



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

«Μελέτη επιπέδων μεθυλίωσης του γονιδίου FAM19A4 σε HPV θετικές γυναίκες με
πρόδρομες αλλοιώσεις του τραχήλου της μήτρας»

ΑΝΤΩΝΙΑ ΧΡΙΣΤΟΔΟΥΛΙΔΗ

ΤΕΧΝΟΛΟΓΟΣ ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΩΝ

Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των

απαιτήσεων για την απόκτηση του

Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης

ΛΑΡΙΣΑ

ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2019

Εγκρίθηκε από τα Μέλη της Εξεταστικής Επιτροπής:

1^{ος} Εξεταστής (Επιβλέπων)	Μαρία Σαμαρά, Επίκουρος Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής με έμφαση στη Μοριακή Ιστοπαθολογία
2^{ος} Εξεταστής (Σύμβουλος)	Μαρία Σάτρα, ΕΔΙΠ Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
3^{ος} Εξεταστής (Μέλος)	Αλέξανδρο Δαπόντε, Καθηγητή Μαιευτικής και Γυναικολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω αρχικά τον Καθηγητή Μαιευτικής και Γυναικολογίας 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 Καθηγήτριά μου, Επίκουρη Καθηγήτρια, κυρία Μαρία Σαμαρά, για τη συνεχή καθοδήγηση και υποστήριξη που μου προσέφερε το τελευταίο χρονικό διάστημα, όπως 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, τα αδέρφια 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.

Χριστοδουλίδη Αντωνία

ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ

ΧΡΙΣΤΟΔΟΥΛΙΔΗ ΑΝΤΩΝΙΑ

Ημερομηνία Γέννησης: 14 Ιουλίου 1995

ΣΠΟΥΔΕΣ:

- ✓ Απόφοιτη ΤΕΙ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ- 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 ΣΥΝΕΔΡΙΟ ΑΝΑΠΡΑΓΩΓΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΚΕΝΤΡΙΚΗΣ ΕΛΛΑΔΑΣ 30.11-02.12.2018 / Λάρισα
- ✓ Σεμινάριο για τα Διαγνωστικά στην «Υγεία της Γυναίκας»-Roche Diagnostics Hellas. 30.9-2.10.2019 / Αθήνα

ΕΡΓΑΣΙΕΣ-ΜΕΛΕΤΕΣ:

- ✓ Πτυχιακή Εργασία «Μοριακές Τεχνικές στην Εγκληματολογία»
- ✓ Διπλωματική εργασία «Μελέτη επιπέδων μεθυλίωσης του γονιδίου FAM19A4 σε HPV θετικές γυναίκες με πρόδρομες αλλοιώσεις του τραχήλου της μήτρας»

ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ:

- ✓ Αγγλικά, GCSE

ΓΝΩΣΗ Η/Υ:

- ✓ Καλή γνώση προγραμμάτων Microsoft Office-Word, Excel, PowerPoint

«ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ –

ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΣΤΗ ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΑ – ΠΕΡΙΓΕΝΝΗΤΙΚΗ ΙΑΤΡΙΚΗ»

ΧΡΙΣΤΟΔΟΥΛΙΔΗ ΑΝΤΩΝΙΑ

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:	Μαρία Σαμαρά, Επίκουρος Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής με έμφαση στη Μοριακή Ιστοπαθολογία
Σύμβουλος :	Μαρία Σάτρα, ΕΔΙΠ Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
Μέλος :	Αλέξανδρο Δαπόντε,

Περίληψη

Ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας αποτελεί έναν από τους συχνότερους καρκίνους στο γυναικείο φύλο. Πρόκειται για μια ιδιαίτερη νόσο που χαρακτηρίζεται από την ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων στους ιστούς του τραχήλου της μήτρας και αναπτύσσεται ως αποτέλεσμα μακροχρόνιας λοίμωξης από τον ιό των ανθρώπινων θηλωμάτων (HPV). 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 FAM01, FAM03, FAM04 του γονιδίου FAM19A4 σε ασθενείς με πρόδρομες αλλοιώσεις του τραχήλου της μήτρας, προκειμένου να δούμε το ρόλο των επιγενετικών αλλαγών στα γονίδια αυτά και την πιθανή επίδρασή τους στην καρκινογένεση του τραχήλου. Στην παρούσα μελέτη συμμετείχαν 70 γυναίκες, ηλικίας 19-64 ετών, με χαμηλόβαθμη δυσπλασία (CIN I, CIN II). 88.6% των ασθενών διαγνώστηκαν με CIN I και 11.4% διαγνώστηκαν με CIN II αλλοιώσεις. 34.3% δεν είχαν προσβληθεί από τον HPV ιό, ενώ 65.7% ήταν θετικές για τον HPV ιό. Οι ασθενείς με απλή λοίμωξη από τον HPV ιό έφεραν ένα από τα στελέχη 16, 31, 51 ή 33, ενώ όσοι διαγνώστηκαν με πολλαπλές λοιμώξεις έφεραν τα στελέχη 6, 11, 31, ή 16, 31 ή 16, 33. Από τους γενετικούς τόπους που αναλύθηκαν, επιτυχή ποσοστά μεθυλίωσης παρείχαν οι τόποι FAM19A4_01 και FAM19A4_03. Τα επίπεδα μεθυλίωσης κυμάνθηκαν στο $15,75 \pm 10,9\%$ και $10 \pm 7,6\%$ αντίστοιχα. Παρατηρήθηκαν υψηλότερα επίπεδα συνολικής μεθυλίωσης στους ασθενείς με βαθμό δυσπλασίας CIN II και η συσχέτιση του βαθμού δυσπλασίας και των επιπέδων μεθυλίωσης της γονιδιακής περιοχής FAM03 είναι στατιστικώς σημαντική ($p = 0.015$). Τα επίπεδα μεθυλίωσης των δύο περιοχών FAM19A4_01 και FAM19A4_03 συσχετίστηκαν με την ηλικία, την παρουσία ή απουσία HPV λοίμωξης καθώς και την παρουσία απλής ή πολλαπλής λοίμωξης του ιού HPV, χωρίς στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις. Ο μικρός αριθμός μελετών για τη μεθυλίωση του υποκινητή του FAM19A4 γονιδίου, σε συνδυασμό με τα ευρήματα της δικής μας, αλλά και προηγούμενων μελετών, που υποδηλώνουν τη χρησιμότητα μέτρησης των επιπέδων μεθυλίωσης του συγκεκριμένου γονιδίου στα πλαίσια της διαφοροποίησης των γυναικών με χαμηλόβαθμες και υψηλόβαθμες δυσπλασίες, καθιστούν σχεδόν αναγκαία την περαιτέρω έρευνα σε μεγάλο αριθμό δειγμάτων προκειμένου να εξαχθούν ασφαλή στατιστικά συμπεράσματα.

Summary

Cervical cancer is one of the most common cancers in females. It is a particular disease characterized by the development of cancer cells in the cervical tissues and develops as a result of long-term human papillomavirus (HPV) infection. Numerous studies have identified a large number of methylated genes involved in critical cellular processes, but until today, we have not been able to find any prognostic or predictive epigenetic biomarkers. In the present study, we aimed to study the methylation levels of the FAM01, FAM03 and FAM04 promoter CpG-islands in patients with precancerous cervical lesions, to investigate the role of epigenetic changes in these genes and their possible carcinogenesis of the cervix. The study involved 70 women, aged 19-64 with cervical lesions (CINI, CINII / LGSIL). The methylation levels were analysed by the sequencing method and the statistical analysis was performed with IBM SPSS v software. 22. 88.6% of patients were diagnosed with CIN I and 11,4% with CIN II lesions. 34.3% were HPV negative and 65.7% were HPV positive. HPV positive patients with one HPV subtype carried the 16, 31, 51 or 33 subtype, while patients with multiple infections carried the 16, 11, 31 or 16, 31 or 16, 33 subtypes. FAM19A4_01 and FAM19A4_03 methylation levels were acquired and calculated at $15.75 \pm 10,9\%$ and $10 \pm 7,6\%$ respectively. Higher methylation levels in CIN II patients versus CIN I patients for the FAM03 region, a statistically significant correlation ($p=0.015$). FAM01 and FAM03 methylation levels didn't correlate to patient age, presence or absence of HPV infections, as well as single or multiple HPV infections. The small number of studies regarding FAM19A4 promoter methylation levels in combination with our findings, as well as those of previous studies, indicating utility in methylation levels testing, in terms of differentiation between low level and high level lesions in patients, demand further study in larger sample sizes in order to infer valid statistical results.

Περιεχόμενα	
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	3
ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ.....	4
Περίληψη	6
Summary	7
Κεφάλαιο 1	10
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	10
1.1. Καρκίνος του τραχήλου της μήτρας	11
1.2. Επιδημιολογία.....	11
1.4. Τρόποι αντιμετώπισης	14
1.5. Γεννητικό σύστημα θήλεος ατόμου	15
1.6. Φυσιολογία του τραχήλου της μήτρας	18
1.7. Ιστολογία του τραχήλου της μήτρας.....	19
1.8. Αλλοιώσεις και σταδιοποίηση	21
1.9. Επιγενετική	27
1.10. Μεθυλίωση και FAM19A4	28
1.11. Το γονίδιο FAM19A4	29
1.12. Θεραπεία	30
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2	31
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.....	31
2.1 Σκοπός	32
2.2. Υλικό της μελέτης	33
2.2.1 Απομόνωση γενομικού DNA από FFPE (Formalin Fixed Paraffin Embedded) ιστό (DNA extraction)	33
2.2.2. Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός DNA	35
2.3. Παρασκευή πηκτώματος αгарόζης	36
2.3.1 Διαδικασία ηλεκτροφόρησης.....	37
2.4. Τροποποίηση με δισουλφιδικό νάτριο των μη-μεθυλιωμένων κυτοσινών του DNA (Sodium Bisulfite Conversion of Unmethylated Cytosines in DNA)	38
2.5. Καθαρισμός του τροποποιημένου DNA (bisulfite converted)	40
2.6. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) για ενίσχυση των υπό μελέτη γονιδιακών τμημάτων	41
2.7. Ανίχνευση στελεχών HPV με υβριδισμό Zytovision HPV Array	44
Συνθήκες PCR	45
2.8. Ηλεκτροφόρηση των PCR προϊόντων του γονιδίου FAM19A4	47

2.7. Αρχή λειτουργίας της μεθόδου πυροαλληλούχισης (Pyrosequencing)	47
2.9. Αντιδράσεις πυροαλληλούχισης των προϊόντων του εξεταζόμενου FAM19A4 γονιδίου	50
Συστατικά Όγκος ανά αντίδραση (μl)	50
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3	56
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	56
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	57
3.1. Μελέτη των επιπέδων μεθυλίωσης των CpG νησίδων της περιοχής FAM01 του γονιδίου FAM19A4 στις ηλικιακές ομάδες της μελέτης.....	58
3.2. Μελέτη των επιπέδων μεθυλίωσης των CpG νησίδων της περιοχής FAM01 του FAM19A4 γονιδίου στους ασθενείς της μελέτης, σύμφωνα με το βαθμό δυσπλασίας.....	59
3.3. Μελέτη των επιπέδων μεθυλίωσης των CpG νησίδων της περιοχής FAM01 του FAM19A4 γονιδίου στους ασθενείς της μελέτης και συσχέτιση με την απουσία ή παρουσία λοίμωξης από τον ιό HPV	60
3.4. Μελέτη των επιπέδων μεθυλίωσης των CpG νησίδων του FAM01 γονιδίου στους ασθενείς της μελέτης, σύμφωνα με τη διάγνωση ενός ή περισσότερων τύπων HPV.....	60
3.5. Μελέτη των επιπέδων μεθυλίωσης των CpG νησίδων της περιοχής FAM03 του FAM19A4 γονιδίου στις ηλικιακές ομάδες της μελέτης.....	61
3.6. Μελέτη των επιπέδων μεθυλίωσης των CpG νησίδων της περιοχής FAM03 του γονιδίου FAM19A4 στους ασθενείς της μελέτης, σύμφωνα με το βαθμό δυσπλασίας.....	62
3.7. Μελέτη των επιπέδων μεθυλίωσης των CpG νησίδων του FAM03 γονιδίου στους ασθενείς της μελέτης, σύμφωνα με την απουσία ή παρουσία διάγνωσης HPV	63
3.8. Μελέτη των επιπέδων μεθυλίωσης των CpG νησίδων της περιοχής FAM03 του γονιδίου FAM19A4 στους ασθενείς της μελέτης μας σε σχέση με την παρουσία απλής ή πολλαπλής λοίμωξης από στελέχη του ιού HPV	64
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4	66
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	66
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	67
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5	70
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	70
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	71

Κεφάλαιο 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

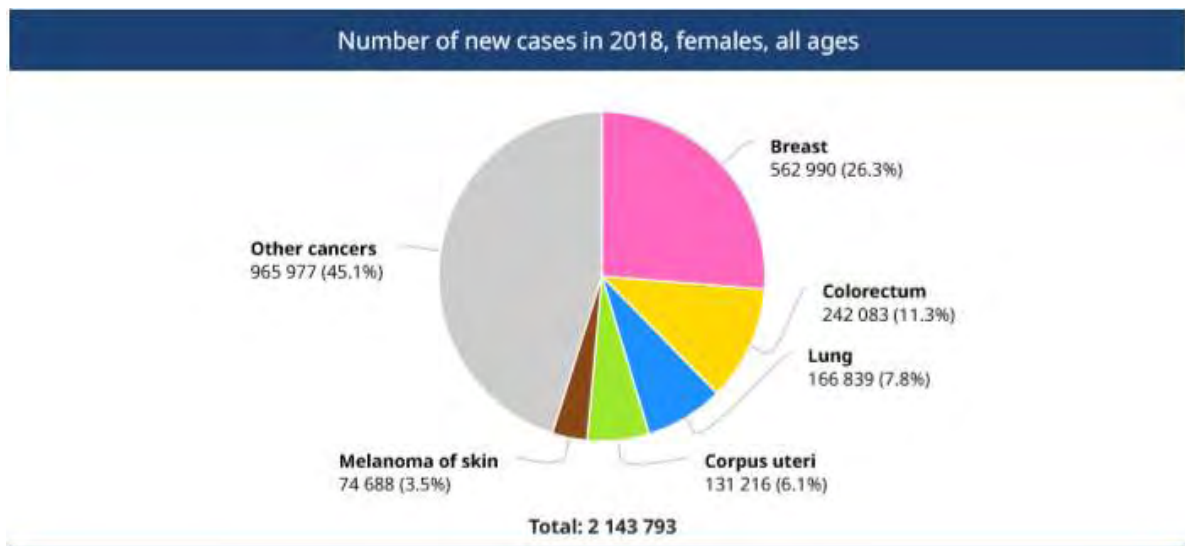
1.1. Καρκίνος του τραχήλου της μήτρας

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (World Health Organization, 2014), όταν στη ζώνη μετάπλασης του τραχήλου της μήτρας υπάρχει ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός των κυττάρων και κατά συνέπεια παθολογικός, τότε αναπτύσσεται καρκίνος του τραχήλου της μήτρας. Η λοίμωξη από τον ιό των ανθρωπίνων θηλωμάτων (Human Papilloma Virus, HPV), αποτελεί τον κυριότερο παράγοντα υπεύθυνο για την κακοήγη εξαλλαγή των συγκεκριμένων κυττάρων του τραχήλου. Έτσι όταν γίνει αυτή η ενσωμάτωση τα κύτταρα πλέον είναι καρκινικά και αντί να πεθάνουν στον συνήθη χρόνο απόπτωσης φυσιολογικών κυττάρων, συνεχίζουν και πολλαπλασιάζονται με αυξημένο ρυθμό με αποτέλεσμα να συσσωρεύονται και να δημιουργούν τον λεγόμενο όγκο.

Οι περισσότερες λοιμώξεις από τον HPV στον τράχηλο δεν προκαλούν συμπτώματα. Η λοίμωξη συνήθως διαρκεί 1-2 χρόνια και ξεφεύγει από μόνη της. Ωστόσο, τουλάχιστον 1-10 από αυτές τις μολύνσεις γίνεται πιο μακρόχρονη και μπορεί να εξελιχθεί σε προκαρκινικές αυξήσεις. Εάν αυτές οι αναπτύξεις δεν ανιχνευθούν και απομακρυνθούν έγκαιρα, μπορούν να αναπτυχθούν επί αρκετά χρόνια ή δεκαετίες σε καρκίνο του τραχήλου της μήτρας (WHO 2019).

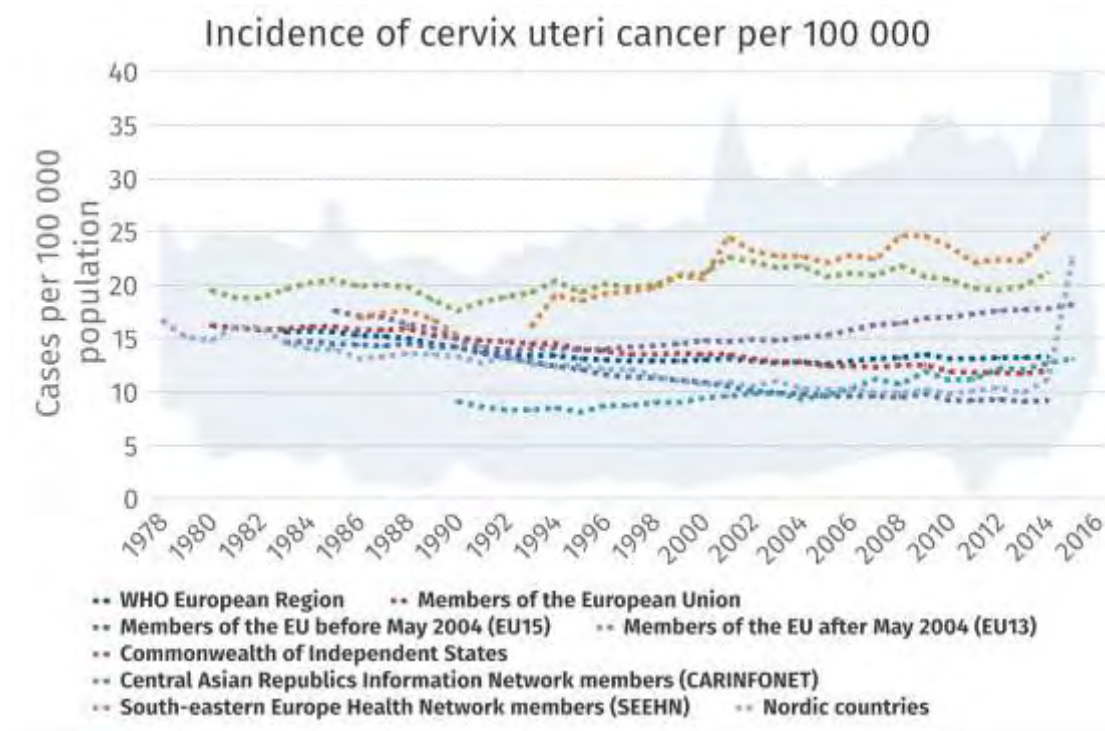
1.2. Επιδημιολογία

Σύμφωνα με τα στοιχεία του WHO (World Health Organization) μέχρι το έτος του 2019, ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας είναι ο 4ος πιο συνηθισμένος καρκίνος στις γυναίκες παγκοσμίως (Εικ.1), ενώ στην Ευρώπη φαίνεται να είναι ο έβδομος πιο συνηθισμένος στις γυναίκες, αντιπροσωπεύοντας περίπου το 3.8% του συνόλου. Είναι σχετικά σπάνιος στις ανεπτυγμένες χώρες που εφαρμόζονται προγράμματα προσυμπτωματικού ελέγχου (WHO 2019).



Εικόνα 1. Αριθμός νέων περιπτώσεων διαφόρων τύπων καρκίνων το 2018 σε θήλεα άτομα όλων των ηλικιών (WHO 2019).

Σχεδόν όλες οι περιπτώσεις ανάπτυξης καρκίνου του τραχήλου της μήτρας (99%) προκαλούνται από τη λοίμωξη των γεννητικών οργάνων με ογκογόνα στελέχη του ιού των ανθρωπίνων θηλωμάτων (HPV). Η τεράστια διαφορά μεταξύ των πληθυσμών στις αναπτυγμένες και στις λιγότερο αναπτυγμένες χώρες, όσον αφορά στη νοσηρότητα και στη θνησιμότητα, οφείλεται κατά κύριο λόγο στις διαφορές στον επιπολασμό της λοίμωξης από τον HPV, που συνδέονται με την κακή πρόσβαση και την κακή ποιότητα των υπηρεσιών πρόληψης και ελέγχου του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας στις μη αναπτυγμένες χώρες. Τα ποσοστά θνησιμότητας ποικίλλουν σημαντικά μεταξύ των χωρών και παρατηρείται αύξηση των ποσοστών στην Ανατολική Ευρώπη. Τα ποσοστά διακύμανσης του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας σε διάφορες χώρες απεικονίζονται στο παρακάτω διάγραμμα (Εικόνα 2)(WHO 2019).



Εικόνα 2. Επίπτωση του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας ανά 100 000 άτομα (WHO 2019)

Οι περισσότερες μελέτες διηθητικού καρκίνου έγιναν κατά τη διάρκεια της δεκαετίας του 1950 και του 1960, όταν η ασθένεια ήταν πιο διαδεδομένη, έτσι δεν είναι σαφές αν ισχύουν ακόμη οι ίδιοι παράγοντες κινδύνου. Επιδημιολογικά και εργαστηριακά δεδομένα υποδηλώνουν ότι ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας είναι αποτέλεσμα διαφόρων παραμέτρων.

Κύριος αιτιολογικός παράγοντας αποτελεί η λοίμωξη των νέων γυναικών από συγκεκριμένους τύπους ιών των ανθρωπίνων θηλωμάτων (HPV). Οι τραχηλικές αλλοιώσεις οδηγούν συνήθως σε χαμηλόβαθμες ενδοεπιθηλιακές αλλοιώσεις. Οι λοιμώξεις συνήθως υποστρέφουν σε διάστημα μερικών μηνών. Όταν η λοίμωξη εμμένει, όχι συχνά, οι αλλοιώσεις προχωρούν και προκαλούν υψηλόβαθμες αλλοιώσεις, αυξάνοντας τον κίνδυνο για ανάπτυξη καρκίνου του τραχήλου της μήτρας (Mark H. Schiffman M.D., M.P.H., Louise A. Brinton Ph.D.1995).

Ο υψηλός αριθμός ερωτικών συντρόφων και η έναρξη της σεξουαλικής δραστηριότητας νωρίς ηλικιακά ενοχοποιούνται επίσης συνεργατικά για τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του τραχήλου της μήτρας, χωρίς να είναι απόλυτα κατανοητό που επηρεάζουν οι παράγοντες αυτοί. Διατροφικοί παράγοντες ή η συνύπαρξη άλλων παθογόνων μικροοργανισμών συμβάλλουν επίσης στην ανάπτυξη χαμηλόβαθμων και υψηλόβαθμων αλλοιώσεων. Στους παράγοντες κινδύνου συγκαταλέγονται επίσης το κάπνισμα και η χρήση αντισυλληπτικών από του

στόματος, χωρίς ωστόσο να είναι σαφές εάν αυτοί οι παράγοντες λειτουργούν ανεξάρτητα από τον HPV ιό.

Αν και δεν είναι σαφές εάν η παρουσία άλλων παθογόνων μικροοργανισμών έχει υποστηρικτικό ή δραστικό ρόλο, φαίνεται να παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον η ανεξάρτητη επίδραση του HSV2 καθώς υπάρχουν ενδείξεις ότι αυτός ο ιικός παράγοντας μπορεί να αλληλοεπιδράσει με τον HPV ιό.

1.4. Τρόποι αντιμετώπισης

Η πρόληψη αποτελεί τον καλύτερο τρόπο αντιμετώπισης του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας. Η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη προσέγγιση διαλογής για την ανίχνευση χαμηλόβαθμων και υψηλόβαθμων αλλοιώσεων του τραχήλου της μήτρας είναι η συμβατική κυτταρολογική εξέταση του τραχήλου (Paptest), που συνοδεύεται από κολποσκόπηση και κατευθυνόμενη βιοψία σε γυναίκες που εμφανίζουν κυτταρολογικές αλλοιώσεις. Ωστόσο, μελέτες για την ευαισθησία και ειδικότητα της κυτταρολογικής εξέτασης, έδειξαν μειωμένη ευαισθησία της συμβατικής κυτταρολογίας και ποσοστό ευαισθησίας που κυμαίνεται μεταξύ 50-60%(Whiley-Liss.2003).

Η ανάπτυξη εμβολίων έναντι στελεχών του ιού HPV αποτελεί μία από τις σημαντικότερες εξελίξεις στην πρόληψη του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας. Τα εμβόλια που κυκλοφορούν στις μέρες μας στοχεύουν στα στελέχη HPV 16/18, που ευθύνονται για ποσοστό μεγαλύτερο του 70% για τους καρκίνους του τραχήλου της μήτρας. Τα μέχρι σήμερα δεδομένα δείχνουν ότι έχουν καταστεί ιδιαίτερα αποτελεσματικά έναντι των συγκεκριμένων τύπων του ιού (Partha Basu, Debjani Chowdhury 2009).

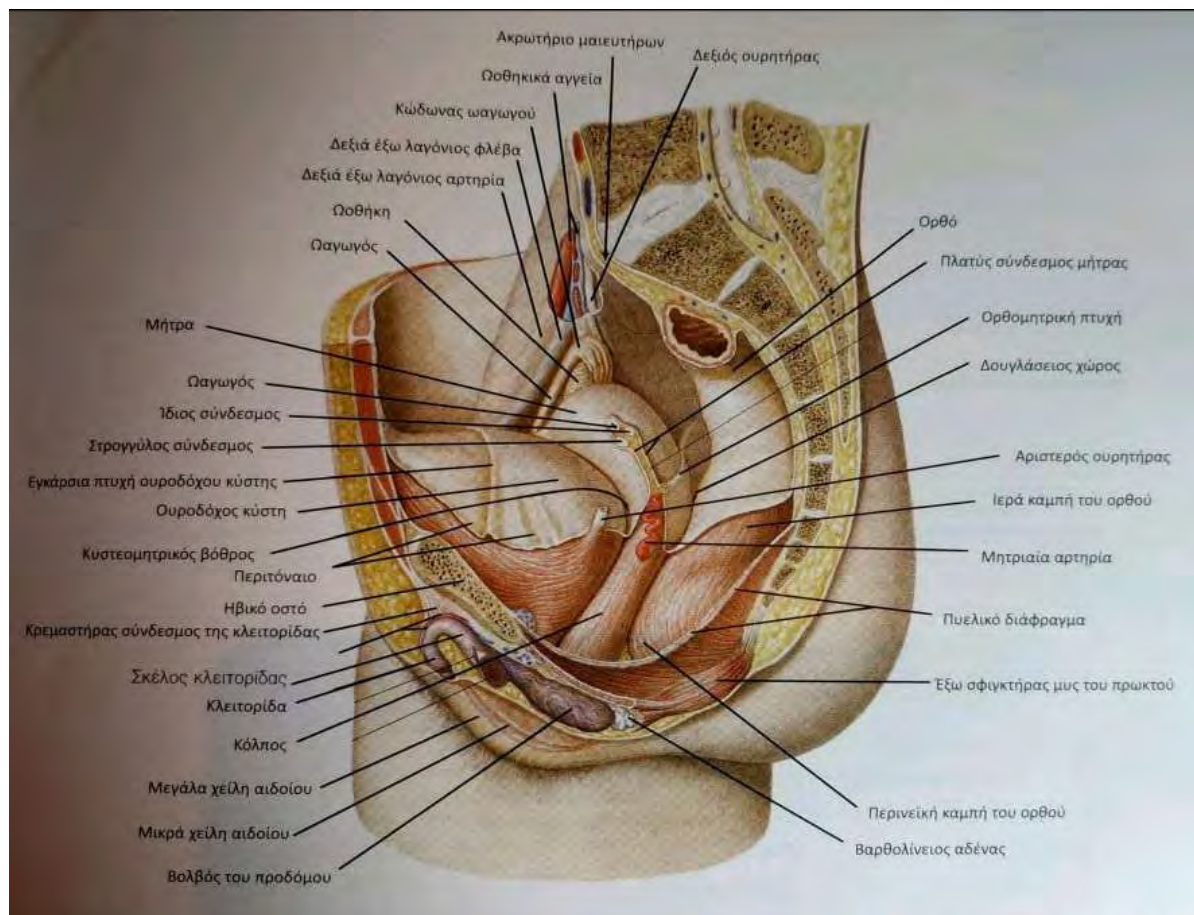
Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας(WHO), συστήνει σε όλα τα κορίτσια ηλικίας 9-14 ετών να λάβουν 2 δόσεις του εμβολίου. Μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στην Αυστραλία, το Βέλγιο, τη Γερμανία, τη Νέα Ζηλανδία, τη Σουηδία, το Ηνωμένο Βασίλειο και τις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής έδειξαν ταχείες μειώσεις της τάξεως έως και 90% στις λοιμώξεις σε έφηβες και νεαρές γυναίκες. Αρκετές χώρες προσφέρουν επίσης το εμβόλιο στα αγόρια προκειμένου να διασφαλίσουν την άμεση προστασία τους από κονδυλώματα των γεννητικών οργάνων και από μορφές καρκίνου που σχετίζονται με τον ιό HPV και επηρεάζουν τόσο τους άνδρες όσο και τις γυναίκες (WHO 2019). Τα εμβόλια για να έχουν την μέγιστη αποτελεσματικότητα θα πρέπει να χορηγούνται σε κορίτσια και νεαρούς ενήλικες πριν γίνουν σεξουαλικά ενεργοί (Whiley-Liss.2003).

1.5. Γεννητικό σύστημα θήλεος ατόμου

Το γεννητικό σύστημα θήλεος ατόμου αποτελείται από την πύελο, τα έσω και τα έξω γεννητικά όργανα.

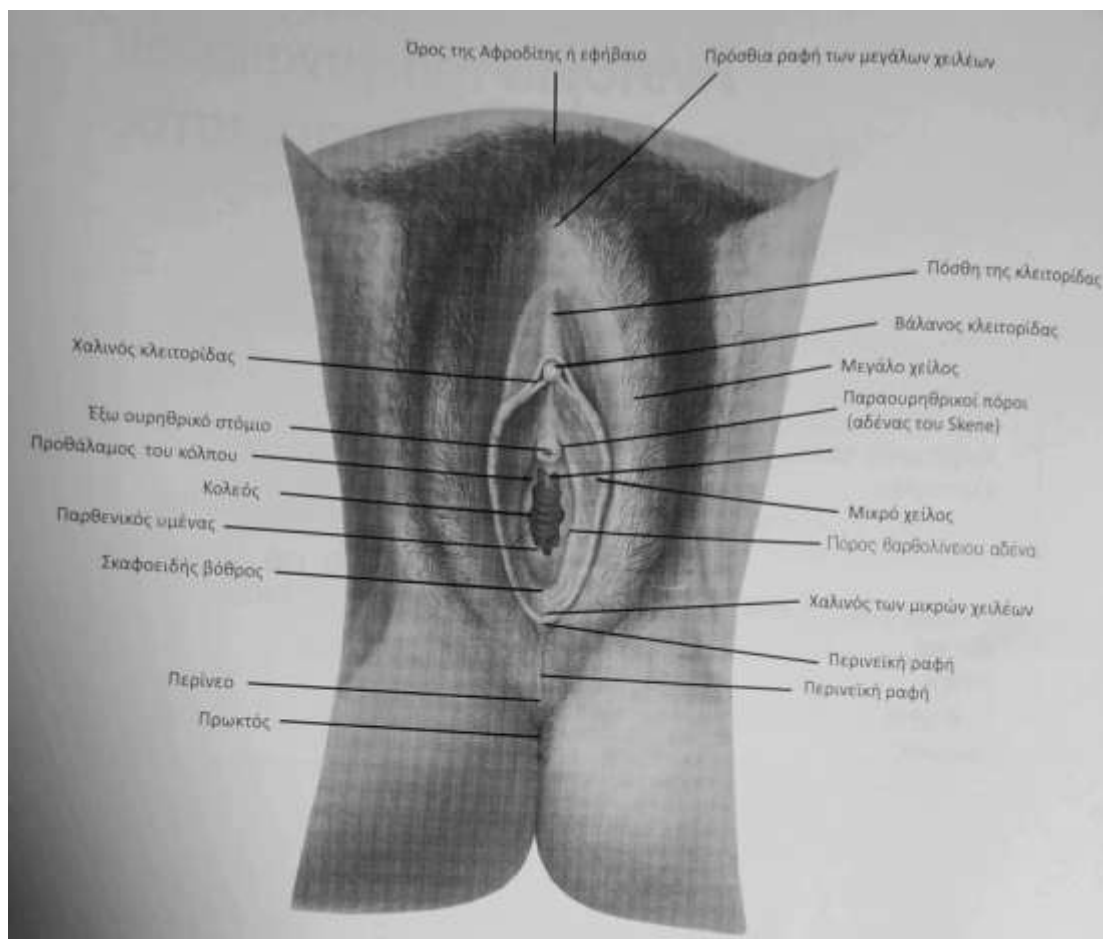
Πύελος: Αποτελείται από την μείζων-ψευδή πύελο και την ελάσσων-αληθή πύελο. Η μείζων στηρίζει τα σπλάχνα της κάτω κοιλίας, το έμβρυο μετά τον 3ο μήνα και διευκολύνει την καθοδήγησή του προς την ελάσσωνα πύελο κατά τον τοκετό. Η ελάσσων αποτελείται από το επίπεδο εισόδου, το επίπεδο ευρυχωρίας, το επίπεδο στενού και το επίπεδο εξόδου.

Έσω γεννητικά όργανα: Στα έσω γεννητικά όργανα περιλαμβάνονται η μήτρα, οι ωοθήκες, οι σάλπιγγες-ωαγωγοί και ο κόλπος-κολεός. Η μήτρα είναι ένα κοίλο όργανο με λείες μυϊκές ίνες που έχει αποιεϊδές σχήμα και βρίσκεται μεταξύ της ουροδόχου κύστης και του ορθού. Ενώ γενικά ποικίλει σε μέγεθος ανάλογα με την ηλικία της γυναίκας. Αποτελείται από το σώμα, τον τραχήλο και τον ισθμό. Το μυομήτριο είναι αυτό που αποτελεί τον παχύτερο χιτώνα της μήτρας και το ενδομήτριο αποτελεί τον βλεννογόνο της μήτρας. Από το ενδομήτριο γίνεται η λεγόμενη έμμηνος ρύση. Οι σάλπιγγες είναι υπεύθυνες για την λήψη και τη μεταφορά του ωαρίου από την ωοθήκη προς την μήτρα δημιουργώντας το κατάλληλο περιβάλλον για την γονιμοποίηση. Αποτελούνται από το διάμεσο τμήμα, τον ισθμό, τη λήκυθο και τον κώδωνα. Οι ωοθήκες είναι δύο και αποτελούν τους γεννητικούς αδένες της γυναίκας. Το μέγεθος τους επηρεάζεται από τις ορμόνες που παράγονται στις διάφορες φάσεις του εμμηνορρυσιακού κύκλου και επίσης από την χορήγηση ορμονικών σκευασμάτων. Ο κόλπος είναι ένας ινομυώδης, κυλινδρικός σωλήνας ο οποίος εκτείνεται μεταξύ του τραχήλου της μήτρας και του αιδοίου. Αποτελείται από το κάτω άκρο (στόμιο), το μέσο τμήμα (σώμα) και το άνω άκρο (θόλος) (Εικόνα 3).



ος 2016).

Έξω γεννητικά όργανα: Τα έξω γεννητικά όργανα είναι το εφηβαίο, τα μεγάλα και μικρά χείλη, η κλειτορίδα, ο πρόδρομος του κόλπου, οι βολβοί του πρόδρομου και οι βαρθολίνειοι αδένες (Διάλεξη Χριστίνα Μεσσήνη. Ανατομία του γυναικείου γεννητικού συστήματος. Οκτώβριος 2018)

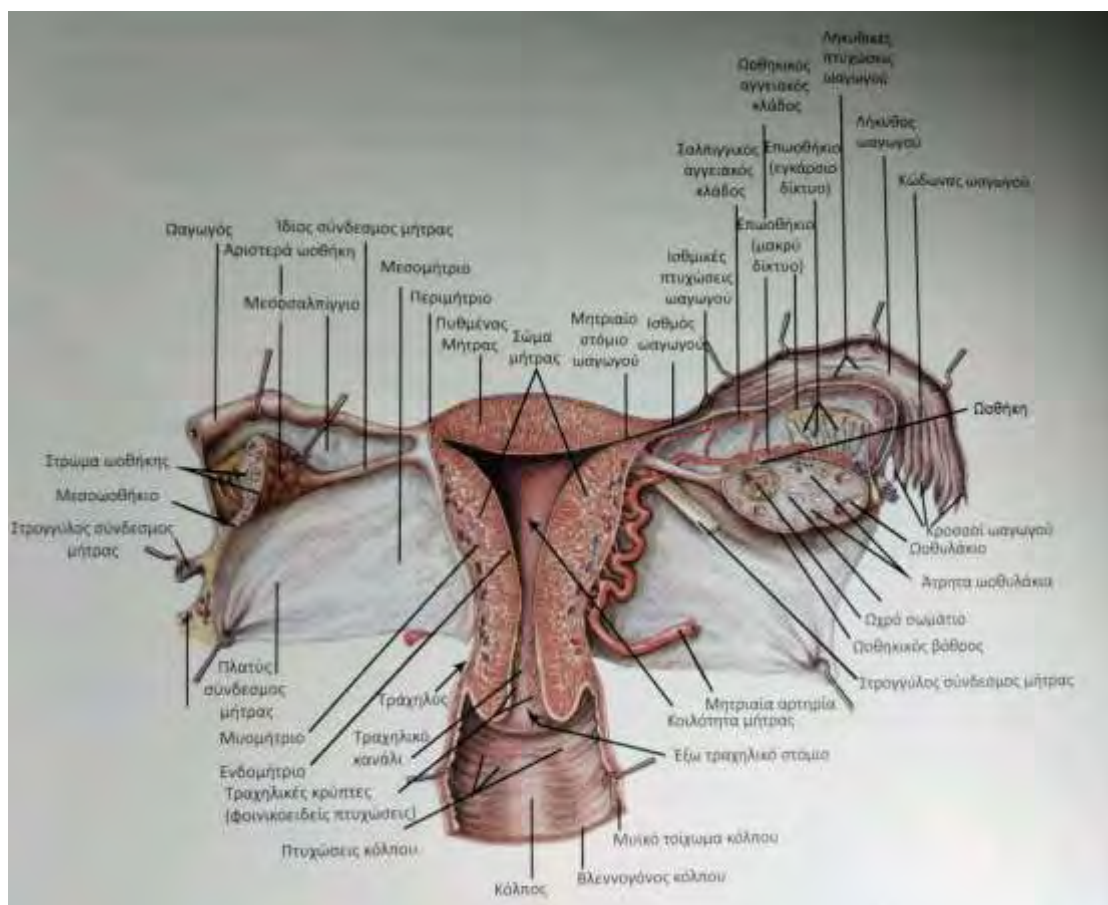


Εικόνα 4. Ανατομία εξωτερικού γεννητικού συστήματος θήλεος ατόμου (Δαυίδ Ρούσσος 2016)

Ο τράχηλος αποτελεί το κατώτερο τμήμα της μήτρας που προεξέχει στον άνω κόλπο. Ο κόλπος συγχωνεύεται περιφερειακά και λοξά γύρω από το μακρινό τμήμα του τραχήλου, χωρίζοντας τον σε ανώτερο, ανώμαλο και κατώτερο κολπικό τμήμα. Είναι κυλινδρικού σχήματος και η κανονική του θέση είναι ελαφρώς γωνιακή προς τα κάτω και προς τα πίσω (Alex Ferenczy, 1997). Συνέχεται με το σώμα της μήτρας και αποτελείται από 2 τμήματα, α) το κολπικό (portio vaginalis) που προβάλλει μέσα στον θόλο του κόλπου και β) το έξω κολπικό (exocervix). Ο αυλός του τραχήλου παρουσιάζει ένα στένωμα στο ύψος του έσω τραχηλικού στομίου και ένα στο ύψος του έξω τραχηλικού στομίου το οποίο ανοίγει προς τον κόλπο. Σε γυναίκες με μη φυσιολογικό τοκετό το έξω τραχηλικό στόμιο είναι στρόγγυλο ενώ μετά τον τοκετό παρουσιάζει εγκάρσιο γραμμοειδές σχήμα.

Η κολπική επιφάνεια του τραχήλου αποτελείται από ινομυώδη ιστό και ο αυλός του επενδύεται από υψηλό μονόστιβο κυλινδρικό βλεννοεκκριτικό επιθήλιο. Ο εξωτράχηλος, που περιλαμβάνει την εξωτερική επιφάνεια του τραχήλου, καλύπτεται από μη κερατινοποιημένο πολύστιβο πλακώδες επιθήλιο. Η περιοχή στην οποία ενώνονται τα δύο είδη του επιθηλίου

καλείται ζώνη μετάπτωσης.. Η περιοχή αυτή χαρακτηρίζεται από ταχεία κυτταρική διαίρεση και εδώ αναπτύσσεται το 95% των καρκίνων του τραχήλου της μήτρας (Εγχειρητική στη Μαιευτική και Γυναικολογία, Δαβίδ Ρούσσο, Ιωάννης Καλογιαννίδης, Απόστολος Μαμόπουλος, Γεώργιος Μαυροματίδης, Νικόλαος Πράπας. εκδ. Τζιόλα, p.26)



Εικόνα 5. Ανατομία του τραχήλου της μήτρας (Δαβίδ Ρούσσος 2016)

1.6. Φυσιολογία του τραχήλου της μήτρας

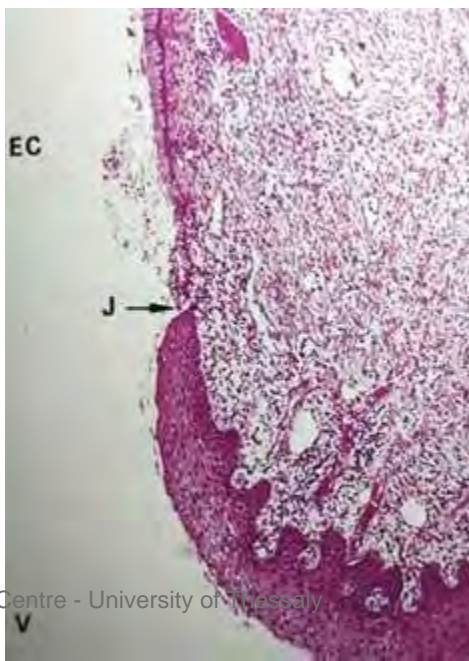
Ο τράχηλος είναι ένας ινομυώδης σχηματισμός που αποτελείται κυρίως από στρώμα κολλαγόνου το οποίο βρίσκεται μέσα σε έδαφος πρωτεϊνογλυκανών. Οι μεταβολές που επιδέχεται ο τράχηλος λόγω της επίδρασης των οιστρογόνων και της προγεστερόνης αφορούν

τόσο στην εκκριτική του λειτουργία όσο και στη μορφολογία του τραχηλικού στομίου. Οι κυριότερες μεταβολές συμβαίνουν κατά την κύηση και κατά το μέσον του κύκλου. Γνωρίζοντας ότι τα οιστρογόνα έχουν την τάση να διευρύνουν το τραχηλικό στόμιο και η προγεστερόνη να μειώνει το εύρος του, βλέπουμε ότι το μεγαλύτερο εύρος του τραχηλικού στομίου παρατηρείται προς το τέλος της ωοθυλακικής φάσης του κύκλου, δηλαδή περίπου 2-3 μέρες πριν την ωοθυλακιορρηξία, όπου επίσης ο τράχηλος διογκώνεται και γίνεται πιο μαλακός με αποτέλεσμα να μετακινείται πιο εύκολα κατά την ψηλάφηση.

Λόγω των μεγάλων συγκεντρώσεων της οιστραδιόλης που παρατηρούνται στους ιστούς του τραχήλου προς το τέλος της ωοθυλακικής φάσης βλέπουμε μεταβολές στην ανακύκλωση του κολλαγόνου και των μορίων των πρωτεϊνογλυκανών και βλέπουμε ότι σχηματίζονται νέοι τύποι πρωτεϊνογλυκανών. Οι τελευταίοι τύποι περιέχουν περισσότερο υαλουρονικό οξύ και λιγότερη δερματίνη. Αυξάνοντας έτσι το υδρόφιλο υαλουρονικό οξύ προκαλείται διασπορά των ινιδίων του κολλαγόνου που μειώνει τον σχηματισμό δεσμίδων ώστε να αυξάνεται η ελαστικότητα του ιστού. Η επίδραση της προγεστερόνης εξουδετερώνει τη δράση των οιστρογόνων και τόσο κατά την ωχρινική φάση του κύκλου όσο και κατά την κύηση, όπου οι συγκεντρώσεις της προγεστερόνης στους ιστούς είναι μεγάλες, ελαττώνεται η διάσπαση και η ανακύκλωση του κολλαγόνου, ενώ αναστέλλεται η σύνθεση της κολλαγενάσης, που διασπά το κολλαγόνο (Ιωάννης Ε. Μεσσήνης, 2010).

1.7. Ιστολογία του τραχήλου της μήτρας

Ο ενδοτραχηλικός σωλήνας (EC), επενδύεται από υψηλό μονόστιβο κυλινδρικό βλεννοεκκριτικό επιθήλιο. Εκεί που ο τράχηλος εκτίθεται στο πιο εχθρικό περιβάλλον του κόλπου (V), είναι επενδυμένος με παχύ στρωματοποιημένο πλακώδες επιθήλιο. Η διασταύρωση (J) που βρίσκεται ανάμεσα στο κολπικό και ενδοτραχηλικό επιθήλιο, είναι απότομη και συνήθως βρίσκεται στο εξωτερικό τμήμα, το σημείο δηλαδή στο οποίο το ενδοτραχηλικό κανάλι ανοίγει προς τον κόλπο (Εικόνα 6).



Εικόνα 6. Ο ενδοτραχηλικός σωλήνας EC. Η διασταύρωση (J) που βρίσκεται ανάμεσα στο κολπικό και ενδοτραχηλικό επιθήλιο και στο πιο εχθρικό περιβάλλον του κόλπου (V) (P. J. Deakin. 1987).

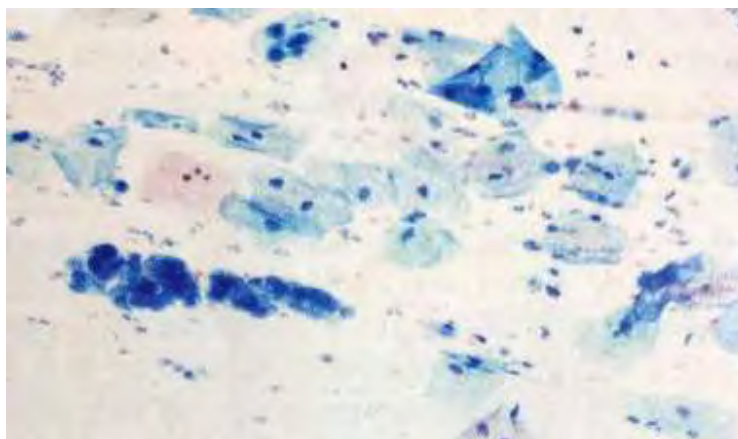
Ο εξωτράχηλος, δηλαδή το τμήμα του τραχήλου που προβάλλει στον κόλπο, καλύπτεται από πολύστιβο πλακώδες επιθήλιο. Η ζώνη μετάπτωσης πριν από την ήβη και μετά την εμμηνόπαυση βρίσκεται εντός του τραχήλου, ενώ κατά την αναπαραγωγική περίοδο του θήλεος βρίσκεται ακριβώς έξω από το έξω στόμιο του τραχήλου (Michael H. Ross. Wojciech Pawlina.2013)



Εικόνα 7. Φωτογραφία τραχήλου της μήτρας από μετεμμηνοπαυσιακή γυναίκα. Η επιφάνεια του τραχήλου καλύπτεται από πολύστιβο πλακώδες επιθήλιο (SSE, stratified squamous epithelium), το οποίο είναι η συνέχεια του επιθηλίου που επενδύεται στον κόλπο. Στην είσοδο του τραχηλικού σωλήνα συμβαίνει απότομη μετάβαση από το πολύστιβο πλακώδες επιθήλιο σε μονόστιβο κυλινδρικό επιθήλιο (SCE, simple columnar epithelium). Κατά μήκος του τραχηλικού σωλήνα φαίνονται οι βλεννοεκκριτικοί αδένες του τραχηλικού σωλήνα. Οι αδένες συχνά μετατρέπονται σε κύστες Naboth ως αποτέλεσμα κατακράτησης της εκκρινόμενης βλέννας λόγω απόφραξης τους στομίου των αδένων (Michael H. Ross. Wojciech Pawlina.2013).

1.8. Αλλοιώσεις και σταδιοποίηση

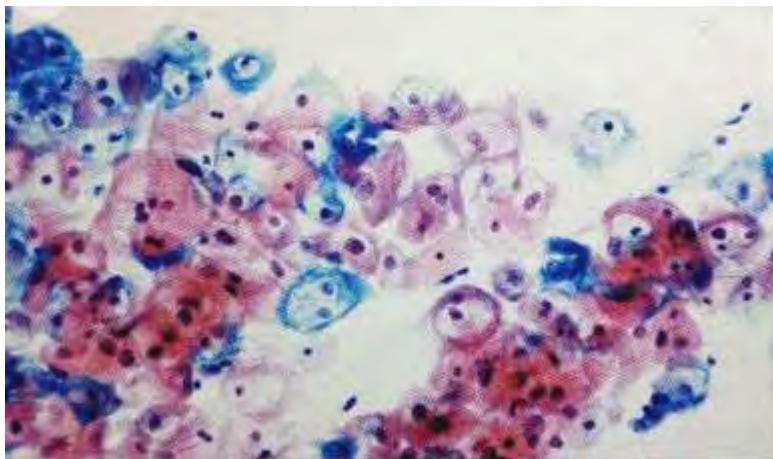
Ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας μπορεί να προληφθεί. Η διηθητική αυτή νόσος



έπεται μιας ανιχνεύσιμης προδιηθητικής νόσου, γνωστής ως τραχηλική ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία (CIN). Για τον εντοπισμό των αλλοιώσεων γίνεται λήψη τραχηλικού επίχρισματος το οποίο και εξετάζεται κυτταρολογικά. Σε ένα φυσιολογικό τραχηλικό επίχρισμα, βλέπουμε φυσιολογικά επιπολής και διάμεσα πλακώδη επιθηλιακά κύτταρα μαζί με μια σειρά από κυλινδρικά αδενικά επιθηλιακά κύτταρα. Διακρίνονται ερυθρά αιμοσφαίρια και ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρρηνα (Εικόνα 8).

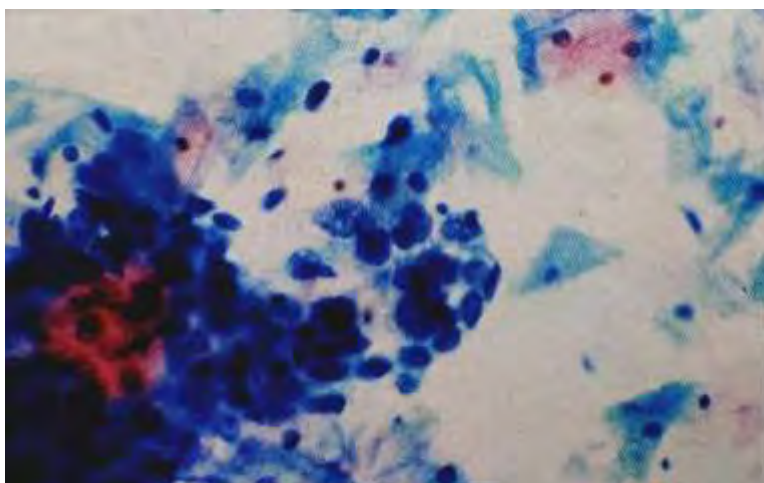
Εικόνα 8. Φυσιολογικό τραχηλικό επίχρισμα (Αντώνης Γκαράς.2008)

Στην επόμενη εικόνα (Εικόνα 8.2), απεικονίζονται πυρηνικές αλλαγές από HPV λοίμωξη στα επιπολής και διάμεσα επιθηλιακά πλακώδη κύτταρα. Σε αυτό το επίχρισμα παρατηρούνται κοιλοκύτταρα και διπύρρηνα κύτταρα. Επιπλέον, οι πυρήνες παρουσιάζουν διόγκωση, υπερχρωμία και ελαφριά ανωμαλία αποτελώντας την οριακή πυρηνική αλλαγή.



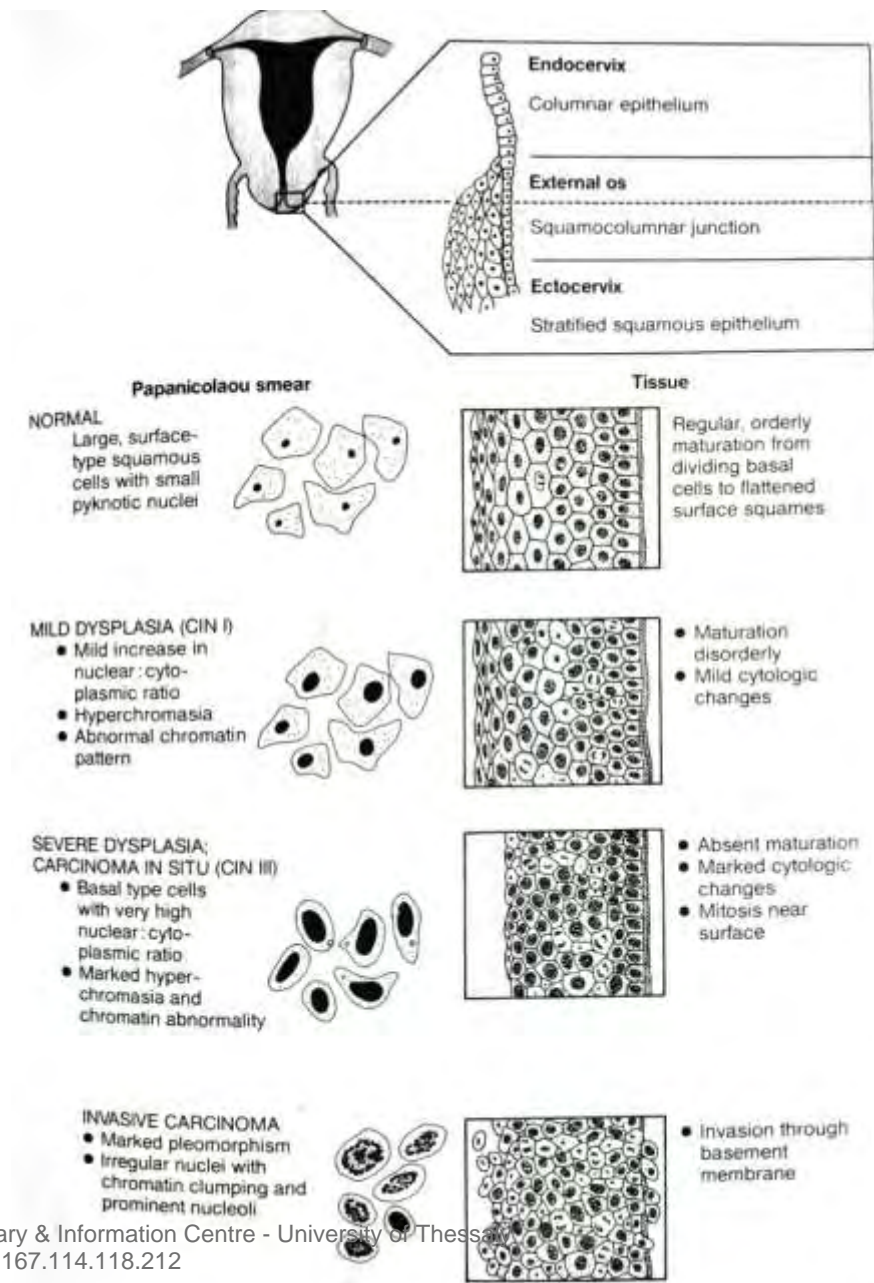
Εικόνα 8.2. Πυρηνικές αλλαγές-HPV λοίμωξη. (Αντώνης Γκαράς.2008)

Βαριά δυσκαρύωση σε επίχρισμα, παρατηρείται όταν τα κύτταρα έχουν μεγάλο αριθμό διογκωμένων πυρήνων σε σχέση με το κυτταρόπλασμα. Οι πυρήνες ποικίλουν σε μέγεθος και σχήμα και έχουν τραχιά ανώμαλη χρωματίνη. Σε μερικά κύτταρα παρατηρούνται πυρήνια. (Εικόνα 8.3) (Αντώνης Γκαράς.2008).



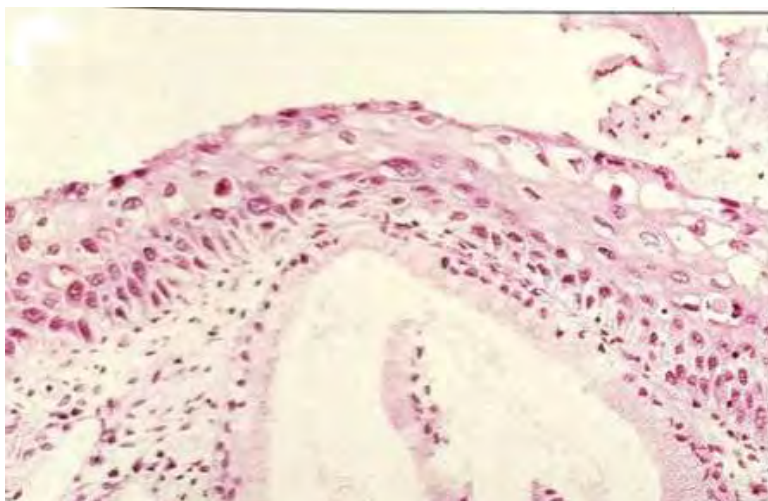
Εικόνα 8.3. Βαριά δυσκαρύωση (Αντώνης Γκαράς.2008).

Η δυσπλασία αποτελεί αναστρέψιμη αλλοίωση, αλλά όσο μεγαλύτερος ο βαθμός της δυσπλασίας τόσο μειώνονται οι πιθανότητες αναστρεψιμότητας. Το 25% των ασθενών με καρκίνωμα *in situ*, αναπτύσσει διηθητικό καρκίνωμα σε 5 χρόνια αν αφαιρεθεί χωρίς θεραπεία. Το χρονικό διάστημα για την ανάπτυξη της δυσπλασίας είναι μεταβλητό. Ο διάμεσος χρόνος ανάπτυξης καρκινώματος είναι τα 7 έτη για ήπια δυσπλασία και 1 έτος για σοβαρή δυσπλασία.



Εικόνα 9. Πλακώδης επιθηλιακή δυσπλασία και καρκίνωμα του τραχήλου της μήτρας. Απεικονίζονται τα μορφολογικά κριτήρια που χρησιμοποιούνται για το χαρακτηρισμό του βαθμού δυσπλασίας (Parakrama Chandreasoma,1991).

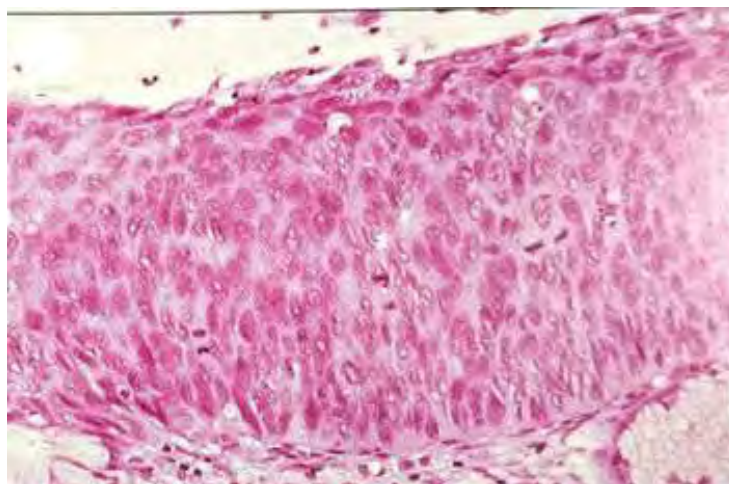
Σε CIN I δυσπλασία με κοιλοκύτταρα, παρατηρούνται κύτταρα στη βασική στιβάδα του μεταπλαστικού πλακώδους επιθηλίου διογκωμένα και ελαφρώς πολυμορφικά. Υπάρχουν άτυποι



πυρήνες σε όλες τις στιβάδες του επιθηλίου και τα κοιλοκύτταρα παρουσιάζουν περιπυρηνική κυτταροπλασματική διαύγηση (Εικόνα 10).

Εικόνα 10. Επίχρισμα με CIN I δυσπλασία και κοιλοκύτταρα ((Αντώνης Γκαράς 2008)

Σε επίχρισμα με υψηλόβαθμη δυσπλασία (CIN III) δεν υπάρχει καμία επιθηλιακή στιβαδωτή δομή και παρατηρείται ελάχιστη κυτταροπλασματική ωρίμανση. Τα επιθηλιακά κύτταρα έχουν υψηλή αναλογία πυρήνα-κυτταροπλάσματος και παρατηρείται ανώμαλα διασκορπισμένη πυρηνική χρωματίνη και μιτώσεις σε όλα τα επίπεδα επιθηλίου (Εικόνα X) (Αντώνης Γκαράς 2008).



Εικόνα 11. Επίχρισμα με υψηλόβαθμη δυσπλασία (CIN III) (Αντώνης Γκαράς 2008)

Η 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 IIA	Η συμμετοχή περιορίζεται στα δύο τρίτα του ανώτερου κόλπου χωρίς παραμετρική εμπλοκή
Στάδιο IIA1	Διηθητικό καρκίνωμα <4 cm σε μεγαλύτερη διάσταση
Στάδιο IIA2	Διηθητικό καρκίνωμα >4 cm σε μεγαλύτερη διάσταση
Στάδιο IIB Στάδιο III	με παραμετρική εμπλοκή Το καρκίνωμα περιλαμβάνει το κατώτερο τρίτο του κόλπου και / ή εκτείνεται στο πυελικό τοίχωμα και / ή προκαλεί υδρόφιψη 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. Σταδιοποίηση κατά FIGO (2018).

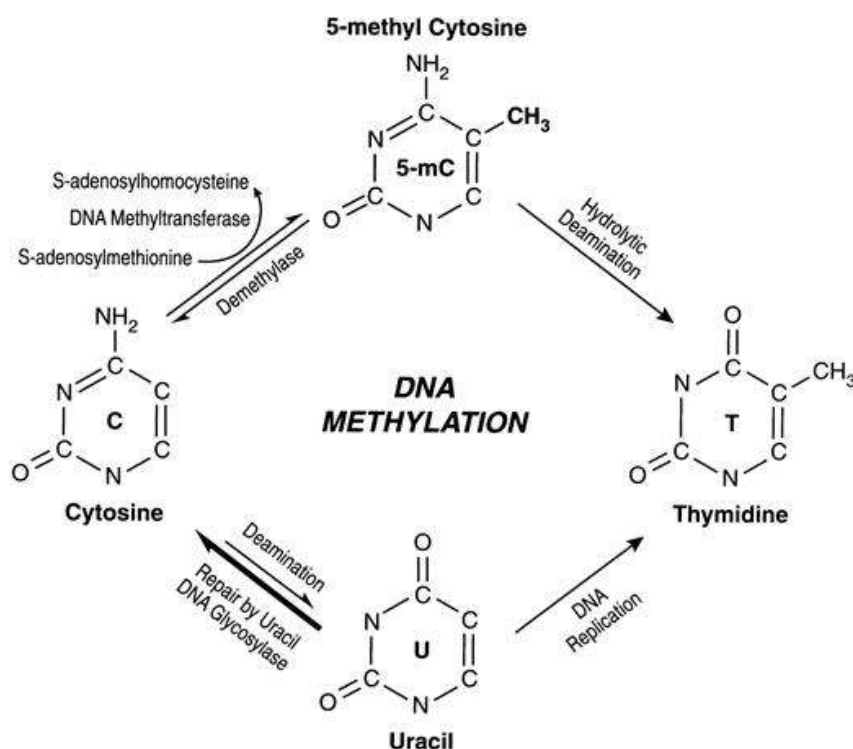
1.9. Επιγενετική

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.

Η μεθυλίωση του DNA είναι μία από τις πιο ευρέως μελετημένες επιγενετικές μεταβολές μαζί με τις τροποποιήσεις των ιστονών και τη μεταβολή της έκφρασης των miRNA μορίων. Οι επιγενετικές αυτές μεταβολές είναι υπεύθυνες για γονιδιακά μοτίβα έκφρασης τα οποία ρυθμίζονται ανάλογα με τον κυτταρικό ή ιστολογικό τύπο. Οποιαδήποτε αλλαγή σε αυτά μπορεί να προκαλέσει ασθένεια και συγκεκριμένους τύπους καρκίνου (Eva Jablonka. 2002). Η μεθυλίωση του DNA παρατηρείται σε CpG νησίδες στην περιοχή των υποκινητών των γονιδίων κυρίως και περιλαμβάνει την προσθήκη μιας μεθυλομάδας στη θέση άνθρακα-5 του δακτυλίου κυτοσίνης, μετατρέποντας το νουκλεοτίδιο κυτοσίνης σε 5-μεθυλοκυτοσίνη (Εικόνα 12). Αυτή η αντίδραση καταλύεται από το ένζυμο DNA μεθυλοτρανσφεράση,

Η μεθυλίωση του γονιδιώματος του κυττάρου αποτελεί συχνά παρατηρούμενο επιγενετικό φαινόμενο στην καρκινογένεση του τραχήλου της μήτρας (Gynec Wentzensen N, 2009) και ελέγχεται στενά από συγκεκριμένα ένζυμα (DNA μεθυλοτρανσφεράσες) και ρυθμιστικούς παράγοντες (Attila T. Lorincz.2016). Σημαντικός αριθμός ογκοκατασταλτικών γονιδίων έχει βρεθεί να είναι μεθυλιωμένα στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας. Τα επίπεδα μεθυλίωσης ορισμένων γονιδίων όπως CADM1, MAL, mir124-2, JAM3, TERT, C13ORF, EPB41L3, ANKRD18CP, GFRA1, CDH6, LHX8, GATA4, PRDM14 και FAM19A4 σε τραχηλικά αποξέσματα φαίνεται να αυξάνονται ανάλογα με την βαρύτητα των τραχηλικών αλλοιώσεων ή του καρκίνου. Η ανάλυση του βαθμού μεθυλίωσης γονιδίων όπως τα CADM1,

MAL, mir124-2 και FAM19A4, έχει βρεθεί ότι επιτρέπει την ανίχνευση υψηλόβαθμων δυσπλασιών με μακρόχρονη προηγούμενη λοίμωξη από hrHPV (Bierkens M 2013) (De Strooper LMA 2014).



Εικόνα 12. Σχηματική αναπαράσταση των βιοχημικών οδών για την μεθυλίωση κυτοσίνης, απομεθυλίωση και μεταλλαξιγένεση κυτοσίνης (Rakesh Singal 1999).

1.10. Μεθυλίωση και FAM19A4

Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες έχει βρεθεί ότι τα επίπεδα μεθυλίωσης του ογκοκατασταλτικού γονιδίου FAM19A4 είναι εξαιρετικά υψηλά σε τραχηλικές αποξέσεις με καρκίνωμα (Attila T. Lorincz.2016, Br J Cancer.2016). Η ανάλυση του βαθμού μεθυλίωσης του γονιδίου FAM19A4 φαίνεται να επηρεάζεται από την ηλικία, ευαισθησία της τάξης (75.8-88.3%) και ειδικότητα (62.1-67.0%) για \geq CIN III σε γυναίκες ηλικίας άνω των 30 ετών, σε σύγκριση με μικρότερης ηλικίας γυναίκες όπου για \geq CIN III η ευαισθησία δεν ξεπερνά σε ποσοστό το 50% αλλά η ειδικότητα φτάνει σε ποσοστό το 81.7% (Luttmer R 2016).

Σε πρόσφατη μελέτη, σε δείγματα τραχήλου της μήτρας από 215 γυναίκες που είχαν προσβληθεί από hrHPV, ανιχνεύθηκε αυξανόμενο επίπεδο μεθυλίωσης του γονιδίου FAM19A4

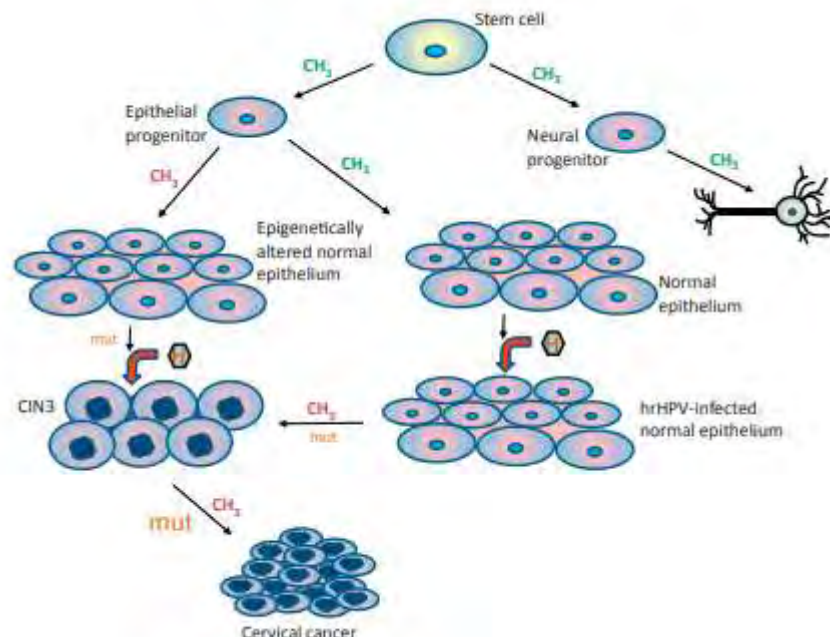
καθώς αυξανόταν ο βαθμός δυσπλασίας και προέκυψε παράλληλα ότι τα επίπεδα μεθυλίωσης στις ομάδες HPV16/18 ήταν υψηλότερα σε σχέση με άλλες ομάδες hrHPV (Bu Q 2018).

1.11. Το γονίδιο FAM19A4

Το FAM19A4, αποτελεί συντομογραφία για μια οικογένεια με ομοιότητα αλληλουχίας 19 (Chemokine-Χημιοκίνη με μοτίβο C-C) μέλος A4. Το γονίδιο κωδικοποιεί μια εκκριτική πρωτεΐνη που εκφράζεται σε χαμηλά επίπεδα σε φυσιολογικούς ιστούς. Οι βιολογικές λειτουργίες του FAM19A4 παραμένουν προς προσδιορισμό και ο πιθανός υποδοχέας ή υποδοχείς του, είναι ακόμα ασαφής (Y. Tom Tang, 2004).

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 αποσιώπησής του μέσω του μηχανισμού υπερμεθυλίωσης των CpG νησίδων του υποκινητή του.

Ως συνδέτης κυτοκίνης του FPR1, το FAM19A4 μπορεί να γίνει χημειοελκυστικό για τα μακροφάγα, να προάγει την φαγοκυττάρωση έναντι ζυμομάνης (Zymosan-προσδέτης που βρίσκεται στην επιφάνεια μυκήτων), και να αυξήσει την απελευθέρωση ROS (Reactive Oxygen Species). Επιπλέον ενισχύει την επικοινωνία μεταξύ κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος, το οποίο είναι χρήσιμο στην κατανόηση της νόσου και της ανοσίας.



Εικόνα 13. Μεθυλίωση του DNA. Σωματικές μεταλλάξεις και λοιμώξεις από HPV ιό κατά τη διάρκεια ανάπτυξης φυσιολογικών επιθηλιακών ιστών και πρόοδος σε καρκίνο του τραχήλου της μήτρας. Η φυσιολογική διαδικασία μεθυλίωσης φαίνεται κατά μήκος των βελών με CH₃ σε πράσινο χρώμα, ενώ η μη φυσιολογική μεθυλίωση στα CH₃ με κόκκινο χρώμα. Τα μεταλλαξογόνα γεγονότα (mut), παρουσιάζονται ως ένα μέσο φορτίο μετάλλαξης που υπολογίζεται από μελέτες προσδιορισμού αλληλουχίας του συνόλου των εξονίων (exome-sequencing studies) (Lau and Lorincz). Τα εξάγωνα με το γράμμα H και τα κόκκινα βέλη δείχνουν τα κύρια βήματα της λοίμωξης από υψηλού κινδύνου HPV (hrHPV) και τις φαινοτυπικές επιδράσεις (Attila T. Lorincz.2016).

1.12. Θεραπεία

Ανάλογα το στάδιο που βρίσκεται η νόσος δίνεται και η κατάλληλη θεραπεία, όπως επίσης και ανάλογα με την ηλικία του ατόμου, αν έχει τεκνοποιήσει ή όχι. Η χειρουργική θεραπεία εφαρμόζεται στο στάδιο στο οποίο ο καρκίνος έχει προχωρήσει πέραν του τραχήλου και περιλαμβάνει διήθηση μέχρι και στα άνω 2/3 του κόλπου και τα παραμήτρια αλλά όχι στο πλάγιο τοίχωμα.

Η ακτινοθεραπεία εφαρμόζεται στα πρώτα στάδια των αλλοιώσεων και σε νέα άτομα εφόσον οι αγγειακοί και λεμφικοί χώροι δεν έχουν διηθηθεί. Ο καρκίνος μπορεί να αντιμετωπιστεί όπως ο καρκίνος *in situ*, δηλαδή με ευρεία κωνοειδή εκτομή. Σε άτομα μεγαλύτερης ηλικίας που έχουν τεκνοποιήσει, η αντιμετώπιση στο 1^ο στάδιο μπορεί να γίνει με απλή ολική υστερεκτομή. Η αφαίρεση των ωοθηκών ενδέχεται να μην απαραίτητη εφόσον ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας δεν είναι ορμονοεξαρτώμενος, εκτός εάν η γυναίκα είναι ηλικίας άνω των 45 ετών ή μετεμμηνοπαυσιακή. Αν υπάρξει διήθηση στους αγγειακούς και λεμφικούς χώρους γίνεται ολική υστερεκτομή συμπεριλαμβανομένου και ολικής αφαίρεσης της μήτρας, των παραμητρίων, των λεμφαδένων, της περιοχής του θυροειδούς νεύρου και όλων των λαγονίων αγγείων. Τα τελευταία χρόνια γίνεται προσπάθεια εφαρμογής λιγότερων χειρουργικών επεμβάσεων, έτσι στα πρώτα στάδια δοκιμάζεται η λαμπαρασκοπική λεμφαδεκτομή των πυελικών λεμφαδένων και η κολπική ριζική τραχηλεκτομή που επιτρέπει τη διατήρηση της γονιμότητας της γυναίκας.

Συνήθως μετά από χειρουργική επέμβαση συνιστάται και συμπληρωματική ακτινοθεραπεία στην οποία οι κυριότερες επιπλοκές είναι η δημιουργία συριγγίων και οι αιμορραγική κυστίτιδα, πρωκτίτιδα, σμιγμοειδίτιδα και ο αποφρακτικός ειλεός. Η σοβαρότερη

επιπλοκή της ριζικής υστερεκτομής είναι η στένωση ή τα συρίγγια του ουρητήρα, η κακή λειτουργία της ουροδόχου κύστης λόγω της διατομής των νεύρων που διέρχονται μετά από τους τραχηλικούς και ιερομητρικούς συνδέσμους και η θρομβοφλεβίτιδα και πνευμονική εμβολή οι οποίες είναι λιγότερο συχνές επιπλοκές αλλά και πιο επικίνδυνες.

Η χημειοθεραπεία στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας έχει αρχίσει να εφαρμόζεται ευρύτερα τα τελευταία χρόνια. Μπορεί να γίνει είτε πριν από την χειρουργική επέμβαση είτε μετά ως συμπληρωματική θεραπεία αλλά και σε συνδυασμό με την ακτινοθεραπεία. Η εφαρμογή της πριν από την επέμβαση γίνεται με σκοπό να ελαττώσει το μέγεθος τους όγκου, ιδιαίτερα σε ασθενείς που βρίσκονται σε προχωρημένο στάδιο νόσου, δίνοντας τη δυνατότητα σε ανεγχείρητες περιπτώσεις να γίνουν εγχειρήσιμες. Με τη συμπληρωματική χημειοθεραπεία μετά από την επέμβαση φαίνεται ότι αυξάνεται το προσδόκιμο ζωής άνω των 5 ετών και μειώνει της υποτροπές και τους θανάτους από τη νόσο σε μεγαλύτερο ποσοστό συγκριτικά με την εφαρμογή μεμονωμένης χειρουργικής θεραπείας ή συμπληρωματικά με ακτινοθεραπεία (Ιωάννης Ε. Μεσσήνης 2010).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

2.1 Σκοπός

Στην παρούσα εργασία επιλέξαμε να μελετήσουμε τα επίπεδα μεθυλίωσης των υποκινητών του γονιδίου FAM19A4 σε γυναίκες με πρόδρομες αλλοιώσεις του τραχήλου της μήτρας, προκειμένου να εξετάσουμε τον πιθανό ρόλο των επιγενετικών αλλαγών στην καρκινογένεση του τραχήλου της μήτρας. Παράλληλα, θελήσαμε να εξετάσουμε τυχόν διακυμάνσεις των επιπέδων μεθυλίωσης του υποκινητή του FAM19A4 γονιδίου σε σχέση με την παρουσία/ απουσία λοίμωξης HPV και να δούμε τυχόν διαφορές μεταξύ διαφορετικών στελεχών του ιού HPV.

2.2. Υλικό της μελέτης

Στην παρούσα εργασία μελετήσαμε 70 ασθενείς που είχαν αλλοιώσεις στον τράχηλο της μήτρας με χαμηλό βαθμό δυσπλασίας (CINI και CINII / LGSIL). Οι γυναίκες που εξετάστηκαν είχαν ηλικία μεταξύ 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 κλινικο-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
4. Προσθήκη 1ml ξυλόλης και επώαση 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
5. Φυγοκέντρηση 10 λεπτά στις 15.000 στροφές και αφαίρεση του υπερκείμενου
Προσθήκη 1ml αιθανόλης
6. Φυγοκέντρηση 10 λεπτά στις 15.000 στροφές και αφαίρεση του υπερκείμενου
Προσθήκη 1ml αιθανόλης
7. Φυγοκέντρηση 10 λεπτά στις 15.000 στροφές, αφαίρεση του υπερκείμενου και αφήνουμε να εξατμιστεί όλη η αιθανόλη
8. Προσθήκη:
 - i. 20 μl διαλύματος Πρωτεϊνάσης K
 - ii. 200μl διαλύματος λύσης του ιστού (Genomic Digestion Buffer)
9. 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) Φυγοκέντρωση για 10 στις 15.000 στροφές και αφαίρεση του υπερκείμενου
- 7) Προσθήκη 600 µl διαλύματος πλύσης I (Wash Buffer 1)
- 8) Φυγοκέντρωση για 10 λεπτά στις 15.000 στροφές και αφαίρεση του υπερκείμενου
- 9) Προσθήκη 600 µl διαλύματος πλύσης II (Wash Buffer 2)
- 10) Φυγοκέντρωση 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) Φυγοκέντρωση για 10 λεπτά στις 15.000 στροφές, συλλέγω το εκλούμενο DNA και το προσθέτω ξανά στη στήλη. Ακολουθεί επώαση για άλλα 5 λεπτά
- 13) Φυγοκέντρωση 10 λεπτά στις 15.000 στροφές και συλλογή του εκλουόμενου DNA σε αποστειρωμένο σωληνάριο τύπου erpendorf των 2ml
- 14) Φύλαξη στους -20°C μέχρι να χρησιμοποιηθεί.



Εικόνα 14 (αριθμό που συνεχίζει από προηγούμενη εικόνα). 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 καθαρότητά 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:

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

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:

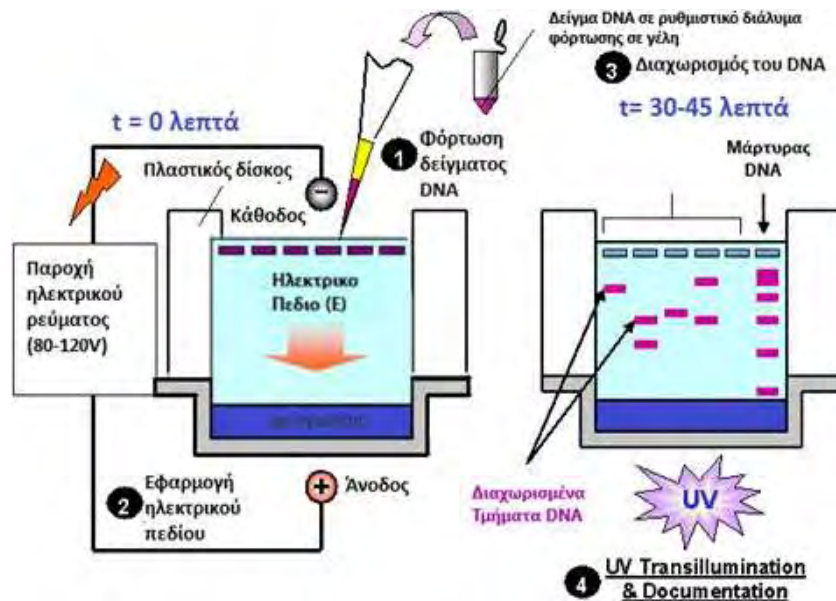
- 1) Μέτρηση σε ζυγό ακριβείας της επιθυμητής ποσότητας αγαρόζης σε σκόνη και μεταφορά της σε ογκομετρική φιάλη. Προσθήκη 300ml ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης TBE (Tris- Boric Edta) 1x και ανάδευση.
- 2) Τοποθέτηση της ογκομετρικής φιάλης σε φούρνο μικροκυμάτων και θέρμανση του μίγματος μέχρι 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 (μπλε 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 15).



Εικόνα 15. 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

protectBuffer:

35μl Vτελικό:

140μl

3) Συνθήκες μετατροπής με δισουλφιδικό νάτριο σε θερμικό κυκλοποιητή τύπου Eppendorf (Εικόνα 16)

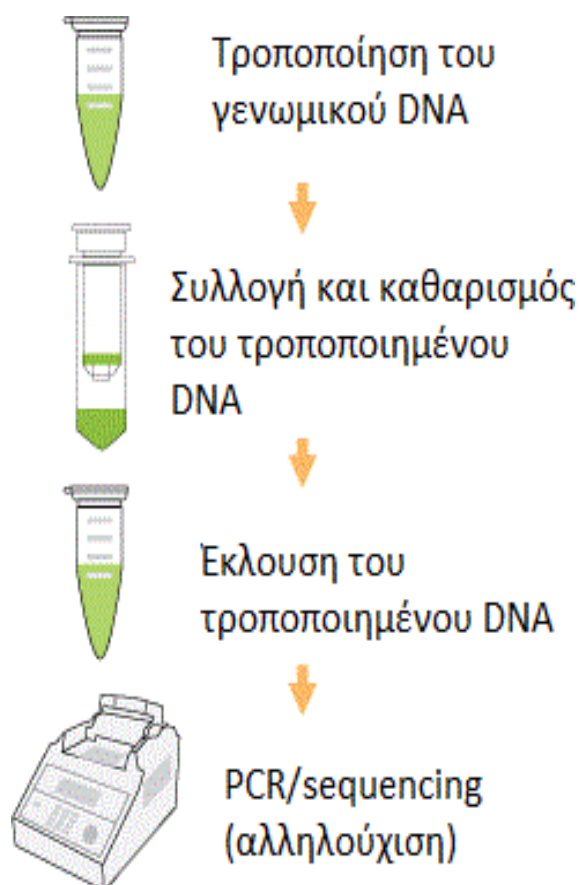
Στάδια	Χρόνος	Θερμοκρασία
Αποδιάταξη	5 λεπτά	95°C
Επώαση	25 λεπτά	60°C
Αποδιάταξη	5 λεπτά	95°C
Επώαση	85 λεπτά	60°C
Αποδιάταξη	5 λεπτά	95°C
Επώαση	175 λεπτά	60°C
Διατήρηση	αόριστο	20°C



Εικόνα 16. Αυτόματος θερμικός κυκλοποιητής τύπου Eppendorf.

2.5. Καθαρισμός 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 υπερκλειμένου
- 3) Προσθήκη 500 μl διαλύματος BW, φυγοκέντρωση 2 λεπτά στις 15.000 στροφές και αφαίρεση του υπερκλειμένου
- 4) Προσθήκη 500 μl διαλύματος BD και επώαση για 15 λεπτά, φυγοκέντρωση 2 λεπτά στις 15.000 στροφές και αφαίρεση του υπερκλειμένου
- 5) Προσθήκη 500 μl διαλύματος BW, φυγοκέντρωση για 2 λεπτά στις 15.000 στροφές και αφαίρεση του υπερκλειμένου
- 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 17. 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:

GAGYGGGTTTGGGAAGTTGYGTTTTTTTTTYGYGGGA

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: TATCGTTAGTCGATCGTCTGTCTG

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:	ENSEMBL Gene	Sequence Strand: Anti Sense
Chr3: 68981137-68981223	ID:	
	ENSG00000163377	

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 Concetrates, 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	

2.7. 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

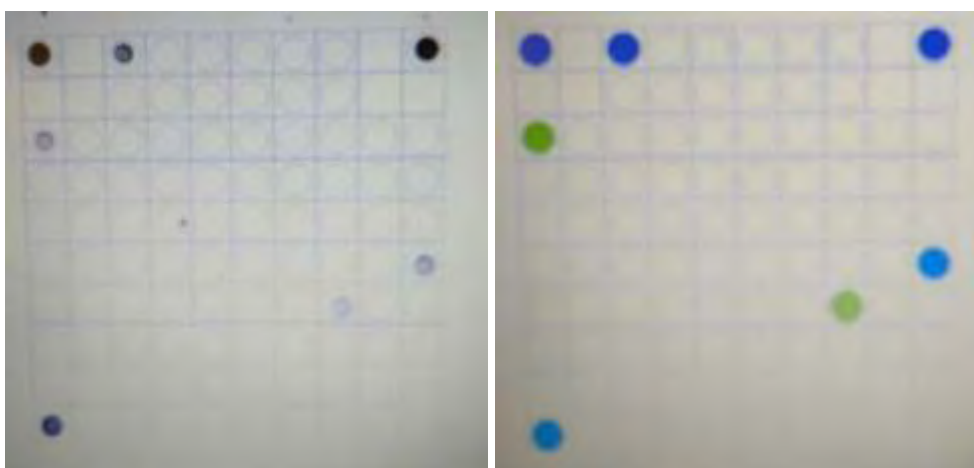
Συνθήκες PCR

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		Υβριδοποίηση
1 λεπτό	95	1	Επιμήκυνση
-	8	1	Αποδιάταξη

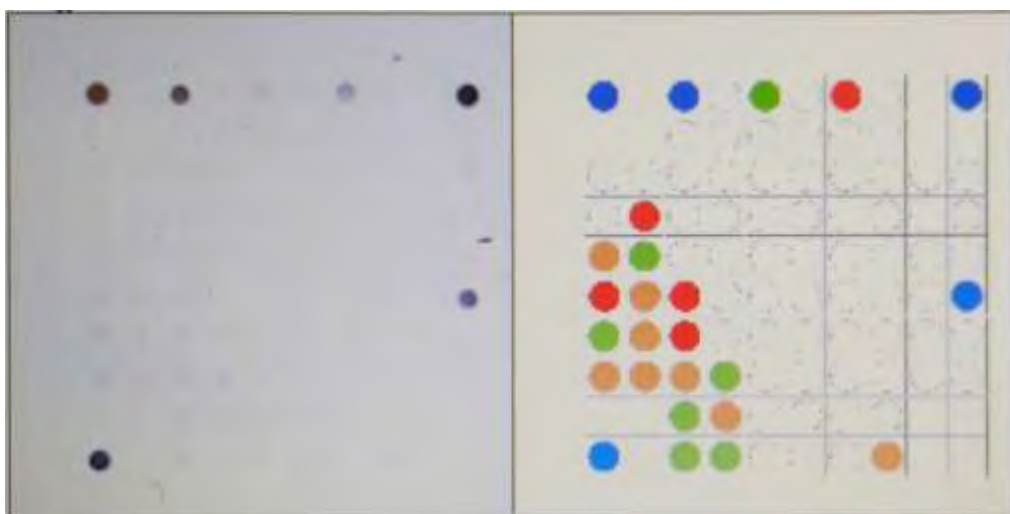
Υβριδισμός και ανίχνευση στελεχών HPV με το ZytoVision Array Detection Kit

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



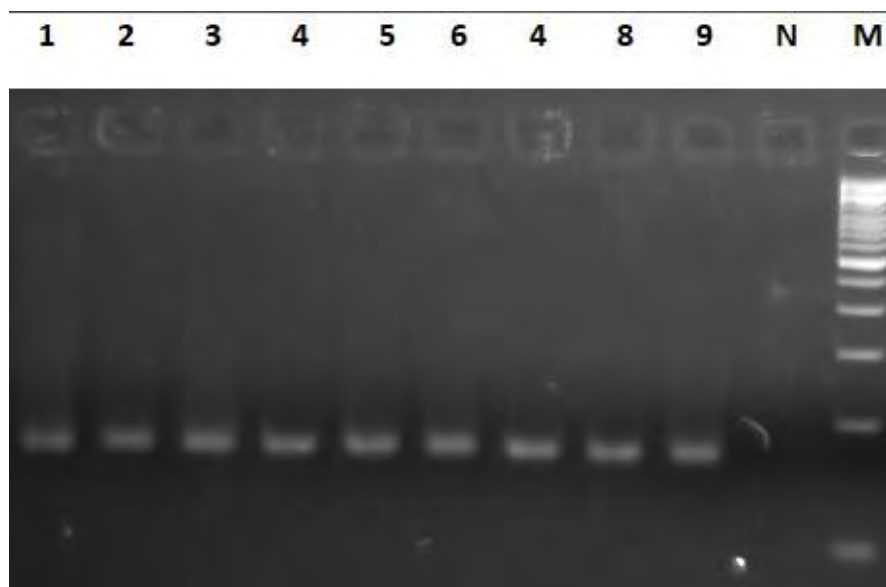
Εικόνα 18. Ανίχνευση ενός στελέχους HPV σε ασθενή με το σύστημα ZytoVision HPV Vision Array



Εικόνα 19. Ανίχνευση πολλαπλών στελεχών HPV σε ασθενή με το σύστημα ZytoVision HPV Vision Array

2.8. 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%.

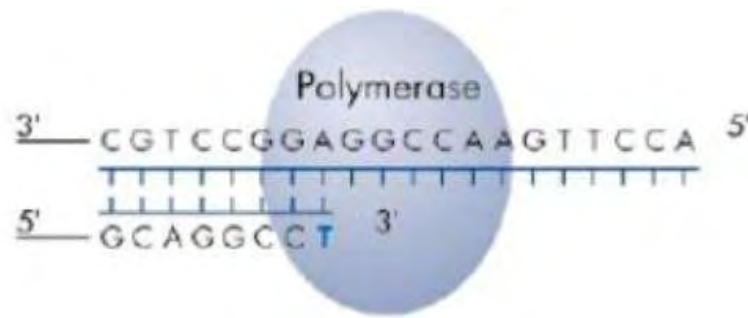


Εικόνα 20. Ηλεκτροφόρηση PCR προϊόντων του γονιδίου PTEN/KILLN σε 3% πήκτωμα αγαρόζης, 1-9: δείγματα ασθενών, M: 100bp μάρτυρας γνωστού μεγέθους (Thermo Fischer), N: αρνητικός μάρτυρας

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.



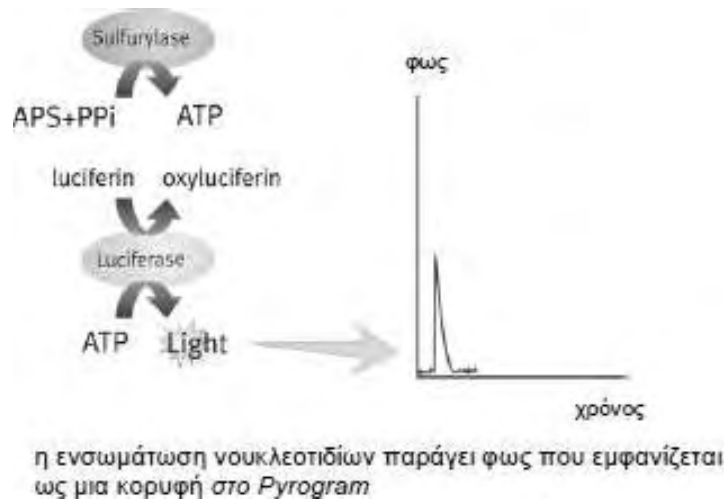
Εικόνα 21. Υβριδοποίηση του εκκινητή.

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.



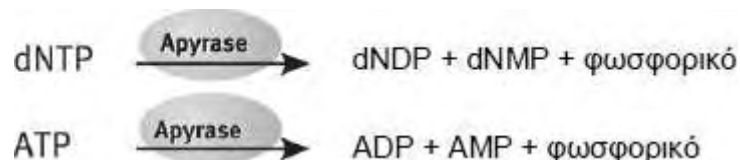
Εικόνα 22. Ενσωμάτωση dNTP και απελευθέρωση πυροφωσφορικού (PPi)

Βήμα 3. Η ATP σουλφουρυλάση μετατρέπει ποσοτικά την PPi σε ATP υπό την παρουσία 5' φωσφοθεϊκής 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.



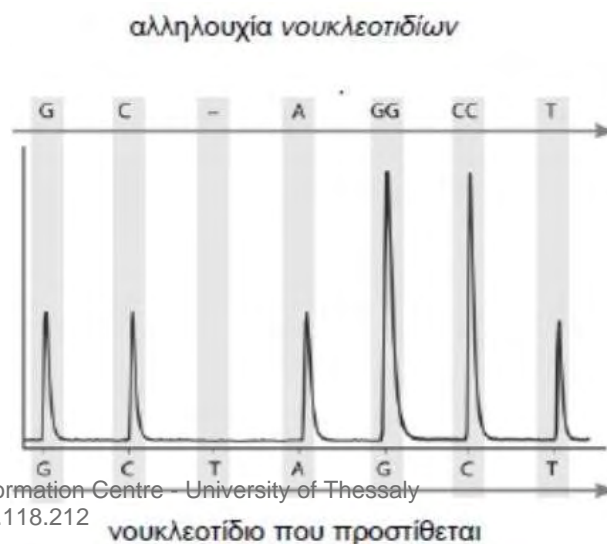
Εικόνα 23. Μετατροπή του πυροφωσφορικού (PPi) σε ATP και εκπομπή ορατού φωτός.

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 24. Αντίδραση αποικοδόμησης μη ενσωματωμένων νουκλεοτιδίων.

Βήμα 5. Τα νουκλεοτίδια προστίθενται ένα ένα κάθε φορά. Σημειώνεται ότι η αλφα-θειο τριφωσφορική δεοξυαδενοσίνη (dATPaS) 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 25. Δημιουργία πυρογράμματος βάσει της συντιθέμενης νουκλεοτιδικής αλληλουχίας.

2.9. 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	Όγκος ανά αντίδραση (μl)
Streptavidin Sepharose High Performance	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 26. Σταθμός εργασίας με αντλία υπό κενό PyroMark Q24 (QIAGEN).

- Διαλυτοποίηση του εκκινητή αλληλούχησης σε 1175 μ l ρυθμιστικό διάλυμα υβριδοποίησης

Mix

Συστατικά

Όγκος ανά δείγμα (μ l)

Εκκινητής αλληλούχησης 0,8

Ρυθμιστικό διάλυμα πρόσδεσης (PyroMark Annealing) 24,2

Τελικός όγκος 25,0

Μοιράζω 25 μ l 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. Ανοψώνω το εργαλείο κατακόρυφα περισσότερο από 90° για 10 δευτερόλεπτα, για να αποστραγγιστεί το υγρό από τους δειγματολήπτες με φίλτρο.



Εικόνα 27. 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 αλληλούχισης.
- 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 βυθίζοντάς τους στο δεύτερο περιέκτη με νερό υψηλής καθαρότητας και εφαρμόζοντας κενό.

- Ανοψώνω 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.
- Διαλυτοποίηση 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).



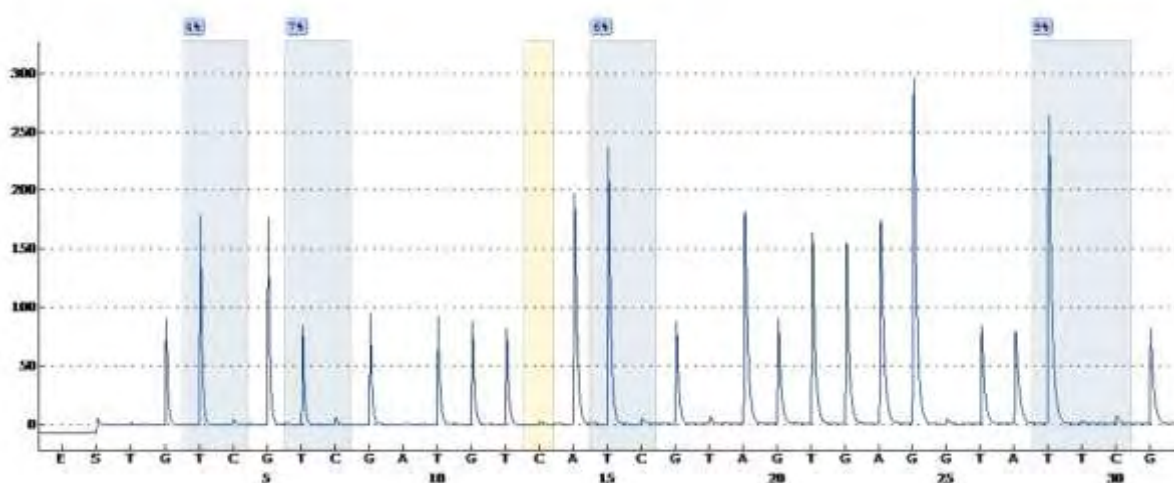
Εικόνα 28. Φύσιγγα PyroMark Q24 (Cartridge)

- 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

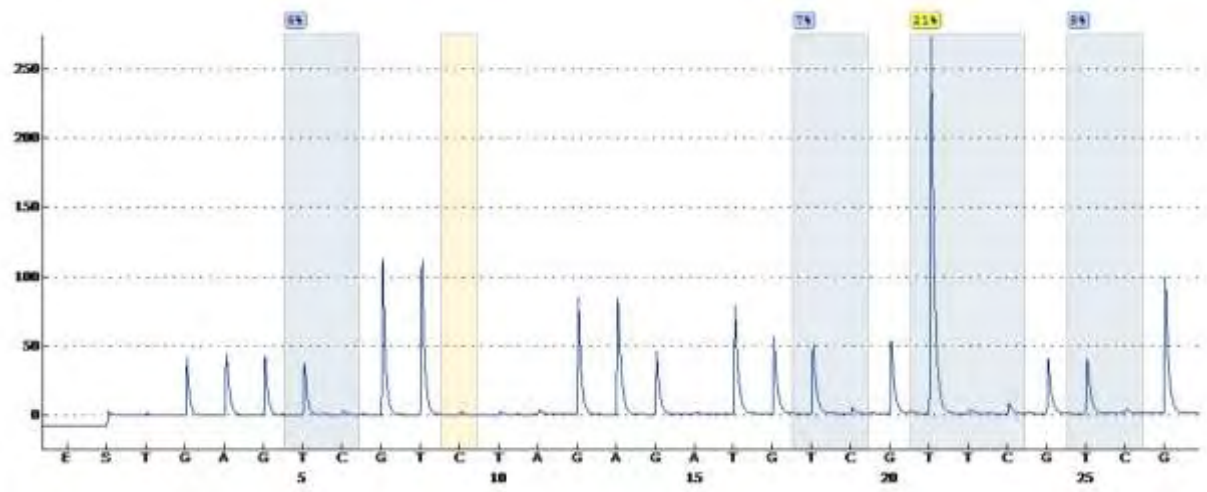


πυροαλληλούχισης.

Εικόνα 29. Συσκευή πυροαλληλούχισης Pyromark Q24(Qiagen).



Εικόνα 30. Πυρόγραμμα Hs_FAM19A4_01_PM



Εικόνα 31. Πυρόγραμμα Hs_FAM19A4_03_PM

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Οι ασθενείς της μελέτης μας ομαδοποιήθηκαν σε δύο ηλικιακές ομάδες, με βάση τη διάμεση τιμή τους (35 ± 10.9). Στην πρώτη ομάδα συμπεριλάβαμε όλους τους ασθενείς ηλικίας < 35 ετών, ενώ στη δεύτερη ομάδα εντάξαμε τους ασθενείς με ηλικία ≥ 35 ετών.

Με βάση τα κλινικοϊστολογικά στοιχεία που συλλέξαμε, καταγράψαμε το βαθμό δυσπλασίας των συμμετεχόντων, 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 κλινικο-ιστολογικά στοιχεία των ασθενών απεικονίζονται αναλυτικά στον παρακάτω πίνακα.

<i>Παράμετρος</i>	<i>Αριθμός</i>	<i>Ποσοστό (%)</i>
<i>Ηλικία</i>		
<i>< 35</i>	35	50
<i>≥ 35</i>	35	50
<i>Βαθμός δυσπλασίας</i>		
<i>CIN I</i>	62	88.6
<i>CIN II</i>	8	11.4
<i>Ανίχνευση HPV ιού</i>		
<i>Αρνητική</i>	24	34.3
<i>Θετική</i>	46	65.7
<i>Τύποι HPV ιού</i>		
<i>Ένας</i>	34	73.9
<i>Πολλαπλοί</i>	12	26.1

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

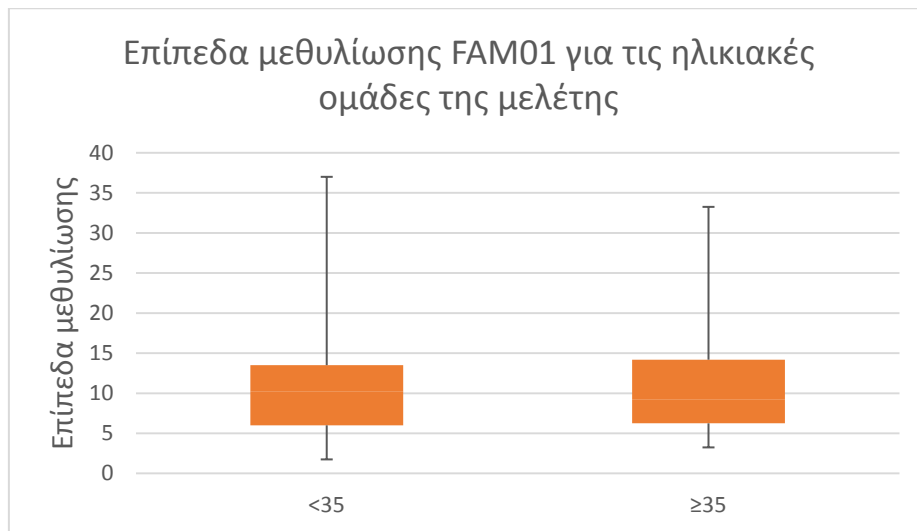
Όπως φαίνεται στον παραπάνω πίνακα, οι ασθενείς ήταν εξίσου κατανεμημένοι στις δύο ηλικιακές ομάδες. 62/70 ασθενείς (88,6%) είχαν δυσπλασία τύπου I (CIN I) και 8/70 ασθενείς (11,4%) είχαν δυσπλασία τύπου II (CIN II). Σε 24/70 ασθενείς (34.3%) δεν ανιχνεύθηκε ο ιός HPV, ενώ σε 46/70 ασθενείς (65.7%) ο ιός ήταν παρών. Προχωρήσαμε σε τυποποίηση για να προσδιορίσουμε το στέλεχος του ιού HPV που έφεραν οι θετικοί ασθενείς (46/70). 34/46 ασθενείς (73.9%) είχαν απλή λοίμωξη και έφεραν ένα μόνο στέλεχος του HPV ιού, ενώ οι υπόλοιποι 12/46 (26.1%) διαγνώστηκαν με περισσότερα από ένα στελέχη.

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

3.1. Μελέτη των επιπέδων μεθυλίωσης των CpG νησίδων της περιοχής FAM01 του γονιδίου FAM19A4 στις ηλικιακές ομάδες της μελέτης

Μελετήσαμε τα επίπεδα μεθυλίωσης της περιοχής FAM01 του γονιδίου σε γυναίκες με χαμηλόβαθμη δυσπλασία, ανεξαρτήτως της παρουσίας ή απουσίας λοίμωξης από τον ιό 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 του υποκινητή του γονιδίου.

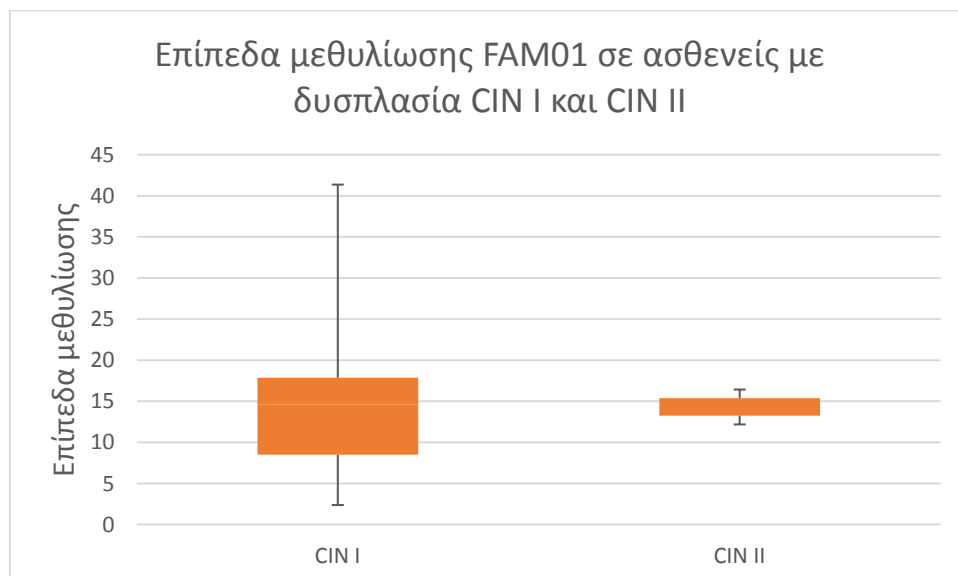
Τα επίπεδα μεθυλίωσης των τεσσάρων CpG νησίδων της περιοχής FAM01 κυμαίνονταν σε ποσοστό $16.9 \pm 8\%$ για τους ασθενείς ηλικίας < 35 ετών και 16.8 ± 14 για τους ασθενείς ηλικίας ≥ 35 ετών. Τα επίπεδα μεθυλίωσης στις δύο ηλικιακές ομάδες είναι παρόμοια και δεν αναδείχθηκε κάποια στατιστικώς σημαντική συσχέτιση.



Γράφημα 1. Επίπεδα μεθυλίωσης των δύο ηλικιακών ομάδων ασθενών για την περιοχή FAM01 του γονιδίου FAM19A4.

3.2. Μελέτη των επιπέδων μεθυλίωσης των CpG νησίδων της περιοχής FAM01 του FAM19A4 γονιδίου στους ασθενείς της μελέτης, σύμφωνα με το βαθμό δυσπλασίας

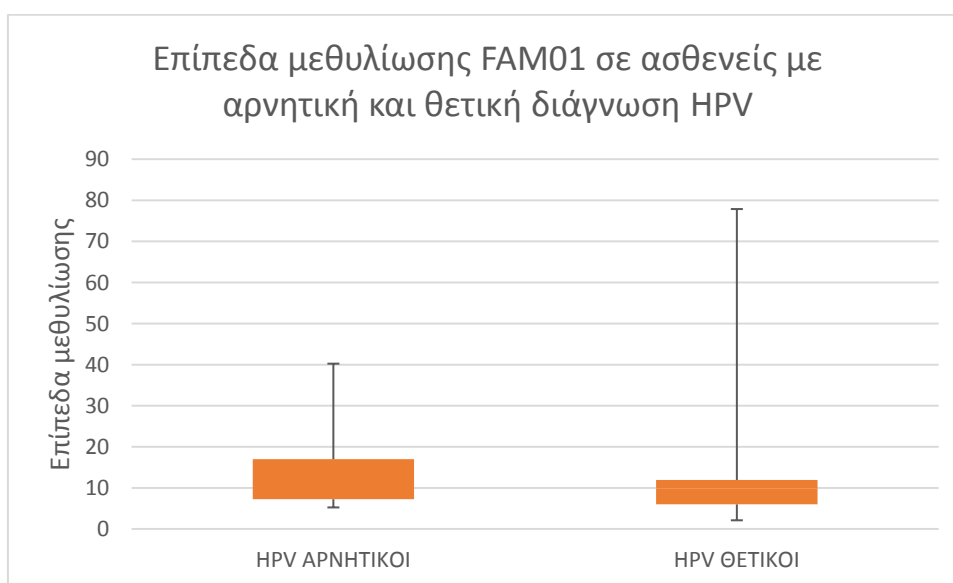
Τα επίπεδα μεθυλίωσης των τεσσάρων CpG νησίδων της περιοχής FAM01 κυμάνθηκαν στο $18.6 \pm 7\%$ για τους ασθενείς CIN I και 15.4 ± 3 για τους ασθενείς CIN II. Τα επίπεδα μεθυλίωσης στις δύο ηλικιακές ομάδες είναι παρόμοια. Δεν αναδείχθηκε κάποια στατιστικώς σημαντική συσχέτιση.



Γράφημα 2. Διακύμανση επιπέδων μεθυλίωσης της περιοχής FAM01 του γονιδίου FAM19A4 των ασθενών με CIN I και CIN II αλλοιώσεις.

3.3. Μελέτη των επιπέδων μεθυλίωσης των CpG νησίδων της περιοχής FAM01 του FAM19A4 γονιδίου στους ασθενείς της μελέτης και συσχέτιση με την απουσία ή παρουσία λοίμωξης από τον ιό HPV

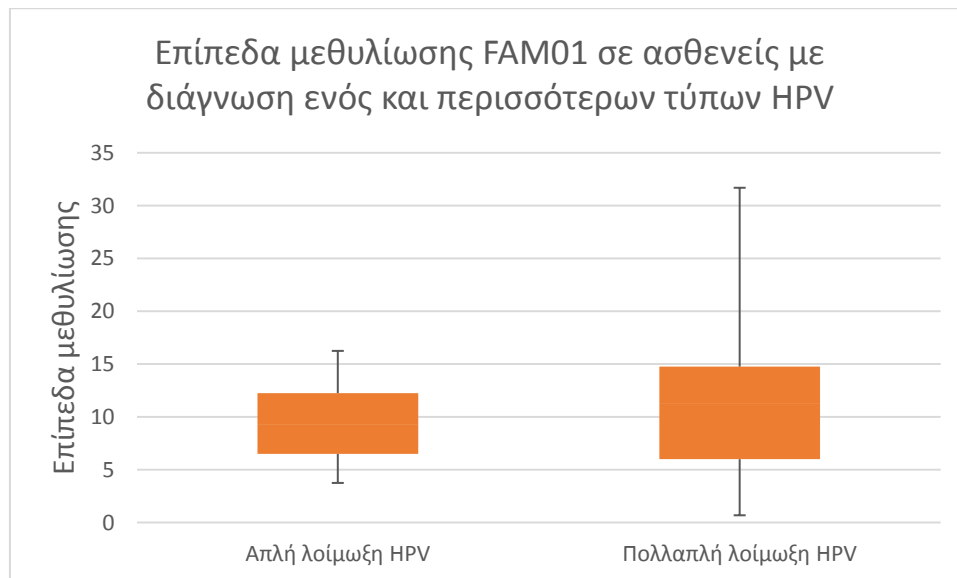
Τα επίπεδα μεθυλίωσης των τεσσάρων CpG νησίδων της περιοχής FAM01 του FAM19A4 γονιδίου κυμάνθηκαν στο $16.5 \pm 9.4\%$ για τους ασθενείς με απουσία λοίμωξης HPV και 16.8 ± 11.9 για τους ασθενείς με θετική διάγνωση HPV. Τα επίπεδα μεθυλίωσης στις δύο ηλικιακές ομάδες είναι παρόμοια. Δεν αναδείχθηκε κάποια στατιστικώς σημαντική συσχέτιση.



Γράφημα 3. Διακύμανση των επιπέδων μεθυλίωσης της περιοχής FAM01 του FAM19A4 γονιδίου σε ασθενείς παρουσία /η απουσία λοίμωξης από τον HPV ιό.

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

Τα επίπεδα μεθυλίωσης των τεσσάρων CpG νησίδων της περιοχής FAM01 του γονιδίου FAM19A4 κυμάνθηκαν στο $14.6 \pm 5.3\%$ για τους ασθενείς που είχαν απλή λοίμωξη HPV και 21.9 ± 21.5 για τους ασθενείς που είχαν πολλαπλή λοίμωξη από περισσότερα του ενός στελέχη του ιού HPV. Δεν αναδείχθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές.

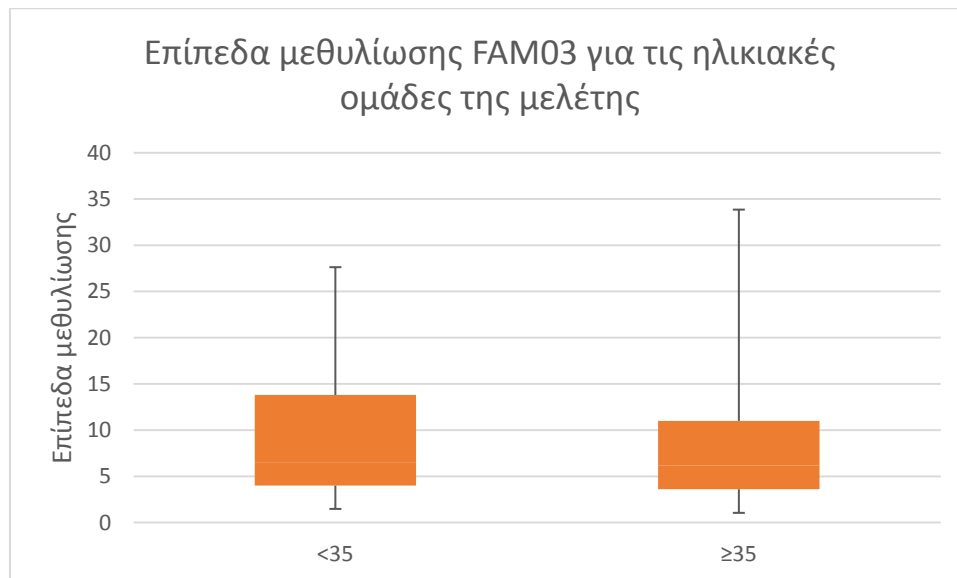


Γράφημα 4. Διακύμανση των επιπέδων μεθυλίωσης της περιοχής FAM01 του FAM19A4 γονιδίου σε ασθενείς με απλή ή πολλαπλή λοίμωξη από στελέχη του ιού HPV.

3.5. 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 χαμηλόβαθμη δυσπλασία, ανεξαρτήτως της παρουσίας ή απουσίας λοίμωξης από τον HPV ιό. 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.

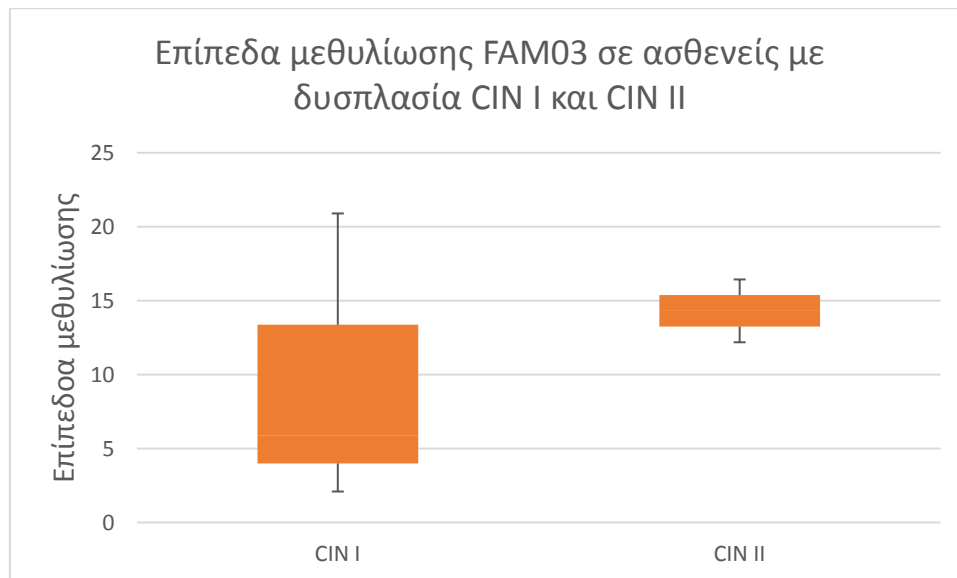
Τα επίπεδα μεθυλίωσης των τεσσάρων CpG νησίδων του γονιδίου FAM03 κυμάνθηκαν στο $12.9 \pm 7.1\%$ για τους ασθενείς ηλικίας < 35 ετών και 11.8 ± 8.3 για τους ασθενείς ≥ 35 ετών. Δεν αναδείχθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές.



Γράφημα 5. Διακύμανση των επιπέδων μεθυλίωσης της περιοχής FAM03 του γονιδίου FAM19A4 στις δύο ηλικιακές ομάδες των ασθενών μας.

3.6. Μελέτη των επιπέδων μεθυλίωσης των CpG νησίδων της περιοχής FAM03 του γονιδίου FAM19A4 στους ασθενείς της μελέτης, σύμφωνα με το βαθμό δυσπλασίας

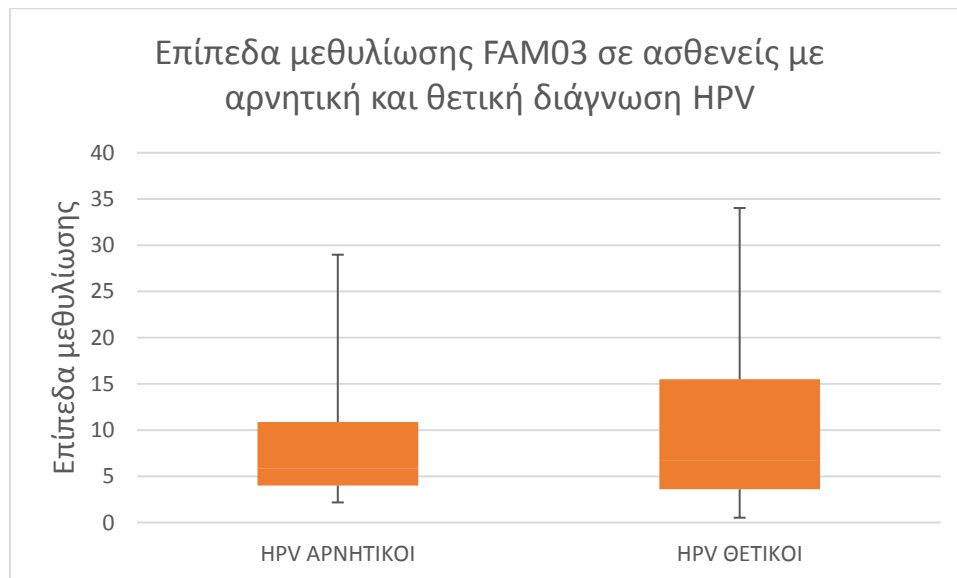
Τα επίπεδα μεθυλίωσης των τεσσάρων CpG νησίδων της γονιδιακής περιοχής FAM03 κυμάνθηκαν στο $12.8 \pm 7\%$ για τους ασθενείς με CIN I και $15.4 \pm 3\%$ για τους ασθενείς με CIN II αλλοιώσεις. Παρατηρήθηκαν υψηλότερα επίπεδα συνολικής μεθυλίωσης στους ασθενείς με βαθμό δυσπλασίας CIN II και η συσχέτιση μεταξύ του βαθμού δυσπλασίας και των επιπέδων μεθυλίωσης της γονιδιακής περιοχής FAM03 είναι στατιστικώς σημαντική ($p = 0.015$).



Γράφημα 6. Διακύμανση και σύγκριση των επιπέδων μεθυλίωσης της γονιδιακής περιοχής FAM03 του γονιδίου FAM19A4 σε ασθενείς με CIN I και CIN II αλλοιώσεις ($p = 0.015$).

3.7. Μελέτη των επιπέδων μεθυλίωσης των CpG νησίδων του FAM03 γονιδίου στους ασθενείς της μελέτης, σύμφωνα με την απουσία ή παρουσία διάγνωσης HPV

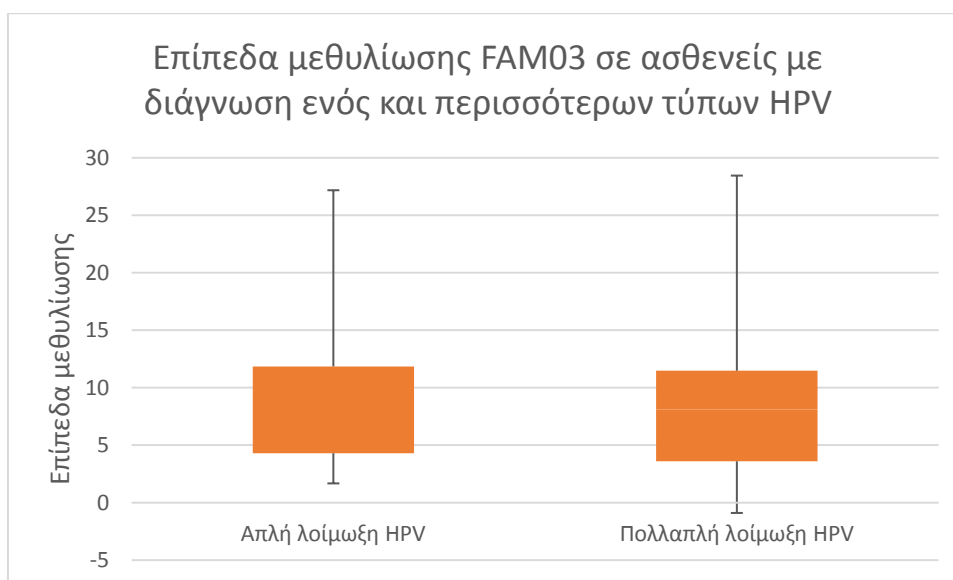
Όσον αφορά στα επίπεδα μεθυλίωσης των τεσσάρων CpG νησίδων της γονιδιακής περιοχής FAM03, αυτά κυμάνθηκαν σε ποσοστά της τάξης του $11.3 \pm 7\%$ για τους ασθενείς που δεν είχαν προσβληθεί από τον HPV ιό και 13.3 ± 8.1 για τους ασθενείς στους οποίους ανιχνεύθηκε ο ιός HPV. Δεν αναδείχθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές.



Γράφημα 7. Διακύμανση επιπέδων μεθυλίωσης της γονιδιακής περιοχής FAM03 του γονιδίου FAM19A4 σε ασθενείς με απουσία ή παρουσία λοίμωξης από τον ιό HPV.

3.8. Μελέτη των επιπέδων μεθυλίωσης των CpG νησίδων της περιοχής FAM03 του γονιδίου FAM19A4 στους ασθενείς της μελέτης μας σε σχέση με την παρουσία απλής ή πολλαπλής λοίμωξης από στελέχη του ιού HPV

Τέλος εξετάσαμε τα επίπεδα μεθυλίωσης των τεσσάρων CpG νησίδων της περιοχής FAM03 του εξεταζόμενου γονιδίου. Αυτά κυμαίνονταν σε ποσοστά της τάξης του $12.6 \pm 7.2\%$ για τους ασθενείς που διαγνώστηκαν με απλή λοίμωξη και $16.2 \pm 10.5\%$ για τους ασθενείς που διαγνώστηκαν με πολλαπλή λοίμωξη HPV. Τα επίπεδα μεθυλίωσης στις δύο ηλικιακές ομάδες είναι παρόμοια. Δεν προέκυψε κάποια στατιστικώς σημαντική συσχέτιση.



Γράφημα 8. Διακύμανση των επιπέδων μεθυλίωσης της περιοχής FAM03 του γονιδίου FAM19A4 σε ασθενείς με απλή ή πολλαπλή λοίμωξη από στελέχη του ιού HPV.

Τα στελέχη που ανιχνεύτηκαν στους ασθενείς με απλές λοιμώξεις ήταν το στέλεχος 16 σε 20 ασθενείς (59%), το στέλεχος 31 σε 8 ασθενείς (23,5%) και τα στελέχη 51 και 33 σε τρεις ασθενείς αντίστοιχα (8,75%). Από τους ασθενείς με πολλαπλές λοιμώξεις, 4 έφεραν τα στελέχη 6,11,31 (33,3%), 4 έφεραν τα στελέχη 16 και 31 (33,3%) και 4 έφεραν τα στελέχη 16 και 33 (33,3%).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας είναι ο τέταρτος συχνότερος καρκίνος στις γυναίκες παγκοσμίως. Είναι σχετικά σπάνιος σε ανεπτυγμένες χώρες που εφαρμόζονται προγράμματα προ συμπτωματικού ελέγχου (WHO 2019).

Στην πλειοψηφία των περιπτώσεων ανάπτυξης καρκίνου του τραχήλου της μήτρας ευθύνεται η λοίμωξη των γεννητικών οργάνων με ογκογόνα στελέχη του ιού HPV. Παράγοντες όπως ο μεγάλος αριθμός ερωτικών συντρόφων, η έναρξη της σεξουαλικής δραστηριότητας σε πρώιμη ηλικία, η συνύπαρξη άλλων παθογόνων μικροοργανισμών, το κάπνισμα και η χρήση αντισυλληπτικών δια του στόματος φαίνεται να δρουν συνεργατικά αυξάνοντας τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου στον τράχηλο της μήτρας (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).

Στην παρούσα εργασία επιλέξαμε να μελετήσουμε τα επίπεδα μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου FAM19A4 σε γυναίκες με πρόδρομες αλλοιώσεις του τραχήλου της μήτρας, προκειμένου να εξετάσουμε τον πιθανό ρόλο των επιγενετικών αλλαγών στην καρκινογένεση του τραχήλου της μήτρας. Παράλληλα, θελήσαμε να εξετάσουμε τυχόν διακυμάνσεις των επιπέδων μεθυλίωσης του υποκινητή του FAM19A4 γονιδίου σε σχέση με την παρουσία/απουσία λοίμωξης HPV και να δούμε τυχόν διαφορές μεταξύ διαφορετικών στελεχών του ιού HPV.

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 70 γυναίκες, ηλικίας 19-64 ετών, με χαμηλόβαθμη δυσπλασία (CIN I, CIN II). 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.

Απομονώθηκε γενομικό DNA από τομές παραφίνης και στη συνέχεια ενισχύθηκε το εξεταζόμενο γονίδιο για την εκτίμηση των επιπέδων μεθυλίωσης με τη μέθοδο της πυροαλληλούχησης. 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 νησίδες CpG έκαστος. Παράλληλα, τα δείγματα των ασθενών της μελέτης μας εξετάστηκαν για την παρουσία ή απουσία λοίμωξης από στελέχη HPV, με την τεχνική του υβριδισμού μέσω σάρωσης (ZytoVision HPV Vision Array).

62/70 ασθενείς (88.6%) διαγνώστηκαν με CIN I και 8/70 (11.4%) διαγνώστηκαν με CIN II αλλοιώσεις. 24/70 ασθενείς (34.3%) δεν είχαν προσβληθεί από τον HPV ιό, ενώ 46/70 γυναίκες (65.7%) ήταν θετικές για τον HPV ιό. Από αυτές, 34/46 ασθενείς (73.9%) είχαν απλή λοίμωξη από τον HPV ιό και συγκεκριμένα έφεραν ένα από τα στελέχη 16, 31, 51 ή 33, ενώ οι υπόλοιπες 12/46 γυναίκες (26.1%) διαγνώστηκαν με πολλαπλές λοιμώξεις και έφεραν τα στελέχη 6, 11, 31, ή 16, 31 ή 16, 33.

Από τους γενετικούς τόπους που αναλύθηκαν, επιτυχή ποσοστά μεθυλίωσης παρείχαν οι τόποι FAM19A4_01 και FAM19A4_03. Τα επίπεδα μεθυλίωσης κυμάνθηκαν στο $15,75 \pm 10,9\%$ και $10 \pm 7,6\%$ αντίστοιχα. Για το γενετικό τόπο FAM19A4_01, τα ποσοστά μεθυλίωσης σε συμμετέχοντες CIN I κυμάνθηκαν στο $18.6 \pm 7\%$ και 15.4 ± 3 για τους ασθενείς CIN II, χωρίς να υπάρχει κάποια στατιστικά σημαντική συσχέτιση. Αντιθέτως, στο γενετικό τόπο FAM19A4_03, τα επίπεδα μεθυλίωσης κυμάνθηκαν στο $12.8 \pm 7\%$ για τους ασθενείς με CIN I και $15.4 \pm 3\%$ για τους ασθενείς με CIN II αλλοιώσεις. Παρατηρήθηκαν υψηλότερα επίπεδα συνολικής μεθυλίωσης στους ασθενείς με βαθμό δυσπλασίας CIN II και η συσχέτιση του βαθμού δυσπλασίας και των επιπέδων μεθυλίωσης της γονιδιακής περιοχής FAM03 είναι στατιστικώς σημαντική ($p = 0.015$).

Τα επίπεδα μεθυλίωσης των δύο περιοχών FAM19A4_01 και FAM19A4_03 συσχετίστηκαν επιπρόσθετα με την ηλικία, την παρουσία ή απουσία HPV λοίμωξης καθώς και την παρουσία ενός ή περισσότερων στελεχών του ιού HPV. Τα ευρήματα ήταν ανάλογα και η στατιστική ανάλυση δεν ανέδειξε στατιστικώς σημαντικές συσχετίσεις.

Δεν υπάρχει μεγάλος αριθμός μελετών για το FAM19A4. Σε σχετικά πρόσφατη μελέτη των De Strooper και συνεργατών, το γονίδιο FAM19A4 εκτιμάται ως δείκτης μεθυλίωσης σε περιστατικά με προκαρκινικές αλλοιώσεις και ταυτόχρονη παρουσία λοίμωξης από τον HPV ιό (De Strooper et al, 2014). Τα επίπεδα μεθυλίωσης του γονιδίου ήταν χαμηλά σε χαμηλόβαθμες προκαρκινικές αλλοιώσεις συγκριτικά με τα επίπεδα μεθυλίωσης του γονιδίου σε υψηλόβαθμες

αλλοιώσεις, εύρημα που καθιστά τη μεθυλίωση των CpG νησίδων του υποκινητή του FAM19A4 γονιδίου ως υποψήφιο βιοδείκτη για την ανίχνευση και διαφοροποίηση χαμηλόβαθμων έναντι υψηλόβαθμων προκαρκινικών αλλοιώσεων (De Strooper et al, 2014).

Σε πρόσφατη μελέτη, των Bu και συνεργατών (2018), βρέθηκε ότι οι μεγαλύτερου 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). Οι παραπάνω μελέτες συμφωνούν και ενισχύουν τα ευρήματα της δικής μας μελέτης, που αν και σε σχετικά μικρό δείγμα ασθενών έδειξε επίσης ότι τα επίπεδα μεθυλίωσης της FAM_03 γονιδιακής περιοχής του FAM19A4 αυξάνονται αναλογικά με το βαθμό δυσπλασίας των ασθενών της μελέτης μας ($p = 0.015$). Ο μικρός αριθμός μελετών για τη μεθυλίωση του υποκινητή του FAM19A4 γονιδίου, σε συνδυασμό με τα ευρήματα της δικής μας ,αλλά και προηγούμενων μελετών, που υποδηλώνουν τη χρησιμότητα μέτρησης των επιπέδων μεθυλίωσης του συγκεκριμένου γονιδίου στα πλαίσια της διαφοροποίησης των γυναικών με χαμηλόβαθμες και υψηλόβαθμες δυσπλασίες, καθιστούν σχεδόν αναγκαία την περαιτέρω έρευνα σε μεγάλο αριθμό δειγμάτων προκειμένου να εξαχθούν ασφαλή στατιστικά συμπεράσματα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. *Alex Ferenczy M.D. Pathology of the Female Genital Tract pp 102-123. Anatomy and Histology of the Cervix. [1977]*
2. *Alexandra Fournier, Nobuhiro Sasai, Mitsuyoshi Nakao, Pierre-Antoine Defossez. The role of methyl-binding proteins in chromatin organization and epigenome maintenance. Briefing in Functional Genomics. Volume 11. Issue 3. Pages 251–264 [19 December 2011] <https://doi.org/10.1093/bfgp/elr040>*
3. *Anorlu RI. What is the significance of the HPV epidemic? The Canasian Journal of Urology [01 Feb 2008, 15(1):3860-3865] <https://europepmc.org/abstract/med/18304395>*
4. *Attila T. Lorincz. Virtues and Weaknesses of DNA Methylation as a Test for Cervical Cancer Prevention. Centre for Cancer Prevention, Wolfson Institute of Preventive Medicine, Queen Mary University of London, London, UK. Acta Cytologica Volume 60. Pages 501–512. [2016]*
5. *Bierkens M, Hesselink AT, Meijer CJLM, et al. CADM1 and MAL promoter methylation levels in hrHPV-positive cervical scrapes increase proportional to degree and duration of underlying cervical disease. Int J Cancer. 2013;133(6):1293–1299*
6. *Briton LA. Epidemiology of the Cervical Cancer. IARC Scientific Publications, (119):3-23 [1 Jan 1992] <https://europepmc.org/abstract/med/1428106>*
7. *Bu Q , Wang S, Ma J, Zhou X, Hu G, Deng H, Sun X, Hong X, Wu H, Zhang L, Luo X. The clinical significance of FAM19A4 methylation in high-risk HPV-positive cervical samples for the detection of cervical (pre)cancer in Chinese women. BMC Cancer. 2018 Nov 29;18(1):1182. doi: 10.1186/s12885-018-4877-5.*

8. *Daniel Keppler Athena W.Lin Editors. Methods in Molecular Biology 1249. Cervical Cancer Methods and Protocols. Springer Science + Buisness Media New York 2015*
9. *De Sanjose S, Quint WGV, Alemany L, et al. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. Lancet Oncol. 2010;11 (11):1048–1056.*
10. *De Strooper LMA, Meijer CJLM, Berkhof J, 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):1251–1257*
11. *Eduardo L. Franco, Diane M. Harper. Vaccination against human papillomavirus infection: a new paradigm in cervical cancer control. Vaccine, vol.23. issues 17-18, 18 March 2005, p.2388-2394. [13 January 2005]
<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.01.016>*
12. *Eva Jablonka, Marion J. Lamb. The changing concept of epigenetics. Cohn Institute for the History and Philosophy of Science and Ideas, Tel Aviv University, Tel Aviv 69978, Israel. Ann N Y Acad Sci. 2002, 981: 82-96.*
13. *Franco Borruto, Marc De Ridder. HPV and Cancer. Achievments in Prevention and future Prospects. Springer Science + Buisness Media, LLC 2012*
14. *Helen Pearson. What is a gene? NATURE|Vol 441 [25 May 2006]
<https://www.nature.com/articles/441398a.pdf>

https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4757-6143-6_5?fbclid=IwAR0x4xy4MGYsRqfvVkujVd2iJI1CDOjXFkd8JXlfzK_sfGC9u_Mqai5DMZg*
15. *Ian J. Groves, Nicholas Coleman. Pathogenesis of human papillomavirus-associated mucosal disease. The Journal of Pathology. Volume 235. Issue 4. Pages 527–538 [08 December 2014] <https://doi.org/10.1002/path.4496>*
16. *Jaime G. de la Garza-Salazar, Flavia Morales-Vasquez, Abelardo Meneses-Garcia. Cervical Cancer. Springer International Publishing Switzerland 2017*
17. *James R. Marshall, Saxon Graham, Tim Byers, Mya Swanson, John Brasure. Diet and Smoking in the Epidemiology of Cancer of the Cervix, JNCI: Journal of the National Cancer Institute. Vol.70, Issue 5. p.847-851[01 May 1983]
<https://doi.org/10.1093/jnci/70.5.847>*

18. Jeffrey A.Yoder, Colum P.Walsh, Timothy H.Bestor. Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends in Genetics*, Vol.13, Issue 8, August 1997, p. 335-340 [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(97\)01181-5](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(97)01181-5)
19. John. O'Shea, Averil Ma, Peter Lipsky. Cytokines and autoimmunity. *Nature Reviews Immunology* 2,37-45 [01 January 2002]. <https://www.nature.com/articles/nri702>
20. Joseph Monsonogo, F. Xavier Bosch, Pierre Coursaget, John Thomas Cox, Eduardo Franco, Ian Frazer, Rengaswamy Sankaranarayanan, John Schiller, Albert Singer, Tom Wright, Walter Kinney, Chris Meijer, James Linder. Cervical Cancer Control, priorities and new directions. *International Journal of Cancer*. Vol.108. Issue 3. Pages 329-333 [20 January 2004] Wiley-Liss. [24 October 2003] <https://doi.org/10.1002/ijc.11530>
21. Kenneth P. Nephew, Tim Hui-Mig Huang. Epigenetic gene silencing in cancer initiation and progression. *Cancer Letters*. Volume 190. Issue 2. Pages 125-133 [20 February 2003] [https://doi.org/10.1016/S0304-3835\(02\)00511-6](https://doi.org/10.1016/S0304-3835(02)00511-6)
22. Lise M. A. De Strooper, Chris J. L. M. Meijer, Johannes Berkhof, Albertus T. Hesselink, Peter J. F. Snijders, Renske D.M. Steenbergen, Danielle A. M. Heideman. Cancer Prevention Research. Methylation Analysis of the FAM19A4 Gene in Cervical Scrape Is Highly Efficient in Detecting Cervical Crcinomas and Advanced CIN2/3 Lesions. Vol.7(12). p.1251 [December 2014] 10.1158/1940-6207.CAPR-14-0237
23. Lise M.A. De Strooper, Chris J.L.M Mijer, Johannes Berkhof, Albertus T. Hesselink, Peter J.F. Snijders, Renske D.M. STRRNBERGEN, Dainelle A.M. Heideman. Methylation Analysis of the FAM19A4 Gene in Cervical Scrapes Is Highly Efficient in Detecting Cervical Carcinomas and Advanced CIN2/3 Lesions.October 3. 2014
24. Lorincz AT. Cancer diagnostic classifiers based on quantitative DNA methylation. *Mol Diagn* 2014;14:293–305.
25. Louise A. Briton, Joseph F, Fraumeni Jr. Epidemiology of Uterine Cervical Cancer. *Journal of Chronic Diseases*, Vol.39. Issue 12, 1986, p.1051-1065. *Epidemiology and Biostatistics Program, National Cancer Institute, Bethesda, MD 20892, U.S.A.* [15 April 2004] [https://doi.org/10.1016/0021-9681\(86\)90139-6](https://doi.org/10.1016/0021-9681(86)90139-6)
26. Luttmer R, De Strooper LMA, Berkhof J. 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). *Int J Cancer*. 2016;138(4):992–1002

27. *Luttmer R, De Strooper LMA, Dijkstra MG, et al. FAM19A4 methylation analysis in self-samples compared with cervical scrapes for detecting cervical (pre)cancer in HPV-positive women. Br J Cancer. 2016. doi:10.1038/bjc.2016.200*
28. *M.A. Hayat. Methods of Cancer Diagnosis, Therapy and Prognosis. Vol.6. Ovarian Cancer, Renal Cancer, Urogenitary track Cancer, Urinary Bladder Cancer, Cervical Uterine Cancer, Skin Cancer, Leukemia, Multiple Myeloma and Sarcoma. Springer Science+Business Media B.V. 2010*
29. *Management of high-risk HPV-positive women for detection of cervical (pre)cancer Roosmarijn Luttmer, Lise M. A. De Strooper, Renske D. M. Steenbergen, Johannes Berkhof, Peter J. F. Snijders, Daniëlle A. M. Heideman & Chris J. L. M. Meijer (2016) Management of high-risk HPV-positive women for detection of cervical (pre)cancer, Expert Review of Molecular Diagnostics, 16:9, 961-974, DOI: 10.1080/14737159.2016.1217157*
30. *Marc J Williams, Benjamin Werner, Chris P. Barnes, Trevor A. Graham, Andrea Sottoriva. Identification of neutral tumor evolution across cancer types. Nature Genetics 48 pages 238–244. [January 2018]*
31. *Mark H. Schiffman M.D., M.P.H., Louise A, Brinton Ph.D. The Epidemiology of Cervical Carcinogenesis. Volume 76, Issue S10 Supplement: An Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society [15 November 1995] Pages 1888-1901*
32. *Megan A. Clarke, Nicolas Wentzensen, Lisa Mirabello, Arpita Ghosh, Sholom Wacholder, Ariana Harari, Attila Lorincz, Mark Schiffman, Robert D. Burk. Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention. Human papillomavirus DNA methylation as a potential biomarker for cervical cancer. Volume 21. Issue 12. Pages 2125–2137. [December 2012]*
33. *Michael H. Ross. Wojciech Pawlina. Ιστολογία με έγχρωμο άτλαντα. Ιατρικές εκδόσεις Αίτσας. 5η έκδοση. 2013*
34. *Nicholas Wentzensen, Chang Sun, Arpita Ghosh, Walter Kinney, Lisa Mirabello, Sholom Wacholder, Ruth Shaber, Brendon LaMere, Megan Clarke, Attila T. Lorincz, Philip E. Castle, Mark Schiffman, Robert D. Burk. Methylation of HPV18, HPV31, and HPV45 genomes and cervical intraepithelial neoplasia grade 3. Journal of the National Cancer Institute. Volume 104. Issue 22. Pages 1738–1749 [21 November 2012] <https://doi.org/10.1093/jnci/djs425>*

35. *Nicolas Wentzensen, Barbara Fetterman, Philip E. Castle, Mark Schiffman, Shannon N. Wood, Eric Stiemerling, Diane Tokugawa, Clara Bodelon, Nancy Poitras, Thomas Lorey, Walter Kinney. p16/Ki-67 dual stain cytology for detection of cervical precancer in HPV-positive women. JOURNAL of the National Cancer Institute. Volume 107, Issue 12 [December 2015] <https://doi.org/10.1093/jnci/djv257>*
36. *P. Andrew Futreal, Lachlan Coin, Mhairi Marshall, Thomas Down, Timothy Hubbard, Richard Wooster, Nazneen Rahman & Michael R. Stratton. A census of human cancer genes. Nature Reviews Cancer 4, 177-183 Michael R. Stratton. [01 March 2004] <https://www.nature.com/articles/nrc1299#author-information>*
37. *P.R. Wheeler. H. G. Burkitt. V. G. Daniels. P. J. Deakin. Functional Histology. Churchill Livingstone. Longman Group UK Limited 1987. p.303*
38. *Parakrama Chandreasoma. Clive R. Taylor. Concise Pathology. Appleton & Lange 1991. p.794-795*
39. *Partha Basu, Debjani Chowdhury. Cervical cancer screening & HPV vaccination: a comprehensive approach to cervical cancer control. Indian J Med Res 130, pp 241-246. [September 2009] <https://www.researchgate.net/publication/38078262>*
40. *Qiaowen Bu, Sanfeng Wang, Jian Ma, Xiangcheng Zhou, Guiying Hu1, Hua Deng, Xiaoli Sun, Xiaoshan Hong, Hengying Wu, Liang Zhang2, Xiping Luo. The clinical significance of FAM19A4 methylation in high-risk HPV-positive cervical samples for the detection of cervical (pre)cancer in Chinese women. Bu et al. BMC Cancer (2018) 18:1182*
41. *Rakesh Singal, Gordon D. Ginder. DNA Methylation Blood (1999) 93 (12): 4059-4070. https://doi.org/10.1182/blood.V93.12.4059.412k40_4059_4070*
42. *Ralph M. Richart MD. Causes and management of cervical intraepithelial neoplasia. Cancer. Vol.60, Issue S8,1951-1959, p.1954 [15 Oct 1987]*
43. *Roosmarijn Lutter, Lise M. A. Strooper, Renske D. M. Steenbergen, Johannes Berkhof, Peter J. F. Snijders, Danielle A. M. Heideman, Chris J. L. M. Meijer. Management of high-risk HPV-positive women for detection of cervical pre-cancer. Expert Review of Molecular Diagnostics. Volume 16, Issue 9 [2016] <https://doi.org/10.1080/14737159.2016.1217157>*
44. *Wentzensen N, Sherman ME, Schiffman M, et al. Utility of methylation markers in cervical cancer early detection: appraisal of the state-of-the-science. Gynecol Oncol. 2009;112(2):293–299*

45. Wenyan Wang, Ting Li, Xiaolin Wang, Wanxiong Yuan, Yingying Cheng, Heyu Zhang, Enquan Xu, Yingmei Zhang, Shuang Shi, Dalong Ma and Wenling Han. *Research article. FAM19A4 is a novel cytokine ligand of formyl peptide receptor 1 (FPR1) and is able to promote the migration and phagocytosis of macrophages. Cellular & Molecular Immunology (2015)12, 615–624 [11 August 2014] doi:10.1038/cmi.2014.61;*
46. World health organization. *Cervical Cancer and Epidemiology. WHO 2019*
47. World Health organization. *Integrating Health Care for Sexual and Reproductive Health and Chronic Diseases. Comprehensive Cervical Cancer Control: A guide to essential practise. Chapter1. pages 19-22. WHO 2006*
https://books.google.gr/books?hl=en&lr=&id=a4cYeKpbXH8C&oi=fnd&pg=PP2&dq=cervical+cancer+control&ots=JmbSPtn0NN&sig=p-rf9K-hauefQIEmbnKtYVOVgf0&redir_esc=y#v=onepage&q=cervical%20cancer%20control&f=false
48. Xavier Castellsagué. *Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer. Gynecology Oncology. [01 Sep 2008. 110(03 Suppl 2):S4-7] 10.1016/j.ygyno.2008.07.045*
49. Y. Tom Tang, Peter Emtag, Walter D. Funk , Tianhua Hu, Matthew Arterburn, Emily E. J. Park, Fabio Rupp. *TAFAs: a novel secreted family with conserved cysteine residues and restricted expression in the brain. Genomics. Volume 83. pages 727–734 [April 2004] https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2003.10.006*
50. Αντώνης Γκαράς. Ian A Greer-Latin T Cameron-Henry C Kitchener- Andrew Prentice. *Έγχρωμο εγχειρίδιο Μαιευτικής και Γυναικολογίας. Mosby international Limited 2001. Εκδόσεις Παρισιάνου 2008. p. 290-291*
51. Δαβίδ Ρούσσος, Ιωάννης Καλογιαννίδης, Απόστολος Μαμόπουλος, Γεώργιος Μαυροματίδης, Νικόλαος Πραπας. *Εγχειρητική στη Μαιευτική και Γυναικολογία. Εκδόσεις Τζιολα. 2016*
52. Ιωάννης Ε. Μεσσήνης. *Μαιευτική και Γυναικολογία. Ιούνιος 2010, p.47-48*