-με Καρκίνο. Πηγή:<https://terzakis-obgyn.gr>

1.5.4 Σταδιοποίηση

Η σταδιοποίηση είναι η διαδικασία κατά την οποία ένας καρκίνος κατηγοριοποιείται με βάση το μέγεθος του, την παρουσία του ή όχι στους επιχώριους λεμφαδένες αλλά και την επέκτασή του σε άλλα μέρη του σώματος εκτός από τον τράχηλο της μήτρας. Ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας χωρίζεται σε 4 κύρια στάδια.. Στο στάδιο I η νόσος βρίσκεται περιορισμένη στον τράχηλο. Στο στάδιο II εκτείνεται πέρα από τον τράχηλο αλλά δεν φθάνει στο πλάγιο πυελικό τοίχωμα, διηθεί τον κόλπο αλλά δε φθάνει στο κατώτερο τριτημόριο. Στο στάδιο III το καρκίνωμα εκτείνεται έως το πλάγιο πυελικό τοίχωμα, κατά την εξέταση από τον ορθό δεν υπάρχει ελεύθερος χώρος μεταξύ του όγκου και του πλάγιου πυελικού τοιχώματος, ο όγκος διηθεί έως και το κατώτερο τριτημόριο του κόλπου. Όλες οι περιπτώσεις υδρονέφρωσης ή μη λειτουργικών νεφρών πρέπει να συμπεριλαμβάνονται στο στάδιο III εκτός και αν οφείλεται σε άλλη αιτία. Και το τελευταίο στάδιο IV είναι αυτό που το καρκίνωμα εκτείνεται έξω από την αληθή πύελο ή διηθεί το βλεννογόνο του ορθού ή της ουροδόχου κύστης (Μεσσήνης,2010).



Εικόνα 9. Απεικόνιση των σταδίων του Καρκίνου του Τραχήλου της Μήτρας

Πηγή: <https://www.askitis-cy.com/>

Η πρόσφατη κλινική σταδιοποίηση κατά **FIGO** (2018) είναι η ακόλουθη:

Στάδιο I	Το καρκίνωμα επιβεβαιώνεται αυστηρά στον τράχηλο της μήτρας (δεν πρέπει να ληφθούν υπόψη οι επεκτάσεις του σώματος)
Στάδιο IA	Εισαγωγικό καρκίνωμα που μπορεί να διαγνωστεί μόνο με μικροσκοπία, με μέγιστο βάθος εισβολής <5mm

Στάδιο IA1	Μετρήσιμη στρωματική εισβολή <3mm σε βάθος
Στάδιο IA2	Μετρήσιμη στρωματική εισβολή >3mm και <5 mm σε βάθος
Στάδιο IB	Διηθητικό καρκίνωμα με μέτρηση βαθύτερης εισβολής >5mm (μεγαλύτερη από τη φάση IA) Η βλάβη περιορίζεται στην μήτρα του τραχήλου
Στάδιο IB1	Διηθητικό καρκίνωμα >5mm βάθος στοματικής εισβολής και <2cm σε μεγαλύτερη διάσταση
Στάδιο IB2	Διηθητικό καρκίνωμα >2cm και <4cm σε μεγαλύτερη διάσταση
Στάδιο IB3	Διηθητικό καρκίνωμα >4 cm σε μεγαλύτερη διάσταση
Στάδιο II	Το καρκίνωμα εισβάλλει πέρα από τη μήτρα αλλά δεν έχει επεκταθεί στο κατώτερο τρίτο του

	κόλπου ή στο πυελικό τοίχωμα
Στάδιο ΙΙΑ	Η συμμετοχή περιορίζεται στα δύο τρίτα του ανώτερου κόλπου χωρίς παραμετρική εμπλοκή
Στάδιο ΙΙΑ1	Διηθητικό καρκίνωμα <4 cm σε μεγαλύτερη διάσταση
Στάδιο ΙΙΑ2	Διηθητικό καρκίνωμα >4 cm σε μεγαλύτερη διάσταση
Στάδιο ΙΙΒ	Με παραμετρική εμπλοκή

Στάδιο III	Το καρκίνωμα περιλαμβάνει το κατώτερο τρίτο του κόλπου και / ή εκτείνεται στο πυελικό τοίχωμα και / ή προκαλεί υδρόφιση ή νεφρό που δεν λειτουργεί ή εμπλέκει πυελικούς και / ή παρατορικούς λεμφαδένες
Στάδιο IIIA	Το καρκίνωμα περιλαμβάνει το κατώτερο τρίτο του κόλπου χωρίς επέκταση στον πυελικό τοίχο
Στάδιο IIIB	Επέκταση στο πυελικό τοίχωμα και / ή υδρόδεση ή νεφρό που δεν λειτουργεί (εκτός εάν είναι γνωστό ότι οφείλεται σε άλλη αιτία)
Στάδιο IIIC	Συμμετοχή των πυελικών και / ή παρατορικών λεμφογαγγλίων, ανεξάρτητα από το μέγεθος και την έκταση του όγκου
Στάδιο IIIC1	Μόνο μετάσταση των λεμφαδένων του πέλματος

Στάδιο IIIc2	Μόνο μετάσταση των παραμετρικών λεμφαδένων
Στάδιο IV	Το καρκίνωμα έχει επεκταθεί πέρα από την αληθινή πυέλου ή έχει εμπλακεί σε βιοψία του βλεννογόνου της ουροδόχου κύστης ή του ορθού. Ένα οίδημα βόλων όπως αυτό δεν επιτρέπει την κατανομή της υπόθεσης στο στάδιο IV.
Στάδιο IVA	Εξάπλωση της ανάπτυξης σε γειτονικά όργανα
Στάδιο IVB	Εξαπλώνεται σε μακρινά όργανα

Πίνακας 1. Κλινική σταδιοποίηση του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας κατά FIGO (2018) Πηγή: Bhatla N et al. Int J Gynecol Obstet 2019; 145: 129–135

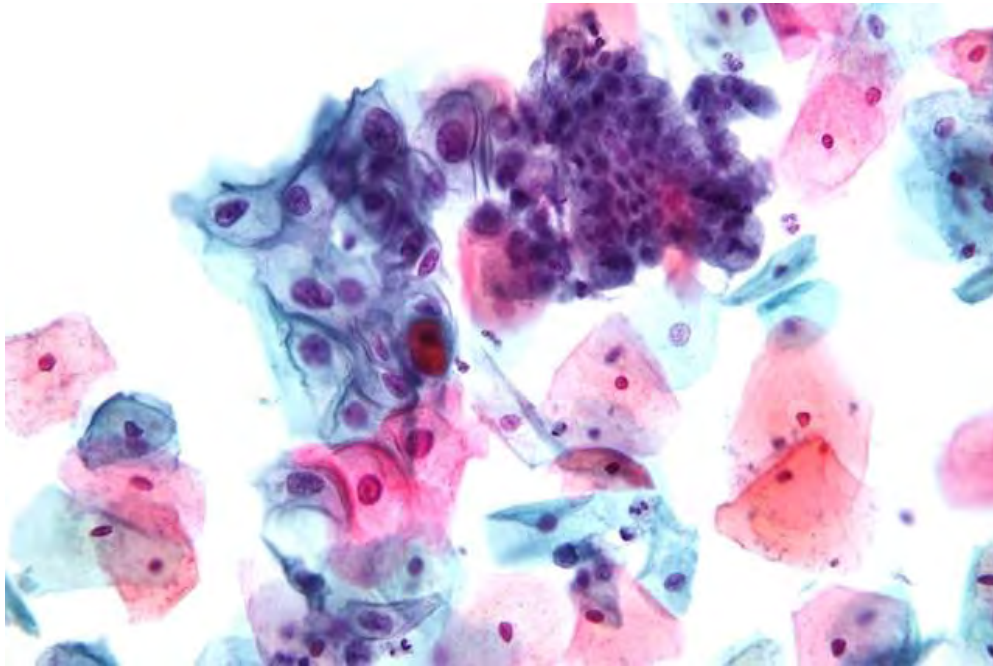
Πηγή: <https://www.esgo.org>

1.5.5 Διάγνωση

Η κλινική εξέταση μπορεί να δώσει ενδείξεις για την ύπαρξη καρκίνου τόσο κατά την επισκόπηση όσο και για τη ψηλάφηση του τραχήλου. Κατά την επισκόπηση, ο καρκίνος του τραχήλου μπορεί να εμφανίζεται με τη μορφή εξωφυτικής διόγκωσης μερικές φορές εξελκωμένης ή νεκρωτικής ή με τη μορφή μόνο διηθητικής βλάβης ή έλκους με επηρμένα χείλη.

Αν και ο τράχηλος τείνει να παίρνει βαρελοειδή μορφή οι βλάβες του ενδοτράχηλου μπορεί να είναι ορατές.

Σε περιπτώσεις που η βλάβη δεν είναι ορατή, αλλά η κυτταρολογική εξέταση ή η βιοψία είναι θετική, θα πραγματοποιηθεί κωνοειδής εκτομή (Εικόνα 10). Με τον τρόπο αυτό γίνεται η διάγνωση της αρχομένης διήθησης (στάδιο Ia) και του μικροδιηθητικού καρκινώματος (στάδιο Ia2). Τέλος, ένας ακόμα τρόπος διάγνωσης είναι η απόξεση του τραχήλου, η οποία πρέπει να έχει τη μορφή της κλασματικής απόξεσης της μήτρας (Μεσσήνης, 2010).



Εικόνα 10. Απεικόνιση ενδοθηλιακών κυττάρων που συλλέχθηκαν για τεστ Παπανικολάου. Φυσιολογικά κύτταρα (μοβ χρώμα), Προκαρκινικά (μπλε-μοβ χρώμα) Πηγή: P.R Wheeler, 1987

1.5.6 Θεραπεία

Εάν η νόσος ανιχνευθεί έγκαιρα και αντιμετωπιστεί κατάλληλα μπορεί να υπάρξει ίαση. Το είδος και η ένταση της θεραπείας εξαρτάται από το στάδιο της νόσου. Η χειρουργική επέμβαση είναι η κύρια μέθοδος θεραπείας ιδίως εάν η νόσος προληφθεί σε αρχικό στάδιο, τα αποτελέσματα δείχνουν 90% ίαση στην 5ετία. Αν η νόσος είναι σε προχωρημένο στάδιο ενδείκνυται η ακτινοθεραπεία ως τρόπος αντιμετώπισης, ενώ η χημειοθεραπεία φαίνεται ότι μπορεί να δράσει τόσο σε πρώιμο όσο και σε προχωρημένο στάδιο νόσου. Σε γυναίκες που θέλουν να τεκνοποιήσουν και στις οποίες ο καρκίνος έχει βρεθεί σε αρχικά στάδια, υπάρχει η πιθανότητα αφαίρεσης ενός μικρού τμήματος (κωνοειδής εκτομή) του τραχήλου της μήτρας.

Χειρουργική θεραπεία: Εφαρμόζεται μέχρι το στάδιο ΙΑ. Στο στάδιο ΙΑ1, σε νέα άτομα και εφόσον οι αγγειακοί και λεμφικοί χώροι δεν έχουν διηθηθεί, ο καρκίνος μπορεί να αντιμετωπισθεί όπως ο καρκίνος *in situ*, δηλαδή με ευρεία κωνοειδή εκτομή, με την προϋπόθεση ότι η αφαίρεση έγινε επί των υγιών ιστών. Στο ίδιο στάδιο, σε γυναίκες μεγαλύτερης ηλικίας που έχουν τεκνοποιήσει η αντιμετώπιση είναι απλή ολική υστερεκτομή. Λόγω του ότι ο καρκίνος του τραχήλου τη μήτρας δεν είναι ορμονοεξαρτώμενος, η αφαίρεση των ωοθηκών δεν είναι απαραίτητη, εκτός κι αν η ασθενής είναι άνω των 45 ετών η μετ εμμηνοπαυσιακή. Επίσης, για την αντιμετώπιση από το στάδιο ΙΑ1 ως και το στάδιο ΙΑ, εφόσον έχουν διηθηθεί οι αγγειακοί και οι λεμφικοί χώροι, εφαρμόζεται ριζική υστερεκτομή. Η ριζική υστερεκτομή, περιλαμβάνει την ολική αφαίρεση μήτρας και των εξαρτημάτων, την αφαίρεση των παραμήτριων (τραχηλικών συνδέσμων) και συνεπώς και των λεμφαδένων που υπάρχουν σε αυτά, καθώς επίσης την αφαίρεση των λεμφαδένων της περιοχής του θυρεοειδούς νεύρου και των αγγείων, την αφαίρεση των λεμφαδένων των έξω λαγόνιων αγγείων, των κοινών λαγόνιων αγγείων, των έσω λαγόνιων αγγείων και την αφαίρεση των προϊερών λεμφαδένων. Επιπλέον γίνεται αφαίρεση του κυτταρολιπώδους ιστού, που καλύπτει τον περικυστικό και περιορθικό χώρο, ενώ αφαιρείται εκτεταμένα ο πλατύς σύνδεσμος και το άνω τριτημόριο του κόλπου, καθώς και οι λεμφαδένες της περιοχής του ουρητήρα πλησίον δηλαδή του χιασμού του με τη μητριάια αρτηρία, καθώς επίσης και οι παραορτικοί λεμφαδένες.

Ακτινοθεραπεία: Εφαρμόζεται στα πιο προχωρημένα στάδια της νόσου όπως, ΙΙΒ, ΙΙΑ, ΙΙΒ και ΙV. Περιλαμβάνει την ενδοκολπική και ενδοτραχηλική ακτινοβολία, καθώς και την εξωτερική πυελική ακτινοβολία των λεμφαδένων. Τα τελευταία χρόνια, γίνονται προσπάθειες να μειωθούν οι εκτεταμένες χειρουργικές επεμβάσεις και στα στάδια ΙΑ2 και ΙΑ δοκιμάζεται η λαπαροσκοπική λεμφαδενεκτομή των πυελικών λεμφαδένων και η κολπική ριζική τραχηλεκτομή με εξαίρεση και τμήματος του παραμήτριου. Αυτή η προσπάθεια γίνεται για να διατηρηθεί η γονιμότητα της γυναίκας, ωστόσο, δεν υπάρχουν ακόμη τεκμηριωμένα αποτελέσματα.

Προτείνεται επίσης η προ εγχειρητική ακτινοθεραπεία, που αυξάνει τον κίνδυνο επιπλοκών και εφαρμόζεται μόνο σε προχωρημένο στάδιο της νόσου.

Ωστόσο, η ακτινοθεραπεία έχει σοβαρές επιπλοκές κατά την πραγματοποίησή της. Οι κυριότερες είναι η δημιουργία συριγγίων, στην ουροδόχο κύστη, στους ουρητήρες, το ορθοσιγμοειδές και το λεπτό έντερο, η αιμορραγική κυστίτιδα, η πρωκτίτιδα και ο αποφρακτικός ειλεός.

Χημειοθεραπεία: Αυτό το είδος έχει αρχίσει να εφαρμόζεται ως θεραπεία για τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας τα τελευταία χρόνια. Μπορεί να χορηγηθεί πριν την χειρουργική επέμβαση ή μετά από αυτή μόνη ή σε συνδυασμό με ακτινοθεραπεία, όπως επίσης και σε υποτροπές της νόσου. Εάν η νόσος διαγνωσθεί σε προχωρημένο στάδιο συνιστάται χημειοθεραπεία ώστε να μειωθεί το μέγεθος του όγκου και μετά να προβεί η ασθενής σε χειρουργική επέμβαση. Το θεραπευτικό χημειοθεραπευτικό σχήμα έχει ως βάση τη σισπλατίνη. Τέλος η συμπληρωματική χημειοθεραπεία έχει δείξει ότι έχει θετικά αποτελέσματα και αυξάνει την επιβίωση, σε συνδυασμό με χειρουργική επέμβαση ή με ακτινοθεραπεία (Μεσσήνης,2010).

1.6 Επιγενετική

Η επιγενετική μπορεί να οριστεί ως η κληρονομική μεταβίβαση αλλαγών της γονιδιακής έκφρασης, που δεν περιλαμβάνουν αλλαγές της αλληλουχίας του DNA. Σύμφωνα με την επιγενετική, το περιβάλλον αλληλοεπιδρά με τα γονίδιά μας και δημιουργεί έναν φαινότυπο μέσω της αλληλεπίδρασης περιβάλλοντος και κυττάρων. Παίζει σημαντικό ρόλο σε μια ποικιλία βιολογικών διεργασιών όπως η εμβρυϊκή ανάπτυξη, η βιολογία του καρκίνου και η ανταπόκριση του ανοσοποιητικού συστήματος.

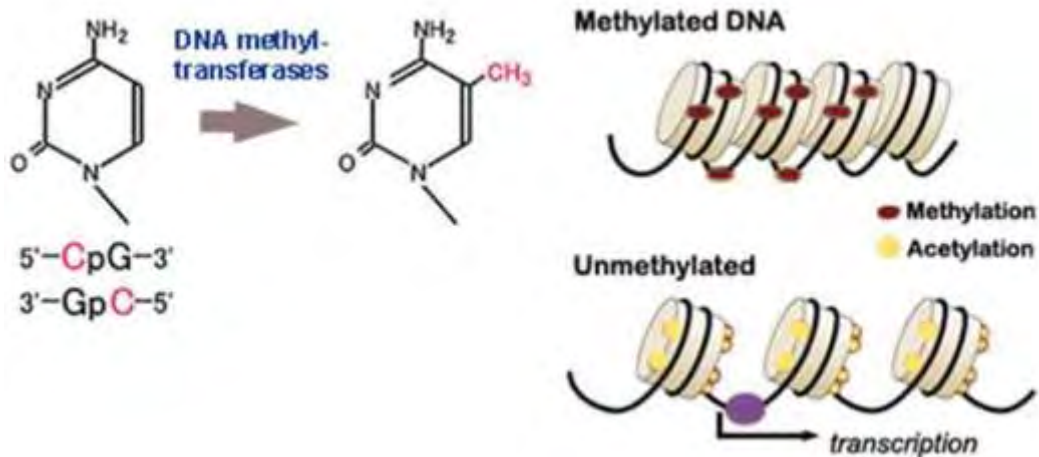
Οι τρεις κύριοι επιγενετικοί μηχανισμοί είναι η μεθυλίωση του DNA, οι τροποποιήσεις των ιστονών και η μεταβολή της έκφρασης των miRNA μορίων. Και οι τρεις μηχανισμοί μπορούν να ρυθμίσουν την μεταγραφή των γονιδίων και να επηρεάσουν τα πρότυπα της πρωτεϊνικής σύνθεσης. Συνοπτικά αναφέρονται οι τρεις επιγενετικοί μηχανισμοί:

-Η μεθυλίωση του DNA είναι μια ομοιοπολική χημική τροποποίηση που εμφανίζεται στον δακτύλιο της κυτοσίνης, με αποτέλεσμα την προσθήκη μια μεθυλομάδας (CH₃) στη θέση του άνθρακα 5. Το ανθρώπινο γονιδίωμα δεν μεθυλιώνεται ομοιόμορφα και περιέχει περιοχές μη μεθυλιωμένων τμημάτων διασκορπισμένων εντός της μεθυλιωμένης περιοχής. Μικρές περιοχές του DNA που ονομάζονται CpG νησίδες, καθώς είναι πλούσιες σε κυτοσίνες και γουανίνες είναι μη μεθυλιωμένες και εντοπίζονται κυρίως στην περιοχή του υποκινητή κάθε γονιδίου. Περίπου το 50% του συνόλου των ανθρώπινων γονιδίων φέρουν CpG νησίδες και στα δυο αλληλόμορφα γονίδια. Έχουν ταυτοποιηθεί τρεις τουλάχιστον λειτουργικές DNA μεθυλοτρανσφεράσες (DNMTs) που έχουν ως ρόλο τους τη μεθυλίωση του DNA. Το μοτίβο

μεθυλίωσης του DNA διατηρείται κατά την κυτταρική διαίρεση μέσω του ενζύμου DNMT1, ενώ οι μεθυλοτρανσφεράσες DNMT3a και DNMT3b εμπλέκονται στη δημιουργία de novo πρότυπων μεθυλίωσης.

-Η χρωματίνη αποτελείται από νουκλεοσώματα, τα οποία αποτελούνται από 146 ζεύγη βάσεων DNA περιτυλιγμένα γύρω από ένα πυρήνα πρωτεϊνών, των ιστονών. Οι ιστόνες υφίστανται μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις που παίζουν εξέχοντα ρόλο στη ρύθμιση γονιδιακής έκφρασης στις σηματοδοτικές οδούς όπως η μεθυλίωση, η ακετυλίωση, η φωσφορυλίωση, η σαμουλίωση, η ουμπικουΐτυλίωση και η ADP ριβοσυλίωση.

-Όπως η μεθυλίωση τροποποιεί το DNA και επηρεάζει την ικανότητά του να μεταγράφεται, με ανάλογο τρόπο επηρεάζει και τα επίπεδα έκφρασης των miRNA μορίων, επηρεάζοντας με τον τρόπο αυτό την ικανότητά τους να ρυθμίζουν μεταγραφικά την έκφραση των γονιδίων (Alfonso Duenas-Gonzales et al, 2005).



Εικόνα 11. Πηγή:<https://www.emedi.gr>

1.7 Μεθυλίωση του DNA και Καρκίνος του Τραχήλου της Μήτρας

Λόγω της στενής αλληλεπίδρασης μεταξύ της μεθυλίωσης του DNA και των τροποποιήσεων των ιστονών, αναμένεται ότι και οι μηχανισμοί λειτουργούν σε νόσους όπως ο καρκίνος. Οι επιγενετικές αλλαγές που προκαλούνται από μη φυσιολογική μεθυλίωση του DNA έχει μελετηθεί εκτενώς στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας.

Έχει παρατηρηθεί ότι τόσο η υπομεθυλίωση όσο και η υπερμεθυλίωση διαδραματίζουν εξέχοντα ρόλο στην καρκινογένεση και η συμβολή τους παρουσιάζει ελάχιστα καθορισμένα όρια. Είναι γνωστό ότι οι όγκοι εμφανίζουν υπομεθυλίωση και περιφερειακή υπερμεθυλίωση (Bustros A et.al 1988, Feinberg et.al 1983).

Πρόσφατες μελέτες υποστηρίζουν ότι σε καρκινικές σειρές και αρκετούς καρκίνους, μεταξύ των οποίων οι καρκίνοι του τραχήλου της μήτρας και του ενδομητρίου, παρουσιάζουν υπερμεθυλίωση στους υποκινητές γονιδίων όπως το FAM19A4 και/ή hmir124. Η ανάλυση της μεθυλίωσης του υποκινητή στο κύτταρο-ξενιστή ανιχνεύει τόσο καρκίνους όσο και τις επονομαζόμενες πρόδρομες αλλοιώσεις νεοπλασίας του τραχήλου της μήτρας (CIN), που φέρουν προφίλ μεθυλίωσης ανάλογο του καρκίνου και παρουσιάζουν υψηλό βραχυπρόθεσμο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου (De Strooper, L.M., et al., (2014) Methylation analysis of the FAM19A4 gene in cervical scrapes is highly efficient in detecting cervical carcinomas and advanced CIN2/3 lesions. *Cancer Prev. Res.* 7, 1251–7, Bierkens, M. et al. (2013) CADM1 and MAL promoter methylation levels in hrHPV-positive cervical scrapes increase proportional to degree and duration of underlying cervical disease. *Int. J. Cancer* 133, 1293–9, Steenbergen, R.D.M. et al. (2014) Clinical implications of (epi)genetic changes in HPV-induced precancerous lesions. *Nat. Rev. Cancer* 14, 395–405).

1.7.1 Το γονίδιο FAM19A4

Το γονίδιο FAM19A4 είναι μια συντομογραφία για την οικογένεια με ομοιότητα αλληλουχίας 19 μελών A4 και C-C μοτίβων χημειοκίνης. Μετά από μια μελέτη, προσδιορίστηκε ότι η έκφραση αυτής της κυτοσίνης ρυθμίζεται ανοδικά σε μονοκύτταρα και μακροφάγα που είχαν υποβληθεί σε διέγερση με λιποπολυσακχαρίτη (LPS) και ήταν τυπικά σε πολωμένο M1. Το FAM19A4 παρουσιάζει χημειοτακτικές δραστηριότητες σε μακροφάγα και ενισχύει τη φαγοκυττάρωση σε αυτά τόσο *in vivo* όσο και *in vitro* με αξιοσημείωτες αυξήσεις φωσφορυλίωσης πρωτεϊνικής κινάσης B. Με βάση την εσωτερικοποίηση του υποδοχέα, τις δοκιμασίες πρόσδεσης του συνδέτη ραδιενέργειας και την απόφραξη υποδοχέα αποδείχθηκε ότι το γονίδιο αυτό είναι ένας νέος προσδέτης του υποδοχέα formyl πεπτιδίου 1 (FPR1). Το FAM19A4 μπορεί να διαδραματίσει κρίσιμο ρόλο στην ενεργοποίηση και τη μετανάστευση μακροφάγων κατά τη διάρκεια παθογόνων λοιμώξεων (Wenyan Wang et al, 2014). Πρόκειται για

ένα ογκοκατασταλτικό γονίδιο που εδράζεται στο χρωμόσωμα 3 (θέση: 3p14.1), έχει τρία μετάγραφα και κωδικοποιεί μια μικρή εκκριτική πρωτεΐνη. Παρουσιάζει τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης στον εγκέφαλο, ανιχνεύεται σε μικρότερα επίπεδα στο έντερο και στον σπλήνα, ενώ φαίνεται να μην εκφράζεται καθόλου σε άλλους ιστούς, πιθανώς λόγω αποσιώπησή του μέσω του μηχανισμού υπερμεθυλίωσης των CpG νησίδων του υποκινητή του.

Προηγούμενες μελέτες μεθυλίωσης σε επίπεδο γενόσημων για τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας αναφέρουν καθολική υπερμεθυλίωση του υποκινητή του FAM19A4 γονιδίου σε όλους τους καρκίνους του τραχήλου της μήτρας(Steenbergen RD et al, 2013). Η μεθυλίωση του FAM19A4 γονιδίου έχει προταθεί ως ένας εναλλακτικός βιολογικός δείκτης για την πρόιμη ανίχνευση του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας, ιδιαίτερα των υψηλόβαθμων αλλοιώσεων (HSIL) (De Strooper LM, et al,2014), καθώς και ως ένα νέο εργαλείο ταξινόμησης για τη συλλογή αυτοδειγμάτων σε hrHPV θετικές γυναίκες (Luttmer R et al, 2016).

2. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 Σκοπός

Στην παρούσα εργασία επιλέξαμε να μελετήσουμε τα επίπεδα μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου FAM19A4 σε ασθενείς με καρκίνο του τραχήλου της μήτρας, προκειμένου να δούμε το ρόλο των επιγενετικών αλλαγών στο γονίδιο αυτό και την πιθανή επίδρασή του στην καρκινογένεση του τραχήλου της μήτρας. Εξετάσαμε επίσης την παρουσία του HPV ιού και προσδιορίσαμε τα στελέχη του ιού, προκειμένου να εξετάσουμε εάν τα επίπεδα μεθυλίωσης του υποκινητή του FAM19A4 γονιδίου παρουσιάζουν διακυμάνσεις ανάλογα με τον τύπο του HPV ή την παρουσία απλών ή πολλαπλών HPV λοιμώξεων.

2.2 Υλικό της μελέτης

Στην παρούσα εργασία μελετήσαμε 44 ασθενείς που είχαν καρκίνο του τραχήλου της μήτρας ή υψηλόβαθμη δυσπλασία (CIN III/ HGSIL). Οι γυναίκες που εξετάστηκαν είχαν ηλικία (εύρος: 19-64). Οι ασθενείς είχαν εξετασθεί στην Γυναικολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Περιφερειακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας και τα χειρουργικά παρασκευάσματα ή οι βιοψίες εξετάστηκαν για παθολογοανατομική εκτίμηση στο εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής και Κυτταρολογίας του Πανεπιστημιακού Περιφερειακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας. Με τη βοήθεια ιατρού Παθολογοανατόμου έγινε επιλογή και λήψη καρκινικού ιστού. Παράλληλα, έγινε συλλογή των κλινικά-ιστολογικών στοιχείων των ασθενών.

Η στατιστική ανάλυση έγινε με το λογισμικό IBM SPSS v. 22. Η δοκιμασία που χρησιμοποιήθηκε είναι η Student's t-test. Η τιμή σημαντικότητας προσδιορίστηκε ως μικρότερη από 0,05.

2.2.1 Απομόνωση γενομικού DNA από FFPE (Formalin Fixed Paraffin Embedded) ιστό (DNA extraction)

Η απομόνωση του γενομικού DNA έγινε με τη βοήθεια του PureLink™ Genomic DNA Kit (Invitrogen, Thermo Fischer Scientific) σύμφωνα με το ακόλουθο πρωτόκολλο:

1η Μέρα Απομόνωσης

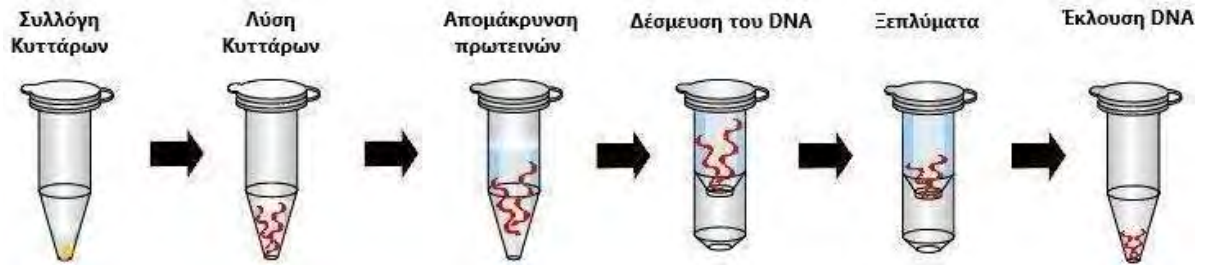
Έγινε επιλογή του υλικού με παρατήρηση σε πλακίδιο αιματοξυλίνης-ηωσίνης (H/E) και ακολούθησε η διαδικασία απομόνωσης γενομικού DNA σύμφωνα με την ακόλουθη διαδικασία:

- 1) 10 τομές παραφίνης πάχους 10 μm κόβονται και τοποθετούνται σε σωληνάριο τύπου Eppendorf των 2 ml.
- 2) Προσθήκη 1ml ξυλόλης και επώαση 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να διαλυθεί ο ιστός
- 3) Φυγοκέντρηση 10 λεπτά στις 15.000 στροφές, και αφαίρεση του υπερκείμενου. Προσθήκη 1ml ξυλόλης και επώαση 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- 4) Φυγοκέντρηση 10 λεπτά στις 15.000 στροφές και αφαίρεση του υπερκείμενου Προσθήκη 1ml αιθανόλης
- 5) Φυγοκέντρηση 10 λεπτά στις 15.000 στροφές και αφαίρεση του υπερκείμενου Προσθήκη 1ml αιθανόλης
- 6) Φυγοκέντρηση 10 λεπτά στις 15.000 στροφές, αφαίρεση του υπερκείμενου και αφήνουμε να εξατμιστεί όλη η αιθανόλη
- 7) Προσθήκη:
 - i) 20 μl διαλύματος Πρωτεΐνάσης K
 - ii) 200μl διαλύματος λύσης του ιστού (Genomic Digestion Buffer)
- 8) Επώαση του μίγματος σε υδατόλουτρο στους 55°C για 1 ημέρα

2η Μέρα Απομόνωσης

- 1) Επώαση δειγμάτων για 1 ώρα στους 90°C
- 2) Προσθήκη:

- i) 200μl διαλύματος λύσης/ πρόσδεσης (Lysis Binding Buffer)
- ii) 20μl RNAάση
- iii) 200 μl αιθανόλη
- 3) Τοποθέτηση δειγμάτων σε στήλες των 600μl που παρέχονται από το κιτ
- 4) Φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 15.000 στροφές και αφαίρεση του υπερκείμενου
- 5) Επανάληψη του βήματος 4 εφόσον έχει περισσέψει μίγμα
- 6) Φυγοκέντρηση για 10 στις 15.000 στροφές και αφαίρεση του υπερκείμενου
- 7) Προσθήκη 600 μl διαλύματος πλύσης I (Wash Buffer 1)
- 8) Φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 15.000 στροφές και αφαίρεση του υπερκείμενου
- 9) Προσθήκη 600 μl διαλύματος πλύσης II (Wash Buffer 2)
- 10) Φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 15.000 στροφές και αφαίρεση του υπερκείμενου
- 11) Μεταφορά της στήλης σε καινούργιο αποστειρωμένο σωληνάριο τύπου Eppendorf των 2 ml, προσθήκης 40μl δις απεσταγμένου H₂O και επώαση 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- 12) Φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 15.000 στροφές, συλλέγω το εκλούμενο DNA και το προσθέτω ξανά στη στήλη. Ακολουθεί επώαση για άλλα 5 λεπτά
- 13) Φυγοκέντρηση 10 λεπτά στις 15.000 στροφές και συλλογή του εκλούμενου DNA σε αποστειρωμένο σωληνάριο τύπου eppendorf των 2ml
- 14) Φύλαξη στους -20°C μέχρι να χρησιμοποιηθεί.



Εικόνα 12. Σχηματική απεικόνιση της μεθοδολογίας απομόνωσης γενομικού DNA.

2.2.2 Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός DNA

2.2.2.1 Φωτομέτρηση

Πραγματοποιήθηκε φωτομέτρηση του DNA των δειγμάτων μας για να αξιολογηθεί η συγκέντρωση και η καθαρότητα τους. Η καθαρότητα του δείγματος προσδιορίζεται εάν μετρηθεί η απορρόφηση του ίδιου δείγματος τόσο στα 260nm όσο και στα 280nm και μετά υπολογιστεί ο λόγος OD260/OD280. Για τιμές μεταξύ 1.7-1.9, το DNA χαρακτηρίζεται σχετικά καθαρό. Τιμές μικρότερες του 1.7 είναι ενδεικτικές της ύπαρξης προσμίξεων, συνήθως είτε πρωτεϊνών είτε φαινόλης, ενώ μεγαλύτερες του 1.9 είναι ενδεικτικές πρόσμιξης με άλλα μακρομόρια. Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης του δίκλωνου DNA χρησιμοποιείται ο ακόλουθος τύπος:

$$C_{dsDNA}(\mu\text{g/ml}) = \text{τιμή OD260} \times 50 \times \text{συντελεστής αραίωσης.}$$

2.2.2.2 Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων

Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των DNA δειγμάτων μας σε πήκτωμα αγαρόζης 1%, για να ελέγξουμε την ακεραιότητα του δείγματός μας και εκτίμησή του με έκθεση του πηκτώματος αγαρόζης σε υπεριώδες φως (UV).

2.3 Παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης

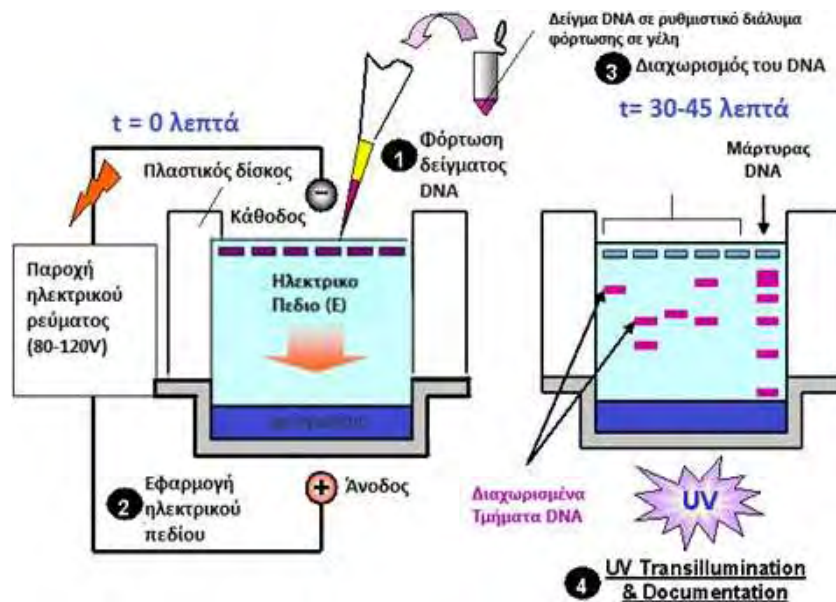
Για την παρασκευή του πηκτώματος αγαρόζης ακολουθήσαμε τα παρακάτω βήματα:

- 1) Μέτρηση σε ζυγό ακριβείας της επιθυμητής ποσότητας αγαρόζης σε σκόνη και μεταφορά της σε ογκομετρική φιάλη. Προσθήκη 300ml ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης TBE (Tris- Boric Edta) 1x και ανάδευση.
- 2) Τοποθέτηση της ογκομετρικής φιάλης σε φούρνο μικροκυμάτων και θέρμανση του μίγματος μέχρι να διαλυθεί η αγαρόζη και να γίνει διαυγές το διάλυμα.
- 3) Προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου στο μείγμα (τυπικά 0,5μg/ml). Η ένωση αυτή εισχωρεί στις βάσεις του DNA (για αυτό και είναι γνωστός μεταλλαξιογόνος παράγοντας) και φθορίζει παρουσία υπεριώδους φωτός.
- 4) Ανάδευση του μίγματος και τοποθέτηση του περιεχομένου σε κατάλληλο εκμαγείο. Παραμονή σε ανοιχτό απαγωγό μέχρι να πολυμεριστεί η αγαρόζη και να δημιουργηθεί το πήκτωμα.
- 5) Τέλος αφαίρεση του πηκτώματος από το εκμαγείο και αποθήκευσή του στο ψυγείο.

2.3.1 Διαδικασία ηλεκτροφόρησης

Πριν την τοποθέτηση του δείγματος στο πήκτωμα αγαρόζης αυτό αναμιγνύεται με μια χρωστική φόρτωσης (μπλέ της βρωμοφαινόλης). Αυτή εξυπηρετεί πολλούς σκοπούς. Αρχικά, επειδή είναι ορατή στο φυσικό φως βοηθάει στην αναγνώριση της θέσης φόρτωσης του δείγματος και παράλληλα καθώς μετακινείται μαζί με το DNA χρησιμεύει στην παρακολούθηση της πορείας της ηλεκτροφόρησης. Τέλος, η γλυκερόλη που περιέχει προσδίδει μεγαλύτερη πυκνότητα στο DNA και δεν το αφήνει να βγει έξω από το πηγαδάκι φόρτωσης του δείγματος. Ταυτόχρονα με τα δείγματα φορτώνεται και ένα δείκτης γνωστού μοριακού βάρους για την εκτίμηση του μεγέθους των προϊόντων μας.

Η μετακίνηση των νουκλεϊκών οξέων γίνεται προς την άνοδο (+) λόγω του αρνητικού φορτίου που τους προσδίδει η παρουσία των φωσφορικών ομάδων. Το τελευταίο στάδιο είναι η μεταφορά του πηκτώματος υπό υπεριώδες φως (UV), αξιολόγηση των εμφανιζόμενων δειγμάτων και καταγραφή με την μορφή αποθήκευσης εικόνας των δεδομένων στοιχείων (Εικόνα 13).



Εικόνα 13. Διαδικασία ηλεκτροφόρησης των δειγμάτων. Πηγή:

<https://schoolworkhelper.net/gel-electrophoresis-basics-steps>

2.4 Τροποποίηση με δισουλφιδικό νάτριο των μη-μεθυλιωμένων κυτοσινών του DNA (Sodium Bisulfite Conversion of Unmethylated Cytosines in DNA)

Η επώαση του DNA με δισουλφιδικό νάτριο έχει ως αποτέλεσμα τη μετατροπή των μη-μεθυλιωμένων κυτοσινών σε ουρακίλες, αφήνοντας τις μεθυλιωμένες κυτοσίνες αμετάβλητες. Επομένως, με τη διαδικασία αυτή έχουμε διαφορετική αλληλουχία DNA για το μεθυλιωμένο και το μη-μεθυλιωμένο DNA. Για τη συγκεκριμένη διαδικασία χρησιμοποιήσαμε το EpiTect Bisulfite Kit (QIAGEN) και ακολουθήσαμε το πρωτόκολλο, όπως αυτό περιγράφεται στη συνέχεια σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Πιο συγκεκριμένα:

1) Ετοιμάζω το μίγμα μεθυλίωσης (Bisulfite Mix). Το διάλυμα αυτό περιέχει δισουλφιδικό νάτριο στο βέλτιστο pH για την πλήρη μετατροπή των κυτοσινών σε ουρακίλες, χωρίς επιπλέον ρύθμιση του pH. Για τη διαλυτοποίησή του προσθέτω 800μl δις απεσταγμένου H₂O. Ο όγκος αυτός επαρκεί για τη μεθυλίωση 8 DNA δειγμάτων.

2) Ακολουθεί PCR. Η συγκέντρωση του DNA θα πρέπει να είναι 1ng-2μg.

DNA: 1ng-2μg

H₂O: αναλόγως της ποσότητας του DNA

DNA + H₂O = 20μl όγκος

Bisulfite Mix: 85μl

DNA protect

Buffer: 35μl

Ντελικό: 140μl

- 3) Συνθήκες μετατροπής με δισουλφιδικό νάτριο σε θερμικό κυκλοποιητή τύπου Eppendorf (Εικόνα 14)

Στάδια	Χρόνος	Θερμοκρασία
Αποδιάταξη	5 λεπτά	95°C
Επώαση	25 λεπτά	60°C
Αποδιάταξη	5 λεπτά	95°C
Επώαση	85 λεπτά	60°C
Αποδιάταξη	5 λεπτά	95°C
Επώαση	175 λεπτά	60°C
Διατήρηση	αόριστο	20°C



Εικόνα 14. Αυτόματος θερμικός κυκλοποιητής τύπου Eppendorf.

2.5Καθαρισμός του τροποποιημένου DNA (bisulfite converted)

1) Δημιουργία μίγματος 700μl το οποίο περιέχει:

- i) 140 μl από κάθε δείγμα
- ii) 310 μl διάλυμα BL
- iii) 250 μl αιθανόλη

2) Μεταφορά σε στήλες φυγοκέντρωση 2 λεπτά στις 15.000 στροφές και αφαίρεση του υπερκειμένου

3) Προσθήκη 500 μl διαλύματος BW, φυγοκέντρωση 2 λεπτά στις 15.000 στροφές και αφαίρεση του υπερκειμένου

4) Προσθήκη 500 μl διαλύματος BD και επώαση για 15 λεπτά, φυγοκέντρωση 2 λεπτά στις 15.000 στροφές και αφαίρεση του υπερκειμένου

5) Προσθήκη 500 μl διαλύματος BW, φυγοκέντρωση για 2 λεπτά στις 15.000 στροφές και αφαίρεση του υπερκειμένου

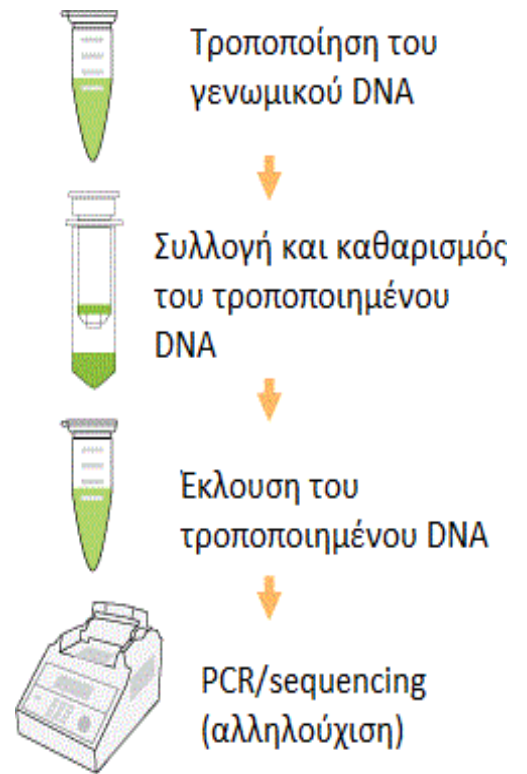
6) Επανάληψη του βήματος 5

7) Μεταφέρουμε τις στήλες σε αποστειρωμένα σωληνάρια τύπου Eppendorf των 2 ml

8) Προσθήκη 20μl αποστειρωμένου H₂O, επώαση 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρωση για 5 λεπτά στις 15.000 στροφές

9) Επανάληψη του βήματος 8 εφόσον έχω επαναπροσθέσει τα 20 μl του εκλούμενου DNA

10) Συλλογή του καθαρισμένου εκλούμενου DNA σε σωληνάριο τύπου Eppendorf των 2 ml.



Εικόνα 15. Σχηματική απεικόνιση του καθαρισμού των επεξεργασμένων DNA μορίων

2.6 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) για ενίσχυση των υπό μελέτη γονιδιακών τμημάτων

Οι αλληλουχίες των εκκινητών F3, F4, F1 που χρησιμοποιήθηκαν στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) για το εξεταζόμενο γονίδιο παρατίθενται στη συνέχεια:

PyroMark CpG Assay		
No.1		
Assay name: Hs_FAM19A4_03_PM	Gene Symbol: FAM19A4	Amplicon Length: 92
GeneGlob Cat no. :PM00015470	Entrez Gene ID: 151647	Biotin Modification On: Reverse Primer
Chromosomal Location: Chr3: 68980746-68980838	ENSEMBL Gene ID: ENSG00000163377	Sequence Strand: Anti Sense

Sequence to Analyze: GAGCGGGTCTGGAAGTTGCGTCTCTTTCCGCGGGA

Sequence to Analyze Bisulfite Converted:

GAGYGGGTTTGGAAAGTTGYGTTTTTTTTTYGYGGGA

Dispensation Order: TGAGTCGTCTAGAGATGTCGTTTCGTCG

Number of CpGs: 4

PyroMark CpG Assay

No.2

Assay name: Hs_FAM19A4_04_PM	Gene Symbol: FAM19A4	Amplicon Length: 92
GeneGlob Cat no. : PM00015477	Entrez Gene ID: 151647	Biotin Modification On: Reverse Primer
Chromosomal Location: Chr3: 68980833-68980925	ENSEMBL Gene ID: ENSG00000163377	Sequence Strand: Sense

Sequence to Analyze: ACGCCTCCCAAGCGCTCGCTGCGC

Sequence to Analyze Bisulfite Converted: AYGTTTTTTAAGYGTTYGTTGYGT

Dispensation Order: TATCGTTAGTCGATCGTCTGTCCG

Number of CpGs: 4

PyroMark CpG Assay

No.3

Assay name: Hs_FAM19A4_01_PM	Gene Symbol: FAM19A4	Amplicon Length: 92
GeneGlob Cat no. : PM00015456	Entrez Gene ID: 151647	Biotin Modification On: Reverse Primer
Chromosomal Location: Chr3: 68981137-68981223	ENSEMBL Gene ID: ENSG00000163377	Sequence Strand: Anti Sense

Sequence to Analyze: GTCGGCGTGCAACCCGAGGTTGGAAGGGGCACTCCGA

Sequence to Analyze Bisulfite Converted:
GTYGGYGTGTAATTYGAAGTTGGAAGGGGTATTTYGA

Dispensation Order: TGTCGTCGATGTCATCGTAGTGAGGTATTTCG

Number of CpGs: 4

Συστατικά	Όγκος ανά αντίδραση (μl)
Pyromark PCR Master Mix, 2x	12,5
Coral Load Concetrate, 10x	2,5
Εκκινητής	1
Νερό (ddH ₂ O)	7
Καθαρό DNA	1
Τελικός όγκος	25

Συνθήκες PCR

Βήμα ενεργοποίησης	15 λεπτά	95°C	Η HotstartTaq DNA πολυμεράση έχει ενεργοποιηθεί
Κύκλος τριών βημάτων			
Αποδιάταξη	30 δευτερόλεπτα	94 °C	
Υβριδοποίηση	30 δευτερόλεπτα	56 °C	
Επιμήκυνση	30 δευτερόλεπτα	72 °C	
Αριθμός κύκλων	45		
Τελική επιμήκυνση	10 λεπτά	72 °C	

Ανίχνευση στελεχών HPV με υβριδισμό Zytovision HPV Array

Για την ανίχνευση των στελεχών HPV των ασθενών, τα δείγματα ενισχύθηκαν σύμφωνα με το πρωτόκολλο της διαδικασίας ανίχνευσης στελεχών HPV μέσω υβριδισμού με το σύστημα Zytovision HPV array.

Συστατικά	Όγκος ανά αντίδραση (μl)
Vision HPV PreCise Master Mix	15
Sample DNA	2,5- 5
Νερό (ddH ₂ O)	5- 7,5
Τελικός όγκος	25

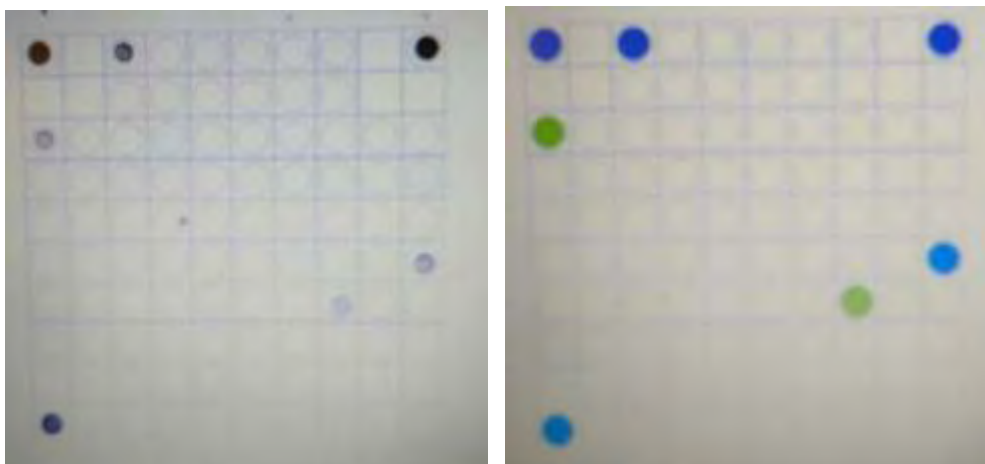
Συνθήκες PCR

Χρόνος	Θερμοκρασία (°C)	Επαναλήψεις	Βήμα
10 λεπτά	25	1	Ενεργοποίηση Uracil- DNA γλυκοσυλάσης
20 δευτερόλεπτα	95	1	Ενεργοποίηση Hot Start πολυμεράσης, Απενεργοποίηση Uracil- DNA γλυκοσυλάσης
30 δευτερόλεπτα	55	10	Αποδιάταξη
80 δευτερόλεπτα	60		Υβριδοποίηση
20 δευτερόλεπτα	95		Επιμήκυνση
30 δευτερόλεπτα	38	35	Αποδιάταξη

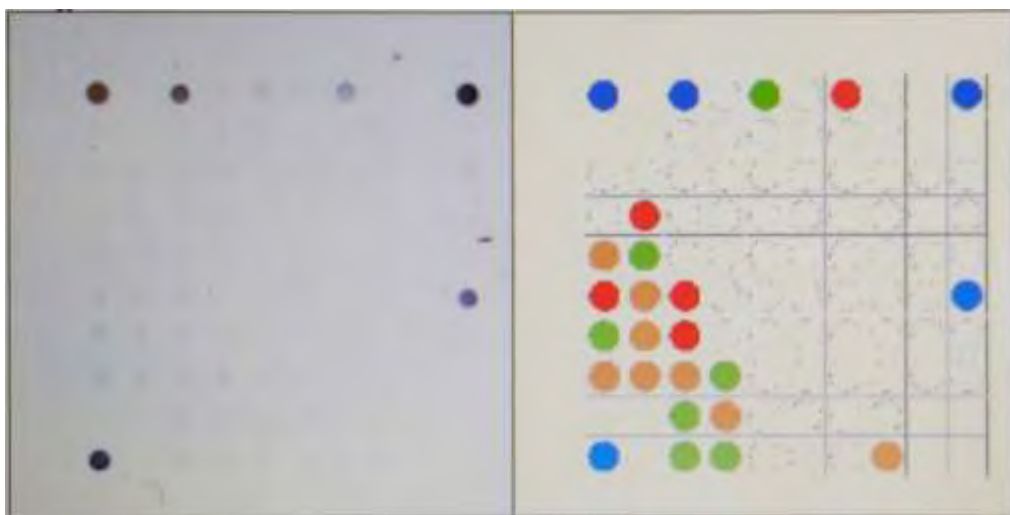
80 δευτερόλεπτα	60	1	Υβριδοποίηση
1 λεπτό	95		Επιμήκυνση
-	8	1	Αποδιάταξη

Υβριδισμός και ανίχνευση στελεχών HPV με το ZytoVision Array Detection Kit

1. Στην επιφάνεια πλακιδίου προστίθεται μίγμα του προϊόντος ενίσχυσης της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης και του διαλύματος υβριδοποίησης, όγκου 30 μl και καλύπτεται από πλαστική καλυπτρίδα
2. Το πλακίδιο επωάζεται σε προθερμασμένο υβριδοποιητή για 30 λεπτά στους 42°C
3. Προετοιμάζεται αραιώση του Wash Buffer σε αναλογία 1:100 και διαμοιράζεται σε τρία δοχεία
4. Με το πέρας του υβριδισμού, αφαιρείται η καλυπτρίδα από το πλακίδιο, το πλακίδιο στεγνώνει και εμβαπτίζεται στα τρία δοχεία που περιέχουν Wash Buffer. Με τον εμβαπτισμό στο τρίτο δοχείο, το δείγμα επωάζεται για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου.
5. Το δείγμα φυγοκεντρείται σε φυγόκεντρο πλακιδίων για 30 δευτερόλεπτα
6. Στην επιφάνεια του πλακιδίου προστίθενται 100 μl διαλύματος ανίχνευσης και το δείγμα επωάζεται για δέκα λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
7. Το δείγμα εμβαπτίζεται σε τρία δοχεία που περιέχουν Wash Buffer. Με τον εμβαπτισμό στο τρίτο δοχείο, το δείγμα επωάζεται για ένα λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου.
8. Το δείγμα φυγοκεντρείται σε φυγόκεντρο πλακιδίων για 30 δευτερόλεπτα
9. Στην επιφάνεια του πλακιδίου προστίθενται 100 μl διαλύματος χρώσης Blue Spot και το δείγμα επωάζεται για πέντε λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
10. Το πλακίδιο ξεπλένεται με Wash Buffer και μεταφέρεται στον υπολογιστή για σάρωση και ανίχνευση στελεχών



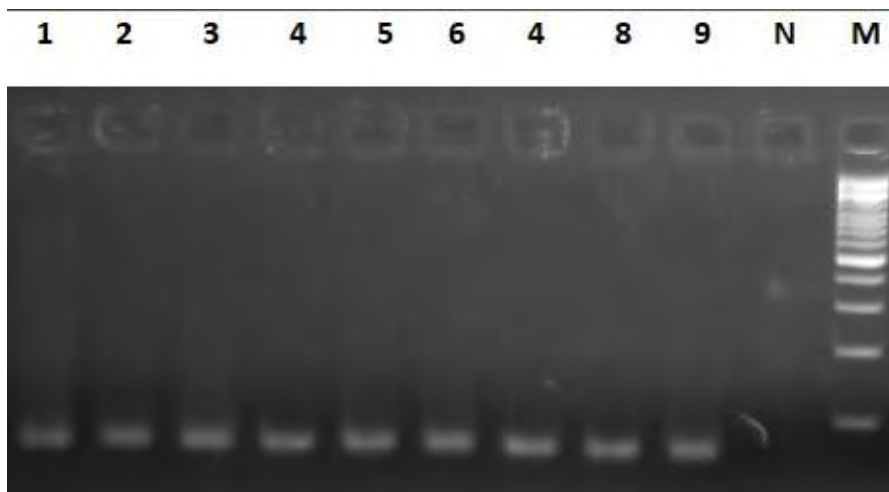
Εικόνα 16. Ανίχνευση ενός στελέχους HPV σε ασθενή με το σύστημα ZytoVision HPV Vision Array



Εικόνα 17. Ανίχνευση πολλαπλών στελεχών HPV σε ασθενή με το σύστημα ZytoVision HPV Vision Array

2.6.1 Ηλεκτροφόρηση των PCR προϊόντων του γονιδίου FAM19A4

Ηλεκτροφορήσαμε τα PCR προϊόντα για το εξεταζόμενο γονίδιο για να αποκλείσουμε τυχόν επιμόλυνση και να ελέγξουμε ότι ενισχύθηκε το επιθυμητό προϊόν σε κάθε περίπτωση, σε πήκτωμα αγαρόζης σύστασης 3%.

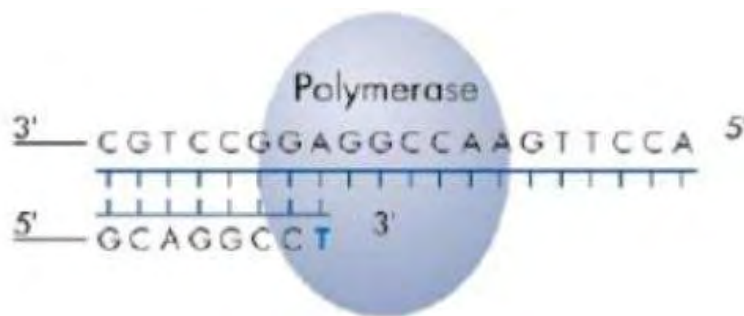


Εικόνα 18. Ηλεκτροφόρηση PCR προϊόντων του γονιδίου FAM19A4 σε 3% πήκτωμα αγαρόζης, 1-9: δείγματα ασθενών, M: 100bp μάρτυρας γνωστού μεγέθους (Thermo Fischer), N: αρνητικός μάρτυρας

2.7 Αρχή λειτουργίας της μεθόδου πυροαλληλούχισης (Pyrosequencing)

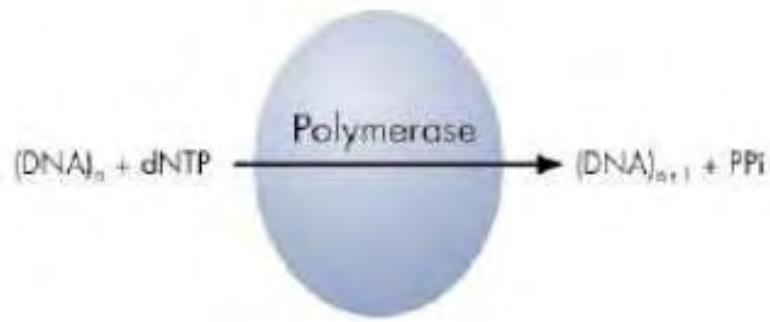
Η τεχνολογία της πυροαλληλούχισης (Pyrosequencing) χρησιμοποιεί αλληλούχιση μέσω σύνθεσης για την ακριβή και ποσοτική ανάλυση αλληλουχιών DNA.

Βήμα 1. Ένας εκκινητής αλληλούχισης υβριδίζεται σε ένα μονόκλωνο τμήμα DNA, ενισχυμένο μέσω PCR αντίδρασης που λειτουργεί ως μήτρα και επωάζεται με τα ένζυμα DNA πολυμεράση, ATP σουλφουρυλάση, λουσιφεράση και απυράση καθώς επίσης και με τα υποστρώματα 5' φωσφοθειική αδενοσίνη (APS) και λουσιφερίνη.



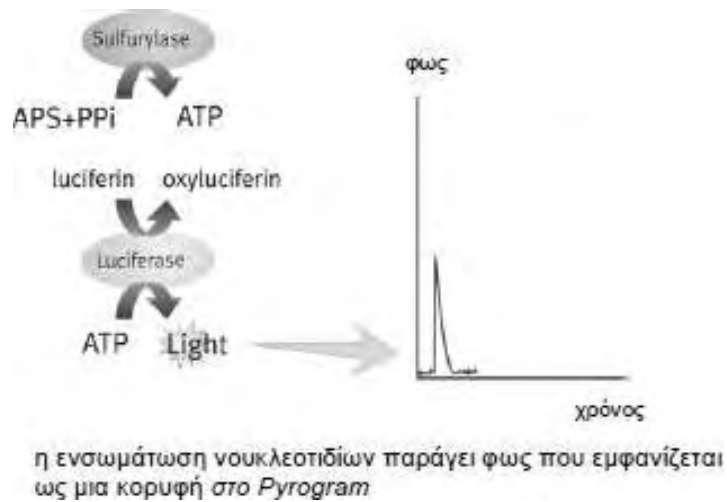
Εικόνα 19. Υβριδοποίηση του εκκινητή.

Βήμα 2. Το πρώτο από τέσσερα νουκλεοτίδια προστίθεται στην αντίδραση. Εάν το νουκλεοτίδιο είναι συμπληρωματικό της βάσης που υπάρχει στον κλώνο της μήτρας, θα ενσωματωθεί στον κλώνο του DNA από την DNA πολυμεράση. Κάθε συμβάν ενσωμάτωσης συνοδεύεται από την απελευθέρωση πυροφωσφορικού (PPi) σε ισομοριακή ποσότητα με την ποσότητα του νουκλεοτιδίου που ενσωματώνεται.



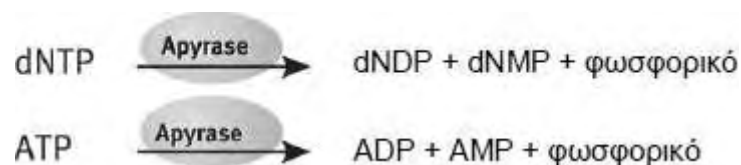
Εικόνα 20. Ενσωμάτωση dNTP και απελευθέρωση πυροφωσφορικού (PPi)

Βήμα 3. Η ATP σουλφουρυλάση μετατρέπει ποσοτικά την PPI σε ATP υπό την παρουσία 5' φωσφοθεικής αδενοσίνης. Αυτό ενεργοποιεί τη μετατροπή της λουσιφερίνης σε οξυλουσιφερίνη από τη λουσιφεράση, παράγοντας ορατό φως σε ποσότητες ανάλογες προς την ποσότητα του ATP. Το φως ανιχνεύεται με χρήση συζευγμένων με φορτίο στοιχείων (CCD) και εμφανίζεται ως μια κορυφή (πυρόγραμμα). Κάθε φωτεινό σήμα είναι ανάλογο προς τον αριθμό των νουκλεοτιδίων που ενσωματώνονται.



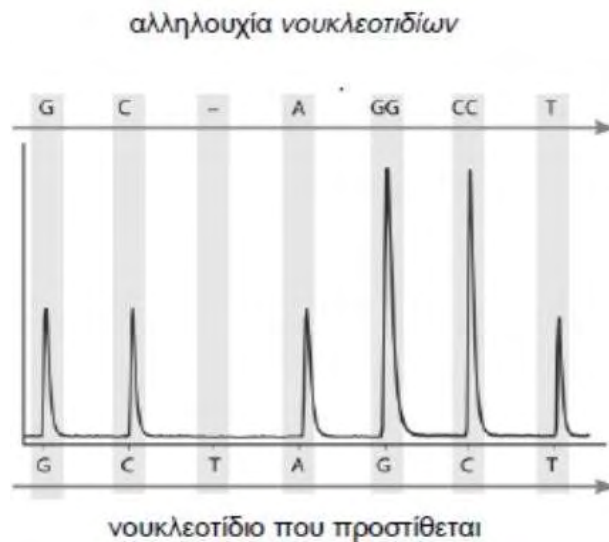
Εικόνα 21. Μετατροπή του πυροφωσφορικού (PPI) σε ATP και εκπομπή ορατού φωτός.

Βήμα 4. Η απυράση, ένα ένζυμο αποικοδόμησης των νουκλεοτιδίων, αποικοδομεί συνεχώς τα μη ενσωματωμένα νουκλεοτίδια και το ATP. Όταν ολοκληρωθεί η αποικοδόμηση, προστίθεται ένα άλλο νουκλεοτίδιο.



Εικόνα 22. Αντίδραση αποικοδόμησης μη ενσωματωμένων νουκλεοτιδίων.

Βήμα 5. Τα νουκλεοτίδια προστίθενται ένα ένα κάθε φορά. Σημειώνεται ότι η αλφα-θειο τριφωσφορική δεοξυαδενοσίνη (dATP α S) υποκαθιστά τη φυσική τριφωσφορική δεοξυαδενοσίνη (dATP) καθώς χρησιμοποιείται αποτελεσματικά από την DNA πολυμεράση, αλλά δεν αναγνωρίζεται από την λουσιφεράση. Καθώς η διαδικασία συνεχίζεται, δημιουργείται η συμπληρωματική αλληλουχία, και η αλληλουχία νουκλεοτιδίων προσδιορίζεται από την κορυφή στο πυρόγραμμα.



Εικόνα 23. Δημιουργία πυρογράμματος βάσει της συντιθέμενης νουκλεοτιδικής αλληλουχίας.

2.7.1 Αντιδράσεις πυροαλληλούχισης των προϊόντων του εξεταζόμενου FAM19A4 γονιδίου

- Τα βιοτινυλιωμένα προϊόντα PCR ακινητοποιούνται επάνω σε επικαλυμμένα με στρεπταβιδίνη σφαιρίδια σεφαρόζης (Streptavidin Sepharose High Performance).

Master Mix για ακινητοποίηση του DNA

Συστατικά

Streptavidin Sepharose High Performance

Όγκος ανά αντίδραση (μl)

2

Ρυθμιστικό διάλυμα σύνδεσης (PyroMark Binding Buffer)	40
Νερό	28
Τελικός όγκος αντίδρασης	70

- Μοιράζω 70μl από το Master Mix σε κάθε πηγαδάκι και προσθέτω 12μl από το προϊόν της PCR.
- Ανάδευση των μιγμάτων σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά στις 1.400 στροφές.
- Είναι σημαντικό πριν ξεκινήσουμε τη διαδικασία στη συσκευή να έχουμε προετοιμάσει και τοποθετήσει όλα τα απαραίτητα διαλύματα στους ξεχωριστούς περιέκτες που παρέχονται με τον υπό κενό σταθμό εργασίας PyroMark Q24 (QIAGEN).



Εικόνα 24. Σταθμός εργασίας με αντλία υπό κενό PyroMark Q24 (QIAGEN).

- Διαλυτοποίησή του εκκινητή αλληλούχισης σε 1175 μl ρυθμιστικό διάλυμα υβριδοποίησης

Mix

Συστατικά

Όγκος ανά δείγμα (μl)

Εκκινητής αλληλούχισης

0,8

Ρυθμιστικό διάλυμα πρόσδεσης (PyroMark Annealing)	24,2
Τελικός όγκος	25,0

- Μοιράζω 25μl του παραπάνω μίγματος σε κάθε πηγαδάκι της πλάκας 24 θέσεων PyroMark Q24 που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί.
- Αμέσως μετά την ακινητοποίηση, τοποθετώ τα σωληνάρια PCR (strips) και το πλακίδιο PyroMark Q24 στο σταθμό εργασίας και εφαρμόζω κενό ανοίγοντας τον διακόπτη της αντλίας κενού.
- Χαμηλώνω προσεκτικά τους δειγματολήπτες με φίλτρο μέσα στο πλακίδιο που περιέχει τα PCR προϊόντα για 1 λεπτό, με σκοπό να δεσμευθούν τα σφαιρίδια που περιέχουν το ακινητοποιημένο DNA.
- Μεταφέρω το εργαλείο στον περιέκτη που περιέχει 40ml 70% αιθανόλη για 5 δευτερόλεπτα.
- Μεταφέρω το εργαλείο στον περιέκτη που περιέχει 40ml διαλύματος αποδιάταξης (Denaturation Solution) για 5 δευτερόλεπτα.
- Μεταφέρω το εργαλείο στον περιέκτη που περιέχει 50ml ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης (Wash Buffer) για 10 δευτερόλεπτα.
- Ανυψώνω το εργαλείο κατακόρυφα περισσότερο από 90° για 10 δευτερόλεπτα, για να αποστραγγιστεί το υγρό από τους δειγματολήπτες με φίλτρο.



Εικόνα 25. Δειγματολήπτης με φίλτρα

- Ενώ κρατάω το εργαλείο επάνω από το πλακίδιο PyroMark Q24, κλείνω τον διακόπτη στην αντλία κενού (απενεργοποίηση).

- Ανακινώντας το εργαλείο απαλά από πλευρά σε πλευρά, απελευθερώνονται τα σφαιρίδια στο πλακίδιο που περιέχει τον εκκινητή αλληλούχησης.
- Με τον διακόπτη κενού κλειστό (απενεργοποίηση), μεταφέρω το εργαλείο στον περιέκτη που περιέχει νερό υψηλής καθαρότητας και ανακινώ για 10 δευτερόλεπτα.
- Ξεπλένω τους δειγματολήπτες με φίλτρο βυθίζοντας τους στο δεύτερο περιέκτη με νερό υψηλής καθαρότητας και εφαρμόζοντας κενό.
- Ανυψώνω το εργαλείο κατακόρυφα περισσότερο από 90° για 5 δευτερόλεπτα, για να αποστραγγιστεί το υγρό από τους δειγματολήπτες με φίλτρο.
- Κλείνω τον διακόπτη στην αντλία κενού (απενεργοποίηση) και τοποθετώ τον δειγματολήπτη στη θέση στάθμευσης (P).
- Θερμαίνω το πλακίδιο PyroMark Q24 που περιέχει τα δείγματα στους 80°C για 2 λεπτά χρησιμοποιώντας την κατάλληλη βάση π PyroMark Q24 (παρέχονται με τον σταθμό εργασίας υπό κενό) κι ένα θερμικό μπλοκ.
- Αφαιρώ το πλακίδιο από τη βάση και αφήνω τα δείγματα να κρυώσουν σε θερμοκρασία δωματίου (15–25°C) για τουλάχιστον 5 λεπτά. Το πλακίδιο μπορεί τώρα να τοποθετηθεί στον αναλυτή PyroMark Q24.
- Διαλυτοποίησή του λυοφιλοποιημένου ενζύμου και του υποστρώματος σε 620μl δις απεσταγμένου H₂O
- Εισάγω το κατάλληλο πρόγραμμα στον υπολογιστή με τις αντίστοιχες θέσεις των δειγμάτων και υπολογίζονται οι αντίστοιχοι όγκοι των νουκλεοτιδίων, του ενζύμου και του υποστρώματος.
- Γεμίζω τη φύσιγγα PyroMark Q24 (Cartridge), με τους απαιτούμενους όγκους των αντιδραστηρίων (νουκλεοτίδια, ένζυμο, υπόστρωμα).

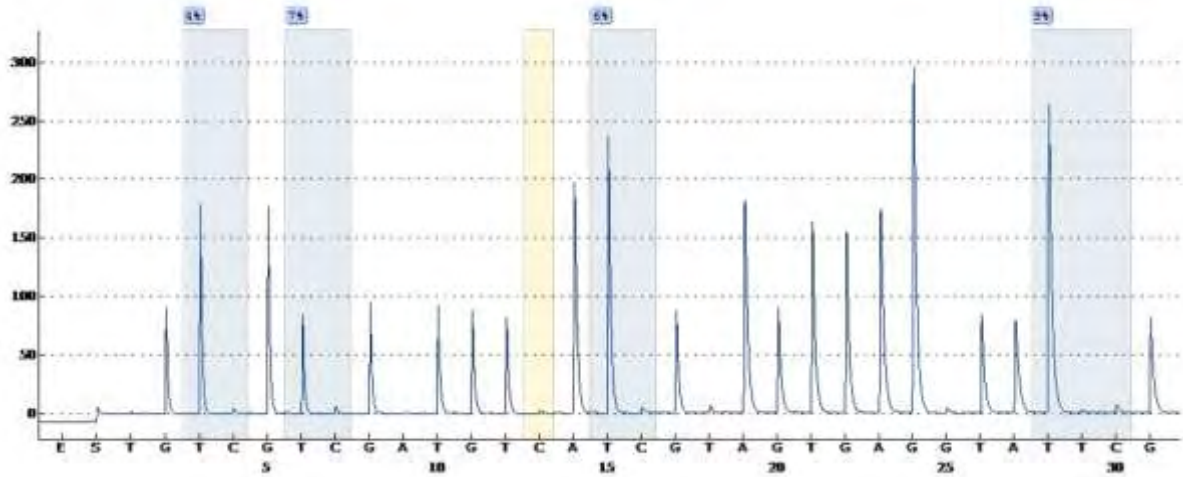


Εικόνα 26. Φύσιγγα PyroMark Q24 (Cartridge)

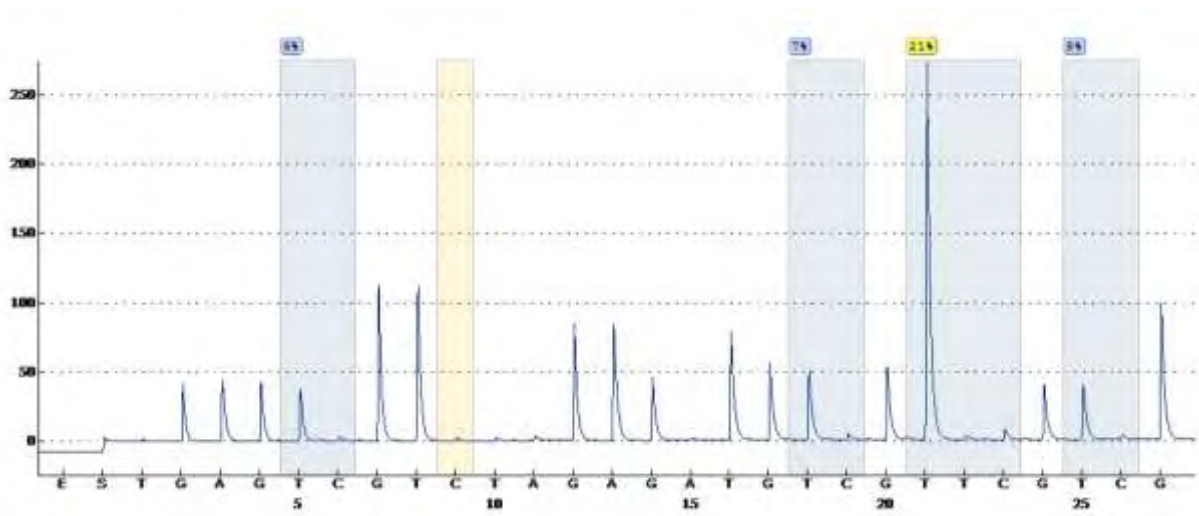
- Τοποθετώ τη γεμάτη φύσιγγα αντιδραστηρίων και την πλάκα στη συσκευή και εισάγω το πρόγραμμα με το USB στη θύρα υποδοχής της συσκευής.
- Αφού έχει ολοκληρωθεί η εκτέλεση, τα δεδομένα εκτέλεσης έχουν μεταφερθεί στη μονάδα μνήμης USB.
- Αφαιρώ τη φύσιγγα και ξεπλένω πολύ καλά.
- Ακολουθεί η εισαγωγή του USB στον υπολογιστή για αποθήκευση των δεδομένων μόλις ολοκληρωθεί το πείραμα και η ανάλυση των δειγμάτων με την μέθοδο της πυροαλληλούχισης.



Εικόνα 27. Συσκευή πυροαλληλούχισης Pyromark Q24(Qiagen).



Εικόνα 28. Πυρόγραμμα Hs_FAM19A4_01_PM



Εικόνα 29. Πυρόγραμμα Hs_FAM19A4_03_PM

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Οι ασθενείς της μελέτης μας ομαδοποιήθηκαν σε δύο ηλικιακές ομάδες, με βάση τη διάμεση τιμή τους (42 ± 11.2). Στην πρώτη ομάδα συμπεριλάβαμε όλους τους ασθενείς ηλικίας <45 ετών, ενώ στη δεύτερη ομάδα οι ασθενείς με ηλικία ≥ 45 ετών.

Με βάση τις κλινικοπαθολογικές παραμέτρους που συλλέξαμε, καταγράψαμε το βαθμό δυσπλασίας των συμμετεχόντων, τον τύπο του καρκινώματος και την απουσία ή παρουσία του HPV ιού. Σε όσες ασθενείς ανιχνεύθηκε ο ιός HPV προχωρήσαμε περαιτέρω σε ταυτοποίηση και προσδιορισμό του συγκεκριμένου στελέχους του HPV ιού.

Τα κλινικό-ιστολογικά στοιχεία των ασθενών απεικονίζονται αναλυτικά στον παρακάτω πίνακα.

<i>Παράμετρος</i>	<i>Αριθμός</i>	<i>Ποσοστό (%)</i>
<i>Ηλικία ασθενών</i>		
< 45	19	63.3
≥ 45	11	36.7
<i>Ανίχνευση HPV ιού</i>		
<i>Αρνητική</i>	0	0
<i>Θετική</i>	100	100
<i>Τύποι HPV ιού</i>		
<i>Ένας</i>	17	56.6
<i>Πολλαπλοί</i>	13	43.3

Πίνακας 2. Κλινικό-ιστολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών της μελέτης.

Όπως φαίνεται από τον παραπάνω πίνακα, 19/30 γυναίκες (63,3%) ήταν ηλικίας κάτω των 45 ετών, ενώ 11/30 γυναίκες (36,7%) ήταν ηλικίας \geq των 45 ετών. Όλοι οι ασθενείς της μελέτης μας είχαν διαγνωστεί με καρκίνο ή δυσπλασία τύπου III (CIN III).

Ακολούθησε απομόνωση γενομικού DNA και έλεγχος των ασθενών της μελέτης για την παρουσία του HPV. Όλες οι γυναίκες που εξετάστηκαν ήταν θετικές για την παρουσία του ιού

και προχωρήσαμε περαιτέρω σε τυποποίηση. 17/30 ασθενείς (56,6%) είχαν απλή λοίμωξη με ένα στέλεχος του HPV ιού, φέροντας το στέλεχος 16. Οι υπόλοιποι 13/30 (43,3%) διαγνώστηκαν με πολλαπλή λοίμωξη του ιού HPV καθώς έφεραν περισσότερα από ένα στελέχη. 4 ασθενείς (30,8%) έφεραν τα στελέχη 6, 11 και 16, 4 ασθενείς (30,8%) έφεραν τα στελέχη 16 και 31 και 5 ασθενείς (38,4%) έφεραν τα στελέχη 16, 31 και 33.

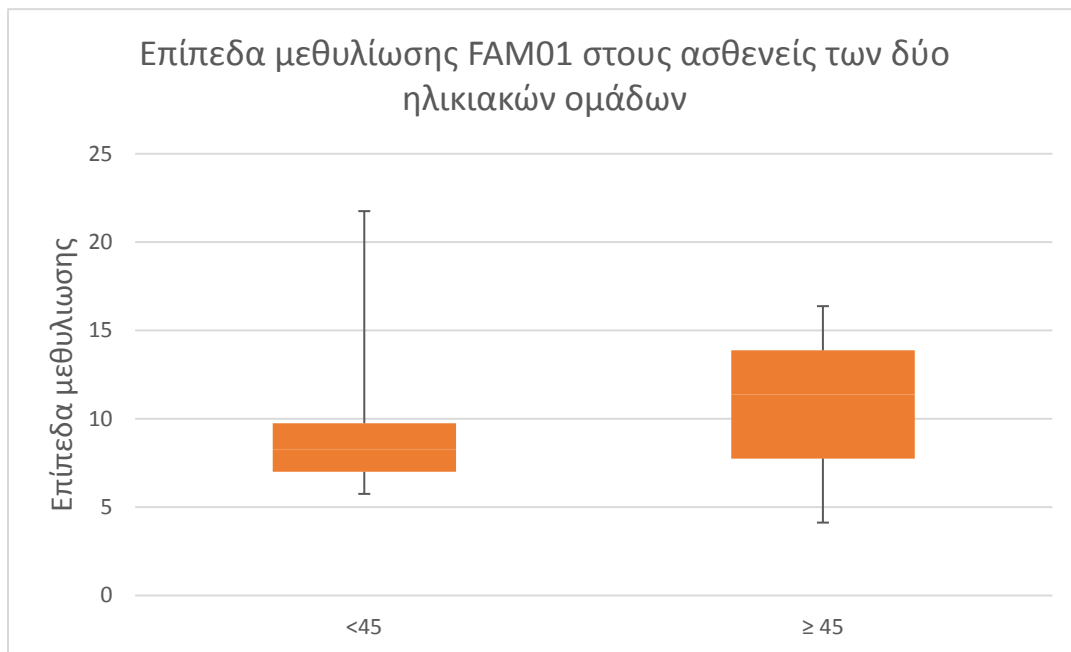
Μελέτη των επιπέδων μεθυλίωσης των CpG νησίδων του FAM19A4 γονιδίου στις περιοχές FAM01 και FAM03

Τα επίπεδα μεθυλίωσης για το FAM01 ανήλθαν σε 13.25 ± 6.4 με εύρος (7-24,75) για την ομάδα ασθενών υψηλού κινδύνου και καρκίνου. Τα επίπεδα μεθυλίωσης για το FAM03 ανήλθαν σε $14,6 \pm 7$ με εύρος (5,3-39,7) για την ομάδα ασθενών υψηλού κινδύνου και καρκίνου.

Μελέτη των επιπέδων μεθυλίωσης των CpG νησίδων του FAM01 γονιδίου στις ηλικιακές ομάδες της μελέτης

Μελετήσαμε τα επίπεδα μεθυλίωσης της περιοχής FAM01 του FAM19A4 γονιδίου σε γυναίκες με υψηλόβαθμη δυσπλασία και καρκίνο. Χρησιμοποιήσαμε τη μέθοδο της πυροαλληλούχισης, που επιτρέπει πέρα από την ανίχνευση μεθυλίωσης ή μη για το εξεταζόμενο γονίδιο και την ποσοτικοποίηση των επιπέδων μεθυλίωσης των CpG νησίδων.

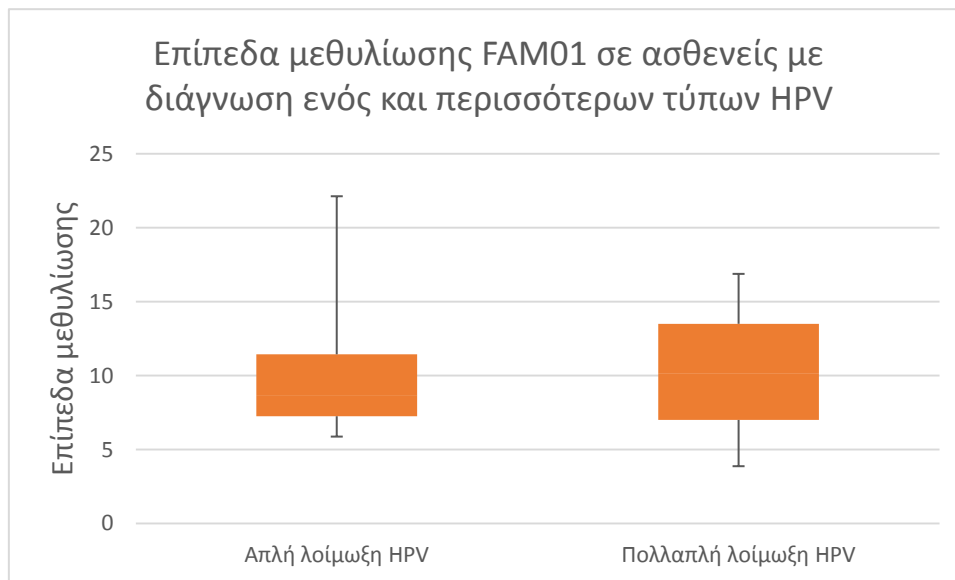
Τα επίπεδα μεθυλίωσης των τεσσάρων CpG νησίδων της περιοχής FAM01 του FAM19A4 γονιδίου κυμάνθηκαν στο $12.5 \pm 6.5\%$ για τους ασθενείς ηλικίας < 45 ετών και $14.3 \pm 6.2 \%$ για τους ασθενείς ≥ 45 ετών. Τα επίπεδα μεθυλίωσης στις δύο ηλικιακές ομάδες είναι παρόμοια, συνεπώς δεν αναδείχθηκε κάποια στατιστικώς σημαντική συσχέτιση.



Γράφημα 1. Επίπεδα μεθυλίωσης στις δύο ηλικιακές ομάδες των ασθενών της μελέτης μας για την περιοχή FAM01 του FAM19A4 γονιδίου.

Μελέτη των επιπέδων μεθυλίωσης των CpG νησίδων της περιοχής FAM01 του FAM19A4 γονιδίου στους ασθενείς της μελέτης, σύμφωνα με τη διάγνωση ενός ή περισσότερων τύπων HPV

Οι ασθενείς με υψηλόβαθμη δυσπλασία (CIN III) ή καρκίνο εξετάστηκαν για την παρουσία του HPV ιού. Η παρουσία του ιού επιβεβαιώθηκε σε όλους τους ασθενείς και ακολούθησε τυποποίηση για τον προσδιορισμό των στελεχών του HPV ιού. Εκτιμήσαμε τα επίπεδα μεθυλίωσης του γονιδίου FAM01 σε ασθενείς με διάγνωση ενός και πολλαπλών τύπων HPV. Τα επίπεδα μεθυλίωσης των τεσσάρων CpG νησίδων του γονιδίου FAM01 κυμάνθηκαν στο $12.8 \pm 6.5\%$ για τους ασθενείς που διαγνώστηκαν απλή λοίμωξη (ένα στέλεχος HPV) και 13.4 ± 6.5 για τους ασθενείς που διαγνώστηκαν με πολλαπλή λοίμωξη (περισσότερα από ένα στέλεχη) του HPV ιού. Τα επίπεδα μεθυλίωσης στις δύο ηλικιακές ομάδες είναι παρόμοια και δεν αναδείχθηκε κάποια στατιστικώς σημαντική συσχέτιση.

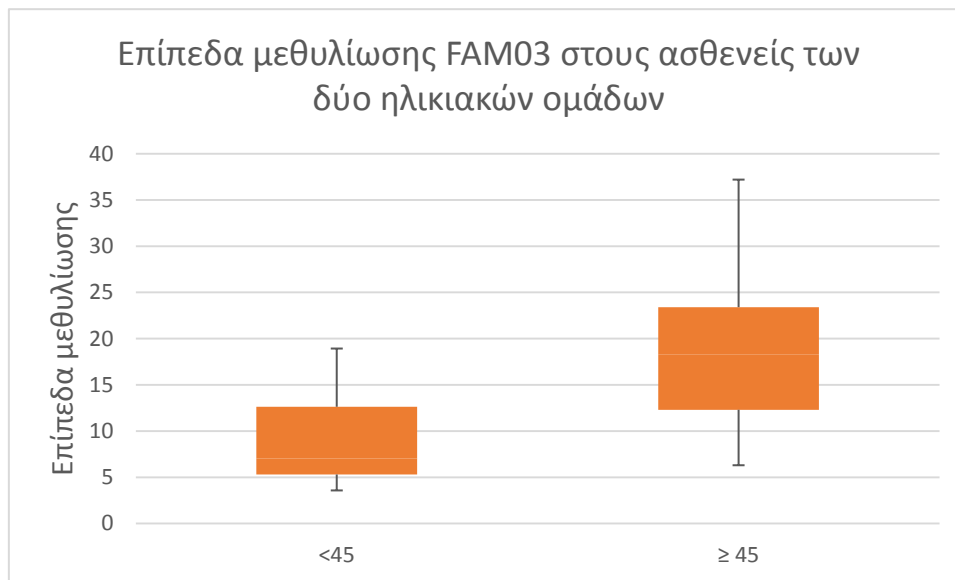


Γράφημα 2. Επίπεδα μεθυλίωσης του γονιδίου FAM01 σε ασθενείς με απλή ή πολλαπλή λοίμωξη από στελέχη του ιού HPV.

Μελέτη των επιπέδων μεθυλίωσης των CpG νησίδων της περιοχής FAM03 του FAM19A4 γονιδίου στις ηλικιακές ομάδες της μελέτης

Μελετήσαμε τα επίπεδα μεθυλίωσης του FAM03 γονιδίου σε γυναίκες με υψηλό βαθμό δυσπλασίας και καρκίνο ανεξάρτητα από τη διάγνωση HPV. Χρησιμοποιήσαμε τη μέθοδο της πυροαλληλούχισης, που επιτρέπει πέρα από τον προσδιορισμό των μεθυλιωμένων και μη μεθυλιωμένων DNA δειγμάτων και την ποσοτικοποίηση των επιπέδων μεθυλίωσης των CpG νησίδων.

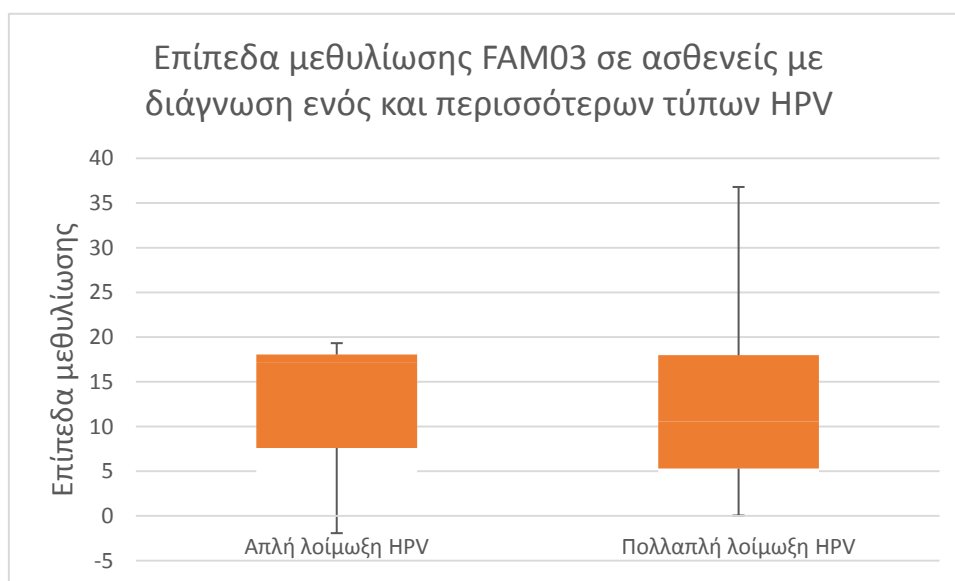
Τα επίπεδα μεθυλίωσης των τεσσάρων CpG νησίδων της FAM03 περιοχής κυμάνθηκαν στο $12.6 \pm 8\%$ για τους ασθενείς ηλικίας < 45 ετών και $23.4 \pm 11,6\%$ για τους ασθενείς ηλικίας ≥ 45 ετών. Τα επίπεδα μεθυλίωσης στις δύο ηλικιακές ομάδες είναι παρόμοια, συνεπώς δεν αναδείχθηκε κάποια στατιστικώς σημαντική συσχέτιση.



Γράφημα 3. Επίπεδα μεθυλίωσης των δύο ηλικιακών ομάδων ασθενών για την περιοχή FAM03 του FAM19A4 γονιδίου.

Μελέτη των επιπέδων μεθυλίωσης των CpG νησίδων FAM03 περιοχής του FAM19A4 γονιδίου στους ασθενείς της μελέτης, σύμφωνα με τη διάγνωση ενός ή περισσότερων τύπων HPV

Τα επίπεδα μεθυλίωσης των τεσσάρων CpG νησίδων του γονιδίου FAM03 κυμάνθηκαν στο $18.1 \pm 7.1\%$ για τους ασθενείς που διαγνώστηκαν με ένα τύπο HPV και $18 \pm 15\%$ για τους ασθενείς που διαγνώστηκαν με πολλαπλούς τύπους HPV. Τα επίπεδα μεθυλίωσης στις δύο ηλικιακές ομάδες είναι παρόμοια και δεν αναδείχθηκε κάποια στατιστικώς σημαντική συσχέτιση.



Γράφημα 4. Επίπεδα μεθυλίωσης της περιοχής FAM03 του FAM19A4 γονιδίου σε ασθενείς με απλή ή πολλαπλή λοίμωξη από στελέχη του ιού HPV.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας είναι ο τέταρτος σε συχνότητα γυναικολογικός καρκίνος και αποτελεί την τρίτη συχνότερη αιτία θανάτου από καρκίνο στο γυναικείο φύλο παγκοσμίως. Η συχνότητα εμφάνισης ποικίλει γεωγραφικά με υψηλότερα ποσοστά να απεικονίζονται στις λιγότερο αναπτυγμένες χώρες (Bray F et al, 2018).

Επιδημιολογικοί παράγοντες όπως το κάπνισμα, η εναλλαγή πολλών ερωτικών συντρόφων, η έναρξη της σεξουαλικής δραστηριότητας σε πρόωμη ηλικία, η χρήση αντισυλληπτικών χαπιών δια του στόματος αποτελούν παράγοντες που σχετίζονται με την ανάπτυξη καρκινογένεσης του τραχήλου της μήτρας. Η λοίμωξη από τον ιό των ανθρωπίνων θηλωμάτων HPV, κυρίως ογκογόνα στελέχη του, είναι απαραίτητη αιτία, αλλά όχι επαρκής αιτία για την ανάπτυξη καρκίνου του τραχήλου της μήτρας (Herrero R, Murillo R. Cervical cancer. In: Thun MJ, Linet MS, Cerhan JR, Haiman CA, Schottenfeld D, eds. Cancer Epidemiology and Prevention. 4th ed. New York: Oxford).

Τα τελευταία χρόνια, στα καρκινογενετικά μονοπάτια εμπλέκονται πλέον και οι επιγενετικές αλλαγές του γονιδιώματος. Πρόκειται για αλλαγές που αφορούν στην έκφραση του γονιδιώματος και όχι σε αλλαγές της αλληλουχίας του DNA. Οι κύριοι επιγενετικοί μηχανισμοί είναι η μεθυλίωση του DNA, οι τροποποιήσεις των ιστονών και η μεταβολή της έκφρασης των miRNA μορίων. Πρόσφατες μελέτες σε αρκετούς καρκίνους, μεταξύ των οποίων και του τραχήλου της μήτρας, έχουν δείξει πλήθος γονιδίων που υπόκεινται σε ρύθμιση της γονιδιακής τους έκφρασης μέσω της υπερμεθυλίωσης των υποκινητών τους. Μεταξύ των γονιδίων αυτών είναι το γονίδιο FAM19A4 (De Strooper, L.M., et al., (2014)).

Στην παρούσα εργασία επιλέξαμε να μελετήσουμε τα επίπεδα μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου FAM19A4 σε ασθενείς με καρκίνο του τραχήλου της μήτρας, προκειμένου να δούμε το ρόλο των επιγενετικών αλλαγών στο γονίδιο αυτό και την πιθανή επίδρασή του στην καρκινογένεση του τραχήλου της μήτρας. Εξετάσαμε επίσης την παρουσία του HPV ιού και προσδιορίσαμε τα στελέχη του ιού, προκειμένου να εξετάσουμε εάν τα επίπεδα μεθυλίωσης του υποκινητή του FAM19A4 γονιδίου παρουσιάζουν διακυμάνσεις ανάλογα με τον τύπο του HPV ή την παρουσία απλών ή πολλαπλών HPV λοιμώξεων.

Το εξεταζόμενο γονίδιο είναι ένα ογκοκατασταλτικό γονίδιο με τρία μετάγραφα που εδράζεται στη χρωμοσωμική περιοχή 3p14.1 και κωδικοποιεί μια μικρή εκκριτική πρωτεΐνη. Το

εν λόγω γονίδιο εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στον εγκέφαλο, ενώ δεν εκφράζεται καθόλου στους άλλους ιστούς.

Στην παρούσα μελέτη συμμετείχαν 30 γυναίκες με υψηλόβαθμες δυσπλασίες (CIN III) και καρκίνο του τραχήλου της μήτρας που εξετάστηκαν στη Γυναικολογική κλινική του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας. Απομονώθηκε γενομικό DNA από μονιμοποιημένο σε φορμόλη και εμπεδωμένο σε παραφίνη ιστό και μετά από κατάλληλη επεξεργασία με δισουλφιδικό νάτριο ενισχύθηκε το εξεταζόμενο γονίδιο για την εκτίμηση των επιπέδων μεθυλίωσης με τη μέθοδο της πυροαλληλούχισης. Η εν λόγω μέθοδος επιτρέπει ταυτόχρονα και την ποσοτικοποίηση των επιπέδων μεθυλίωσης. Τα επίπεδα μεθυλίωσης εξετάστηκαν στους γενετικούς τόπους FAM19A4_01, FAM19A4_03 και FAM19A4_04, που διαθέτουν τέσσερις CpG νησίδες έκαστος.

Οι ασθενείς της μελέτης ελέγχθηκαν για την παρουσία ή απουσία λοίμωξης από τον HPV ιό, με την τεχνική του υβριδισμού μέσω σάρωσης ZytoVision HPV Vision Array. 17/30 ασθενείς (56.7%) έφεραν απλή λοίμωξη HPV για το στέλεχος 16. 13/30 ασθενείς (43.3%) διαγνώστηκαν με πολλαπλές λοιμώξεις και έφεραν τα στελέχη 6, 11, 16 ή 16, 31 ή 16, 31, 33.

Από τους γενετικούς τόπους που αναλύθηκαν, επιτυχή ποσοστά μεθυλίωσης παρείχαν οι γενετικοί τόποι FAM19A4_01 και FAM19A4_03. Τα επίπεδα μεθυλίωσης κυμάνθηκαν στο $13.25 \pm 6.4\%$ με εύρος (7-24,75) και $14.6 \pm 7\%$ με εύρος (5,3-39,7) αντίστοιχα. Εξαιτίας της κατανομής των ασθενών και της ομοιομορφίας των διαγνώσεων, δεν επιτράπηκε η μελέτη της πιθανής σχέσης των επιπέδων μεθυλίωσης και του υψηλού σταδίου CIN III των ασθενών.

Τα επίπεδα μεθυλίωσης των δύο περιοχών συσχετίστηκαν με την ηλικία και την παρουσία απλής ή πολλαπλής λοίμωξης από τον HPV ιό. Τα ευρήματα ήταν παρόμοια και δεν αναδείχθηκε κάποια στατιστικώς σημαντική συσχέτιση. Αξίζει να σημειωθεί ότι δεν υπάρχει μεγάλος αριθμός μελετών για το γονίδιο FAM19A4. Σε σχετικά πρόσφατη μελέτη του De Strooper και συνεργατών εκτιμάται ως δείκτης μεθυλίωσης σε περιστατικά με προκαρκινικές αλλοιώσεις και παρουσία λοίμωξης από τον HPV ιό (De Strooper et al, 2014). Στη ίδια μελέτη των De Strooper et al (2014), ανιχνεύθηκαν υψηλά επίπεδα μεθυλίωσης του γονιδίου FAM19A4 σε ασθενείς προσβεβλημένους από υψηλού κινδύνου στελέχη του ιού HPV, καθώς και σε ασθενείς με καρκίνο. Τα επίπεδα μεθυλίωσης του γονιδίου ήταν χαμηλά σε μικρότερου βαθμού προκαρκινικές αλλοιώσεις, θέτοντας το ογκοκατασταλτικό γονίδιο FAM19A4 ως έναν εν δυνάμει βιοδείκτη για την ανίχνευση προκαρκινικών και καρκινικών αλλοιώσεων υψηλού κινδύνου (De Strooper et al, 2014).

Σε μία πρόσφατη μελέτη ασθενών με χαμηλόβαθμες και υψηλόβαθμες αλλοιώσεις, καθώς και σε ασθενείς με καρκίνο ανιχνεύθηκαν υψηλά επίπεδα μεθυλίωσης του FAM19A4 γονιδίου (Bu et al, 2018). Συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι οι υψηλότερου βαθμού αλλοιώσεις, παρουσίαζαν

και υψηλότερα επίπεδα μεθυλίωσης, εύρημα που εκτιμά ότι το εν λόγω γονίδιο θα μπορούσε να χρησιμεύσει ως βιοδείκτης για την ανίχνευση προκαρκινικών αλλοιώσεων (Bu et al, 2018).

Αντίστοιχα και η μελέτη των Dankai και συνεργατών (2019), που εξέτασε τα επίπεδα μεθυλίωσης διαφόρων γονιδίων, μεταξύ των οποίων και του γονιδίου FAM19A4 σε κυτταρολογικά και ιστικά δείγματα προσβεβλημένων από τον ιό HPV γυναικών, ανίχνευσε αυξημένα επίπεδα μεθυλίωσης του γονιδίου FAM19A4. Ωστόσο οι διακυμάνσεις στα επίπεδα μεθυλίωσης του εν λόγω γονιδίου δεν έδειξαν συσχέτιση με τον HPV ιό, γεγονός που επιβεβαιώνει και τα δικά μας ευρήματα.

Τέλος, στη μελέτη των Dick και συνεργατών (2019) διερευνήθηκε η πιθανή χρήση των επιπέδων μεθυλίωσης του FAM19A4 σε γυναίκες με λοίμωξη από HPV ιό για κίνδυνο εμφάνισης ενδοεπιθηλιακής νεοπλασίας σταδίου 3 (CIN III). Στη μελέτη συγκρίνονται τα επίπεδα της μεθυλίωσης του FAM19A4 με αντίστοιχα κυτταρολογικά ευρήματα. Τα επίπεδα μεθυλίωσης και κυτταρολογικής ανίχνευσης είναι συγκρίσιμα, γεγονός που προτείνει την ανάλυση μεθυλίωσης του FAM19A4 ως εναλλακτική διάγνωση (Dick et al, 2019).

Στην παρούσα μελέτη αναλύθηκαν τα επίπεδα μεθυλίωσης δύο περιοχών του γονιδίου FAM19A4 σε ασθενείς υψηλού κινδύνου δυσπλασίας και καρκίνου. Δεν αναδείχθηκε κάποια στατιστικώς σημαντική συσχέτιση με τις παραμέτρους που μελετήθηκαν. Ωστόσο, δεδομένου απαιτείται μελέτη μεγαλύτερου αριθμού δειγμάτων σε συνδυασμό με το γεγονός ότι η μεθυλίωση του FAM19A4 γονιδίου φαίνεται να διαδραματίζει ρόλο στην καρκινογένεση του τραχήλου της μήτρας ανοίγουν το δρόμο προς την έρευνα και την εξέταση του γονιδίου FAM19A4 ως υποψήφιου μελλοντικού βιοδείκτη.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. **.Sankaranarayanan R. HPV vaccination: the most pragmatic cervical cancer primary prevention strategy. *Int J Gynecol Obstet* 2015;131: S33-S35.**
2. **.Tota JE, Bentley J, Blake J, Coultée F, Duggan MA, Ferenczy A, Franco EL, Fung-Kee-Fung M, Gotlieb W, Mayrand MH, McLachlin M, Murphy J, Ogilvie G, Ratnam S. Introduction of molecular HPV testing as the primary technology in cervical cancer screening: Acting on evidence to change the current paradigm. *Prev Med.* 2017;98: 5-14**
3. **Διακομανώλης Ε. Κολποσκόπηση & παθολογία του κατώτερου γεννητικού συστήματος της γυναίκας. Ιατρικές Εκδόσεις Π. Χ. Πασχαλίδης, 2010**
4. **Μορτάκης Α. Μόλυνση από τους HPV στο κατώτερο γεννητικό σύστημα της γυναίκας. Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσας. Αθήνα, 1999**
5. **Alex Ferenczy, Pathology of Female Genital Tract, Anatomy and Histology of the Cervix, Springer Science Business Media, New York, 1977**
6. **Alfonso Duenas-Gonzalez, Marcela Lizano, Myrna Candelaria, Lucely Cetina, Claudia Arce, Eduardo Cervera, Epigenetics of cervical cancer. An overview and therapeutic perspectives, October 2005**
7. **Angiolo Gadducci, Cecilia Barsotti, Stefania Cosio, Lavinia Domenici, Andrea Riccardo, Genazzani, Gynecological Endocrinology, Smoking habit, immune suppression, oral contraceptive use, and hormone replacement therapy use and cervical carcinogenesis: a review of the literature, March 2011, Volume 27, Issue 8, p.**
8. **C.Kroupis, G.Thomopoulou, T.G Papathomas, N.Vourlidis, A.C Lazaris, Epidemiology & Infection, EPopulation-based study of human papillomavirus infection and cervical neoplasia in Athens, Greece, June 2007, Volume 135, Issue 6: p.943-950**
9. **Carla Alves, Luis Alves, Nuno Lunet, Epidemiology of cervical cancer. Arquivos de medica. 24(6): p. 266-77**
10. **De Bustros A, Nelkin BD, Silverman A, Ehrlich G, Poiesz B, Baylin SB. The short arm of chromosome 11 is a "hot spot" for hypermethylation in human neoplasia. Proc Natl Acad Sci U S A. 1988 85: p.5693–5697**
11. **De Strooper LM, Meijer CJ, Berkhof J, Hesselink AT, Snijders PJ, Steenbergen RD, et al. Methylation analysis of the FAM19A4 gene in cervical scrapes is highly efficient in**

- detecting cervical carcinomas and advanced CIN2/3 lesions. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2014;7(12):1251–7. 10.1158/1940-6207.CAPR-14-0237
12. De Strooper LM, Meijer CJ, Berkhof J, Hesselink AT, Snijders PJ, Steenbergen RD, et al. Methylation analysis of the FAM19A4 gene in cervical scrapes is highly efficient in detecting cervical carcinomas and advanced CIN2/3 lesions. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2014;7(12): p.1251–7. 10.1158/1940-6207.CAPR-14-0237
 13. European Society of Gynaecological Oncology, **Καρκίνος του Τραχήλου της Μήτρας Κατευθυντήριες Οδηγίες 2017**, Γεώργιος Π.Παναγάκης,Υποψήφιος Διδάκτωρ Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ Ειδ. Μαιευτικής & Γυναικολογίας Ά Μαιευτική & Γυναικολογική Κλινική ΕΚΠΑ ΓΝΑ "Αλεξάνδρα
 14. Feinberg AP, Vogelstein B. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature*. 1983;301: p.89–92. doi: 10.1038/301089a0.
 15. Franco, Eduardo L. DrPHa, Schlecht, Nicolas F. PhDb, Saslow, Debbie PhDc, *The Cancer Journal, The Epidemiology of Cervical Cancer, September-October 2003, Volume 9, Issue 5: p. 348-359*
 16. Freddie Bray, BSc, MSc, PhD Jacques Ferlay, ME Isabelle Soerjomataram, MD, MSc, PhD Rebecca L. Siegel, MPH Lindsey A. Torre, MSPH Ahmedin Jemal, PhD, DVM,CA *CANCER J CLIN* 2018;68:394–424
 17. Jack Cuzick, Christine Clavel, Karl Ulrich Petry, Chris J.L.Meijer, Heik Hoyer, Samuel Ratnam, Anne Szarewski, Phillippe Birembaut, Shalini Kulasingam, Peter Sasieni, Thomas Iftner, *Wiley Online Library, Overview of the European and North American studies on HPV testing in primary cervical cancer screening, June 2006, Volume 119, Issue 5, p.1095-1101*
 18. Krantz, K. E. The anatomy of the human cervix, gross and microscopic, in Blandau, R. J., and Moghissi, K., eds.: *The Biology of the Cervix*. Chicago, University of Chicago Press, 1973, p. 57–69.
 19. Lise M.A. De Strooper Chris J.L.M. Meijer Johannes Berkhof Albertus T. Hesselink Peter J.F. Snijders Renske D.M. Steenbergen and Dani elle A.M. Heidema, *Published Online First October 3, 2014; DOI: 10.1158/1940-6207.CAPR-14-0237*
 20. Luttmer R, De Strooper LM, Berkhof J, Snijders PJ, Dijkstra MG, Uijterwaal MH, et al. Comparing the performance of FAM19A4 methylation analysis, cytology and HPV16/18 genotyping for the detection of cervical (pre)cancer in high-risk HPV-positive women of a gynecologic outpatient population (COMETH study). *International journal of cancer*. 2016;138(4): p.992–1002. 10.1002/ijc.29824

21. Neerja Bhatla1, Jonathan S. Berek, Mauricio Cuello Fredes, Lynette A. Denny, Seija Grenman, Kanishka Karunaratne, Sean T. Kehoe, Ikuo Konishi, Alexander B. Olawaiye, Jaime Prat,
22. Overmeer RM, Henken FE, Bierkens M, Wilting SM, Timmerman I, Meijer CJ, et al. Repression of MAL tumour suppressor activity by promoter methylation during cervical carcinogenesis. *J Pathol.* 2009;219(3): p.327–36. 10.1002/path.2598
23. Overmeer RM, Henken FE, Snijders PJ, Claassen-Kramer D, Berkhof J, Helmerhorst TJ, et al. Association between dense CADM1 promoter methylation and reduced protein expression in high-grade CIN and cervical SCC. *J Pathol.* 2008;215(4):388–97. 10.1002/path.2367
24. Paul R.Wheater, H. George Burkitt, Victor G. Daniels, *Functional Histology*, Churchill Livingstone, Second Edition, New York, 1987, p.303
25. Rengaswamy Sankaranarayanan. Revised FIGO staging for carcinoma of the cervix uteri. *Int J Gynecol Obstet* 2019; 145: 129–135.
26. Schmidt D, Burgeron C, Denton KJ, Ridder R, *Cancer Cytopathol*, p16/ki-67 dual-stain cytology in the triage of ASCUS and LSIL papanicolaou cytology: results from the European equivocal or mildly abnormal Papanicolaou cytology study, June 2011
27. Steenbergen RD, Kramer D, Braakhuis BJ, Stern PL, Verheijen RH, Meijer CJ, et al. TSLC1 gene silencing in cervical cancer cell lines and cervical neoplasia. *J Natl Cancer Inst.* 2004 96(4):p. 294–305
28. Steenbergen RD, Ongenaert M, Snellenberg S, Trooskens G, van der Meide WF, Pandey D, et al. Methylation-specific digital karyotyping of HPV16E6E7-expressing human keratinocytes identifies novel methylation events in cervical carcinogenesis. *The Journal of pathology.* 2013;231(1): p.53–62. 10.1002/path.4210
29. Stéfanie Dick Wieke W. Kremer Lise M.A. De Strooper Birgit I. Lissenberg-Witte Renske D.M. Steenbergen Chris J.L.M. Meijer Johannes Berkhof Daniëlle A.M. Heideman
30. Wenyan Wang, Ting Li, Xiaolin Wang, Wanxiong Yuan, Yingying Cheng, Heyu Zhang, Yingmei Zhang, Shuang Shi, Dalong Ma, Wenling Han1, *Cellular and Molecular Immunology*, FAM19A4 is a novel cytokine ligand of formyl peptide receptor 1 (FPR1) and is able to promote the migration and phagocytosis of macrophages, August 2014, 12(5): p.615-624

31. **Wiyada Dankai, Surapan Khunamornpong, Sumalee Siriaungkul, Aungsumalee Soongkhaw, Arphawan Janpanao, Utaiwan Utaipat, Nakarin Kitkumthorn, Apiwat Mutirangura, Jatupol Srisomboon, Suree Lekawanvijit, Role of genomic DNA methylation in detection of cytologic and histologic abnormalities in high risk HPV-infected women, 2019**
32. **Γυναικολογικά Προβλήματα και Λύσεις, Εκδόσεις Κάλλιπος, 2015**
33. **Δρ. Θάνος Ε.Ασκητής, Νευρολόγος – Ψυχίατρος, Διδάκτωρ Ψυχιατρικής Παν/μίου Αθηνών, Πρόεδρος του Ινστιτούτου Ψυχικής & Σεξουαλικής Υγείας, Πρώην Βουλευτής Αθηνών, Πρόεδρος Ελληνικής Εταιρείας Αγωγής Ψυχικής & Σεξουαλικής Υγείας, Σεξουαλική Υγεία, Καρκίνος των Γεννητικών Οργάνων, Καρκίνος του Τραχήλου της Μήτρας**
34. **Εγχειρητική στη Μαιευτική και Γυναικολογία, Εκδόσεις Τζιόλα, 2016, σελ.26,123**
35. **Επιτομή Μαιευτική και Γυναικολογία, Εκδόσεις MD COMMUNICATIONS, 2η Έκδοση, 2010, σελ.512,514,515,516,517,518,519**
36. **Ευγονία, Μονάδα Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής, Γονιμότητα, Τραχηλικός Παράγων**

