



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**«Μικροδορυφορική αστάθεια και καρκίνος ενδομητρίου : Συσχέτιση
μοριακών και ανοσοϊστοχημικών ευρημάτων»**

**Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών : «Βιολογία της Αναπαραγωγής –
Βιοδείκτες στη Μαιευτική και Γυναικολογία – Περιγεννητική Ιατρική»**

Διευθυντής ΠΜΣ : Καθηγητής ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ Ι. ΔΑΠΟΝΤΕ

**ΗΛΙΑΝΑ ΝΙΚΟΛΟΥ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

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

ΛΑΡΙΣΑ, ΑΠΡΙΛΙΟΣ 2022



**UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES
FACULTY OF MEDICINE**



**“Microsatellite Instability in endometrial cancer: Correlation of
molecular and immunohistochemical findings”**

Program of Master Sciences:

**“Reproductive Biology – Biomarkers in Obstetrics and Gynecology – Perinatal
Medicine”**

Director of MSc: Professor Alexandros I. Daponte

**ILIANA NIKOLOU
BIOLOGIST**

Submitted to meet part of the requirements
for obtaining the Master Science Diploma

Larissa, April 2022

[2]

Επιβλέπων καθηγητής:

Αλέξανδρος Δαπόντε, Καθηγητής Μαιευτικής και Γυναικολογίας, Τμήματος Ιατρικής, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Τριμελής συμβουλευτική επιτροπή:

Μαρία Σαμαρά, Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής με έμφαση στη Μοριακή Ιστοπαθολογία, Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Αλέξανδρος Δαπόντε, Καθηγητής Μαιευτικής και Γυναικολογίας, Τμήματος Ιατρικής, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Μαρία Σάτρα, Ε.ΔΙ.Π. Βιολογίας-Μοριακής Βιολογίας, Εργαστήριο Βιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής, του Τμήματος Ιατρικής, της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, υπό την επίβλεψη της Επίκουρης Καθηγήτριας Ιατρικής κ. Μαρίας Σαμαρά.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Επιβλέπουσα της παρούσας εργασίας ήταν η Επίκουρη Καθηγήτρια κα. Σαμαρά Μαρία την οποία και ευχαριστώ θερμά για την ευκαιρία που μου έδωσε να εργαστώ στην εργαστηριακή της ομάδα αλλά και για την πολύτιμη καθοδήγησή της σε όλη αυτή τη διατριβή. Με την επιμονή, την υπομονή, τις γνώσεις, την εμπειρία αλλά και την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου, βοήθησε ώστε να έρθει εις πέρας η παρούσα εργασία και να ολοκληρωθεί ο πιο σημαντικός έως τώρα στόχος της ακαδημαϊκής μου πορείας. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς επιτροπής κ. Αλέξανδρο Δαπόντε και κα. Μαρία Σάτρα για την υποστήριξή τους στην εκπόνηση της πτυχιακής αυτής.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Υποψήφια Διδάκτωρ του τμήματος Παπαθανασίου Μαρία, για την αμέριστη βοήθειά της καθ' όλη τη διάρκεια της εργασίας. Η επιστημονική βοήθεια που μου παρείχε ήταν καθοριστική για την εκμάθηση τεχνικών, τη διεξαγωγή των πειραμάτων αλλά και για τις πολύτιμες συμβουλές και γνώσεις που μου έδωσε όσον αφορά το θεωρητικό υπόβαθρο των πειραμάτων. Την ευχαριστώ επίσης για τις αμέτρητες ώρες που περάσαμε στο εργαστήριο με σκοπό την περάτωση της εργασίας, τις συζητήσεις αλλά και την παρέα, καταφέροντας να γίνει το διάστημα αυτό πιο δημιουργικό.

Ευχαριστώ την Δρ. Αναγνώστου Μαρίλη για την πολύ καλή συνεργασία που είχαμε, τις συμβουλές, τις γνώσεις αλλά και τις συζητήσεις που είχαμε κατά τη χρονική αυτή περίοδο.

Ευχαριστώ επίσης θερμά όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομίας αλλά και τις υπόλοιπες μεταπτυχιακές φοιτήτριες που μοιραζόμασταν το εργαστήριο για την βοήθεια, τις συζητήσεις και την άψογη συνεργασία.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω από τα βάθη της καρδιάς μου την οικογένειά μου και τους φίλους μου για την αγάπη, την εμπιστοσύνη, την ενθάρρυνση αλλά και την υποστήριξη που μου παρέχουν κατά τη διάρκεια των σπουδών μου.

ΗΛΙΑΝΑ ΝΙΚΟΛΟΥ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο καρκίνος του ενδομητρίου αποτελεί τον έκτο σε συχνότητα καρκίνο στα θήλεα άτομα. Η ανάπτυξη του όγκου επιτυγχάνεται με ποικίλους τρόπους, μεταξύ των οποίων είναι η συσσώρευση σφαλμάτων στους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA, όπως ο μηχανισμός επιδιόρθωσης εσφαλμένα συζευγμένων βάσεων (MMR). Οι μικροδορυφόροι είναι επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες DNA που βρίσκονται συνήθως σε φυσιολογικά κύτταρα. Σε κύτταρα με μεταλλάξεις στα γονίδια του MMR δημιουργούνται πρωτεΐνες που αποτυγχάνουν να διατηρήσουν την ακεραιότητα του DNA με αποτέλεσμα κάποιες μικροδορυφορικές αλληλουχίες να συσσωρεύουν σφάλματα και να γίνονται μεγαλύτερες ή μικρότερες. Η παρουσία ασυνήθιστα μεγάλων ή βραχέων μικροδορυφόρων χαρακτηρίζεται ως μικροδορυφορική αστάθεια (MSI) που σημαίνει ότι η ανίχνευση MSI σε καρκινικό κύτταρο υποδηλώνει τη μετάλλαξη σε ένα γονίδιο του συστήματος MMR. Στη διαγνωστική πράξη, ο προσδιορισμός της μικροδορυφορικής αστάθειας γίνεται με τη μελέτη χρώσεων ανοσοϊστοχημείας, που αποτελεί και την ενδεδειγμένη μέθοδο, όμως αρκετές ερευνητικές ομάδες εξετάζουν και τη δυνατότητα ανίχνευσης της μικροδορυφορικής αστάθειας μέσω της ενίσχυσης με PCR και μεθόδους ηλεκτροφόρησης. Για το λόγο αυτό, στην συγκεκριμένη διπλωματική εργασία μελετήθηκαν τρεις δείκτες μικροδορυφορικής αστάθειας, οι BAT25, BAT26 και NR27 μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης και επακόλουθης τριχοειδικής ηλεκτροφόρησης με το σύστημα QIAxcel, με σκοπό τον υπολογισμό της μικροδορυφορικής αστάθειας σε ασθενείς με καρκίνο του ενδομητρίου. Απώτερος σκοπός είναι να εξεταστεί εάν η ανίχνευση μικροδορυφορικής αστάθειας των όγκων του ενδομητρίου μέσω τριχοειδικής ηλεκτροφόρησης μπορεί να αποτελέσει αξιόπιστο τρόπο ανίχνευσης σε σχέση με την προτεινόμενη μέθοδο των χρώσεων ανοσοϊστοχημείας. Η παρούσα εργασία παρέχει αρχικές ενδείξεις για τη δυνατότητα χρήσης της ανίχνευσης μικροδορυφορικής αστάθειας μέσω ενίσχυσης με PCR και τριχοειδική ηλεκτροφόρηση. Εκτενέστερες μελέτες και μεγαλύτερο δείγμα ασθενών απαιτούνται για να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα.

Λέξεις κλειδιά: Ενδομήτριο, Καρκίνος ενδομητρίου, μικροδορυφορική αστάθεια, ανεπάρκεια MMR, αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, τριχοειδική ηλεκτροφόρηση

ABSTRACT

Endometrial cancer is the sixth most common gynaecological tumor in developed countries with its incidence constantly increasing. Tumor growth is studied in a variety of ways, including the accumulation of errors in DNA repair mechanisms such as the Mismatch Repair mechanism (MMR). Microsatellites are repeated DNA sequences that are commonly found in normal cells. However, cells with mutations in the MMR genes, fail to maintain this integrity of the DNA during protein synthesis, and result in microsatellite error accumulation with formation of longer or shorter sequences. The presence of abnormally long or short microsatellites is referred to as Microsatellite Instability (MSI), which means that the detection of MSI in a cancer cell indicates a mutation in a gene in the MMR mechanism. MSI is usually detected with immunohistochemistry staining, which considered to be the golden standard for MSI testing. Until recently, it is shown by several research groups that MSI can also be detected with PCR based methods. In this dissertation, three markers for MSI are studied BAT25, BAT26 and NR27 using the polymerase chain reaction, for the amplification of the desired sequences and then capillary electrophoresis with the QIAxcel Advanced system, for the detection of MSI in patient samples. The main objective is to investigate whether the detection of MSI in endometrial cancer by capillary electrophoresis can be a reliable way of detecting MSI compared with the gold standard, immunohistochemistry. The present study provides initial indications for the possibility of using PCR amplification and capillary electrophoresis for the detection of microsatellite instability. However, extensive studies and more samples are needed to have more reliable and translational results.

Key words: Endometrium, Endometrial cancer, Microsatellite instability, MMR deficiency, polymerase chain reaction, capillary electrophoresis

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1.Εισαγωγή.....	9
1.1 Ανατομία και Φυσιολογία Αναπαραγωγικού συστήματος θήλεος ατόμου.....	9
1.2 Εμβρυολογία και φυσιολογία της μήτρας.....	11
1.2.1 Ιστολογία της μήτρας.....	13
1.3 Φυσιολογία ενδομητρίου.....	14
2. Πρόδρομες αλλοιώσεις ενδομητρίου.....	16
2.1 Υπερπλασία του ενδομητρίου (Endometrial Hyperplasia - EH).....	17
2.2 Ενδομητρικοί πολύποδες.....	19
2.3 Ινομώματα ενδομητρίου.....	19
3. Καρκίνος Ενδομητρίου (Endometrial Cancer – EC).....	20
3.1 Επιδημιολογία του καρκίνου του ενδομητρίου.....	20
3.2 Παράγοντες κινδύνου.....	21
3.2.1 Ορμονική θεραπεία υποκατάστασης.....	21
3.2.2 Παχυσαρκία.....	21
3.2.3 Ταμοξιφαίνη.....	21
3.2.4 Ατοκία-Υπογονιμότητα.....	22
3.3 Παθολογοανατομία του καρκίνου του ενδομητρίου.....	22
3.3.1 Καρκίνωμα Ενδομητρίου τύπου Ι.....	22
3.3.1.1 Ενδομητριοειδές αδenoκαρκίνωμα.....	23
3.3.1.1.1 Πλακώδης διαφοροποίηση.....	24
3.3.1.1.2 Λαχνοαδενικός υπότυπος.....	25
3.3.1.1.3 Εκκριτικός υπότυπος.....	25
3.3.1.1.4 Βλενώδης μετάπλαση.....	26
3.3.2 Καρκίνωμα ενδομητρίου τύπου ΙΙ.....	26
3.3.2.1 Ορογόνο καρκίνωμα.....	27
3.3.2.2 Διαυγοκυτταρικό καρκίνωμα.....	28
3.3.3 Μικτά καρκινώματα.....	29
3.4 Καρκίνος του ενδομητρίου και μετάσταση.....	29

3.5 Διάγνωση του καρκίνου του ενδομητρίου.....	29
3.6 Ταξινόμηση και θεραπεία ενδομητρικού καρκίνου.....	30
4. Μοριακή καρκινογένεση στον καρκίνο του ενδομητρίου.....	34
4.1 Μοριακό προφίλ καρκινωμάτων τύπου I.....	37
4.2 Μοριακό προφίλ καρκινωμάτων τύπου II.....	40
5. Μηχανισμοί επιδιόρθωσης DNA	41
5.1 Μηχανισμός επιδιόρθωσης διαμέσου Εκτομής – Νουκλεοτιδίου (NER).....	42
5.2 Μηχανισμός επιδιόρθωσης διαμέσου Εκτομής – Βάσης (BER).....	45
5.3 Μηχανισμός επιδιόρθωσης θραύσης της διπλής έλικας του DNA (DBR).....	47
5.3.1 Μη ομόλογη σύνδεση άκρων (NHEJ).....	49
5.3.2 Ομόλογος Ανασυνδυασμός (HR).....	50
5.4 Μηχανισμός επιδιόρθωσης Εσφαλμένα Συζευγμένων Βάσεων (MMR).....	49
6. Μικροδορυφορική αστάθεια (Microsatellite Instability – MSI).....	51
6.1 Μικροδορυφορική αστάθεια και καρκίνος του ενδομητρίου.....	53
6.2 Προσδιορισμός MSI ανάλογα με τα πειραματικά ευρήματα.....	54
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
ΣΚΟΠΟΣ.....	56
2.ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	57
2.1 Υλικά- Αντιδραστήρια.....	58
2.2 Αποπαραφίνωση του ιστού και απομόνωση DNA.....	59
2.2.1 Αποπαραφίνωση των FFPEΤ δειγμάτων.....	59
2.2.2 Λύση των κυττάρων και απομόνωση του γενωμικού DNA.....	60
2.3 Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός του γενωμικού DNA.....	62
2.4 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction –PCR)...	64
2.5 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.....	66
2.6 Τριχοειδική ηλεκτροφόρηση (Capillary electrophoresis).....	69
3. Αποτελέσματα.....	83
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	93
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	99

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ανατομία και Φυσιολογία Αναπαραγωγικού συστήματος θήλεος ατόμου

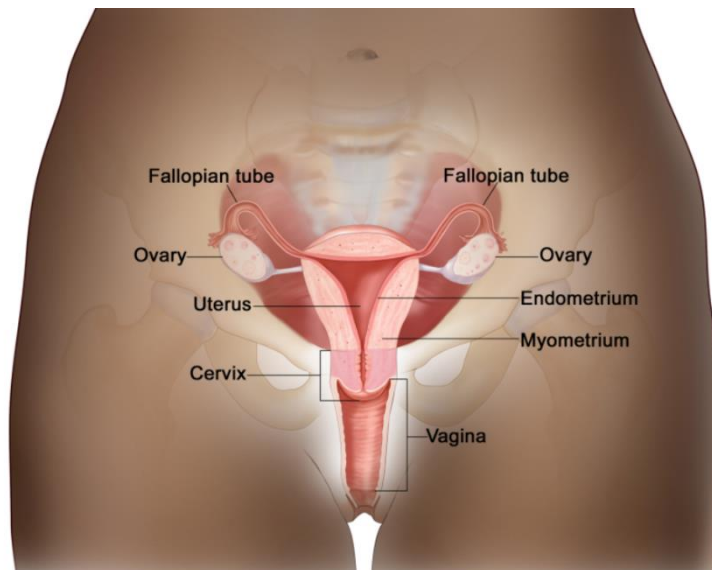
Το γυναικείο γεννητικό σύστημα είναι ένα δυναμικό σύστημα με ποικίλη μορφολογική εμφάνιση που βασίζεται σε ορμονικές επιδράσεις κατά τη διάρκεια του έμμηνου κύκλου, της εγκυμοσύνης καθώς και της γήρανσης των ωοθηκών (Boyd., et al, 2018). Αποτελείται από εσωτερικά και εξωτερικά γεννητικά όργανα που λειτουργούν για την παραγωγή νέων απογόνων.

Τα εξωτερικά γεννητικά όργανα περιλαμβάνουν το αιδοίο (τα μικρά και μεγάλα χείλη), την κλειτορίδα καθώς και το εφηβαίο. Το αιδοίο αποτελεί τμήμα του ουροποιητικού και του γεννητικού συστήματος του θήλεος και θεωρείται ως δευτερεύον γεννητικό όργανο. Συμβάλει στην αναπαραγωγή και η κύρια λειτουργία του έγκειται κατά τη διάρκεια της συνουσίας στην απορρόφηση του και προώθηση στο εσωτερικό της μήτρας του γεννητικού υλικού του άρρενος ατόμου.

Τα έσω γεννητικά όργανα εντοπίζονται εντός της πυέλου και είναι ο κόλπος (vagina), οι ωοθήκες (ovaries), οι σάλπιγγες ή ωαγωγοί (fallopian tubes) και η μήτρα (uterus) (Εικόνα 1).

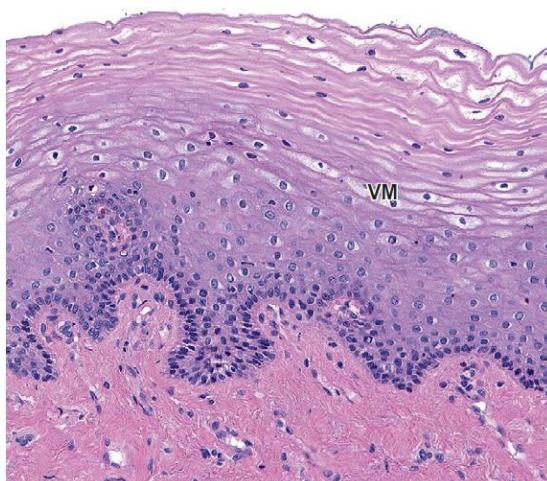
Ο κόλπος εκτείνεται μεταξύ του τραχήλου της μήτρας και του αιδοίου και αποτελεί έναν ινομυώδη, ελαστικό, κυλινδρικό σωλήνα μήκους 6 -

9 cm και πλάτους 3 - 4 cm στις άτοκες, ενώ το πλάτος φτάνει μέχρι και τα 7 cm στις πολύτοκες. Το άνοιγμα του κόλπου εντοπίζεται στην περινεϊκή περιοχή, μια περιοχή μεταξύ του στομίου της ουρήθρας πρόσθια και του στομίου του πρωκτού οπίσθια



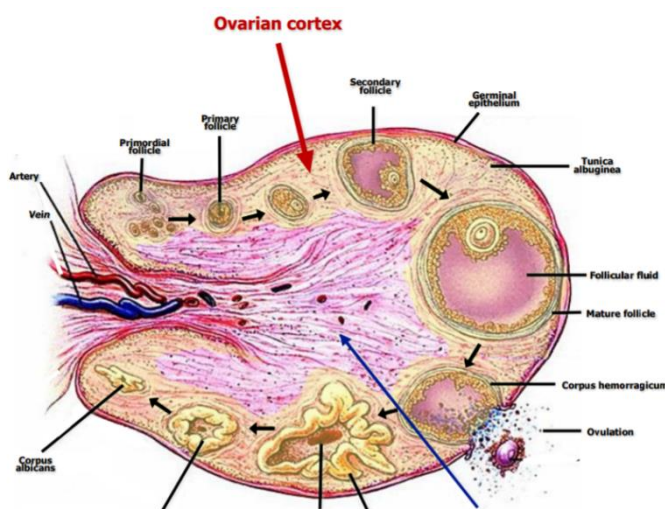
Εικόνα 1 : Γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα - έσω γεννητικά όργανα. Πηγή :Ovarian, Fallopian Tube, and Primary Peritoneal Cancer Screening, 2021

(Εισαγωγή στη Φυσιολογία του ανθρώπου , Sherwood et al) . Ο κόλπος αποτελείται από τρεις στιβάδες: τον βλεννογόνο, την ινομυώδη στιβάδα και τον εξωτερικό χιτώνα. Ο βλεννογόνος επενδύεται από πολύστιβο πλακώδες επιθήλιο και χόριο πλούσιο σε ελαστικές ίνες και αιμοφόρα αγγεία, χωρίς αδένες. Η ινομυώδης στιβάδα αποτελείται από κυκλικά διατεταγμένες δεσμίδες λείων μυϊκών ινών εσωτερικά και επιμήκεις λείες μυϊκές ίνες εξωτερικά (**Εικόνα 2**). Γύρω από την περιοχή του παρθενικού υμένα η ινομυώδης στιβάδα ενισχύεται από γραμμωτές μυϊκές ίνες. Ο εξωτερικός χιτώνας αποτελείται από πυκνό ινοκολλαγονώδη ιστό με άφθονες ελαστικές ίνες (Rendi et al . 2012) .



Εικόνα 2. Βλεννογόνος του κόλπου - Vaginal Mucosa (VM) Πηγή: Rendi H., et al. 2012.

Το ζεύγος των ωοθηκών χαρακτηρίζεται ως τα πρωτογενή αναπαραγωγικά όργανα του γυναικείου αναπαραγωγικού συστήματος και αποτελούν τους γεννητικούς αδένες της γυναίκας καθώς παράγουν τους γαμέτες και τις αναπαραγωγικές ορμόνες (οιστρογόνα και προγεστερόνη) . Έχουν ωοειδές σχήμα και οι διαστάσεις τους είναι 1cm*2cm*3cm σε πάχος , πλάτος και μήκος αντίστοιχα. Το βάρος τους κυμαίνεται από 3 έως και 10 γραμμάρια. Το μέγεθός τους επηρεάζεται από τις ορμόνες που παράγονται κατά τη διάρκεια των διαφόρων φάσεων του έμμηνου κύκλου και την εξωγενή χορήγηση ορμονικών σκευασμάτων. Καλύπτονται εξωτερικά από μονόστιβο πλακώδες μεσοθήλιο το οποίο είναι συνεχές με το μονόστιβο πλακώδες επιθήλιο που καλύπτει την περιτοναϊκή κοιλότητα και στερεώνονται με δυο συνδέσμους στη μήτρα και το περιτόναιο (Boyd ., et al, 2018). Η ωοθήκη απαρτίζεται από την πύλη, τον φλοιό (ovarian cortex) και τον

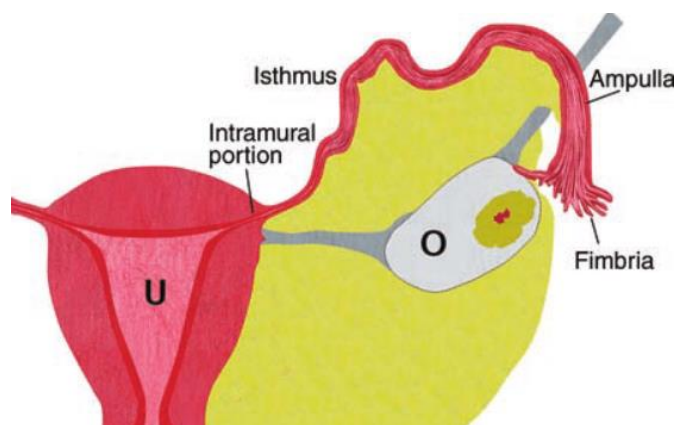


Εικόνα 3: Ανατομία της ωοθήκης Πηγή :Silvestris et al., 2020

μυελό (stromal medulla) (**Εόνα 3**). Η ωθηκική πύλη συνδέεται με τον μυελό και εξασφαλίζει την είσοδο και έξοδο των αγγείων και των νεύρων. Ο μυελός καταλαμβάνει ένα μικρό τμήμα της ωθήκης κεντρικά και αποτελείται από αγγειοβριθή χαλαρό συνδετικό ιστό. Ο φλοιός αποτελεί το κύριο τμήμα της ωθήκης και περιλαμβάνει το στρώμα και τα ωθυλάκια.

Το ζεύγος των ωαγωγών ή σαλπίγγων συνδέουν τη μήτρα με τις ωθήκες. Είναι κοίλα όργανα και το μέγεθός τους κυμαίνεται από 7-12cm και πλάτος 3-4mm. Προσλαμβάνουν το ωάριο, μετά την ωορρηξία, από τις ωθήκες και το μεταφέρουν στη μήτρα, εξασφαλίζοντας το κατάλληλο περιβάλλον για τη γονιμοποίηση. Κάθε ωαγωγός από τη μήτρα προς την ωθήκη αποτελείται από 4 μέρη: το διάμεσο τμήμα (intramural portion), τον ισθμό (isthmus), τη λήκυθο (ampulla) και τον κώδωνα (infundibulum) (**Εικόνα 4**). Το

διάμεσο τμήμα βρίσκεται εντός του τοιχώματος της μήτρας και σχηματίζει τα στόμια των σαλπίγγων στην ενδομήτρια κοιλότητα. Ο ισθμός αποτελεί ένα στενό συνδετικό τμήμα μεταξύ της μήτρας και της σάλπιγγας. Η λήκυθος είναι το



Εικόνα 4: Ανατομία σάλπιγγας Πηγή: Kim et al, 2009.

ευρύτερο και μακρύτερο τμήμα της σάλπιγγας ενώ ο κώδωνας αποτελεί το στόμιο των σαλπίγγων το οποίο επικοινωνεί με την περιτοναϊκή κοιλότητα και περιβάλλεται από δακτυλιοειδείς προεκβολές, τους κροσσούς (fimbria) οι οποίοι αυξάνουν την επιφάνεια της σάλπιγγας για τη λήψη του ωαρίου. Ιστολογικά, το τοίχωμα των σαλπίγγων αποτελείται από δύο στιβάδες μυϊκού τοιχώματος, μία επιμήκη στιβάδα εξωτερικά και μία κυκλωτή στιβάδα εσωτερικά. Οι μεταβολές των ορμονών που παρατηρούνται κατά τη διάρκεια του εμμηνορρυσιακού κύκλου προκαλούν μεταβολές στο επιθήλιο καθώς και στο σαλπινγικό υγρό.

1.2 Εμβρυολογία και φυσιολογία της μήτρας

Στα θήλα εμβρυα, οι παραμεσονεφρικοί πόροι (του Muller) κατέχουν κύριο ρόλο στην ανάπτυξη του γεννητικού συστήματος. Αναπτύσσονται πλευρικά των γονάδων και των μεσονεφρικών πόρων. Αφορούν αμφοτερόπλευρες εκβλαστήσεις του μεσοθηλίου των πλαγίων επιφανειών του μεσόνεφρου. Τα άκρα των εκβλαστήσεων αυτών συγκλίνουν

και τελικά συμφύονται με αποτέλεσμα τον σχηματισμό των παραμεσονεφρικών πόρων. Τα κρανιακά τμήματα των πόρων αυτών σχηματίζουν τους μητριάιους σωλήνες. Το άκρο του κάθε μητριάιου σωλήνα ανοίγει στην περιτοναϊκή κοιλότητα. Στη συνέχεια έχουμε συνένωση των παραμεσονεφρικών πόρων, η οποία συμβαίνει στην 8^η εβδομάδα της κύησης. Ο πόρος του Wolf ατροφεί και εξαφανίζεται εκτός από ένα μικρό τμήμα στο κεφαλικό άκρο και ένα άλλο στο ουραίο άκρο, από το οποίο μπορεί να σχηματιστεί στο κατώτερο τμήμα του κολεού μικρή κύστη, γνωστή ως κύστη του Gartner.

Η μήτρα του εμβρύου μπορεί να ανιχνευθεί απεικονιστικά στη 19^η εβδομάδα της κύησης. Η οργανογένεση της μήτρας αποτελείται από 1) τον σχηματισμό και οργάνωση του ενδομητρίου, 2) τη διαφοροποίηση και ανάπτυξη του μυομητρίου και 3) την ανάπτυξη των ενδομητρικών αδένων, η οποία αρχίζει στην εμβρυική ζωή, και ολοκληρώνεται στην εφηβεία.

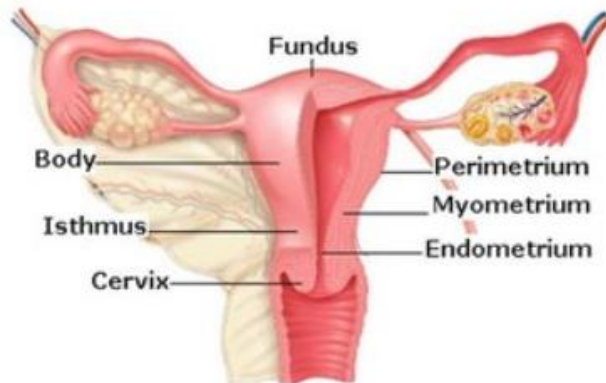
Κατά την εμβρυική ζωή, το ενδομήτριο αποτελείται από μονόστιβο κυλινδρικό επιθήλιο, το οποίο σχηματίζει εγκολπώσεις, οι οποίες αφορούν τις πρόδρομες μορφές των ενδομητρικών αδένων. Στο νεογνό, το επιφανειακό επιθήλιο είναι μονόστιβο, χαμηλό κυλινδρικό, ενώ οι ενδομητρικοί αδένες είναι σπάνιοι και περιορίζονται στο επιπολής στρώμα. Από τη γέννηση έως την πρώιμη εφηβεία το ενδομήτριο αναπτύσσεται αργά. Στην ηλικία των 6 ετών, οι αδένες παρατηρούνται στο ήμισυ περίπου της έκτασης του ενδομητρίου, ενώ στην εφηβεία το ενδομήτριο είναι πλήρως αναπτυγμένο.

Η κύρια στήριξη της μήτρας είναι ο κόλπος και το περιτόναιο. Στην στήριξή της συμβάλλουν : το περιτόναιο, οι ιερομητρικοί σύνδεσμοι και μύες, οι πλατείς σύνδεσμοι, το παραμήτριο και οι στρογγυλοί σύνδεσμοι της μήτρας. Όσον αφορά στην αγγείωση της μήτρας, η αιμάτωση γίνεται από τις μητριάιες αρτηρίες, οι οποίες αποτελούν κλάδους των έσω λαγόνιων αρτηριών. Σε μικρότερο βαθμό αιματώνεται από τις ωθηκικές αρτηρίες, οι οποίες αποτελούν κλάδους της αορτής. Επιπρόσθετα, υπάρχει ένα πλούσιο φλεβικό δίκτυο που περιβάλλει τον κόλπο και επικοινωνεί με το κυστικό, αιδοϊκό και αιμορροϊδικό φλεβικό πλέγμα, τα οποία εκβάλλουν στις έσω λαγόνιες φλέβες.

1.2.1 Ιστολογία της μήτρας

Η μήτρα (uterus) , είναι ένα κοίλο όργανο με παχύ μυϊκό τοίχωμα που φιλοξενεί το έμβρυο κατά τη διάρκεια της κύησης και το εξωθεί κατά τον τοκετό στο τέλος της κύησης. Βρίσκεται μεταξύ της ουροδόχου κύστης και του ορθού , το μήκος της κυμαίνεται από 6 -8 cm και το βάρος της είναι περίπου 70 γραμμάρια. Το μέγεθος της ποικίλλει ανάλογα με την ορμονική κατάσταση , την παρουσία κύησης , προηγούμενες εγκυμοσύνες και με την παρουσία

παθολογικών καταστάσεων (λειομυώματα). Αποτελείται από τρία τμήματα: το σώμα της μήτρας (body of the uterus) , τον τράχηλο (cervix) και τον ισθμό (isthmus) το μέρος που διαχωρίζει το σώμα από τον τράχηλο (**Εικόνα 5**). Το σώμα της μήτρας αποτελείται από το περιμήτριο, το μυομήτριο και το



Εικόνα 5 : Ανατομία της μήτρας. Πηγή : Ανατομία του γεννητικού συστήματος της γυναίκας- Παναγιώτης Χριστόπουλος.

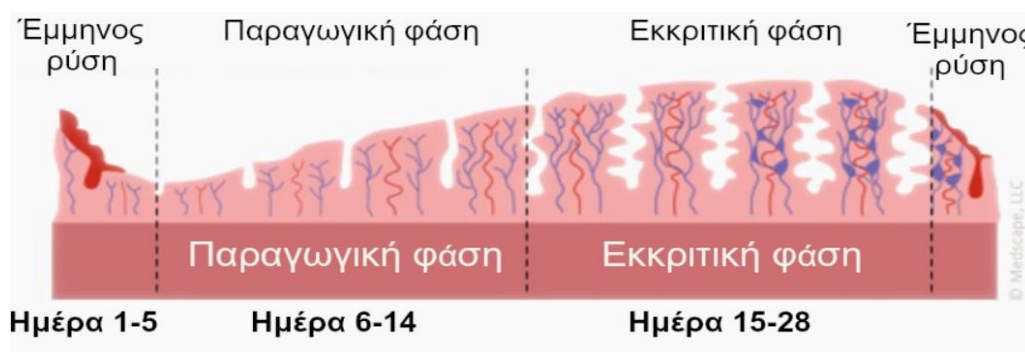
ενδομήτριο . Το περιμήτριο αποτελεί τον ορογόνο χιτώνα της μήτρας και είναι η λεπτή εξωτερική επένδυση αυτής. Το μυομήτριο αποτελεί τον παχύτερο χιτώνα της μήτρας και παρατηρούνται δεσμίδες λείων μυϊκών ινών που χωρίζονται με συνδετικό ιστό. Το ενδομήτριο επενδύει τη μήτρα εσωτερικά και αποτελείται από αδενικού τύπου μονόστιβο κυλινδρικό επιθήλιο. Από την εφηβεία μέχρι και την εμμηνόπαυση , υπό την επίδραση των στεροειδών ορμονών της ωοθήκης, υφίσταται κυκλικές μεταβολές με απόπτωση του επιφανειακού τμήματος (λειτουργική στοιβάδα, επιπολής) του ενδομητρίου , η λεγόμενη έμμηνος ρύση και αναγέννηση του από το βασικό τμήμα (εν τω βάθει στοιβάδα). Ο τράχηλος αποτελεί το κατώτερο τμήμα της μήτρας. Πρόκειται για έναν ινομυώδη σωλήνα ο , ο οποίος επενδύεται από δυο είδη επιθηλίων. Ο εξωτράχηλος (ectocervix) καλύπτεται περιφερικά από μη κερατινοποιημένο πολύστιβο πλακώδες επιθήλιο (squamous cells), ενώ ο ενδοτράχηλος (endocervix) επενδύεται από αδενικού τύπου μονόστιβο κυλινδρικό επιθήλιο (glandular cells). Το αδενικού τύπου επιθήλιο είναι βλεννοεκκριτικό και ευθύνεται για την παραγωγή της τραχηλικής βλέννας. Μεταξύ των δύο επιθηλίων υπάρχει η ζώνη μετάπλασης η οποία χαρακτηρίζεται από μεταπλαστικό επιθήλιο (μεταβατικό, το οποίο προκύπτει από την μετάπτωση του αδενικού κυλινδρικού επιθηλίου σε πλακώδες επιθήλιο).

1.3 Φυσιολογία ενδομητρίου

Το ενδομήτριο επενδύεται από μονόστιβο κυλινδρικό επιθήλιο, με κροσσωτά και εκκριτικά κύτταρα τα οποία επενδύουν τους σωληνοειδείς μητριάιους αδένες που κατανέμονται σε όλο το πάχος του ενδομητρίου. Το χόριο, καλείται και ενδομητρικό στρώμα, είναι πλούσιο σε κολλαγόνες ίνες τύπου II, ινοβλάστες και θεμέλια ουσία. Το ενδομήτριο διαφοροποιείται σε δυο ιστολογικά και λειτουργικά διακριτές στιβάδες: τη βασική και τη λειτουργική στιβάδα. Η βασική στιβάδα βρίσκεται σε γεινίαση με το μυομήτριο και περιλαμβάνει στρώμα και τα βαθύτερα τμήματα των αδένων. Υφίσταται ελάχιστες μεταβολές κατά τη διάρκεια του εμμηνορρυσιακού κύκλου. Η λειτουργική στιβάδα αποτελείται από στρώμα με αυξημένη θεμέλια ουσία και φέρει το ανώτερο τμήμα των αδένων και το καλυπτήριο επιθήλιο. Αποπίπτει κατά την έμμηνο ρύση.

Οι αδένες και το στρώμα του ενδομητρίου υπόκεινται σε επίδραση από τα οιστρογόνα και την προγεστερόνη, ορμόνες οι οποίες εκκρίνονται από την ωοθήκη, κατά τη διάρκεια του εμμηνορρυσιακού κύκλου. Οι ομαλές, κυκλικές μεταβολές της μορφολογίας του ενδομητρίου διαμορφώνουν το κατάλληλο περιβάλλον για την εμφύτευση του γονιμοποιημένου ωαρίου. Η ακριβής μορφολογική εκτίμηση του ενδομητρίου και των φυσιολογικών κυκλικών αλλαγών του, που αντανακλά στην ωοθηκική λειτουργία, έχει μεγάλη σημασία για την αναγνώριση της ωορρηξίας και της παθολογίας του ενδομητρίου.

Ως αρχή του εμμηνορρυσιακού κύκλου θεωρείται η μέρα που εμφανίζεται η έμμηнос ρύση και η διάρκεια είναι περίπου 28 ημέρες. Η φάση της εμμηνορρυσίας διαρκεί περίπου 4-5 ημέρες. Στο στάδιο αυτό, το ενδομήτριο και συγκεκριμένα η λειτουργική στιβάδα αυτού αποπίπτει με τη μορφή της αιμορραγίας προκειμένου να αντικατασταθεί από τη νέα λειτουργική στιβάδα στον επόμενο κύκλο. Στη συνέχεια ακολουθούν οι επόμενες φάσεις του κύκλου, η παραγωγική και η εκκριτική φάση (Εικόνα 6).



Εικόνα 6: Φάσεις του εμμηνορρυσιακού κύκλου. Πηγή : Έμμηнос ρύση – Αλμαλόγλου Κωνσταντίνος.

Παραγωγική φάση

Κατά τη παραγωγική φάση γίνεται η αναγέννηση και η αναδόμηση του ενδομητρίου που έχει αποπέσει εν μέρει κατά την προηγούμενη έμμηνο ρύση. Η φάση αυτή χαρακτηρίζεται από την πάχυνση του ενδομητρίου από 1-2 έως 10-12mm, καθώς και από την ανάπτυξη των ωοθυλακίων λόγω της επίδρασης των οιστρογόνων. Παράλληλα, αυξάνουν σε μέγεθος και οι αδένες. Η φυσιολογική παραγωγική φάση διαρκεί από την 6^η έως τη 14^η ημέρα (ωοθυλακιορρηξία) του κύκλου και διακρίνεται σε πρόιμη, μέση και όψιμη.

Κατά την πρόιμη φάση, η λειτουργική στοιβάδα περιέχει μικρούς, σωληνοειδείς αδένες και πυκνό στρώμα, αποτελούμενο από κύτταρα ατρακτόμορφου σχήματος με παρουσία μιτώσεων. Στην επόμενη φάση οι αδένες είναι επιμήκεις και επενδύονται από κυλινδρικό επιθήλιο. Το στρώμα είναι οιδηματώδες και παρατηρούνται άφθονες μιτώσεις. Η όψιμη φάση, πριν την ωοθυλακιορρηξία χαρακτηρίζεται από την παρουσία ελικοειδών αδένων, με ψευδοπολύστοιβο κυλινδρικό επιθήλιο και μέτρια πυκνό στρώμα. Πολλές φορές παρατηρείται έξοδος ερυθροκυττάρων από το υποεπιθηλιακά τριχοειδή και μικρή αιμορραγία (μεσοκαταμήνια ρύση).

Εκκριτική φάση

Μετά την ωοθυλακιορρηξία, το ενδομήτριο δέχεται την επίδραση τόσο των οιστρογόνων όσο και την προγεστερόνης που εκκρίνονται από το ωχρό σωματίο. Η εκκριτική φάση έχει διάρκεια από την 15^η έως και την 26^η ημέρα. Το κύριο χαρακτηριστικό της εν λόγω φάσης είναι η έκκριση γλυκογόνου μέσα στους αδένες του ενδομητρίου υπό την επίδραση της προγεστερόνης, γεγονός που διευκολύνει την μετέπειτα εμφύτευση του εμβρύου.

Κατά τη διάρκεια αυτής, οι αδένες γίνονται πιο ελικοειδείς και τα αγγεία φθάνουν μέχρι και την επιφάνεια του ενδομητρίου, ενώ τα κύτταρα του στρώματος μεταβάλλονται σε ευμεγέθη πολυγωνικά. Το στρώμα γίνεται οιδηματώδες και γενικώς το ενδομήτριο έχει τη μεγαλύτερη ανάπτυξη του περίπου την 21^η ημέρα του κύκλου σε κύκλο 28 ημερών.

Το ενδομήτριο τώρα διακρίνεται σαφώς σε δύο στοιβάδες, τη βασική και τη λειτουργική. Η βασική περιέχει τα εν τω βάθει τμήματα των αδένων, ενώ στη λειτουργική στοιβάδα διακρίνουμε δυο επί μέρους στοιβάδες, τη συμπαγή επιφανειακά και τη σπογγώδη βαθύτερα με τους πολλούς αδένες. Προς το τέλος του κύκλου η σπογγώδης στοιβάδα συρρικνώνεται και οι σπειροειδείς αρτηρίες, λόγω ελάττωσης

των επιπέδων της προγεστερόνης συσπώνται με αποτέλεσμα την ισχαιμία των επιπολής στοιβάδων. Ακολουθως, με την αύξηση των επιπέδων των οιστρογόνων, τα αγγεία διευρύνονται και πάλι και ακολουθεί αιμορραγία και απόπτωση της σπογγώδους στοιβάδας.

Εμμηνορρυσιακή φάση

Προς το τέλος της ωχρινικής φάσης το ενδομήτριο συρρικνώνεται, το πάχος του μικραίνει και αρχίζουν οι υπόστροφες αλλοιώσεις. Αυτό οφείλεται στην ελάττωση των οιστρογόνων και της προγεστερόνης στο αίμα. Με τη συρρίκνωση, η κυκλοφορία στα αρτηρίδια διαταράσσεται, και δημιουργείται φλεβική στάση, με αποτέλεσμα να δημιουργείται ισχαιμία του ενδομητρίου, εξαγγείωση του αίματος στο στρώμα και ενδιάμεση αιμορραγία. Η περαιτέρω ισχαιμία οδηγεί σε νέκρωση και απόπτωση του ενδομητρίου, το οποίο εξέρχεται μαζί με αίμα μέσω του κόλπου και οδηγεί στην έμμηνο ρύση.

2. Πρόδρομες αλλοιώσεις ενδομητρίου

Συχνά, τα θήλεα άτομα διαγιγνώσκονται με ύποπτες βλάβες στο ενδομήτριο, εξαιτίας συμπτωμάτων όπως η μη φυσιολογική αιμορραγία της μήτρας ή η απουσία γονιμότητας. Για την οριστική διάγνωση της παθολογικής κατάστασης χρησιμοποιείται είναι διακολπικό υπερηχογράφημα ή διαγνωστική υστεροσκόπηση. Το διακολπικό υπερηχογράφημα είναι η αρχική εξέταση μετά τη διάγνωση της βλάβης. Ωστόσο, παρουσιάζει χαμηλή εξειδίκευση και δεν επιτρέπει τη λήψη του παθολογικού ιστού. Κατά την εξέταση μπορεί να χρησιμοποιηθεί έγχρωμο Doppler, καθώς επίσης και τεχνικές 3D απεικόνισης για την καλύτερη δυνατή εκτίμηση των ευρημάτων. Εάν για την τελική γνωμάτευση είναι αναγκαία η λήψη δείγματος, τότε απαιτείται περαιτέρω υστεροσκόπηση. Η μέθοδος αυτή είναι ελάχιστα επεμβατική, και επιτρέπει να εξετάσουμε την κοιλότητα της μήτρας, την ύπαρξη ενδομητριας παθολογίας, τον τράχηλο και τα στόμια των σαλπίνγων στη μήτρα.

Οι αλλοιώσεις του ενδομητρίου μπορούν να διαχωριστούν σε πέντε μεγάλες κατηγορίες: την ενδομήτρια υπερπλασία χωρίς ατυπία, την ενδομήτρια υπερπλασία με ατυπία, τους ενδομητρικούς πολύποδες, τα υποβλεννογόνια ινομύματα, καθώς και τον καρκίνο του ενδομητρίου (Zhang et al, 2021).

2.1 Υπερπλασία του ενδομητρίου (Endometrial Hyperplasia - EH)

Η υπερπλασία του ενδομητρίου αποτελεί ένα φάσμα μορφολογικών αλλοιώσεων του ενδομητρίου, οι οποίες χαρακτηρίζονται από καλοήθειες έως προνεοπλασματικές βιολογικές συμπεριφορές. Πρόκειται για μια συχνή διαταραχή, που οφείλεται στην έκθεση σε εξωγενή ή ενδογενή οιστρογόνα σε συνδυασμό με ανεπάρκεια προγεστερόνης. Η αλλοίωση αυτού του είδους στο ενδομήτριο αποτελεί μια πρόδρομη κατάσταση του καρκινώματος του ενδομητρίου (Singh et al,2022).

Παρατηρείται κυρίως σε γυναίκες περιεμμηνόπαυσιακής ηλικίας, χωρίς ωστόσο να αποκλείεται η εμφάνισή της και σε γυναίκες νεότερης ηλικίας. Οι παράγοντες οι οποίοι ευνοούν την εμφάνιση αυτής είναι οι επαναλαμβανόμενοι ανωορρηκτικοί κύκλοι, η εξωγενής χορήγηση οιστρογόνων επί απουσίας προγεστερονικής επίδρασης, η περιφερική μετατροπή των ανδρογόνων σε οιστρογόνα στο λιπώδη ιστό των γυναικών με παχυσαρκία, το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών. Εκδηλώνεται κλινικά με δυσλειτουργική μητρορραγία αν και συχνά είναι ασυμπτωματική (Wolfman et al,2010).

Η υπερπλασία του ενδομητρίου ταξινομείται σε δύο ομάδες με βάση την παρουσία κυτταρολογικής ατυπίας, σύμφωνα με την αναθεωρημένη ταξινόμηση του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (ΠΟΥ) του 2014 :

1. Υπερπλασία χωρίς ατυπία
2. Υπερπλασία με ατυπία / ενδομητρική ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία.

Οι προαναφερόμενες ομάδες χαρακτηρίζονται από ανομοιόμορφο σχήμα και μέγεθος των αδένων και παρουσία μιτώσεων.

Υπερπλασία χωρίς ατυπία

Οι αδένες έχουν ανώμαλο σχήμα και ποικίλο μέγεθος, ενώ πολλοί είναι κυστικά διατεταμένοι. Δεν παρατηρείται πυρηνική ατυπία. Χαρακτηρίζονται από διακλαδώσεις και ενδοαυλικές προεκβολές του επιθηλίου. Διατάσσονται διάσπαρτα μέσα στο κυτταροβριθές στρώμα. Τα επιθηλιακά κύτταρα εμφανίζουν ψευδοπολυστιβάδωση και είναι επιμήκη ή ωοειδούς σχήματος. Σημειώνεται ποικίλη μιτωτική δραστηριότητα. Συνοδεύεται επίσης από την παρουσία κροσσών στα αδενικά κύτταρα και την ύπαρξη διατεταμένων φλεβιδίων σε θέσεις κάτω από το επιφανειακό επιθήλιο. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι αλλοιώσεις της υπερπλασίας χωρίς ατυπία ενδέχεται να είναι εστιακές

και να συνυπάρχουν με αλλοιώσεις παραγωγικού ενδομητρίου που δεν ωριμάζει ομαλά.

Χωρίς κατάλληλη θεραπεία, ένα ποσοστό της τάξης 1-5% ενδέχεται να εξελιχθεί σε νεόπλασμα σε μια περίοδο 15 ετών. Αντιθέτως, η χορήγηση θεραπείας - συνήθως προγεσταγόνα- προκαλεί υποστροφή των ευρημάτων σε ένα ποσοστό της τάξης περίπου 80-85%.

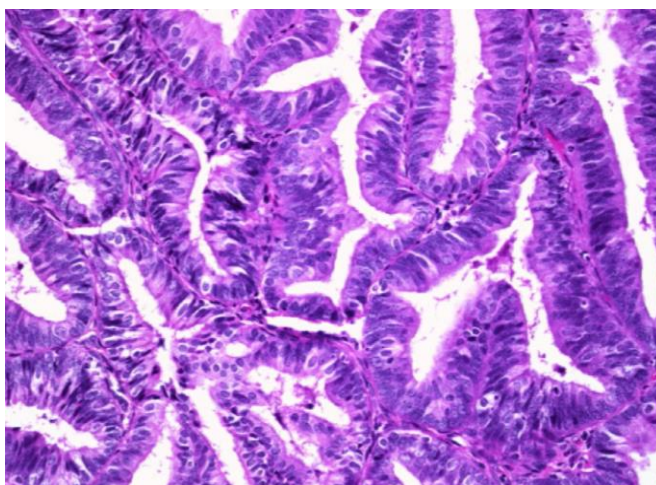


Εικόνα 7. Υπερπλασία χωρίς ατυπία. Πηγή: Salim et al,2011

Υπερπλασία με ατυπία / ενδομητρική ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία

Στην ομάδα αυτή η διάγνωση βασίζεται στην παρουσία της πυρηνικής ατυπίας. Οι πυρήνες εμφανίζουν πολυστιβάδωση, με απώλεια της πολικότητας. Χαρακτηρίζονται από διόγκωση, ανώμαλο σχήμα, εμφανή πυρήνια και αδρή κατανομή της χρωματίνης. Η μιτωτική δραστηριότητα ποικίλει. Οι αδένες έχουν ανώμαλο σχήμα, φέρουν θηλώδεις προσεκβολές εντός των αυλών και είναι συχνά διατεταμένοι. Επίσης, δεν είναι σπάνια η πλακώδης μετάπλαση του επιθηλίου, χωρίς ωστόσο να επηρεάζεται η πρόγνωση.

Οι άτυπες υπερπλασίες χαρακτηρίζονται εν γένει ως προκαρκινικές αλλοιώσεις. Αποτελούν το 40% περίπου των πρόδρομων αλλοιώσεων που ενδέχεται να εξελιχθούν σε νεόπλασμα. Σε ορισμένες περιπτώσεις, η άτυπη υπερπλασία, αναπτύσσεται σε υπόστρωμα υπερπλασίας χωρίς ατυπία.

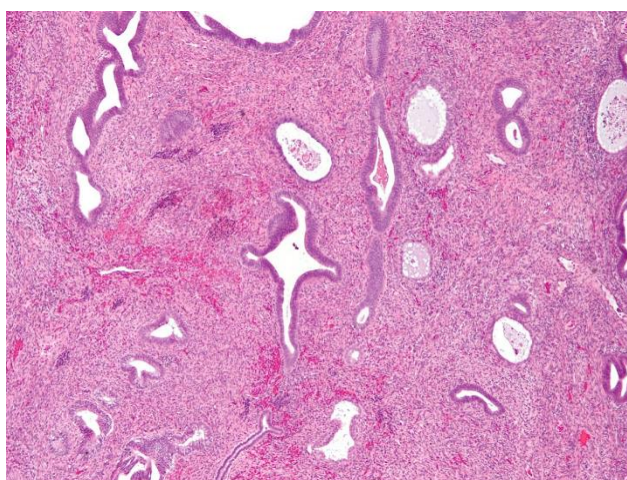


Εικόνα 8. Υπερπλασία με ατυπία. Πηγή: Salim et al,2011

Η πλειονότητα των άτυπων υπερπλασιών θα υποχωρήσει ύστερα από θεραπεία με προγεστερόνη, ωστόσο παρατηρείται υψηλό ποσοστό υποτροπών κατά τη διακοπή της θεραπείας. Αξίζει να σημειωθεί επίσης, ότι σε περι-εμμηνοπαυσιακές γυναίκες, οι οποίες υπεβλήθησαν σε υστερεκτομή λόγω άτυπης υπερπλασίας, ένα ποσοστό της τάξης του 62% παρουσίασε συνυπάρχοντα καρκίνο του ενδομητρίου.

2.2 Ενδομητρικοί πολύποδες

Οι πολύποδες του ενδομητρίου αποτελούν ένα είδος υπερπλασίας του ενδομητρίου, με διαστάσεις που κυμαίνονται από μερικά χιλιοστά έως κάποια εκατοστά. Σε ορισμένες περιπτώσεις προβάλλουν μέσω του τραχηλικού στομίου και μπορούν να επεκταθούν μέχρι και τον κόλπο. Μικροσκοπικά, περιέχουν πυκνό ινώδη ιστό (στρώμα), μεγάλα και πεπαχυσμένα τοιχώματα αγγείων και ποικίλου μεγέθους και σχήματος αδένες.



Εικόνα 9. Ενδομητρικός πολύποδας. Πηγή: Salim et al, 2011

Τα επίπεδα των οιστρογόνων και της προγεστερόνης συμβάλλουν στην επιμήκυνση των ενδομητρικών αδένων, του στρώματος και των σπειροειδών αρτηριών που προσδίδουν τη χαρακτηριστική αυτή εμφάνιση στους πολύποδες. Οι περισσότεροι ενδομητρικοί πολύποδες είναι καλοήθεις, ωστόσο, σε ένα ποσοστό της τάξης 0-13% ενδέχεται να γίνουν υπερπλαστικοί με κακοήθη πρόγνωση (Salim et al, 2011).

2.3 Ινομώματα ενδομητρίου

Τα ινομώματα του ενδομητρίου αποτελούν καλοήθεις όγκους του θήλεος γεννητικού συστήματος, τα οποία αναπτύσσονται στη μήτρα και στους περιβάλλοντες ιστούς της. Ιστολογικά, περιβάλλονται από κάψα που ξεχωρίζει από την υπόλοιπη μήτρα και περιλαμβάνουν υπερπλαστικές μυϊκές ίνες που αυξάνονται σε όγκο. Φέρουν σκληρό ινώδη ιστό και διαταράσσουν την υφή και τη λειτουργία της μήτρας αναλόγως της θέσης και του μεγέθους τους.

Σπάνια, σε ποσοστό μικρότερο του 1.5%, ενδέχεται να εξαλλαγούν σε κακοήθη νεοπλασμάτα της μήτρας που καλούνται ‘σαρκώματα’, ιδιαίτερα σε εμμηνοπαυσιακές γυναίκες ή σε περιπτώσεις που το ινομύωμα αναπτύσσεται πολύ γρήγορα.

3. Καρκίνος Ενδομητρίου (Endometrial Cancer – EC)

Ο καρκίνος του ενδομητρίου αποτελεί πρωτοπαθές, κακόηθες επιθηλιακό νεόπλασμα, αδενικής διαφοροποίησης. Είναι η συχνότερη κακοήθεια του γυναικείου γεννητικού συστήματος.

3.1 Επιδημιολογία του καρκίνου του ενδομητρίου

Ο καρκίνος του ενδομητρίου αποτελεί το συχνότερο κακόηθες νεόπλασμα του θήλεος γεννητικού συστήματος στις ανεπτυγμένες χώρες με αυξανόμενο επιπολασμό και το δεύτερο συχνότερο καρκίνωμα στις αναπτυσσόμενες χώρες, μετά τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας. Το 2018, καταγράφηκαν περισσότερες από 382.000 νέες περιπτώσεις παγκοσμίως, ενώ περίπου 90.000 γυναίκες κατέληξαν από τον εν λόγω καρκίνο (International Agency for Research in Cancer).

Η επίπτωση της νόσου είναι μεγαλύτερη στη Βόρεια Αμερική και στην Ευρώπη καθώς αναφέρονται περίπου 22 και 12-14 νέες περιπτώσεις αντίστοιχα ανά 100.000 γυναίκες. Αντιθέτως, στις χώρες της Ασίας, της Αφρικής και της Νοτίου Αμερικής, η επίπτωση της νόσου είναι μικρότερη, αφού καταγράφονται λιγότερες από 4 ανά 100.000 γυναίκες να προσβάλλονται από τη νόσο (Gu et al, 2021). Στις αρχές της δεκαετίας του '90 καταγράφεται απότομη αύξηση της νόσου (κατά 56%), ενώ μόλις την τελευταία δεκαετία τα ποσοστά καρκίνου του ενδομητρίου αυξήθηκαν κατά 21%. Η αύξηση αυτή οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στα υψηλά ποσοστά παχυσαρκίας σε συνδυασμό με το μεγαλύτερο προσδόκιμο ζωής (Gentry-Maharaj et al, 2020).

Η διάγνωση του καρκίνου του ενδομητρίου γίνεται σε πρώιμα στάδια λόγω της πρώιμης κολπικής αιμόρροιας, γεγονός που επιτρέπει καλύτερη πρόγνωση έναντι των άλλων κακοηθειών του γεννητικού συστήματος θήλεος. Η πλειοψηφία των γυναικών, οι οποίες διαγιγνώσκονται με καρκίνο του ενδομητρίου είναι περί- ή μετεμμηνοπαυσιακές, με ηλικία μεταξύ 50 και 65 ετών. Η αιχμή της διάγνωσης αφορά σε γυναίκες που διανύουν την 6^η και 7^η δεκαετία της ζωής τους. Σημειώνεται ωστόσο, ότι ένα ποσοστό της τάξης του 25% εμφανίζεται σε προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες. Η νόσος έχει περιγραφεί επίσης και σε γυναίκες ηλικίας 20-30 ετών (Morice et al, 2016).

3.2 Παράγοντες κινδύνου

Οι κυριότεροι παράγοντες κινδύνου που σχετίζονται με τον ενδομητρικό καρκίνο(και ειδικότερα τον οιστρογόνο-εξαρτώμενο καρκίνο του ενδομητρίου τύπου I) είναι : τα υψηλά επίπεδα ενδογενών και εξωγενών οιστρογόνων, η παχυσαρκία, η ταμοξιφαίνη, η ατοκία – υπογονιμότητα, ο σακχαρώδης διαβήτης, το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών η πρόωμη εμμηναρχή καθώς και η καθυστερημένη εμμηνόπαυση. Η γεωγραφική ετερογένεια, η οποία παρατηρείται ως προς τον επιπολασμό του καρκίνου του ενδομητρίου, μεταξύ των χωρών υποδηλώνει την εμπλοκή κάποιας περιβαλλοντικής συνιστώσας. Ωστόσο, οι περιβαλλοντικοί παράγοντες που ενδεχομένως εμπλέκονται δεν είναι καλά χαρακτηρισμένοι (Sorosky, 2012; Gentry-Maharaj et al, 2020).

3.2.1 Ορμονική θεραπεία υποκατάστασης

Η ορμονική θεραπεία υποκατάστασης με οιστρογόνα σε γυναίκες με συμπτώματα εμμηνόπαυσης θεωρείται η κυριότερη αιτία ανάπτυξης καρκίνου του ενδομητρίου. Ο κίνδυνος αυξάνεται αναλογικά με τον χρόνο και την αυξανόμενη δοσολογία των οιστρογόνων που λαμβάνει η ασθενής. Τελευταία, οι γυναίκες που λαμβάνουν θεραπεία υποκατάστασης λαμβάνουν προφυλακτικά και προγεστερόνη, προκειμένου να αποφευχθεί ενδεχόμενη υπερπλασία του ενδομητρίου και επακόλουθος καρκίνος του ενδομητρίου (Barbaglia et al, 2009).

3.2.2 Παχυσαρκία

Η παχυσαρκία αυξάνει από δύο έως και πέντε φορές τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του ενδομητρίου σε σύγκριση με τις γυναίκες που διατηρούν το βάρος τους σε φυσιολογικά επίπεδα. Αυτό οφείλεται στην περιφερική μετατροπή των πρόδρομων μορφών οιστρογόνων σε ενεργά οιστρογόνα, την αυξημένη υδροξυλίωση της οιστρόνης (βιολογικά πιο ενεργός μορφή) και το αυξημένο ποσοστό ελεύθερων οιστρογόνων στον ορό του αίματος (Constantine et al, 2018).

3.2.3 Ταμοξιφαίνη

Η ταμοξιφαίνη αποτελεί έναν εκλεκτικό ρυθμιστή των οιστρογονικών υποδοχέων. Παρουσιάζει αντι-οιστρογονικές ιδιότητες στον μαζικό αδένα και χρησιμοποιείται για τη θεραπεία του καρκίνου του μαστού. Ωστόσο, ενδέχεται να αυξήσει τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του ενδομητρίου, καθώς δρα ως οιστρογόνο στη μήτρα, με αποτέλεσμα ο κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου του ενδομητρίου να αυξάνεται αναλόγως

τη διάρκεια χορήγησης και τη δοσολογία. Η παρατεταμένη χορήγηση (διάστημα >60 μήνες) σχετίζεται με την εμφάνιση επιθετικότερων μορφών καρκίνου του ενδομητρίου, όπως το ενδομητριοειδές αδενοκαρκίνωμα βαθμού 3 και το ορώδες καρκίνωμα (Constantine et al, 2018).

3.2.4 Ατοκία-Υπογονιμότητα

Η ατοκία και η υπογονιμότητα φαίνεται να σχετίζονται επίσης με τον καρκίνο του ενδομητρίου. Οι γυναίκες που δεν έχουν τεκνοποιήσει, παρουσιάζουν 2 με 3 φορές μεγαλύτερη πιθανότητα να αναπτύξουν καρκίνο του ενδομητρίου συγκριτικά με αυτές που έχουν τεκνοποιήσει. Η πιθανότητα εμφάνισης φαίνεται να μειώνεται με κάθε γέννηση (Bevier et al, 2011). Επιπρόσθετα, η πρόιμη εμμηναρχή, η όψιμη εμμηνόπαυση, το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών καθώς και ο σακχαρώδης διαβήτης φαίνεται να ενοχοποιούνται επίσης για τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του ενδομητρίου. Προστατευτικά φαίνεται ότι δρα η λήψη αντισυλληπτικών.

3.3 Παθολογοανατομία του καρκίνου του ενδομητρίου

Στις αρχές της δεκαετίας του '80 ο Bokhman, βασιζόμενος σε κλινικοπαθολογικές παρατηρήσεις καρκίνου του ενδομητρίου προχώρησε στη διαφοροποίηση σε ομάδες και υπέθεσε ότι υπάρχουν δύο θεμελιωδώς διαφορετικοί τύποι καρκινώματος με διαφορετικούς κλινικούς, ιστοπαθολογικούς και βιολογικούς χαρακτήρες (Bokhman, 1983). Έκτοτε, μια αδρή ιστολογική ταξινόμηση περιλαμβάνει τα Τύπου I/ ενδομητριοειδή και Τύπου II/ μη ενδομητριοειδή καρκινώματα.

Characteristic	Type I	Type II
Unopposed oestrogen	Yes	No
Background endometrium	Hyperplastic	Atrophic
Morphology	Endometrioid	Serous, clear cell
Genetic abnormalities	MSI, PTEN, <i>K-ras</i> , β -catenin	p53, HER2/ <i>neu</i>

Πίνακας 1: Διαφορές των δυο υποτύπων του ενδομητρικού καρκίνου Πηγή: Ryan et al, 2005.

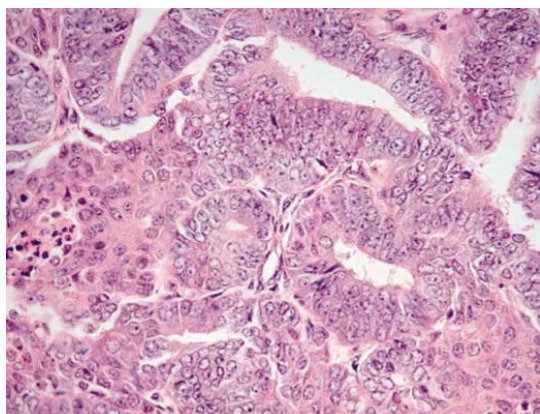
3.3.1 Καρκίνωμα ενδομητρίου τύπου I

Ο καρκίνος του ενδομητρίου τύπου I περιγράφει τους όγκους του ενδομητρίου βαθμού 1 και 2 της Διεθνούς Ομοσπονδίας Γυναικολογίας και Μαιευτικής (International Federation of Gynecology and Obstetrics – FIGO). Αντιπροσωπεύει ποσοστό της τάξης

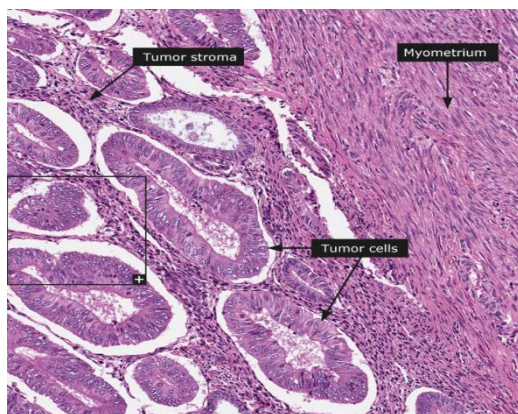
75-80% του συνόλου των καρκίνων του ενδομητρίου. Η θνησιμότητα από τον εν λόγω καρκίνο προσεγγίζει περίπου το 40% (Gentry-Maharaj et al, 2020). Αφορά στο αδενοκαρκίνωμα ενδομητριοειδούς τύπου με τους υποτύπους του και στο βλεννώδες καρκίνωμα. Ο μέσος όρος της ηλικίας των ασθενών που αναπτύσσουν καρκίνωμα τύπου I είναι τα 50-70 έτη. Ωστόσο παρατηρείται ένα εκτενές ηλικιακό εύρος, το οποίο περιλαμβάνει από νεαρές προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες κάτω των 30 ετών έως και μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες ηλικίας άνω των 70 ετών. Οι όγκοι αυτοί αναπτύσσονται κυρίως σε περιεμμηνοπαυσιακές γυναίκες με αυξημένη οιστρογονική επίδραση, ενώ συνυπάρχουν με άτυπη υπερπλασία ή ακολουθούν το πρότυπο αυτής, με συμπτώματα όπως η μη φυσιολογική αιμορραγία της μήτρας ή η μετεμμηνοπαυσιακή αιμορραγία.

Τα καρκινώματα ενδομητρίου τύπου I εκτιμώνται ως οιστρογονοεξαρτώμενοι όγκοι. Πρόκειται για συνήθως χαμηλού βαθμού κακοήθειας νεοπλάσματα, με επιπολής διήθηση του μυομητρίου και σταθερή βιολογική συμπεριφορά. Χαρακτηριστικά στοιχεία των νεοπλασμάτων αυτού του τύπου αποτελούν η μικροδορυφορική αστάθεια, οι μεταλλάξεις των γονιδίων *PTEN*, *PIK3CA*, *KRAS* και η συσσώρευση της β-κατενίνης στον πυρήνα (Green et al, 2020; Denschlag et al, 2011).

3.3.1.1 Ενδομητριοειδές αδενοκαρκίνωμα



Εικόνα 10: Καλά διαφοροποιημένο ενδομητριοειδές αδενοκαρκίνωμα Πηγή: Amant et al,2005.



Εικόνα 11: Καρκινικά κύτταρα και διείσδυση στο μυομήτριο Πηγή : Human Protein Atlas.

Τα τύπου I καρκινώματα μιμούνται ιστολογικά το αδενικό πρότυπο του φυσιολογικού ενδομητρίου και για το λόγο αυτό καλούνται ενδομητριοειδή. Τα κύτταρα είναι μεγαλύτερα από τα αντίστοιχα του παραγωγικού ενδομητρίου, και παρατηρούνται μιτώσεις και αποπτωτικά σώματα. Εξαπλώνονται μέσω διήθησης στο

μυομήτριο και στον τράχηλο. Ο προσδιορισμός του βαθμού διήθησης, λιγότερο ή περισσότερο από το 50% του πάχους του μυομητρίου, είναι πολύ σημαντικός, καθώς επηρεάζει τη σταδιοποίηση του νεοπλάσματος. Τα ενδομητριοειδή αδενοκαρκινώματα ανιχνεύονται σε πρώιμο στάδιο και ως εκ τούτου τα ποσοστά επιβίωσης ανέρχονται στο 85-90% (Amant et al, 2005).

Η διάγνωση του καλώς διαφοροποιημένου αδενοκαρκινώματος του ενδομητρίου βασίζεται στον εντοπισμό της στρωματικής διήθησης του ενδομητρίου, και υπάρχουν τρία βασικά κριτήρια προκειμένου να εντοπιστεί τυχόν διήθηση:

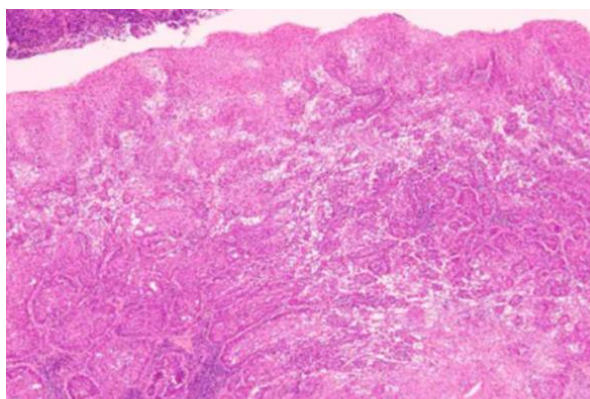
1. Συρρέον αδενικό πρότυπο ανάπτυξης, στο οποίο οι αδένες, χωρίς να παρεμβάλλεται στρώμα, συγχωνεύονται και δημιουργούν ένα ηθμοειδές πρότυπο.
2. Εκτεταμένο θηλώδες πρότυπο.
3. Ακανόνιστη διείσδυση των αδένων συνδεδεμένη με μεταβαλλόμενο ινοβλαστικό στρώμα (δεσμοπλαστική στρωματική αντίδραση).

Το ενδομητριοειδές αδενοκαρκίνωμα ενδέχεται να εμφανίζει διάφορες μορφολογικές παραλλαγές, όπως πλακώδη διαφοροποίηση, λαχνοαδενικό υπότυπο, εκκριτικούς χαρακτήρες και βλεννώδη μετάπλαση. Πρόκειται για μορφολογικές αλλαγές του καρκινώματος, οι οποίες δεν σχετίζονται με διαφορές στην πρόγνωση της νόσου (Mazur et al, 2005; Longacre et al, 1995).

3.3.1.1.1 Πλακώδης διαφοροποίηση

Η πλακώδης διαφοροποίηση αποτελεί συχνό εύρημα στο ενδομητριοειδές αδενοκαρκίνωμα. Εμφανίζεται με τη μορφή μοριδίων ή συρρέουσων ομάδων. Χαρακτηρίζεται συνήθως από πολυγωνικά, πλακώδη κύτταρα με ηωσινόφιλο κυτταρόπλασμα, τα οποία παρουσιάζουν μεσοκυττάρειες γέφυρες ή συγκεντρικές εναποθέσεις πεταλίων κερατίνης, ενώ η εκτεταμένη κερατινοποίηση είναι σπάνια.

Τα πλακώδη κύτταρα δεν εμφανίζουν συνήθως πυρηνική ατυπία. Παλαιότερα, η εκτεταμένη πλακώδης διαφοροποίηση στο ενδομητριοειδές

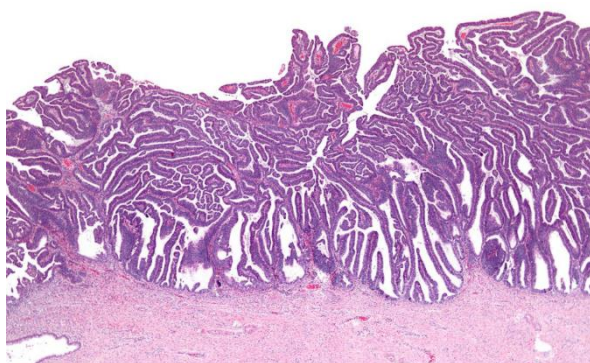


Εικόνα 12: Πλακώδης διαφοροποίηση ενδομητριοειδούς αδενοκαρκινώματος Πηγή :Akizawa et al,2020.

αδενοκαρκίνωμα θεωρούνταν ως ξεχωριστός υπότυπος και ονομαζόταν αδеноπλακώδες καρκίνωμα.

3.3.1.1.2 Λαχνοαδενικός υπότυπος

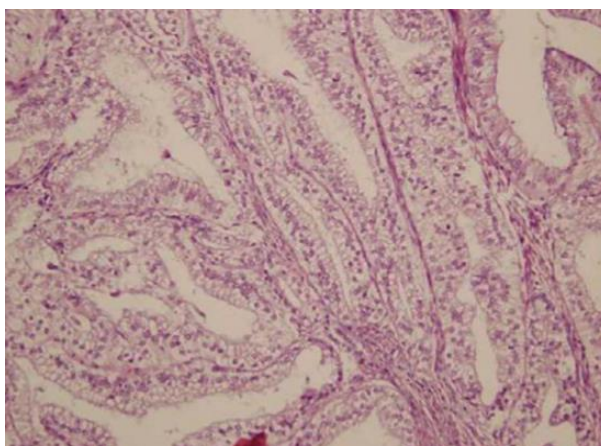
Ο λαχνοαδενικός υπότυπος είναι συνήθως χαμηλού βαθμού κακοήθειας. Χαρακτηρίζεται από αδενικούς σχηματισμούς και λεπτοφυείς θηλές. Τα νεοπλασματικά κύτταρα είναι κυλινδρικά και παρουσιάζουν ήπια έως μετρίου βαθμού ατυπία. Κλινικά είναι χαμηλού σταδίου, με επιφανειακή διήθηση του μυομητρίου. Συχνά, συνυπάρχει και με άλλους μορφολογικούς υποτύπους του ενδομητριοειδούς καρκινώματος (Zaino et al, 1998)



Εικόνα 13: Λαχνοαδενικός υπότυπος ενδομητριοειδούς αδενοκαρκινώματος. Πηγή : Zaino et al, 1998

3.3.1.1.3 Εκκριτικός υπότυπος

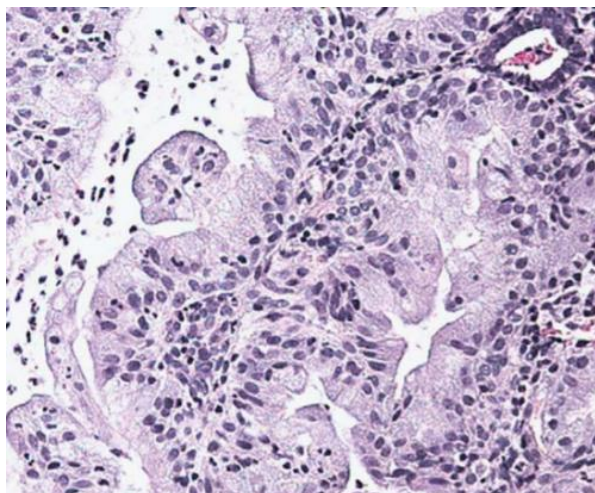
Ο υπότυπος με εκκριτικούς χαρακτήρες είναι συνήθως χαμηλού βαθμού κακοήθειας, ωστόσο τίθεται συχνά το θέμα της διαφορικής διάγνωσης με άλλα είδη καρκινωμάτων του ενδομητρίου. Παρουσιάζει την καλύτερη πρόγνωση. Ιστολογικά, παρουσιάζει καλώς διαφοροποιημένο αδενικό πρότυπο ανάπτυξης. Αποτελείται από κυλινδρικά κύτταρα που εμφανίζουν υπό- και υπέρ-πυρηνικά κενοτόπια παρόμοια με αυτά που αναγνωρίζονται στο εκκριτικό ενδομήτριο. Σημειώνεται ελάχιστη κυτταρική ατυπία και πλειομορφισμός. Ενδοκυτταρικά εκκρίνεται γλυκογόνο και όχι βλέννη.



Εικόνα 14: Εκκριτικός υπότυπος ενδομητριοειδούς αδενοκαρκινώματος Πηγή :Wu et al,2007.

3.3.1.1.4 Βλεννώδης μετάπλαση

Το βλεννώδες καρκίνωμα του ενδομητρίου είναι σπάνιο. Προκειμένου να χαρακτηριστεί ως βλεννώδες απαιτείται περισσότερο από το 50% των νεοπλασματικών κυττάρων να περιέχει ενδοκυττάρια βλέννη. Ιστολογικά, τα νεοπλασματικά αδένια συχνά σχηματίζουν θηλώδεις δομές, με επένδυση από βλεννοεκκριτικά κύτταρα. Συχνά εμφανίζονται κυστικά διατεταμένοι αδένες με άφθονη βλέννη. Οι πυρήνες παρουσιάζουν ήπια ατυπία και οι μιτώσεις είναι σπάνιες. Συνήθως, η εστιακή βλεννώδης διαφοροποίηση εντοπίζεται στο ενδομητριοειδές αδενοκαρκίνωμα σε συνδυασμό με την πλακώδη διαφοροποίηση. Αυτός ο τύπος ενδομητρικού καρκινώματος έχει παρόμοια μορφολογία με το αδενοκαρκίνωμα του τραχήλου, από το οποίο πρέπει να διαφοροδιαγνωστεί. Συγκεκριμένα, το ενδομητρικό βλεννώδες καρκίνωμα είναι έντονα και διάχυτα θετικό σε υποδοχείς οιστρογόνων και προγεστερόνης, καθώς και βιμεντίνη, κάτι το οποίο δεν ισχύει για το αδενοκαρκίνωμα του τραχήλου. Ωστόσο, χρειάζεται προσοχή, καθώς η βλεννώδης μετάπλαση του ενδομητρίου είναι θετική στο p16, όπως και η μετάπλαση του τραχήλου, παρότι δεν σχετίζεται με HPV (Chekmareva et al, 2008).



Εικόνα 15. Βλεννώδης μετάπλαση ενδομητριοειδούς αδενοκαρκινώματος. Πηγή: Chekmareva et al, 2008.

3.3.2 Καρκίνωμα ενδομητρίου τύπου II

Τα καρκινώματα ενδομητρίου τύπου II δε σχετίζονται με την παχυσαρκία και δεν είναι οιστρογόνο-εξαρτώμενα. Αφορούν στο 10-15% του συνόλου των καρκινωμάτων του ενδομητρίου. Πρόκειται για επιθετικά νεοπλάσματα που εμφανίζονται σε μεγαλύτερης ηλικίας μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες. Στα τύπου II καρκινώματα ανήκουν το ορώδες και το διαυγοκυτταρικό καρκίνωμα. Στους παράγοντες κινδύνου περιλαμβάνονται η ηλικία και τυχόν προηγούμενη ακτινοθεραπεία στην περιοχή αυτή, για παράδειγμα λόγω θεραπείας του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας.

Πρόκειται για υψηλού βαθμού κακοηθείας νεοπλάσματα με εν τω βάθει επέκταση στο μυομήτριο. Προκύπτουν από ατροφικό ενδομήτριο μέσω ενός προκαταρκτικού σταδίου (ενδοεπιθηλιακό καρκίνωμα του ενδομητρίου) και δεν εκφράζουν υποδοχείς οιστρογόνων και προγεστερόνης. Μορφολογικά αποτελούνται από κύτταρα με σοβαρού βαθμού πυρηνική ατυπία και αυξημένη μιτωτική δραστηριότητα ή κύτταρα με διαυγές κυτταρόπλασμα και ‘πεταλιώδεις’ (Hobnail) πυρήνες. Η διάγνωσή τους γίνεται σε προχωρημένο στάδιο και επομένως χαρακτηρίζονται από υψηλή θνησιμότητα. Έχουν την ικανότητα να εξαπλώνονται εκτός μήτρας ακόμη και σε όγκους με λίγη ή καθόλου διήθηση του μυομητρίου. Είναι πιθανό να παρουσιάσουν μεταστατική νόσο, έχουν υψηλότερο κίνδυνο υποτροπής και χειρότερη πρόγνωση. Η συνολική 5ετής επιβίωση για τα καρκινώματα τύπου II είναι 30-70% (Denschlag et al, 2011; Bokhman, 1983).

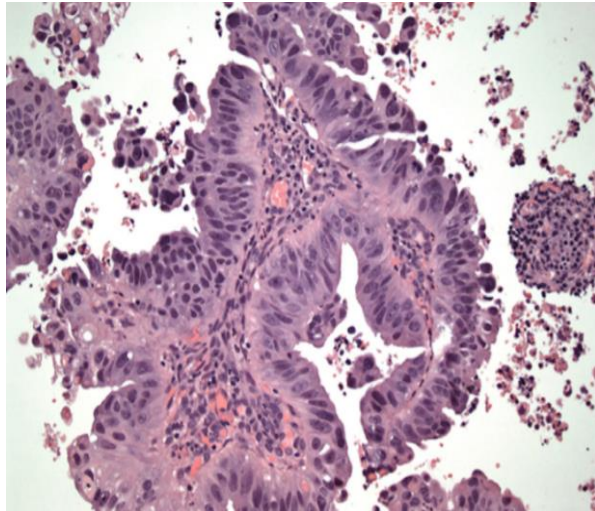
3.3.2.1 Ορογόνο καρκίνωμα

Το ορώδες καρκίνωμα του ενδομητρίου (Endometrial Serous Carcinoma – ESC) εμφανίζεται κυρίως σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες και αφορά στο 5-10% των καρκινωμάτων του ενδομητρίου. Μοιάζει ιστολογικά με το ορώδες καρκίνωμα των ωοθηκών. Το ESC παρουσιάζει αυξημένη τάση για πρόιμη λεμφαγγειακή διήθηση, καθώς και για ενδοπεριτοναϊκή και εξωκοιλιακή μετάσταση. Διαγιγνώσκεται συνήθως σε προχωρημένο στάδιο και αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι υπάρχουν μεταστάσεις τη στιγμή της διάγνωσης (Nakayama et al, 2012).

Οι ασθενείς με ορώδες καρκίνωμα έχουν υψηλότερο κίνδυνο υποτροπής και γενικά χειρότερη πρόγνωση σε σύγκριση με το αδενοκαρκίνωμα του ενδομητρίου. Το εν λόγω καρκίνωμα ευθύνεται για το 40% περίπου του συνολικού αριθμού θανάτων που σχετίζονται με τον καρκίνο του ενδομητρίου, γεγονός που έχει αυξήσει το ενδιαφέρον για την αποκρυπτογράφηση των χαρακτηριστικών του (Bogani et al, 2021).

Το ορώδες καρκίνωμα εμφανίζεται συνήθως στην επιφάνεια των πολυπόδων του ενδομητρίου σε περιβάλλον ατροφικού ενδομητρίου. Χαρακτηρίζεται μικροσκοπικά από θηλώδες πρότυπο ανάπτυξης. Οι θηλές είναι παχιές με ή χωρίς ινοαγγειακό άξονα. Παρατηρείται έντονη πυρηνική ατυπία, και το νεόπλασμα ενδέχεται να αναπτύσσεται διάχυτα, σε ανώμαλες μάζες (συσσωματώματα κυττάρων), ή με αδενικούς σχηματισμούς. Τα κύτταρα έχουν λιγυστό, ηωσινόφιλο κυτταρόπλασμα και πυρήνες με έντονη πλειομορφία, υπερχρωμασία και εμφανή πυρήνια. Ψαμμώδη σωματίδια εμφανίζονται σε ποσοστό της τάξης του 30% των περιπτώσεων.

Το ορώδες καρκίνωμα σχετίζεται συχνά με την εν τω βάθει διήθηση του μυομητρίου, καθώς και τη διήθηση λεμφαγγείων και αιμοφόρων αγγείων. Σε ένα ποσοστό της τάξης του 33% των περιπτώσεων, συνυπάρχουν με το ενδομητριοειδές αδενοκαρκίνωμα ή το διαυγοκυτταρικό καρκίνωμα. Πρόκειται εξ ορισμού για υψηλής κακοήθειας καρκινώματα και ως εκ τούτου δεν ταξινομούνται (Wang et al, 2018).

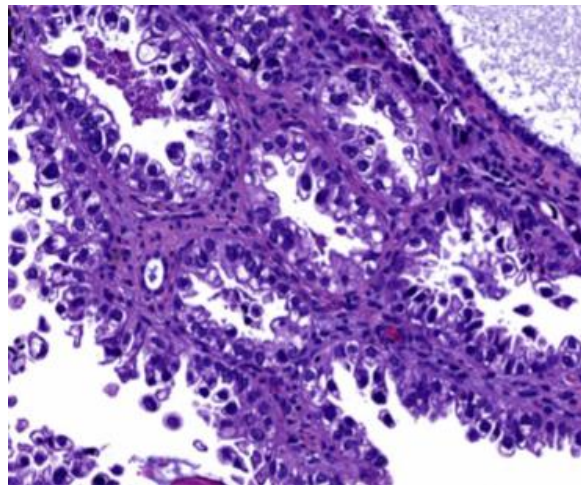


Εικόνα 16. Ορώδες καρκίνωμα του ενδομητρίου. Πηγή: Bogani et al, 2021.

3.3.2.2 Διαυγοκυτταρικό καρκίνωμα

Το διαυγοκυτταρικό καρκίνωμα ανήκει επίσης στην κατηγορία των καρκινωμάτων τύπου II. Είναι λιγότερο συχνό από το ορώδες, παρατηρείται, ωστόσο, στις ίδιες ηλικιακές ομάδες. Είναι υψηλής κακοήθειας και κατά κανόνα προχωρημένου σταδίου τη στιγμή της διάγνωσης (Hoang et al, 2015).

Μικροσκοπικά, η αρχιτεκτονική τους αποτελεί συνδυασμό σωληνώδους, θηλώδους, σωληνοκυστικού ή συμπαγούς προτύπου ανάπτυξης. Τα καρκινικά κύτταρα έχουν διαυγές κυτταρόπλασμα λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς τους σε γλυκογόνο (όχι ενδοκυττάρια βλέννη). Συνυπάρχουν με κύτταρα με ηωσινόφιλο κυτταρόπλασμα και κύτταρα με μορφολογία ‘κεφαλής καρφίδος’ (hobnail cells), τα οποία προβάλλουν σε αδενικούς αυλούς ή από θηλώδεις σχηματισμούς. Οι πυρήνες είναι ογκώδεις και πλειόμορφοι. Ενδέχεται να υπάρχουν με μορφολογικά χαρακτηριστικά ορώδους και διαυγοκυτταρικού καρκινώματος στον ίδιο όγκο (Suarez et al, 2017).



Εικόνα 17. Διαυγοκυτταρικό καρκίνωμα του ενδομητρίου. Πηγή: Suarez et al, 2017.

Οι ασθενείς που διαγιγνώσκονται με διαυγοκυτταρικό καρκίνωμα εμφανίζουν συνήθως προχωρημένη νόσο τη στιγμή της διάγνωσης και ως εκ

τούτου, έχουν κακή πρόγνωση. Αντιθέτως, οι ασθενείς που διαγιγνώσκονται σε αρχικό στάδιο της νόσου παρουσιάζουν καλή πρόγνωση και έχει αποδειχθεί ότι ανταποκρίνονται στη χημειοθεραπεία.

Οι ασθενείς με διανοκωτταρικό καρκίνωμα εμφανίζουν συνήθως προχωρημένη νόσο τη στιγμή της διάγνωσης, και ως εκ τούτου, η πρόγνωση του καρκινώματος αυτού δεν είναι ιδιαίτερα καλή. Αντίθετα, ασθενείς που διαγιγνώσκονται σε αρχικό στάδιο της νόσου παρουσιάζουν πολύ καλή πρόγνωση και έχει αποδειχθεί ότι ανταποκρίνονται θετικά σε χημειοθεραπεία.

3.3.3 Μικτά καρκινώματα

Τα μικτά καρκινώματα του ενδομητρίου αποτελούνται από δύο ή περισσότερους τύπους ενδομητρικού καρκινώματος, εκ των οποίων, ο ένας τουλάχιστον είναι τύπου Π. Η συνηθέστερη συνύπαρξη είναι το ενδομητριοειδές αδenoκαρκίνωμα και το ορώδες καρκίνωμα. Η ελάχιστη αναλογία του ενός από τους δύο τύπους καρκινωμάτων σε ένα μικτό καρκίνωμα είναι το 5%. Το υψηλού βαθμού κακοήθειας καρκίνωμα καθορίζει την πρόγνωση, ακόμη κι αν υπάρχει σε πολύ μικρό βαθμό (Quddus et al, 2010).

3.4 Καρκίνος του ενδομητρίου και μετάσταση

Ο καρκίνος του ενδομητρίου μεθίσταται συχνά στις ωθήκες και στις σάλπιγγες. Το καρκίνωμα εξαπλώνεται αρχικά στο μυομήτριο και στη συνέχεια σε άλλες αναπαραγωγικές δομές της πυέλου. Οι λεμφαδένες της πυέλου και οι λεμφαδένες των παρα-αορτικών όγκων είναι συνηθέστερο να εμπλακούν πρώτα, αλλά χωρίς συγκεκριμένη διάταξη, σε αντίθεση με τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας. Οι πιο απομακρυσμένες μεταστάσεις εξασφαλίζονται μέσω της αγγειακής κυκλοφορίας και παρατηρούνται στους πνεύμονες, στο συκώτι, στον εγκέφαλο, και στα οστά. Ο καρκίνος του ενδομητρίου είναι πιθανόν να δώσει πνευμονικές μεταστάσεις κατά 20-25% περισσότερο από κάθε άλλο γυναικολογικό καρκίνο.

3.5 Διάγνωση του καρκίνου του ενδομητρίου

Η συχνότερη εκδήλωση του καρκίνου του ενδομητρίου είναι η μη φυσιολογική αιμορραγία της μήτρας, η οποία εμφανίζεται με τη μορφή μηνορραγίας (βαριά εμμηνορροϊκή αιμορραγία), μητρορραγίας (ακανόνιστη αιμορραγία), μη προγραμματισμένης αιμορραγίας (ασθενείς που λαμβάνουν ορμονική θεραπεία

υποκατάστασης) ή μετεμμηνοπαυσιακής αιμορραγίας. Ορισμένες γυναίκες ενδέχεται να παρουσιάσουν μη φυσιολογική έκκριση, η οποία μπορεί να είναι δύσοσμη ή με κηλίδες αίματος. Στις περιπτώσεις αυτές το τεστ Παπανικολάου μπορεί να δείξει μη φυσιολογικά αδενικά κύτταρα ή κύτταρα του ενδομητρίου με ατυπία, και τα αποτελέσματα αυτά χρήζουν περαιτέρω αξιολόγησης.

Η διάγνωση του καρκίνου του ενδομητρίου γίνεται με τη βοήθεια ορισμένων παρακλινικών εξετάσεων όπως: η δοκιμαστική απόξεση (ιστολογική εξέταση), η κυτταρολογική εξέταση, ο κοιλικός υπερηχογραφικός έλεγχος της μήτρας, το έγχρωμο υπερηχογράφημα Doppler, η υστεροσαλπιγγογραφία, η υστεροσκόπηση, η λαπαροσκόπηση, η υπολογιστική τομογραφία (Computed Tomography – CT scan), η απεικόνιση με μαγνητική τομογραφία (Magnetic Resonance Imaging – MRI), καθώς και με ακτινολογικό έλεγχο. Για τον αποκλεισμό εστιακών πρόδρομων αλλοιώσεων του ενδομητρίου, όπως είναι ένας πολύποδας, ένα υποβλεννογόνιο ινομύωμα, αλλά και παθολογικών αλλοιώσεων των ωθηκών, απαιτείται η διεκπεραίωση μίας σειράς εξετάσεων που αφορούν σε: γενική εξέταση αίματος, γενική εξέταση ούρων, τεστ Παπανικολάου, διακολπικό υπερηχογράφημα, έλεγχος ηπατικής λειτουργίας, ουρία, γλυκόζη αίματος, λήψη κολποτραχηλικού επιχρίσματος και ακτινογραφία θώρακος (Singh et al 2022). Το CA-125 αποτελεί έναν δοκιμασμένο καρκινικό δείκτη για τον καρκίνο των ωθηκών, που μπορεί να φανεί χρήσιμος και για τον καρκίνο του ενδομητρίου. Ένα ποσοστό της τάξης του 20% περίπου των γυναικών με στάδιο I έχουν ανεβασμένο τον δείκτη CA-125, ο οποίος είναι ιδιαίτερα υψηλός σε περιπτώσεις με περιτοναϊκές εμφυτεύσεις.

Ο καρκίνος του ενδομητρίου διαγιγνώσκεται ως επί το πλείστον ιστολογικά με τη λήψη βιοψίας. Η διάγνωσή του μέσω της βιοψίας κρίνεται ακριβέστερη σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες και σε ασθενείς με συμπτώματα (μητρορραγία). Η τεχνική που ακολουθείται μετά την βιοψία, εάν εντοπιστεί ανωμαλία, είναι το διακολπικό υπερηχογράφημα (Transvaginal Ultrasonography – TVU), το οποίο και χρησιμοποιείται πλέον ως το πρώτο βήμα σε κάθε γυναίκα που παρουσιάζει μη φυσιολογική αιμορραγία μήτρας (Amant et al, 2005).

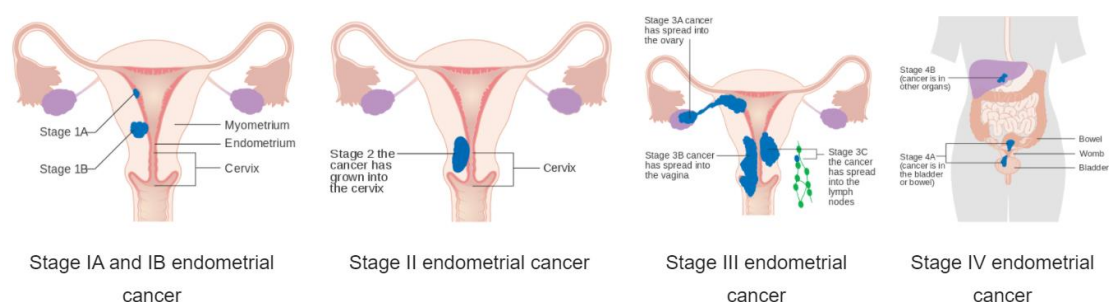
3.6 Ταξινόμηση και θεραπεία ενδομητρικού καρκίνου

Το στάδιο της νόσου αποτελεί τον σημαντικότερο προγνωστικό παράγοντα στον καρκίνο του ενδομητρίου. Η ταξινόμηση διευκολύνει την πρόγνωση και την οργάνωση

θεραπευτικών στρατηγικών με σκοπό την αύξηση του προσδόκιμου επιβίωσης των ασθενών. Από το 1998, σύμφωνα με τις οδηγίες της International Federation of Gynecologists and Obstetricians - FIGO, η επιβίωση των καρκινωμάτων του ενδομητρίου ποικίλει και καθορίζεται αναλόγως του σταδίου (Stage) και του βαθμού διαφοροποίησης-κακοήθειας της νόσου (Grade). Στις παρακάτω εικόνες απεικονίζεται η πρόσφατα αναθεωρημένη ταξινόμηση της FIGO για τον καρκίνο του ενδομητρίου (Εικόνες 18, 19).

Stage	Description
I	Tumor confined to uterine corpus
IA	No or less than half myometrial invasion
IB	Invasion to or in more than half of the myometrium
II	Tumor invades the cervical stroma but does not extend beyond the uterus
III	Local or regional spread of the tumor
IIIA	Tumor invades the serosa or adnexae or serosa and adnexae
IIIB	Vaginal or parametrial involvement
IIIC	Metastases to the pelvic or paraaortic or pelvic and paraaortic lymph nodes
IIIC1	Positive pelvic nodes
IIIC2	Positive paraaortic lymph nodes with or without positive pelvic nodes
IV	Tumor invades bladder or bowel mucosa or distant metastases
IVA	Tumor invasion of bladder or bowel or bladder and bowel mucosa
IVB	Distant metastasis, including intraabdominal metastases, inguinal lymph nodes, or intraabdominal metastases and inguinal lymph nodes

Εικόνα 18: Σταδιοποίηση ενδομητρικού καρκίνου σύμφωνα με τη FIGO. Πηγή: International Federation of Gynecologists and Obstetricians



Εικόνα 19: Απεικόνιση της ταξινόμησης κατά FIGO. Πηγή: Cancer Research UK

Η σταδιοποίηση βασίζεται στη χειρουργική και στην παθολογοανατομική αξιολόγηση των παρατηρούμενων ευρημάτων. Περιλαμβάνει την εκτίμηση του βάθους της διήθησης στο μυομήτριο, την εξάπλωσή του στον τράχηλο, τη διήθηση των

λεμφαδένων, το μέγεθος και τη θέση του όγκου, αλλά και την εκτίμηση του ιστολογικού τύπου και τον βαθμό της λεμφαγγειακής διήθησης. Όσον αφορά στη σταδιοποίηση, αυτή αφορά κυρίως στα ενδομητριοειδή και στα βλενώδη καρκινώματα, καθώς τα ορώδη και διαυγοκυτταρικά καρκινώματα είναι στην πλειοψηφία τους Grade 3.

Η εκτίμηση του βαθμού ιστολογικής διαφοροποίησης (Grading) δηλώνει τον βαθμό διαφοροποίησης των νεοπλασματικών κυττάρων και την ομοιότητά τους προς τα φυσιολογικά κύτταρα του ιστού. Βασίζεται στη μορφολογία του πυρήνα και στην αρχιτεκτονική του ιστού και διακρίνεται σε 3 βαθμίδες (Grades 1, 2, 3). Όσο πιο φτωχή είναι η διαφοροποίηση του όγκου, τόσο υψηλότερος βαθμός διαφοροποίησης του αποδίδεται και κατά κανόνα σχετίζεται με επιθετική βιολογική συμπεριφορά.

Επιπρόσθετα, η παρουσία διήθησης του μυομητρίου, ανεξαρτήτως ιστολογικού τύπου και βαθμού διαφοροποίησης του όγκου, αποτελεί σημαντική προγνωστική παράμετρο. Όσο βαθύτερη είναι η διήθηση του μυομητρίου, τόσο χειρότερη είναι η πρόγνωση. Μεταξύ των ιστολογικών τύπων του καρκίνου του ενδομητρίου, το ορώδες καρκίνωμα θεωρείται το πιο επιθετικό νεόπλασμα. Το διαυγοκυτταρικό καρκίνωμα θεωρείται επίσης υψηλού βαθμού κακοηθείας και είναι ιδιαίτερα επιθετικό, σε αντίθεση με όλα τα αδενοκαρκινώματα ενδομητριοειδούς τύπου που έχουν ιδιαίτερα καλή πρόγνωση. Όσον αφορά στη θεραπεία των ασθενών, η χειρουργική προσπέλαση, η ακτινοθεραπεία, η χημειοθεραπεία, η ορμονοθεραπεία, καθώς και η συστηματική παρακολούθηση, αποτελούν επιλογές για την αντιμετώπιση των ασθενών που πάσχουν από καρκίνο του ενδομητρίου. Η σημασία της κάθε μίας από τις επιλογές αυτές εξαρτάται από τον ιστολογικό τύπο και το στάδιο της νόσου. Η πλειονότητα των ασθενών, λόγω της κοιλικής αιμόρροιας, διαγιγνώσκονται σε πρώιμο στάδιο με αποτέλεσμα να επιτυγχάνονται υψηλά ποσοστά θεραπείας. Η χειρουργική θεραπεία, με ολική υστερεκτομή μετά των εξαρτημάτων, αποτελεί το gold standard στην αντιμετώπιση των ασθενών αυτών.

Χειρουργική προσπέλαση

Όλες σχεδόν οι ασθενείς με καρκίνο του ενδομητρίου θα υποβληθούν σε κάποια μορφή χειρουργικής θεραπείας. Η ολική υστερεκτομή, η οποία περιλαμβάνει την αφαίρεση της μήτρας, των σαλπίγγων και των ωοθηκών, σε συνδυασμό με την αφαίρεση σε ορισμένες περιπτώσεις των πυελικών και παραορτικών λεμφαδένων, αποτελεί τη βάση της χειρουργικής θεραπείας και μέρος της σταδιοποίησης του καρκίνου του

ενδομητρίου. Σε περιπτώσεις νεαρών γυναικών γίνεται προσπάθεια διατήρησης των ωοθηκών.

Οι ασθενείς σταδίου IA και βαθμού διαφοροποίησης 1 ή 2 είναι απίθανο να έχουν κάποια προσβολή στους λεμφαδένες και η πρόγνωση για αυτές είναι συνήθως πολύ καλή. Η λεμφαδεκτομή δεν ενδείκνυται στις περιπτώσεις αυτές, καθώς δεν αλλάζει το προσδόκιμο επιβίωσης. Αντιθέτως, οι ασθενείς με προχωρημένη νόσο μπορούν να επωφεληθούν από τη χειρουργική επέμβαση, αλλά θα πρέπει επίσης να υποβληθούν σε επιπρόσθετη χημειοθεραπεία ή ακτινοβολία. Εκτός από την κλασική επέμβαση της υστερεκτομής, η αφαίρεση των εξαρτημάτων μπορεί να γίνει και λαπαροσκοπικά από έμπειρους ιατρούς (Denschlag et al, 2011).

Όγκοι σταδίου II μπορούν να αντιμετωπισθούν με ριζική υστερεκτομή, καθιστώντας μη απαραίτητη την μετεγχειρητική ακτινοβολία. Η χειρουργική αντιμετώπιση μπορεί να αφορά και σε ασθενείς με υποτροπή, ύστερα από θεραπεία με ακτινοβολία, ή και σε ασθενείς που έλαβαν ακτινοβολία για άλλους καρκίνους στην περιοχή της πυέλου. Η θεραπεία εκλογής για τον καρκίνο του ενδομητρίου είναι η χειρουργική επέμβαση. Ωστόσο, υπάρχει ένας αριθμός πρόσθετων θεραπευτικών επιλογών, στα πλαίσια της επικουρικής θεραπείας, οι οποίες μπορούν να ακολουθήσουν το χειρουργείο συνδυαστικά, όπως είναι η ακτινοθεραπεία ή η χημειοθεραπεία σε υψηλού κινδύνου ή υψηλού βαθμού κακοηθείας νεοπλασμάτα.

Χημειοθεραπεία

Η χημειοθεραπεία αποτελεί τη χορήγηση φαρμακευτικών ουσιών με απώτερο σκοπό την παρέμβαση στα στάδια του κυτταρικού κύκλου και την καταστολή των νεοπλασματικών κυττάρων.

Ο καρκίνος του ενδομητρίου διαγιγνώσκεται συνήθως όταν είναι ακόμη εντοπισμένος στο ενδομήτριο, επομένως η χειρουργική αντιμετώπιση, με ή χωρίς επικουρική ακτινοθεραπεία, αποτελεί την ενδεδειγμένη θεραπευτική προσπέλαση. Ωστόσο, ένα ποσοστό των ασθενών που διαγιγνώσκονται σε αρχικό στάδιο I ή II, θα παρουσιάσουν σημαντική υποτροπή της νόσου. Επιπρόσθετα, σε ένα ποσοστό ασθενών, της τάξης του 15% περίπου, ο καρκίνος του ενδομητρίου διαγιγνώσκεται σε προχωρημένο στάδιο III ή IV και για την αντιμετώπισή του δεν επαρκούν η χειρουργική επέμβαση και η ακτινοθεραπεία.

Κυτταροστατικά φάρμακα τα οποία χορηγούνται συνδυαστικά και επιτυγχάνουν μία ανταπόκριση των ασθενών της τάξης του 20% είναι η δοξορουβικίνη, η επιρουβικίνη,

η σισπλατίνη, η κυκλοφωσφαμίδη, η καρβοπλατίνη και η πακλιταξέλη. Με βάση προϋπάρχουσες μελέτες, διαφαίνεται αύξηση της επιβίωσης των ασθενών που λαμβάνουν επικουρική θεραπεία, όταν παίρνουν συνδυαστικά θεραπεία κυκλοφωσφαμίδης-δοξορουβικίνης και σισπλατίνης.

Σε περιπτώσεις που η χειρουργική επέμβαση δεν ενδείκνυται, η χημειοθεραπεία ή η παρηγορητική χημειοθεραπεία αποτελούν επιλογή. Η υψηλότερης δόσης χημειοθεραπεία φαίνεται να συνδέεται με μεγαλύτερη επιβίωση. Συχνά, για τη θεραπεία του υποτροπιάζοντος καρκίνου ενδέχεται να χρησιμοποιηθεί η ανακουφιστική χημειοθεραπεία.

Ακτινοθεραπεία

Ο ρόλος της μετεγχειρητικής ακτινοθεραπείας (κολπική βραχυθεραπεία ή εξωτερική τηλεθεραπεία) σε ασθενείς υψηλού κινδύνου, ελαττώνει την πιθανότητα τοπικής υποτροπής, χωρίς ωστόσο να αυξάνει το συνολικό ποσοστό επιβίωσης. Η κολπική βραχυθεραπεία υπερσχύει έναντι της εξωτερικής τηλεθεραπείας, καθώς έχει λιγότερες παρενέργειες και τοξικότητα. Οι ασθενείς που έχουν υποβληθεί σε κολπική βραχυθεραπεία δε φαίνεται να έχουν σημαντικές διαφορές ως προς τα ποσοστά των υποτροπών και των μεταστάσεων, αλλά και ως προς την ελεύθερης νόσου επιβίωση και τη συνολική επιβίωση (Blake et al, 2009).

Αξίζει να σημειωθεί ότι οι απόψεις δίστανται αναφορικά με το ρόλο της συστηματικής χημειοθεραπείας σε συνδυασμό με την ακτινοθεραπεία, στη βελτίωση του προσδόκιμου επιβίωσης υψηλού κινδύνου ασθενών. Πρόσφατη έρευνα έδειξε ότι η χημειο-ακτινοθεραπεία δεν υπερέχει έναντι της ακτινοθεραπείας, όσον αφορά στην ελεύθερης νόσου επιβίωση ή στη συνολική επιβίωση. Αντιθέτως, η χημειο-ακτινοθεραπεία φαίνεται να συνδέεται με υψηλότερο ποσοστό υποτροπών (Jingjing et al, 2019).

4. Μοριακή καρκινογένεση στον καρκίνο του ενδομητρίου

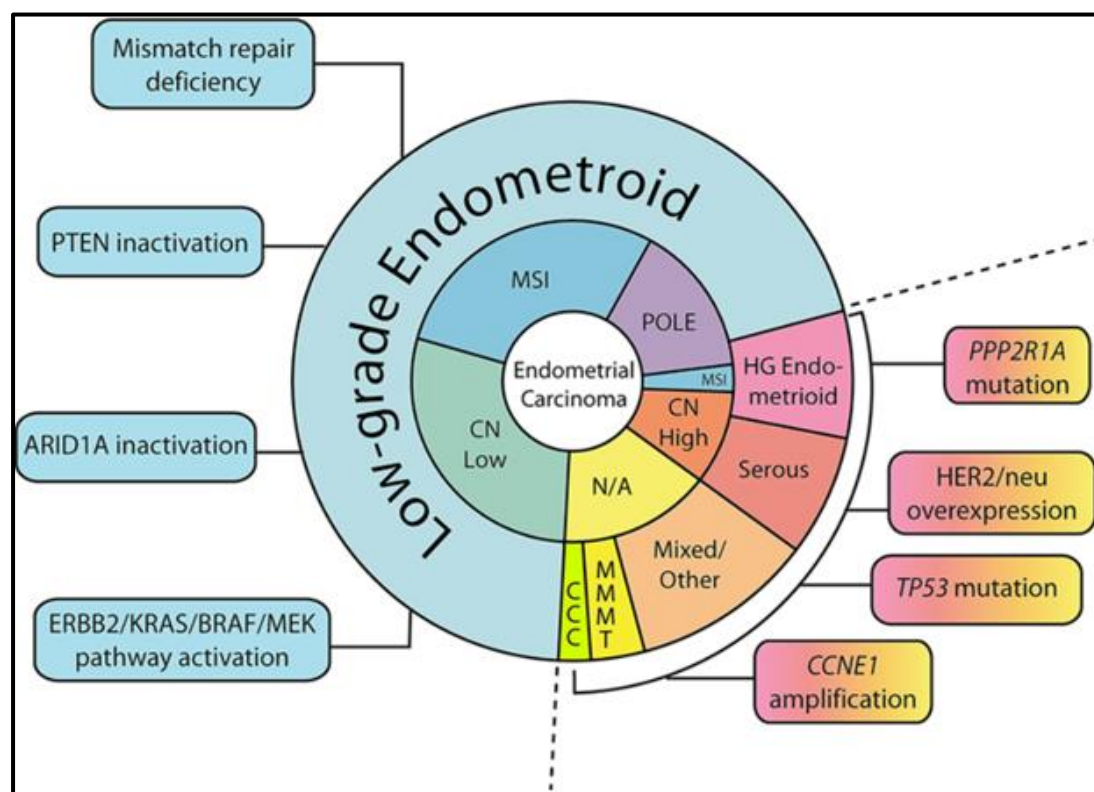
Η ραγδαία ανάπτυξη υψηλής ευαισθησίας και ειδίκευσης τεχνολογιών και μεθόδων μοριακής βιολογίας έχει επιτρέψει, τελευταία, την μορφομοριακή ταξινόμηση στα περισσότερα νεοπλάσματα και μεταξύ αυτών και του καρκίνου του ενδομητρίου. Η ενσωμάτωση των μοριακών χαρακτηριστικών φαίνεται ότι προσφέρει μεγαλύτερη ακρίβεια ως προς τον προσδιορισμό των υποτύπων του καρκίνου του ενδομητρίου (Yen et al,2020).

Το 2013, η ομάδα η οποία χαρτογράφησε το γονιδίωμα (TCGA - The Cancer Genome Atlas), έπειτα από εκτενή, γενωμική ανάλυση περίπου 400 καρκίνων του ενδομητρίου, προσδιόρισε τέσσερις κατηγορίες με διακριτά κλινικά, παθολογικά και μοριακά χαρακτηριστικά.

Η ταξινόμηση περιλαμβάνει τις υποομάδες:

- A) POLE Υπερμεταλλαγμένη ομάδα (Ultra-mutated) (7%),
- B) Μικροδορυφορική Αστάθεια με μεγάλο ποσοστό μεταλλάξεων (Microsatellite Instability (MSI) – Hypermuted) (28%),
- Γ) Χαμηλός Αριθμός Αντιγράφων / Μικροδορυφορική Σταθερότητα (Copy Number Low (CN) / Microsatellite Stable) (39%) και
- Δ) Ορώδους τύπου / Υψηλός Αριθμός Αντιγράφων (Serous-like / Copy Number High (CN)) (26%).

Οι υποομάδες με τις περιεχόμενες μοριακές παραλλαγές και τους ιστολογικούς υποτύπους με τους οποίους συνδέονται, απεικονίζονται παρακάτω (Εικόνα 20).



Εικόνα 20. Ιστολογικοί υποτύποι και ταξινομήσεις στον καρκίνο του ενδομητρίου βάσει του TCGA group. Ο εξωτερικός κύκλος δείχνει τους ιστολογικούς υποτύπους. Ο εσωτερικός κύκλος δείχνει τη μοριακή ταξινόμηση του TCGA στα ενδομητριοειδή και ορώδη καρκινώματα. Τα εξωτερικά πλαίσια απεικονίζουν τις ποικίλες μοριακές οδούς σηματοδότησης που παραλλάσσονται συχνότερα στον καρκίνο του ενδομητρίου. Η TCGA ομάδα δεν

ανέλυσε το διαυγοκυτταρικό καρκίνωμα, το καρκινοσάρκωμα και τους φτωχά διαφοροποιημένους όγκους. CCC: διαυγοκυτταρικό καρκίνωμα, HG: υψηλού βαθμού, LG: χαμηλού βαθμού, MMMT: κακοήθης μεικτός όγκος Mullerian. N/A: μη διαθέσιμο. Πηγή: Yen et al. 2020.

Η υποομάδα με υπερ-μεταλλαγμένη POLE χαρακτηρίζεται από υψηλό αριθμό σωματικών μεταλλάξεων (missense mutations) στην περιοχή της DNA πολυμεράσης ε με δράση εξωνουκλεάσης. Οι εν λόγω μεταλλάξεις προκαλούν υψηλά ποσοστά αντιγραφικών λαθών (232×10^{-6} μεταλλάξεις ανά Mb), καθώς η DNA πολυμεράση ε, είναι υπεύθυνη για τη διατήρηση της πιστότητας κατά την αντιγραφή του DNA. Στην υποομάδα αυτή συγκαταλέγονται τα υψηλού και χαμηλού βαθμού ενδομητριοειδή καρκινώματα και έχουν πολύ καλή πρόγνωση, χωρίς υποτροπές (Yen et al. 2020).

Η μικροδορυφορική αστάθεια (MSI) προέρχεται από ανεπάρκεια του συστήματος επιδιόρθωσης λανθασμένων ζευγών βάσεων (MMR - MisMatch Repair). Στη μελέτη της TCGA ομάδας, η πλειοψηφία των όγκων με μικροδορυφορική αστάθεια, ως ένδειξη απώλειας της έκφρασης της MLH1 πρωτεΐνης έδειξε μειωμένη έκφραση του MLH1 mRNA, ως δευτερεύον συμβάν μετά την μεθυλίωση του υποκινητή. Τα νεοπλάσματα της κατηγορίας αυτής χαρακτηρίζονται ως μικροδορυφορικά σταθερά (MSS - microsatellite-stable), ως χαμηλής μικροδορυφορικής αστάθειας (MSI-L), εάν ένας έως δύο δείκτες έχουν τροποποιηθεί και ως υψηλής μικροδορυφορικής αστάθειας (MSI-H) εφόσον τροποποιούνται τουλάχιστον τρεις ή περισσότεροι δείκτες. Η ομάδα αυτή περιλαμβάνει τα ενδομητριοειδή καρκινώματα βαθμίδων 1-3 και έχει ενδιάμεση πρόγνωση (Yen et al, 2020).

Ταυτοποιήθηκαν επιπλέον δύο ακόμη υποομάδες, με βάση τις παραλλαγές στον αριθμό αντιγράφων (Copy Number, CN). Η υποομάδα με χαμηλό αριθμό αντιγράφων, η οποία χαρακτηρίζεται και μικροδορυφορικά σταθερή, περιλαμβάνει περισσότερους από τους μισούς ενδομητριοειδείς όγκους χαμηλού βαθμού κακοηθείας (βαθμού 1 και 2). Στην υποομάδα αυτή ανιχνεύονται μεταλλάξεις στα *PTEN*, *PIK3CA*, *ARID1A* γονίδια, καθώς και στα γονίδια *CTNNB1* και *KRAS*.

Όλα σχεδόν τα ορώδη καρκινώματα (97.7%), η πλειονότητα των καρκινωμάτων μικτού τύπου (75.0%) και ένα μικρό ποσοστό των ενδομητριοειδών καρκινωμάτων υψηλού βαθμού κακοηθείας (βαθμού 3) ανήκουν στην υποομάδα υψηλού αριθμού αντιγράφων. Στην ομάδα αυτή σημειώνονται μεταλλάξεις στα *TP53* και *HER2* κυρίως γονίδια (Yen et al. 2020). Όσον αφορά στην πρόγνωση στις δύο αυτές υποομάδες, η

υποομάδα χαμηλού CN έχει ενδιάμεση, ενώ η υψηλού έχει κακή πρόγνωση (Murali et al, 2018).

Τα χαμηλού βαθμού ενδομητριοειδή καρκινώματα φαίνεται να εξελίσσονται από άτυπη υπερπλασία του ενδομητρίου και φέρουν συνήθως μεταλλάξεις στα γονίδια *ARID1A*, *PTEN*, *KRAS*, *PIK3CA* και *CTNNB1*. Σύμφωνα με το TCGA group, εδώ μπορεί να κατανέμονται ασθενείς με μεταλλάξεις *POLE*, μικροδορυφορική αστάθεια και υψηλό ποσοστό μεταλλάξεων εν αντιθέσει με τον αριθμό αντιγράφων που είναι συνήθως χαμηλός.

Τα υψηλού βαθμού ενδομητριοειδή καρκινώματα, αν και φαίνεται να εξελίσσονται κατά τον ίδιο τρόπο από άτυπη υπερπλασία, φέρουν συνήθως μεταλλάξεις στα γονίδια *ARID1A*, *PTEN*, *KRAS*, *PIK3CA*, *CTNNB1* αλλά και στο *TP53*, ενώ με βάση το TCGA group, συμπεριλαμβάνουν ασθενείς με υψηλό αριθμό γονιδιακών αντιγράφων.

Όσον αφορά στα ορώδη καρκινώματα, αυτά προέρχονται συνήθως από ορώδη ενδοεπιθηλιακά καρκινώματα του ενδομητρίου. Φέρουν συνήθως μεταλλάξεις στα γονίδια *TP53*, *HER2* και περιλαμβάνουν όγκους με επίσης υψηλό αριθμό γονιδιακών αντιγράφων. Τέλος, αναφορικά με τα διαυγοκυτταρικά καρκινώματα, τα γονίδια που φαίνονται να παραλλάσσονται στην κατηγορία αυτή είναι τα *TP53*, *PTEN*, *ARID1A*, *PIK3CA*. Η εν λόγω κατηγορία δεν είχε αναλυθεί περαιτέρω από το TCGA group. Οι μη ενδομητριοειδείς καρκίνοι, όπως γίνεται αντιληπτό, εμφανίζουν συχνά ανευπλοειδία και μεταλλάξεις του *TP53* (Hecht et al, 2006).

4.1 Μοριακό προφίλ καρκινωμάτων τύπου I

Ογκοκατασταλτικό γονίδιο *PTEN*

Οι μεταλλάξεις στο ογκοκατασταλτικό γονίδιο *PTEN* ευθύνονται για το 80% των ενδομητριοειδών καρκινωμάτων και το 55% των προκαρκινικών αλλοιώσεων του ενδομητρίου. Το γονίδιο εδράζεται στο χρωμόσωμα 10q23 και κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη με λειτουργία τυροσινικής κινάσης. Η αδρανοποίηση του *PTEN* προκαλείται κυρίως από μεταλλάξεις που οδηγούν σε απώλεια της έκφρασής του και σε μικρότερο βαθμό από απώλεια ετεροζυγωτίας (Bilbao et al, 2006). Ανταγωνίζεται τη δραστηριότητα κινάσης της τριφωσφορικής φωσφατιδυλι-ινοσιτόλης (PIP3) μέσω αρνητικής ρύθμισης του μονοπατιού PIP3-Akt, ενώ δρώντας λιπιδική φωσφατάση, προκαλεί διακοπή του κυτταρικού κύκλου στο σημείο ελέγχου G1/S. Ως εκ τούτου

αποτελεί εξαιρετικά σημαντικό μόριο στην καρκινογένεση. Εμπλέκεται επίσης στη ρύθμιση των αποπτωτικών μηχανισμών, αλλά και σε διαδικασίες όπως η αναστολή της κυτταρικής προσκόλλησης (cell adhesion), η εξάπλωση και η μετανάστευσης των νεοπλασματικών κυττάρων (Liu, 2007).

Η απώλεια του *PTEN* γονιδίου αποτελεί πρώιμο γεγονός στην καρκινογένεση του ενδομητρίου, καθώς απαντάται και σε προκαρκινικές αλλοιώσεις. Το ποσοστό πενταετούς επιβίωσης των ασθενών που φέρουν *PTEN* μεταλλάξεις είναι περίπου 80% σε σύγκριση με το 50% σε εκείνες που δεν φέρουν μεταλλάξεις (Liu, 2007).

Μικροδορυφορική Αστάθεια - Microsatellite Instability (MSI)

Το 20% περίπου των ενδομητριοειδών καρκίνων του ενδομητρίου παρουσιάζουν μικροδορυφορική αστάθεια (MSI). Οι μικροδορυφόροι είναι μικρού μήκους τμήματα επαναλαμβανόμενων βάσεων του DNA, τα οποία βρίσκονται διάσπαρτα στο γονιδίωμα. Η προοδευτική συσσώρευση αλλαγών σε κύρια ρυθμιστικά γονίδια, που προκαλούνται από την μικροδορυφορική αστάθεια, φαίνεται να εμπλέκεται στην διαδικασία της καρκινογένεσης. Η μικροδορυφορική αστάθεια οφείλεται στην αδρανοποίηση οποιασδήποτε πρωτεΐνης του συστήματος MMR (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*: πρωτεΐνες του συστήματος επιδιόρθωσης), γεγονός που οδηγεί σε συσσώρευση αλλαγών σε μεγάλο αριθμό γονιδίων. Ο πιο κοινός μηχανισμός στον καρκίνο του ενδομητρίου, είναι η αδρανοποίηση του γονιδίου *MLH1*, η οποία επιτυγχάνεται μέσω επιγενετικής σίγασης, ως αποτέλεσμα της υπερμεθυλίωσης των CpG νησίδων στον υποκινητή του γονιδίου. Επιπρόσθετα, κληρονομικές ή επίκτητες μεταλλάξεις του γονιδίου *MSH6* παρατηρούνται επίσης συχνά σε ασθενείς με καρκίνο του ενδομητρίου.

Η μικροδορυφορική αστάθεια και η μη φυσιολογική μεθυλίωση του *MLH1* γονιδίου, αποτελούν πρώιμα γεγονότα στην καρκινογένεση του ενδομητρίου, καθώς έχουν αναφερθεί και σε προκαρκινικές αλλοιώσεις. Η μικροδορυφορική αστάθεια προκαλεί γενετική ετερογένεια στα κύτταρα ενός όγκου. Το γεγονός αυτό επιτρέπει τη δημιουργία κλωνικών πληθυσμών με διαφορετικά χαρακτηριστικά και δυνατότητα επιβίωσης, διήθησης και μετάστασης. Πράγματι, υπάρχουν μελέτες οι οποίες υποστηρίζουν ότι όγκοι που παρουσιάζουν μικροδορυφορική αστάθεια φέρουν αλλοιώσεις του πλαισίου ανάγνωσης στις κωδικοποιητικές περιοχές των γονιδίων *FAS*,

BAX, *CASP5* και *IGF1R*, που εμπλέκονται στον μηχανισμό της απόπτωσης, κάτι το οποίο δεν παρατηρείται σε όγκους χωρίς MSI (Hecht. et al, 2006).

Αξίζει να αναφερθεί ότι τα υψηλότερα ποσοστά μεταλλάξεων στο γονίδιο *PTEN* έχουν περιγραφεί σε όγκους με μικροδορυφορική αστάθεια. Η συσχέτιση μεταξύ της αδρανοποίησης του *PTEN* γονιδίου και του MSI status έχει καταγραφεί και σε προκαρκινικές αλλοιώσεις, υποδηλώνοντας τη σημασία τους στον καρκίνο του ενδομητρίου τύπου I (Parazzini et al, 1991).

Πρωτο-ογκογονίδιο *K-ras*

Το *KRAS* εδράζεται στο χρωμόσωμα 12p12.1 και εμπλέκεται στην απόκριση των κυττάρων μετά από εξωκυττάρια σηματοδότηση. Έχει ενεργό ρόλο στην καθοδική ρύθμιση (down regulation) των μονοπατιών MAPK, PI3K/AKT και EGFR, και εμπλέκεται με τον τρόπο αυτό σε διαδικασίες όπως είναι ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση, η αγγειογένεση και η απόπτωση. Μεταλλάξεις του *KRAS* γονιδίου αναφέρονται σε ποσοστό 10-30% των καρκίνων του ενδομητρίου τύπου I.

Η πλειοψηφία των εν λόγω μεταλλάξεων εμφανίζονται σε νεοπλασμάτα με μικροδορυφορική αστάθεια (Sideris et al, 2019).

Γονίδιο *CTNNB1*

Το γονίδιο *CTNNB1* κωδικοποιεί την β-κατενίνη και εδράζεται στο χρωμόσωμα 3p21. Η β-κατενίνη αποτελεί το βασικό συστατικό του συστήματος προσκόλλησης των καντχερινών. Συνδέεται κυτταροπλασματικά με την E-καντχερίνη και μέσω των αμινοτελικών περιοχών της α-κατενίνης με τον κυτταροσκελετό. Συμμετέχει στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της μετανάστευσης των κυττάρων και της απόπτωσης.

Μεταλλάξεις στο γονίδιο *CTNNB1* απαντώνται σε ποσοστό της τάξης του 20-35% των ενδομητριοειδών καρκινωμάτων. Η σηματοδοτική οδός ενεργοποιείται μέσω μεταλλάξεων ή αδρανοποίησης του μορίου της E-καντχερίνης. Οι μεταλλάξεις της β-κατενίνης οδηγούν στην συσσώρευσή της στον πυρήνα του κυττάρου. Μεταβολές στην έκφρασή της έχουν σημειωθεί στην άτυπη υπερπλασία, αντιπροσωπεύοντας έτσι ένα πρώιμο γεγονός στην ογκογένεση του ενδομητρίου (Hecht., et al, 2006). Αξίζει να σημειωθεί ότι ενώ οι μεταλλάξεις στα γονίδια *PTEN* και *KRAS* συχνά συνυπάρχουν, οι μεταλλάξεις του γονιδίου *CTNNB1* παρατηρούνται συνήθως μόνες τους, δείχνοντας

ότι η οδός σηματοδότησης Wnt αποτελεί έναν ανεξάρτητο μηχανισμό κατά την καρκινογένεση (Liu, 2007).

4.2 Μοριακό προφίλ καρκινωμάτων τύπου II

Ογκοκατασταλτικό γονίδιο TP53

Η συνηθέστερη γενετική αλλοίωση στα τύπου II καρκινώματα του ενδομητρίου αφορά στο ογκοκατασταλτικό γονίδιο TP53, το οποίο εδράζεται στο χρωμόσωμα 17. Αποτελεί κύριο γονίδιο φρουρό και μεταλλάξεις του εντοπίζονται σε ποσοστό της τάξης του 90% των ορωδών καρκινωμάτων. Υπό κανονικές συνθήκες, ευθύνεται για τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου, μέσω αναστολής της φωσφορυλίωσης τόσο της κυκλίνης D1, όσο και της πρωτεΐνης του ρετινοβλαστώματος, μετά από αναγνώριση βλάβης στο DNA. Η παρουσία μεταλλάξεων στο γονίδιο TP53 προκαλεί τη σύνθεση μίας μη λειτουργικής πρωτεΐνης που συσσωρεύεται στο κύτταρο και δρα ως διπλά αρνητικός αναστολέας του φυσιολογικού γονιδίου, με αποτέλεσμα την αναπαραγωγή ανώμαλων κυττάρων. Θεωρείται ότι η μετάλλαξη στο ένα αλληλόμορφο εμφανίζεται νωρίς, ενώ η απώλεια του δεύτερου φυσιολογικού αλληλομόρφου εμφανίζεται αργότερα κατά την εξέλιξη του όγκου (Ryan et al, 2005).

Λοιπές γενετικές παραλλαγές

Άλλες συχνές γενετικές παραλλαγές στα τύπου II καρκινώματα του ενδομητρίου είναι η αδρανοποίηση της p16 πρωτεΐνης, η υπερέκφραση του HER-2/neu2 υποδοχέα και η μειωμένη έκφραση της E-καντχερίνης.

Η αδρανοποίηση της p16 σημειώνεται στο 45% των ορωδών καρκινωμάτων και σε κάποια διανομοκυτταρικά. Το υπεύθυνο ογκοκατασταλτικό γονίδιο εδράζεται στο χρωμόσωμα 9p21 και κωδικοποιεί μια ρυθμιστική πρωτεΐνη του κυτταρικού κύκλου.

Ο HER-2/neu2 υποδοχέας είναι ένας διαμεμβρανικός υποδοχέας με ενεργότητα τυροσινικής κινάσης ο οποίος εμπλέκεται στην κυτταρική σηματοδότηση. Η υπερέκφραση του υποδοχέα ή η γονιδιακή ενίσχυση του γονιδίου ενεργοποιούν σηματοδοτικές οδούς κρίσιμες στη διαδικασία της καρκινογένεσης (Ryan et al, 2005).

Οι καντχερίνες είναι μόρια κυτταρικής προσκόλλησης και παίρνουν μέρος στις συνδέσεις των κυττάρων μεταξύ τους. Η E-καντχερίνη, ένα από τα σημαντικότερα μόρια προσκόλλησης στους επιθηλιακούς ιστούς, κωδικοποιείται από το γονίδιο CDH1 το οποίο εδράζεται στη χρωμοσωμική θέση 16q22.1. Πρόκειται για ένα

ογκοκατασταλτικό γονίδιο, η απώλεια του οποίου φαίνεται ότι προωθεί τη διήθηση και τη μετάσταση του όγκου. Η μειωμένη έκφραση της E-καντχερίνης είναι συχνή στα μη ενδομητριοειδούς τύπου καρκινώματα (80%-90%) και ενδέχεται να είναι αποτέλεσμα αποσιώπησης μέσω υπερμεθυλίωσης ή απώλειας ετεροζυγωτίας.

Η απώλεια της E-καντχερίνης συνδέεται με EMT μετάβαση και αυξημένο μεταστατικό δυναμικό. Η απώλειά της συσχετίζεται επίσης με αυξημένη ικανότητα διήθησης των όγκων. Συμμετέχει στην σηματοδοτική οδό Wnt, ρυθμίζοντας διαδικασίες όπως η μετανάστευση, ο πολλαπλασιασμός, η απόπτωση και η διαφοροποίηση των κυττάρων. Στον καρκίνο του ενδομητρίου, μερική ή ολική απώλεια έκφρασης της E-καντχερίνης συσχετίζεται με επιθετική συμπεριφορά (Sanderson et al, 2016).

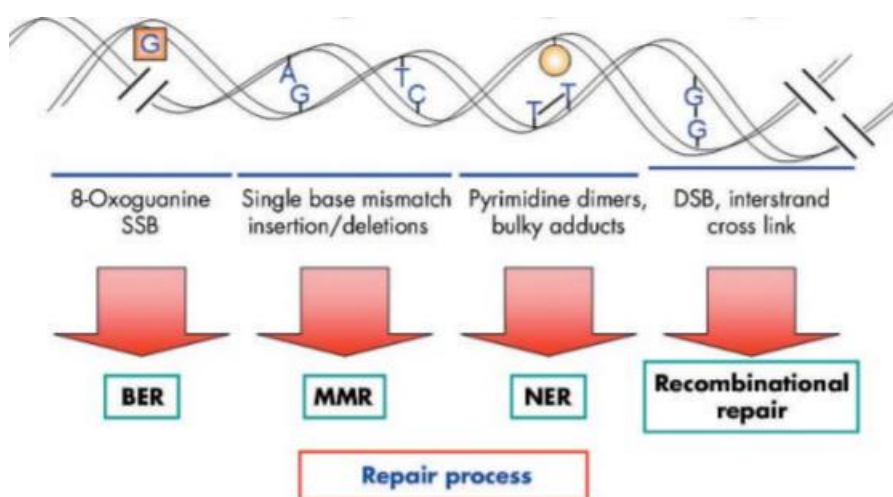
5. Μηχανισμοί επιδιόρθωσης DNA

Τα κύτταρα υφίστανται έναν συνεχή καταγισμό εξωγενών ουσιών όπως το βενζοπυρένιο, οι διοξίνες, το υπεριώδες φως και άλλα, καθώς και ενδογενών στρεσογόνων παραγόντων όπως τα δραστικά είδη οξυγόνου και αζώτου (ROS και NOS) που μπορούν να προκαλέσουν βλάβη στο DNA. Μια άλλη πηγή που είναι δυνατό να προκαλέσει βλάβη στο DNA είναι λάθη που συμβαίνουν κατά τον μεταβολισμό ή λάθη που γίνονται κατά την αντιγραφή και τον ανασυνδυασμό του γενετικού υλικού. Εάν οι βλάβες του DNA δεν επισκευαστούν είναι πιθανό να προκληθούν μεταλλάξεις στα σωματικά ή γεννητικά κύτταρα, οι οποίες μπορούν να αλλάξουν τον κυτταρικό φαινότυπο και να οδηγήσουν σε παθολογικές καταστάσεις και γενική δυσλειτουργία των κυττάρων (Li, 2017). Μια από τις παθολογικές καταστάσεις που μπορούν να προκληθούν λόγω βλάβης στο DNA είναι ο καρκίνος καθώς μπορεί να δημιουργηθούν μεταλλάξεις και να επηρεάσουν ογκογονίδια και ογκοκατασταλτικά γονίδια (Torgovnick et al, 2015).

Τα κύτταρα για να προστατευτούν και να αντισταθμίσουν τη διάβρωση των γονιδίων αλλά και τη συσσώρευση μεταλλαγμένου DNA έχουν αναπτύξει μηχανισμούς επιδιόρθωσης όπου ο καθένας είναι υπεύθυνος για να διορθώνει ένα διαφορετικό σύνολο βλαβών καθώς είναι πρακτικά αδύνατο ένας μηχανισμός να μπορεί να αντιμετωπίσει την πληθώρα των λαθών που συμβαίνουν αλλά ένα σύνολο συστημάτων να είναι σε θέση να αντιμετωπίσει σχεδόν κάθε πιθανή βλάβη στο DNA. Τα κύτταρα των θηλαστικών έχουν αναπτύξει τέσσερις βασικούς μηχανισμούς επιδιόρθωσης.

(Dexheimer, 2012 ; Hoeijmakers, 2001). Οι μηχανισμοί αυτοί όπως φαίνονται και στην παρακάτω εικόνα είναι οι :

- Μηχανισμός επιδιόρθωσης διαμέσου Εκτομής – Νουκλεοτιδίου (Nucleotide – Excision Repair , NER)
- Μηχανισμός επιδιόρθωσης διαμέσου Εκτομής – Βάσης (Base - Excision Repair , BER)
- Μηχανισμός επιδιόρθωσης θραύσης της διπλής έλικας του DNA (Double-strand Break Repair , DBR)
- Μηχανισμός επιδιόρθωσης Εσφαλμένα Συζευγμένων Βάσεων (Mismatch Repair , MMR)



Εικόνα 21: Βλάβη στο DNA και ο κατάλληλος μηχανισμός επιδιόρθωσης. Πηγή: Boland , 2005.

5.1 Μηχανισμός επιδιόρθωσης διαμέσου Εκτομής – Νουκλεοτιδίου (NER)

Ο μηχανισμός επιδιόρθωσης διαμέσου εκτομής Νουκλεοτιδίου είναι το κύριο σύστημα επισκευής για την αφαίρεση μεγάλων βλαβών του DNA που δημιουργούνται μετά από έκθεση σε ακτινοβολία , χημικές ουσίες ή προσθήκη κάποιας πρωτεΐνης στο DNA. Κατά τη διάρκεια της αντιγραφής η DNA πολυμεράση δεν μπορεί να προσπεράσει τέτοιες βλάβες με αποτέλεσμα το μπλοκάρισμα της αντιγραφής και την επαγωγή του κυτταρικού θανάτου , παρόμοια είναι δυνατόν να παρεμποδιστεί η μετακίνηση των μεταγραφικών συμπλόκων. Για το λόγο αυτό οι προκαρυωτικοί και ευκαρυωτικοί οργανισμοί χρησιμοποιούν τον μηχανισμό NER , ο οποίος είναι ικανός να ξεπερνά

τέτοια αντιγραφικά και μεταγραφικά μπλοκαρίσματα και να επιδιορθώνει τις βλάβες (Sancar et al, 2004).

Στον μηχανισμό επιδιόρθωσης εκτομής νουκλεοτιδίου διακρίνονται τέσσερις φάσεις :

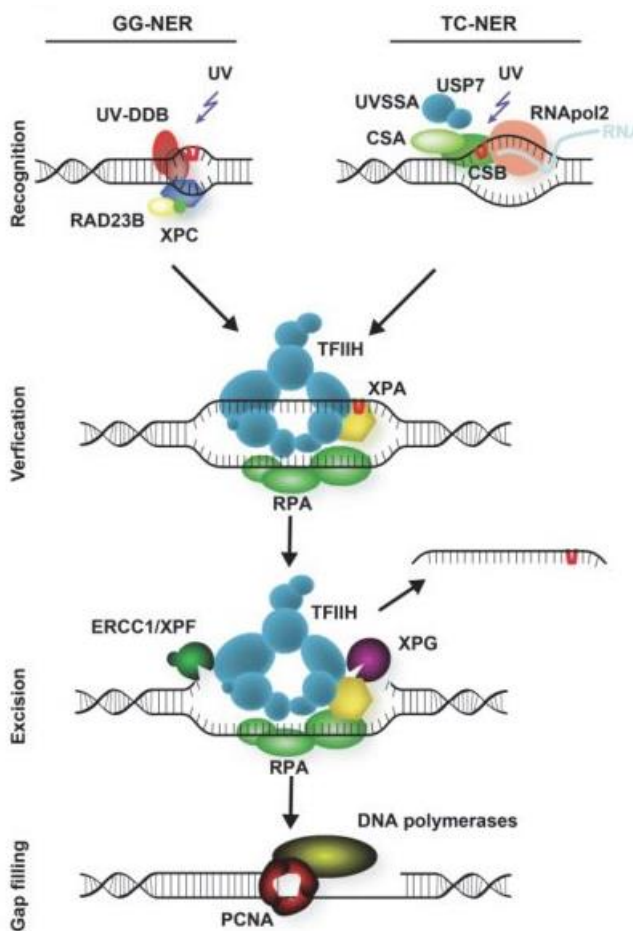
1. Αναγνώριση της βλάβης (της ή των κατεστραμμένων βάσεων) (recognition).
2. Συναρμογή ενός πολυπρωτεϊνικού συμπλόκου στη θέση αυτή (verification).
3. Εκτομή της κατεστραμμένης αλυσίδας αρκετά νουκλεοτίδια ανοδικά και καθοδικά της θέσης όπου εντοπίστηκε η βλάβη και απομάκρυνση περίπου 30 νουκλεοτιδίων μεταξύ των δύο αυτών θέσεων (excision).
4. Χρήση της άθικτης αλυσίδας σαν εκμαγείο για την DNA πολυμεράση και ολοκλήρωση της διαδικασίας με ομοιοπολική σύνδεση του 3' άκρου του νέου τμήματος με την υπόλοιπη αλυσίδα (gap filling).

Υπάρχουν δύο τύποι NER που διαφέρουν μόνο ως προς την αναγνώριση της βλάβης , δηλαδή στο βήμα 1. Οι δυο μηχανισμοί αυτοί είναι :

- Global Genomic Repair (GGR - NER) – διορθώνει βλάβες οπουδήποτε στο γονιδίωμα και ενεργοποιείται από ακινητοποιημένες αντιγραφικές διχάλες.
- Transcription – Coupled NER (TC – NER) – επιδιορθώνει μεταγραφόμενες περιοχές του DNA.

Οι σταματημένες αντιγραφικές διχάλες και τα σταματημένα μεταγραφικά σύμπλοκα ενεργοποιούν τον μηχανισμό επιδιόρθωσης διαμέσου Εκτομής – Νουκλεοτιδίου (Διαλέξεις Γενετικής Μηχανικής – Τμήμα Β.Ε.Τ- Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων).

Όπως φαίνεται και από τη διπλανή εικόνα, στο πρώτο βήμα (recognition) και στο μονοπάτι GG-NER ο βασικός παράγοντας αναγνώρισης της βλάβης είναι ένα πρωτεϊνικό σύμπλεγμα που αποτελείται από XPC (Xeroderma Pigmentosum) και δύο βοηθητικές πρωτεΐνες τις HR23B/CEN2 οι οποίες αυξάνουν τη συγγένεια αλλά και την ειδικότητα του XPC που θα αναγνωρίσει και θα προσδεθεί σε βλάβη του DNA που παραμορφώνει την έλικα. Υπάρχει επιπλέον και ένα σύμπλοκο σύνδεσης στο DNA που αναγνωρίζει βλάβη από υπερϊώδη ακτινοβολία, και ονομάζεται UV-DDB



Εικόνα 22: Μηχανισμός επιδιόρθωσης NER. Πηγή :Marteijn et al, 2014

(Ultraviolet radiation – DNA damage-binding protein). Το σύμπλοκο αυτό αποτελείται από δυο υπομονάδες την DDB1 και την XPE (DDB2), οι οποίες αναγνωρίζουν το συγκεκριμένο είδος βλάβης που προκαλεί παραμόρφωση στην έλικα του DNA και διευκολύνει την έλευση του συμπλέγματος XPC στο σημείο της βλάβης (Sugasawa.,2010). Από την άλλη πλευρά η αναγνώριση βλάβης στο TC-NER ξεκινά όταν ανιχνεύεται μπλοκάρισμα της επιμήκυνσης της μεταγραφής καθώς η πολυμεράση (RNApol2) σταματά τη δράση της όταν συναντά μια θέση βλάβης στο DNA. Μόλις ανιχνευτεί σταματημένη πολυμεράση, το TC-NER στρατολογεί τις πρωτεΐνες CSA και CSB (Cockayne Syndrome protein A and B), τους βασικούς παράγοντες του συστήματος NER και ειδικές για το TC-NER πρωτεΐνες όπως οι : UVSSA (UV-Stimulated Scaffold Protein A), USP7 (Ubiquitin – Specific-Processing Protease 7), XAB2 (XPA-binding protein 2) και την HMGN1 (High Mobility Group Nucleosome-binding domain-containing protein 1) (Fousteri et al, 2006 ; Schwertman et al, 2012).

Μετά την αναγνώριση της βλάβης , τα δυο υποσυστήματα προχωρούν στις κοινές αντιδράσεις του συστήματος NER. Το σύμπλεγμα XPC του GG-NER και το CSB/CSA του TC-NER προσλαμβάνουν τον πολυπαραγοντικό μεταγραφικό παράγοντα TFIIF στο σημείο της βλάβης. Στη συνέχεια , δυο ελικάσες που είναι συνδεδεμένες στον TFIIF , δημιουργούν ένα ασύμμετρο ξετύλιγμα στην διπλή έλικα και σχηματίζουν μια ‘φουσαλίδα’ περίπου 30 νουκλεοτιδίων που εμπεριέχει τη βλάβη και ο παράγοντας XPA εισέρχεται στην περιοχή αυτή διασφαλίζοντας ότι το άθικτο DNA δεν θα υποστεί επεξεργασία. Η δέσμευση του XPA συνοδεύεται από ένα ετεροδιμερές , μια πρωτεΐνη που δεσμεύεται στο μονόκλωνο DNA η οποία σταθεροποιεί το σύμπλοκο και βοηθάει στην αντιγραφή , την RPA (Replication Protein A) (βήμα 2 - verification). Έπειτα , δυο ενδονουκλεάσες οι XPG και XPF/ERCC1 διασπών το DNA στις θέσεις 3’ και 5’ αντίστοιχα , προκαλώντας εκτομή του ολιγονουκλεοτιδίου που περιέχει τη βλάβη και έχει μήκος περίπου 30 νουκλεοτίδια (βήμα 3 – excision). Τέλος η DNA πολυμεράση χρησιμοποιεί τον άθικτο κλώνο ως εκμαγείο για να συνθέσει έναν νέο κλώνο στο κενό που προκύπτει . Το κενό που δημιουργείται μεταξύ του παλιού και του νεοσυντεθειμένου κλώνου σφραγίζεται με τη DNA λιγάση (βήμα 4 – gap filling) και έτσι ολοκληρώνεται η επιδιόρθωση βλάβης με τον μηχανισμό NER (Dexheimer, 2012).

5.2 Μηχανισμός επιδιόρθωσης διαμέσου Εκτομής – Βάσης (BER)

Ο μηχανισμός επιδιόρθωσης διαμέσου εκτομής – βάσης έχει συσχετιστεί με τη διατήρηση της ακεραιότητας του γονιδιώματος εξαλείφοντας τις βάσεις με μικρές χημικές τροποποιήσεις. Το σύστημα BER είναι υπεύθυνο για την αφαίρεση κατεστραμμένων βάσεων του DNA , οι οποίες μπορούν να αναγνωριστούν από ειδικά ένζυμα τις DNA γλυκοζυλάσες , ένζυμα που αφαιρούν επιλεκτικά τις κατεστραμμένες, τροποποιημένες ή μη συμπληρωματικές βάσεις. Οι κύριες βλάβες που διορθώνονται από τον μηχανισμό BER είναι η μεθυλίωση , η απαμίνωση , η οξειδωση, η αυθόρμητη απώλεια μιας βάσης του DNA αλλά και διάφορα αντικαρκινικά φάρμακα όπως το DTIC και η τεμοζολομίδη που προκαλούν ακυλιώσεις στο DNA (Mullins et al, 2019; Christmann et al, 2003).

Η διαδικασία επιδιόρθωσης πραγματοποιείται σε πέντε βασικά βήματα (εικόνα 23) :

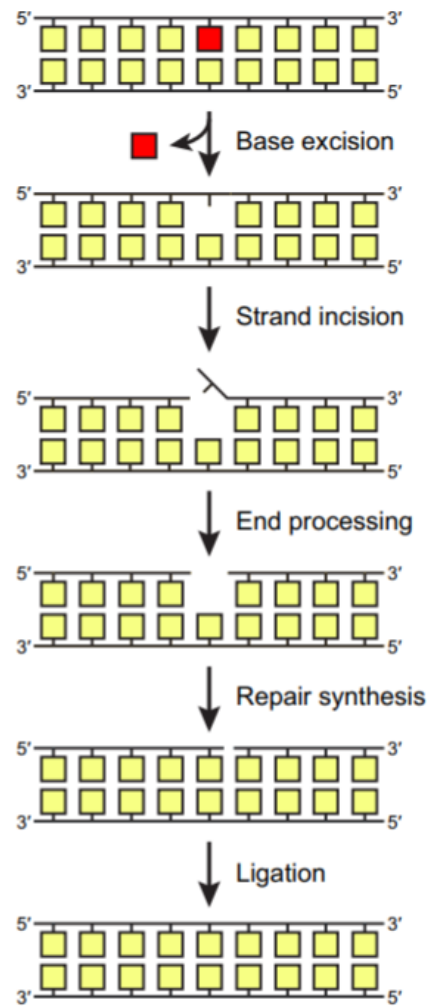
1. Εκτομή της βάσης (base excision)
2. Τομή της διπλής έλικας (strand incision)
3. Επεξεργασία του άκρου που έχει τη τομή (end processing)

4. Επισκευή της βλάβης (repair synthesis)
5. Σύνδεση (ligation)

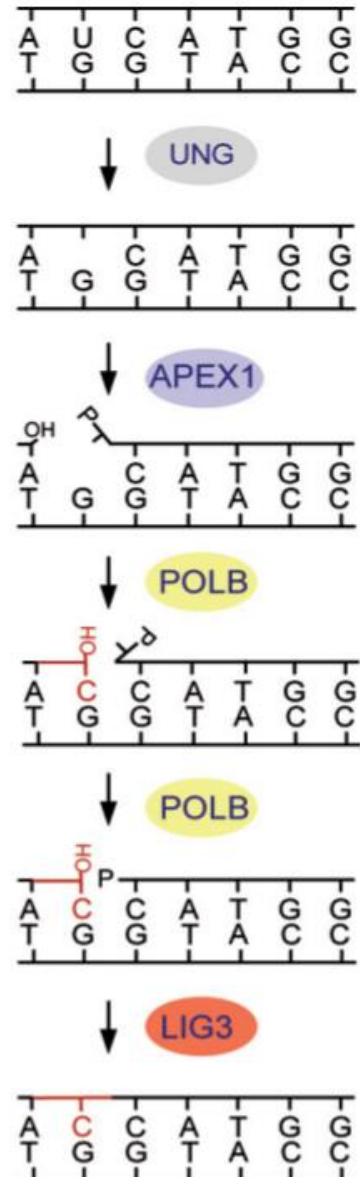
Πιο αναλυτικά , για τη σωστή λειτουργία του συγκεκριμένου μηχανισμού επιδιόρθωσης απαιτείται η δράση τεσσάρων πρωτεϊνών/ ενζύμων: μια DNA γλυκοζυλάση , μια AP ενδονουκλεάση ή AP λυάση, μια DNA πολυμεράση και μια DNA λιγάση. Τα ένζυμα αυτά λειτουργούν συντονισμένα με σκοπό να αφαιρέσουν μια κατεστραμμένη βάση DNA και να την αντικαταστήσουν με τη σωστή (Robertson et al, 2009).

Το πρώτο βήμα στον μηχανισμό BER είναι η αναγνώριση μιας κατεστραμμένης βάσης από μια γλυκοζυλάση του DNA και συγκεκριμένα την uracil – DNA glycosylase (UNG). Μετά την αναγνώριση , η γλυκοζυλάση UNG καταλύει τη διάσπαση ενός N – γλυκοσιδικού δεσμού , αφαιρώντας αποτελεσματικά την κατεστραμμένη βάση δημιουργώντας μια απουρινική ή απυριμιδική θέση (apurinic or apyrimidinic site – AP). Στη συνέχεια μια ενδονουκλεάση AP (APEX nuclease 1, APEX1) κόβει τον τροποποιημένο κλώνο , δημιουργώντας

έναν σπάσιμο στην αλυσίδα που περιέχει την κατεστραμμένη βάση. Εφόσον είναι απαραίτητο το σπάσιμο επεξεργάζεται με ένα από τα πολλά ένζυμα ,συνήθως μια δεοξυ-ριβο-φωσφοδιεστεράση υδρολύει την αλυσίδα DNA για να δημιουργηθεί ένα κενό με ένα 3'-υδροξυλικό και ένα 5'- φωσφορικό άκρο. Μια DNA πολυμεράση γεμίζει το κενό με το σωστό νουκλεοτίδιο , οι δύο παραπάνω αντιδράσεις καταλύονται από το ίδιο ένζυμο την πολυμεράση Β (POLB) η οποία πραγματοποιεί τις δυο αντιδράσεις που περιγράφονται παραπάνω. Τέλος μια DNA λιγάση (LIG3) ολοκληρώνει τη διαδικασία της επιδιόρθωσης και αποκαθιστά την ακεραιότητα της έλικας σφραγίζοντας την εγκοπή (Robertson et al, 2009 ; Zharkov, 2008).



Εικόνα 23: Βασικά θήματα μηχανισμού επιδιόρθωσης BER. Πηγή :Mullins et al, 2019.



Εικόνα 24: Ένζυμα που καταλύουν τα βήματα κατά το μηχανισμό BER. Πηγή: Robertson et al, 2009

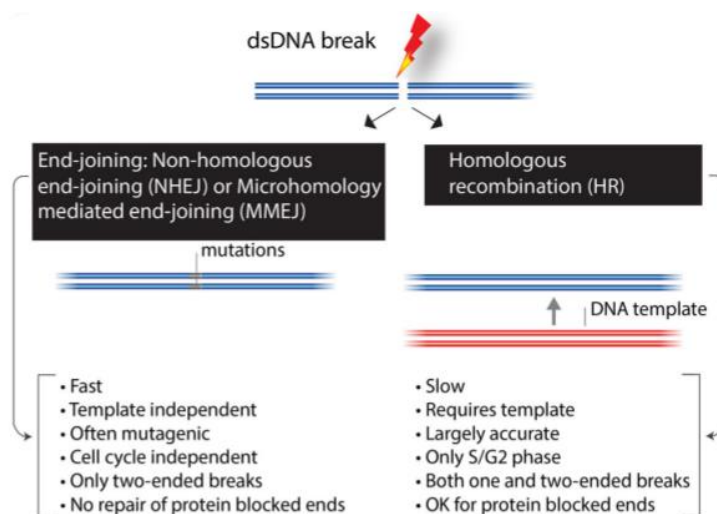
5.3 Μηχανισμός επιδιόρθωσης θραύσης της διπλής έλικας του DNA (DBR)

Το DNA μας βρίσκεται υπό την συνεχή απειλή λάθους λόγω υπεριόδους και ιονίζουσας ακτινοβολίας, χημικών ουσιών ή λαθών κατά τη διάρκεια μεταβολικών διαδικασιών (Ranjhe et al, 2018). Η έκθεση στις ακτίνες X συχνά προκαλεί θραύση και των δυο αλυσίδων του DNA σε γειτονικές θέσεις δημιουργώντας έτσι Δίκλωνες Θραύσεις (Double strand Break - DSB). Εάν αυτές οι δίκλωνες θραύσεις δεν επιδιορθωθούν είναι δυνατό να προκαλέσουν πληθώρα χρωμοσωμικών ανωμαλιών οι οποίες οδηγούν σε κυτταρικό θάνατο ή προ-καρκινικές καταστάσεις. Πρέπει να σημειωθεί ότι η δημιουργία δίκλωνων θραύσεων είναι θεμελιώδες χαρακτηριστικό ορισμένων φυσιολογικών κυτταρικών διαδικασιών, οι οποίες απαιτούν αναδιατάξεις

του DNA όπως ο μειωτικός ανασυνδυασμός (Σημειώσεις Γενετικής Μηχανικής , Τμήμα Β.Ε.Τ – Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων).

Οι δίκλωνες θραύσεις είναι οι πιο κυτταροτοξικές αλλοιώσεις του DNA που σημαίνει ότι η ανίχνευση , η σηματοδότηση αλλά και η επισκευή τους απαιτούν μια ολοκληρωμένη κυτταρική απόκριση , γνωστή ως Μηχανισμός επιδιόρθωσης θραύσης της διπλής έλικας του DNA (DBR). Η επιδιόρθωση μέσω του συστήματος DBR μπορεί να επιτευχθεί με διάφορα μέσα που ομαδοποιούνται σε δυο μεγάλες κατηγορίες ανάλογα με τη χρήση ή όχι μιας ομόλογης αλληλουχίας DNA ως πρότυπο (Vitor et al,2020).

Τα δύο κύρια μονοπάτια που χαρακτηρίζουν τον μηχανισμό αυτό όπως φαίνεται και από την εικόνα 25 είναι : η μη ομόλογη σύνδεση άκρων (Non-homologous end joining , NHEJ) και ο ομόλογος ανασυνδυασμός (Homologous recombination , HR).



Εικόνα 25: Τα δυο βασικά μονοπάτια του DBR και οι κύριες διαφορές αυτών. Πηγή: Ranjha et al,2018.

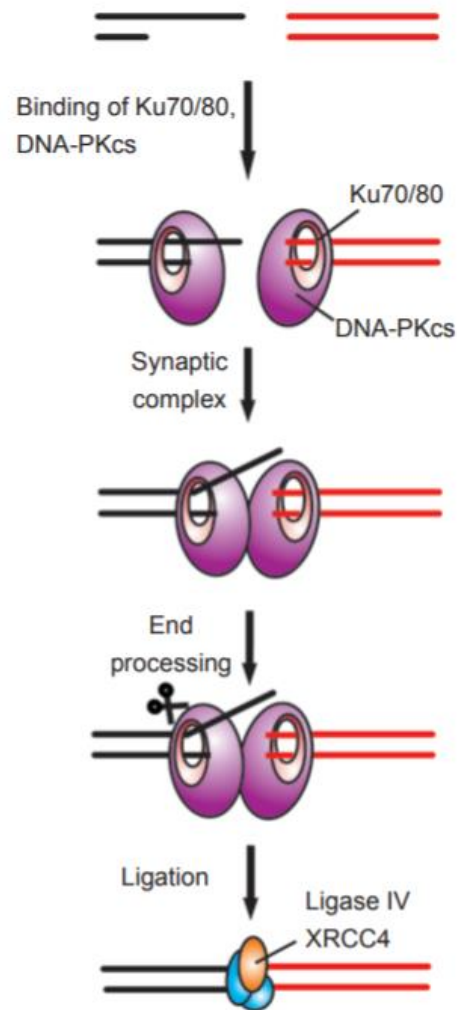
Η επισκευή μέσω τους συστήματος HR είναι κατά κύριο λόγο ένας μηχανισμός χωρίς σφάλματα, καθώς χρησιμοποιεί τις αδερφές χρωματίδες ως εκμαγεία για να εξασφαλίσει τη σωστή επιδιόρθωση (Li et al,2008). Αντίθετα, ο μηχανισμός NHEJ επιδιορθώνει τα σφάλματα με απευθείας σύνδεση των σπασμένων άκρων, κάτι που τον καθιστά συνήθως επιρρεπής σε σφάλματα (Lieber, 2010). Ο μηχανισμός NHEJ, αν και είναι ενεργός κατά τη διάρκεια ολόκληρου του κυτταρικού κύκλου, η δράση του κρίνεται σημαντικότερη κατά τη φάση G1 ενώ η λειτουργία του HR περιορίζεται στις όψιμες φάσεις S και G2 (Vitor et al,2020 ; Dexheimer, 2012).

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω τόσο ο NHEJ όσο και ο HR προστατεύουν την ακεραιότητα του γονιδιώματος και προχωρούν μέσω ενός καταρράκτη αντιδράσεων όπου οι ανιχνευτές λαθών του DNA, οι μεταγωγείς σήματος και τα ένζυμα τελεστές ανιχνεύουν και επανασυνδέουν τα σπασμένα άκρα. Οι παράγοντες που εμπλέκονται και τα δυο μονοπάτια περιγράφονται συνοπτικά παρακάτω.

5.3.1 Μη ομόλογη σύνδεση άκρων (NHEJ)

Ο μοριακός μηχανισμός της διαδικασίας NHEJ (εικόνα 26) αποτελεί έναν περίπλοκο επιδιορθωτικό μηχανισμό και απαιτεί τη συντονισμένη αλληλεπίδραση ενζύμων για την έγκαιρη έναρξη κάθε συμπλόκου και την επιτυχή ολοκλήρωση της διαδικασίας.

Ο μηχανισμός ξεκινά με τη δέσμευση ενός πρωτεϊνικού συμπλόκου, του ετεροδιμερούς Ku70/80 στα δυο άκρα του σπασμένου DNA. Το ετεροδιμερές Ku αποτρέπει περαιτέρω άκρη στα άκρα και προσελκύει άλλες πρωτεΐνες οι οποίες επεξεργάζονται τα άκρα των κλώνων δημιουργώντας τα 5' φωσφορικά και 3' υδροξυλικά άκρα που χρειάζονται για την ομοιοπολική σύνδεση από τη λιγάση, αποτελεί δηλαδή ένα κριώμα για τη συναρμολόγηση των άλλων βασικών ενζύμων του μηχανισμού. Κατά το αρχικό στάδιο του NHEJ το κριώμα Ku προσελκύει την εξαρτώμενη από το DNA καταλυτική υπομονάδα της



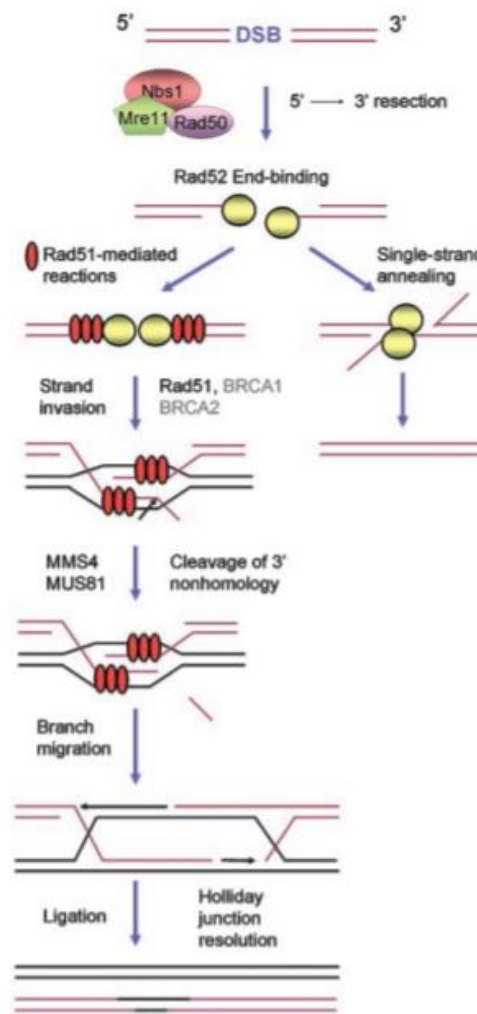
Εικόνα 26: Βασικός μηχανισμός του NHEJ
Πηγή: Weterings et al,2008.

πρωτεϊνικής κινάσης (DNA-dependent Protein Kinase Catalytic Subunit, DNA-PKcs) στο DSB. Η πρωτεϊνική κινάση είναι υπεύθυνη για τη δημιουργία συμπλέγματος που θα φέρει τα δύο άκρα του DNA κοντά, όταν λοιπόν τα δυο άκρα του DNA έχουν συλληφθεί και συνδεθεί στο πρωτεϊνικό σύμπλεγμα των Ku/DNA-PKcs, τα μη συνδεόμενα άκρα πρέπει να υποβληθούν σε επεξεργασία πριν πραγματοποιηθεί η τελική επιδιόρθωση της διπλής θραύσης (synaptic complex). Το ένζυμο που είναι υπεύθυνο για την αφαίρεση των μη συνδεόμενων άκρων είναι η Άρτεμις, μια πρωτεΐνη η οποία στην ενεργή της μορφή έχει ενεργότητες εξωνουκλεάσης και ενδονουκλεάσης. Στη συνέχεια μια πολυμεράση (η οποία δεν είναι ακόμα γνωστή) συμπληρώνει τις εναπομένουσες μονόκλωνες προεξοχές (end processing). Τέλος το σύμπλεγμα της λιγάσης IV με την πρωτεΐνη XRCC4 είναι υπεύθυνο για τη σύνδεση των μονόκλωνων άκρων (ligation) (Weterings et al,2008).

5.3.2 Ομόλογος Ανασυνδυασμός (HR)

Η δεύτερη κύρια οδός αποκατάστασης του DSB, είναι ο ομόλογος ανασυνδυασμός, αποτελεί μια διαδικασία πολλών σταδίων και συνδέεται στενά με την εμφάνιση καρκίνου στον άνθρωπο ειδικά μέσω της εμπλοκής δυο κύριων κληρονομικών γονιδίων προδιάθεσης για καρκίνου του μαστού και των ωοθηκών, τα γονίδια BRCA1 και BRCA2 (Scully et al, 2019).

Ο ομόλογος ανασυνδυασμός μπορεί να χωριστεί χονδρικά σε τρεις κύριες φάσεις : τη προ-σύναψη , τη σύναψη και τη διαδικασία μετά τη σύναψη ,ο μοριακός μηχανισμός του HR παρουσιάζεται και στην διπλανή εικόνα. Κατά τη πρώτη φάση , παρατηρείται δέσμευση εξειδικευμένων πρωτεϊνών και ενζύμων στα σπασμένα άκρα, και επακόλουθη επεξεργασία των 5' άκρων από μια ενδονουκλεάση προκειμένου να δημιουργηθούν 3'-μονόκλωνες περιοχές και επικάλυψη αυτών των περιοχών με πρωτεΐνες. Υπάρχει ένα σύμπλοκο τριών υπομονάδων το MRN που αποτελείται από το Mre11-Rad50-Nbs1 μαζί με το CtIP(RBBP8) τα οποία είναι υπεύθυνα για την έναρξη της εκτομής κατά την οποία τα 5' άκρα εκατέρωθεν του σφάλματος κόβονται ώστε να δημιουργηθούν 3' μονόκλωνες προεξοχές DNA. Το προκύπτον 3' μονόκλωνο άκρο δεσμεύεται από ένα σύμπλοκο πρωτεϊνών , το Rad52 ,το



Εικόνα 27: Βασικός μηχανισμός του HR.
Πηγή :Sancar et al,2004.

οποίο και προστατεύει από εξωνουκλεολυτική πέψη. Στη συνέχεια το σύμπλοκο Rad51-ινίδιο DNA αναζητά την αδερφή χρωματίδα με σκοπό την εύρεση της συμπληρωματικής αλληλουχίας με μια διαδικασία που ονομάζεται Διείσδυση κλώνου (Strand Invasion). Μόλις γίνει η αναγνώριση του ομόλογου DNA το Rad51 μεσολαβεί στην αντίδραση για την εισβολή του κλώνου όπως ο κατεστραμμένος κλώνος εισβάλλει στο εκμαγείο DNA δηλαδή την αδερφή χρωματίδα. Στη συνέχεια, η σύνθεση

DNA από το 3' άκρο του κλώνου εισβολής πραγματοποιείται από μια DNA πολυμεράση, και τέλος η σύνδεση των μονόκλωνων άκρων γίνεται από τη DNA λιγάση I, η οποία δίνει μια ενδιάμεση δομή τεσσάρων κατευθύνσεων γνωστών και ως διασταύρωση Holliday. Η διασταύρωση Holliday είναι δυνατό να επιλυθεί είτε με διάλυση με τη βοήθεια του συμπλόκου BLM-TopIIa, με συμμετρική διάσπαση μέσω των συμπλεγμάτων GEN1/Yen1 ή Slx1/Slx4 ή με ασύμμετρη διάσπαση με τη βοήθεια του ειδικού συμπλέγματος ενδονουκλεασών Mus81/Eme1, έχοντας ως αποτέλεσμα την επιτυχή επιδιόρθωση των διπλών θραύσεων του DNA (Dexheimer, 2012 ; Christmann et al,2003 ; Constantinou et al,2001).

5.4 Μηχανισμός επιδιόρθωσης Εσφαλμένα Συζευγμένων Βάσεων (MMR)

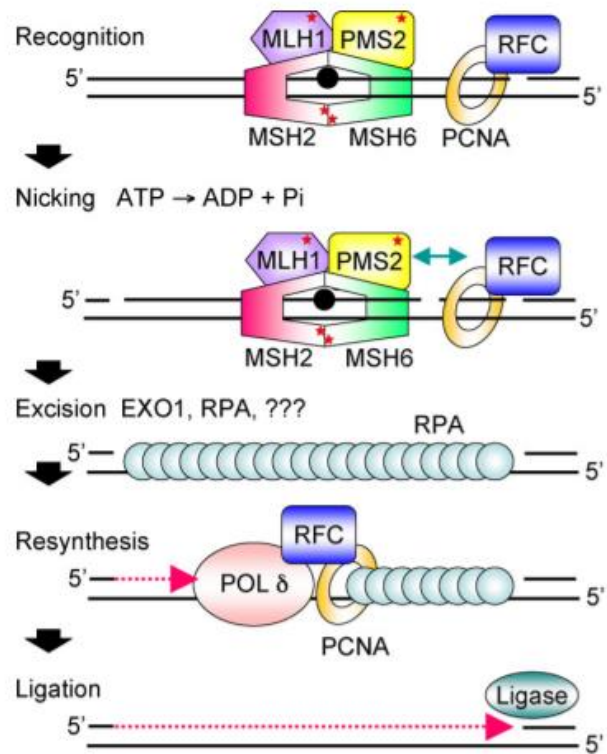
Ο μηχανισμός επιδιόρθωσης εσφαλμένα συζευγμένων βάσεων διαδραματίζει ουσιαστικό ρόλο στην επιδιόρθωση λανθασμένα ενσωματωμένων βάσεων κατά τη διάρκεια της αντιγραφής, τα οποία έχουν διαφύγει από τις πολυμεράσες της αντιγραφής που έχουν το ρόλο να διορθώνουν τα λάθη αυτά. Εκτός από τις λανθασμένες βάσεις οι πρωτεΐνες του συστήματος MMR έχουν το ρόλο να επιδιορθώνουν τους βρόγχους εισαγωγής/διαγραφής (insertion/deletion loops- IDLs) που προκύπτουν από 'ολίσθηση' της πολυμεράσης κατά τη διάρκεια της αντιγραφής επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών DNA. Η σημασία του μηχανισμού αυτού επιβεβαιώνεται από το γεγονός ότι τα κύτταρα με ανεπάρκεια MMR έχουν έναν μεταλλαγμένο φαινότυπο ο οποίος χαρακτηρίζεται από μικροδορυφορική αστάθεια και αυξημένη συχνότητα μεταλλάξεων (Peltomaki,2001). Το σημαντικότερο είναι ότι οι μεταλλάξεις στα γονίδια MMR δημιουργούν πλήθος προβλημάτων όπως προδιάθεση για ορισμένους τύπους καρκίνου, όπως του καρκίνου του ενδομητρίου καθώς και του κληρονομικού καρκίνου του παχέος εντέρου, αντίσταση σε ορισμένους χημειοθεραπευτικούς παράγοντες αλλά και ανωμαλίες στη μείωση και την αναπαραγωγική ικανότητα των θηλαστικών. Έτσι ο μηχανισμός MMR αποτρέπει τη μεταλλαξιγένεση βραχυπρόθεσμα καθώς και την ογκογένεση μακροπρόθεσμα (Li,2007). Πρέπει να τονιστεί ότι ο μηχανισμός επιδιόρθωσης MMR είναι καλά συντηρημένος από την E.coli μέχρι και τον άνθρωπο (Iyer et al,2021).

Το σύστημα MMR ανασυστάθηκε στο εργαστήριο του Paul Modrich, και η επιδιόρθωση μέσω του συστήματος αυτού γίνεται σε τρία βασικά στάδια :

1. Αναγνώριση των αταίριαστων βάσεων.

2. Βήμα εκτομής όπου ο κλώνος που έχει τη λανθασμένη βάση σπάει και δημιουργείται ένα κενό.
3. Απομάκρυνση της λανθασμένης βάσης και επιδιόρθωση. (Dexheimer,2012)

Το σύστημα MMR παρουσιάζεται και σχηματικά στην διπλανή εικόνα. Το επιδιορθωτικό αυτό μονοπάτι πραγματοποιείται από δυο κύρια πρωτεϊνικά σύμπλοκα, τα MutS και MutL, τα οποία πήραν τα ονόματά τους από την ομολογία τους με τις πρωτεΐνες MMR στην *E.coli*. Το σύμπλοκο MutS είναι υπεύθυνο για την αναγνώριση της λανθασμένης βάσης ενώ το MutL συνδέει την αναγνώριση λάθους που έγινε από το MutS με την αφαίρεση του κλώνου που περιέχει το σφάλμα. Το πρώτο βήμα, η αναγνώριση δηλαδή του λάθους πραγματοποιείται από δυο σύμπλοκα του MutS που λειτουργούν ως



Εικόνα 28: Μοριακός Μηχανισμός MMR. Πηγή :Hsieh et al,2008.

ετεροδιμερή. Το ένα είναι το MutS α που αποτελείται από τις πρωτεΐνες MSH2-MSH6 και αναγνωρίζει αναντιστοιχίες βάσεων και μικρά IDL ενός ή δυο νουκλεοτιδίων και το άλλο είναι το MutS β , το ετεροδιμερές των MSH2-MSH3 και αναγνωρίζει μεγαλύτερα IDL. Στο επόμενο βήμα, το ετεροδιμερές MSH2-MSH6 υφίσταται μια αλλαγή εξαρτώμενη από ATP, η αλλαγή αυτή του επιτρέπει να μετατοπίζεται κατά μήκος του DNA και στη συνέχεια στρατολογεί το σύμπλοκο MutL που εξαρτάται και αυτό από το ATP. Το σύμπλοκο MutL αποτελείται από τις πρωτεΐνες MLH1 και PMS2, και είναι αυτό που θα συνεχίσει την επιδιόρθωση που ξεκίνησε από τα MutS. Δημιουργείται έτσι ένα σύμπλοκο το οποίο είναι εξαρτώμενο από το ATP, αποτελείται από MutS-MutL-DNA και είναι απαραίτητο για την ενεργοποίηση της αποικοδόμησης που παρακινείται από την εξωνουκλεάση του κλώνου που περιέχει το λάθος, στην προκειμένη περίπτωση η αποικοδόμηση πραγματοποιείται από την εξωνουκλεάση 1 (Exonuclease1 – EXO1) με δράση 5' προς 3'. Το σημείο εισόδου της EXO1 στο DNA, μπορεί να είναι χιλιάδες νουκλεοτίδια από το λάθος και δημιουργείται μέσω κοπής της

μονής έλικας από την εξαρτώμενη από PCNA/παράγοντα αντιγραφής C (Replication Factor C – RFC) μέσω του MutLa που έχει δραστηριότητα ενδονουκλεάσης. Το κενό που δημιουργείται από την EXO1 συμπληρώνεται στη συνέχεια από την πολυμεράση δ, η οποία δρα μαζί με άλλες δυο πρωτεΐνες την PCNA και την πρωτεΐνη αντιγραφής A (Replication Protein A – RPA). Τέλος, ο μηχανισμός επιδιόρθωσης MMR ολοκληρώνεται με τη σύνδεση των μονόκλωνων άκρων που δημιουργούνται και επισφραγίζονται από την λιγάση I, αποκαθιστώντας την ακεραιότητα της διπλής έλικας (Hsieh et al,2008 ; Modrich, 2006 ; Dexheimer, 2012).

6. Μικροδορυφορική αστάθεια (Microsatellite Instability – MSI)

Η μικροδορυφορική αστάθεια είναι η γονιδιακή κατάσταση προδιάθεσης για μεταλλάξεις που προκύπτουν από την ελαττωματική επιδιόρθωση του DNA λόγω της ανεπάρκειας των μηχανισμών επιδιόρθωσής του (Mismatch repair system/MMR). Η παρουσία MSI υποδηλώνει ότι το σύστημα MMR δεν λειτουργεί κανονικά. Το συγκεκριμένο σύστημα επιδιόρθωσης, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, διορθώνει τα σφάλματα που εμφανίζονται κατά την αντιγραφή του DNA, όπως λανθασμένες βάσεις, εισαγωγές και διαγραφές βάσεων. Τα κύτταρα με ελαττωματικό MMR (dMMR) δεν είναι σε θέση να διορθώσουν τα λάθη που εμφανίζονται κατά την αντιγραφή του DNA και συνεπώς τα συσσωρεύουν. Αυτό οδηγεί στη δημιουργία νέων μικροδορυφόρων. Η ανάλυση με βάση την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης μπορεί να εμφανίσει αυτούς τους νέους μικροδορυφόρους και να υποδείξει τη παρουσία μικροδορυφορικής αστάθειας. Οι μικροδορυφόροι είναι επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες DNA, αυτές οι αλληλουχίες είναι φτιαγμένες από επαναλαμβανόμενα ζεύγη βάσεων μήκους ενός έως έξι βάσεων. Αν και το μήκος αυτών των μικροδορυφόρων είναι πολύ μεταβλητό από άτομο σε άτομο και συμβάλλει στο ξεχωριστό ‘δακτυλικό αποτύπωμα’ του DNA, κάθε άτομο έχει μικροδορυφόρους καθορισμένου μήκους. Ο πιο συνηθισμένος μικροδορυφόρος στους ανθρώπους είναι μια δινουκλεοτιδική επανάληψη νουκλεοτιδίων C και A, η οποία εμφανίζεται δεκάδες χιλιάδες φορές στο γονιδίωμα. Οι μικροδορυφόροι είναι επίσης γνωστοί ως απλές επαναλήψεις αλληλουχιών. Τέτοιες επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες διανέμονται στο γονιδίωμα και αποτελούνται από επαναλήψεις νουκλεοτιδίων οι οποίες έχουν συχνά αντιγραφεί λανθασμένα, με συνέπεια οι DNA πολυμεράσες να μην μπορούν να συνδεθούν αποτελεσματικά στο DNA για την επιδιόρθωσή του. Η MSI χαρακτηρίζεται από μεταβολές στο μήκος των απλών επαναλαμβανόμενων νουκλεοτιδικών αλληλουχιών του DNA που

απομονώνεται από τον όγκο του ασθενούς. Το σύστημα MMR αφορά πρωτεΐνες, που είναι τα προϊόντα γονιδίων όπως MLH1, MSH2, MSH6 και PMS2 και θεωρείται υπεύθυνο για την επιτήρηση και διόρθωση τέτοιων σφαλμάτων. Αυτή η αποτυχία να διορθωθούν τα λάθη στην αντιγραφή του DNA έχει σαν αποτέλεσμα τον ισχυρό ‘φαινότυπο μετάλλαξης’ με πολυάριθμες μεταλλάξεις αναγνωστικού πλαισίου (frameshift) σε κωδικοποιήσιμους και μη μικροδορυφόρους. Η βλάβη του DNA μέσα σε κωδικοποιούσες αλληλουχίες μπορεί να προκαλέσει μεταλλάξεις αναγνωστικού πλαισίου, που οδηγούν στην παραγωγή ανενεργών πρωτεϊνών. Η συσσώρευση μεταλλάξεων σε αυτά τα γονίδια τελικά προκαλεί την ανάπτυξη του φαινοτύπου MSI, βάσει του οποίου ενεργοποιείται το ανοσοποιητικό σύστημα και οδηγεί στην υψηλή αντιγονικότητα των όγκων με φαινότυπο μικροδορυφορικής αστάθειας.

Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι η μικροδορυφορική αστάθεια παίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεση κακοηθειών και σχετίζεται άμεσα με την εμφάνιση, εξέλιξη και πρόγνωση πολλών καρκίνων ανάμεσα σε αυτούς και ο καρκίνος του ενδομητρίου (Yang et al,2019).

6.1 Μικροδορυφορική αστάθεια και καρκίνος του ενδομητρίου

Ο ογκογόνος μηχανισμός του ενδομητρικού καρκίνου περιλαμβάνει μικροδορυφορική αστάθεια η οποία προκαλείται όπως προαναφέρθηκε από δυσλειτουργία του μηχανισμού επιδιόρθωσης MMR, και αυτό παρατηρείται στο 30% των ασθενών με το συγκεκριμένο τύπο καρκίνου. Οι περισσότεροι καρκίνοι MSI είναι σποραδικοί και αντιπροσωπεύουν περίπου το 90% των περιπτώσεων μικροδορυφορικής αστάθειας στον καρκίνο του ενδομητρίου. Τις περισσότερες φορές αυτού του είδους τα νεοπλάσματα αναπτύσσονται μέσω συσσώρευσης μεταλλαγών υπερμεθυλίωσης (Kunitomi et al,2017).

Σε σποραδικά ενδομητριοειδή καρκινώματα, η μικροδορυφορική αστάθεια είναι συνέπεια σίγασης του γονιδίου MLH1 λόγω υπερμεθυλίωσης του προαγωγέα η οποία οδηγεί σε ελαττωματικό MMR και συσσώρευση σωματικών μεταλλάξεων σε μικροδορυφόρους σε όλο το γονιδίωμα. Μερικές από αυτές τις μεταλλάξεις ολίσθησης κλώνου (frameshift mutations) μπορεί να συμβούν τυχαία σε καρκινικά γονίδια και να αποτελέσουν στη συνέχεια ‘οδηγούς’ για ανάπτυξη παθογόνων διαδικασιών. Υπάρχουν γονίδια όπως τα ATR, CTCF, JAK1, RNF43 και άλλα που αποτελούν ‘οδηγούς’ παθογένεσης, διατηρούν τις παθογόνες μεταλλάξεις μετατόπισης πλαισίου

σε μονονουκλεοτιδικές επαναλήψεις καρκινωμάτων ενδομητρίου που βρέθηκαν θετικά σε μικροδορυφορική αστάθεια. Το ATR είναι ένα βασικό συστατικό απόκρισης σε βλάβη DNA, το CTCF είναι πρωτεΐνη ψευδαργύρου που ρυθμίζει την οργάνωση του γονιδιώματος και τη μεταγραφή, το JAK1 είναι μια ογκογόνος τυροσινική κινάση που ενεργοποιεί τη σηματοδότηση STAT και το RNF43 ένα στοιχείο που ρυθμίζει αρνητικά τη σηματοδότηση WNT-β-κατενίνης (Bell et al,2017).

Πρέπει επίσης να αναφερθεί ότι υπάρχουν αντικρουόμενα δεδομένα σχετικά με την κατάσταση MSI και την κλινική έκβαση ασθενών με ενδομητρικό καρκίνο που πιθανώς αντικατοπτρίζουν διαφορές μεταξύ των μελετών στο μέγεθος της κοορτής, την ένταξη του ιστοτύπου καθώς και τις μεθοδολογίες που χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση του MSI. Μια πρόσφατα ολοκληρωμένη μελέτη, η οποία αξιολόγησε την έκφραση MSI, μέσω αξιολόγησης των πρωτεϊνών MMR ανοσοϊστοχημικά και μέσω μεθυλίωσης του προαγωγέα MLH1 σε περισσότερους από 1000 ασθενείς έδειξε στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ της κατάστασης MMR και δυσμενών κλινικοπαθολογικών ευρημάτων (Bell et al,2017).

Τέλος, επιγενετικά ελαττώματα MMR και πιθανές μεταλλάξεις σε γονίδια του μηχανισμού επιδιόρθωσης συσχετίστηκαν με υψηλότερο βαθμό όγκου και παρουσία διήθησης όγκου στον λεμφαγγειακό χώρο. Τα επιγενετικά ελαττώματα MMR συσχετίστηκαν με νόσο μεταγενέστερου σταδίου (McMeekin et al,2016).

Η μοριακή ταξινόμηση του ενδομητρικού καρκίνου συμπεριλαμβανομένης της κατάστασης MMR μπορεί να βελτιώσει την πρόβλεψη υποτροπής της ασθένειας και πρόσφατα εισήχθη στις οδηγίες για μετεγχειρητική θεραπεία σε πρώιμα στάδια (Evrard et al,2021).

6.2 Προσδιορισμός MSI ανάλογα με τα πειραματικά ευρήματα

Πρόκειται για το είδος της μικροδορυφορικής αστάθειας το οποίο εμφανίζεται όταν συμβαίνουν μεταλλαγές πλαισίου ανάγνωσης στις επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες που υπάρχουν στο γονιδίωμα, τους μικροδορυφόρους. Οι μικροδορυφόροι είναι συνεχείς επαναλήψεις μικρών τμημάτων DNA που βρίσκονται σε μεγάλη ποσότητα σε όλη την έκταση του ανθρώπινου γονιδιώματος. Σχετίζονται άμεσα με το σύστημα επιδιόρθωσης των λαθών που συμβαίνουν λόγω λάθους αντιστοίχισης μη συμπληρωματικών αλληλουχιών στο γονιδίωμα, κάτι που συμβαίνει εξαιτίας μεταλλαγών στα αντίστοιχα επιδιορθωτικά ένζυμα.

Για την εκτίμηση του βαθμού της μικροδορυφορικής αστάθειας χρησιμοποιούνται ως μοριακοί δείκτες αλλαγές μονονουκλεοτιδίων (BAT25,BAT26,NR27,NR21,NR24), δινουκλεοτιδίων (D2S123, D5S346, D17S250) και πεντανουκλεοτιδίων (penta- C, penta-D) αλληλουχιών, των οποίων το μήκος αυξάνεται εξαιτίας γλιστρίματος της αλυσίδας DNA και επακόλουθου λάθους ταιριάσματος βάσεων.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκαν τρεις μονονουκλεοτιδικοί δείκτες οι BAT25, BAT26, NR27 και εξετάστηκαν χρησιμοποιώντας το σύστημα τριχοειδικής ηλεκτροφόρησης της QIAxcel. Τα αποτελέσματα ταξινομήθηκαν όπως περιγράφεται παρακάτω.

Όταν ένας όγκος παρουσιάζει αλλαγή μήκους αλληλουχιών σε δύο ή περισσότερους δείκτες θεωρείται MSI-H (MSI-High), όταν εμφανίζει αλλαγή μήκους σε έναν δείκτη το δείγμα θεωρείται ως MSI-L(MSI-Low) ενώ όταν δεν υπάρχει αλλαγή σε κάποιον από τους μικροδορυφορικούς δείκτες το δείγμα χαρακτηρίζεται ως MSS (MSI Stable) (Kunitomi et al,2017).

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η μελέτη της παρουσίας μικροδορυφορικής αστάθειας σε ασθενείς με καρκίνο του ενδομητρίου με τη χρήση των μονονουκλεοτιδικών δεικτών BAT-25, BAT-26 και NR-27 και τη μέθοδο της τριχοειδικής ηλεκτροφόρησης. Διερευνάται η συσχέτιση της μικροδορυφορικής αστάθειας των ασθενών και των κλινικοπαθολογικών τους παραμέτρων και εξετάζεται επιπλέον, κατά πόσο είναι εφικτή η χρησιμοποιούμενη μεθοδολογία για screening του MSI status στους καρκίνους του ενδομητρίου, συγκριτικά με την ανοσοϊστοχημική εκτίμηση της ανεπάρκειας του συστήματος MMR, που αποτελεί το gold standard.

2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Στην παρούσα μελέτη συμπεριλάβαμε 30 ασθενείς με καρκίνο του ενδομητρίου, οι οποίες χειρουργήθηκαν στη Μαιευτική και Γυναικολογική κλινική του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας κατά το χρονικό διάστημα 2019-2020. Η διάγνωση έγινε στο εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής, από το οποίο ελήφθη και το αρχειακό υλικό της μελέτης.

Χρησιμοποιήθηκε ιστός μονιμοποιημένος σε φορμόλη και εγκλεισμένος σε παραφίνη (Formalin Fixed Paraffin Embedded Tissue, FFPET) από το αρχείο του Παθολογοανατομικού Εργαστηρίου. Για κάθε ασθενή έγινε επιλογή, μέσω παρατήρησης της χρώσης αιματοξυλίνης-ηωσίνης, από παθολογοανατόμο του εργαστηρίου, προκειμένου να λάβουμε ξεχωριστά φυσιολογικό και νεοπλασματικό ιστό. Ακολούθησε η μικροτόμηση του υλικού και η λήψη 5-6 τομών FFPET ιστού, πάχους 10 μm , σε σωληνάριο τύπου Eppendorf.

Υλικά – Αντιδραστήρια

2.1 Υλικά και αντιδραστήρια προς χρήση:

- Xylene (mixture of isomers) της εταιρείας VWR chemicals
- Histanol 100%- denaturated ethyl alcohol solution της εταιρείας Biognost
- Isopropyl alcohol της εταιρείας Amresco
- DNA Extraction Cobas Kit της εταιρείας Roche
 - DNA Tissue Lysis Buffer (TLB)
 - Proteinase K
 - DNA Paraffin Binding Buffer (PBB)
 - DNA Wash Buffer 1 (WB1)
 - DNA Wash Buffer 2 (WB2)
 - DNA Elution Buffer (DNA EB)
 - Filter tubes with caps (FT)
 - Collection tubes (CT)
- Spectrophotometer – NANODROP 2000 της εταιρείας Thermo Scientific
- Tris – Borate – EDTA 10x (TBE Buffer) της εταιρείας GRISP
- AgaPure – Agarose LE της εταιρείας Canvaxbiotech
- Ύδωρ ενέσιμο μιας χρήσεως της εταιρείας ΒΙΟΣΕΡ
- Χρωστική ηλεκτροφόρησης που φτιάχνεται στο εργαστήριο
- Ethidium Bromide solution (1%) της εταιρείας Appllichem
- Ladder 100bp DNA της εταιρείας Invitrogen
- DNR Bioimage System MiniB S Pro , UV
- Ζυγός ακριβείας , Denver Instrument APX-200
- Κωνικές φιάλες των 500ml
- Εκμαγείο για πηκτή ηλεκτροφόρησης
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης , Thermo Electron Cooperation
- Συσκευή Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR) , Mastercycler ep gradient της εταιρείας Eppendorf
- Vortex της εταιρείας FIRLABO s.e
- Φυγόκεντρος, SL8R της εταιρείας ThermoFisher
- ThermoStat Plus της εταιρείας eppendorf

- Εστία απορρόφησης πτητικών χημικών κάθετης νηματικής ροής , Safehood120 της εταιρείας BIOAIR
- Πιπέτες άντλησης και έγχυσης P20 , P100 και P1000 της εταιρείας GILSON
- Falcon (15 και 50 ml)
- Ρύγχι πιπετών διαφόρων μεγεθών : 10μl της εταιρείας Molecular BioProtocols 100μl Filter tips της εταιρείας ClearLine και 1000μl Finntip της εταιρείας ThermoLab systems
- Σωληνάρια τύπου Eppendorf : MicroTube 2.0ml SafeSeal της εταιρείας SARSTEDT και 0,2ml PCR tubes flat cap της εταιρείας AHN BiotechnologieGmbH

2.2 Αποπαραφίνωση του ιστού και απομόνωση DNA

Οι διαδικασίες της αποπαραφίνωσης και απομόνωσης του γενωμικού DNA πραγματοποιήθηκαν σε απαγωγό εστία (HOOD) με κατάλληλα πρωτόκολλα που περιγράφονται παρακάτω. Η διαδικασία της αποπαραφίνωσης εξυπηρετεί τη διάλυση της παραφίνης, ώστε να αποκαλυφθεί αμιγώς ο ιστός. Ακολουθεί η λύση των κυττάρων του ιστού, ώστε να φτάσουμε στο γενωμικό DNA. Για την απομόνωση του DNA χρησιμοποιήθηκε το cobas DNA Sample Preparation Kit (Roche Diagnostics) και η απομόνωση έγινε σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρίας:

2.2.1 Αποπαραφίνωση των FFPEΤ δειγμάτων

Πειραματική διαδικασία:

1. Προσθήκη 500 μl διαλύματος ξυλόλης στο σωληνάριο τύπου Eppendorf, ώστε να διαλυθεί η παραφίνη.
2. Έντονη ανάδευση (vortex) για 10 δευτερόλεπτα.
3. Επώαση του δείγματος σε θερμοκρασία 15°C έως 30°C για 5 λεπτά.
4. Προσθήκη 500 μl διαλύματος απόλυτης αιθανόλης στο σωληνάριο τύπου Eppendorf, ώστε να διαλυθεί η ξυλόλη.
5. Έντονη ανάδευση (vortex) για 10 δευτερόλεπτα.

6. Επώαση του δείγματος σε θερμοκρασία 15°C έως 30°C για 5 λεπτά.
7. Φυγοκέντρηση στις 14.000 στροφές (rpm) για 2 λεπτά.
8. Απόρριψη του εκλουόμενου υγρού χωρίς τη διατάραξη του ιζήματος.
9. Προσθήκη 1 ml διαλύματος απόλυτης αιθανόλης στο σωληνάριο τύπου Eppendorf για την απομάκρυνση των υπολειμμάτων ξυλόλης.
10. Έντονη ανάδευση (vortex) για 10 δευτερόλεπτα.
11. Φυγοκέντρηση στις 14.000 στροφές (rpm) για 2 λεπτά.
12. Απόρριψη του εκλουόμενου υγρού χωρίς τη διατάραξη του ιζήματος.
Σε περίπτωση που το ιζήμα αιωρείται, τότε πραγματοποιούμε νέα φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες, προκειμένου να αφαιρέσουμε όλη την υπολειπόμενη αιθανόλη.
13. Αποξήρανση του ιζήματος στους 56°C σε μονάδα επώασης ξηρής θερμότητας (heat block) έχοντας ανοικτό το καπάκι του σωληναρίου τύπου Eppendorf.

Απαιτείται πλήρης εξάτμιση της απόλυτης αιθανόλης, καθώς η παραμονή της αποτελεί ανασταλτικό παράγοντα για την επιτυχία των μετέπειτα PCR πειραμάτων. Ο χρόνος της ξήρανσης εξαρτάται από την ποσότητα του ιζήματος και τα υπολείμματα αιθανόλης. Για το λόγο αυτό ελέγχουμε το δείγμα τακτικά, καθώς πρέπει να είναι στεγνό.

2.2.2 Λύση των κυττάρων και απομόνωση του γενωμικού DNA

Μετά την αποπαραφίνωση του ιστού, ακολουθεί η λύση των κυττάρων και η απομόνωση του γενωμικού DNA σύμφωνα με παρακάτω:

Πειραματική Διαδικασία

1. Επαναδιάλυση του ιζήματος του ιστού σε 180 μl διαλύματος λύσης του ιστού (Tissue Lysis Buffer, TLB) και προσθήκη 70 μl ανασυσταμένης πρωτεΐνάσης K, ώστε να διασπαστούν οι ιστόνες και να απελευθερωθεί το γενωμικό DNA.
2. Έντονη ανάδευση (vortex) για 30 δευτερόλεπτα, ώστε να ομογενοποιηθεί ο ιστός.
3. Επώαση του σωληναρίου τύπου Eppendorf για 60 λεπτά σε θερμοκρασία 56°C στο heat block.

4. Έντονη ανάδευση (vortex) για 10 δευτερόλεπτα, ανά τακτά χρονικά διαστήματα κατά την επώαση.
5. Επώαση του σωληναρίου τύπου Eppendorf για 60 λεπτά σε θερμοκρασία 90°C στο heat block.
6. Έντονη ανάδευση (vortex) για 10 δευτερόλεπτα, ανά τακτά χρονικά διαστήματα κατά την επώαση.
7. Ψύξη του σωληναρίου τύπου Eppendorf σε θερμοκρασία 15°C έως 30°C και σύντομη φυγοκέντρηση (spin-down).
8. Προσθήκη 200 μl διαλύματος δέσμησης της παραφίνης (Paraffin Binding Buffer, PBB) και καλή ανάμιξη, τουλάχιστον 3 φορές με την πιπέτα.
9. Επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία 15°C έως 30°C.
10. Προσθήκη 100 μl διαλύματος ισοπροπανόλης και καλή ανάμιξη με την πιπέτα.
11. Μεταφορά του προϊόντος σε στήλη με φίλτρο (FT) που έχει τοποθετηθεί σε σωληνάριο συλλογής (CT).
12. Φυγοκέντρηση της μονάδας FT/CT στις 14.000 στροφές (rpm) για 2 λεπτά.
13. Τοποθέτηση της στήλης FT σε νέο σωληνάριο συλλογής CT.
14. Προσθήκη στη στήλη 500 μl διαλύματος πλύσης DNA (Wash Buffer I, WB I).
15. Φυγοκέντρηση της μονάδας FT/CT στις 14.000 στροφές (rpm) για 2 λεπτά.
16. Απόρριψη του εκλουόμενου υγρού του CT, διατηρώντας το ίδιο σωληνάριο συλλογής CT.
17. Προσθήκη στη στήλη 500 μl διαλύματος πλύσης DNA (Wash Buffer II, WB II).
18. Φυγοκέντρηση της μονάδας FT/CT στις 14.000 στροφές (rpm) για 2 λεπτά.
Πραγματοποιείται περισσότερες φορές, έως ότου περάσουμε όλο το δείγμα από τη στήλη.
19. Τοποθέτηση της στήλης FT σε νέο σωληνάριο συλλογής και φυγοκέντρηση της μονάδας FT/CT στις 14.000 στροφές (rpm) για 2 λεπτά, ώστε να εξατμιστούν τα υπολείμματα.
20. Τοποθέτηση της στήλης FT σε σωληνάριο τύπου Eppendorf.
21. Προσθήκη 35 μl διαλύματος έκλυσης του DNA (Elution Buffer, EB), στο κέντρο της στήλης FT.
22. Επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία 15°C έως 30°C.
23. Φυγοκέντρηση στις 14.000 στροφές (rpm) για 2 λεπτά.
24. Συλλογή του εκλουόμενου διαλύματος που περιέχει το DNA και εκ νέου πέρασμα από τη στήλη FT.

25. Επανάληψη των βημάτων 19, 20.
26. Απόρριψη της στήλης FT και αποθήκευση του σωληναρίου τύπου Eppendorf που περιέχει το γενωμικό DNA.

2.3 Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός του γενωμικού DNA

Η ποσοτικοποίηση του γενωμικού DNA πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια φασματοφωτόμετρου, βάσει της ιδιότητας του DNA να απορροφά ακτινοβολία μήκους κύματος 260nm. Από τον λόγο των απορροφήσεων στα 260/280nm εκτιμάται η καθαρότητα του γενωμικού DNA. Ένα ακατάλληλο - μη καθαρό δείγμα ενδέχεται να περιέχει προσμίξεις που αναστέλλουν την ενίσχυσή του κατά την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR). Η συνήθης τεχνική για τον προσδιορισμό της ποσότητας και της καθαρότητας του γενωμικού DNA είναι η μέτρηση της απορρόφησης με φασματοφωτόμετρο. Στην παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήσαμε το φασματοφωτόμετρο NanoDrop 2000 Spectrophotometer της εταιρείας Thermo Fisher Scientific.

Πειραματική διαδικασία

1. Ανοίγουμε το πρόγραμμα στον συνδεδεμένο με το φασματοφωτόμετρο υπολογιστή.
2. Επιλέγουμε τη ρύθμιση για νουκλεϊκά οξέα «Nucleic Acid».
3. Κάνουμε 3 πλύσεις με 5 μl δις απεσταγμένου νερού (ddH₂O) σκουπίζοντας κάθε φορά το μηχανήμα με χαρτί.
4. Μηδενίζουμε το φωτόμετρο χρησιμοποιώντας ως «τυφλό» το διάλυμα έκλουσης (EB) σε όγκο ίσο με την ποσότητα του δείγματος DNA (1,5 μl) DNA EB, για μηδενισμό του φωτομέτρου θεωρώντας το ως τυφλό δείγμα.
5. Καθαρίζουμε με χαρτί.
6. Προσθέτουμε 1,5 μl δείγματος και φωτομετρούμε.
7. Μετρούμε την απορρόφηση στα 260/280 nm και σημειώνουμε το λόγο που μας δείχνει την καθαρότητα του δείγματος.
8. Καθαρίζουμε με χαρτί και ξεπλένουμε με 1,5 μl DNA EB.
9. Ακολουθεί η φωτομέτρηση του επόμενου δείγματος.

10. Όταν τελειώσει η φωτομέτρηση όλων των δειγμάτων κάνουμε 3 πλύσεις με 5 μl δις απεσταγμένου νερού σκουπίζοντας κάθε φορά το μηχάνημα με χαρτί.

Κάθε δείγμα ελέγχεται τρεις φορές και στη συνέχεια υπολογίζεται ο μέσος όρος των απορροφήσεων. Μεταξύ των δειγμάτων πραγματοποιείται καθαρισμός του Nanodrop με δις απεσταγμένο νερό.

Η ποσοτικοποίηση και η συγκέντρωση του DNA κάθε δείγματος εκτιμάται σύμφωνα με την τροποποιημένη εξίσωση Beer – Lambert. Η εξίσωση βασίζεται στην απορρόφηση στα 260 nm, όπου το DNA και το RNA απορροφούν πιο έντονα το φως σε αυτό το μήκος κύματος. Έπειτα, η τιμή της απορρόφησης κανονικοποιείται σε 1.0 cm (10.0 mm) της οπτικής διαδρομής. Επομένως, η απορρόφηση υπολογίζεται με βάση την παρακάτω εξίσωση:

$$A = -\log \frac{\text{Ένταση Ακτινοβολίας που διαπερνά από το υπο εξέταση δείγμα}}{\text{Ένταση Ακτινοβολίας που διαπερνά από το τυφλό δείγμα (blank)}}$$

Η τροποποιημένη εξίσωση Beer-Lambert βασίζεται στο συντελεστή μοριακής απορρόφησης, ο οποίος είναι συγκεκριμένος για τα νουκλεϊκά οξέα. Οι κοινώς αποδεκτοί συντελεστές μοριακής απορρόφησης για τα νουκλεϊκά οξέα είναι:

- Καθαρό δείγμα που περιέχει μόνο δίκλωνο DNA = 50 ng-cm/μl
- Καθαρό δείγμα που περιέχει μόνο μονόκλωνο DNA = 33 ng-cm/μl
- Καθαρό δείγμα που περιέχει μόνο RNA = 40 ng-cm/μl

Η καθαρότητα του DNA εκτιμάται υπολογίζοντας την απορρόφηση στα 280nm και 230nm, συμπεριλαμβανομένου και του λόγου 260/280 nm. Η παρουσία άλλων μακρομορίων, όπως πρωτεϊνών και RNA, ή ακόμη και άλλων προσμίξεων, ενδέχεται να οδηγήσουν σε λανθασμένη εκτίμηση της συγκέντρωσης του DNA, επηρεάζοντας ενδεχομένως επακόλουθες πειραματικές διαδικασίες. Ένα καλής ποιότητας DNA θα έχει λόγο ~ 1.8 (1.7 – 1.9), ενώ ένα καλής ποιότητας RNA θα έχει λόγο ~ 2.0 (1.8 – 2.0). Εάν ο λόγος είναι αισθητά μικρότερος, υποδηλώνει την παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων πρωτεϊνών, φαινολών ή άλλων επιμολύνσεων που απορροφούν έντονα κοντά στα 280 nm.

Παράλληλα, εκτιμάται και ο λόγος 260 nm/230 nm. Πρόκειται για ένα δευτερεύον μέτρο καθαρότητας των νουκλεϊκών οξέων, που δηλώνει την παρουσία ανεπιθύμητων

ουσιών. Όταν ένα δείγμα DNA είναι καθαρό, ο λόγος κυμαίνεται μεταξύ 1.8 – 2.2. Χαμηλότερες τιμές υποδηλώνουν την παρουσία προσμίξεων ή υπολειμματικών ουσιών που χρησιμοποιήθηκαν κατά την απομόνωση του DNA.

2.4 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction –PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) επιτρέπει τη σύνθεση μεγάλου αριθμού αντιγράφων ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA σε μια *in vitro* ενζυμική αντίδραση. Βασίζεται στον ενζυμικό πολλαπλασιασμό μίας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA, η οποία οριοθετείται εκατέρωθεν από κατάλληλους εκκινητές (primers), οι αλληλουχίες των οποίων είναι συμπληρωματικές ως προς τη μία από τις δυο αλυσίδες του δίκλωνου DNA, που χρησιμοποιείται ως εκμαγείο.

Η αντίδραση περιλαμβάνει περίπου 30-40 επαναλαμβανόμενους κύκλους και ο καθένας αποτελείται από τρία επιμέρους στάδια:

1. **Αποδιάταξη** του εκμαγείου (DNA denaturation): η αντίδραση λαμβάνει χώρα στους 94 – 96 °C, διαρκεί από 20 – 60'' και επιτυγχάνει τη μετουσίωση της διπλής έλικας του DNA και τη χαλάρωση της δευτεροταγούς δομής του DNA.
2. **Υβριδοποίηση** των εκκινητών με τις συμπληρωματικές προς αυτούς αλυσίδες: πραγματοποιείται σε θερμοκρασία 48 - 65°C, η οποία καθορίζεται από την αλληλουχία των εκκινητών και διαρκεί συνήθως από 30 έως 60''.
3. **Επιμήκυνση** των συνδεδεμένων εκκινητών και σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας του DNA από το ένζυμο DNA πολυμεράση με κατεύθυνση 5'→3': πραγματοποιείται στους 72°C και διαρκεί από 30'' έως 2'.

Μετά την ολοκλήρωση των επαναλαμβανόμενων κύκλων, ακολουθεί η τελική επιμήκυνση, στάδιο κατά το οποίο παρέχεται χρόνος στο ένζυμο, ώστε να συμπληρώσει την επέκταση των ημιτελών PCR προϊόντων, σε θερμοκρασίες 72–78°C. Τελευταίο βήμα είναι η αναστολή του ενζύμου, ώστε να λάβει τέλος η αντίδραση, σε θερμοκρασία 4°C. Οι χρόνοι του κάθε σταδίου διαφέρουν ανάλογα με την προς ενίσχυση νουκλεοτιδική αλληλουχία.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία η μικροδορυφορική αστάθεια εξετάστηκε χρησιμοποιώντας τους μονονουκλεοτιδικούς δείκτες BAT-25 , BAT-26 και NR-27 ξεχωριστά σε φυσιολογικό και νεοπλασματικό ιστό των ασθενών με καρκίνο του

ενδομητρίου. Οι αλληλουχίες των μονονουκλεοτιδικών δεικτών απεικονίζονται στον παρακάτω πίνακα:

PRIMERS	GENE	SEQUENCE (5'→3')	PRODUCT SIZE (bp)	T _m (°C)
BAT-25_F	KIT	CTCGCCTCCAAGAATGTAAGT	114	57.9
BAT-25_R		CTATGGCTCTAAAATGCTCTGTTC		59.3
BAT-26_F	MSH2	TGACTACTTTTGACTTCAGCC	122	55.9
BAT-26_R		AACCATTC AACATTTTAAACCC		52.8
NR-27_F	BIRC3	AACCATGCTTGCAAACCACT	89	55.3
NR-27_R		CGATAATACTAGCAATGACC		53.2

Πίνακας 2: 5' → 3' αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη της μικροδορυφορικής αστάθειας.

Η αντίδραση πολυμερισμού γίνεται σε σωληνάριο τύπου Eppendorf , σε τελικό όγκο 20μl και περιλαμβάνει :

Master Mix	BAT-25 Όγκος σε μl	BAT-26 Όγκος σε μl	NR-27 Όγκος σε μl
10x buffer	2	2	2
50mM MgCl₂	0.6	0.75	0.5
0.25mM dNTPs	0.5	0.75	0.5
Πρόσθιος εκκινητής F	1	1	2
Ανάστροφος εκκινητής R	1	1	2
Taq Polymerase	0.3	0.3	0.3
Δις απεσταγμένο νερό	Αναλόγως της αρχικής ποσότητας γενωμικού DNA που προστέθηκε		
Τελικός όγκος	20	20	20

Πίνακας 2. Σύσταση μίγματος των αντιδραστηρίων της PCR αντίδρασης ανά δείγμα για κάθε δείκτη.

Μόλις τα δείγματα είναι έτοιμα φυγοκεντρώνται για 10'' και στη συνέχεια μεταφέρονται στον θερμικό κυκλοποιητή (Εικόνα 29)



Εικόνα 29: Θερμικός κυκλοποιητής (PCR machine).

Το πρόγραμμα που ακολουθείται είναι το εξής :

Βήμα	Θερμοκρασία (°C)	Διάρκεια	Κύκλοι
Αρχική επώαση	95	5min	1
Αποδιάταξη	95	30sec	40
Υβριδισμός	54	45sec	
Επιμήκυνση	72	60sec	
Τελική επιμήκυνση	72	10min	1

Πίνακας 3. Συνθήκες διεξαγωγής των PCR αντιδράσεων στον θερμικό κυκλοποιητή Eppendorf MasterCycler.

Στο τέλος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης τα προϊόντα της PCR αντίδρασης ελέγχονται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 3%.

2.5 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Το πήκτωμα αγαρόζης (agarose gel), στο οποίο πραγματοποιείται η ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR είναι πυκνότητας 3% και περιέχει βρωμιούχο αιθίδιο (ethidium bromide).

Κατά τη διαδικασία παρασκευής του πηκτώματος αγαρόζης, τα πολυμερή της αγαρόζης συνδέονται μη ομοιοπολικά σχηματίζοντας ένα πλέγμα, μέσα στο οποίο θα διαχωριστούν τα μόρια βάσει της μοριακής τους μάζας. Η συγκέντρωση της αγαρόζης καθορίζει την κινητικότητα των μορίων DNA. Όσο μειώνεται η συγκέντρωση της

αγαρόζης στο πήκτωμα, το μέγεθος των πόρων αυξάνεται και τα μόρια DNA που είναι μεγαλύτερα σε μέγεθος διαχωρίζονται καλύτερα. Όταν η συγκέντρωση της αγαρόζης αυξάνεται, το μέγεθος των πόρων μειώνεται και τα μόρια DNA που είναι μικρότερα σε μέγεθος διαχωρίζονται καλύτερα, ενώ τα μεγαλύτερα κινούνται εξαιρετικά αργά.

Κατά την ηλεκτροφόρηση, τα μόρια κινούνται αναλόγως του φορτίου και του μεγέθους τους. Τα μόρια DNA είναι αρνητικά φορτισμένα λόγω της παρουσίας των φωσφορικών ομάδων. Επομένως, όταν εφαρμόζεται ηλεκτρικό πεδίο, κινούνται προς τον θετικό πόλο. Τα μικρότερα μόρια κινούνται ταχύτερα, καθώς συναντούν μικρότερη αντίσταση στους πόρους του πηκτώματος, ενώ τα μεγαλύτερα μόρια κινούνται βραδύτερα.

Για τη δημιουργία του πηκτώματος αγαρόζης, προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Tris Boric EDTA, TBE), το οποίο προσφέρει την πηγή ιόντων, που απαιτούνται για τη δημιουργία ηλεκτρικού πεδίου, που επιτρέπει την κίνηση κατά μήκος του πηκτώματος. Στο πήκτωμα αγαρόζης προστίθεται και η χρωστική βρωμιούχο αιθίδιο. Πρόκειται για μία τοξική χρωστική, η οποία παρεμβάλλεται στη διπλή έλικα του DNA, ενσωματώνεται ανάμεσα στις βάσεις του DNA και υπό την επίδραση υπεριώδους ακτινοβολίας μπορεί να φθορίζει. Ο φθορισμός είναι ανάλογος της ποσότητας του δείγματος.

Κατά το φόρτωμα των δειγμάτων στις κατάλληλα διαμορφωμένες θέσεις του πηκτώματος αγαρόζης, αναμιγνύεται μαζί με το δείγμα κατάλληλη χρωστική ουσία, η οποία αυξάνει την πυκνότητα του δείγματος και εμποδίζει τη διάχυσή του. Παράλληλα, ως χρωστική επιτρέπει την παρακολούθησή του, καθώς κινείται κατά μήκος του πηκτώματος αγαρόζης.

Παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης σύστασης 3%

1. Ζυγίζουμε σε ζυγό ακριβείας 9 γραμμάρια αγαρόζης για να φτιάξουμε πήκτωμα αγαρόζης 3%.
2. Προσθήκη σε κωνική φιάλη, η οποία περιέχει την ζυγισμένη ποσότητα της αγαρόζης, 300 ml ρυθμιστικού διαλύματος TBE, με βάση τη χωρητικότητα του εκμαγείου.
3. Τοποθέτηση της κωνικής φιάλης σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι να διαλυθεί πλήρως η αγαρόζη και το διάλυμα να είναι διαυγές.

Κατά διαστήματα, διακόπτεται η θέρμανση, αναδεύεται η κωνική φιάλη και συνεχίζεται η θέρμανση.

4. Προσθήκη του βρωμιούχου αιθιδίου και ήπια ανάδευση ώστε να διαλυθεί.
5. Αδειάζουμε προσεκτικά, σε κατάλληλο εκμαγείο, στο οποίο έχουμε προηγουμένως τοποθετήσει κατάλληλη χτένα, ώστε να δημιουργηθούν μικρά βοηθία-πηγαδάκια στα οποία θα φορτώσουμε τα δείγματα.
6. Αφήνουμε το πήκτωμα σε θερμοκρασία δωματίου για 40 λεπτά περίπου, ώστε επιτευχθεί ο πολυμερισμός και να ψυχθεί.
7. Αφαιρούμε τη χτένα μόλις πήξει και αποκαλύπτονται τα πηγαδάκια.
8. Το πήκτωμα αγαρόζης, τυλίγεται σε μεμβράνη και αλουμινόχαρτο, καθώς είναι φωτοευαίσθητο και αποθηκεύεται στο ψυγείο έως ότου χρησιμοποιηθεί.

Ηλεκτροφόρηση πηκτώματος αγαρόζης

Η συσκευή ηλεκτροφόρησης πληρείται με ρυθμιστικό διάλυμα 1x TBE. Στη συνέχεια, φορτώνουμε τα προϊόντα της PCR αντίδρασης που θέλουμε να ελέγξουμε. Συγκεκριμένα αναμιγνύουμε 7μl χρωστική μπλε της βρωμοφαινόλης και 8μl προϊόντος PCR. Στο πήκτωμα φορτώνεται παράλληλα και δείκτης γνωστού μεγέθους και μοριακού βάρους, που θα επιτρέψει να ελέγξουμε εάν ενισχύθηκε το επιθυμητό προϊόν κατά την PCR αντίδραση. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήσαμε τον μάρτυρα 100bp της εταιρείας Invitrogen.

Εφαρμόζεται ηλεκτρικό πεδίο περίπου 80-100 Volt για 20-30 λεπτά και στη συνέχεια το πήκτωμα μεταφέρεται σε συσκευή υπεριώδους ακτινοβολίας συνδεδεμένη με υπολογιστή, όπου μέσω του προγράμματος GelCapture οπτικοποιούνται οι ζώνες των ηλεκτροφορούμενων PCR δειγμάτων.

2.6 Τριχοειδική ηλεκτροφόρηση (Capillary electrophoresis)

Για την εφαρμογή της τριχοειδικής ηλεκτροφόρησης χρησιμοποιήθηκε το σύστημα QIAxcel της εταιρείας QIAGEN το οποίο παρέχει μία πλήρως αυτοματοποιημένη τριχοειδική ηλεκτροφόρηση υψηλής ανάλυσης και δίνει τη δυνατότητα να

προσδιοριστεί το μέγεθος των μικροδορυφόρων με σχετικά χαμηλό κόστος. Τα κύρια τμήματα του συστήματος QIAxcel είναι: 1) το σημείο εισόδου του πλακιδίου 96 φρεατίων (sample door), 2) το σημείο εισόδου της κασέτας (cartridge) με τα τριχοειδή (Cartridge door), 3) εσοχή για επιδιόρθωση της συσκευής (Service door) και 4) εσοχή για την φιάλη αζώτου (N₂ door) (Εικόνα 30)



Εικόνα 30: Κύρια σημεία του συστήματος QIAxcel

Προετοιμασία του συστήματος Qiaxcel

1. Προσθήκη 10ml ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης QX στις δυο δεξαμενές της βάσης του Cartridge και κάλυψη αυτών με 2ml ορυκτέλαιο (mineral oil).
2. Αφαίρεση της κασέτας από τη συσκευασία και προσεκτική απομάκρυνση τυχόν υπολειμμάτων τζελ από τα άκρα των τριχοειδών χρησιμοποιώντας ένα μαλακό χαρτομάντηλο.
3. Αφαίρεση του πάματος στεγανοποίησης από το πίσω μέρος της κασέτας και τοποθέτηση στη βάση σταθεροποίησης QX (QX Cartridge Stand). καθώς χρειάζεται να έλθει σε θερμοκρασία δωματίου για τουλάχιστον 20 λεπτά.

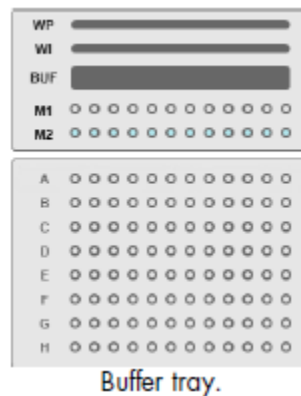


QIAxcel gel cartridge in the QX Cartridge Stand.

Εικόνα 31: Τοποθέτηση της κεφαλής cartridge στην κατάλληλη βάση.

4. Προσθήκη 8ml ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης QX στη θέση WP του δίσκου ρυθμιστικού διαλύματος.

5. Προσθήκη 8mL ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης στη θέση WI του δίσκου ρυθμιστικού διαλύματος.
6. Προσθήκη 18mL ρυθμιστικού διαλύματος διαχωρισμού DNA QX στη θέση BUFF του δίσκου ρυθμιστικού διαλύματος.
7. Πλήρωση και των τριών θέσεων με QX Mineral Oil για να αποτροπή εξάτμισης.
8. Προσθήκη 2ml ορυκτέλαιου QX στις θέσεις WP και WI και 4ml ορυκτέλαιου QX στη θέση BUF.
9. Προσθήκη 15μl δείκτη ευθυγράμμισης QX (QX Alignment Marker) σε κάθε πηγαδάκι μιας σειράς 12 φρεατίων QX 0,2ml ή χρησιμοποιείται μια προκαταρκτική σειρά.
10. Προσθήκη 1 σταγόνας ορυκτέλαιου QX σε κάθε πηγαδάκι και τοποθέτηση στη θέση M1 του δίσκου αποθήκευσης.
11. Εάν δεν έχει επιτευχθεί ακόμη η εξισορρόπηση της κασέτας προστίθενται 15μl δείκτη βαθμονόμησης έντασης QX (QX Intensity Calibration Marker) σε κάθε πηγαδάκι μιας λωρίδας 12 σωληναρίων QX 0,2ml.
12. Προσθήκη μιας σταγόνας ορυκτέλαιου QX και τοποθέτηση στη θέση M2 του δίσκου αποθήκευσης.



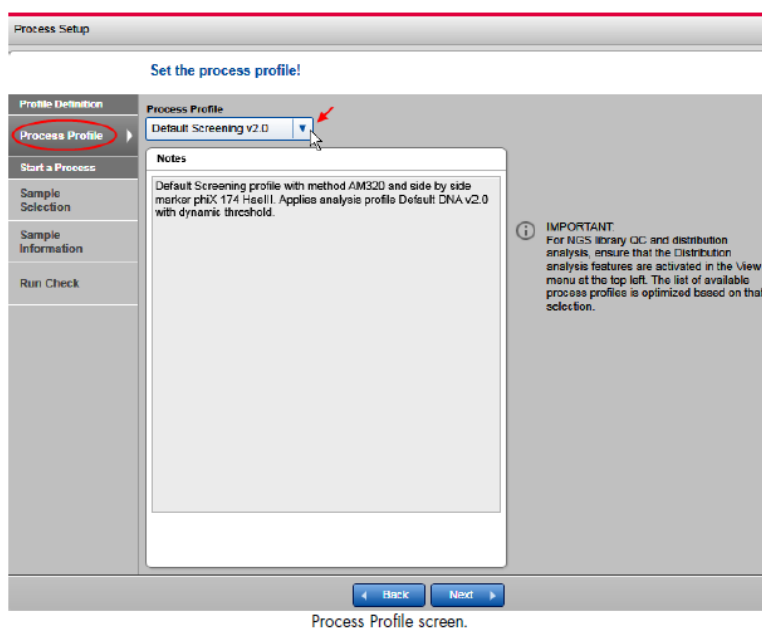
Εικόνα 32: Δίσκος τοποθέτησης του συστήματος Qiaxcel.

13. Ενεργοποίηση του συστήματος QIAxcel Advanced και στη συνέχεια, του υπολογιστή.
14. Σύνδεση στο λογισμικό ScreenGel και επιλογή της λειτουργίας DNA.
15. Επιλέγουμε τη θέση Load Position στον επάνω πίνακα και η θήκη του buffer tray μετακινείται.
16. Τοποθέτηση του buffer tray στην κενή θέση της θήκης και επιλογή της ένδειξης Park Position , προκειμένου να μετακινηθεί εκεί η βάση τοποθέτησης.

17. Αφαίρεση της κασέτας QIAxcel gel cartridge από τη βάση της.
18. Άνοιγμα της θύρας της κασέτας και τοποθέτησή της στη συσκευή QIAxcel Advanced. Η ετικέτα περιγραφής της κασέτας πρέπει να είναι στραμμένη προς τα εμπρός και η οπή καθαρισμού να είναι προς το πίσω μέρος του οργάνου.
19. Εισαγωγή του κλειδιού (smart key) στην υποδοχή του κλειδιού κοντά στη κασέτα . Το κλειδί μπορεί να εισαχθεί προς οποιαδήποτε κατεύθυνση.
20. Το αναγνωριστικό στοιχείο και ο τύπος της κασέτας εμφανίζονται αυτόματα στον πίνακα παροχής πληροφοριών Status Information.

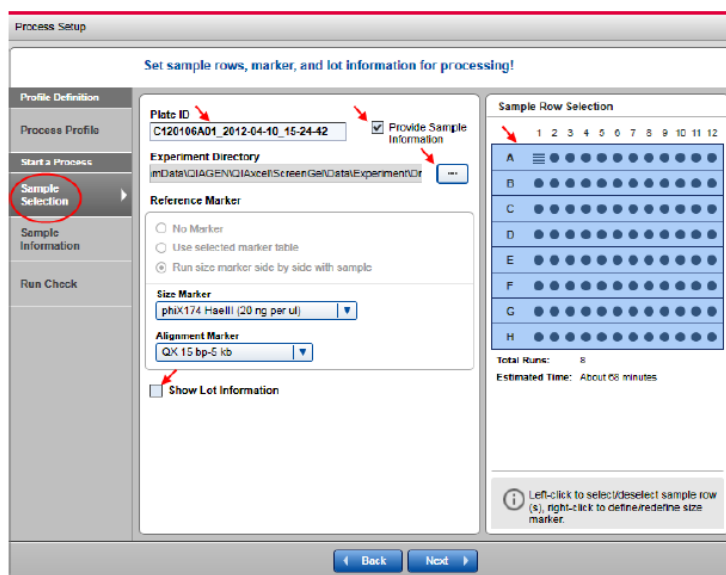
Επεξεργασία και ανάλυση των δειγμάτων στο QIAxcel Advanced

1. Στο λογισμικό QIAxcel ScreenGel, επιλέγεται ένα προκαθορισμένο προφίλ διεργασίας στην οθόνη Προφίλ διεργασίας (Profile screen).



Εικόνα 33: Επιλογή Προφίλ διεργασίας.

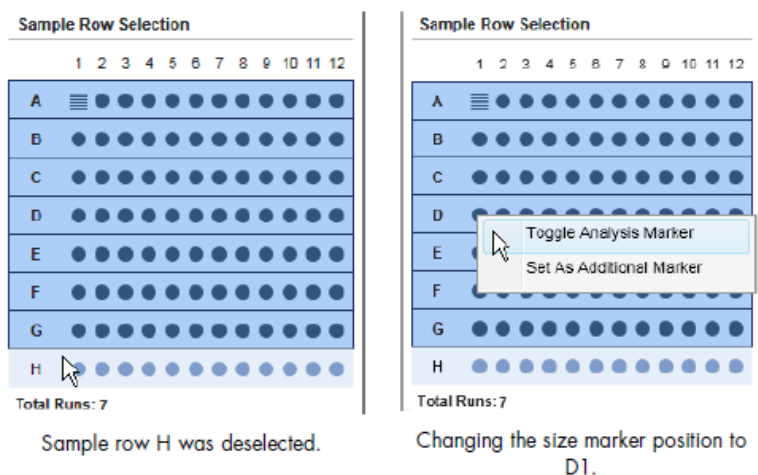
2. Πιέζουμε το πλήκτρο Next και μεταβαίνουμε στην επόμενη σελίδα για επιλογή δείγματος.



Sample Selection screen.

Εικόνα 34: Οθόνη επιλογής δειγμάτων.

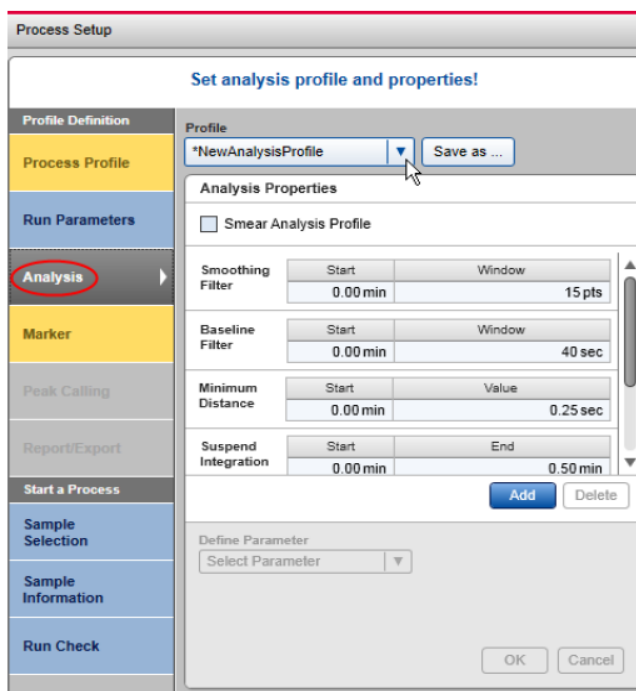
3. Η σειρά των δειγμάτων προς επεξεργασία μπορεί να διαφοροποιηθεί εάν είναι επιθυμητό. Χρησιμοποιούμε το αριστερό κλικ για επιλογή και αποεπιλογή.



Εικόνα 35: Διαφοροποίηση σειράς δειγμάτων και δείκτη.

4. Επιλέγουμε τη θέση του δείκτη (size marker). Εάν είναι επιλεγμένη η επιλογή χωρίς δείκτη, επιλέγετε τον έτοιμο δείκτη ευθυγράμμισης (prepared alignment marker) από το πλαίσιο Marker Alignment.

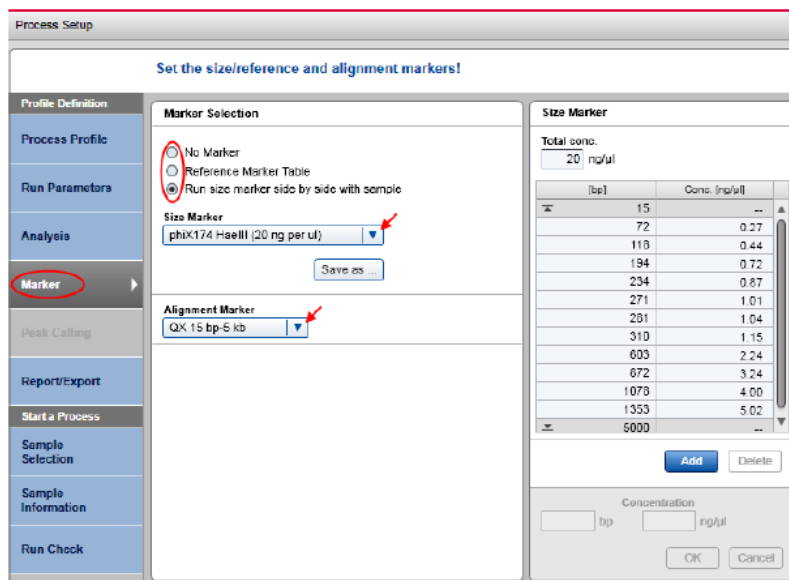
5. Επιλέγουμε τις παραμέτρους ανάλυσης από τον πίνακα ανάλυσης στην αριστερή πλευρά της οθόνης.



Selecting an analysis profile to modify.

Εικόνα 36: Επιλογή παραμέτρων ανάλυσης.

6. Επιλέγουμε τους δείκτες από το πάνελ δεικτών (Marker panel) στην αριστερή πλευρά της οθόνης.

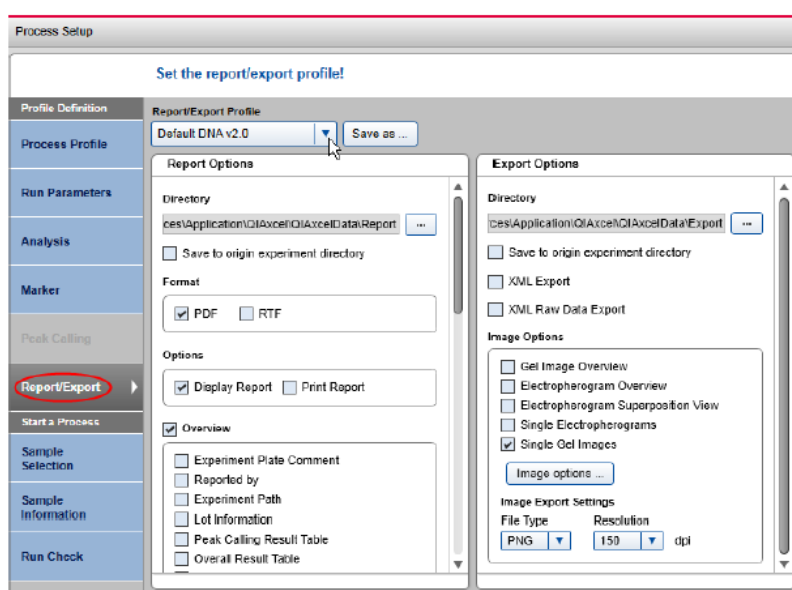


Marker selection.

Εικόνα 37 : Επιλογή δεικτών από το Marker Panel.

7. Οι δείκτες ορίζονται από τη γραμμή Size Marker, όπου επιλέγουμε τον επιθυμητό δείκτη.

8. Οι παράμετροι Report/Export τροποποιούνται από τον πίνακα Report/Export στην αριστερή πλευρά της οθόνης.



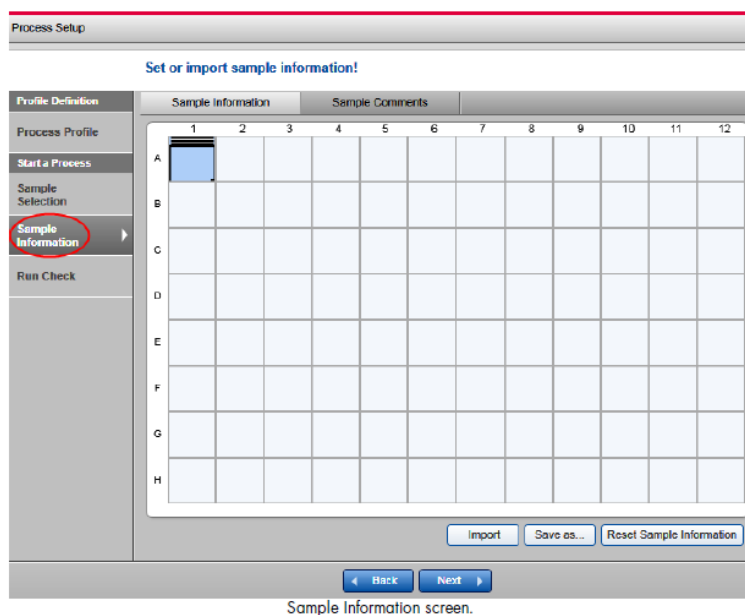
Εικόνα 38: Τροποποίηση παραμέτρων.

9. Επιλέγουμε τις παραμέτρους που επιθυμούμε να εμφανίζονται στην τελική έκδοση των αποτελεσμάτων της ηλεκτροφόρησης, όπως είναι το μέγεθος και το ύψος κορυφής,

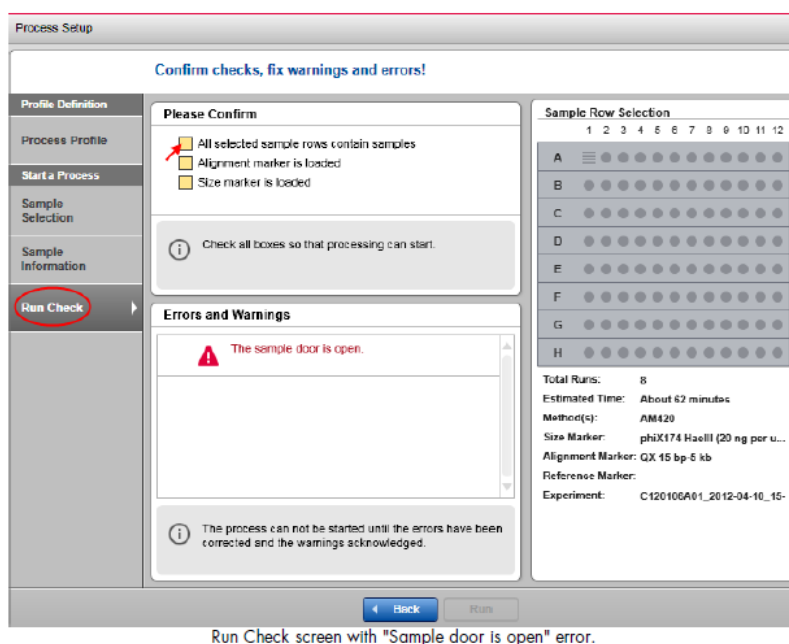
η συγκέντρωση του δείγματος, η μοριακότητα δείγματος. Όλες οι παράμετροι μπορούν να επιλεγούν επιλέγοντας τα κατάλληλα πλαίσια.

10. Στη συνέχεια, επιλέγουμε με την ένδειξη Next να προχωρήσουμε στην επόμενη οθόνη, που παρέχονται οι πληροφορίες των δειγμάτων, οι οποίες έχουν εισαχθεί από τον χειριστή ή από προηγούμενο αρχείο.

11. Επιλέγουμε την ένδειξη Next για να προχωρήσετε στην επόμενη οθόνη, Run Check.

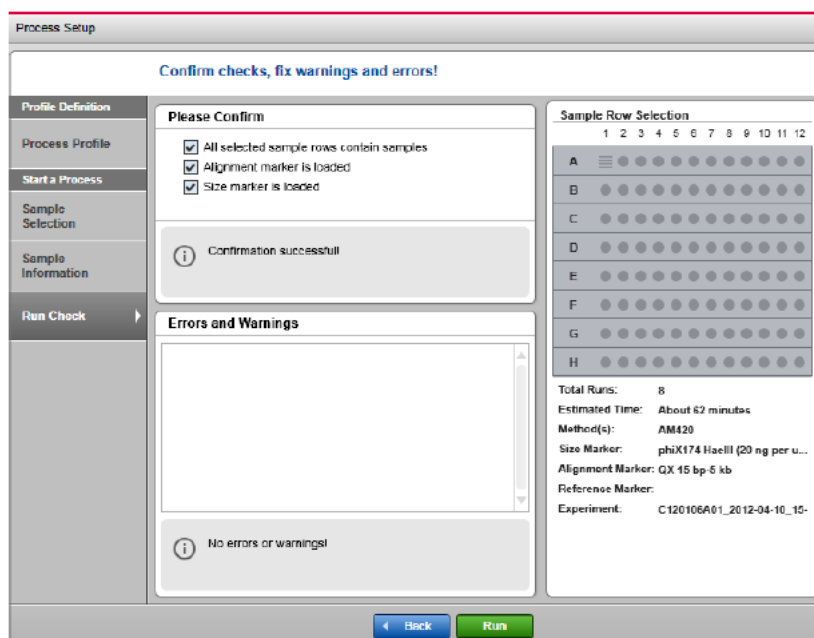


Εικόνα 39: Οθόνη προσθήκης πληροφοριών δειγμάτων.



Εικόνα 40: Οθόνη παραμέτρου Run Check.

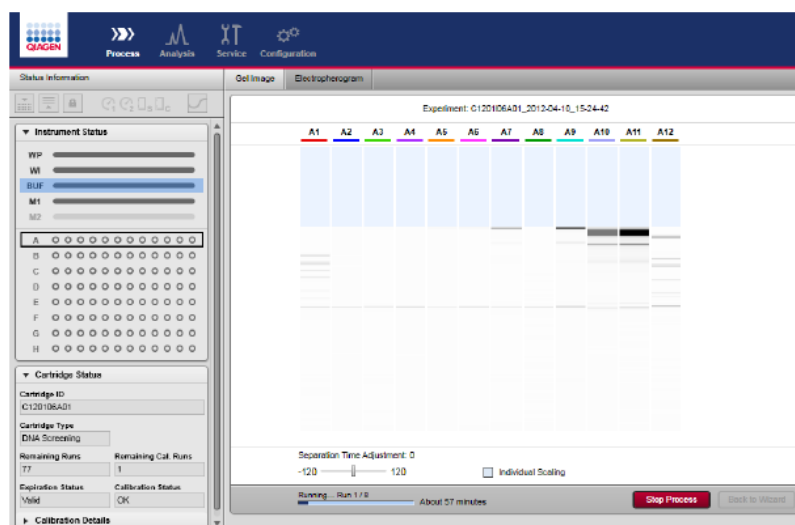
Επιβεβαιώνουμε όλα τα πλαίσια που έχουμε επιλέξει και ξεκινάμε τη διαδικασία επιλέγοντας την ένδειξη RUN.



Run Check screen with all confirmation boxes checked and all problems resolved.

Εικόνα 41: Επιβεβαίωση επιλεγμένων πλαισίων.

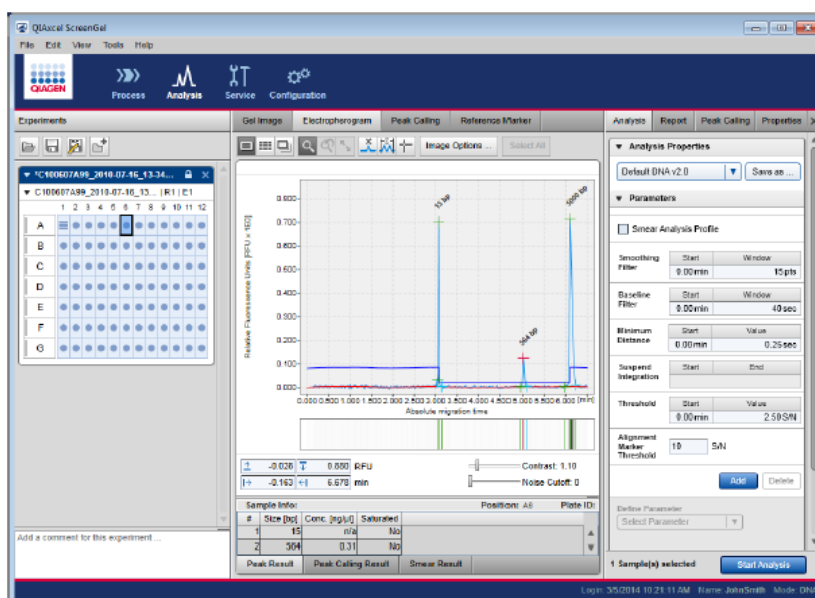
Ο χρόνος διαχωρισμού μπορεί να ρυθμιστεί μετακινώντας τη μπάρα στο πλαίσιο Separation Time Adjustment στο κάτω μέρος της οθόνης. Μόλις ολοκληρωθεί η ηλεκτροφόρηση τα δείγματα απεικονίζονται όπως φαίνεται παρακάτω (Εικόνα 42).



Process currently running row A.

Εικόνα 42: Απεικόνιση ηλεκτροφορημένων δειγμάτων.

Η ανάλυση ενός πειράματος μπορεί να παρουσιαστεί όπως φαίνεται παρακάτω (Εικόνα 43).



Analysis environment with active Electropherogram screen, Experiment Explorer to the left, and Analysis panel to the right.

Εικόνα 43: Ανάλυση πειράματος.

Προκειμένου να αναλύσουμε τα δείγματά μας, επιλέγουμε το παράθυρο Analysis στο πάνω μέρος της οθόνης. Στη συνέχεια, επιλέγουμε το πείραμα που μας ενδιαφέρει και το σύρουμε στο κέντρο της οθόνης. Οι διαθέσιμες παράμετροι για την ανάλυση περιλαμβάνουν: εικόνες του gel, ηλεκτροφερόγραμμα, κορυφές, πίνακες κορυφών καθώς και επιλογή για επαναφορά του ορίου ανίχνευσης ενός πειράματος.

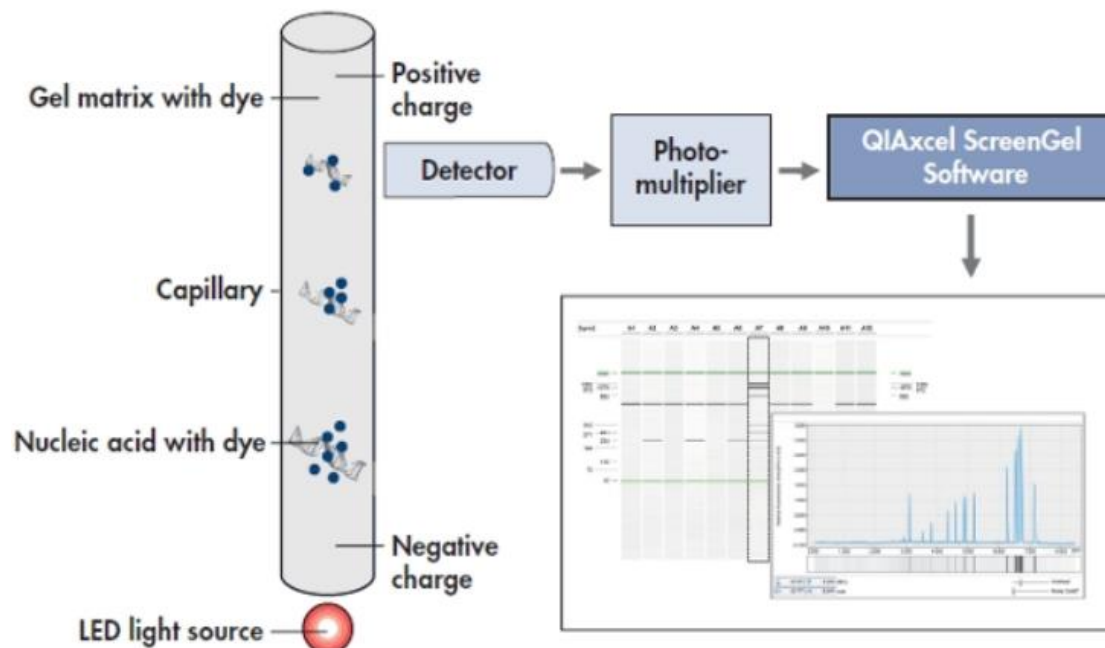
Η αποθήκευση του πειράματος, γίνεται από την ένδειξη File στο επάνω μέρος της οθόνης, μέσω της επιλογής Save File As, ώστε να επιλέξουμε τον κατάλληλο φάκελο.

Αφού ολοκληρωθεί το πείραμα, το μηχάνημα μπορεί να κλείσει. Για το κλείσιμο του συστήματος επιλέγουμε αρχικά την ένδειξη Unlatch στο επάνω μέρος της οθόνης, ώστε να απασφαλίσουμε την κασέτα και στη συνέχεια επιλέγουμε την ένδειξη Load Position, ώστε να μετακινηθεί η κασέτα στο μπροστινό μέρος του μηχανήματος. Στη συνέχεια ανοίγουμε τη θέση που είναι τοποθετημένη η κασέτα, αποσυνδέουμε το κλειδί και αφαιρούμε την κασέτα. Σκουπίζουμε τις περιττές σταγόνες με ένα χαρτομάντηλο και επαναφέρουμε την κασέτα στη θήκη της προκειμένου να αποθηκευτεί ξανά στο

ψυγείο (συντήρηση), όπου τοποθετείται σε όρθια θέση. Αποσυνδεόμαστε από το λογισμικό ScreenGel και απενεργοποιούμε το μηχάνημα και τον υπολογιστή.

Αρχή λειτουργίας της τριχοειδικής ηλεκτροφόρησης

Η αρχή λειτουργίας της τριχοειδικής ηλεκτροφόρησης με τη χρήση του προηγμένου συστήματος QIAxcel βασίζεται στον διαχωρισμό των μορίων DNA ανάλογα με το μέγεθός τους με την εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος. Το συγκεκριμένο σύστημα τριχοειδικής ηλεκτροφόρησης απαρτίζεται από δώδεκα μεμονωμένα τριχοειδή, καθένα από τα οποία περιέχει matrix gel ακρυλαμιδίου, τα οποία είναι εμποτισμένα με βρωμιούχο αιθίδιο. Το αρνητικά φορτισμένο δείγμα DNA εγχέεται στο τριχοειδές και μετακινείται εντός του ηλεκτρικού πεδίου μέσω του gel προς την περιοχή του τριχοειδούς με θετικό φορτίο. Τα δείγματα που ηλεκτροφορούνται, περνούν από μία πηγή υπεριώδους φωτός (LED light source) σε συνδυασμό με έναν ανιχνευτή πολλαπλασιασμού (Photo-multiplier) πριν μετατραπούν στις μορφές του ηλεκτροφερογράμματος και φωτογραφίας του gel μέσω του λογισμικού του QIAxcel (Dean et al.,2013, American Laboratory articles, 2013) (Εικόνα 44).



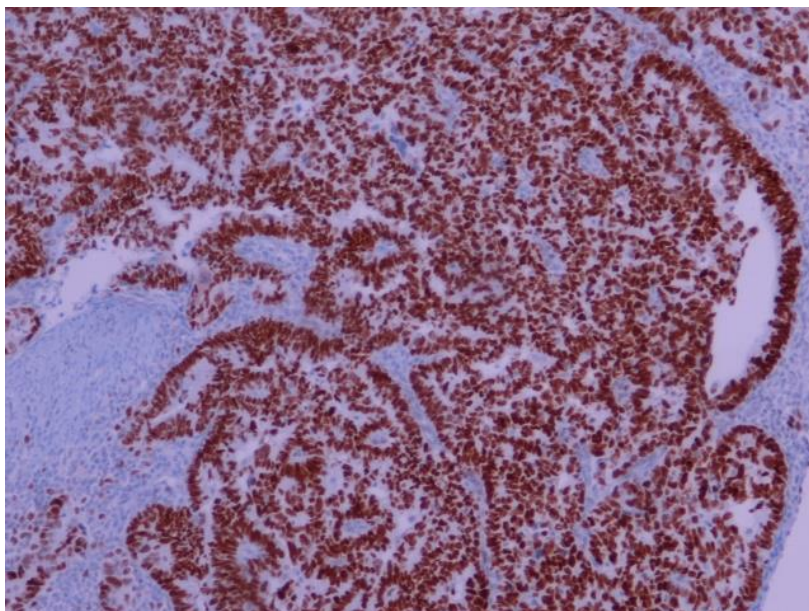
Εικόνα 44: Αρχή λειτουργίας του συστήματος της τριχοειδικής ηλεκτροφόρησης. Πηγή: American Laboratory articles, 2013.

Με το πέρας της ηλεκτροφόρησης και δεδομένου ότι τα PCR προϊόντα φέρουν το επιθυμητό μέγεθος, τα δείγματα αναλύονται στο σύστημα QIAxcel χρησιμοποιώντας δείκτη ευθυγράμμισης (Alignment marker) μεγέθους 15bp/400bp. Ο διαχωρισμός

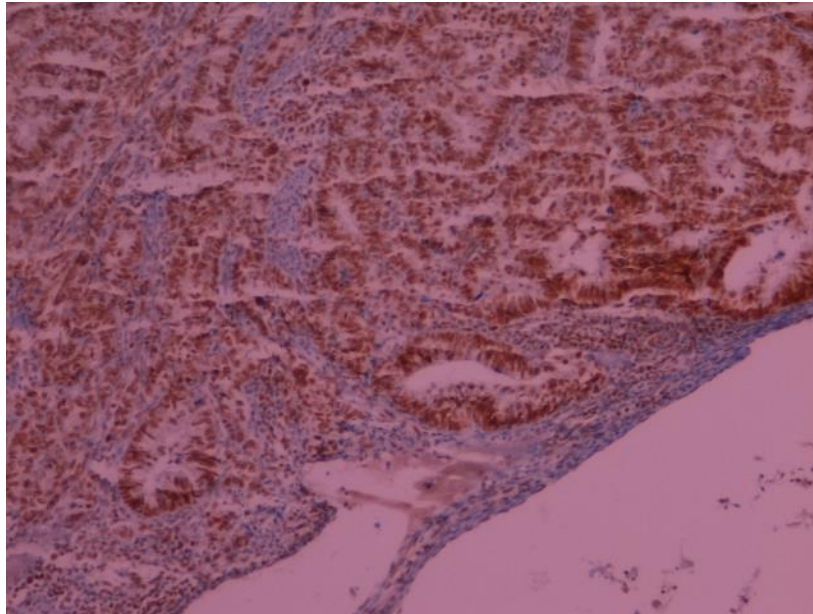
πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας το πρωτόκολλο της εταιρείας και εφαρμόζοντας τάση 2 KV, χρόνο έγχυσης 40 sec στα δείγματα, 30 sec στο δείκτη ευθυγράμμισης και χρόνο διαχωρισμού 700 sec.

Τα δείγματα προστίθενται σε πλάκα 96 θέσεων και σε κάθε σειρά προστίθεται και δείκτης μεγέθους (DNA size marker) για την εκτίμηση του μεγέθους των δειγμάτων. Σε κάθε φρεάτιο τοποθετούμε 3μl δείγμα και 12μl διάλυμα αραιώσης. Κατά αντιστοιχία, ίδιες ποσότητες χρησιμοποιούμε και για τον μάρτυρα. Εάν υπάρχουν κενά φρεάτια, σε καθένα από αυτά προστίθενται 15μl διαλύματος αραιώσης. Μόλις η πλάκα είναι έτοιμη, τοποθετείται στο σύστημα Qiaxcel και ακολουθούμε τη διαδικασία που περιγράψαμε προηγουμένως.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία για τον προσδιορισμό της μικροδορυφορικής αστάθειας σε ασθενείς με καρκίνο του ενδομητρίου χρησιμοποιήθηκε το σύστημα τριχοειδικής ηλεκτροφόρησης QIAxcel. Στη συνέχεια, ακολούθησε σύγκριση των ευρημάτων μας με το MSI status, όπως αυτό είχε διαμορφωθεί με την ανοσοϊστοχημική διερεύνηση του MMR συστήματος και τις ανοσοχρώσεις των πρωτεϊνών MLH1, PMS2, MSH2 και MSH6 (Εικόνες 45,46).



Εικόνα 45: Θετική ανοσοχρώση για την πρωτεΐνη MSH6 (μεγέθυνση 40x).



Εικόνα 46: Θετική ανοσοχρώση για την πρωτεΐνη PMS2 (μεγέθυνση 40x).

Οι παράμετροι που χρησιμοποιήθηκαν στη τριχοειδική ηλεκτροφόρηση για τα δείγματα του παχέος εντέρου απεικονίζονται παρακάτω (Εικόνα 47).

Run			
Instrument ID:	31472	Rise Time:	0.3 sec.
Applied Injection Time:	10 sec.	Applied Separation Time:	1336 sec.
Processed by:	Maria	Applied Method:	OM1200
Method Injection Time:	10 sec.	Method Separation Time:	1200 sec.
Method Injection Voltage:	5.0 kV	Method Separation Voltage:	3.5 kV

Εικόνα 47: Συνθήκες πειράματος QIAxcel για τα δείγματα παχέος εντέρου.

Τα δείγματα ταξινομούνται ως **MSI-high (MSI-H)** όταν περισσότεροι από ένας από τους δείκτες είναι ασταθείς, **MSI-low (MSI-L)** όταν μόνο ένας μικροδορυφορικός τύπος διαφοροποιείται και **Microsatellite-stable (MSS)**, όταν δεν εντοπίζεται καμία αλλαγή στους μικροδορυφόρους που εξετάστηκαν.

D05 m C210317028_2021-	D06 6495n25 C210317028_2021-	D07 6495c25 C210317028_2021-	D08 9892n25 C210317028_2021-	D09 9892c25 C210317028_2021-
L	N	Ca	N	Ca

Εικόνα 48: Απεικόνιση QIAxcel, MSI για τον δείκτη BAT-25, δείγμα ασθενούς με καρκίνο του ενδομητρίου.

E06 6903n26 C210317028_2021-09-07_10-5...	E07 6903c26 C210317028_2021-09-07_10-5...	E08 12762n26 C210317028_2021-09-07_10-5...	E09 12762c26 C210317028_2021-09-07_10-5...
N	Ca	N	Ca

Εικόνα 49: Απεικόνιση QIAxcel, MSI για τον δείκτη BAT-26, δείγμα ασθενούς με καρκίνο του ενδομητρίου.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

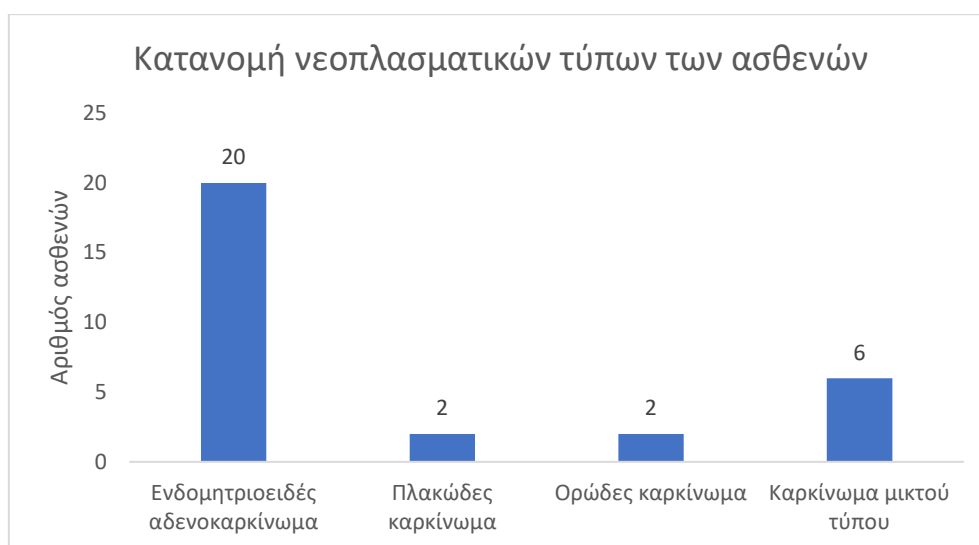
Στην παρούσα διπλωματική εργασία εξετάσαμε δείγματα 30 ασθενών με καρκίνο του ενδομητρίου, που χειρουργήθηκαν στη Γυναικολογική κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας. Πραγματοποιήθηκε απομόνωση DNA από καρκινικούς και παρακείμενους φυσιολογικούς ιστούς, μονιμοποιημένους σε φορμόλη και εγκλεισμένους σε παραφίνη (FFPET). Από τις ιστολογικές εκθέσεις συλλέξαμε πληροφορίες σχετικά με τα κλινικοπαθολογοανατομικά στοιχεία των ασθενών. Παράλληλα, συλλέξαμε πληροφορίες για το MSI status με βάση την ανοσοέκφραση των MMR πρωτεϊνών, στα δείγματα που είχαν ελεγχθεί διαγνωστικά. Η επεξεργασία και η απεικόνιση των γραφημάτων έγινε με τη βοήθεια του υπολογιστικού προγράμματος Microsoft Excel. Τα χαρακτηριστικά των ασθενών συνοψίζονται παρακάτω:

<i>Παράμετρος</i>		<i>Αριθμός ασθενών</i>	<i>Ποσοστό %</i>
<i>Νεοπλασματικός τύπος</i>	Ενδομητριοειδές αδenoκαρκίνωμα	20	66,6
	Πλακώδες καρκίνωμα	2	6,7
	Ορώδες καρκίνωμα	2	6,7
	Μικτό καρκίνωμα	6	20
<i>Βαθμός Διαφοροποίησης</i>	Υψηλή	8	26,66
	Μέτρια	11	36,67
	Χαμηλή	11	36,67
<i>Διήθηση μυομητρίου</i>	<50%	22	73,3
	≥50%	8	26,7
<i>Διάμετρος όγκου</i>	≤2cm	12	40
	>2cm	18	60
<i>Παρουσία άλλων διηθήσεων</i>	Ναι	14	46,67
	Όχι	16	53,33
<i>BAT25</i>	Σταθερός	23	76,7
	Ασταθής	7	23,3
<i>BAT26</i>	Σταθερός	20	66,7
	Ασταθής	9	30
<i>NR27</i>	Σταθερός	27	90
	Ασταθής	3	10
<i>Μικροδορυφορική αστάθεια</i>	Καμία	12	40
	Χαμηλή	16	53,3
	Υψηλή	2	6,7

Πίνακας 4: Κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών της μελέτης.

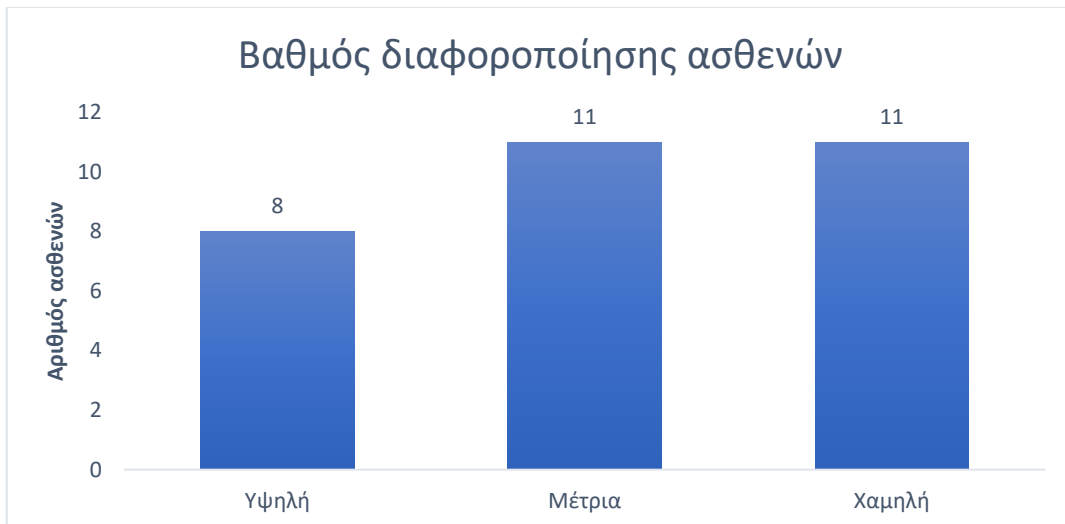
Ο μέσος όρος ηλικίας των ασθενών ήταν τα $63,17 \pm 9,08$ έτη (median = 35). Η ηλικία των ασθενών κυμαίνονταν από 48 έως και 83 έτη.

Οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν με βάση τον ιστολογικό τύπο του καρκινώματος. 20/30 ασθενείς (66.6%) διαγνώστηκαν με ενδομητριοειδές αδενοκαρκίνωμα, 2/30 ασθενείς (6.7%) διαγνώστηκαν με πλακώδες αδενοκαρκίνωμα, 2/30 ασθενείς (6.7%) διαγνώστηκαν με ορώδες καρκίνωμα και 6/30 ασθενείς (20%) διαγνώστηκαν με καρκίνωμα μικτού τύπου. Η κατανομή των ιστολογικών τύπων απεικονίζεται στο Γράφημα 1.



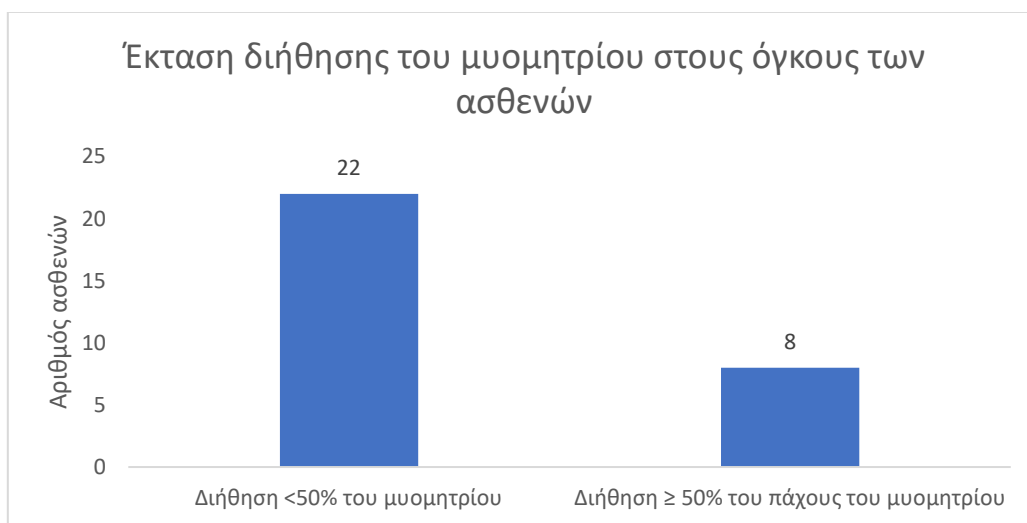
Γράφημα 1: Κατανομή των ιστολογικών τύπων των ασθενών της μελέτης.

Στη συνέχεια εξετάστηκε ο βαθμός διαφοροποίησης και οι ασθενείς ταξινομήθηκαν σε τρεις κατηγορίες: υψηλής, μέτριας και χαμηλής διαφοροποίησης, όπου υψηλή διαφοροποίηση αντιστοιχεί σε καλώς διαφοροποιημένο όγκο και χαμηλή διαφοροποίηση αντιστοιχεί σε αδιαφοροποίητο όγκο. 8/30 ασθενείς (26.66%) διαγνώστηκαν με όγκους υψηλής διαφοροποίησης, 11/30 ασθενείς (36.67%) διαγνώστηκαν με όγκους μέτριας διαφοροποίησης και 11/30 ασθενείς (36.67%) διαγνώστηκαν με όγκους χαμηλής διαφοροποίησης (Γράφημα 2).



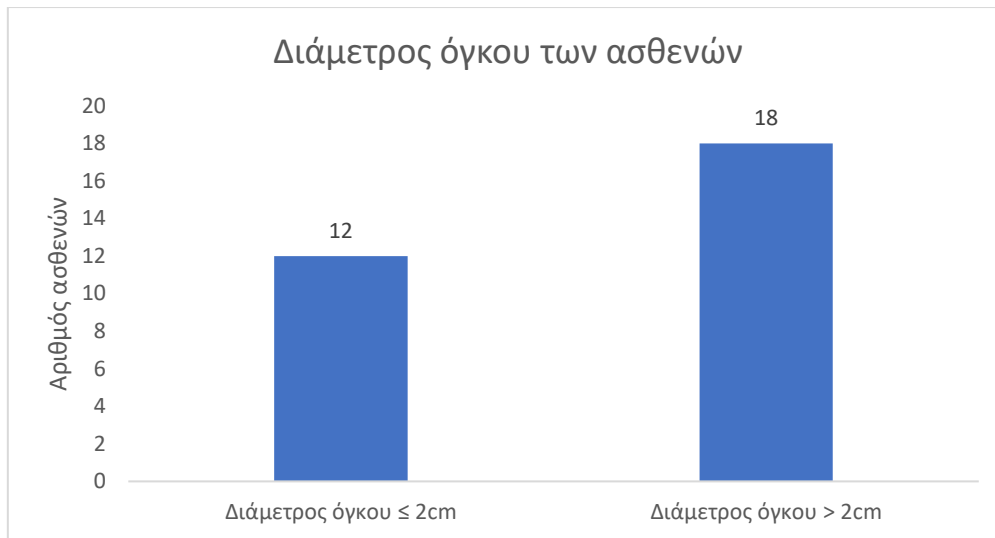
Γράφημα 2: Κατανομή των καρκινωμάτων με βάση τον βαθμό διαφοροποίησης.

Η επόμενη παράμετρος που εξετάστηκε είναι η διήθηση του μυομητρίου. Οι ασθενείς ταξινομήθηκαν σε δύο κατηγορίες, αναλόγως εάν η διήθηση ξεπερνά ή όχι το 50% του πάχους του μυομητρίου. Η πλειοψηφία των ασθενών (22/30, 73.3%) είχαν διήθηση του μυομητρίου <50%, ενώ σε 8/30 ασθενείς (26.7%) η διήθηση ξεπερνούσε το $\geq 50\%$ του πάχους του μυομητρίου (Γράφημα 3).



Γράφημα 3: Έκταση της διήθησης του μυομητρίου.

Με βάση τη διάμετρο του καρκινώματος, σύμφωνα με τις μετρήσεις των Schink et al (1991), διακρίναμε τους ασθενείς σε εκείνους που έφεραν όγκους με διάμετρο $\leq 2\text{cm}$ και σε εκείνους με διάμετρο $> 2\text{cm}$. 12/30 ασθενείς (40%) διαγνώστηκαν με όγκους διαμέτρου $\leq 2\text{cm}$ και 18/30 ασθενείς (60%) έφεραν όγκους με διάμετρο $> 2\text{cm}$ (Γράφημα 4).



Γράφημα 4: Κατανομή των ασθενών με βάση τη διάμετρο του καρκινώματος.

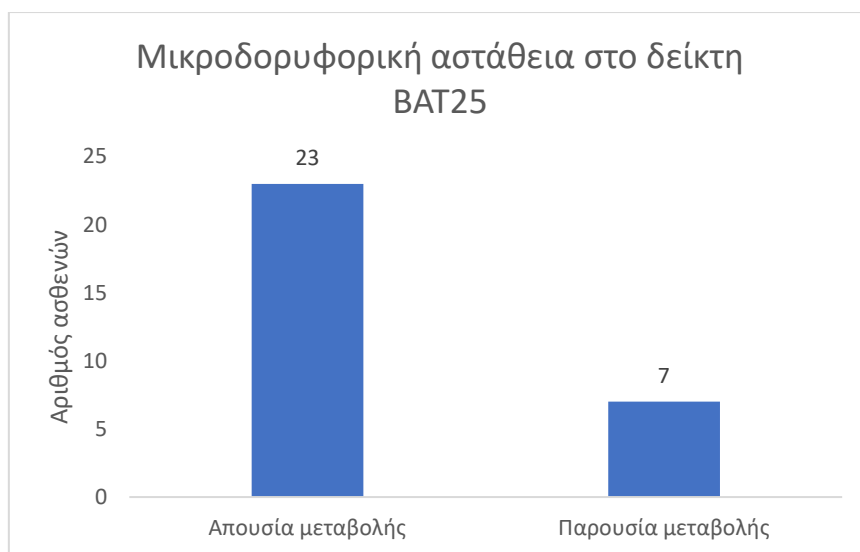
Τέλος, εξετάσαμε την παρουσία ή απουσία λεμφαγγειακής ή περινευρικής διήθησης. Το 46,67% (14/30 ασθενείς) παρουσίασαν έστω και μια διήθηση ενώ το 53,33% (16/30 ασθενείς) δεν παρουσίασαν άλλες διηθήσεις (Γράφημα 5).



Γράφημα 5: Κατανομή των ασθενών βάσει παρουσίας ή απουσίας διήθησης

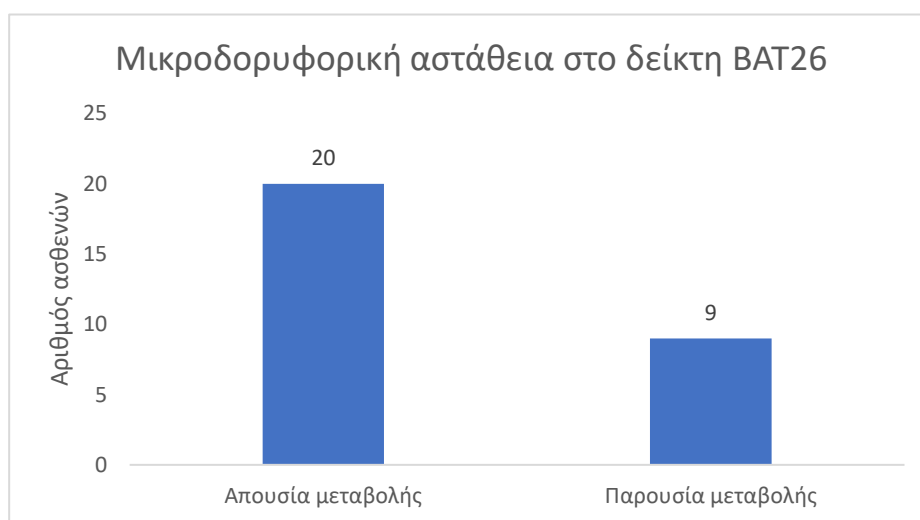
Στη συνέχεια, εξετάσαμε το προφίλ των μονονουκλεοτιδικών μικροδορυφορικών δεικτών BAT25, BAT26 και NR27, προκειμένου να χρησιμοποιηθούν για την εκτίμηση της μικροδορυφορικής αστάθειας των καρκινωμάτων στους ασθενείς μας. 7/30 ασθενείς (23.3%) παρουσίαζαν διαφορές στον εν λόγω δείκτη, όταν συγκρίναμε

τον φυσιολογικό και τον νεοπλασματικό τους ιστό, ενώ στην πλειοψηφία των ασθενών (23/30, 76.7%), ο δείκτης BAT25 ήταν αμετάβλητος στον φυσιολογικό και στον νεοπλασματικό ιστό του κάθε ασθενούς (Γράφημα 6).



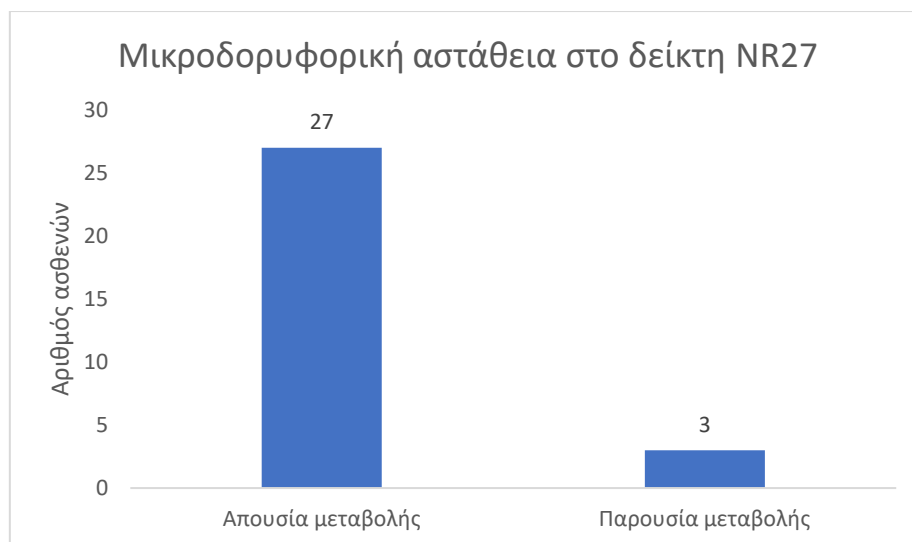
Γράφημα 6: Κατανομή της μεταβλητότητας του μονονουκλεοτιδικού δείκτη BAT25 στους ασθενείς.

Αντίστοιχα, η εκτίμηση των μεταβολών του μονονουκλεοτιδικού δείκτη BAT26, έδειξε μεταβολές σε 9/30 ασθενείς (30%), ενώ στην πλειοψηφία αυτών (20/30, 66,7%), ο δείκτης BAT26 ήταν σταθερός (Γράφημα 7).



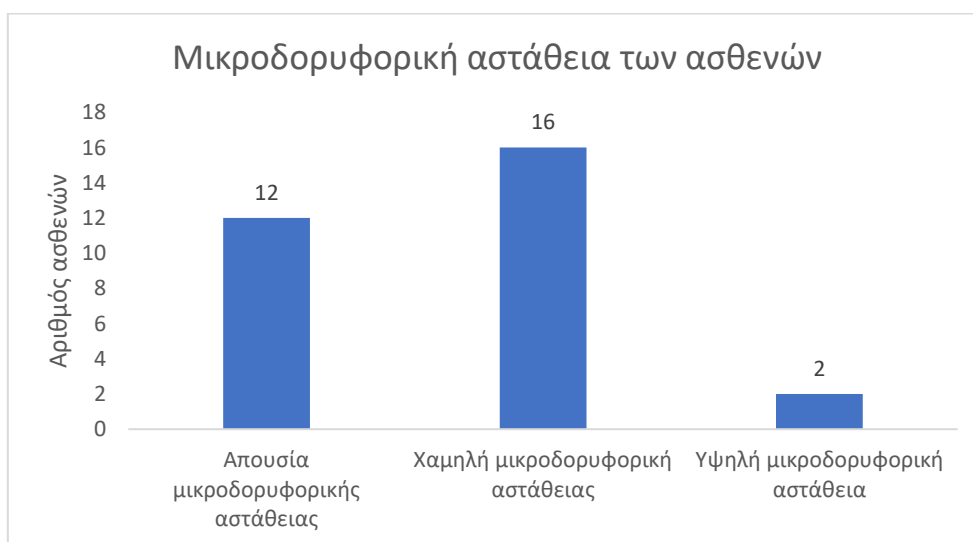
Γράφημα 7: Κατανομή της μεταβλητότητας του μονονουκλεοτιδικού δείκτη BAT26 στους ασθενείς.

Από την τριχοειδική ηλεκτροφόρηση του δείκτη NR27, προέκυψε ότι 3/30 ασθενείς (10%) έφεραν μεταβολές στον εν λόγω δείκτη, ενώ σε 27/30 ασθενείς (90%), ο δείκτης NR27 παρέμενε σταθερός μεταξύ του φυσιολογικού και του νεοπλασματικού ιστού (Γράφημα 8).



Γράφημα 8: Κατανομή της μεταβλητότητας του μονονουκλεοτιδικού δείκτη NR27 στους ασθενείς.

Ο συνδυασμός των τριών μονονουκλεοτιδικών μικροδορυφορικών δεικτών εκτιμήθηκε προκειμένου να εξάγουμε συμπεράσματα σχετικά με το MSI status. Προκειμένου να χαρακτηρίσουμε τα δείγματά μας λάβαμε υπόψη τις διαφορές μεταξύ του νεοπλασματικού και του παρακείμενου φυσιολογικού ιστού. Θεωρήσαμε επίσης ως διαφορά οποιαδήποτε μεταβολή-μετατόπιση κατά την τριχοειδική ηλεκτροφόρηση μεγαλύτερη των 3 νουκλεοτιδίων. Με βάση τους υπολογισμούς μας 12/30 ασθενείς (40%) δεν παρουσίαζαν μικροδορυφορική αστάθεια, 16/30 ασθενείς (53.3%), παρουσίαζαν χαμηλή μικροδορυφορική αστάθεια (MSi-Low) και 2/30 ασθενείς (6.7%) παρουσίαζαν υψηλή μικροδορυφορική αστάθεια (MSI-High) (Γράφημα 9).



Γράφημα 9: Κατανομή της μικροδορυφορικής αστάθειας στους ασθενείς.

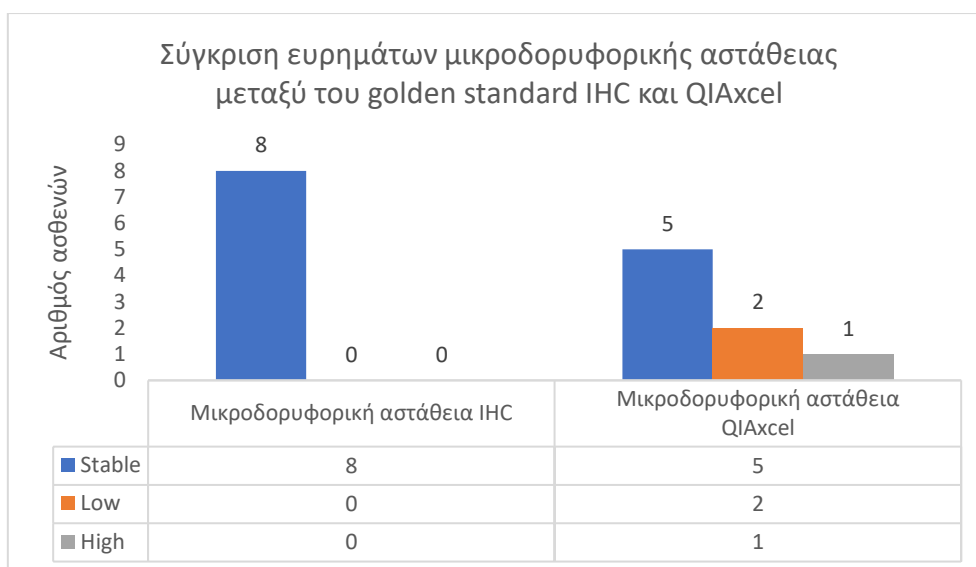
Σε 8/30 ασθενείς είχε γίνει εκτίμηση του MMR με τη χρήση ανοσοχρώσεων για τις πρωτεΐνες MLH1, PMS2, MSH2 και MSH6. Η εκτίμηση των ανοσοχρώσεων δεν

ανέδειξε την παρουσία μικροδορυφορικής αστάθειας στους ασθενείς αυτούς. Συγκρίναμε λοιπόν, τα δικά μας ευρήματα, από την τριχοειδική ηλεκτροφόρηση στο σύστημα QIAxcel, με τα ανοσοϊστοχημικά δεδομένα. Εκτιμώντας την παρουσία μεταβολών των μονονουκλεοτιδικών δεικτών BAT25, BAT26 και NR27 κατά την τριχοειδική ηλεκτροφόρηση, βρέθηκε ότι σε 5/8 ασθενείς (62.5%) δεν ανιχνεύθηκε επίσης μικροδορυφορική αστάθεια. Ωστόσο, σύμφωνα με τα δικά μας ευρήματα, 2/8 ασθενείς (25%) έδειξαν χαμηλή μικροδορυφορική αστάθεια και ένας ασθενής (1/8, 12.5%) θεωρήθηκε ότι παρουσιάζει υψηλή μικροδορυφορική αστάθεια καθώς παρουσίασε μεταβολές σε 2 από τους 3 μονονουκλεοτιδικούς δείκτες.

Αυτή η απόκλιση οφείλεται αρχικά στους διαφορετικούς δείκτες που αναλύονται. Στην ανοσοϊστοχημεία, εξετάζεται η έκφραση των πρωτεϊνών MLH1, PMS2, MSH2 και MSH6. Στην παρούσα εργασία εξετάζονται οι μονονουκλεοτιδικοί μικροδορυφόροι BAT25, BAT26 και NR27, που περιέχονται στα γονίδια *KIT*, *MSH2* και *BIRC3* αντίστοιχα. Παλαιότερες μελέτες για την εύρεση δεικτών μικροδορυφορικής αστάθειας έδειξαν πως ο BAT26 αποτελεί έναν ιδιαίτερα μεταβλητό δείκτη και εντοπίζεται με μεγάλες αποκλίσεις σε άτομα διαφορετικών εθνολογικών ομάδων. Θα πρέπει να λάβουμε επίσης υπόψη τον κατακερματισμό των δειγμάτων του DNA που εξάγεται από FFPEΤ ιστούς, καθώς και την πιθανή παρουσία πολυμορφισμών στις θέσεις των υπό εξέταση μονονουκλεοτιδικών δεικτών, που επηρεάζουν ενδεχομένως τον αριθμό των επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών των BA25, BAT26 και NR27 δεικτών (πίνακας 5 και γράφημα 10).

Δείγμα	Μικροδορυφορική αστάθεια υπολογισμένη με το golden standard της ανοσοϊστοχημείας (IHC)	Μικροδορυφορική αστάθεια υπολογισμένη με QIAxcel
S1 (4489)	MS-Stable	MS-Stable
S2 (8141)	MS-Stable	MSI Low
S3 (337)	MS-Stable	MS-Stable
S4 (5148)	MS-Stable	MSI High
S5 (5862)	MS-Stable	MS-Stable
S6 (5363)	MS-Stable	MS-Stable
S7 (4849)	MS-Stable	MSI Low
S8 (3544)	MS-Stable	MS-Stable

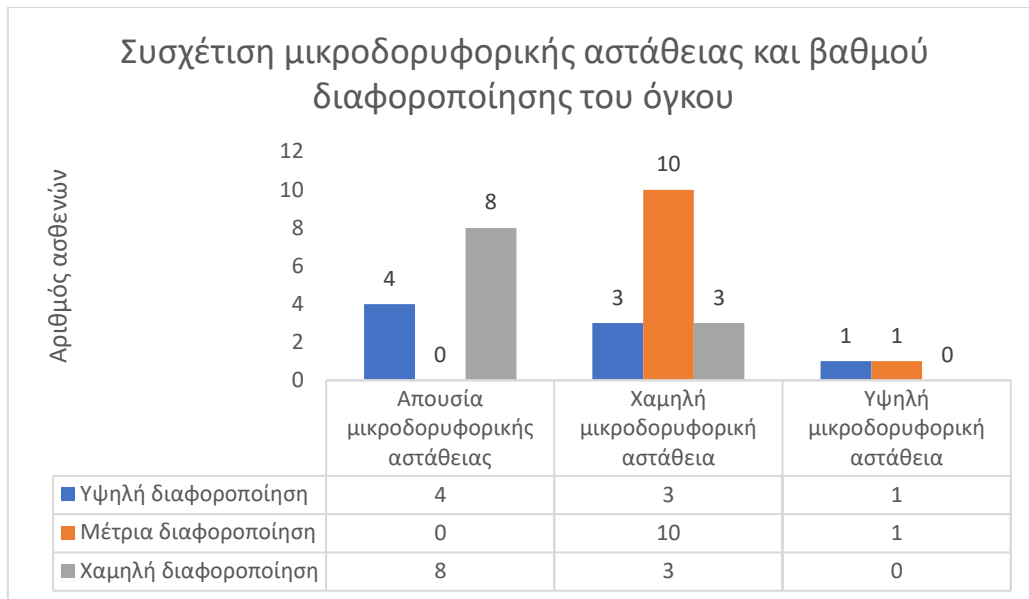
Πίνακας 5: Σύγκριση δειγμάτων με IHC και QIAxcel.



Γράφημα 10: Εκτίμηση MSI status γνωστών περιστατικών με IHC και με τη χρήση της τριχοειδικής ηλεκτροφόρησης των δεικτών BAT25, BAT26 και NR27.

Η συσχέτιση των μονονουκλεοτιδικών δεικτών BAT25, BAT26 και NR27, με κλινικοπαθολογικές παραμέτρους των ασθενών, όπως ο ιστολογικός τύπος του καρκίνου, ο βαθμός διαφοροποίησης του όγκου, η έκταση της διήθησης του μυομητρίου, η διάμετρος του καρκινώματος και η παρουσία άλλων διηθήσεων δεν ανέδειξε κάποια στατιστικώς σημαντική συσχέτιση.

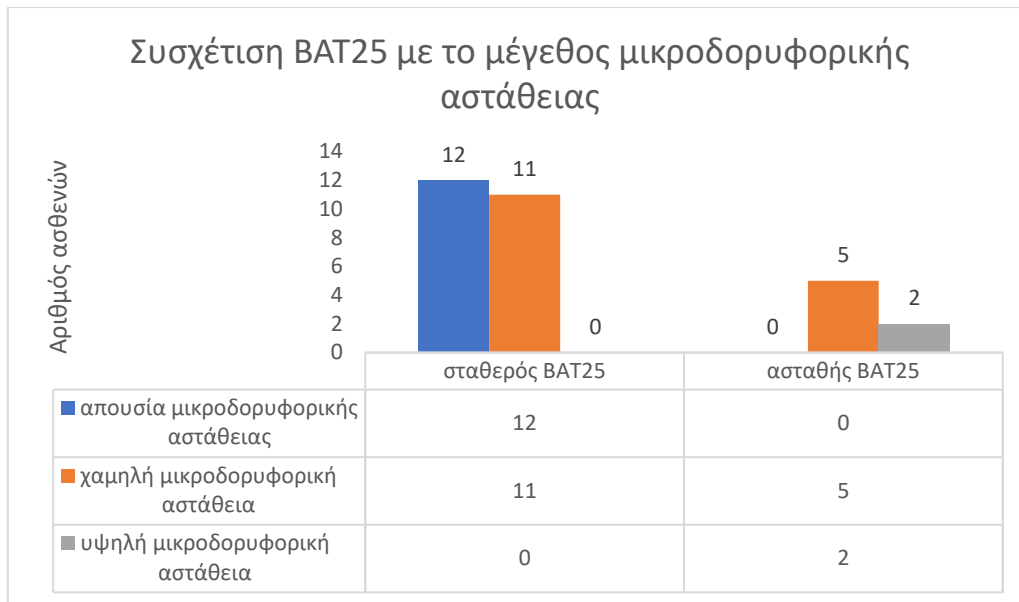
Στατιστικώς σημαντική συσχέτιση αναδεικνύεται μεταξύ της μικροδορυφορικής αστάθειας και του βαθμού διαφοροποίησης των όγκων. Συγκεκριμένα, μεταξύ των ασθενών με απουσία μικροδορυφορικής αστάθειας, 4/12 ασθενείς (33.3%) διαγνώστηκαν με υψηλής διαφοροποίησης όγκους και 8/12 ασθενείς (66.7%) διαγνώστηκαν με χαμηλής διαφοροποίησης νεοπλάσματα. Στους ασθενείς με χαμηλή μικροδορυφορική αστάθεια, 3/16 ασθενείς (18.75%) διαγνώστηκαν με νεοπλάσματα υψηλής διαφοροποίησης, 10/16 ασθενείς (62.50%) διαγνώστηκαν με νεοπλάσματα μέτριας διαφοροποίησης και 3/16 ασθενείς (18.75%) διαγνώστηκαν με νεοπλάσματα χαμηλής διαφοροποίησης. Στους ασθενείς (2) με υψηλή μικροδορυφορική αστάθεια, 1/2 (50%) είχε υψηλής διαφοροποίησης νεόπλασμα, ενώ ο άλλος (50%) διαγνώστηκε με νεόπλασμα μέτριας διαφοροποίησης. Η συσχέτιση που προέκυψε είναι στατιστικώς σημαντική ($p=0.001$) και δείχνει ότι νεοπλάσματα χωρίς μικροδορυφορική αστάθεια, τείνουν να εμφανίζονται σε όγκους χαμηλής διαφοροποίησης, ενώ νεοπλάσματα με χαμηλή μικροδορυφορική αστάθεια, τείνουν να εμφανίζονται σε όγκους μέτριας διαφοροποίησης (Γράφημα 11).



Γράφημα 11: Συσχέτιση μικροδορυφορικής αστάθειας και βαθμού διαφοροποίησης του όγκου.

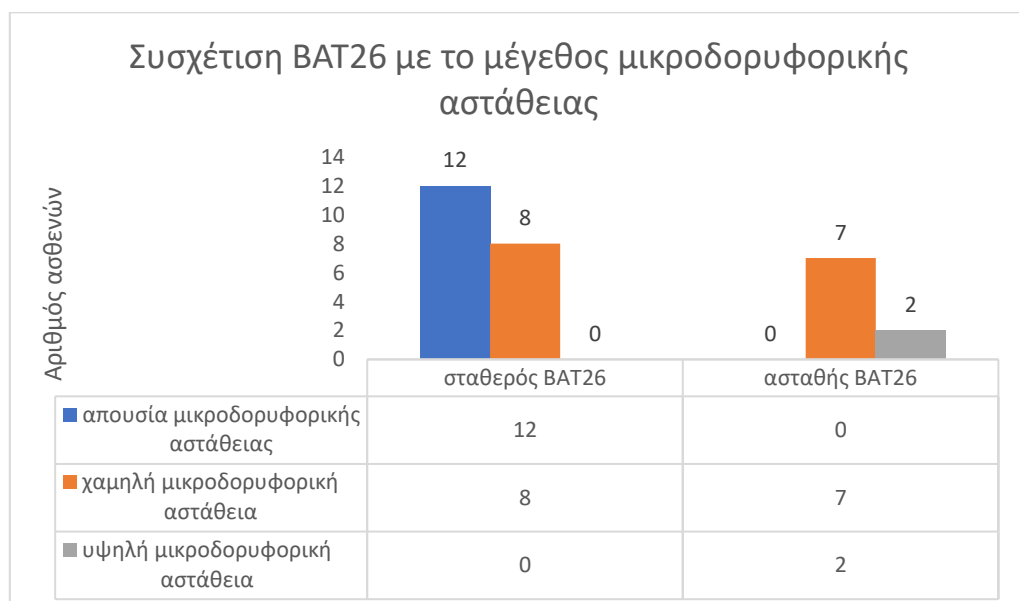
Εξετάσαμε επίσης την πιθανή συσχέτιση των επιμέρους δεικτών BAT25, BAT26 και NR27 με το είδος της μικροδορυφορικής αστάθειας (απουσία, χαμηλή ή υψηλή). Ο δείκτης NR27 δε έδειξε καμία συσχέτιση με το είδος της μικροδορυφορικής αστάθειας των όγκων. Ωστόσο, οι μονονουκλεοτιδικοί δείκτες BAT25 και BAT26 συσχετίζονται με την παρουσία χαμηλής ή υψηλής μικροδορυφορικής αστάθειας στους ασθενείς που μελετήσαμε.

Πιο συγκεκριμένα, κατά την εκτίμηση του BAT25, 12/23 ασθενείς (52.2%) χωρίς μεταβολές δεν είχαν μικροδορυφορική αστάθεια, ενώ 11/23 ασθενείς (47.8%) χωρίς μεταβολές του δείκτη BAT25 παρουσίαζαν χαμηλή μικροδορυφορική αστάθεια. Κατά αντιστοιχία, 5/7 ασθενείς (71.4%) με μεταβολές του δείκτη BAT25 είχαν χαμηλή μικροδορυφορική αστάθεια και 2/7 ασθενείς (28.6%) είχαν υψηλή μικροδορυφορική αστάθεια. Η συσχέτιση είναι στατιστικώς σημαντική ($p=0.002$), αν και πρόκειται για μικρό αριθμό ασθενών, ο οποίος θα πρέπει να επιβεβαιωθεί (Γράφημα 12).



Γράφημα 12: Συσχέτιση του δείκτη BAT25 με τον βαθμό μικροδορυφορικής αστάθειας σε όγκους ενδομητρίου.

Κατά αντιστοιχία, η μέτρηση του δείκτη BAT26, έδειξε ότι 12/20 ασθενείς (60%) χωρίς μεταβολές του BAT26 δεν είχαν μικροδορυφορική αστάθεια, ενώ 8/20 ασθενείς (40%) με σταθερό BAT26 παρουσίαζαν χαμηλή μικροδορυφορική αστάθεια. Ομοίως, 7/9 ασθενείς (77.8%) με μεταβολές στον δείκτη BAT26 είχαν χαμηλή μικροδορυφορική αστάθεια και 2/9 ασθενείς (22.2%) παρουσίαζαν υψηλή μικροδορυφορική αστάθεια. Η συσχέτιση είναι στατιστικώς σημαντική ($p=0.001$) αν και πρόκειται για μικρό αριθμό ασθενών, ο οποίος θα πρέπει να επιβεβαιωθεί (Γράφημα 13).



Γράφημα 13: Συσχέτιση του δείκτη BAT26 με τον βαθμό μικροδορυφορικής αστάθειας σε όγκους ενδομητρίου

4.ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο καρκίνος του ενδομητρίου αποτελεί το συχνότερο κακόηθες νεόπλασμα του θήλεος γεννητικού συστήματος στις αναπτυγμένες χώρες. Εμφανίζεται στο ενδομήτριο και αφορά κυρίως περι- ή μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες. Στους παράγοντες κινδύνου συγκαταλέγονται η ορμονική θεραπεία υποκατάστασης, η παχυσαρκία, η λήψη ταμοξιφαίνης, οι ανωορρηκτικοί κύκλοι και ο σακχαρώδης διαβήτης. Το κύριο σύμπτωμα των γυναικών αυτών, σε ένα ποσοστό της τάξης 80-95% των περιπτώσεων, είναι η μητρορραγία.

Τα καρκινώματα του ενδομητρίου κατανέμονται σε δυο κατηγορίες. Τα καρκινώματα τύπου I/ ενδομητριοειδή ή αλλιώς και οιστρογονοεξαρτώμενα καρκινώματα, τα οποία έχουν συνήθως καλή πρόγνωση και σταθερή βιολογική συμπεριφορά. Η μικροδορυφορική αστάθεια, οι μεταλλάξεις των γονιδίων *PTEN*, *PIK3CA*, *KRAS* και η συσσώρευση της β-κατενίνης στον πυρήνα αποτελούν χαρακτηριστικές μεταβολές των καρκίνων αυτού του τύπου. Χαρακτηριστικό νεόπλασμα της κατηγορίας αυτής είναι το ενδομητριοειδές αδενοκαρκίνωμα, το οποίο ανιχνεύεται σε πρώιμο στάδιο και έχει καλό προσδόκιμο επιβίωσης.

Η δεύτερη κατηγορία περιλαμβάνει τα καρκινώματα τύπου II/ μη ενδομητριοειδή καρκινώματα. Χαρακτηρίζονται από υψηλό βαθμού κακοήθεια και θνησιμότητα, καθώς η διάγνωση της νόσου γίνεται σε προχωρημένο στάδιο. Επομένως, παρουσιάζουν υψηλό κίνδυνο υποτροπής, χειρότερη πρόγνωση και μεγαλύτερη πιθανότητα να δώσουν μεταστάσεις. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν το ορώδες και το διαυγοκυτταρικό καρκίνωμα.

Η μικροδορυφορική αστάθεια χαρακτηρίζεται από παραλλαγές στο μήκος μικρών, επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών μεταξύ φυσιολογικού και καρκινικού DNA του ίδιου ατόμου. Παρατηρείται σε πολλά νεοπλάσματα, μεταξύ των οποίων ο σποραδικός κολοορθικός καρκίνος και ο καρκίνος του ενδομητρίου. Η μικροδορυφορική αστάθεια προκαλείται από λάθη στους μηχανισμούς επιδιόρθωσης βλαβών του DNA, μεταξύ αυτών και μεταλλάξεις στα *MLH1*, *MSH2*, *PMS1*, *PMS2*, *MSH3* και *MSH6* γονίδια (Pyatt et al, 1999).

Η μικροδορυφορική αστάθεια ενός όγκου μπορεί να προσδιορισθεί συγκρίνοντας επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες σε πολλαπλούς τόπους των μικροδορυφόρων, μεταξύ του καρκινικού και του παρακείμενου φυσιολογικού ιστού. Ωστόσο, οι απόψεις δίστανται αναφορικά με τον αριθμό των γενετικών τόπων που θα πρέπει να μελετώνται και τον αριθμό που θα πρέπει να εμφανίζει αστάθεια. Ωστόσο, έχει προταθεί ότι η μελέτη πέντε δεικτών μικροδορυφορικής αστάθειας αρκεί για τον προσδιορισμό της. Με βάση τα δεδομένα αυτά, ένας όγκος μπορεί να χαρακτηριστεί με υψηλή μικροδορυφορική αστάθεια (MSI High, MSI-H) όταν δύο ή περισσότεροι δείκτες δείχνουν παραλλαγές στις αλληλουχίες των μικροδορυφόρων και χαμηλής μικροδορυφορικής αστάθειας (MSI-Low, MSI-L) όταν φέρουν παραλλαγές σε έναν μόνο δείκτη. Τέλος, η απουσία μικροδορυφορικής αστάθειας (MSI Stable, MSS) χαρακτηρίζει τους όγκους εκείνους που δεν φέρουν αλλαγές στους πολυμορφικούς δείκτες που εξετάζονται (Pyatt et al, 1999).

Μέχρι σήμερα, έχει σημειωθεί πλήθος μελετών για τον χαρακτηρισμό τόσο των μοριακών υποτύπων, όσο και γονιδίων στόχων που θα μπορούσαν να αποτελέσουν εν δυνάμει θεραπευτικούς στόχους. Η σημαντικότερη ταξινόμηση προέρχεται από το TCGA (The Cancer Genome Atlas), που διαχωρίζει τα νεοπλάσματα του ενδομητρίου σε νεοπλάσματα με υπερμεταλλάξεις της *POLE*, νεοπλάσματα χαμηλού αριθμού αντιγράφων, νεοπλάσματα υψηλού αριθμού αντιγράφων και νεοπλάσματα με μικροδορυφορική αστάθεια (Levine et al, 2013). Τα νεοπλάσματα ενδομητρίου με μικροδορυφορική αστάθεια διαθέτουν, συνήθως, παραλλαγές στις πρωτεΐνες των *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS1* και *PMS2* γονιδίων (Siemanowski et al, 2021).

Ο φαινότυπος της μικροδορυφορικής αστάθειας ανιχνεύεται σε ποσοστό έως και 30% των νεοπλασμάτων του ενδομητρίου, τόσο σε σποραδικές όσο και σε κληρονομικές μορφές (Siemanowski et al, 2021). Η παρουσία μικροδορυφορικής αστάθειας χαρακτηρίστηκε πρόσφατα ως προβλεπτικός βιοδείκτης στην απόκριση ασθενών σε θεραπείες με αναστολείς μονοπατιών της ανοσολογικής απόκρισης (Le et al, 2017; Marabelel et al, 2020).

Η ύπαρξη ή η απουσία της μικροδορυφορικής αστάθειας εξετάζεται είτε ανοσοιστοχημικά, με ανοσοχρώσεις των *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS1* και *PMS2*, είτε με μεθόδους αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR), με συχνότερη, τη χρήση έως και 5 δεικτών μικροδορυφορικής αστάθειας (Shia et al, 2004). Οι δύο αυτές μέθοδοι χρησιμοποιήθηκαν αρχικά σε νεοπλάσματα κολοορθικού καρκίνου και στη συνέχεια, σε νεοπλάσματα του ενδομητρίου, με συμφωνία ως και 98% και 94%

αντίστοιχα (Steloo et al, 2017). Αν και η χρήση των δύο μεθόδων φαίνεται να έχει υψηλά ποσοστά συμφωνίας στον κολορθικό καρκίνο και στον καρκίνο του ενδομητρίου, εντούτοις, οι ανοσοχρώσεις έχουν δείξει ποικίλα μοτίβα έκφρασης των πρωτεϊνών που δυσχεραίνουν την ερμηνεία στα δύο νεοπλάσματα. Από την άλλη πλευρά, η χρήση μεθόδων PCR φαίνεται να είναι δυσκολότερη στον καρκίνο του ενδομητρίου (Wang et al, 2017).

Παλαιότερες μελέτες αναφέρουν μικρότερες αναλογίες ασταθών βιοδεικτών στον καρκίνο του ενδομητρίου, ενώ στις περιπτώσεις των όγκων με χαμηλή μικροδορυφορική αστάθεια, οι μεταλλάξεις της γαμετικής σειράς δεν ήταν δυνατό να αποκλειστούν εντελώς κατά την αξιολόγηση των δειγμάτων, σε αντίθεση με περιπτώσεις κολορθικού καρκίνου. Επιπλέον, στα καρκινώματα του ενδομητρίου, το φαινόμενο απαλοιφών μικρότερου μήκους ή ενθέσεων σε περιοχές των μικροδορυφόρων, είχαν ως αποτέλεσμα την εμφάνιση περισσότερων κορυφών με μικρή διαφορά μεγέθους κατά την ερμηνεία των αποτελεσμάτων με μεθόδους PCR, γεγονός που δε συμβαίνει συχνά σε κολορθικά καρκινώματα (Siemanowski et al, 2021).

Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η διερεύνηση της παρουσίας μικροδορυφορικής αστάθειας σε ασθενείς με καρκίνο του ενδομητρίου, μέσω της μεθοδολογίας της τριχοειδικής ηλεκτροφόρησης και η σύγκριση της αποτελεσματικότητας της μεθόδου σε σχέση με την ανοσοϊστοχημική μέθοδο ως gold standard.

Οι δείκτες που διερευνήθηκαν, περιλαμβάνουν τους BAT25, BAT26 και NR27 που βρίσκονται στα γονίδια *KIT*, *MSH2* και *BIRC3*. Αρχικά, για το στήσιμο της μεθοδολογίας, χρησιμοποιήσαμε δείγματα ασθενών με καρκίνο παχέος εντέρου με γνωστό status μικροδορυφορικής αστάθειας. Στη συνέχεια, αναλύθηκαν ζεύγη φυσιολογικού και καρκινικού ιστού από μονιμοποιημένο υλικό ασθενών με καρκίνο του ενδομητρίου. Ο μέσος όρος ηλικίας των ασθενών ήταν τα 63.17 ± 9.08 έτη (median = 62). Η ηλικία των ασθενών κυμαίνεται από 48 έως και 83 έτη. 20/30 ασθενείς (66.6%) διαγνώστηκαν με ενδομητριοειδές αδενοκαρκίνωμα, 2/30 ασθενείς (6.7%) διαγνώστηκαν με πλακώδες αδενοκαρκίνωμα, 2/30 ασθενείς (6.7%) διαγνώστηκαν με ορώδες καρκίνωμα και 6/30 ασθενείς (20%) διαγνώστηκαν με καρκίνωμα μικτού τύπου.

8/30 ασθενείς (26,66%) διαγνώστηκαν με όγκους υψηλής διαφοροποίησης, 11/30 ασθενείς (36.67%) έφεραν όγκους μέτριας διαφοροποίησης και 11/30 ασθενείς

(36.67%) είχαν όγκους χαμηλής διαφοροποίησης. 22/30 ασθενείς (73.3%) είχαν κάτω από <50% διήθηση του μυομητρίου, ενώ 8/30 ασθενείς (26.7%) διαγνώστηκαν με διήθηση μυομητρίου $\geq 50\%$. 12/30 ασθενείς (40%) είχαν όγκους διαμέτρου $\leq 2\text{cm}$ και 18/30 ασθενείς (60%) έφεραν μεγαλύτερους όγκους $>2\text{cm}$. Τέλος, 14/30 ασθενείς (46,67%) παρουσίασε περαιτέρω στοιχεία διήθησης, ενώ 16/30 ασθενείς (53,33%) δεν παρουσίασε περαιτέρω στοιχεία διήθησης.

Στη συνέχεια, εξετάστηκε τις μεταβολές των δεικτών BAT25, BAT26 και NR27 μεταξύ των ζευγών φυσιολογικού και νεοπλασματικού ιστού ανά ασθενή, προκειμένου να εκτιμήσουμε τη μικροδορυφορική αστάθεια στους ασθενείς μας. Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, 12/30 ασθενείς (40%) δεν είχαν μικροδορυφορική αστάθεια, 16/30 ασθενείς (53.3%) παρουσίαζαν χαμηλή μικροδορυφορική αστάθεια και μόλις 2/30 ασθενείς (6.7%) έδειξαν υψηλή μικροδορυφορική αστάθεια.

Σε 8 από τις 30 ασθενείς με καρκίνο του ενδομητρίου είχε εκτιμηθεί η επάρκεια του συστήματος MMR μέσω ανοσοχρώσεων των πρωτεϊνών MLH1, PMS2, MSH2 και MSH6. Το σύνολο των ασθενών αυτών δεν παρουσίαζε μικροδορυφορική αστάθεια. Στα ίδια δείγματα, μετά από ενίσχυση με PCR για τους δείκτες BAT25, BAT26 και NR27, βρήκαμε 5/8 ασθενείς (62.5%) χωρίς μικροδορυφορική αστάθεια. 2/8 ασθενείς (25%) είχαν χαμηλή μικροδορυφορική αστάθεια και μόλις μία ασθενής (1/8, 12.5%) χαρακτηρίστηκε με υψηλή μικροδορυφορική αστάθεια.

Μεταξύ των δύο μεθόδων σημειώνεται σημαντική απόκλιση, της τάξης του 37.5%. Η απόκλιση αυτή θα μπορούσε να αποδοθεί στην μελέτη διαφορετικού είδους βιοδεικτών. Οι μονονουκλεοτιδικοί δείκτες BAT25, BAT26 και NR27, βρίσκονται στα γονίδια *KIT*, *MSH2* και *BIRC3* αντίστοιχα. Επιπλέον, σύμφωνα με παλαιότερες μελέτες, ο δείκτης BAT26 φαίνεται να είναι ιδιαίτερα μεταβλητός. Επιπρόσθετα, ενθέςεις ή απαλοιφές στις περιοχές των επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών των ανωτέρω δεικτών, επηρεάζουν τον αριθμό των επαναλήψεων και δυσχεραίνουν την εκτίμηση των μεταβολών.

Η ομάδα των Wong et al (2006), έλεγξε την ευκολία χρήσης πέντε δεικτών μικροδορυφορικής αστάθειας, σε σχέση με ένα εμπορικά διαθέσιμο πάνελ ανίχνευσης, σε 80 ασθενείς με καρκίνο του ενδομητρίου. Σύμφωνα με τη μελέτη τους, φαίνεται να είναι ευκολότερη η ερμηνεία των αποτελεσμάτων για τον υπολογισμό της μικροδορυφορικής αστάθειας μελετώντας μεμονωμένους δείκτες και μετέπειτα συνθέτοντας την ερμηνεία τους, συγκριτικά με το εμπορικώς διαθέσιμο πάνελ. Οι δείκτες που εξετάστηκαν στη μελέτη ήταν BAT25, BAT26 και NR27.

Όπως και στην παρούσα μελέτη, οι δείκτες BAT25 και BAT26 παρουσίαζαν τη μεγαλύτερη ετερογένεια. Οι συγγραφείς τονίζουν πως οι δύο αυτοί δείκτες είναι αρκετοί για τη διερεύνηση της μικροδορυφορικής αστάθειας στον καρκίνο του ενδομητρίου, καθώς θεωρούν πως οι μονονουκλεοτιδικοί δείκτες μπορεί να είναι περισσότερο αξιόπιστοι από δινουκλεοτιδικούς δείκτες. Το εύρημα αυτό συμφωνεί με τα αποτελέσματα της δικής μας μελέτης, καθώς δείξαμε πως οι δείκτες BAT25 και BAT26 ήταν συχνότερα ασταθείς από τον δείκτη NR27 και συσχετίστηκαν θετικά με την εμφάνιση μικροδορυφορικής αστάθειας στους ασθενείς που μελετήσαμε ($p=0.002$ και $p=0.001$ αντίστοιχα).

Ανάλογα ήταν και τα ευρήματα των Campanella et al (2014). Σε μελέτη που διεξήγαγαν σε δείγματα με καρκίνο του παχέος εντέρου και κυτταρικές σειρές, διαπιστώθηκε πως οι δείκτες BAT25 και BAT26 εμφάνισαν τη μεγαλύτερη αστάθεια μεταξύ των εξεταζόμενων δεικτών, εύρημα που συμφωνεί με την παρούσα μελέτη.

Σε μία πρόσφατη μελέτη των Dedeurwaerdere et al (2021) έγινε σύγκριση της ικανότητας ανίχνευσης μικροδορυφορικής αστάθειας μεταξύ των μεθόδων της ανοσοϊστοχημείας και της ενίσχυσης με PCR σε δείγματα καρκίνου του παχέος εντέρου και καρκίνου του ενδομητρίου. Οι συγγραφείς αναφέρουν 100% συμφωνία των αποτελεσμάτων των δύο μεθόδων στον καρκίνο του παχέος εντέρου, ενώ η συμφωνία στα δείγματα με καρκίνο του ενδομητρίου, χρησιμοποιώντας τις ίδιες μεθόδους, μειώνεται σε ποσοστό μικρότερο από 90%.

Στη δική μας μελέτη, υπήρξε σχεδόν 100% συμφωνία για την ανίχνευση της μικροδορυφορικής αστάθειας στα δείγματα με καρκίνο του παχέος εντέρου, ενώ η συμφωνία για τα δείγματα με καρκίνο του ενδομητρίου ανήλθε στο 67.5%. Σύμφωνα με τους Dedeurwaerdere et al (2021), δεν υπάρχει ξεκάθαρος διαχωρισμός αποτελεσματικότητας μεταξύ της ανοσοϊστοχημείας και της μεθοδολογίας ενίσχυσης με PCR και τριχοειδικής ηλεκτροφόρησης, καθώς οι δύο μέθοδοι παρουσιάζουν πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα.

Η ανοσοϊστοχημεία είναι μία μέθοδος γρήγορη, η οποία μπορεί να δώσει πληροφορίες σχετικά με τις πρωτεΐνες των μηχανισμών επιδιόρθωσης που εμπλέκονται στη δημιουργία μικροδορυφορικής αστάθειας. Ωστόσο, σφάλματα στην προαναλυτική διαδικασία ενδέχεται να οδηγήσουν σε ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα. Από την άλλη πλευρά, οι μέθοδοι που βασίζονται σε ενίσχυση με PCR είναι φθηνές, αλλά απαιτούν καλά εκπαιδευμένο προσωπικό για την ερμηνεία μικρών διαφορών μεταξύ δεικτών και

τα αποτελέσματα μπορεί να επηρεαστούν από την εμπειρία του ερμηνευτή (Dedeurwaerdere et al, 2021).

Συνοψίζοντας, η μελέτη μας παρέχει κάποια πρώτα δεδομένα για την αποτελεσματικότητα της χρήσης της τριχοειδικής ηλεκτροφόρησης, μετά από ενίσχυση μέσω PCR στον καρκίνο του ενδομητρίου, ως εναλλακτική τεχνική της ανοσοϊστοχημικής εκτίμησης του MMR status. Ωστόσο, απαιτείται μεγαλύτερος αριθμός δειγμάτων για ανάλυση, καθώς και σύγκριση με περισσότερα ανοσοϊστοχημικά ευρήματα, προκειμένου να βελτιωθεί και να αυξηθεί η ευαισθησία και η ειδικότητα της μεθόδου. Επιπρόσθετα, ο μεγαλύτερος αριθμός δειγμάτων θα επιτρέψει να οδηγηθούμε σε ασφαλή στατιστικώς συμπεράσματα.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Akizawa, Y., Yamamoto, T., Kanno, T., Horibe, Y., Odaira, K., Abe, Y. ... Tabata, T. (2020). Two primary cancers: Primary squamous cell carcinoma with extensive ichthyosis uteri and cervical endometrioid carcinoma: A case report. *Molecular and Clinical Oncology*, 13, 44. <https://doi.org/10.3892/mco.2020.2113>
2. Amant, F., Moerman, P., Neven, P., Timmerman, D., Van Limbergen, E., & Vergote, I. (2005). *Endometrial cancer. The Lancet*, 366(9484), 491–505. doi:10.1016/s0140-6736(05)67063-8
3. Barbaglia G, Macia F, Comas M, et al. Trends in hormone therapy use before and after publication of the Women’s Health Initiative trial: 10 years of follow-up. *Menopause* 2009;16:1061–1064.
4. Bell, D. W., & Ellenson, L. H. (2017). *Molecular Genetics of Endometrial Carcinoma. Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 14(1). doi:10.1146/annurev-pathol-020117-043609
5. Bevier, M., Sundquist, J., & Hemminki, K. (2011). *Does the time interval between first and last birth influence the risk of endometrial and ovarian cancer? European Journal of Cancer*, 47(4), 586–591. doi:10.1016/j.ejca.2010.10.004
6. Bilbao, C., Rodríguez, G., Ramírez, R., Falcón, O., León, L., Chirino, R., ... Perucho, M. (2006). *The relationship between microsatellite instability and PTEN gene mutations in endometrial cancer. International Journal of Cancer*, 119(3), 563–570. doi:10.1002/ijc.21862
7. Blake., et al. Adjuvant external beam radiotherapy in the treatment of endometrial cancer (MRC ASTEC and NCIC CTG EN.5 randomised trials): pooled trial results, systematic review, and meta-analysis. (2009). *The Lancet*, 373(9658), 137–146. doi:10.1016/s0140-6736(08)61767-5
8. Bogani, G., Ray-Coquard, I., Concin, N., Ngoi, N. Y. L., Morice, P., Enomoto, T., ... Monk, B. J. (2021). *Uterine serous carcinoma. Gynecologic Oncology*, 162(1), 226–234. doi:10.1016/j.ygyno.2021.04.029
9. Bokhman JV. Two pathogenetic types of endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol* 1983;15:10-7
10. Boland, C. R. (2005). *INFECTION, INFLAMMATION, AND GASTROINTESTINAL CANCER. Gut*, 54(9), 1321–1331. doi:10.1136/gut.2004.060079
11. Boyd, K. L., Muehlenbachs, A., Rendi, M. H., Garcia, R. L., & Gibson-Corley, K. N. (2018). *Female Reproductive System. Comparative Anatomy and Histology*, 303–334. doi:10.1016/b978-0-12-802900-8.00017-8
12. Cancer Research UK
13. Campanella NC, Berardinelli GN, Scapulatempo-Neto C, Viana D, Palmero EI, Pereira R, Reis RM, Optimization of a pentaplex panel for MSI analysis without control DNA in a

- Brazilian population: correlation with ancestry markers, *European Journal of Human Genetics* (2014) 22, 875–880; doi:10.1038/ejhg.2013.256
14. Chekmareva, M., Ellenson, L. H., & Pirog, E. C. (2008). *Immunohistochemical Differences Between Mucinous and Microglandular Adenocarcinomas of the Endometrium and Benign Endocervical Epithelium*. *International Journal of Gynecological Pathology*, 27(4), 547-554. doi:10.1097/pgp.0b013e318177
 15. Christmann, M., Tomicic, M. T., Roos, W. P., & Kaina, B. (2003). *Mechanisms of human DNA repair: an update*. *Toxicology*, 193(1-2), 3–34. doi:10.1016/s0300-483x(03)00287-7
 16. Constantine, G. D., Kessler, G., Graham, S., & Goldstein, S. R. (2018). *Increased Incidence of Endometrial Cancer Following the Women's Health Initiative: An Assessment of Risk Factors*. *Journal of Women's Health*. doi:10.1089/jwh.2018.6956
 17. Constantinou, A., Davies, A. A., & West, S. C. (2001). *Branch Migration and Holliday Junction Resolution Catalyzed by Activities from Mammalian Cells*. *Cell*, 104(2), 259–268. doi:10.1016/s0092-8674(01)00210-0
 18. Dean, D. A., Wadl, P. A., Hadziabdic, D., Wang, X., & Trigiano, R. N. (2013). *Analyzing Microsatellites Using the QIAxcel System*. *Microsatellites*, 223–243. doi:10.1007/978-1-62703-389-3_16
 19. Dedeurwaerdere F, Claes KBM, Dopre JV, Rottiers I, van der Meulen J, Breyne J, Swaerts K, Martens G, Comparison of microsatellite instability detection by immunohistochemistry and molecular techniques in colorectal and endometrial cancer, *Scientific Reports*, 2021 11(12880): 1-14
 20. Denschlag, D., Ulrich, U., & Emons, G. (2011). *The Diagnosis and Treatment of Endometrial Cancer*. *Deutsches Ärzteblatt Online*. doi:10.3238/arztebl.2011.0571
 21. Dexheimer, T. S. (2012). *DNA Repair Pathways and Mechanisms*. *DNA Repair of Cancer Stem Cells*, 19–32. doi:10.1007/978-94-007-4590-2_2
 22. Evrard, C., & Alexandre, J. (2021). *Predictive and Prognostic Value of Microsatellite Instability in Gynecologic Cancer (Endometrial and Ovarian)*. *Cancers*, 13(10), 2434. doi:10.3390/cancers13102434
 23. Fousteri, M., Vermeulen, W., van Zeeland, A. A. & Mullenders, L. H. Cockayne syndrome A and B proteins differentially regulate recruitment of chromatin remodeling and repair factors to stalled RNA polymerase II in vivo. *Mol. Cell* 23, 471–482 (2006).
 24. Gentry-Maharaj, A., & Karpinskyj, C. (2020). *Current and future approaches to screening for endometrial cancer*. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*. doi:10.1016/j.bpobgyn.2019.12.006
 25. Green, A. K., Feinberg, J., & Makker, V. (2020). *A Review of Immune Checkpoint Blockade Therapy in Endometrial Cancer*. *American Society of Clinical Oncology Educational Book*, (40), 1–7. doi:10.1200/edbk_280503

26. Gu, B., Shang, X., Yan, M., Li, X., Wang, W., Wang, Q., & Zhang, C. (2021). *Variations in incidence and mortality rates of endometrial cancer at the global, regional, and national levels, 1990–2019. Gynecologic Oncology, 161(2), 573–580.* doi:10.1016/j.ygyno.2021.01.036
27. Hecht, J. L., & Mutter, G. L. (2006). *Molecular and Pathologic Aspects of Endometrial Carcinogenesis. Journal of Clinical Oncology, 24(29), 4783–4791.* doi:10.1200/jco.2006.06.7173
28. Hoang, L. N., McConechy, M. K., Meng, B., McIntyre, J. B., Ewanowich, C., Gilks, C. B., ... Lee, C.-H. (2015). *Targeted mutation analysis of endometrial clear cell carcinoma. Histopathology, 66(5), 664–674.* doi:10.1111/his.12581
29. Hoeijmakers, J. H. J. (2001). *DNA repair mechanisms. Maturitas, 38(1), 17–22.* doi:10.1016/s0378-5122(00)00188-2
30. Hsieh, P., & Yamane, K. (2008). *DNA mismatch repair: Molecular mechanism, cancer, and ageing. Mechanisms of Ageing and Development, 129(7-8), 391–407.* doi:10.1016/j.mad.2008.02.012
31. Human Protein Atlas
32. International Agency for Research in Cancer
33. International Federation of Gynecology and Obstetrics – FIGO
34. Iyer, R. R., & Pluciennik, A. (2021). *DNA Mismatch Repair and its Role in Huntington's Disease. Journal of Huntington's Disease, 10(1), 75–94.* doi:10.3233/jhd-200438
35. Jingjing, H., J. Rui, and P. Hui. "Adjuvant chemoradiotherapy vs. radiotherapy alone in early-stage high-risk endometrial cancer: a systematic review and meta-analysis." *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 23.2 (2019): 833-840.
36. Kim, Mi Young; Rha, Sung Eun; Oh, Soon Nam; Jung, Seung Eun; Lee, Young Joon; Kim, You Sung; Byun, Jae Young; Lee, Ahwon; Kim, Mee-Ran (2009). *MR Imaging Findings of Hydrosalpinx: A Comprehensive Review1. RadioGraphics, 29(2), 495–507*
37. Kunitomi, H., Banno, K., Yanokura, M., Takeda, T., Iijima, M., Nakamura, K., ... Aoki, D. (2017). *New use of microsatellite instability analysis in endometrial cancer. Oncology Letters, 14(3), 3297–3301.* doi:10.3892/ol.2017.6640
38. Le, D.T.; Durham, J.N.; Smith, K.N.; Wang, H.; Bartlett, B.R.; Aulakh, L.K.; Lu, S.; Kemberling, H.; Wilt, C.; Lubner, B.S.; et al. Mismatch repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade. *Science* 2017, 357, 409–413
39. Levine, D.A.; Getz, G.; Gabriel, S.B.; Cibulskis, K.; Lander, E.; Sivachenko, A.; Sougnez, C.; Lawrence, M.; Kandoth, C.; Dooling, D.; et al. Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma. *Nature* 2013, 497, 67–73.
40. Li, G.-M. (2007). Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell Research, 18(1), 85–98.* doi:10.1038/cr.2007.115

41. Li, G.-M. (2007). Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell Research*, 18(1), 85–98. doi:10.1038/cr.2007.115
42. Li, X., & Heyer, W.-D. (2008). *Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance*. *Cell Research*, 18(1), 99–113. doi:10.1038/cr.2008.1
43. Lieber, M. R. (2010). *The Mechanism of Double-Strand DNA Break Repair by the Nonhomologous DNA End-Joining Pathway*. *Annual Review of Biochemistry*, 79(1), 181–211. doi:10.1146/annurev.biochem.052308.093131
44. Liu, F.-S. (2007). *Molecular Carcinogenesis of Endometrial Cancer*. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology*, 46(1), 26–32. doi:10.1016/s1028-4559(08)60102-3
45. Longacre, T. A., Chung, M. H., Jensen, D. N., & Hendrickson, M. R. (1995). *Proposed Criteria for the Diagnosis of Well-Differentiated Endometrial Carcinoma*. *The American Journal of Surgical Pathology*, 19(4), 371–406. doi:10.1097/00000478-199504000-00001
46. Marabelle, A.; Le, D.T.; Ascierto, P.A.; Giacomo, A.M.D.; Jesus-Acosta, A.D.; Delord, J.-P.; Geva, R.; Gottfried, M.; Penel, N.; Hansen, A.R.; et al. Efficacy of pembrolizumab in patients with noncolorectal high microsatellite instability/mismatch repair-deficient cancer: Results from the phase II KEYNOTE-158 study. *J. Clin. Oncol.* 2020, 38, 1–10.
47. Marteijn, J. A., Lans, H., Vermeulen, W., & Hoeijmakers, J. H. J. (2014). *Understanding nucleotide excision repair and its roles in cancer and ageing*. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(7), 465–481. doi:10.1038/nrm3822
48. Mazur, M. T., & Kurman, R. J. (2005). *Endometrial Hyperplasia, Endometrial Intraepithelial Carcinoma, and Epithelial Cytoplasmic Change*. *Diagnosis of Endometrial Biopsies and Curettings*, 178–207. doi:10.1007/978-0-387-26321-2_9
49. McMeekin DS , Tritchler DL, Cohn DE, Mutch DG, Lankes HA, et al. 2016. Clinicopathologic significance of mismatch repair defects in endometrial cancer: an NRG Oncology/Gynecologic Oncology Group study. *J. Clin. Oncol.* 34:3062–68
50. Modrich, P. (2006). *Mechanisms in Eukaryotic Mismatch Repair*. *Journal of Biological Chemistry*, 281(41), 30305–30309. doi:10.1074/jbc.r600022200
51. Morice, P., Leary, A., Creutzberg, C., Abu-Rustum, N., & Darai, E. (2016). *Endometrial cancer*. *The Lancet*, 387(10023), 1094–1108. doi:10.1016/s0140-6736(15)00130-0
52. Mullins, E. A., Rodriguez, A. A., Bradley, N. P., & Eichman, B. F. (2019). *Emerging Roles of DNA Glycosylases and the Base Excision Repair Pathway*. *Trends in Biochemical Sciences*. doi:10.1016/j.tibs.2019.04.006
53. Murali, R., Delair, D. F., Bean, S. M., Abu-Rustum, N. R., & Soslow, R. A. (2018). *Evolving Roles of Histologic Evaluation and Molecular/Genomic Profiling in the Management of Endometrial Cancer*. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 16(2), 201–209. doi:10.6004/jnccn.2017.7066

54. Nakayama, K., Nakayama, N., Ishikawa, M., & Miyazaki, K. (2012). *Endometrial Serous Carcinoma: Its Molecular Characteristics and Histology-Specific Treatment Strategies*. *Cancers*, 4(3), 799–807. doi:10.3390/cancers4030799
55. Parazzini, F., La Vecchia, C., Bocciolone, L., & Franceschi, S. (1991). *The epidemiology of endometrial cancer*. *Gynecologic Oncology*, 41(1), 1–16. doi:10.1016/0090-8258(91)90246-2
56. Peltomaki, P. (2001). *Deficient DNA mismatch repair: a common etiologic factor for colon cancer*. *Human Molecular Genetics*, 10(7), 735–740. doi:10.1093/hmg/10.7.735
57. Pyatt R., Chadwick RB., Johnson CK., Adebamowo C., de la Chapelle A., Prior T., Polymorphic Variation at the BAT-25 and BAT-26 Loci in Individuals of African Origin, *American Journal of Pathology*, 1999. 155(2): 349-353
58. Ranjha, L., Howard, S. M., & Cejka, P. (2018). *Main steps in DNA double-strand break repair: an introduction to homologous recombination and related processes*. *Chromosoma*, 127(2), 187–214. doi:10.1007/s00412-017-0658-1
59. Rendi, M. H., Muehlenbachs, A., Garcia, R. L., & Boyd, K. L. (2012). *Female Reproductive System*. *Comparative Anatomy and Histology*, 253–284. doi:10.1016/b978-0-12-381361-9.00017-2
60. Robertson, A. B., Klungland, A., Rognes, T., & Leiros, I. (2009). *DNA Repair in Mammalian Cells*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66(6), 981–993. doi:10.1007/s00018-009-8736-z
61. Ruhul Quddus, M., Sung, C. J., Cunxian Zhang, & Dwayne Lawrence, W. (2010). *Minor Serous and Clear Cell Components Adversely Affect Prognosis in “Mixed-Type” Endometrial Carcinomas: A Clinicopathologic Study of 36 Stage-I Cases*. *Reproductive Sciences*, 17(7), 673–678. doi:10.1177/19337191110368433
62. Ryan, A. J., Susil, B., Jobling, T. W., & Oehler, M. K. (2005). *Endometrial cancer*. *Cell and Tissue Research*, 322(1), 53–61. doi:10.1007/s00441-005-1109-5
63. Salim, S., Won, H., Nesbitt-Hawes, E., Campbell, N., & Abbott, J. (2011). *Diagnosis and Management of Endometrial Polyps: A Critical Review of the Literature*. *Journal of Minimally Invasive Gynecology*, 18(5), 569–581. doi:10.1016/j.jmig.2011.05.018
64. Sancar, A., Lindsey-Boltz, L. A., Ünsal-Kaçmaz, K., & Linn, S. (2004). *Molecular Mechanisms of Mammalian DNA Repair and the DNA Damage Checkpoints*. *Annual Review of Biochemistry*, 73(1), 39–85. doi: 10.1146/annurev.biochem.73.011303.073723
65. Sanderson, P. A., Critchley, H. O. D., Williams, A. R. W., Arends, M. J., & Saunders, P. T. K. (2016). *New concepts for an old problem: the diagnosis of endometrial hyperplasia*. *Human Reproduction Update*. doi:10.1093/humupd/dmw042
66. Schwertman, P., Lagarou, A., Dekkers, D. H. W., Raams, A., van der Hoek, A. C., Laffeber, C., ... Marteijn, J. A. (2012). *UV-sensitive syndrome protein UVSSA recruits USP7 to*

- regulate transcription-coupled repair. Nature Genetics, 44(5), 598–602. doi:10.1038/ng.2230*
67. Scully, R., Panday, A., Elango, R., & Willis, N. A. (2019). *DNA double-strand break repair-pathway choice in somatic mammalian cells. Nature Reviews Molecular Cell Biology. doi:10.1038/s41580-019-0152-0*
 68. Shia, J.; Ellis, N.A.; Klimstra, D.S. The utility of immunohistochemical detection of DNA mismatch repair gene proteins. *Virchows Arch.* 2004, 445, 431–441.
 69. SIDERIS, M., EMIN, E. I., ABDULLAH, Z., HANRAHAN, J., STEFATOU, K. M., SEVAS, V., ... WILLMOTT, F. (2019). *The Role of KRAS in Endometrial Cancer: A Mini-Review. Anticancer Research, 39(2), 533–539. doi:10.21873/anticancer.13145*
 70. Siemanowski, J.; Schömig-Markiefka, B.; Buhl, T.; Haak, A.; Siebolts, U.; Dietmaier, W.; Arens, N.; Pauly, N.; Ataseven, B.; Büttner, R.; et al. Managing Difficulties of Microsatellite Instability Testing in Endometrial Cancer-Limitations and Advantages of Four Different PCR-Based Approaches. *Cancers* 2021, 13, 1268. <https://doi.org/10.3390/cancers13061268>
 71. Silvestris, E., De Palma, G., Canosa, S., Palini, S., Dellino, M., Revelli, A., & Paradiso, A. V. (2020). *Human Ovarian Cortex biobanking: A Fascinating Resource for Fertility Preservation in Cancer. International Journal of Molecular Sciences, 21(9), 3245. doi:10.3390/ijms21093245*
 72. Singh G, Puckett Y. Endometrial Hyperplasia. [Updated 2022 Jan 2]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560693>
 73. Sorosky, J. I. (2012). *Endometrial Cancer. Obstetrics & Gynecology, 120(2, Part 1), 383–397. doi: 10.1097/aog.0b013e3182605bf1*
 74. Stelloo, E.; Jansen, A.M.L.; Osse, E.M.; Nout, R.A.; Creutzberg, C.L.; Ruano, D.; Church, D.N.; Morreau, H.; Smit, V.T.H.B.M.; van Wezel, T.; et al. Practical guidance for mismatch repair-deficiency testing in endometrial cancer. *Ann. Oncol.* 2017, 28, 96–102.
 75. Suarez, A. A., Felix, A. S., & Cohn, D. E. (2017). Bokhman Redux: Endometrial cancer “types” in the 21st century. *Gynecologic Oncology, 144(2), 243–249. doi:10.1016/j.ygyno.2016.12.010*
 76. Torgovnick, A., & Schumacher, B. (2015). *DNA repair mechanisms in cancer development and therapy. Frontiers in Genetics, 6. doi:10.3389/fgene.2015.00157*
 77. Ukkola, I., Nummela, P., Pasanen, A., Kero, M., Lepistö, A., Kytölä, S., ... Ristimäki, A. (2021). *Detection of microsatellite instability with Idylla MSI assay in colorectal and endometrial cancer. Virchows Archiv, 479(3), 471–479. doi:10.1007/s00428-021-03082-w*

78. Vitor, A. C., Huertas, P., Legube, G., & de Almeida, S. F. (2020). *Studying DNA Double-Strand Break Repair: An Ever-Growing Toolbox. Frontiers in Molecular Biosciences*, 7. doi:10.3389/fmolb.2020.00024
79. Wang, Y., Yu, M., Yang, J.-X., Cao, D.-Y., Shen, K., & Lang, J.-H. (2018). *Clinicopathological and survival analysis of uterine papillary serous carcinoma: a single institutional review of 106 cases. Cancer Management and Research, Volume 10*, 4915–4928. doi:10.2147/cmar.s179566
80. Wang, Y.; Shi, C.; Eisenberg, R.; Vnencak-Jones, C.L. Differences in microsatellite instability profiles between endometrioid and colorectal cancers: A potential cause for false-negative results? *J. Mol. Diagn.* 2017, 19, 57–64.
81. Weterings, E., & Chen, D. J. (2008). *The endless tale of non-homologous end-joining. Cell Research*, 18(1), 114–124. doi:10.1038/cr.2008.3
82. Wolfman, W., Leyland, N., Wolfman, W., Heywood, M., Singh, S. S., Rittenberg, D. A., ... Menzies, R. (2010). *Asymptomatic Endometrial Thickening. Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada*, 32(10), 990–999. doi:10.1016/s1701-2163(16)34690-4
83. Wong YF, Cheung TH, Lo KWK, Yim SF, Chan LKY et al, Detection of microsatellite instability in endometrial cancer: advantages of a panel of five mononucleotide repeats over the National Cancer Institute panel of markers, *Carcinogenesis* vol.27 no.5 pp.951–955, 2006 doi:10.1093/carcin/bgi333
84. Wu, C.-J., Peng, Y.-J., Yu, M.-H., & Chen, C.-H. (2007). *Secretory Endometrial Adenocarcinoma in a Tamoxifen User With Breast Cancer After Menopause. Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology*, 46(1), 88–90. doi:10.1016/s1028-4559(08)60118-7
85. Yang, G., Zheng, R., & Jin, Z. (2019). *Correlations between microsatellite instability and the biological behaviour of tumours. Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. doi:10.1007/s00432-019-03053-4
86. Yen, T.-T., Wang, T.-L., Fader, A. N., Shih, I.-M., & Gaillard, S. (2020). Molecular Classification and Emerging Targeted Therapy in Endometrial Cancer. *International Journal of Gynecological Pathology*, 39(1), 26–35. doi:10.1097/pgp.0000000000000585
87. Zaino RJ, Kurman RJ, Brunetto VL, Morrow CP, Bentley RC, Capparelli JO, Bitterman P. Villologlandular adenocarcinoma of the endometrium: a clinicopathologic study of 61 cases: a gynecologic oncology group study. *Am J Surg Pathol.* 1998 Nov;22(11):1379-85. doi: 10.1097/00000478-199811000-00008. PMID: 9808130.
88. Zhang, Y., Wang, Z., Zhang, J., Wang, C., Wang, Y., Chen, H., ... Ma, X. (2021). *Deep learning model for classifying endometrial lesions. Journal of Translational Medicine*, 19(1). doi:10.1186/s12967-020-02660-x
89. Zharkov, D. O. (2008). *Base excision DNA repair. Cellular and Molecular Life Sciences*, 65(10), 1544–1565. doi:10.1007/s00018-008-7543-2

90. *Ανατομία του γεννητικού συστήματος της γυναίκας- Παναγιώτης Χριστόπουλος.*
91. Εισαγωγή στη Φυσιολογία του ανθρώπου , Sherwood et al.
92. Σημειώσεις Γενετικής Μηχανικής , Τμήμα Β.Ε.Τ – Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων