



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



**Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών:**

**«Βιολογία της Αναπαραγωγής – Βιοδείκτες στη Μαιευτική και  
Γυναικολογία – Περιγεννητική Ιατρική»**

**Διευθυντής ΠΜΣ: Καθηγητής ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ Ι. ΔΑΠΟΝΤΕ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**«Μελέτη μικροδορυφορικών δεικτών στον καρκίνο του  
ενδομητρίου»**

**ΝΤΙΝΤΟΥ ΕΛΙΣΣΑΒΕΤ ΡΑΦΑΕΛΑ  
ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

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

**Λάρισα, 2023**



UNIVERSITY OF THESSALY  
FACULTY OF HEALTH SCIENCES  
DEPARTMENT OF MEDICINE



**Postgraduate Programme:**

**Biology of Reproduction – Biomarkers in Obstetrics and Gynecology  
– Perinatal Medicine**

**Director of MSc: Professor Alexandros I. Daponte**

**POSTGRADUATE THESIS**

**“Study of microsatellite markers in endometrial cancer”**

**NTINTOU ELISSAVET RAFAELA  
BIOLOGIST**

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

**Larissa, 2023**

### **Επιβλέπων Καθηγητής:**

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

### **Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:**

1. **κ. Αλέξανδρος Δαπόντε**, Καθηγητής Μαιευτικής και Γυναικολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
2. **κ. Μαρία Σαμαρά**, Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής με έμφαση στη Μοριακή Ιστοπαθολογία, Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
3. **κ. Μαρία Σάτρα**, Επίκουρη Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής, Τμήμα Δημόσιας και Ενιαίας Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο πλαίσιο της μεταπτυχιακής διπλωματικής μου εργασίας και διεξήχθη στη μονάδα Μοριακής Ιστοπαθολογίας, στο εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας σε συνεργασία με τη Μαιευτική και Γυναικολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας. Η εργασία πραγματοποιήθηκε υπό την επίβλεψη της Επίκουρης καθηγήτριας κ. Μαρίας Σαμαρά.

Πρώτα απ' όλα, ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στην κ. Μαρία Σαμαρά για την ευκαιρία που μου έδωσε και την εμπιστοσύνη, ώστε να πραγματοποιήσω την πειραματική διαδικασία της διπλωματικής μου εργασίας στο συγκεκριμένο εργαστήριο. Η καθοδήγηση και η εμπιστοσύνη της ήταν καταλυτική για την επιτυχή περάτωση της διπλωματικής μου εργασίας. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς επιτροπής, τον Καθηγητή κ. Αλέξανδρο Δαπόντε και στην Επίκουρη Καθηγήτρια κ. Μαρία Σάτρα για την υποστήριξή τους στην εκπόνηση της διπλωματικής μου εργασίας.

Θα ήθελα, επίσης, να εκφράσω ένα τεράστιο ευχαριστώ στις Υποψήφιες Διδάκτορες του τμήματος κ. Μαρία Αναγνώστου και κ. Μαρία Παπαθανασίου, για την υπομονή που έδειξαν, όσο και για τη συμπαράσταση, την επιστημονική καθοδήγηση και την βοήθεια που απλόχερα μου έδωσαν και συνέβαλλαν στην επιτυχή ολοκλήρωση των πειραμάτων της εργασίας μου.

Οφείλω επίσης να ευχαριστήσω θερμά όλα τα μέλη του εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής για την ένταξή μου στο εργαστήριο, την ψυχική ενθάρρυνση, τη βοήθεια και το φιλικό κλίμα που διαμόρφωσαν καθ' όλη τη διάρκεια της παρουσίας μου στο εργαστήριο.

Τέλος, ευχαριστώ μέσα από τα βάθη της καρδιάς μου τον φιλικό και οικογενειακό μου περίγυρο, με ιδιαίτερη έμφαση στους γονείς μου, για την υπομονή τους, την πίστη τους σε μένα και τη στήριξή τους σε κάθε μου βήμα. Τους ευχαριστώ που είναι δίπλα μου.

NTINTOY ΕΛΙΣΣΑΒΕΤ ΡΑΦΑΕΛΑ



## Πίνακας περιεχομένων

<b>ΠΡΟΛΟΓΟΣ</b> .....	<b>4</b>
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b> .....	<b>8</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>9</b>
<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....	<b>10</b>
<b>ΑΝΑΤΟΜΙΑ ΤΟΥ ΓΥΝΑΙΚΕΙΟΥ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ</b> .....	<b>10</b>
<b>ΕΜΒΡΥΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΜΗΤΡΑΣ</b> .....	<b>13</b>
<b>ΙΣΤΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΜΗΤΡΑΣ</b> .....	<b>14</b>
<b>ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΕΜΜΗΝΟΡΡΥΣΙΑΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ</b> .....	<b>15</b>
Ωοθυλακική φάση .....	15
Ωορρηξία.....	17
Ωχρινική-Εκκριτική φάση.....	17
<b>ΥΠΕΡΠΛΑΣΙΑ ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΟΥ</b> .....	<b>19</b>
<b>ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΟΥ</b> .....	<b>22</b>
ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΟΥ ΤΥΠΟΥ I .....	24
ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΟΥ ΤΥΠΟΥ II.....	26
ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΟΕΙΔΕΣ ΑΔΕΝΟΚΑΡΚΙΝΩΜΑ.....	27
ΠΛΑΚΩΔΗΣ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ.....	29
ΛΑΧΝΟΑΔΕΝΙΚΟ ΠΡΟΤΥΠΟ .....	29
ΒΛΕΝΝΩΔΕΣ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ .....	30
ΟΡΩΔΕΣ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ.....	31
ΔΙΑΥΓΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ .....	32
ΜΙΚΤΑ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΑ .....	34
ΚΛΗΡΟΝΟΜΙΚΗ ΜΟΡΦΗ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΟΥ.....	34
<b>ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΕΠΙΔΙΟΡΘΩΣΗΣ DNA</b> .....	<b>35</b>
<b>ΜΙΚΡΟΔΟΥΡΥΦΟΡΙΚΕΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΕΣ</b> .....	<b>36</b>
<b>ΜΙΚΡΟΔΟΥΡΥΦΟΡΙΚΗ ΑΣΤΑΘΕΙΑ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΟΥ</b> .....	<b>37</b>
<b>ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΕΣ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΙΣ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΟΥ</b> .....	<b>38</b>
ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ ΕΠΕΜΒΑΣΗ .....	40
ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΙΑ.....	41
ΑΚΤΙΝΟΘΕΡΑΠΕΙΑ.....	42
ΑΝΟΣΟΘΕΡΑΠΕΙΑ .....	42
<b>ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΔΟΥΡΥΦΟΡΙΚΗΣ ΑΣΤΑΘΕΙΑΣ ΑΝΑΛΟΓΑ ΜΕ ΤΑ</b> <b>ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΕΥΡΗΜΑΤΑ</b> .....	<b>43</b>
<b>ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ</b> .....	<b>45</b>
<b>ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ</b> .....	<b>45</b>
<b>ΑΠΟΠΑΡΑΦΙΝΩΣΗ ΤΟΥ ΙΣΤΟΥ ΚΑΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA</b> .....	<b>46</b>
<b>ΑΠΟΠΑΡΑΦΙΝΩΣΗ ΤΩΝ ΦΡΕΤ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ</b> .....	<b>47</b>
Πειραματική διαδικασία:.....	47
<b>ΛΥΣΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΚΑΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΟΥ ΓΕΝΩΜΙΚΟΥ DNA</b> .....	<b>48</b>
<b>ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΓΕΝΩΜΙΚΟΥ DNA</b> .....	<b>49</b>
Πειραματική διαδικασία.....	49
<b>ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)</b> .....	<b>51</b>
<b>ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ</b> .....	<b>54</b>
Παρασκευή πηκτής αγαρόζης σύστασης 3% .....	54
Ηλεκτροφόρηση πηκτώματος αγαρόζης .....	55
<b>ΤΡΙΧΟΕΙΔΙΚΗ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ (CAPILLARY ELECTROPHORESIS)</b> .....	<b>56</b>
<b>ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ QIAXCEL</b> .....	<b>56</b>

<b>ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΣΤΟ QIAXCEL ADVANCED .....</b>	<b>58</b>
<b>ΑΡΧΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΤΗΣ ΤΡΙΧΟΕΙΔΙΚΗΣ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗΣ .....</b>	<b>64</b>
<b>ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΔΟΥΡΥΦΟΡΙΚΗΣ ΑΣΤΑΘΕΙΑΣ ΣΕ ΑΝΑΛΥΤΗ BASETYPER.....</b>	<b>66</b>
<b>ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ .....</b>	<b>67</b>
<b>ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΓΙΑ PAIRED-SAMPLES .....</b>	<b>68</b>
Προετοιμασία της ανάλυσης MicroSight® MSI 1-step HRM Analysis assay .....	68
Προσθήκη DNA στους σωλήνες .....	68
Τοποθέτηση σειρών (strips) στον αναλυτή.....	69
<b>ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΑΝΑΛΥΣΗΣ.....</b>	<b>70</b>
PAIRED-SAMPLE ANALYSIS .....	70
UNPAIRED-SAMPLE ANALYSIS .....	70
<b>ΕΚΚΙΝΗΣΗ ΤΗΣ ΕΚΤΕΛΕΣΗΣ .....</b>	<b>73</b>
<b>ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ .....</b>	<b>74</b>
ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ .....	75
<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>77</b>
<b>ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....</b>	<b>88</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....</b>	<b>92</b>

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο καρκίνος του ενδομητρίου (ΚΕ) αποτελεί μία νόσο που υπονομεύει την υγεία των γυναικών παγκοσμίως, παρουσιάζοντας χαμηλά ποσοστά επιβίωσης σε περιπτώσεις που η νόσος είναι προχωρημένη ή υποτροπιάζουσα/μεταστατική. Στην ανάπτυξη του όγκου συμβάλλουν ποικίλοι παράγοντες, περιβαλλοντικοί και γενετικοί. Στους τελευταίους περιλαμβάνεται πλήθος σηματοδοτικών οδών και μηχανισμών, μεταξύ των οποίων είναι η ανεπάρκεια του μηχανισμού επιδιόρθωσης εσφαλμένα συζευγμένων βάσεων (MMR). Η παρουσία μεταλλάξεων στα γονίδια του μηχανισμού *MMR* δημιουργεί μη λειτουργικές πρωτεΐνες, που αδυνατούν να διατηρήσουν την ακεραιότητα του DNA. Ως εκ τούτου, συσσωρεύονται σφάλματα σε μικροδορυφορικές αλληλουχίες, δημιουργώντας μικροδορυφορική αστάθεια σε έναν όγκο. Στην καθημερινή κλινική πράξη η λειτουργία του μηχανισμού επιδιόρθωσης *MMR* ελέγχεται με ανοσοιστοχημικές χρώσεις, μέσω αντισωμάτων ειδικών για τις επιδιορθωτικές πρωτεΐνες MLH1, PMS2, MSH2 και MSH6. Εκτός από τις γενετικές αλλαγές στα εν λόγω γονίδια, λαμβάνουν χώρα και επιγενετικές αλλαγές, όπως η μεθυλίωση του DNA στον υποκινητή του γονιδίου MLH1, που επηρεάζουν τα επίπεδα έκφρασης των παραγόμενων πρωτεϊνών. Αποτέλεσμα της ανεπάρκειας του μηχανισμού *MMR* είναι η συσσώρευση αλλαγών στις μικροδορυφορικές αλληλουχίες. Πολλές ερευνητικές ομάδες εξετάζουν τη μικροδορυφορική αστάθεια με τεχνικές και πρωτόκολλα μοριακής βιολογίας. Στην παρούσα εργασία μελετήσαμε τους μικροδορυφορικούς δείκτες BAT-25, BAT-26 και NR-27 σε ασθενείς με καρκίνο του ενδομητρίου, με συνδυασμό της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) και τριχοειδικής ηλεκτροφόρησης στο σύστημα QIAxcel Advanced, με στόχο την ανάπτυξη μίας γρήγορης, οικονομικής και έγκυρης μεθοδολογίας για τον προσδιορισμό της μικροδορυφορικής αστάθειας στους όγκους. Ο προσδιορισμός της μικροδορυφορικής αστάθειας, σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες, πρέπει να διεξάγεται σε όλες τις ασθενείς με καρκίνο ενδομητρίου, καθώς εξυπηρετεί τόσο τον εντοπισμό ασθενών με σύνδρομο Lynch, αλλά κυρίως τον προσδιορισμών των ασθενών που δύνανται να είναι υποψήφιοι για ανοσοθεραπεία.

**Λέξεις κλειδιά:** Καρκίνος ενδομητρίου, ανεπάρκεια *MMR*, μικροδορυφορική αστάθεια, ανοσοθεραπεία, τριχοειδική ηλεκτροφόρηση



## **ABSTRACT**

Endometrial cancer (EC) is a disease that undermines women's health worldwide, with low survival rates in cases where the disease is advanced or recurrent/metastatic. A variety of factors, both environmental and genetic, contribute to the development of the tumor. As regards the genetic factors, they include several signaling pathways and mechanisms, including the failure of the mismatched base repair (MMR) mechanism. The presence of mutations in the MMR genes creates non-functional proteins that are unable to maintain DNA integrity. Therefore, errors in microsatellite sequences accumulate, creating microsatellite instability in a tumor. In daily clinical practice, the function of the MMR repair mechanism is monitored by immunohistochemical staining using antibodies specific for the repair proteins MLH1, PMS2, MSH2, and MSH6. In addition to the genetic changes in these genes, epigenetic changes, such as DNA methylation at the MLH1 gene promoter, also take place, affecting the expression levels of the proteins that are produced. As a result of the inefficiency of the MMR mechanism, an accumulation of changes in microsatellite sequences occurs. Many research groups are investigating microsatellite instability with molecular biology techniques and protocols. In this study, we investigated the microsatellite markers BAT-25, BAT-26, and NR-27 in patients with endometrial cancer using a combination of polymerase chain reaction (PCR) and capillary electrophoresis on the QIAxcel Advanced system, with the aim of developing a rapid, cost-effective, and valid methodology to determine microsatellite instability in tumors. The determination of microsatellite instability, according to the guidelines, should be performed in all patients with endometrial cancer, as it helps both to identify patients with Lynch syndrome and especially to identify patients who may be candidates for immunotherapy.

**Keywords:** Endometrial cancer, MMR deficiency, microsatellite instability, immunotherapy, capillary electrophoresis

# ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## ΑΝΑΤΟΜΙΑ ΤΟΥ ΓΥΝΑΙΚΕΙΟΥ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ

Το αναπαραγωγικό σύστημα στα θήλεα άτομα απαρτίζεται από την πύελο, τα έσω και τα έξω γεννητικά όργανα. Πρόκειται για ένα δυναμικό σύστημα, καθώς η μορφολογία του μεταβάλλεται βάσει των ορμονικών αλλαγών που καταγράφονται κατά τη διάρκεια ζωής του θήλεος ατόμου. Οι αλλαγές των ορμονών παρατηρούνται στα πλαίσια του εμμηνορρυσιακού κύκλου, της εγκυμοσύνης και της γήρανσης των ωοθηκών.

Η πύελος σχηματίζεται από το ιερό και τα δύο ανώνυμα οστά. Διαιρείται σε δύο μοίρες, την μείζονα και την ελάσσονα πύελο. Το τμήμα της οστικής ζώνης, το οποίο βρίσκεται κάτω από την είσοδο (χείλος) της πυέλου, μαζί με τα κατώτερα τμήματα των δύο ανώνυμων οστών και το ιερό οστό σχηματίζουν την ελάσσονα - ψευδή πύελο. Η ελάσσονα πύελος έχει σχήμα λεκάνης και εμπεριέχει τα έσω γεννητικά όργανα, καθώς και τα κατώτερα τμήματα του γαστρεντερικού σωλήνα και των ουροφόρων οδών. Σχηματίζει τα οστικά όρια του γεννητικού σωλήνα, διευκολύνοντας τη διέλευση του εμβρύου κατά τον τοκετό. Η μείζονα- αληθής πύελος έχει μικρή κλινική σημασία και συμβάλλει κυρίως στη στήριξη των σπλάγχων της κάτω κοιλίας, αλλά και της μήτρας που κυοφορεί, κυρίως μετά τον τρίτο μήνα της κύησης διευκολύνοντας παράλληλα την καθοδήγηση του εμβρύου προς την ελάσσονα πύελο (Εισαγωγή στη Φυσιολογία του ανθρώπου, Sherwood et al).

Στην κατηγορία των έσω γεννητικών οργάνων ανήκουν ο κόλπος (vagina), οι σάλπιγγες (fallopian tubes), ο τράχηλος (cervix), η μήτρα (uterus) και οι ωοθήκες (ovaries). Οι ωοθήκες είναι δύο, έχουν αμυγδαλοειδές σχήμα και εντοπίζονται στο άνω μέρος της λεκάνης, μία σε κάθε πλευρά της μήτρας. Στηρίζονται στους ακόλουθους συνδέσμους: τον μητροωθηκικό σύνδεσμο, που αποτελείται από τον ωθηκικό κλάδο της μητριαίας αρτηρίας, τον κρεμαστήρα σύνδεσμο που περικλείει τα ωθηκικά αγγεία και νεύρα και το μεσωθηκίο, που αποτελεί περιτοναϊκή πτυχή του πλατώως συνδέσμου. Οι διαστάσεις των ωοθηκών είναι 1cm x 2cm x 3cm και το βάρος τους προσδιορίζεται μεταξύ 3 έως 10 γραμμάρια. Η διακύμανση του μεγέθους και του βάρους αποδίδεται κυρίως σε ενδογενείς και εξωγενείς ορμονικούς παράγοντες.

Οι ωοθήκες αποτελούνται από τον φλοιό και τον μυελό. Ο φλοιός αποτελεί το κύριο τμήμα της ωοθήκης και αποτελείται από το στρώμα και τα ωοθυλάκια, ενώ ο μυελός καταλαμβάνει το μικρότερο μέρος της ωοθήκης και αποτελείται από ινομυώδη ιστό και αγγεία. Εμφανίζουν δύο χείλη, δύο άκρα και δύο επιφάνειες. Το πρόσθιο χείλος έρχεται σε επαφή με τη λήκυθο της σάλπιγγας, και προσφύεται στο μεσοωθήκιο, στο οποίο εντοπίζονται τα αγγεία και τα νεύρα της ωοθήκης, ενώ το οπίσθιο χείλος έρχεται σε επαφή με τον κώδωνα της σάλπιγγας, τον ουρητήρα και την μηριαία αρτηρία. Στο άνω άκρο προσφύεται ο κρεμαστήρας σύνδεσμος της ωοθήκης, ενώ το κάτω άκρο συνδέεται με το πλάγιο τοίχωμα της ωοθήκης μέσω του μητροωθηκικού συνδέσμου. Επιπροσθέτως, η έσω επιφάνεια καλύπτεται από τον κώδωνα, ενώ η έξω επιφάνεια είναι σε άμεση επαφή με το περιτόναιο (Boyd et al., 2018).

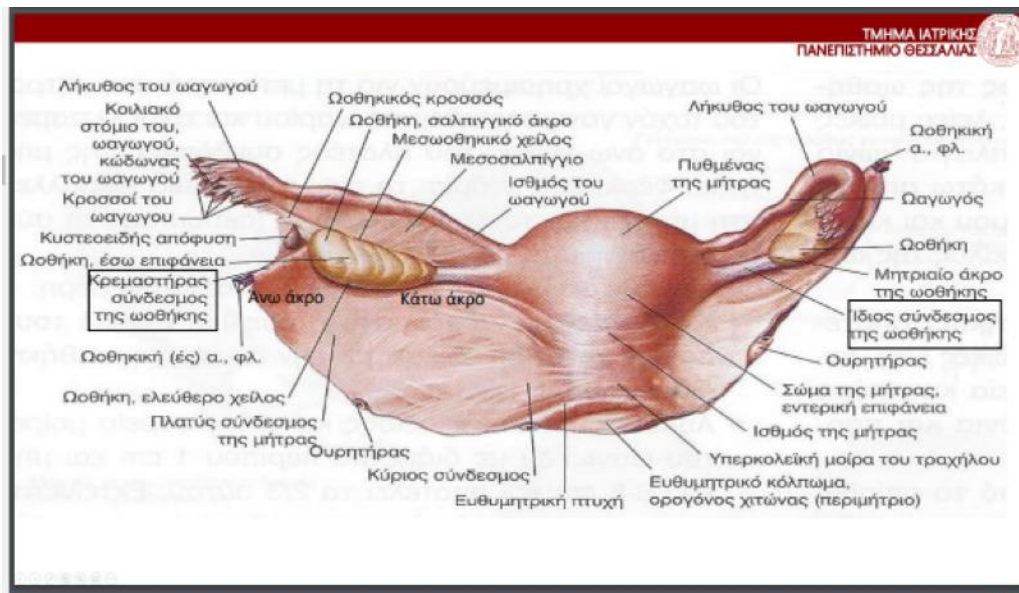
Οι σάλπιγγες-ωαγωγοί είναι όργανα με κοίλη μορφολογία και μήκος που κυμαίνεται από 7 έως 12 εκατοστά. Ο ρόλος τους είναι η λήψη και μεταφορά του ωαρίου από την ωοθήκη προς την μήτρα και η δημιουργία του κατάλληλου περιβάλλοντος, ώστε να επιτευχθεί η γονιμοποίηση. Οι σάλπιγγες σχηματίζονται από τα ακόλουθα τμήματα: το διάμεσο τμήμα, εντοπίζεται εντός του τοιχώματος της μήτρας, τον ισθμό, τη λύκηθο, το ευρύτερο και μακρύτερο τμήμα της σάλπιγγας και τον κώδωνα, ένα χοανοειδές κοιλιακό στόμιο το οποίο επικοινωνεί με την περιτοναϊκή κοιλότητα. Το τοίχωμα των σαλπίγγων φέρει μυϊκές ίνες (Kim et al., 2009).

Ο κόλπος είναι ένας κυλινδρικός σωλήνας μήκους 6 έως 9 εκατοστά. Το πλάτος κυμαίνεται μεταξύ 3 έως 4 εκατοστών σε άτοκες γυναίκες, ενώ δύναται να φτάσει τα 7 εκατοστά σε γυναίκες με πολλές κύσεις. Πρόκειται για ένα ινομυώδες όργανο, καθώς το τοίχωμα του κόλπου φέρει μία ινομυώδη στιβάδα από κυκλικά διατεταγμένες δεσμίδες λείων μυϊκών ινών. Επιπλέον, παρουσιάζει μεγάλη ελαστικότητα, καθώς ο εξωτερικός χιτώνας φέρει πυκνό, ινοκολλαγονώδη συνδετικό ιστό πλούσιο σε ελαστικές ίνες, οι οποίες ευθύνονται για την ελαστικότητα και διατασιμότητα του κόλπου κατά τη διάρκεια του τοκετού (Rendi et al., 2012). Ο κόλπος προσφύεται στο άνω μέρος γύρω από τον τράχηλο της μήτρας και στο κάτω μέρος εκβάλλει στην αιδουϊκή σχισμή. Ο κόλπος διαιρείται σε κάτω άκρο – στόμιο, μέσο τμήμα- σώμα και άνω άκρο- θόλο. Το στόμιο εκβάλλει στον πρόδρομο του κόλπου. Το σώμα του κόλπου υποδιαιρείται σε πρόσθιο τοίχωμα, οπίσθιο τοίχωμα και δύο πλάγια χείλη. Ο θόλος προσφύεται κυκλοτερώς στον τράχηλο και περιλαμβάνει το ενδοκολπικό τμήμα του τραχήλου. Τα τοιχώματα του κόλπου λιπαίνονται από τη βλέννη που παράγουν οι αδένες της μήτρας και συγκεκριμένα οι ενδροτραχηλικοί αδένες και οι Βαρθολίνειοι

αδένες και από το δίδρωμα, το οποίο παράγεται από το υποβλεννογόνιο αγγειακό δίκτυο. Ο βλεννογόνος είναι ορμονικά ευαίσθητος και η χορήγηση οιστρογόνων, ακόμη και εξωγενώς, αναδομεί τα κολπικά τοιχώματα, γεγονός που συμβάλλει θετικά στην περίπτωση της εμμηνόπαυσης, καθώς ο βλεννογόνος λεπταίνει με αποτέλεσμα την έλλειψη ελαστικότητας και την ξηρότητα.

Ο τράχηλος είναι ένας κυλινδρικός, ινομυώδης σωλήνας, ο οποίος συνέχεται με το σώμα της μήτρας στο ύψος του έσω τραχηλικού στομίου. Διακρίνονται δύο επιμέρους τμήματα του τραχήλου, ο ενδοτράχηλος και ο εξωτράχηλος. Ο ενδοτράχηλος έχει μήκος 2 με 3 εκατοστά και εκτείνεται από το έσω έως το έξω τραχηλικό στόμιο. Ο εξωτράχηλος είναι το τμήμα του τραχήλου, το οποίο εντοπίζεται στον κόλπο και αποτελείται από μία κυρτή, στρογγυλή επιφάνεια με μία οπή, το έξω τραχηλικό στόμιο. Το αδενικό επιθήλιο του ενδοτραχήλου παράγει βλέννη, η ποιότητα και η ποσότητα της οποίας μεταβάλλεται κατά μήκος του εμμηνορρυσιακού κύκλου.

Η μήτρα (uterus) είναι ένα από τα κύρια όργανα του γυναικείου γεννητικού συστήματος. Πρόκειται για ένα κοίλο όργανο με απιοειδές σχήμα, υπεύθυνο για μία ποικιλία λειτουργιών, όπως η κύηση, η έμμηνος ρύση και ο τοκετός. Το μήκος της μήτρας κυμαίνεται από 6 έως 8 εκατοστά και ζυγίζει περίπου 70 γραμμάρια. Αποτελείται από τα εξής μέρη: το σώμα, τον τράχηλο και τον ισθμό που διακρίνει το σώμα από τον τράχηλο. Φυσιολογικά, το πρόσθιο και το οπίσθιο τμήμα της μήτρας άπτονται. Το σώμα της μήτρας ποικίλλει σε μέγεθος και εξαρτάται από την ηλικία της γυναίκας και το ιστορικό της. Σε διατομή του σώματος της μήτρας εντοπίζουμε δύο τμήματα, το μυομήτριο και το ενδομήτριο. Το μυομήτριο αποτελεί τον παχύτερο χιτώνα της μήτρας και αποτελείται από δεσμίδες λείων μυϊκών ινών μεταξύ των οποίων παρεμβάλλεται ο συνδετικός ιστός. Εξωτερικά η διάταξη των λείων μυϊκών ινών είναι επιμήκης, εσωτερικά κυκλωτερής και στο μεσαίο στρώμα που εντοπίζονται τα αιμοφόρα αγγεία διαπλέκονται. Η εσωτερική επένδυση της μήτρας (βλεννογόνος) ονομάζεται ενδομήτριο. Το ενδομήτριο αποτελείται από αδενικό επιθήλιο και υπό την επίδραση στεροειδών ορμονών της ωοθήκης υφίσταται κυκλικές, μηνιαίες μεταβολές με απόπτωση του επιφανειακού τμήματος (λειτουργική στοιβάδα) και εκ νέου αναγέννησή του από την εν τω βάθει στοιβάδα. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται έμμηνος ρύση και παρατηρείται από την εφηβεία έως και την εμμηνόπαυση (Ανατομία του γεννητικού συστήματος της γυναίκας- Παναγιώτης Χριστόπουλος).



**Εικόνα 1:** Ανατομία μήτρας (Ανατομία του γεννητικού συστήματος της γυναίκας- Παναγιώτης Χριστόπουλος).

## ΕΜΒΡΥΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΜΗΤΡΑΣ

Στο σχηματισμό και στην ανάπτυξη του γυναικείου γεννητικού συστήματος στα θήλεα έμβρυα, θεμελιώδη ρόλο διαδραματίζουν οι παραμεσονεφρικοί πόροι του Müller. Αποτελούν αμφοτερόπλευρες επιμήκεις εκβλαστήσεις του μεσοθηλίου των πλαγίων επιφανειών του μεσόνεφρου και αναπτύσσονται πλαγίως των γονάδων και των μεσονεφρικών πόρων. Τα άκρα των προαναφερθέντων εκβλαστήσεων συγκλίνουν και συμφύονται δημιουργώντας τους παραμεσονεφρικούς πόρους. Οι μητριάιοι σωλήνες σχηματίζονται από τα κρανιακά τμήματα αυτών των πόρων. Κάθε μητριάιος σωλήνας έχει ένα ανοικτό άκρο που εισέρχεται στην περιτοναϊκή κοιλότητα. Τα άλλα τμήματα των δύο παραμεσονεφρικών πόρων αναπτύσσονται ουραία και παράλληλα με τους μεσονεφρικούς πόρους μέχρι να φθάσουν στην μελλοντική πυελική κοιλότητα του εμβρύου. Πριν από την όγδοη εβδομάδα της κύησης, οι παραμεσονεφρικοί πόροι συγχωνεύονται μεταξύ τους. Το φύμα του Müller, μία προεξοχή που δημιουργείται από τον πρόδρομο μητροκολπικό πόρο, εκτείνεται στο οπίσθιο τοίχωμα του ουρογεννητικού κόλπου. Η σύνδεση των περιτοναϊκών πτυχών, η οποία προκαλείται από τη σύντηξη των παραμεσονεφρικών πόρων έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία του πλατέως συνδέσμου της μήτρας. Ανάμεσα στις στοιβάδες του πλατέως συνδέσμου, πολλαπλασιάζονται τα μεσεγχοματικά κύτταρα και διαφοροποιούνται προς το παραμήτριο, που περιέχει λείες μυϊκές ίνες και χαλαρό συνδετικό ιστό.

Η οργανογένεση της μήτρας περιλαμβάνει: 1) το σχηματισμό και την οργάνωση του στρώματος του ενδομητρίου, 2) τη διαφοροποίηση και ανάπτυξη του μυομητρίου και 3) την ανάπτυξη των ενδομητρικών αδένων, η οποία αρχίζει στην εμβρυϊκή ζωή και ολοκληρώνεται στην εφηβεία.

Το ενδομήτριο επενδύεται από μονόστιβο κυλινδρικό επιθήλιο το οποίο δημιουργεί εγκολπώσεις, κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ζωής. Οι εγκολπώσεις εξελίσσονται στη συνέχεια σε ενδομητρικούς αδένες. Στο νεογνό, οι ενδομητρικοί αδένες είναι σπάνιοι και βρίσκονται μόνο στο επιπολής στρώμα του επιθηλίου. Το ενδομήτριο αναπτύσσεται με αργό ρυθμό από τη γέννηση έως την έναρξη της εφηβείας. Μέχρι την ηλικία των έξι ετών, οι αδένες αναπτύσσονται στο ήμισυ περίπου του ενδομητρίου και η ανάπτυξη ολοκληρώνεται έως την εφηβεία.

## **ΙΣΤΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΜΗΤΡΑΣ**

Το τοίχωμα της μήτρας απαρτίζεται από το μυομήτριο, στο οποίο απαντώνται πυκνά διαπλεκόμενες δεσμίδες λείων μυϊκών ινών, και το ενδομήτριο, το οποίο επενδύει την κοιλότητα της μήτρας.

Το μονόστιβο κυλινδρικό επιθήλιο του ενδομητρίου φέρει κροσσωτά και εκκριτικά κύτταρα, τα οποία επενδύουν τους σωληνοειδείς αδένες της μήτρας που κατανέμονται σε όλο το πάχος του ενδομητρίου. Το χόριο, γνωστό και ως ενδομητρικό στρώμα, φέρει υψηλό αριθμό ινοβλαστών, θεμέλια ουσία και ίνες κολλαγόνου τύπου II. Αποτελείται από δύο διακριτές στιβάδες που διαφέρουν τόσο ιστολογικά όσο και λειτουργικά: Τη βασική στιβάδα, η οποία βρίσκεται σε εν τω βάθει θέση δίπλα στο μυομήτριο και αποτελείται από το στρώμα και το βαθύτερο τμήμα των αδένων και υφίσταται μικρές αλλαγές κατά τη διάρκεια του εμμηνορρυσιακού κύκλου και τη λειτουργική στιβάδα, η οποία περιλαμβάνει ένα πλούσιο σε θεμέλια ουσία στρώμα, το ανώτερο τμήμα των αδένων και το καλυπτικό επιθήλιο το οποίο αποπίπτει κατά τη διάρκεια της εμμήνου ρύσεως (Junqueira LC et al., 5<sup>η</sup> ελληνική έκδοση). Το ενδομήτριο αιματώνεται από τις τοξοειδείς αρτηρίες του μυομητρίου, τις ευθείες αρτηρίες για τη βασική στιβάδα και τις σπειροειδείς αρτηρίες για τη λειτουργική στιβάδα.. Οι σπειροειδείς αρτηρίες διακλαδίζονται διαμορφώνοντας ένα εκτεταμένο επιπολής τριχοειδικό δίκτυο και είναι ευαίσθητες στην προγεστερόνη.

Τα οιστρογόνα και η προγεστερόνη, που εκκρίνονται κατά τη διάρκεια του εμμηνορρυσιακού κύκλου, επιδρούν στους αδένες και στο στρώμα του ενδομητρίου.

Ο σκοπός των κυκλικών αλλαγών στη μορφολογία του ενδομητρίου είναι η παροχή ενός ευνοϊκού περιβάλλοντος για την εμφύτευση του γονιμοποιημένου ωαρίου.

Τα μορφολογικά χαρακτηριστικά που αξιολογούνται από τον παθολογοανατόμο για τον προσδιορισμό της φάσης του κύκλου σε μία διαγνωστική απόξεση ενδομητρίου είναι τα εξής (Mazur MT et al., 2005):

**Πίνακας 1:** Αξιολόγηση μορφολογικών χαρακτηριστικών για τον ορισμό της φάσης του κύκλου.

<b>ΑΔΕΝΕΣ</b>	<b>ΣΤΡΩΜΑ ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΟΥ</b>
Ελίκωση	Οίδημα
Μιτώσεις	Μιτώσεις
Προσανατολισμός πυρήνων	Προφθαρτοειδής μετατροπή
Ενδοαυλικές εκκρίσεις	Διήθηση από κοκκιώδη λεμφοκύτταρα
Υποπυρηνική κενотоπίωση	

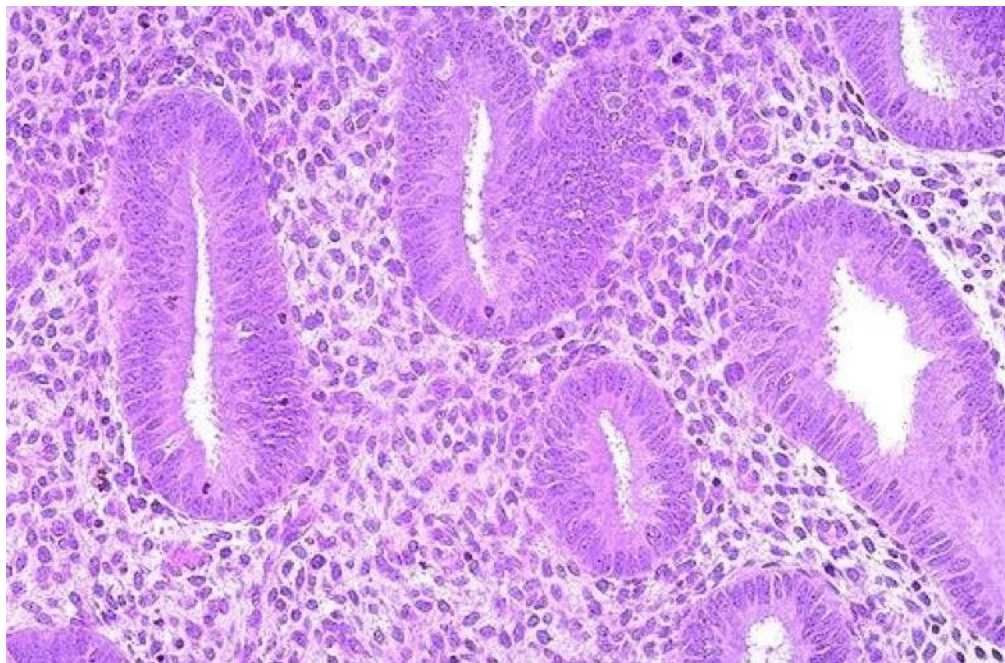
## **ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΕΜΜΗΝΟΡΡΥΣΙΑΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ**

Τα αναπαραγωγικά συστήματα των θήλεων ατόμων, υφίστανται περιοδικές, κυκλικές μεταβολές, που θα μπορούσαν να θεωρηθούν ως προετοιμασία για την ωορρηξία και τη γονιμοποίηση. Αυτός ο κύκλος, γνωστός ως εμμηνορρυσιακός, χαρακτηρίζεται κυρίως από την επαναλαμβανόμενη κοιλιακή αιμορραγία που προκύπτει από την αποβολή του βλεννογόνου της μήτρας (έμμηνος ρύση). Η διάρκεια του κύκλου είναι γνωστό ότι κυμαίνεται κατά μέσο όρο 28 ημέρες, από την αρχή της περιόδου έως την αρχή της επόμενης. Οι ημέρες του κύκλου χαρακτηρίζονται συνήθως με έναν αριθμό, ξεκινώντας από την πρώτη ημέρα της εμμήνου ρύσεως. Αρχίζει στην εφηβεία, στην ηλικία μεταξύ 10 και 16 ετών, και σταματά με την εμμηνόπαυση, στην ηλικία των 51 ετών περίπου (Dhanalakshmi K. et al., 2022).

### **Ωοθυλακική φάση**

Η ωοθυλακική φάση είναι το πρώτο στάδιο του εμμηνορροϊκού κύκλου. Λαμβάνοντας υπόψη έναν μέσο εμμηνορροϊκό κύκλο 28 ημερών, συμβαίνει μεταξύ της 4ης και της 14ης ημέρας. Ταξινομείται στην πρώιμη (4η έως 7η ημέρα), τη μέση (8η έως 10η ημέρα) και την όψιμη (11η έως 14η ημέρα) φάση. Οι διακυμάνσεις κατά

τη διάρκεια της ωοθυλακικής φάσης είναι η αιτία της μεταβαλλόμενης διάρκειας του εμμηνορροϊκού κύκλου. Τα οιστρογόνα και συγκεκριμένα η ορμόνη 17-β-οιστραδιόλη, κυριαρχεί κατά τη διάρκεια αυτής της φάσης. Η ρύθμιση των υποδοχέων της FSH στο ωοθυλάκιο στην αρχή του κύκλου είναι αυτή που προκαλεί την αύξηση αυτής της ορμόνης. Καθώς όμως η ωοθυλακική φάση πλησιάζει προς το τέλος της, τα αυξημένα επίπεδα της 17-οιστραδιόλης στέλνουν στην πρόσθια υπόφυση ένα αναπαραγωγικό σήμα με σκοπό την ανάπτυξη του ενδομητρικού στρώματος της μήτρας. Για να επιτευχθεί αυτό, η 17-β-οιστραδιόλη διεγείρει τον σχηματισμό της ενδομητρικής μήτρας, αυξάνει την ποσότητα του στρώματος και των αδένων και εμβαθύνει τις σπειροειδείς αρτηρίες που τροφοδοτούν το ενδομήτριο. Επιπλέον, το στάδιο αυτό απαιτείται για να δημιουργηθεί ένα περιβάλλον φιλόξενο και δεκτικό για τα πιθανώς εισερχόμενα σπερματοζωάρια. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της 17-β-οιστραδιόλης με το άνοιγμα των καναλιών του τραχήλου της μήτρας που επιτρέπουν την είσοδο του σπέρματος. Τα κανάλια σχηματίζονται μέσα στις άφθονες, ρευστές και ελαστικές μεταβολές του τραχηλικού βλεννογόνου. Ένα αρχέγονο ωοθυλάκιο εξελίσσεται σε Γραφιανό ωοθυλάκιο κατά τη διάρκεια αυτού του σταδίου. Το Γραφιανό ωοθυλάκιο αναπτύσσεται καθώς τα γύρω ωοθυλάκια αρχίζουν να εκφυλίζονται, προετοιμάζοντας το ωοθυλάκιο για την ωορρηξία (Junqueira LC et al., Mazur MT et al., 2005).



*Εικόνα 2: Παραγωγική φάση ενδομητρίου (Mazur MT, 2005).*



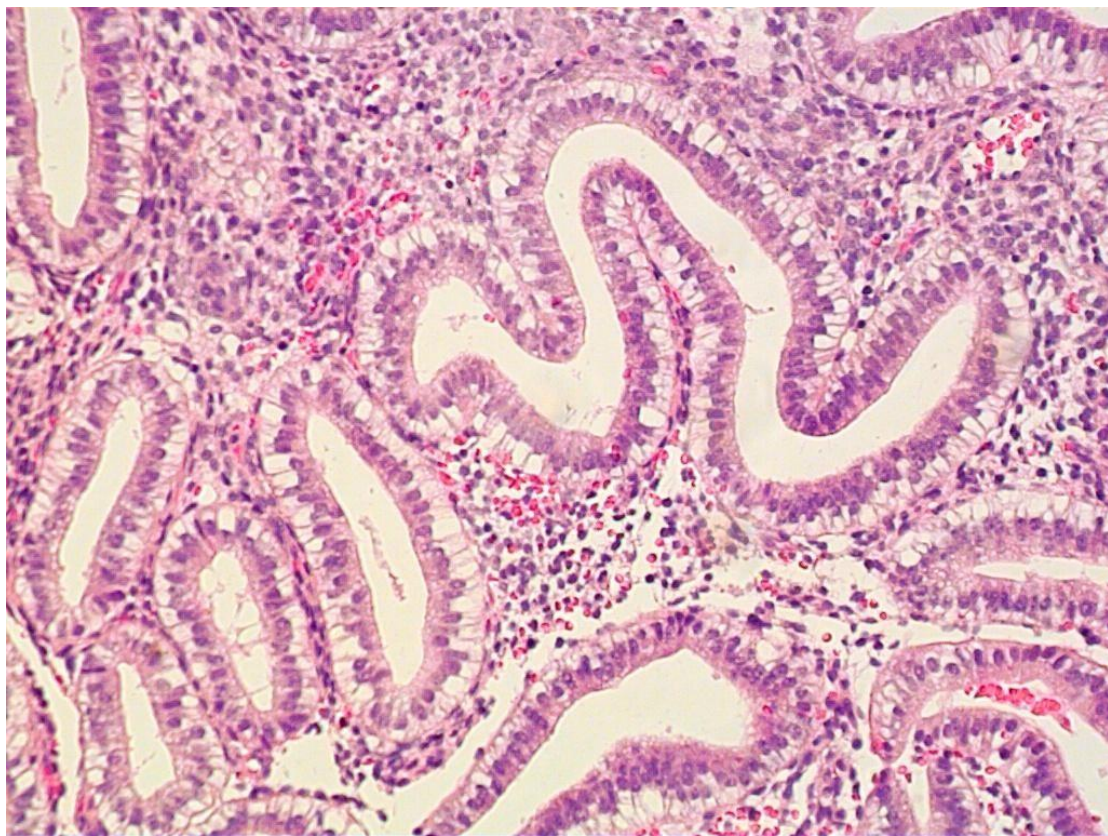
## **Ωορρηξία**

Η ωορρηξία λαμβάνει χώρα την 14η ημέρα ενός τυπικού κύκλου 28 ημερών. Στο τέλος της ωοθυλακικής φάσης, τα επίπεδα της 17-β-οιστραδιόλης είναι υψηλά επειδή τα ωοθυλάκια είναι ώριμα και υπάρχει αυξημένη σύνθεση ορμονών. Μόνο κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου η 17-β-οιστραδιόλη μπορεί να προκαλέσει την παραγωγή FSH και LH, με την προϋπόθεση να υπάρχουν τουλάχιστον 200 πικογραμμάρια 17-β-οιστραδιόλης ανά χιλιοστόλιτρο πλάσματος. Τα αυξημένα επίπεδα της LH και της FSH που υπάρχουν αυτή τη στιγμή αναφέρονται ως κύμα LH. Ως αποτέλεσμα, το ώριμο ωοθυλάκιο σπάει, απελευθερώνοντας ένα ωάριο. Δεδομένου ότι τα επίπεδα της 17-β-οιστραδιόλης μειώνονται μετά την ολοκλήρωση της ωορρηξίας, ο τράχηλος της μήτρας υφίσταται πρόσθετες αλλαγές που επιτρέπουν ένα διευρυμένο, πιο ρευστό τραχηλικό βλεννογόνο για να φιλοξενήσει καλύτερα το μελλοντικό σπέρμα (Junqueira LC et al., Mazur MT et al., 2005).

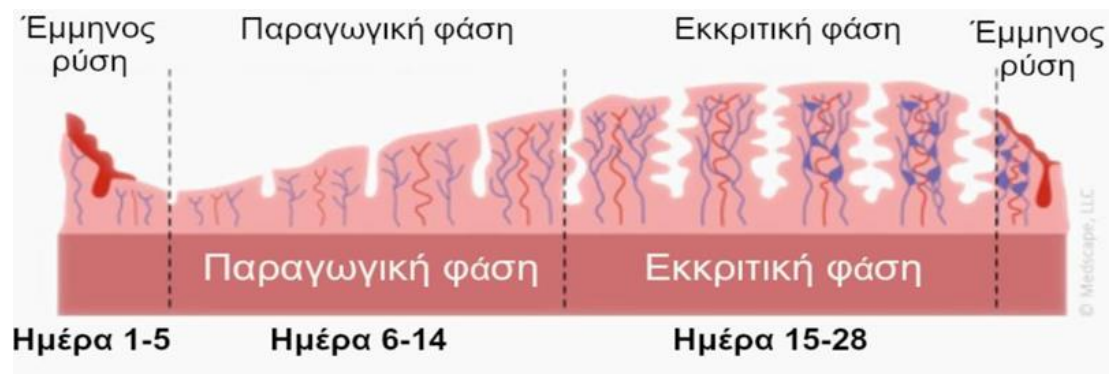
## **Ωχρινική-Εκκριτική φάση**

Σε έναν τυπικό κύκλο 28 ημερών, η ωχρινική φάση διαρκεί από την 14η έως την 28η ημέρα. Η κύρια ορμόνη στη φάση αυτή είναι η διεγερμένη από την LH προγεστερόνη, η οποία προετοιμάζει το ωχρό σωμάτιο και το ενδομήτριο για την πιθανή εμφύτευση ενός γονιμοποιημένου ωαρίου. Η προγεστερόνη θα δώσει στην πρόσθια υπόφυση αρνητική ανατροφοδότηση όταν η ωχρινική φάση ολοκληρώνεται, προκαλώντας την πτώση των επιπέδων της FSH και της LH, ακολουθούμενη από τα επίπεδα της 17-β-οιστραδιόλης και της προγεστερόνης. Για τη δημιουργία της 17-β-οιστραδιόλης και της προγεστερόνης, οι οποίες επικρατούν τελικά λόγω του μηχανισμού αρνητικής ανατροφοδότησης, το ωχρό σωμάτιο σχηματίζεται στην ωοθήκη τη στιγμή της ρήξης του ώριμου ωοθυλακίου. Το ενδομήτριο προετοιμάζεται με την επέκταση της αγγειακής παροχής του ενδομητρίου και την προώθηση μεγαλύτερων βλεννογονικών εκκρίσεων. Η προγεστερόνη διεγείρει το ενδομήτριο προκειμένου να επιβραδύνει τον πολλαπλασιασμό του ενδομητρίου, να μειώσει το πάχος του βλεννογόνου, να δημιουργήσει πιο περίπλοκους αδένες, να αποθηκεύσει γλυκογόνο ως ενέργεια και να αυξήσει την επιφάνεια εντός των σπειροειδών αρτηριών. Η προγεστερόνη καθιστά παχύτερο τον τραχηλικό βλεννογόνο, καθιστώντας τον μη ελαστικό, καθώς η περίοδος γονιμοποίησης έχει παρέλθει και η είσοδος του σπέρματος δεν αποτελεί πλέον προτεραιότητα, σε αντίθεση με τις μεταβολές του τραχηλικού βλεννογόνου που παρατηρούνται κατά τη διάρκεια της πολλαπλασιαστικής φάσης και

της ωορρηξίας. Επιπλέον, η προγεστερόνη αυξάνει τη θερμοκρασία του υποθαλάμου, προκαλώντας αύξηση της θερμοκρασίας του σώματος κατά τη διάρκεια της ωχρινικής φάσης. Το ωχρό σωματίο ελέγχει τα επίπεδα της 17-β-οιστραδιόλης και της προγεστερόνης στο πλάσμα κοντά στην ολοκλήρωση της εκκριτικής φάσης. Σε περίπτωση εγκυμοσύνης, το ωχρό σωματίο θα παραμείνει και θα συνεχίσει να ρυθμίζει τα επίπεδα των ορμονών όταν ένα γονιμοποιημένο ωάριο εμφυτεύει μέσα στο ενδομήτριο. Ωστόσο, το ωχρό σωματίο υποχωρεί και τα επίπεδα της 17-β-οιστραδιόλης και της προγεστερόνης στον ορό πέφτουν γρήγορα, εάν δεν εμφυτεύει ένα γονιμοποιημένο ωάριο (Bart C, Sundeep K., 2010).



**Εικόνα 3:** Εκκριτική φάση ενδομητρίου με ελικοειδείς αδένες και υποπηρυνική κενοτοπίωση αδενικών κυττάρων (Mazur et al., 2005).



Εικόνα 4: Στάδια του εμμηνορρυσιακού κύκλου (Εμμηνορρύση: Αλμαλόγλου Κωνσταντίνος)

## ΥΠΕΡΠΛΑΣΙΑ ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΟΥ

Η υπερπλασία του ενδομητρίου αναφέρεται σε ένα σύνολο μορφολογικών αλλαγών στο ενδομήτριο που προκαλούνται από ανώμαλες κυρίως ορμονικές δράσεις και παρουσιάζουν καλοήγη έως και προνεοπλασματική βιολογική συμπεριφορά (Kurman RJ et al., 2014). Πρόκειται για μία σχετικά διαδεδομένη νόσο, με 150.000-200.000 νέες περιπτώσεις να καταγράφονται ετησίως στα κράτη του δυτικού ημισφαιρίου. Παρατηρείται συχνότερα σε γυναίκες στην περιεμμηνόπαυση, ωστόσο δύναται να εμφανιστεί και σε νεότερες γυναίκες.

Η υπερπλασία του ενδομητρίου είναι αποτέλεσμα της χρόνιας έκθεσης σε οιστρογόνα σε συνδυασμό με σχετική έλλειψη προγεστερόνης. Τα αίτια της περίσσειας οιστρογόνων μπορεί να είναι ενδογενή ή εξωγενή. Οι παράγοντες κινδύνου που σχετίζονται με την υπερπλασία του ενδομητρίου είναι οι ακόλουθοι (Singh G et al., 2023):

1. Η ηλικία
2. Η μητρότητα
3. Η παχυσαρκία
4. Η γενετική προδιάθεση
5. Ο σακχαρώδης διαβήτης
6. Οι ανώμαλοι κύκλοι - PCOS, περιεμμηνόπαυση
7. Οι όγκοι των ωοθηκών - όγκοι των κοκκωδών κυττάρων
8. Η θεραπεία ορμονικής υποκατάστασης- η θεραπεία μόνο με οιστρογόνα μπορεί να οδηγήσει σε υπερπλασία του ενδομητρίου και αντενδείκνυται σε γυναίκες με μήτρα. Τα σκευάσματα που χορηγούνται χωρίς ιατρική συνταγή/φυτικά σκευάσματα μπορεί να έχουν υψηλή ποσότητα οιστρογόνων.

9. Η ανοσοκαταστολή (λήψη νεφρικού μοσχεύματος) και η λοίμωξη ενδέχεται να εμπλέκονται στην ανάπτυξη υπερπλασίας του ενδομητρίου.
10. Ο κληρονομικός μη πολυποδισιακός καρκίνος του παχέος εντέρου ή σύνδρομο Lynch - οι γυναίκες διατρέχουν εξαιρετικά υψηλό κίνδυνο υπερπλασίας του ενδομητρίου.

Η υπερπλασία του ενδομητρίου έχει κατηγοριοποιηθεί χρησιμοποιώντας τρεις διαφορετικές θεμελιώδεις προσεγγίσεις. Αυτές καθορίστηκαν με βάση τα ιστολογικά χαρακτηριστικά της βλάβης και την τάση της να γίνει κακοήθης. Το 1994, ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (ΠΟΥ) προέβη σε μία ταξινόμηση που αναγνωρίστηκε παγκοσμίως. Βασίστηκε στην έρευνα των Kurman και συνεργατών, οι οποίοι διεξήγαγαν μία αναδρομική μελέτη 170 γυναικών με ποικίλου βαθμού υπερπλασία (πολύπλοκη αρχιτεκτονική και ασυνήθιστα χαρακτηριστικά) (Singh G et al., 2023). Η παρακολούθηση των γυναικών αυτών για διάμεσο διάστημα 13 ετών αποκάλυψε ποικίλα ποσοστά εξέλιξης του καρκίνου του ενδομητρίου. Οι τέσσερις κύριες κατηγορίες είναι οι ακόλουθες:

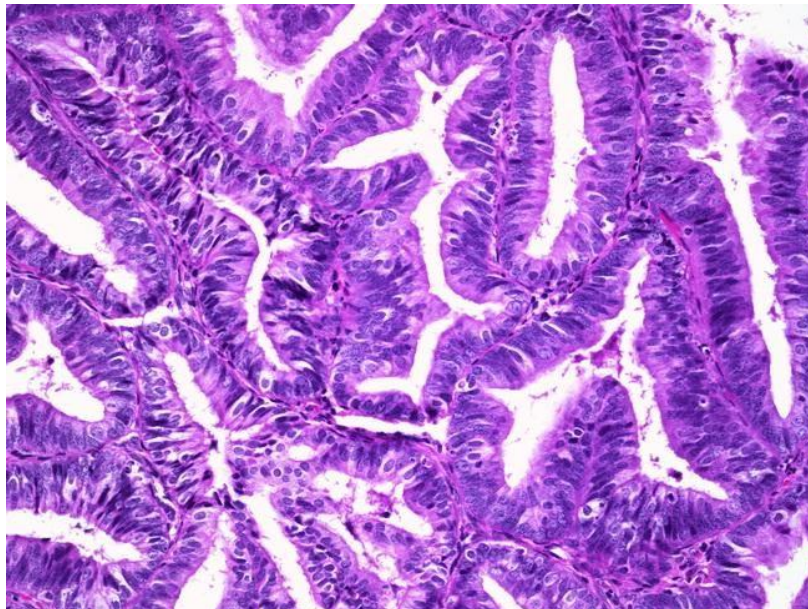
1. **Απλή υπερπλασία χωρίς ατυπία:** ο αριθμός των αδένων αυξανόταν, αλλά η συνήθης αρχιτεκτονική δεν διακυβεύονταν- ποσοστό εξέλιξης σε καρκίνο 1%.
2. **Απλή υπερπλασία με ατυπία:** απλή υπερπλασία με χαρακτηριστικά πυρηνικής ατυπίας (έντονη διαφοροποίηση του σχήματος και του μεγέθους των πυρήνων και εμφανή πυρήνια)- ποσοστό εξέλιξης σε καρκίνο 8%.
3. **Σύνθετη υπερπλασία χωρίς ατυπία:** οι αδένες γίνονται πιο πολυπληθείς και ακανόνιστοι- ποσοστό εξέλιξης σε καρκίνο 3%.
4. **Σύνθετη υπερπλασία με ατυπία:** σύνθετη υπερπλασία με άτυπα χαρακτηριστικά, ποσοστό εξέλιξης σε καρκίνο 29%.



Τα τελευταία χρόνια, οι όροι ενδομητρική υπερπλασία (ΕΥ) και ενδομητρική ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία (ΕΕΝ) έχουν αρχίσει να αντικαθιστούν την προαναφερθείσα ταξινόμηση, καθώς πιστεύεται ότι η ταξινόμηση του ΠΟΥ δεν αντικατοπτρίζει με ακρίβεια τη βιολογική συμπεριφορά της υπερπλασίας και παρουσιάζει υψηλά ποσοστά ασυμφωνίας μεταξύ των παρατηρητών.



**Εικόνα 5:** Απλή υπερπλασία χωρίς ατυπία (Salim et al., 2011).

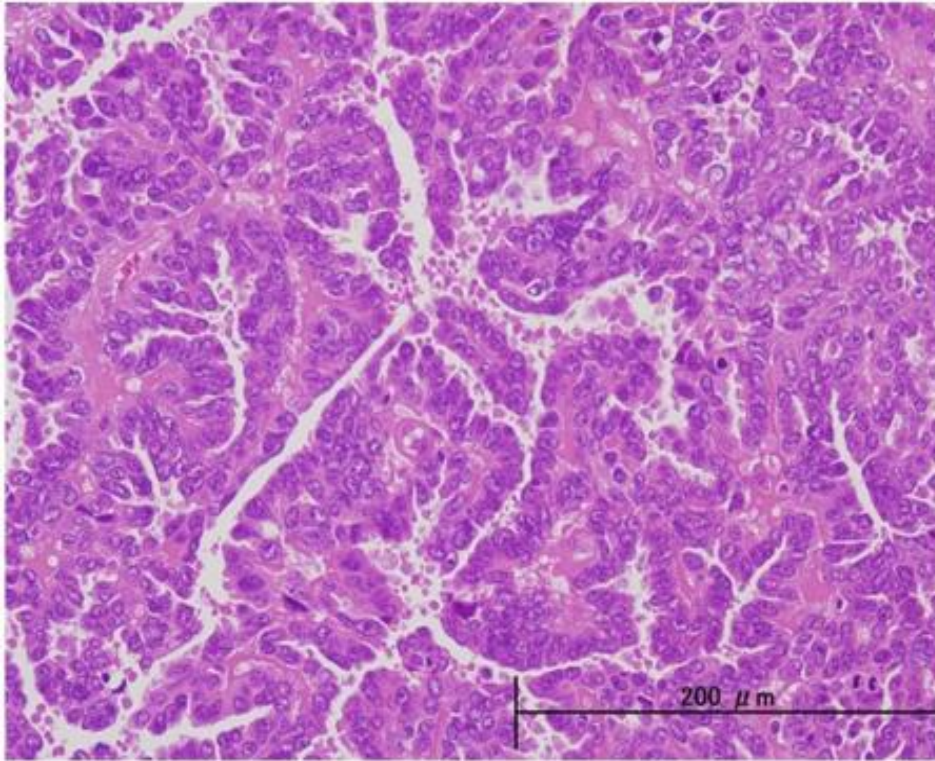


**Εικόνα 6:** Ατυπη υπερπλασία ενδομητρίου (Salim et al., 2011).

## ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΟΥ

Ο καρκίνος του ενδομητρίου είναι ο συχνότερος γυναικολογικός καρκίνος και αποτελεί την τέταρτη συχνότερη κακοήθεια των γυναικών στις αναπτυγμένες χώρες. Η συχνότητα εμφάνισης και η θνησιμότητα παρουσιάζουν αυξητική τάση (Gaber C. et al., 2016). Απαντάται κατά κανόνα σε γυναίκες ηλικίας >50 ετών, ωστόσο είναι πιθανό να εμφανιστεί και σε γυναίκες μικρότερης ηλικίας (ποσοστό 25%) (Shen Y et al., 2023). Σήμερα, ο αριθμός των περιπτώσεων με καρκίνο του ενδομητρίου αυξάνεται ετησίως και η εντόπιση μετατοπίζεται σε μικρότερη ηλικία (Kucuk A et al., 2022). Στους παράγοντες κινδύνου συγκαταλέγονται η ηλικία, η παχυσαρκία, η υπέρταση, ο διαβήτης, η έκθεση σε οιστρογόνα, η ανεπαρκής ποσότητα προγεστερόνης, η πρόωμη εμμηνόρροια ή ακόμη και η καθυστερημένη έναρξη της εμμηνόπαυσης. Επιπροσθέτως, στους ενοχοποιητικούς παράγοντες συγκαταλέγεται το σύνδρομο Lynch, οι πολυκυστικές ωοθήκες και η υπερπλασία του ενδομητρίου (Dedeurwaerdere F et al., 2021, Guo YE et al., 2022).

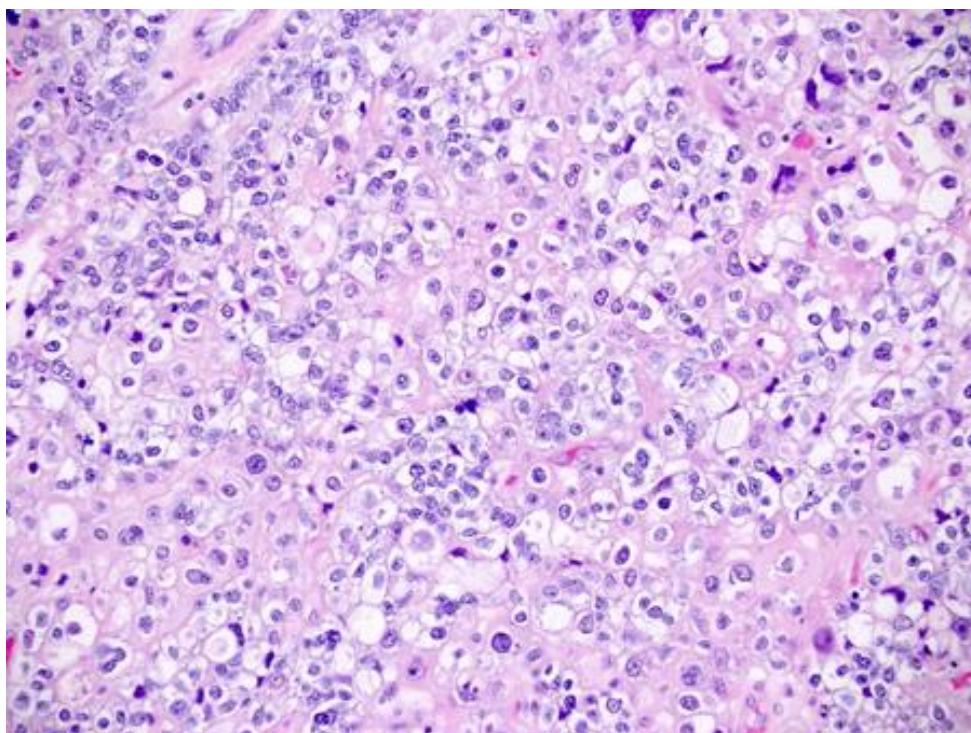
Οι καρκίνοι του ενδομητρίου έχουν ταξινομηθεί ευρέως σε δύο κύριες κατηγορίες. Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν οι όγκοι τύπου I ή ενδομητριοειδείς (60-70% των περιπτώσεων καρκίνου του ενδομητρίου), οι οποίοι έχουν συνδεθεί με την περίσσεια οιστρογόνων, την παχυσαρκία, την υπερλιπιδαιμία, το διαβήτη και εμφανίζονται συχνότερα σε ηλικία άνω των 50 ετών. Ιστολογικά, οι όγκοι τύπου I συνήθως παρουσιάζουν καλή ή μέτρια διαφοροποίηση (Εικόνα 7). Η κλινική εικόνα περιλαμβάνει την υπερπλασία του ενδομητρίου και οι ασθενείς παρουσιάζουν μία πιο ευνοϊκή πρόγνωση σε σύγκριση με τους όγκους του ενδομητρίου τύπου II ή μη ενδομητριοειδείς (30-40% περιπτώσεων καρκίνου του ενδομητρίου), οι οποίοι αποτελούν τη δεύτερη κύρια κατηγορία (Murali R et al., 2014).



*Εικόνα 7: Καρκίνωμα ενδομητρίου τύπου I (Nakayama K et al., 2012)*

Οι μη ενδομητριοειδείς όγκοι τύπου II εμφανίζονται συχνότερα σε γυναίκες μικρότερης ηλικίας, μη παχύσαρκες γυναίκες, χαρακτηρίζονται από υψηλό μεταστατικό δυναμικό και η πρόγνωση των ασθενών είναι πιο δυσμενής. Τα ενδομητριοειδή καρκινώματα τύπου II διαγιγνώσκονται συνήθως σε προχωρημένο στάδιο, παρουσιάζουν επιθετική συμπεριφορά και έχουν φτωχή πρόγνωση (Εικόνα 8). Είναι συνήθως ορώδη ή διαυγοκυτταρικά και δε σχετίζονται με υψηλά επίπεδα οιστρογόνων ή προγεστερόνης (Murali R et al., 2014).





**Εικόνα 8:** Καρκίνωμα ενδομητρίου τύπου II. (Bogani G et al., 2022).

## **ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΟΥ ΤΥΠΟΥ I**

Το βλεννώδες και το ενδομητριοειδές αδενοκαρκίνωμα, καθώς και οι υποομάδες τους, εντάσσονται στα ενδομητριοειδή καρκινώματα τύπου I. Αυτοί οι όγκοι εμφανίζονται συχνότερα σε γυναίκες με μεγαλύτερο ποσοστό οιστρογόνων ή βρίσκονται το στάδιο της περιεμμηνόπαυσης και είτε συνυπάρχουν με τα στάδια της άτυπης υπερπλασίας είτε εξελίσσονται μέσω αυτών. Συχνά έχουν σταθερή βιολογική συμπεριφορά, μέτριο βαθμό κακοήθειας και επιφανειακή διήθηση στο μυομήτριο. Οι μεταλλάξεις των γονιδίων *PTEN*, *PIK3CA* και *KRAS*, η συσσώρευση β-κατενίνης στους πυρήνες των κυττάρων και η μικροδορυφορική αστάθεια είναι από τις πιο χαρακτηριστικές γενετικές αλλαγές σε αυτή την κατηγορία καρκινωμάτων (Lliobet D et al., 2009).

Σε ότι αφορά τη μικροδορυφορική αστάθεια, αν και παρατηρείται συχνότερα στα άτομα με κληρονομικό μη πολυποδισιακό καρκίνωμα του παχέος εντέρου ή του ενδομητρίου (HNPCC), εμφανίζεται εξίσου και σε μη κληρονομικές μορφές καρκίνου του ενδομητρίου. Κληρονομικές μεταλλάξεις στα γονίδια που κωδικοποιούν τις MLH-1, MSH-2, MSH-6 ή PMS-2 πρωτεΐνες είναι παρούσες σε ασθενείς με HNPCC. Ωστόσο, για να εκδηλωθεί καρκίνος του ενδομητρίου, θα πρέπει τα αλληλόμορφα *MLH-1*, *MSH-2* και *MSH-6* και *PMS-2*, να υποστούν μεταλλάξεις ή να εκλείψουν. Στον



μη κληρονομικό καρκίνο του ενδομητρίου, η αδρανοποίηση του *MLH-1* μέσω της υπερμεθυλίωσης του υποκινητή, η οποία συχνά λαμβάνει χώρα στο στάδιο της άτυπης υπερπλασίας, είναι η κύρια πηγή ανεπάρκειας του μηχανισμού επιδιόρθωσης. Συνεπώς, η υπερμεθυλίωση του *MLH-1* γονιδίου αποτελεί πρώιμο μοριακό γεγονός στην παθογένεση του ενδομητρικού καρκινώματος τύπου I και προηγείται της μικροδορυφορικής αστάθειας. Πρόσφατες μελέτες έχουν αποδείξει ότι τα ενδομητριοειδή καρκινώματα που παρουσιάζουν μικροδορυφορική αστάθεια, παρουσιάζουν αυξημένη διήθηση από κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος συγκριτικά με τα μικροδορυφορικά σταθερά καρκινώματα. Η κληρονομική ή σποραδική μορφή του ενδομητριοειδούς καρκινώματος καθορίζει την πιθανή ανταπόκρισή του στην ανοσοθεραπεία (Pakish JB et al., 2017).

Πολυάριθμες νεοπλασίες έχουν αναφερθεί ότι περιέχουν μεταλλάξεις του γονιδίου *PIK3CA*, το οποίο κωδικοποιεί την καταλυτική υπομονάδα p110α της φωσφατιδυλο-3-κινάσης (PI3K). Οι συγκεκριμένες μεταλλάξεις μπορεί να διαδραματίζουν ρόλο στην τροποποίηση της σηματοδοτικής οδού PI3K/AKT στον καρκίνο του ενδομητρίου. Η PI3K είναι ένα ετεροδιμερές ένζυμο, αποτελούμενο από τη ρυθμιστική (p85) και την καταλυτική υπομονάδα (p110). Η καταλυτική υπομονάδα p100 της PI3K κωδικοποιείται από το γονίδιο *PIK3CA*, το οποίο βρίσκεται στο χρωμόσωμα 3q26.32. Στα εξώνια 9 και 20 του *PIK3CA* γονιδίου εντοπίζονται οι περισσότερες μεταλλάξεις. Στα καρκινώματα του ενδομητρίου, οι μεταλλάξεις του *PIK3CA* φαίνεται να είναι συχνές και συγκεκριμένες μεταλλάξεις στο εξώνιο 9 συνδέονται με μικρότερο ποσοστό επιβίωσης (Mjos S et al., 2017).

Το σηματοδοτικό μονοπάτι RAS-RAF-MEK-ERK είναι ζωτικής σημασίας για την ανάπτυξη του όγκου. Η μικροδορυφορική αστάθεια στα καρκινώματα του ενδομητρίου φαίνεται να σχετίζεται με αυξημένη συχνότητα μεταλλάξεων του *KRAS* γονιδίου. Η ενεργοποίηση της πρωτεΐνης RAS συνδέεται με αυξημένη κυτταρική επιβίωση και πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Σπανιότερα, το *BRAF*, ένα άλλο γονίδιο που συμμετέχει στο σηματοδοτικό μονοπάτι RAS-RAF-MEK-ERK, φέρει μεταλλάξεις στα καρκινώματα του ενδομητρίου. Το ανασταλτικό σήμα για την κυτταρική ανάπτυξη που έχουν οι τροποποιητές του RAS, όπως ο RASSF1A, ο οποίος πρέπει να αδρανοποιηθεί κατά τη διάρκεια της καρκινογένεσης. Επιπλέον, τα καρκινώματα του ενδομητρίου που φέρουν *KRAS* μεταλλάξεις εκφράζουν περισσότερους υποδοχείς οιστρογόνων και αντιδρούν στην αναστολή της MEK. Η αναστολή της MEK μαζί με αντι-οιστρογονική φαρμακευτική αγωγή μπορεί να ωφελήσει αυτές τις ασθενείς (με *KRAS* μεταλλάξεις)

(Ring KL et al., 2017). Στο χρωμόσωμα 3p21 βρίσκεται το γονίδιο της β-κατενίνης (*CTNNB1*). Η E-καντχερίνη και η πρωτεΐνη APC εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από την κατενίνη για την ορθή λειτουργία τους. Αποτελεί συστατικό του συμπλέγματος E-καντχερίνης-κατενίνης, η οποία είναι ζωτικής σημασίας για τη διατήρηση της υγιούς αρχιτεκτονικής των ιστών και την προώθηση της κυτταρικής διαφοροποίησης. Η β-κατενίνη είναι επίσης ζωτικής σημασίας για την κυτταρική σηματοδότηση. Το σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt/β-κατενίνη/LEF/Tcf ενεργοποιείται από τις αυξημένες ποσότητες κατενίνης στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα του κυττάρου. Οι μεταλλάξεις στο εξώνιο 3 της β-κατενίνης έχουν ως αποτέλεσμα τη σταθεροποίηση της πρωτεΐνης, τη συσσώρευση στο κυτταρόπλασμα και τον πυρήνα και την ενεργοποίηση της μεταγραφής γονιδίων στόχων που εμπλέκονται στην καρκινογένεση. Μεταλλάξεις του γονιδίου που κωδικοποιεί την β-κατενίνη αναφέρονται σε υπερπλασίες του ενδομητρίου με πλακώδη μετάπλαση. Σε μελέτη το 2017 αναφέρεται η αντιμετώπιση ενδομητριοειδούς καρκινώματος τύπου I μέσω στόχευσης της σηματοδοτικής οδού Wnt/β-κατενίνης/LEF/Tcf (Wang ZM et al., 2017). Το ογκοκατασταλτικό γονίδιο *PTEN* παίζει, επίσης, σημαντικό ρόλο στην καρκινογένεση του ενδομητρικού καρκινώματος.

## **ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΟΥ ΤΥΠΟΥ II**

Τα τύπου II νεοπλάσματα είναι πιο επιθετικά και δεν παρουσιάζουν οιστρογονική δράση. Παρατηρούνται συνήθως σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες μεγαλύτερης ηλικίας. Πρόκειται για ορώδεις κυρίως όγκους. Πρόκειται για εξαιρετικά επικίνδυνους όγκους που συχνά επεκτείνονται αρκετά μέσα στο μυομήτριο. Το γενετικό προφίλ των όγκων αυτών χαρακτηρίζεται από διαταραχές των γονιδίων *p53*, *HER2/neu*, *p16* και E-καντχερίνης, καθώς και από απώλεια ετεροζυγωτίας σε πολυάριθμους γενετικούς τόπους, γεγονός που προκαλεί χρωμοσωμική αστάθεια (Llobet D et al., 2009).

Όταν το DNA υποστεί βλάβη, η πρωτεΐνη *p53* προκαλεί κυτταρικό θάνατο ή σταματά τον κυτταρικό κύκλο. Η ικανότητα του κυττάρου να διορθώνει βλάβες στο DNA πριν από την είσοδο στη φάση S περιορίζεται παρουσία μεταλλάξεων του *TP53* γονιδίου, οι οποίες παρατηρούνται στο 88% των καρκινωμάτων τύπου II και μόλις στο 15% των αδενοκαρκινωμάτων του ενδομητρίου, αυξάνοντας την πιθανότητα οι μεταλλάξεις να μεταφερθούν στο γονιδίωμα του κυττάρου και να εμφανιστούν σε επόμενες γενεές κυττάρων (Schultheis AM et al., 2016). Η χρωμοσωμική αστάθεια

είναι το επικρατέστερο μοριακό χαρακτηριστικό των μη ενδομητριοειδών καρκινωμάτων του ενδομητρίου. Στο φαινόμενο αυτό παρατηρείται ανευλοειδία, η οποία χαρακτηρίζεται από σημαντική απώλεια ή προσθήκη χρωμοσωμάτων. Αρκετά γονίδια (*STK-15*, *BUB1* και *CCNB2*) που εμπλέκονται στον έλεγχο των ελεγκτικών μηχανισμών του κυτταρικού κύκλου ενισχύονται στον καρκίνο του ενδομητρίου τύπου II. Ένα από αυτά, το *STK-15*, είναι συχνά αυξημένο σε μη ενδομητριακά καρκινώματα και είναι ζωτικής σημασίας για τον διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων και τη λειτουργία του κεντροσώματος. Επιπλέον, τα T-λεμφοκύτταρα του περιφερικού αίματος των ασθενών με καρκίνο του ενδομητρίου παρουσιάζουν χρωμοσωμική αστάθεια και εμφανίζουν σημαντικές χρωμοσωμικές αλλοιώσεις (Nesina IP et al., 2014). Η *p16* αποτελεί ρυθμιστή του κυτταρικού κύκλου. Η αδρανοποίησή της παρατηρείται στο 40% των ενδομητρικών καρκινωμάτων τύπου II και φαίνεται ότι προκαλείται από απαλοιφή ή υπερμεθυλίωση του αντίστοιχου υποκινητή. Σημαντική είναι, επίσης, η αυξημένη ανοσοέκφραση του *p16* στα κύτταρα του στρώματος του ενδομητρίου πέριξ του καρκινώματος, εύρημα που πιθανώς να σχετίζεται με πιο επιθετική βιολογική συμπεριφορά (Yoon G., 2017). Η έλλειψη της E-καντχερίνης είναι επίσης συχνή στο καρκίνωμα τύπου II και προκαλείται από υπερμεθυλίωση του υποκινητή ή από απώλεια της ετεροζυγωτίας. Η απώλεια της ετεροζυγωτίας του χρωμοσώματος 16q22.1 παρατηρείται στο 60% των μη-ενδομητριοειδών καρκινωμάτων, ενώ η υπερέκφραση του *ERBB2* εμφανίζεται στο 43% των καρκινωμάτων αυτών.

## **ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΟΕΙΔΕΣ ΑΔΕΝΟΚΑΡΚΙΝΩΜΑ**

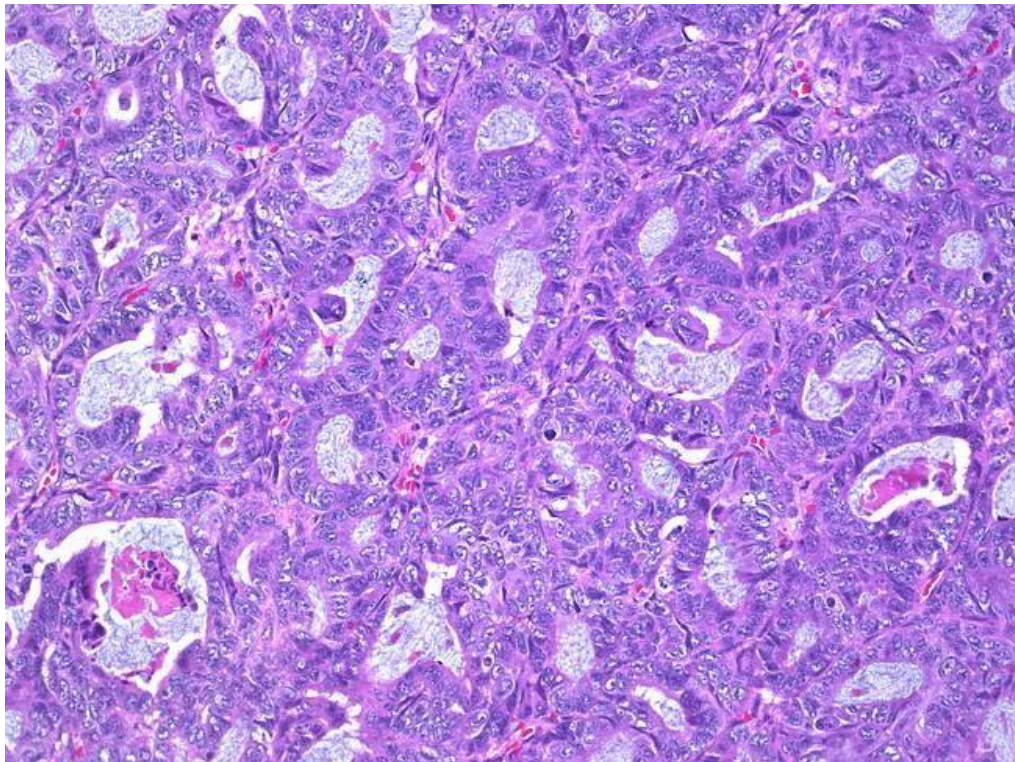
Το αδενοκαρκίνωμα του ενδομητρίου είναι μια μορφή καρκίνου που αναπτύσσεται συνήθως στην ωθήκη ή στο ενδομήτριο. Το αδενοκαρκίνωμα του ενδομητρίου έχει συχνά καλή πρόγνωση, αναπτύσσεται αργά και είναι θεραπεύσιμο. Ακόμη, θεωρείται η πιο διαδεδομένη μορφή καρκίνου του ενδομητρίου.

Περίπου το 80% των κακοήθων νεοπλασματικών όγκων του ενδομητρίου εντάσσονται σε αυτή την κατηγορία. Αυτοί οι όγκοι χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες βάσει της FIGO (Διεθνής Ομοσπονδία Γυναικολογίας και Μαιευτικής): υψηλής διαφοροποίησης (βαθμός 1), μέτριας διαφοροποίησης (βαθμός 2) και χαμηλής διαφοροποίησης (βαθμός 3) (Kurman RJ et al., 2014). Η διείσδυση στο μυομήτριο και τον τράχηλο της μήτρας είναι ο τρόπος εξάπλωσης. Ο εντοπισμός της διήθησης του

στρώματος του ενδομητρίου αποτελεί τη βάση για τη διάγνωση του καλώς διαφοροποιημένου καρκίνου του ενδομητρίου και υπάρχουν τρία βασικά κριτήρια για να επιτευχθεί αυτό:

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

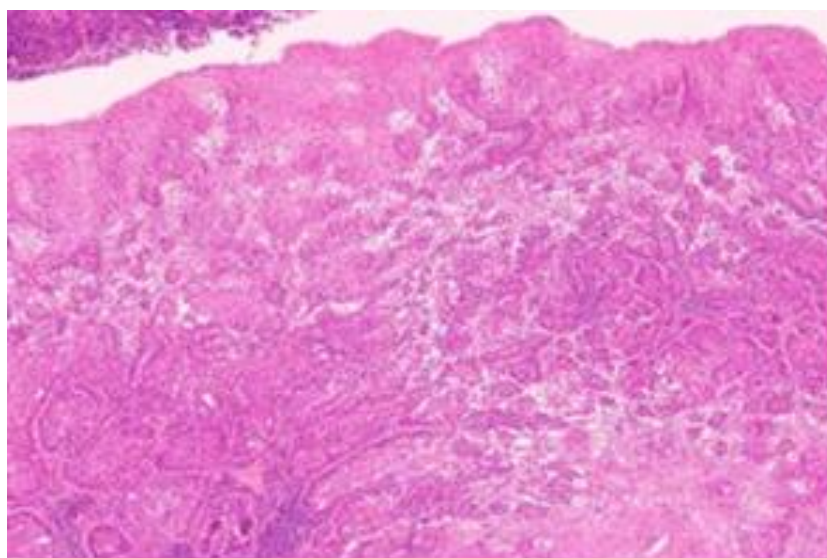
Το ενδομητριοειδές αδενοκαρκίνωμα μπορεί να εμφανίσει ποικίλες μορφολογικές παραλλαγές, συμπεριλαμβανομένης της πλακώδους διαφοροποίησης, του λαχνοαδενικού προτύπου, εκκριτικών χαρακτηριστικών και βλεννώδους μετάπλασης. Αυτές οι μορφολογικές μεταβολές δεν σχετίζονται με διαφοροποιήσεις στην πρόγνωση της νόσου (Mazur et al., 2005- Longacre et al., 1995).



**Εικόνα 9:** Ενδομητριοειδές αδενοκαρκίνωμα βαθμού I (Kurman RJ et al., 2014).

## **ΠΛΑΚΩΔΗΣ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ**

Ένα από τα τυπικά ευρήματα είναι η πλακώδης διαφοροποίηση, η οποία παρατηρείται στο 50% των αδενοκαρκινωμάτων του ενδομητρίου. Αδενοακάνθωμα ή αδеноπλακώδες καρκίνωμα ήταν οι όροι που χρησιμοποιούνταν παλαιότερα για να περιγράψουν τα καρκινώματα του ενδομητρίου με πλακώδη διαφοροποίηση, ανάλογα με τον βαθμό διαφοροποίησης του πλακώδους στοιχείου (Zaino RJ et al., 1991). Ο επικρατέστερος όρος σήμερα είναι ενδομητριοειδές αδενοκαρκίνωμα με πλακώδη διαφοροποίηση, χωρίς να γίνεται διάκριση ως προς το επίπεδο διαφοροποίησης του πλακώδους στοιχείου. Η πρόγνωση του ενδομητριοειδούς αδενοκαρκινώματος με ή χωρίς πλακώδη χαρακτηριστικά δεν φαίνεται να διαφέρει. Τα ενδομητριοειδή καρκινώματα με πλακώδη διαφοροποίηση διαβαθμίζονται πλέον αποκλειστικά με βάση την εμφάνιση του αδενικού τμήματος (Zaino RJ, 1998).



*Εικόνα 10: Απεικόνιση ενδομητριοειδούς αδενοκαρκινώματος με πλακώδη διαφοροποίηση*

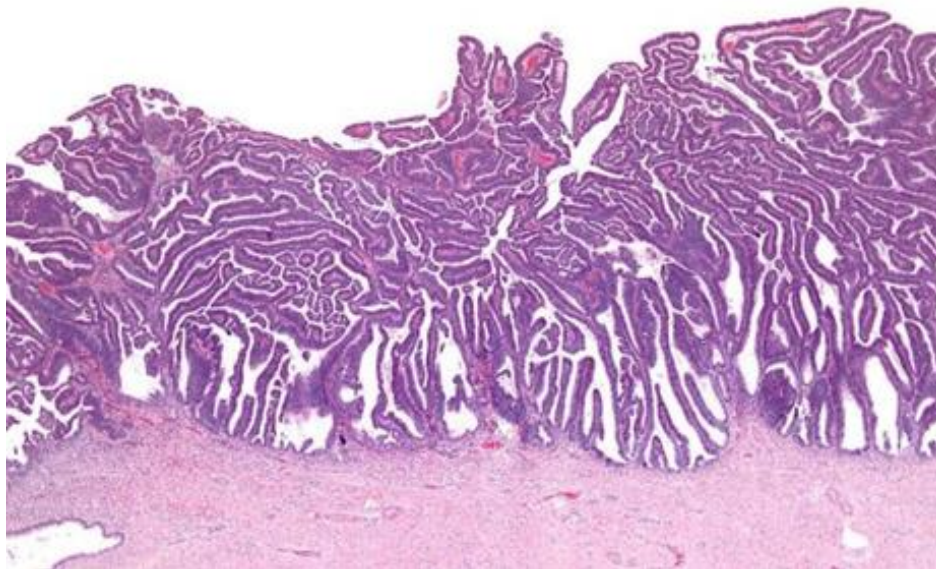
*(Akizawa et al., 2020).*

## **ΛΑΧΝΟΑΔΕΝΙΚΟ ΠΡΟΤΥΠΟ**

Το καρκίνωμα του ενδομητρίου με λαχνοαδενικό πρότυπο (Villoglandular Adenocarcinoma-VGA), η δεύτερη πιο συχνή παραλλαγή του ενδομητριοειδούς αδενοκαρκινώματος, εμφανίζεται σε ποσοστό της τάξης του 15%-30% των περιπτώσεων (Parkash V et al., 1997). Συχνά συνυπάρχει με άλλους μορφολογικούς υποτύπους ενδομητριοειδούς καρκίνου. Τα καρκινικά κύτταρα μοιάζουν με εκείνα



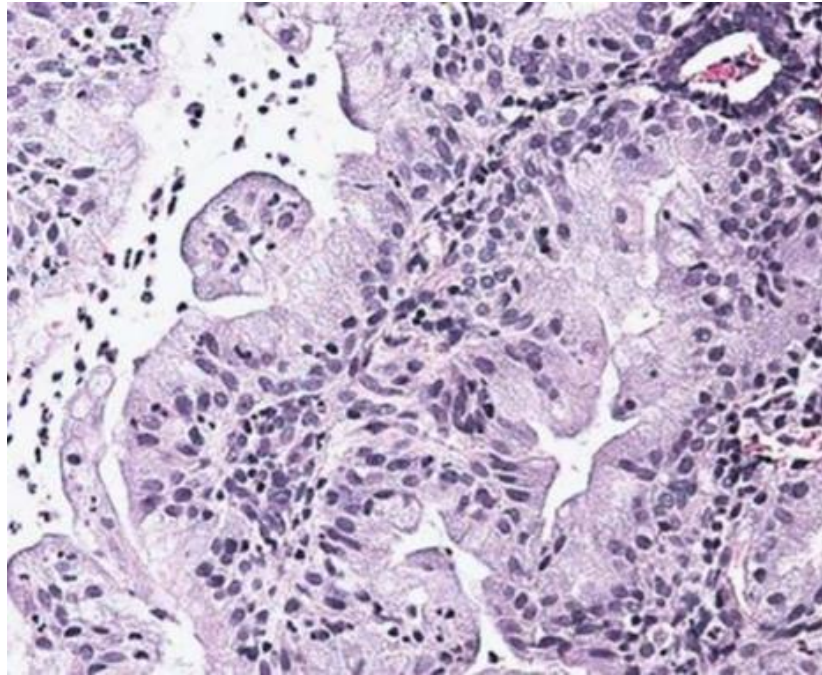
άλλων ενδομητριοειδών αδενοκαρκινωμάτων, με τα οποία συχνά συνυπάρχουν (Zaino RJ, 1998).



*Εικόνα 11: Αδενοκαρκίνωμα του ενδομητρίου με λαχνοαδενικό πρότυπο ( Zaino et al., 1998)*

### **ΒΛΕΝΝΩΔΕΣ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ**

Το βλεννώδες καρκίνωμα του ενδομητρίου είναι σπάνιο. Εξ ορισμού, περιέχει ενδοκυτταροπλασματική βλέννα, θετική στην χρώση PAS (Periodic Acid-Schiff) σε ποσοστό μεγαλύτερο του 50% των νεοπλασματικών κυττάρων (Kurman RJ et al., 2014). Τα ενδομητριοειδή αδενοκαρκινώματα εμφανίζουν συχνότερα εστιακή βλεννώδη διαφοροποίηση, συχνά σε συνδυασμό με πλακώδη διαφοροποίηση. Σε αντίθεση με το αδενοκαρκίνωμα του τραχήλου της μήτρας, το βλεννώδες καρκίνωμα του ενδομητρίου παρουσιάζει θετικότητα για ER, PR και βιμεντίνη. Ωστόσο, συνιστάται προσοχή διότι, αν και δεν συνδέεται με τον HPV, το αδενοκαρκίνωμα του τραχήλου της μήτρας είναι p16-θετικό, όπως και το βλεννώδες καρκίνωμα του ενδομητρίου (Chekmareva M et al., 2008).



*Εικόνα 12: Αδενοκαρκίνωμα ενδομητρίου με βλεννώδη μετάπλαση (Chekmareva et al., 2008).*

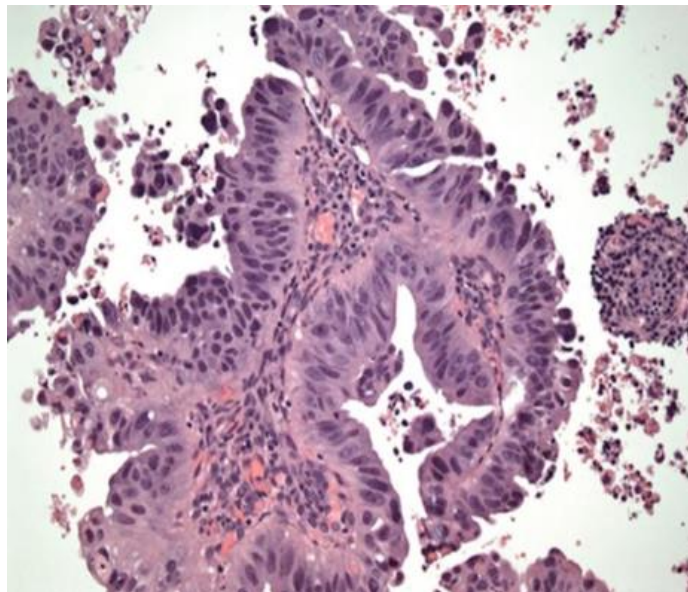
## **ΟΡΩΔΕΣ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ**

Το ορώδες καρκίνωμα, το πιο διαδεδομένο καρκίνωμα τύπου II, συνιστά το 5-10% των περιπτώσεων καρκίνου του ενδομητρίου. Παρουσιάζει σύνθετο πρότυπο ανάπτυξης θηλωμάτων, ανώμαλα θηλώματα μεγάλου πάχους και κυτταρική πολυστιβάδωση. Τα κύτταρα έχουν ηωσινόφιλο κυτταρόπλασμα και οι πυρήνες των κυττάρων παρουσιάζουν πλειομορφία, υπερχρωμασία και ευδιάκριτα πυρήνια. Οι μιτώσεις είναι συχνές και το 30% αυτών έχουν ψαμμώδη σώματα (Kurman RJ et al., 2014).

Η σε βάθος διήθηση του μυομητρίου, καθώς και η λεμφική και αγγειακή διήθηση αποτελούν συχνά χαρακτηριστικά στον ορώδη καρκίνο. Η πρόγνωση για τον συγκεκριμένο τύπο καρκινώματος είναι κακή και υπάρχει υψηλός κίνδυνος μεταστάσεων κατά τη διάγνωση. Οι συγκεκριμένοι όγκοι συνυπάρχουν με το αδενοκαρκίνωμα του ενδομητρίου ή το διαυγοκυτταρικό καρκίνωμα σε ποσοστό 33% των περιπτώσεων. Επιπλέον, μπορεί να υπάρχει ταυτόχρονα διήθηση λεμφαγγείων σε ένα μεγάλο ποσοστό. Ο μιτωτικός δείκτης Ki-67 εκφράζεται εντονότερα στα νεοπλασματικά κύτταρα.

Οι λαχνοαδενικοί υπότυποι του αδενοκαρκινώματος του ενδομητρίου και του διαυγοκυτταρικού καρκινώματος του ενδομητρίου περιλαμβάνονται στη διαφορική

διάγνωση. Οι θηλές είναι λεπτοφυείς και η ατυπία είναι ήπια στην πρώτη περίπτωση. Το ορώδες ενδοεπιθηλιακό καρκίνωμα του ενδομητρίου αποτελεί πρόδρομη αλλοίωση του ορώδους καρκινώματος. Αναπτύσσεται σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες σε υπόστρωμα ατροφικού ενδομητρίου, όπως ακριβώς και το διηθητικό ορώδες καρκίνωμα. Διακρίνεται από την παρουσία κυττάρων που έχουν τα ίδια μορφολογικά χαρακτηριστικά με το διηθητικό ορώδες καρκίνωμα και αντικαθιστούν τα υγιή κύτταρα της επιπολής στιβάδας και των αδένων χωρίς να εμφανίζουν σημεία στρωματικής διήθησης. Παρά την απουσία στρωματικής διήθησης ή διήθησης του μυομητρίου, υπάρχει επέκταση του όγκου εκτός της μήτρας (συχνά στο περιτόναιο, τις ωοθήκες και τις σάλπιγγες), παρόμοιου τύπου με το διηθητικό ορώδες καρκίνωμα (Pathiraja P et al., 2013). Όταν υπάρχει υποψία ορώδους καρκινώματος των ωοθηκών και έχει εξαπλωθεί ευρέως στην πύελο, η ανοσοϊστοχημεία μπορεί να είναι πολύ χρήσιμη για τη διαφορική διάγνωση. Για παράδειγμα, το WT-1 παρουσιάζει θετική ανοσοχρώση στο 70-100% των περιπτώσεων με καρκίνωμα των ωοθηκών, αλλά μόλις στο 10% των περιπτώσεων ορώδους καρκινώματος του ενδομητρίου (Hirschowitz L et al., 2009).



*Εικόνα 13: Ωρώδες καρκίνωμα (Bogani et al., 2021)*

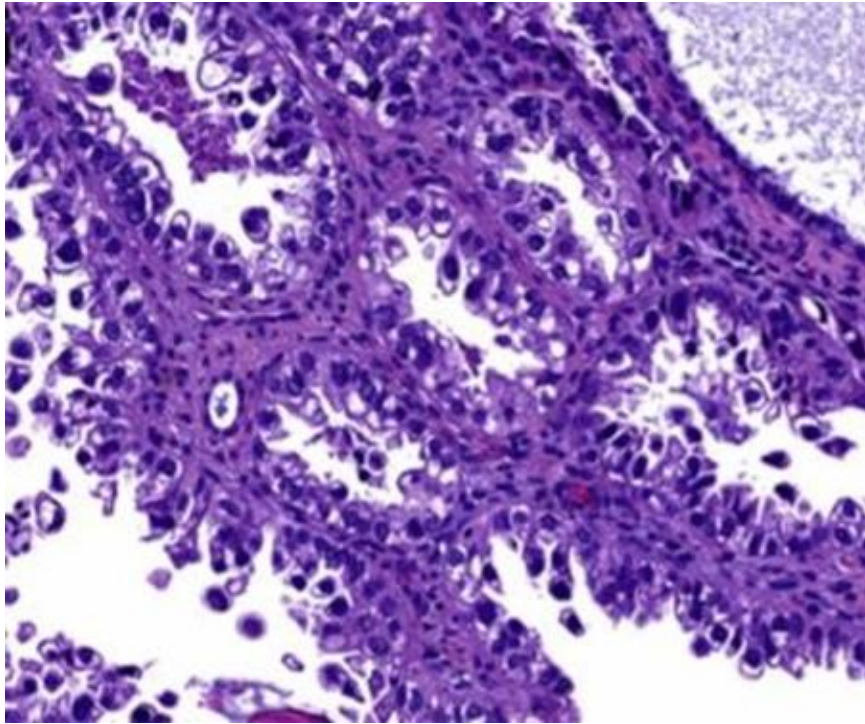
### **ΔΙΑΥΓΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ**

Οι Scully και Barlow εισήγαγαν τον όρο διαυγοκυτταρικό καρκίνωμα περιγράφοντας όγκους προερχόμενους από το επιθήλιο του Muller (Scully RE, Barlow JF, 1967). Το διαυγοκυτταρικό καρκίνωμα του ενδομητρίου είναι ένας υπότυπος του



καρκινώματος "τύπου II" και μοιράζεται επιδημιολογικά χαρακτηριστικά με το ορώδες καρκίνωμα. Αυτοί οι όγκοι είναι συχνότεροι σε γυναίκες αφρικανικής καταγωγής και σε μετεμμηνοπαυσιακές ασθενείς που δεν είναι παχύσαρκες ή παρουσιάζουν περίσσεια οιστρογόνων. Τυπικά, αποτελούν το 5% του συνόλου των καρκινωμάτων του ενδομητρίου. Προκειται για επιθετικούς όγκους που υποτροπιάζουν συχνά εκτός της πυέλου. Οι Cirisano και συνεργάτες, απέδειξαν ότι η εξωμήτρια εξάπλωση εμφανίστηκε σε ποσοστό έως και 40% των ασθενών με διαυγοκυτταρικό καρκίνωμα της μήτρας που περιορίζονταν κλινικά στη μήτρα (Cirisano FD Jr et al., 2000). Η εξωμήτρια εξάπλωση εμφανίστηκε σε ασθενείς με ορώδες καρκίνωμα της μήτρας ακόμη και όταν δεν υπήρχε σημαντική διήθηση στο μυομήτριο. Οι όγκοι είχαν θηλώδες, σωληνοκυστικό ή συμπαγές πρότυπο ανάπτυξης. Λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς τους σε γλυκογόνο (σε αντίθεση με την ενδοκυττάρια βλέννα), τα νεοπλασματικά κύτταρα έχουν συχνά διαφανές κυτταρόπλασμα. Τα κύτταρα αυτά συνυπάρχουν μαζί με κύτταρα που έχουν ηωσινόφιλο κυτταρόπλασμα και τα «hobnail» κύτταρα (Murali R et al., 2019).

Στον ίδιο όγκο μπορεί να συνυπάρχουν διαυγοκυτταρικά και ορώδη στοιχεία (Suarez et al., 2017). Το ιατρικό ιστορικό του ασθενούς και οι ανοσοϊστοχημικές χρώσεις σε ορισμένες περιπτώσεις μπορούν να συμβάλλουν στη σωστή διάγνωση (Lax SF et al., 1998). Το διαυγοκυτταρικό καρκίνωμα παρουσιάζει χαμηλή έκφραση των υποδοχέων οιστρογόνων και προγεστερόνης, παρόμοια με το ορώδες καρκίνωμα. Τόσο το ορώδες καρκίνωμα όσο και ο ενδομητριοειδής καρκίνος έχουν ενδιάμεση έκφραση του p53. Τα δεδομένα σχετικά με τη θεραπεία του διαυγοκυτταρικού καρκίνου της μήτρας είναι ελάχιστα λόγω της σπανιότητάς του. Ωστόσο, μέχρι στιγμής, φαίνεται ότι συγκεκριμένοι όγκοι ανταποκρίνονται στη χημειοθεραπεία (Lax SF et al., 1998).



*Εικόνα 14: Διαυγοκυτταρικό καρκίνωμα (Suarez et al., 2017).*

## **ΜΙΚΤΑ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΑ**

Το μικτό καρκίνωμα του ενδομητρίου περιλαμβάνει δύο ή περισσότερες μορφές καρκίνου του ενδομητρίου, εκ των οποίων τουλάχιστον μία πρέπει να ανήκει στον τύπο Π (Kurman RJ et al., 2014). Τα συχνότερα συνυπάρχοντα καρκινώματα σε ένα μικτό καρκίνωμα είναι το ορώδες καρκίνωμα και το αδenoκαρκίνωμα του ενδομητρίου. Ένα μικτό καρκίνωμα πρέπει να περιέχει τουλάχιστον 5% της μίας από τις δύο κατηγορίες καρκινωμάτων. Ακόμη και σε ελάχιστο ποσοστό, το υψηλού βαθμού κακοηθείας καρκίνωμα επηρεάζει την πρόγνωση (Quddus MR et al., 2010). Το αδιαφοροποίητο και το νευροενδοκρινικό καρκίνωμα αποτελούν λιγότερο συχνές μορφές του καρκίνου του ενδομητρίου.

## **ΚΛΗΡΟΝΟΜΙΚΗ ΜΟΡΦΗ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΟΥ**

Το σύνδρομο Lynch, το σύνδρομο Cowden και ο κληρονομικός καρκίνος του παχέος εντέρου (HNPCC) δίχως εμφάνιση πολυπόδων, ενέχουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκινώματος του ενδομητρίου. Το σύνδρομο Lynch χαρακτηρίζεται από μεταλλάξεις στα γονίδια των πρωτεϊνών επιδιόρθωσης λανθασμένων ζευγών βάσεων

*MLH-1, MSH2, MSH6 ή PMS2* και συνδέεται με καρκίνους του παχέος εντέρου, του ενδομητρίου, του ουροθηλίου και των ωοθηκών. Οι ασθενείς με σύνδρομο Lynch έχουν 20-60% πιθανότητα να αναπτύξουν άτυπη υπερπλασία ή ενδομητριοειδές αδενοκαρκίνωμα του ενδομητρίου (Hampel H et al., 2006). Σε αυτές τις ασθενείς, το καρκίνωμα του ενδομητρίου μπορεί να εμφανιστεί πριν ή μετά την εμφάνιση του καρκίνου του ορθού και η μέση ηλικία στην οποία εκδηλώνονται αυτά τα καρκινώματα είναι άνω των 60 ετών.

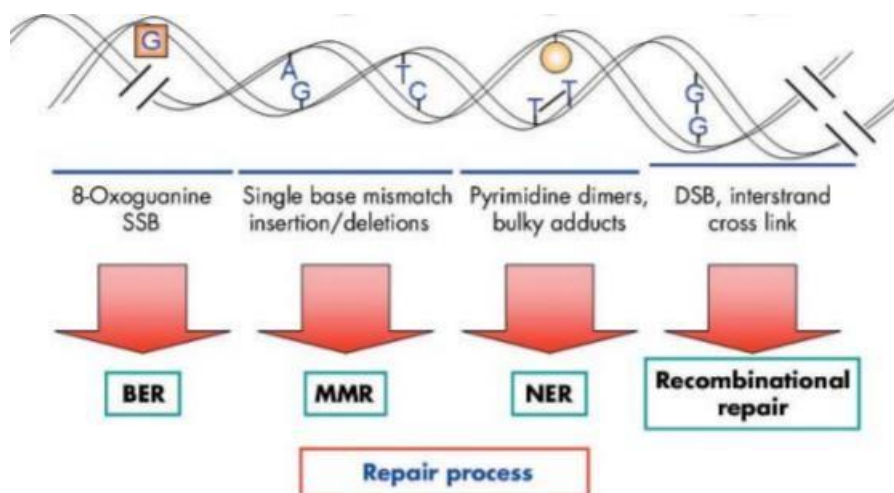
## **ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΕΠΙΔΙΟΡΘΩΣΗΣ DNA**

Τα κύτταρα βομβαρδίζονται συνεχώς με εξωτερικούς στρεσογόνους παράγοντες όπως το βενζοπυρένιο, οι διοξίνες, η υπεριώδης ακτινοβολία, καθώς και με ενδογενείς παράγοντες όπως οι δραστικές ρίζες οξυγόνου και αζώτου (ROS και NOS) που δύνανται να προκαλέσουν βλάβες στο DNA. Τα λάθη που συμβαίνουν κατά τη διάρκεια του μεταβολισμού ή κατά την αντιγραφή και τον ανασυνδυασμό του γενετικού υλικού αποτελούν πηγές βλαβών του DNA. Εάν η βλάβη του DNA δεν επιδιορθωθεί, ενδέχεται να προκύψουν μεταλλάξεις σε σωματικά ή γεννητικά κύτταρα, οι οποίες μεταβάλλουν τον φαινότυπο και οδηγούν σε κυτταρική δυσλειτουργία (Li, 2017). Ο καρκίνος είναι μία από τις παθολογικές καταστάσεις που μπορεί να προκύψουν από βλάβες του DNA, καθώς ενδέχεται οι εκάστοτε βλάβες να έχουν επιδράσει σε ογκογονίδια και ογκοκατασταλτικά γονίδια επηρεάζοντας την εύρυθμη λειτουργία τους (Torgovnick et al., 2015).

Προκειμένου να προστατευτούν τα κύτταρα, ώστε να αποφύγουν τη συσσώρευση μεταλλαγμένου DNA και κατ' επέκταση την ενδεχόμενη δυσλειτουργία των γονιδίων, έχουν αναπτύξει μηχανισμούς επιδιόρθωσης. Καθένας από αυτούς είναι κατάλληλος για ένα διαφορετικό σύνολο βλαβών, ώστε στο σύνολό τους να είναι σε θέση να αντιμετωπίσουν κάθε πιθανή βλάβη. Οι τέσσερις βασικοί μηχανισμοί είναι οι ακόλουθοι (Dexheimer et al., 2012, Hoeijmakers et al., 2001):

1. Μηχανισμός επιδιόρθωσης θραυσμάτων της διπλής έλικας του DNA (Double-strand Break Repair , DBR)
2. Μηχανισμός επιδιόρθωσης λανθασμένων ζευγών βάσεων (Mismatch Repair , MMR)
3. Μηχανισμός επιδιόρθωσης διαμέσου εκτομής – νουκλεοτιδίου (Nucleotide – Excision Repair , NER)

#### 4. Μηχανισμός επιδιόρθωσης διαμέσου εκτομής – βάσης (Base-Excision Repair , BER)



Εικόνα 15: Βλάβη στο DNA και ο κατάλληλος μηχανισμός επιδιόρθωσης (Boland et al., 2005).

## ΜΙΚΡΟΔΟΡΥΦΟΡΙΚΕΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΕΣ

Οι μικροδορυφόροι είναι μικρές DNA αλληλουχίες, σε κωδικές ή μη κωδικές περιοχές, που φέρουν επαναλήψεις 1 έως 4 νουκλεοτιδίων. Έχουν κατά κανόνα μήκος 10 έως 60 ζεύγη βάσεων. Λόγω των επαναλήψεων, αποτελούν συχνά θέσεις λαθών κατά την αντιγραφή, υποδεικνύοντας μη ομαλή επιδιόρθωση από μηχανισμούς επιδιόρθωσης βλαβών του DNA, όπως ο μηχανισμός επιδιόρθωσης λανθασμένου ζεύγους νουκλεοτιδίων (Mismatch Repair system, MMR) (Evrard, C. et al., 2021). Στα φυσιολογικά κύτταρα ο επαναλαμβανόμενος αριθμός των μικροδορυφώρων διατηρείται σταθερός κατά τη διάρκεια της κυτταρικής διαίρεσης με τη βοήθεια του συστήματος επιδιόρθωσης MMR, που διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αντιγραφή του DNA. Σε περίπτωση βλάβης, τα κύτταρα ενδεχομένως να μην καταφέρουν να διατηρήσουν σταθερό τον αριθμό των μικροδορυφώρων και να προκύψει η προαναφερθείσα μικροδορυφορική αστάθεια (Bonneville et al., 2017). Σε πολλούς καρκίνους, μεταξύ των οποίων και ο καρκίνος του ενδομητρίου, παρατηρούνται βλάβες στους μηχανισμούς επιδιόρθωσης, μέσω μεταλλάξεων ή επιγενετικών αλλαγών που λαμβάνουν χώρα στα γονίδια που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες επιδιόρθωσης. Ως εκ τούτου, συσσωρεύονται μεταλλάξεις, γεγονός που ευνοεί την καρκινογένεση. Η

μικροδορυφορική αστάθεια αποτελεί έναν από τους παράγοντες που ενοχοποιούνται για την εμφάνιση και ανάπτυξη των όγκων. Εξετάζεται είτε ανοσοϊστοχημικά, με τη εκτίμηση της έκφρασης των επιδιορθωτικών πρωτεϊνών MLH1, MSH2, MSH6 και PMS2 είτε έμμεσα, μέσω της μελέτης μικροδορυφορικών δεικτών. Η παρουσία θετικής ανοσοχρώσης των τεσσάρων πρωτεϊνών αποτελεί ένδειξη ομαλής λειτουργίας του μηχανισμού επιδιόρθωσης MMR, επομένως δεν παρατηρείται μικροδορυφορική αστάθεια. Όσον αφορά στους μικροδορυφορικούς δείκτες, κατά κανόνα χρησιμοποιείται το Bethesda πάνελ μικροδορυφορικών δεικτών, το οποίο περιλαμβάνει πέντε μονο- ή δινουκλεοτιδικούς δείκτες. Πρακτικά, ο όγκος χαρακτηρίζεται μικροδορυφορικά σταθερός (MicroSatellite Stable, MSS), ή μικροδορυφορικά ασταθής (MicroSatellite Instability, MSI). Εάν καταγράφονται διαφορές σε έναν από τους πέντε μικροδορυφόρους, ο όγκος χαρακτηρίζεται ως MSI-low, ενώ αν οι διαφορές αναφέρονται σε δύο ή περισσότερους μικροδορυφορικούς δείκτες, τότε ο όγκος χαρακτηρίζεται ως MSI-High (Boland et al., 2018).

## **ΜΙΚΡΟΔΟΥΡΥΦΟΡΙΚΗ ΑΣΤΑΘΕΙΑ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΟΥ**

Η μικροδορυφορική αστάθεια (MSI) ανιχνεύεται στα καρκινώματα τύπου I σε ποσοστό της τάξης του 25-40%, αλλά σπανίως παρατηρείται σε καρκινώματα τύπου II (<5%). Κλινικές μελέτες έδειξαν ότι οι καρκίνοι του ενδομητρίου που σχετίζονται με το MSI status ανταποκρίνονται καλύτερα στην αντι-PDL1 ανοσοθεραπεία (Kucuk A et al., 2022). Στη θεραπεία των MSI-H καρκίνων του ενδομητρίου, βάσει των κατευθυντήριων οδηγιών επιλέγεται η ανοσοθεραπεία. Επομένως η τακτική αξιολόγηση της κατάστασης MSI στους διάφορους καρκίνους του ενδομητρίου έχει καταστεί σημαντική.

Το 2013, η ομάδα του TCGA (The Cancer Genome Atlas) καθιέρωσε τη μοριακή ταξινόμηση του καρκίνου του ενδομητρίου προτείνοντας τέσσερις διακριτές μοριακές υποομάδες: την ομάδα με υπερμεταλλάξεις στην πολυμεράση E (POLE), την ομάδα με μικροδορυφορική αστάθεια (MSI-H), και τις υποομάδες με υψηλό (τύπου ορώδους) και χαμηλό αριθμό αντιγράφων (ενδομητριοειδούς τύπου) (Kandoth C et al., 2013). Η Ευρωπαϊκή Εταιρεία Γυναικολογικής Ογκολογίας (European Society of Gynaecological Oncology, ESGO), η Ευρωπαϊκή Εταιρεία Ακτινοθεραπείας και Ογκολογίας (European Society for Therapeutic Radiology and Oncology, ESTRO) και

η Ευρωπαϊκή Εταιρεία Παθολογικής Ανατομικής (European Society of Pathology, ESP), το 2020, αναθεώρησαν την ιστολογική ταξινόμηση των καρκίνων του ενδομητρίου, υιοθετώντας μία μορφομοριακή προσέγγιση για τη διάγνωση και τυποποίηση των συγκεκριμένων νεοπλασμάτων (Concin N et al., 2021).

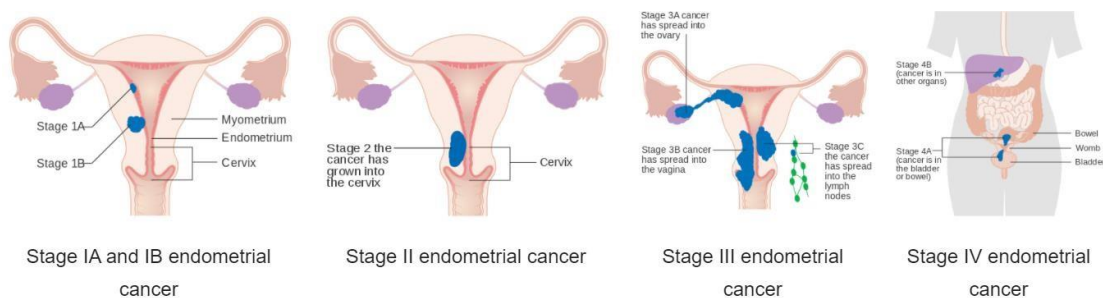
Ο καθορισμός του MSI φαινοτύπου (MSI status) σε ασθενείς με καρκίνο του ενδομητρίου έχει κλινική εφαρμογή, καθώς μπορεί να χρησιμοποιηθεί τόσο ως υποψήφιος δείκτης για τον καθορισμό του υποτύπου, με βάση την πρόσφατη μορφομοριακή ταξινόμηση, όσο και για τον προσυμπτωματικό έλεγχο του συνδρόμου Lynch. Επιπρόσθετα, μπορεί να δώσει πληροφορίες σχετικά με την πρόγνωση του ασθενούς με καρκίνο του ενδομητρίου, αλλά και να συμβάλλει στον καθορισμό των θεραπευτικών αποφάσεων που αφορούν στην πιθανή επιλογή ανοσοθεραπείας με PD-1/PD-L1 αναστολείς (Guo YE et al., 2022, Evrard C and Alexandre J, 2021). Σήμερα, η Διεθνής Εταιρεία Γυναικολογικής Παθολογίας (ISGyP) έχει προτείνει έλεγχο ρουτίνας για τον προσδιορισμό της μικροδορυφορικής αστάθειας (MMR/MSI) σε όλα τα καρκινώματα ενδομητρίου (Cho KR et al., 2019).

## **ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΕΣ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΙΣ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΟΥ**

Στον καρκίνο του ενδομητρίου, ο πιο σημαντικός προγνωστικός παράγοντας είναι το στάδιο της νόσου. Βάσει των οδηγιών της International Federation of Gynecologists and Obstetricians – FIGO από το 1998, η επιβίωση των καρκινωμάτων του ενδομητρίου ποικίλλει και καθορίζεται σε μεγάλο βαθμό από το στάδιο (stage) και το βαθμό διαφοροποίησης-κακοήθειας (Grade). Σύμφωνα με αυτό, προκειμένου να αυξηθεί το προσδόκιμο επιβίωσης των ασθενών, οι θεραπευτικές προσεγγίσεις καθορίζονται με βάση την εκτίμηση του σταδίου και του βαθμού διαφοροποίησης του όγκου.

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 16:** Σταδιοποίηση καρκίνου του ενδομητρίου κατά FIGO. Πηγή: International Federation of Gynecologists and Obstetricians.



**Εικόνα 17:** Ταξινόμηση καρκίνου του ενδομητρίου κατά FIGO. Πηγή: Cancer Research UK.

Για τη σταδιοποίηση του όγκου, εκτιμάται το βάθος διήθησης του μυομητρίου, η διασπορά του στον τράχηλο της μήτρας, η διήθηση των λεμφαδένων, το μέγεθος και η θέση του όγκου, καθώς και ο ιστολογικός τύπος και ο βαθμός λεμφικής διήθησης. Σε ό,τι αφορά τη σταδιοποίηση, τα ορώδη και τα διηθητικά καρκινώματα, τα οποία κατά κύριο λόγο υπάγονται στον βαθμό διαφοροποίησης 3, αφορούν κυρίως τα ενδομητριοειδή και τα βλενώδη καρκινώματα. Ανεξαρτήτως του ιστολογικού τύπου ή του βαθμού διαφοροποίησης του όγκου, η παρουσία διήθησης του μυομητρίου αποτελεί σημαντικό προγνωστικό δείκτη. Όσο μεγαλύτερο είναι το βάθος διήθησης του μυομητρίου, τόσο χειρότερη είναι η πρόγνωση. Το πιο επιθετικό νεόπλασμα μεταξύ των ιστολογικών υποτύπων του καρκίνου του ενδομητρίου είναι το ορώδες



καρκίνωμα. Σε αντίθεση με όλα τα αδενοκαρκινώματα ενδομητριοειδούς τύπου, τα οποία έχουν σχετικά ευνοϊκή πρόγνωση, το ορώδες καρκίνωμα θεωρείται εξαιρετικά επιθετικό και έχει υψηλό βαθμό κακοήθειας.

Όσον αφορά τη θεραπεία των ασθενών, οι ασθενείς με καρκίνο του ενδομητρίου έχουν διάφορες εναλλακτικές λύσεις, όπως η χειρουργική προσέγγιση, η χημειοθεραπεία, η ακτινοθεραπεία, η ορμονοθεραπεία και η συστηματική παρακολούθηση. Η σημασία καθεμιάς από αυτές τις επιλογές καθορίζεται από τον ιστολογικό τύπο και το στάδιο της νόσου. Λόγω της κοιλιακής αιμορραγίας, η πλειονότητα των ασθενών λαμβάνει έγκαιρη διάγνωση, γεγονός που οδηγεί σε καλά ποσοστά ίασης. Το gold standard στη θεραπεία αυτών των ασθενών περιλαμβάνει την ολική υστερεκτομή μετά των εξαρτημάτων μετά από χειρουργική επέμβαση.

### **ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ ΕΠΕΜΒΑΣΗ**

Το θεμέλιο της χειρουργικής θεραπείας και βάση της σταδιοποίησης του καρκίνου του ενδομητρίου είναι η ολική υστερεκτομή, η οποία συνεπάγεται την αφαίρεση της μήτρας, των σαλπίγγων και των ωοθηκών και σε ορισμένες περιπτώσεις των λεμφαδένων της πυέλου και των παρακοιλιακών λεμφαδένων. Οι ωοθήκες επιχειρείται να διατηρηθούν στις νεαρές γυναίκες.

Οι ασθενείς με καρκίνωμα σταδίου IA και βαθμό διαφοροποίησης 1 ή 2 έχουν μειωμένη πιθανότητα να έχουν προσβολή λεμφαδένων και έχουν γενικώς καλή πρόγνωση. Η λεμφαδεκτομή δεν συνιστάται σε αυτούς τους ασθενείς επειδή δεν έχει καμία επίδραση στην επιβίωση. Οι ασθενείς με προχωρημένη νόσο, μπορεί να ωφεληθούν από τη χειρουργική επέμβαση, αλλά θα χρειαστούν επιπρόσθετα χημειοθεραπεία ή ακτινοβολία. Εκτός από τη συνήθη επέμβαση υστερεκτομής, οι έμπειροι χειρουργοί μπορούν να αφαιρούν τα εξαρτήματα λαπαροσκοπικά (Denschlag et al., 2011).

Οι όγκοι σταδίου II μπορούν να αντιμετωπιστούν με ριζική υστερεκτομή, εξαλείφοντας την ανάγκη για μετεγχειρητική ακτινοβολία. Οι ασθενείς που είχαν υποτροπή μετά από ακτινοθεραπεία ή που έχουν υποβληθεί σε ακτινοθεραπεία για άλλες κακοήθειες της πυέλου μπορεί ενδεχομένως να είναι υποψήφιοι για χειρουργική επέμβαση. Η χειρουργική επέμβαση είναι η προτιμώμενη θεραπεία για τον καρκίνο του ενδομητρίου. Ωστόσο, για υψηλού βαθμού κακοήθειας νεοπλάσματα, υπάρχουν οι



ακτινοθεραπεία ή η χημειοθεραπεία, που μπορούν να χρησιμοποιηθούν επικουρικά σε συνδυασμό με τη χειρουργική επέμβαση.

## **ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΙΑ**

Η χημειοθεραπεία είναι η έγχυση φαρμάκων με στόχο την παρέμβαση στον κυτταρικό κύκλο και την αναστολή των καρκινικών κυττάρων. Ο καρκίνος του ενδομητρίου ανιχνεύεται συχνά ενώ παραμένει εντοπισμένος στο ενδομήτριο. Η χειρουργική επέμβαση, με ή χωρίς επικουρική ακτινοθεραπεία, είναι η καλύτερη θεραπευτική επιλογή. Ωστόσο, ένα σημαντικό ποσοστό των ατόμων που διαγιγνώσκονται στο στάδιο I ή II ενδέχεται να εμφανίσουν υποτροπή της νόσου. Επιπλέον, περίπου το 15% των ασθενών διαγιγνώσκονται με καρκίνο του ενδομητρίου σε προχωρημένο στάδιο (III /IV) και η χειρουργική επέμβαση και η ακτινοθεραπεία δεν επαρκούν.

Με βάση προηγούμενες έρευνες, οι ασθενείς που λαμβάνουν επικουρική θεραπεία με κυκλοφωσφαμίδη, δοξορουβικίνη και σισπλατίνη έχουν περισσότερες πιθανότητες επιβίωσης. Όταν η χειρουργική επέμβαση δεν αποτελεί επιλογή, μπορεί να χρησιμοποιηθεί χημειοθεραπεία ή παρηγορητική χημειοθεραπεία. Μεγαλύτερη επιβίωση φαίνεται να συνδέεται με υψηλότερες δόσεις χημειοθεραπείας. Η παρηγορητική χημειοθεραπεία χρησιμοποιείται συχνά για τη θεραπεία του υποτροπιάζοντος καρκίνου.

Σε ασθενείς υψηλού κινδύνου, η μετεγχειρητική ακτινοθεραπεία (κολπική βραχυθεραπεία ή εξωτερική τηλεθεραπεία) μειώνει τη συχνότητα της τοπικής υποτροπής, αλλά δεν βελτιώνει τη συνολική επιβίωση. Η εξωτερική τηλεθεραπεία υπερτερεί της κολπικής βραχυθεραπείας επειδή έχει λιγότερες παρενέργειες και τοξικότητα. Οι ασθενείς που υποβλήθηκαν σε κολπική βραχυθεραπεία δε φαίνεται να έχουν σημαντικές διαφορές στα ποσοστά υποτροπής και μετάστασης, στην επιβίωση ελεύθερης νόσου και στη συνολική επιβίωση (Blake et al., 2009).

Οι απόψεις ποικίλλουν σχετικά με το ρόλο της συστηματικής χημειοθεραπείας σε συνδυασμό με την ακτινοθεραπεία στην αύξηση της επιβίωσης των ασθενών υψηλού κινδύνου. Η χημειο-ακτινοθεραπεία, σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες, δεν υπερέχει έναντι της ακτινοθεραπείας όσον αφορά την ελεύθερης νόσου επιβίωση ή τη συνολική επιβίωση. Αντιθέτως, η χημειο-ακτινοθεραπεία, φαίνεται να σχετίζεται με υψηλότερο ποσοστό υποτροπής (Jingjing et al., 2019).

## **ΑΚΤΙΝΟΘΕΡΑΠΕΙΑ**

Σε ασθενείς υψηλού κινδύνου, η μετεγχειρητική ακτινοθεραπεία (κολπική βραχυθεραπεία ή εξωτερική τηλεθεραπεία) μειώνει τη συχνότητα της τοπικής υποτροπής, αλλά δεν βελτιώνει τη συνολική επιβίωση. Η εξωτερική τηλεθεραπεία υπερτερεί της κολπικής βραχυθεραπείας επειδή έχει πιο λίγες παρενέργειες και τοξικότητα. Οι ασθενείς που υποβλήθηκαν σε κολπική βραχυθεραπεία φαίνεται να μην έχουν σημαντικές διαφορές στα ποσοστά υποτροπής και μετάστασης, καθώς και στην επιβίωση χωρίς νόσο και στη συνολική επιβίωση (Blake et al., 2009). Αξίζει να αναφερθεί ότι οι απόψεις για τη χρησιμότητα της συστηματικής χημειοθεραπείας σε συνδυασμό με την ακτινοθεραπεία στην αύξηση της επιβίωσης των ασθενών υψηλού κινδύνου δίστανται. Η χημειοθεραπεία δεν υπερέχει της ακτινοθεραπείας όσον αφορά την επιβίωση χωρίς νόσο ή τη συνολική επιβίωση, σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες. Η χημειοακτινοθεραπεία, από την άλλη πλευρά, φαίνεται να σχετίζεται με μεγαλύτερο ποσοστό υποτροπής (Jingjing et al., 2019).

## **ΑΝΟΣΟΘΕΡΑΠΕΙΑ**

Τα δεδομένα της ομάδας TCGA για τον καρκίνο του ενδομητρίου διεύρυναν τις γνώσεις μας σχετικά με τον ρόλο των διαφόρων ανοσοθεραπευτικών προσεγγίσεων με βάση τους μοριακούς υποτύπους. Οι αναστολείς των σημείων ανοσολογικού ελέγχου επέδειξαν διακριτές δράσεις ως μονοθεραπεία ή σε συνδυαστική μορφή. Στον καρκίνο του ενδομητρίου με μικροδορυφορική αστάθεια (MSI-H), η ανοσοθεραπεία με αναστολείς των σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος έδειξε υποσχόμενη δράση παραγόντων σε υποτροπιάζουσες καταστάσεις. Από την άλλη πλευρά, οι μεμονωμένοι αναστολείς των σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος δεν έδειξαν ικανοποιητική αποτελεσματικότητα στον καρκίνο του ενδομητρίου χωρίς μικροδορυφορική αστάθεια, αλλά η αποτελεσματικότητα βελτιώθηκε σημαντικά με τη χρήση μιας συνδυαστικής προσέγγισης (Mahdi H et al., 2023).

## ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΔΟΥΡΥΦΟΡΙΚΗΣ ΑΣΤΑΘΕΙΑΣ ΑΝΑΛΟΓΑ ΜΕ ΤΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΕΥΡΗΜΑΤΑ

Για την αξιολόγηση του βαθμού της μικροδορυφορικής αστάθειας χρησιμοποιήθηκαν σαν γνώμονες οι αλλαγές στις μονονουκλεοτιδικές (BAT25, BAT26, NR27, NR21, NR24), δινουκλεοτιδικές (D2S123, D5S346, D17S250) και πεντανουκλεοτιδικές (penta-C, penta-D) αλληλουχίες στις οποίες το μήκος αυξάνεται λόγω της ολίσθησης της αλυσίδας DNA και των επακόλουθων λανθασμένων ζευγών βάσεων.

Στη συγκεκριμένη διπλωματική εργασία μελετήθηκαν τρεις μονονουκλεοτιδικοί δείκτες (BAT25, BAT26, NR27) χρησιμοποιώντας το σύστημα τριχοειδικής ηλεκτροφόρησης QIAxcel Advanced. Τα αποτελέσματά μας, αξιολογήθηκαν και κατηγοριοποιήθηκαν σύμφωνα με τα εξής δεδομένα (Kunitomi et al., 2017):

1. Θεωρείται MSI-H (MSI-High) ένας όγκος που εμφανίζει αλλαγή μήκους αλληλουχιών σε δύο ή περισσότερους δείκτες.
2. Θεωρείται MSI-L (MSI-Low) ο όγκος που εμφανίζει αλλαγή μήκους αλληλουχιών σε έναν δείκτη.
3. Εάν ο όγκος δεν παρουσιάζει αλλαγή σε κάποιον από τους μικροδορυφορικούς δείκτες θεωρείται MSS (MSI Stable).

## **ΣΚΟΠΟΣ**

Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής διπλωματικής εργασίας είναι η διερεύνηση του MSI status σε ασθενείς με καρκίνο του ενδομητρίου, εξετάζοντας τους μικροδορυφορικούς δείκτες BAT-25, BAT-26, NR-27 με την ανάπτυξη μιας μεθοδολογίας απλής τριχοειδικής ηλεκτροφόρησης. Εξετάζεται επιπροσθέτως, η σχέση μεταξύ της μικροδορυφορικής αστάθειας και των διάφορων κλινικοπαθολογικών χαρακτηριστικών των ασθενών.

## ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Στη συγκεκριμένη εργασία, μελετήθηκαν 50 θήλεα άτομα με καρκίνο ενδομητρίου. Στη μελέτη συμπεριλήφθηκαν ασθενείς που χειρουργήθηκαν κατά το διάστημα 2022-2023 Μαιευτική-Γυναικολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας. Παράλληλα, συμπεριλάβαμε δείγματα που είχαν συλλεχθεί αναδρομικά και βρισκόταν στη διάθεση του εργαστηρίου στα πλαίσια προηγούμενων ερευνητικών πρωτοκόλλων. Για κάθε ασθενή της μελέτης λάβαμε δείγμα ιστού μονιμοποιημένου σε φορμόλη και εγκλεισμένου σε παραφίνη (Formalin Fixed Paraffin Embedded Tissue, FFPET). Σε κάθε ασθενή έγινε χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης και στη συνέχεια επιλογή του νεοπλασματικού στοιχείου από παθολογοανατόμο του εργαστηρίου. Ακολούθησε διαχωρισμός του υλικού και λήψη τόσο νεοπλασματικού όσο και μη νεοπλασματικού ιστού, από διαφορετικό κύβο παραφίνης ή από το ίδιο, όπου δεν υπήρχε εναλλακτικός κύβος παραφίνης. Για κάθε δείγμα λάβαμε 5-6 τομές FFPET ιστού πάχους 10 µm, σε σωληνάριο τύπου Eppendorf.

## ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Στην παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα αντιδραστήρια και αναλώσιμα με σκοπό την εκπλήρωση των πειραματικών διαδικασιών:

- Διάλυμα ξυλόλης (VWR chemicals)
- Διάλυμα απόλυτης αιθυλικής αλκοόλης 100% (Biognost)
- Διάλυμα ισοπροπυλικής αλκοόλης (Amresco)
- Kit απομόνωσης DNA (NucleoSpin Tissue, Macherey - Nagel)
- Tris – Borate – EDTA 10x (TBE Buffer, GRISP)
- Αγαρόζη σε σκόνη (Canvaxbiotech)
- Χρωστική ηλεκτροφόρησης μπλε της βρωμοφαινόλης
- Διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (1%) (Appllichem)
- Ladder 100bp DNA (Invitrogen)
- Σωληνάκια τύπου Falcon όγκου 15 και 50 ml
- Ρύγχη πιπετών με φίλτρο: 10µl -100µl -1000µl
- Σωληνάκια τύπου Eppendorf:
  - MicroTube 2.0 ml SafeSeal (SARSTEDT)

- 0.2 ml PCR tubes (AHN Biotechnologie GmbH).

Για την διεκπεραίωση των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε ο κάτωθι εξοπλισμός του εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής του Τμήματος Ιατρικής, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

- Φασματοφωτόμετρο τύπου NANODROP 2000 (Thermo Scientific)
- Σύστημα παρατήρησης και φωτογράφισης UV (DNR Bioimagine System MiniB S Pro)
- Ζυγός ακριβείας Denver Instrument APX-200
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης (Thermo Electron Cooperation)
- Θερμικός κυκλοποιητής Mastercycler ep gradient (Eppendorf)
- Συσκευή ανάδευσης (Vortex) (FIRLABO s.e)
- Φυγόκεντρος, SL8R (ThermoFisher)
- Μονάδα επώασης ξηρής θερμότητας (Heat block, Eppendorf)
- Εστία απορρόφησης πτητικών χημικών κάθετης νηματικής ροής (Safehood120, BIOAIR)
- Πιπέτες άντλησης και έγχυσης P20, P100 και P1000 (GILSON).

## **ΑΠΟΠΑΡΑΦΙΝΩΣΗ ΤΟΥ ΙΣΤΟΥ ΚΑΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA**

Το πρώτο βήμα κατά τη διαδικασία απομόνωσης του γενωμικού DNA είναι η αποπαραφίνωση του ιστού. Η διαδικασία αυτή εξυπηρετεί την διάλυση και την επακόλουθη απομάκρυνση της παραφίνης από τον ιστό και πραγματοποιείται με τη χρήση ξυλόλης και απόλυτης αιθυλικής αλκοόλης. Έπειτα, πραγματοποιείται η λύση των κυττάρων του ιστού. Για την απομόνωση του DNA χρησιμοποιήθηκε το Genomic DNA from Tissue kit της εταιρίας MACHEREY-NAGEL σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστικού οίκου. Οι διαδικασίες της αποπαραφίνωσης και της απομόνωσης του DNA πραγματοποιήθηκαν σε απαγωγό εστία σύμφωνα με τα ακόλουθα πρωτόκολλα:

## ΑΠΟΠΑΡΑΦΙΝΩΣΗ ΤΩΝ FFRET ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

### Πειραματική διαδικασία:

- Προσθέτουμε 0.5 ml διαλύματος ξυλόλης σε σωληνάριο τύπου Eppendorf,
- Ακολουθεί έντονη ανάδευση (vortex) για 10 δευτερόλεπτα.
- Επωάζουμε το δείγμα σε θερμοκρασία δωματίου (15°C -30°C) για 5 λεπτά.
- Προσθέτουμε 0.5 ml διαλύματος απόλυτης αιθυλικής αλκοόλης στο σωληνάριο Eppendorf, για απομάκρυνση της ξυλόλης.
- Πραγματοποιούμε έντονη ανάδευση (vortex) για 10 δευτερόλεπτα.
- Επωάζουμε το δείγμα σε θερμοκρασία 15°C έως 30°C για 5 λεπτά.
- Φυγοκεντρούμε στις 14000 στροφές (rpm) για 2 λεπτά.
- Απορρίπτουμε το υπερκείμενο υγρό χωρίς τη διατάραξη του ιζήματος.
- Προσθέτουμε εκ νέου 1 ml διαλύματος απόλυτης αιθυλικής αλκοόλης στο σωληνάριο τύπου Eppendorf για την πλήρη απομάκρυνση της ξυλόλης.
- Έντονη ανάδευση (vortex) των δειγμάτων για 10 δευτερόλεπτα
- Φυγοκέντρωση στις 14.000 στροφές (rpm) για 2 λεπτά.
- Απορρίπτουμε το υπερκείμενο υγρό προσεκτικά. Εάν το ίζημα αιωρείται, επαναλαμβάνουμε τη φυγοκέντρωση στις ίδιες ακριβώς συνθήκες, προκειμένου να αφαιρέσουμε υπολείμματα αιθανόλης.
- Αποξηραίνουμε το ίζημα στους 56°C σε μονάδα επώασης ξηρής θερμότητας (heat block) έχοντας ανοικτό το καπάκι του σωληναρίου τύπου Eppendorf, ώστε να εξατμιστεί πλήρως η αιθανόλη, καθώς δύναται να αποτελέσει ανασταλτικό παράγοντα στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR). Ο χρόνος της ξήρανσης είναι συνήθως ανάλογος του όγκου του ιζήματος.

## ΛΥΣΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΚΑΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΟΥ ΓΕΝΩΜΙΚΟΥ DNA

Ακολουθεί η λύση των κυττάρων, με σκοπό την απομόνωση του γενωμικού DNA, ως εξής:

1. Επαναδιαλύουμε το ίζημα του ιστού σε 180μL διαλύματος λύσης του ιστού (T1). Προσθέτουμε επίσης 25μL διαλύματος πρωτεΐνάσης K, για την απομάκρυνση των ιστονών και την απελευθέρωση του γενωμικού DNA.
2. Πραγματοποιούμε καλή ανάδευση (vortex) για 30 δευτερόλεπτα, με σκοπό την ομογενοποίηση του ιστού.
3. Τοποθετούμε το δείγμα στους 56°C στη μονάδα επώασης ξηρής θερμότητας για επώαση για τουλάχιστον 16 ώρες.
4. Κατά τη διάρκεια της επώασης αναδεύουμε στο vortex ανά τακτά χρονικά διαστήματα.
5. Το δείγμα αφήνεται σε θερμοκρασία 15°C έως 30°C να ψυχθεί και ακολουθεί σύντομη φυγοκέντρηση (spin-down), ώστε να συλλεχθούν οι υδρατμοί του διαλύματος από τα τοιχώματα και το καπάκι του σωληναρίου.
6. Προσθέτουμε 200 μL διαλύματος λύσης (B3).
7. Επιάζουμε για 10 λεπτά στους 70°C στη μονάδα επώασης ξηρής θερμότητας.
8. Πραγματοποιούμε έντονη ανάδευση (vortex) και προσθέτουμε 210μL απόλυτης αιθανόλης.
9. Ακολουθεί εκ νέου έντονη ανάδευση (vortex) και μεταφορά σε στήλη με φίλτρο (FT) που συνοδεύεται από σωληνάριο μεταφοράς (CT).
10. Φυγοκεντρούμε τα δείγματα στις 14.000 στροφές (rpm) για 2 λεπτά.
11. Απορρίπτεται το εκλούόμενο υγρό του CT και η στήλη FT τοποθετείται σε νέο σωληνάριο συλλογής CT.
12. Ακολουθεί προσθήκη 500μL διαλύματος πλύσης DNA (BW).
13. Επαναλαμβάνουμε το βήμα 10.
14. Το εκλούόμενο υγρό του CT απορρίπτεται και η στήλη FT επανατοποθετείται στο ίδιο σωληνάριο συλλογής CT.
15. Ακολουθεί προσθήκη 600μL διαλύματος πλύσης B5.
16. Τα δείγματα φυγοκεντρούνται εκ νέου στις 14.000 στροφές (rpm) για 2 λεπτά.
17. Η στήλη FT τοποθετείται σε νέο σωληνάριο CT και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 14.000 στροφές (rpm) για 2 λεπτά επιτρέποντας την πλήρη εξάτμιση της



- αιθυλικής αλκοόλης.
18. Τοποθέτηση της στήλης σε σωληνάριο τύπου Eppendorf.
  19. Ακολουθεί η προσθήκη 35μL διαλύματος έκλουσης του DNA (BE) στη στήλη και επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία 15°C-30°C.
  20. Φυγοκεντρούμε στις 14.000 στροφές (rpm) για 2 λεπτά.
  21. Συλλογή του εκλούμενου DNA και επαναλαμβάνουμε τα βήματα 19, 20, 21.
  22. Το δείγμα DNA συλλέγεται και αποθηκεύεται σε θερμοκρασία 5°C-8°C μέχρι την περαιτέρω χρήση του.

## **ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΓΕΝΩΜΙΚΟΥ DNA**

Το DNA απορροφά ακτινοβολία μήκους κύματος 260nm. Βάσει αυτής της ιδιότητάς του, ποσοτικοποιούμε το γενωμικό DNA που έχουμε απομονώσει από τον εκάστοτε ιστό με μέτρηση της απορρόφησης με φασματοφωτόμετρο. Επιπλέον, ανάλογα με τον λόγο των απορροφήσεων (260/280nm) εκτιμάμε την καθαρότητα του DNA. Ένα δείγμα θεωρείται πως είναι καθαρό δίχως προσμίξεις όταν ο προαναφερθέν λόγος κυμαίνεται στο 1,8. Ωστόσο, ένα δείγμα ενδέχεται να μην είναι καθαρό και να έχει προσμίξεις γεγονός που πρόκειται να δράσει σαν ανασταλτικός παράγοντας στην διαδικασία της ενίσχυσης του κατά την διάρκεια της PCR. Στην παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκε το φασματοφωτόμετρο NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific).

### **Πειραματική διαδικασία**

1. Άνοιγμα του συνδεδεμένου με το φασματοφωτόμετρο υπολογιστή και επιλογή του προγράμματος NanoDrop 2000.
2. Επιλέγουμε τη ρύθμιση «Nucleic Acid» η οποία αντιστοιχεί στον προσδιορισμό συγκέντρωσης νουκλεϊκών οξέων.
3. Κάνουμε 3 πλύσεις στο σημείο υποδοχής του δείγματος με 5μl δις απεσταγμένο νερό (ddH<sub>2</sub>O).
4. Μηδενίζουμε το φωτόμετρο χρησιμοποιώντας ως «τυφλό-blank» το διάλυμα έκλουσης (BE) σε όγκο ίσο με την ποσότητα του δείγματος DNA (1,5μl).
5. Σκουπίζουμε με απορροφητικό με χαρτί.
6. Προσθέτουμε 1,5μl δείγματος έπειτα από ήπια ανάδευση με πιπέτα.

7. Μετράμε την απορρόφηση στα 260/280nm και το λόγο της καθαρότητας του δείγματος.
8. Ξεπλένουμε με 1,5 μl DNA BE.
9. Όταν τελειώσει η φωτομέτρηση όλων των δειγμάτων καθαρίζουμε το φασματοφωτόμετρο με δις απεσταγμένο νερό.

Κάθε δείγμα φωτομετρείται 3 φορές και σημειώνουμε τον μέσο όρο των τιμών.

Η εκτίμηση της συγκέντρωσης κάθε δείγματος γίνεται με τη χρήση της τροποποιημένης εξίσωσης Beer – Lambert, σύμφωνα με την οποία εκτιμάται η μοριακή απορρόφηση των νουκλεϊκών οξέων στα 260 nm. Η απορρόφηση υπολογίζεται βάσει της παρακάτω εξίσωσης:

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

Οι συντελεστές μοριακής απορρόφησης για τα νουκλεϊκά οξέα που είναι ευρέως αποδεκτοί είναι:

- Αμιγώς δίκλωνο DNA = 50 ng-cm/μl
- Αμιγώς μονόκλωνο DNA = 33 ng-cm/μl
- Αμιγώς RNA = 40 ng-cm/μl

Με τον υπολογισμό των λόγων 230/280 nm και 260/280 nm, εκτιμάται η καθαρότητα του DNA. Η παρουσία άλλων μακρομορίων, όπως πρωτεΐνες και RNA ή ακόμη και άλλων προσμίξεων, ενδέχεται να οδηγήσει σε λανθασμένη εκτίμηση της συγκέντρωσης του DNA. Ένα υψηλής καθαρότητας RNA θα έχει λόγο ~2,0 (1,8-2,0), αλλά ένα υψηλής ποιότητας DNA θα έχει λόγο 1,8 (1,7-1,9). Κάθε είδους απόκλιση από τις προαναφερόμενες τιμές υποδεικνύει την ύπαρξη ποικίλων προσμίξεων, όπως φαινόλες, πρωτεΐνες ή άλλες ουσίες, που απορροφούν έντονα στα 280 nm.

## ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)

Ένα συγκεκριμένο τμήμα DNA μπορεί να συντεθεί σε τεράστιες ποσότητες χρησιμοποιώντας την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) σε μια *in vitro* ενζυμική αντίδραση. Η μεθοδολογία της βασίζεται στην ενζυμική ενίσχυση της αλληλουχίας-στόχου που ορίζεται εκατέρωθεν με τη χρήση κατάλληλων εκκινητών, συμπληρωματικών ως προς τη μία εκ των δύο αλυσίδων του δίκλωνου DNA, που χρησιμοποιείται ως εκμαγείο.

Η αντίδραση περιλαμβάνει κατά κανόνα 30-40 κύκλους με τα ακόλουθα επιμέρους στάδια:

1. Αποδιάταξη του DNA: στο στάδιο αυτό επιτυγχάνεται η χαλάρωση της δευτεροταγούς δομής του DNA. Συμβαίνει μεταξύ 94°C και 96°C και διαρκεί 20 έως 60 δευτερόλεπτα.
2. Υβριδοποίηση των εκκινητών με τις συμπληρωματικές αλληλουχίες: Η θερμοκρασία καθορίζεται από την αλληλουχία των εκκινητών και κυμαίνεται συνήθως μεταξύ 48°C – 65°C. Το στάδιο αυτό διαρκεί 30-60 δευτερόλεπτα.
3. Επιμήκυνση και σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας του DNA με 5'→3' κατεύθυνση από το ένζυμο DNA πολυμεράση: πραγματοποιείται στους 72°C και διαρκεί από 30 δευτερόλεπτα έως 2 λεπτά.

Με την ολοκλήρωση των επαναλήψεων, δίνεται χρόνος στο ένζυμο να ολοκληρώσει την επέκταση των προϊόντων PCR που δεν είναι πλήρη σε θερμοκρασίες μεταξύ 72°C έως 78°C. Με την ολοκλήρωση της αντίδρασης PCR τα δείγματα φυλάσσονται στο ψυγείο μέχρι την μετέπειτα χρήση τους.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία εξετάσαμε το μοριακό προφίλ των δειγμάτων μας και για να ελέγξουμε την παρουσία ή απουσία της μικροδορυφορικής αστάθειας χρησιμοποιήσαμε τους μονονουκλεοτιδικούς δείκτες BAT-25 , BAT-26 και NR-27. Οι αλληλουχίες των μονονουκλεοτιδικών δεικτών απεικονίζονται στον Πίνακα 2:

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

ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ	ΓΟΝΙΑΙΟ	ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ (5'→3')	ΜΕΓΕΘΟΣ PCR ΠΡΟΙΟΝΤΟΣ (bp)	T <sub>m</sub> (°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 3:** Ποσότητες και συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων της PCR αντίδρασης ανά δείγμα για κάθε δείκτη

Μίγμα αντιδραστηρίων	BAT-25 Όγκος (μl)	BAT-26 Όγκος (μl)	NR-27 Όγκος (μl)
10x ρυθμιστικό διάλυμα	2	2	2
50mM MgCl <sub>2</sub>	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 DNA Polymerase	0.3	0.3	0.3
ddH <sub>2</sub> O	Συμμορφώνεται με βάση την ποσότητα του προστιθέμενου γενωμικού DNA		
Τελικός όγκος αντίδρασης	20	20	20



Εικόνα 18: Θερμικός Κυκλοποιητής τύπου Eppendorf

Οι συνθήκες της αντίδρασης PCR στον θερμικό κυκλοποιητή είναι οι ακόλουθες:

Πίνακας 4: Συνθήκες διεξαγωγής των PCR αντιδράσεων στον θερμικό κυκλοποιητή Master Cycler.

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

Στη συνέχεια, τα προϊόντα της PCR αντίδρασης ελέγχονται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αραρόζης 3%, ώστε να ελεγχθεί εάν είναι επιτυχής η ενίσχυση.

## ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Τα προϊόντα PCR ηλεκτροφορούνται σε πηκτή αγαρόζης με πυκνότητα 3% και βρωμιούχο αιθίδιο (ethidium bromide).

Τα πολυμερή της αγαρόζης είναι μη ομοιοπολικά συνδεδεμένα για να δημιουργήσουν ένα πλέγμα στο οποίο τα μόρια θα διαχωριστούν ανάλογα με τη μοριακή τους μάζα κατά τη διαδικασία παρασκευής της πηκτής αγαρόζης. Η κινητικότητα των μορίων DNA εξαρτάται από τη συγκέντρωση της αγαρόζης, καθώς το μέγεθος των πόρων διευρύνεται αντιστρόφως ανάλογα με τη συγκέντρωση της αγαρόζης και τα μεγάλα μήκους μόρια γενωμικού DNA διαχωρίζονται καλύτερα.

Επιπλέον, το μέγεθος και το φορτίο των μορίων επηρεάζουν τον τρόπο με τον οποίο κινούνται κατά την ηλεκτροφόρηση. Λόγω της παρουσίας φωσφορικών ομάδων στο DNA, που τις καθιστά αρνητικά φορτισμένες, όταν εφαρμόζεται ηλεκτρικό πεδίο, τα μόρια του DNA κινούνται προς την κατεύθυνση του θετικού πόλου. Τα μεγαλύτερα μόρια ρέουν πιο αργά επειδή συναντούν μεγαλύτερη αντίσταση καθώς διαπερνούν τους πόρους της πηκτής, αλλά τα μικρότερα μόρια κινούνται πιο γρήγορα.

Η πηκτή αγαρόζης δημιουργείται με την προσθήκη ενός ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης (Tris Boric EDTA, TBE) για την παροχή της πηγής ιόντων που απαιτείται για την παραγωγή του ηλεκτρικού πεδίου που εξασφαλίζει την κίνηση. Προστίθεται επίσης η χρωστική ουσία βρωμιούχο αιθίδιο, η οποία έχει την ιδιότητα να εισάγεται στη διπλή έλικα του DNA, να ενσωματώνεται ανάμεσα στις βάσεις του και να φθορίζει υπό έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV). Η ποσότητα του δείγματος έχει αναλογικό αντίκτυπο στον φθορισμό.

Σε κάθε δείγμα, πριν από τη φόρτωσή του στα κατάλληλα διαμορφωμένα "πηγαδάκια" της πηκτής αγαρόζης, προστίθεται η χρωστική μπλε της βρωμοφαινόλης, ώστε να είναι ορατή η μετακίνησή του κατά την ηλεκτροφόρηση και να αποφευχθεί η διάχυσή του.

### Παρασκευή πηκτής αγαρόζης σύστασης 3%

1. Σε ζυγό ακριβείας υπολογίζονται 9 γραμμάρια αγαρόζης.
2. Προστίθενται σε κωνική φιάλη, η οποία περιέχει και 300 ml ρυθμιστικού διαλύματος TBE, βάσει της χωρητικότητας του εκμαγείου.

3. Η κωνική φιάλη θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι της πλήρους διαλύσεως του διαλύματος της αγαρόζης.
4. Ανά διαστήματα γίνεται ανάδευση της κωνικής φιάλης.
5. Στη συνέχεια, προστίθενται 20 μl βρωμιούχου αιθιδίου και ακολουθεί ήπια ανάδευση για την ομογενοποίηση.
6. Τοποθέτηση του διαλύματος σε κατάλληλο εκμαγείο, στο οποίο έχει γίνει επεξεργασία και έχει τοποθετηθεί “χτένα”, η αφαίρεση της οποίας επιτρέπει τη δημιουργία κατάλληλων βοθρίων για τη φόρτωση των υπό εξέταση δειγμάτων.
7. Ο πολυμερισμός της πηκτής αγαρόζης επιτυγχάνεται σε θερμοκρασία δωματίου για διάρκεια περίπου 40 λεπτά.
8. Μετά την πήξη της πηκτής αγαρόζης αφαιρείται η χτένα και αποκαλύπτονται τα πηγαδάκια.
9. Η πηκτή αγαρόζης, είναι έτοιμη προς χρήση. Εάν η χρήση δεν είναι άμεση, φυλάσσεται στο ψυγείο, εφόσον προηγουμένως το έχουμε τοποθετήσει σε μεμβράνη για αποφυγή αφυδάτωσής της και στη συνέχεια τυλίγεται σε αλουμινόχαρτο, καθώς το βρωμιούχο αιθίδιο είναι φωτοευαίσθητο.

### **Ηλεκτροφόρηση πηκτώματος αγαρόζης**

Το ρυθμιστικό διάλυμα 1x TBE εισάγεται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης. Για κάθε δείγμα το οποίο θέλουμε να ηλεκτροφορήσουμε, αναμιγνύουμε 10 μl του προϊόντος της αντίδρασης PCR με 5μl χρωστικής μπλε της βρωμοφαινόλης. Για την αξιολόγηση της επιτυχούς PCR αντίδρασης χρησιμοποιείται ένας δείκτης - μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους και μεγέθους (ladder), ο οποίος φορτώνεται ταυτόχρονα στην πηκτή αγαρόζης. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε ο δείκτης 100bp ladder της εταιρείας Invitrogen. Η πηκτή αγαρόζης ηλεκτροφορείται για 30-40 λεπτά σε ηλεκτρικό πεδίο περίπου 80-100 Volt. Στη συνέχεια μεταφέρεται στη συσκευή παρατήρησης και φωτογράφησης UV η οποία είναι συνδεδεμένη με υπολογιστή. Ακολουθεί εκτίμηση της ηλεκτροφόρησης των δειγμάτων, φωτογράφιση και χαρακτηρισμός των δειγμάτων.

## ΤΡΙΧΟΕΙΔΙΚΗ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ (CAPILLARY ELECTROPHORESIS)

Στην παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκε η τριχοειδική ηλεκτροφόρηση και συγκεκριμένα το σύστημα QIAxcel της εταιρείας QIAGEN. Πρόκειται για μία πλήρως αυτοματοποιημένη τριχοειδική ηλεκτροφόρηση υψηλής ανάλυσης η οποία επιτρέπει τον προσδιορισμό των μικροδορυφορικών αλληλουχιών στα δείγματά μας με σχετικά χαμηλό κόστος. Το σύστημα αποτελείται από τα ακόλουθα μέρη: 1) σημείο εισόδου της πλάκας 96 θέσεων, 2) σημείο εισόδου της κασέτας (cartridge) με τα τριχοειδή, 3) θέση που επιτρέπει την επιδιόρθωση της συσκευής και 4) θέση τοποθέτησης της φιάλης αζώτου.



*Εικόνα 19: Κύρια τμήματα του συστήματος QIAxcel.*

### ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ QIAXCEL

1. Στις δυο δεξαμενές της βάσης του Cartridge προστίθενται 10 ml ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης QX και στη συνέχεια καλύπτονται με 2 ml ορυκτέλαιο (mineral oil).
2. Η κασέτα αφήνεται να έρθει σε θερμοκρασία δωματίου για τουλάχιστον 20 λεπτά, καθώς διατηρείται στο ψυγείο και στη συνέχεια την αφαιρούμε από τη συσκευασία. Τυχόν υπολείμματα πηκτής απομακρύνονται προσεκτικά από τα άκρα των τριχοειδών.

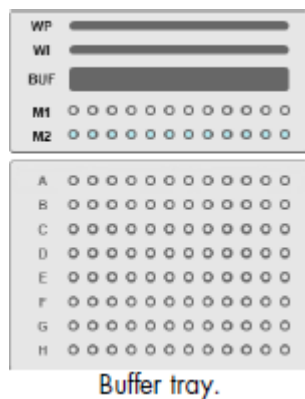




QIAxcel gel cartridge in the QX Cartridge Stand.

**Εικόνα 20:** Κεφαλή Cartridge.

3. Στις θέσεις WP και WI του δίσκου προστίθενται αντίστοιχα 8 ml ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης QX.
4. Στη θέση με το χαρακτηρισμό BUFF προστίθενται 18 ml ρυθμιστικού διαλύματος διαχωρισμού DNA QX.
5. Προκειμένου να αποφευχθεί η εξάτμιση, συμπληρώνονται και οι τρεις θέσεις με QX ορυκτέλαιο.
6. Προσθήκη 2 ml ορυκτέλαιου QX στις θέσεις WP και WI και 4 ml QX στη θέση BUF αντίστοιχα.
7. Στη συνέχεια, προσθέτουμε 15μl δείκτη ευθυγράμμισης QX (QX Alignment Marker) σε κάθε πηγαδάκι μιας σειράς 12 φρεατίων που περιέχουν QX 0,2 ml.
8. Προσθέτουμε μία σταγόνα ορυκτέλαιου QX σε κάθε πηγαδάκι και τοποθετούμε την πλάκα των 96 θέσεων στη θέση M1 του δίσκου αποθήκευσης.
9. Προσθήκη μιας σταγόνας ορυκτέλαιου QX και τοποθέτηση στη θέση M2 του δίσκου αποθήκευσης.

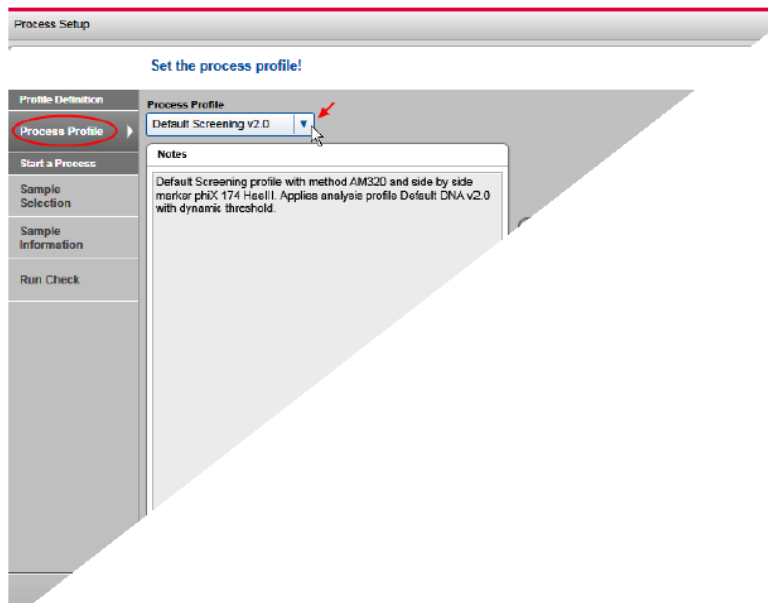


**Εικόνα 21:** Δίσκος τοποθέτησης στο σύστημα QIAxcel.

10. Αρχικά ανοίγουμε το σύστημα QIAxcel Advanced και στη συνέχεια τον υπολογιστή.
11. Συνδεόμαστε στο λογισμικό ScreenGel και επιλέγουμε τη λειτουργία DNA.
12. Επιλέγουμε τη θέση Load Position που επιτρέπει την μετακίνηση της θέσης του buffer tray, το οποίο εξασφαλίζει τη μετακίνηση της βάσης τοποθέτησης.
13. Η κασέτα QIAxcel gel cartridge τοποθετείται στη συσκευή. Η ετικέτα περιγραφής της κασέτας πρέπει να είναι στραμμένη προς τα εμπρός και η οπή καθαρισμού να είναι προς το πίσω μέρος του οργάνου.
14. Εισάγουμε το συνοδευόμενο χαρακτηριστικό κλειδί (smart key) στην κατάλληλη υποδοχή κοντά στην κασέτα.
15. Ο τύπος και τα χαρακτηριστικά στοιχεία της κασέτας εμφανίζονται αυτόματα στον πίνακα παροχής πληροφοριών.

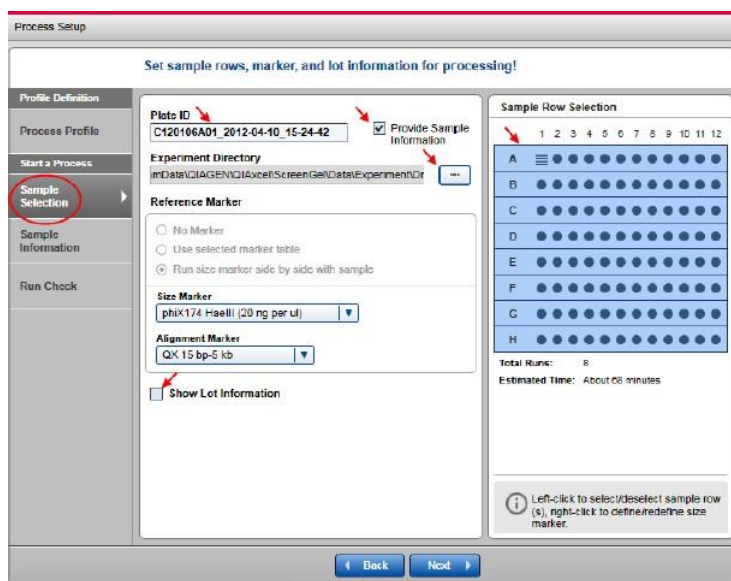
## ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΣΤΟ QIAxCEL ADVANCED

1. Στο λογισμικό του συστήματος QIAxcel, επιλέγουμε ένα προκαθορισμένο προφίλ διεργασίας στην οθόνη Προφίλ διεργασίας.



Εικόνα 22: Επιλογή Προφίλ διεργασίας.

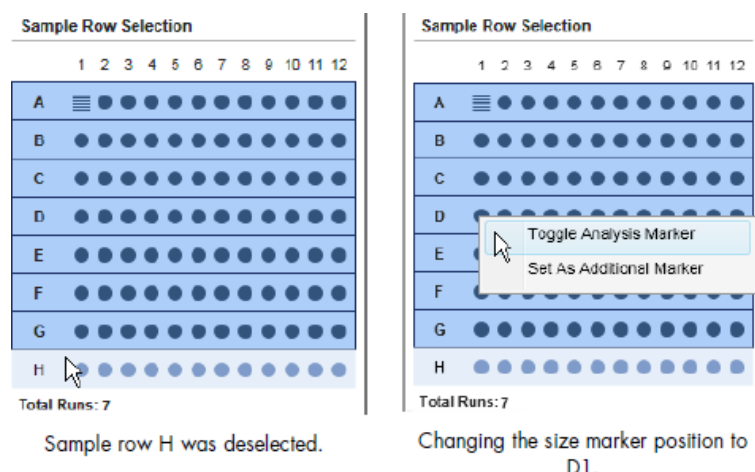
2. Επιλέγοντας το πλήκτρο Next μεταβαίνουμε στην επόμενη σελίδα για την επιλογή των δειγμάτων.



Sample Selection screen.

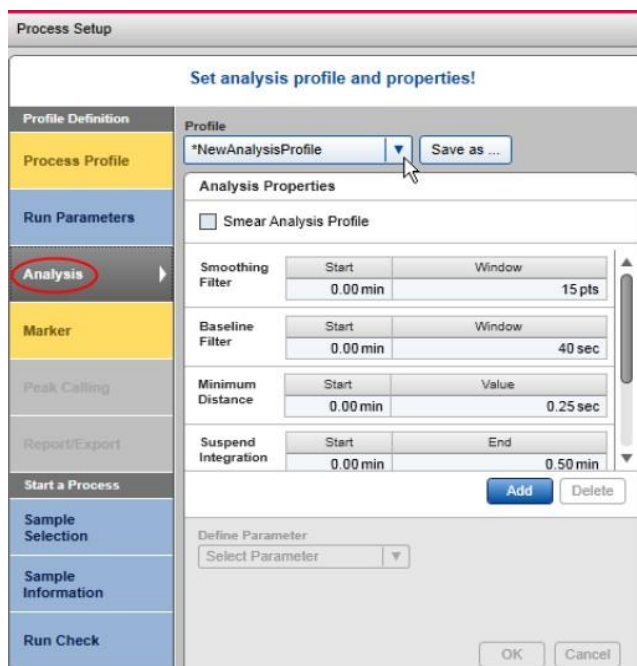
Εικόνα 23: Οθόνη επιλογής δειγμάτων.

3. Η σειρά των υπό εξέταση δειγμάτων μπορεί να διαφοροποιηθεί εάν χρειάζεται. Το αριστερό κλικ παρέχει τη δυνατότητα επιλογής/ αποεπιλογής.



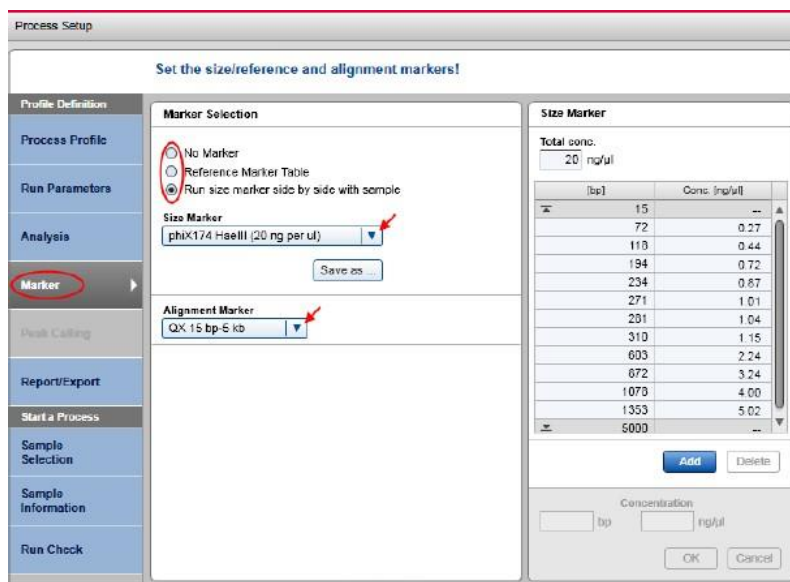
Εικόνα 24: Διαφοροποίηση σειράς δειγμάτων και δείκτη.

4. Επιλέγουμε τη θέση του δείκτη μεγέθους (size marker), εφόσον χρειάζεται και στη συνέχεια επιλέγουμε τον δείκτη ευθυγράμμισης από το πλαίσιο που έχουμε προετοιμάσει.
5. Καθορίζουμε τις παραμέτρους ανάλυσης που θέλουμε από την αριστερή πλευρά της οθόνης του υπολογιστή.



Εικόνα 25: Επιλογή Παραμέτρων Ανάλυσης.

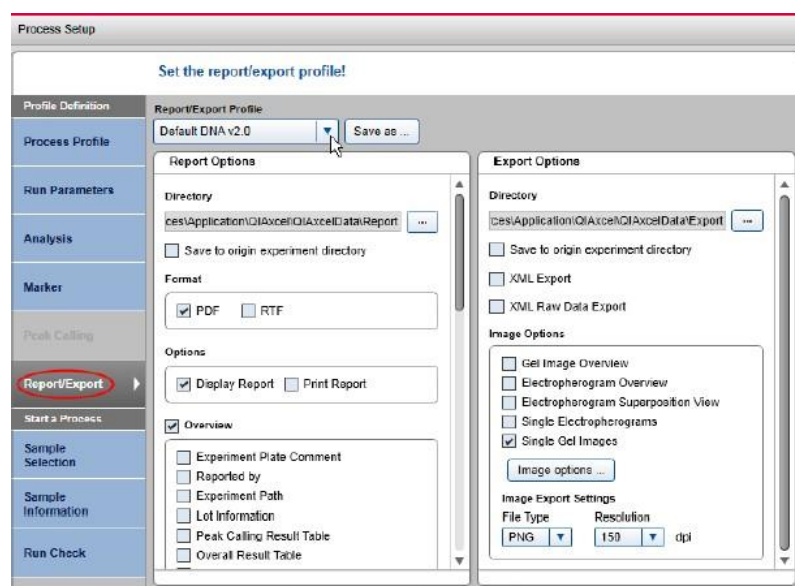
6. Στην αριστερή πλευρά της οθόνης γίνεται επίσης και η επιλογή του κατάλληλου δείκτη ευθυγράμμισης (alignment marker).



Marker selection.

Εικόνα 26: Επιλογή δεικτών από το Marker Panel.

7. Οι παράμετροι Report/Export τροποποιούνται από τον αντίστοιχο πίνακα.



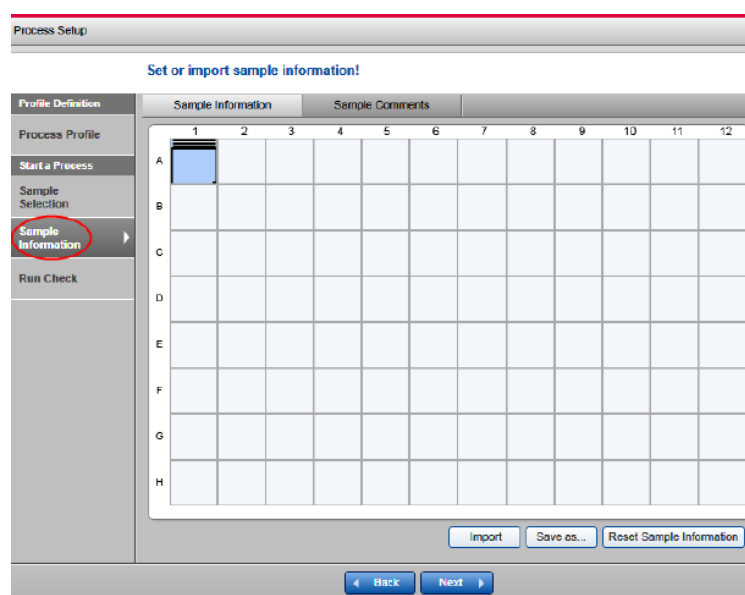
Selecting a report/export profile.

**Εικόνα 27:** Επιλογή παραμέτρων.

8. Επιλέγουμε τις παραμέτρους, που επιθυμούμε να εμπεριέχονται στην ανάλυση των αποτελεσμάτων της ηλεκτροφόρησης, όπως είναι το μέγεθος και το ύψος της κορυφής, η συγκέντρωση του δείγματος, η μοριακότητα δείγματος.

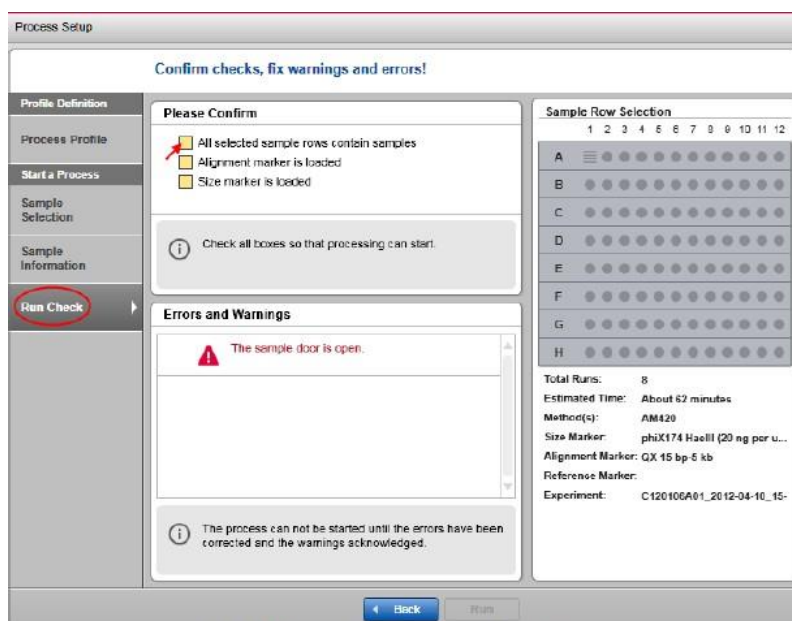
9. Στη συνέχεια, επιλέγοντας την ένδειξη Next, προχωράμε στην επόμενη οθόνη, που παρέχονται οι πληροφορίες των δειγμάτων.

10. Επιλέγοντας και πάλι την ένδειξη Next περνάμε στην επόμενη οθόνη, Run Check.



Sample Information screen.

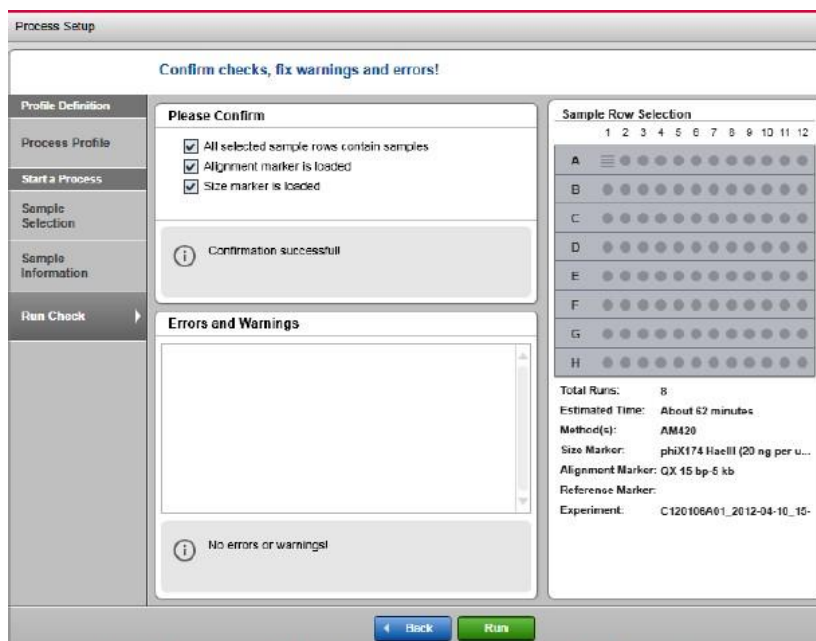
**Εικόνα 28:** Εισαγωγή στοιχείων των δειγμάτων.



Run Check screen with "Sample door is open" error.

Εικόνα 29: Οθόνη ρύθμισης παραμέτρων.

Εφόσον ελέγξουμε προσεκτικά όλα τα πεδία που έχουμε συμπληρώσει, επιλέγουμε την ένδειξη RUN για να ξεκινήσει η διαδικασία.

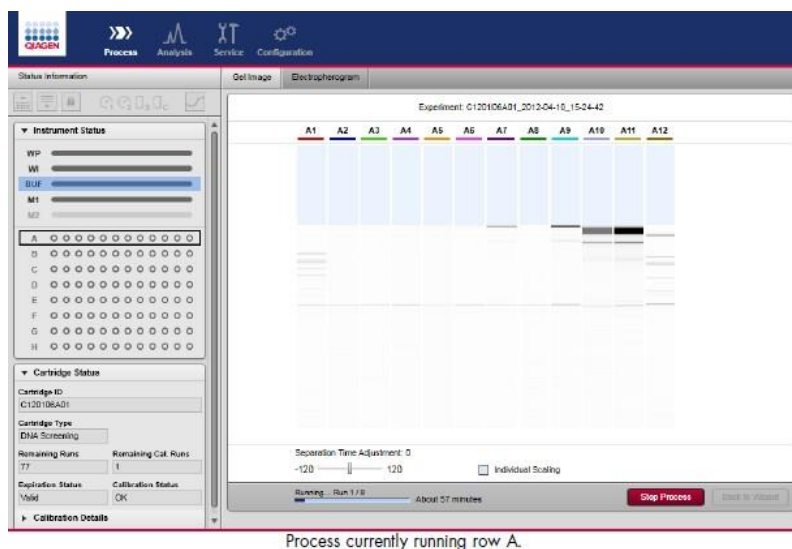


Run Check screen with all confirmation boxes checked and all problems resolved.

Εικόνα 30: Έλεγχος των επιλεγμένων πεδίων.



Μετακινώντας τη μπάρα στο πλαίσιο Separation Time Adjustment στο κάτω μέρος της οθόνης, ρυθμίζουμε τον χρόνο διαχωρισμού. Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης τα δείγματα απεικονίζονται ακολούθως (Εικόνα 31):



**Εικόνα 31:** Απεικόνιση δειγμάτων ηλεκτροφόρησης.

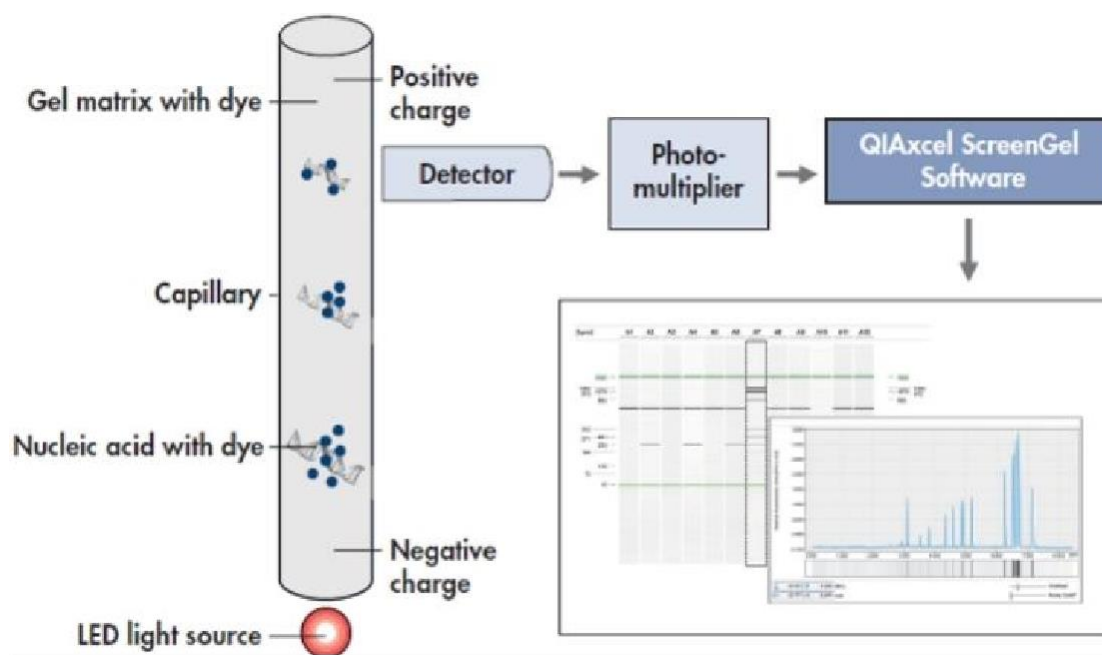
Για την ανάλυση των δειγμάτων μας, επιλέγουμε το παράθυρο Analysis και επιλέγουμε το πείραμα που μας ενδιαφέρει σύροντάς το στο κέντρο της οθόνης. Οι παράμετροι ανάλυσης που μπορούμε να επιλέξουμε περιλαμβάνουν: την απεικόνιση της πηκτής, το διάγραμμα ηλεκτροφόρησης για κάθε δείγμα και τις κορυφές των δειγμάτων. Επιπλέον, υπάρχει διαθέσιμη η επιλογή για την επαναφορά του ορίου ανίχνευσης ενός πειράματος.

Το πείραμα αποθηκεύεται μέσω της ένδειξης “File” στο επάνω μέρος της οθόνης, επιλέγοντας το πλαίσιο “Save File As”, για να ορίσουμε τον επιθυμητό φάκελο.

Μετά την ολοκλήρωση του πειράματος κλείνουμε το μηχάνημα. Αρχικά επιλέγουμε την ένδειξη “Unlatch” στο επάνω μέρος της οθόνης, ώστε να απασφαλιστεί η κασέτα και στη συνέχεια επιλέγοντας το πεδίο “Load Position” η κασέτα μετακινείται στην πρόσθια θέση του μηχανήματος. Στη συνέχεια αποσυνδέοντας το κλειδί αφαιρούμε την κασέτα, σκουπίζουμε τις περιττές σταγόνες με ένα χαρτομάντηλο και την επαναφέρουμε στη θήκη της. Αποθηκεύεται στο ψυγείο (συντήρηση) σε όρθια θέση μέχρι την επόμενη χρήση της. Όσον αφορά το μηχάνημα QIAxcel, αποσυνδέουμε το λογισμικό σύστημα και κλείνουμε το μηχάνημα και τον υπολογιστή.

## ΑΡΧΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΤΗΣ ΤΡΙΧΟΕΙΔΙΚΗΣ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗΣ

Η χρήση του προηγμένου συστήματος QIAxcel Advanced επιτρέπει τον διαχωρισμό των μορίων DNA ανάλογα με το μέγεθός τους όταν εφαρμόζεται ηλεκτρικό ρεύμα. Το συγκεκριμένο σύστημα αποτελείται από δώδεκα μεμονωμένα τριχοειδή. Κάθε τριχοειδές περιέχει πηκτή ακρυλαμιδίου, εμποτισμένη με βρωμιούχο αιθίδιο. Όπως συμβαίνει σε κάθε εφαρμογή ηλεκτροφόρησης, το αρνητικά φορτισμένο δείγμα DNA μετακινείται μέσω της πηκτής και υπό την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου, προς την θετικά φορτισμένη περιοχή. Τα δείγματα περνούν μέσω μίας πηγής υπεριώδους φωτός (LED light source) η οποία συνδυάζεται με έναν ενισχυτή φωτεινής δέσμης (Photo-multiplier). Μέσω του λογισμικού προγράμματος του συστήματος QIAxcel για κάθε δείγμα δημιουργείται εικόνα και διάγραμμα ηλεκτροφόρησης (Dean et al.,2013, American Laboratory articles, 2013).

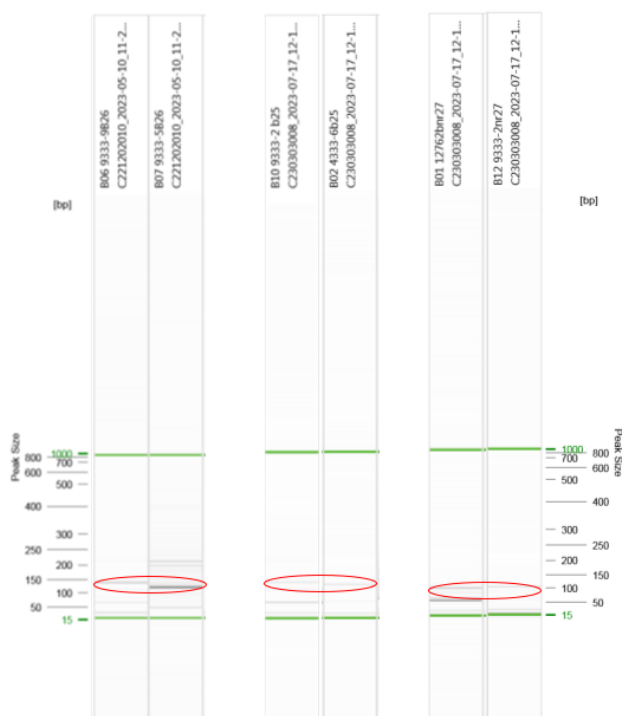


**Εικόνα 32:** Αρχή λειτουργίας του συστήματος QIAxcel. (Πηγή: American Laboratory articles, 2013).

Τα PCR προϊόντα αναλύθηκαν στο σύστημα QIAxcel χρησιμοποιώντας παράλληλα έναν δείκτη ευθυγράμμισης (Alignment marker) μεγέθους 15bp/400bp. Ο διαχωρισμός πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστικού οίκου. Οι συνθήκες της ηλεκτροφόρησης περιλαμβάνουν την εφαρμογή τάσης 2 KV, χρόνο έγχυσης δειγμάτων 40 δευτερόλεπτα και 30 δευτερολέπτων για τον δείκτη ευθυγράμμισης. Ο συνολικός χρόνος διαχωρισμού ορίστηκε στα 700 δευτερόλεπτα. Τα

δείγματα προστέθηκαν σε πλάκα 96 θέσεων και σε κάθε σειρά τοποθετήσαμε και έναν δείκτη γνωστού μεγέθους (DNA size marker). Σε κάθε φρεάτιο αναμίξαμε και φορτώσαμε 3μl δείγματος και 12μl διαλύματος αραιώσης. Ίδιες αναλογίες χρησιμοποιήθηκαν και για τον μάρτυρα.

Εφόσον τα δείγματα που ηλεκτροφορούνται είναι λιγότερα από τις 12 θέσεις της κάθε σειράς, οι κενές θέσεις πληρούνται με 15μl διαλύματος αραιώσης. Μόλις ετοιμαστεί η πλάκα φορτώνεται στο σύστημα Qiaxcel ακολουθώντας την προαναφερόμενη διαδικασία.



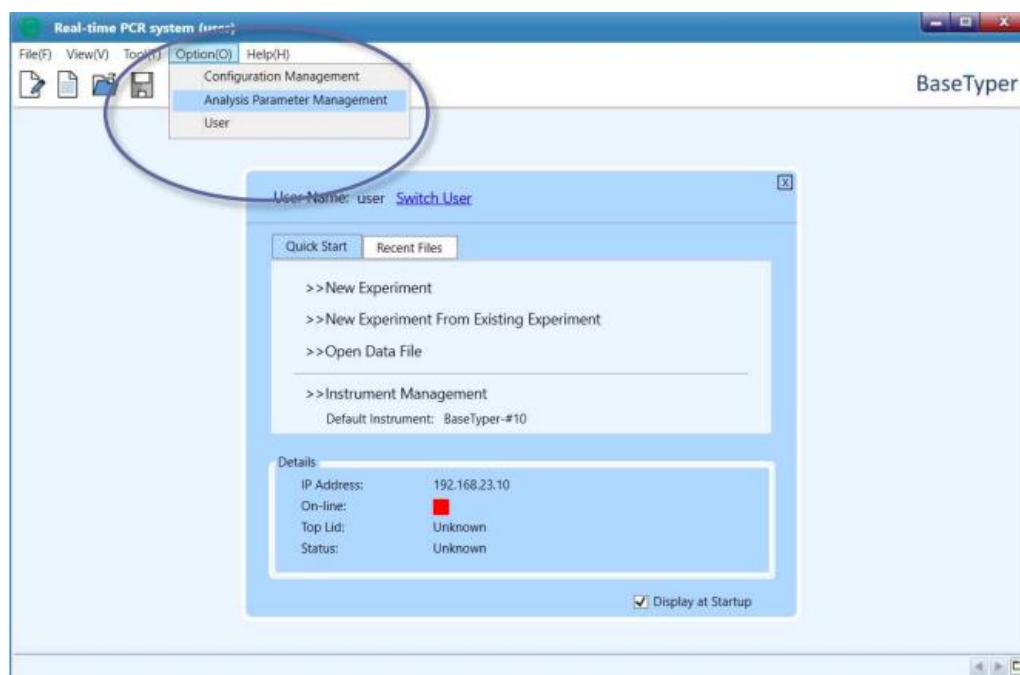
**Εικόνα 33:** Απεικόνιση Qiaxcel, MSI για τους δείκτες BAT-26, BAT-25, NR-27 αντίστοιχα.

## **ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΔΟΥΡΥΦΟΡΙΚΗΣ ΑΣΤΑΘΕΙΑΣ ΣΕ ΑΝΑΛΥΤΗ BASETYPER**

Η ανάλυση MicroSight® MSI 1-step HRM βασίζεται στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (RT-PCR), ακολουθούμενη από HRM ανάλυση στον θερμικό κυκλοποιητή BaseTyper™ 48 Real-Time PCR. Η ανάλυση προορίζεται για την ποιοτική αξιολόγηση της μικροδορυφορικής αστάθειας (MSI). Εκτιμά την παρουσία ή απουσία αστάθειας πέντε μονονουκλεοτιδικών μικροδορυφορικών αλληλουχιών: BAT25, BAT26, NR22, NR24 και MONO27. Τα προϊόντα της PCR αναλύονται με βάση το προφίλ τήξης τους. Τα διαφορετικά μήκη των μικροδορυφόρων επηρεάζουν τη μορφή της καμπύλης τήξης και έτσι είναι δυνατή η διάκριση μεταξύ των όγκων MSS και MSI. Το MicroSight® MSI 1-step HRM Analysis είναι κατάλληλο για την ανάλυση γενωμικού DNA (gDNA) και επιτρέπει την ανάλυση σε ζεύγη ή μη. Οι καμπύλες τήξης του DNA του καρκινικού ιστού συγκρίνονται με τις καμπύλες τήξης του DNA παρακείμενου φυσιολογικού ιστού ή του γενωμικού DNA αναφοράς για την ανίχνευση διαφορών στην τήξη, που αντικατοπτρίζει τη διακύμανση μήκους των μικροδορυφορικών αλληλουχιών.

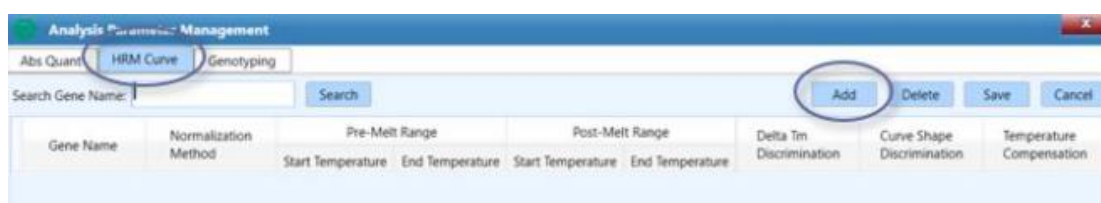
## ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ

1. Αφού ανοίξουμε το μηχάνημα BaseTyper, ανοίγουμε τον υπολογιστή και συνδεόμαστε στο πρόγραμμα Pentabase.
2. Επιλέγουμε την ένδειξη Option (O) και μεταφερόμαστε στο παράθυρο Analysis Parameter Management.



Εικόνα 34: Ρύθμιση διαχείρισης παραμέτρων ανάλυσης του BaseTyper™.

Επιλέγουμε την ένδειξη HRM Curve και στη συνέχεια την ένδειξη Add.



Εικόνα 35: Προσθήκη HRM καμπύλης.

Πληκτρολογούμε «BAT25» κάτω από την στήλη Gene Name και συμπληρώνουμε την στήλες όπως φαίνεται στην Εικόνα 36.

Επαναλαμβάνουμε τη διαδικασία για τους δείκτες «BAT26, NR22, NR24, MONO27» επιλέγοντας την ένδειξη Add και συμπληρώνοντας με τις αντίστοιχες πληροφορίες όπως φαίνονται παρακάτω.

Επιλέγουμε την ένδειξη Save.

Gene Name	Normalization Method	Pre-Melt Range		Post-Melt Range		Delta Tm Discrimination	Curve Shape Discrimination	Temperature Compensation
		Start Temperature	End Temperature	Start Temperature	End Temperature			
BAT25	Ratio Method	38,000	39,000	63,000	64,000	1,000	-0,040	0,1000
BAT26	Ratio Method	43,000	44,000	65,000	66,000	1,000	-0,030	0,1000
NR22	Ratio Method	44,000	45,000	66,000	67,000	1,000	-0,030	0,1000
NR24	Ratio Method	44,000	45,000	66,000	67,000	1,000	-0,040	0,1000
MONO27	Ratio Method	45,000	46,000	67,000	68,000	1,000	-0,040	0,1000

Εικόνα 36: Ρύθμιση παραμέτρων HRM.

## ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΓΙΑ PAIRED-SAMPLES

Στην συγκεκριμένη διαδικασία, για κάθε ασθενή συμπεριλαμβάνεται δείγμα γενωμικού DNA (gDNA) που προέρχεται από φυσιολογικό παρακείμενο ιστό. Επιπροσθέτως, χρησιμοποιούμε ως δείγματα ελέγχου ένα θετικό μάρτυρα (positive control), ο οποίος περιέχει 20% 1ng/μL ποσότητα καρκινικής κυτταρικής σειράς με MSI, και έναν αρνητικό μάρτυρα (negative control) που περιέχει 1 ng/μL ανθρώπινου gDNA με παρόμοια μήκη DNA με αυτά των πέντε υπό διερεύνηση γονιδιακών τόπων. Τα τοποθετούμε σε δύο σειρές (strips) αντίστοιχα, με τον αρνητικό και θετικό μάρτυρα να αντιπροσωπεύουν το γενωμικό DNA του φυσιολογικού και του νεοπλασματικού ιστού αντίστοιχα του ίδιου ασθενούς.

### Προετοιμασία της ανάλυσης MicroSight® MSI 1-step HRM Analysis assay

1. Χρησιμοποιούμε δύο σειρές PCR Ready-to-Use (σειρά 1 και σειρά 2) για κάθε ασθενή που πρόκειται να αναλυθεί. Σε μία εφαρμογή, μπορούν να αναλυθούν έως τέσσερις ασθενείς.
2. Πραγματοποιούμε μία σύντομη φυγοκέντρηση της κάθε σειράς PCR (1-2 λεπτά στις 4000-5000 στροφές ανά λεπτό) για να διασφαλίσουμε ότι όλα τα αντιδραστήρια έχουν συγκεντρωθεί στον πυθμένα σε κάθε πηγαδάκι της σειράς.

### Προσθήκη DNA στους σωλήνες

Η συγκέντρωση του DNA πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 1-10 ng/μL, αλλά συνιστάται η χρήση 2-5 ng/μL. Χρησιμοποιούμε την ίδια συγκέντρωση για το DNA του φυσιολογικού και του καρκινικού δείγματος από κάθε ασθενή.

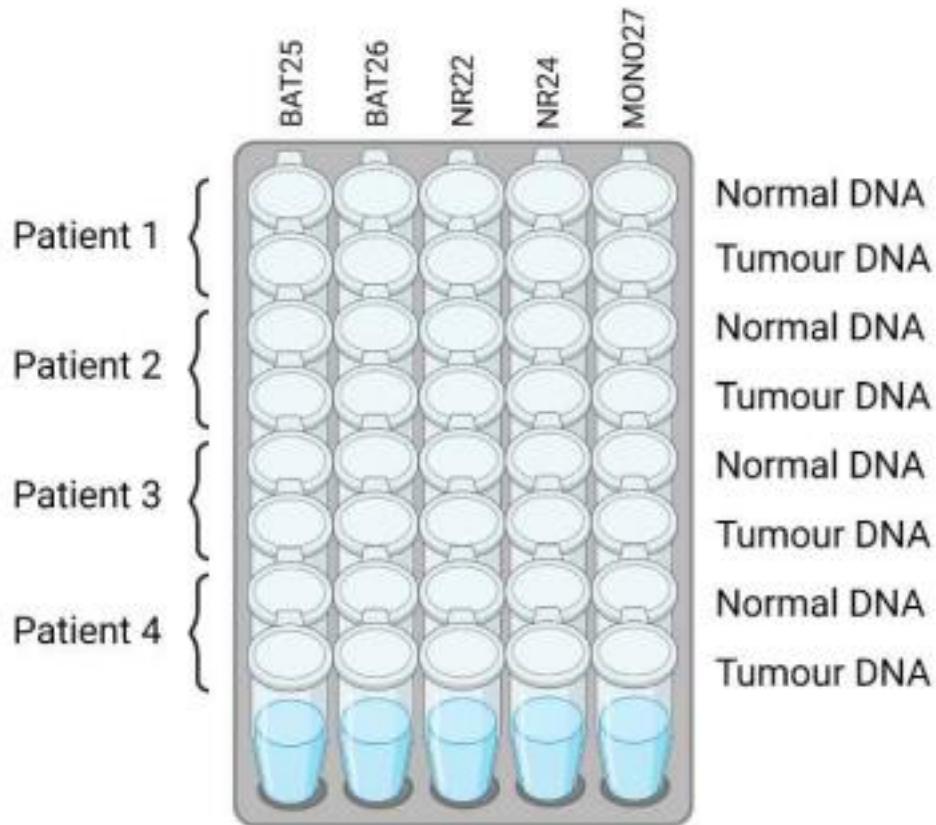


1. Αναδεύουμε τα δείγματα DNA με Vortex λίγο πριν από τη χρήση.
2. Προσθέτουμε 5  $\mu\text{L}$  DNA από τον φυσιολογικό ιστό του ασθενούς, 1 σε καθένα από τα 5 σωληνάρια της σειράς 1. Σφραγίζουμε όλα τα σωληνάρια.
3. Προσθέτουμε 5  $\mu\text{L}$  DNA από τον καρκινικό ιστό του ασθενούς, 1 σε καθένα από τα 5 σωληνάρια της σειράς 2. Σφραγίζουμε όλα τα σωληνάρια.
4. Επαναλαμβάνουμε για τους ασθενείς 2 έως 4.

#### **Τοποθέτηση σειρών (strips) στον αναλυτή**

1. Πραγματοποιούμε σύντομο vortex στις σειρές (2-5 δευτερόλεπτα) για να ενισχύσουμε την απομάκρυνση των φυσαλίδων αέρα και φυγοκεντρούμε σύντομα τις σειρές PCR (1-2 λεπτά στις 4000-5000 rpm).
2. Τοποθετούμε τα σωληνάρια PCR στον αναλυτή BaseTyper™. Το φυσιολογικό δείγμα του ασθενούς 1 τοποθετείται στη θέση με τη σήμανση A1 και το καρκινικό δείγμα του ασθενούς 1 τοποθετείται στη θέση με τη σήμανση B1. Επαναλαμβάνουμε για τους ασθενείς 2 (C1, D1), 3 (E1, F1) και 4 (H1, G1).

Στη περίπτωση που επιλέξουμε ανάλυση μη ζευγαρωμένων δειγμάτων (unpaired sample analysis), αντί για δείγμα gDNA από φυσιολογικό ιστό, επιλέγεται ένα καθολικό δείγμα αναφοράς το οποίο παρέχεται με το κιτ. Σ' αυτό εμπεριέχεται 1 ng/ $\mu\text{L}$  ανθρώπινου gDNA με παρόμοια μήκη DNA με αυτά των πέντε υπό διερεύνηση γονιδιακών τόπων. Για κάθε εκτέλεση PCR, πρέπει να περιλαμβάνεται μία σειρά (strip) που να περιέχει τον μάρτυρα αναφοράς.



Εικόνα 37: Τοποθέτηση των strips στο μηχάνημα BaseTyper™.

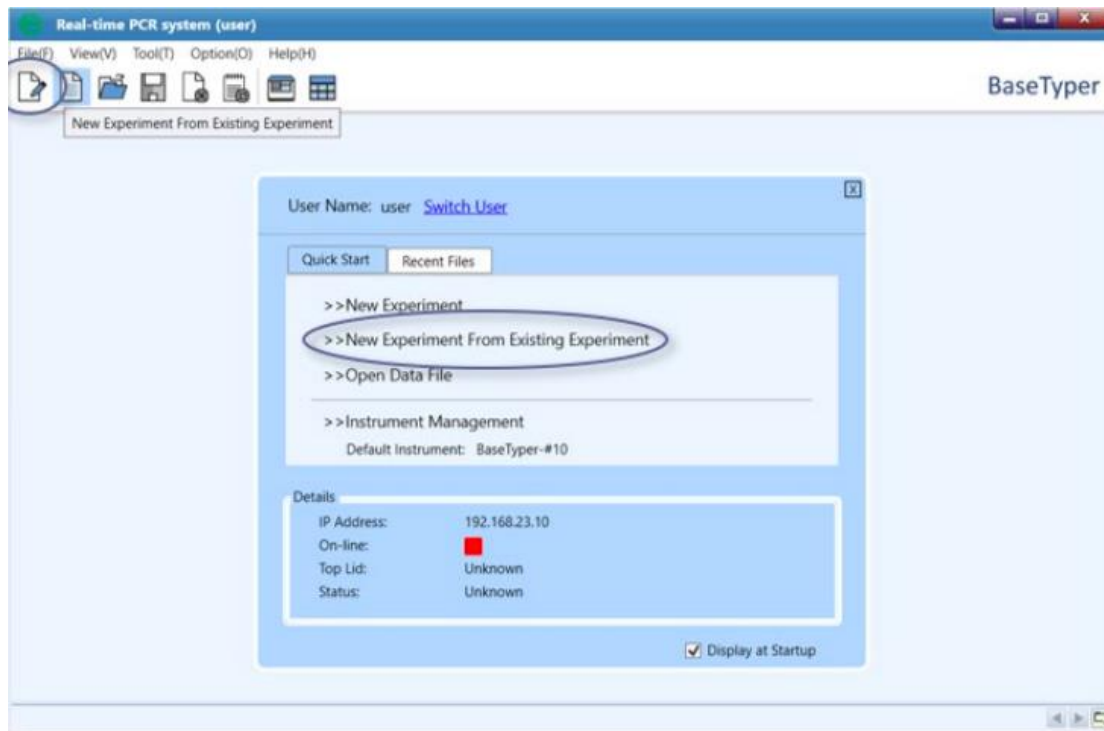
## ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

### PAIRED-SAMPLE ANALYSIS

Στο λογισμικό BaseTyper™ Instrument, επιλέγουμε New Experiment From Existing Experiment και ανοίγουμε το πρότυπο "MSI BASETYPER TEMPLATE - PAIRED SAMPLES v1.0".

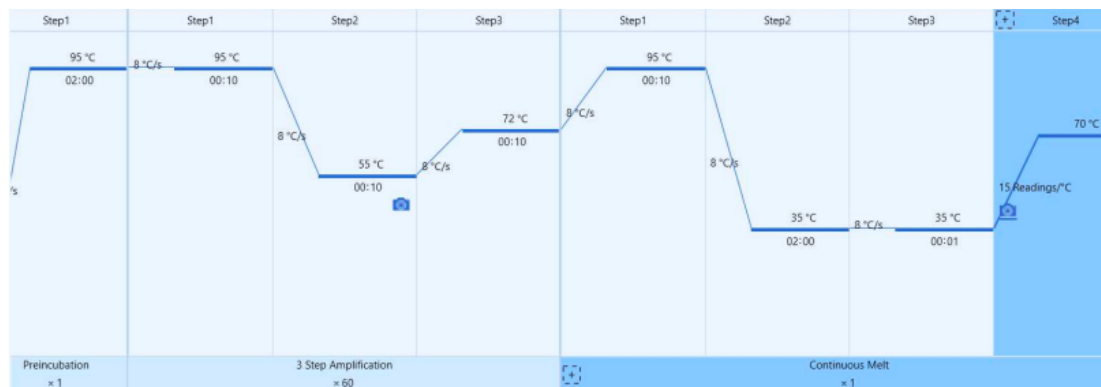
### UNPAIRED-SAMPLE ANALYSIS

Στο λογισμικό BaseTyper™ Instrument, επιλέγουμε New Experiment From Existing Experiment και ανοίγουμε το πρότυπο MSI BASETYPER TEMPLATE – UNIVERSAL REFERENCE v2.1".



**Εικόνα 38:** Ρύθμιση νέας ανάλυσης για Paired-Samples.

1. Ονομάζουμε το πείραμα με τους αναγνωριστικούς αριθμούς των δειγμάτων όγκου.
2. Το προφίλ θερμοκρασίας ρυθμίζεται στην ενότητα Run Setting (Ρύθμιση εκτέλεσης).

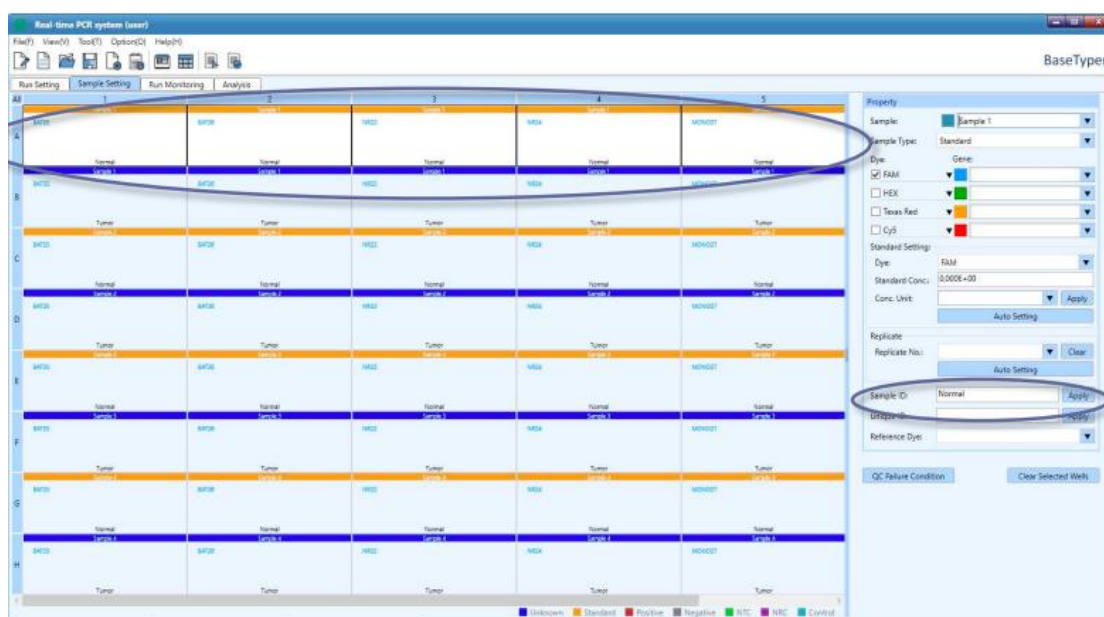


**Εικόνα 3939:** Ρύθμιση προφίλ θερμοκρασίας του πειράματος.

3. Ρυθμίζουμε τον όγκο αντίδρασης στα 24  $\mu$ L στην περιοχή Experiment (Πείραμα) στην καρτέλα Run Setting (Ρύθμιση εκτέλεσης).
4. Μεταβαίνουμε στην καρτέλα Sample Setting (Ρύθμιση δείγματος).

Για την Paired-Sample analysis καταχωρούμε τα δείγματα σημειώνοντας μια σειρά από 1-5.

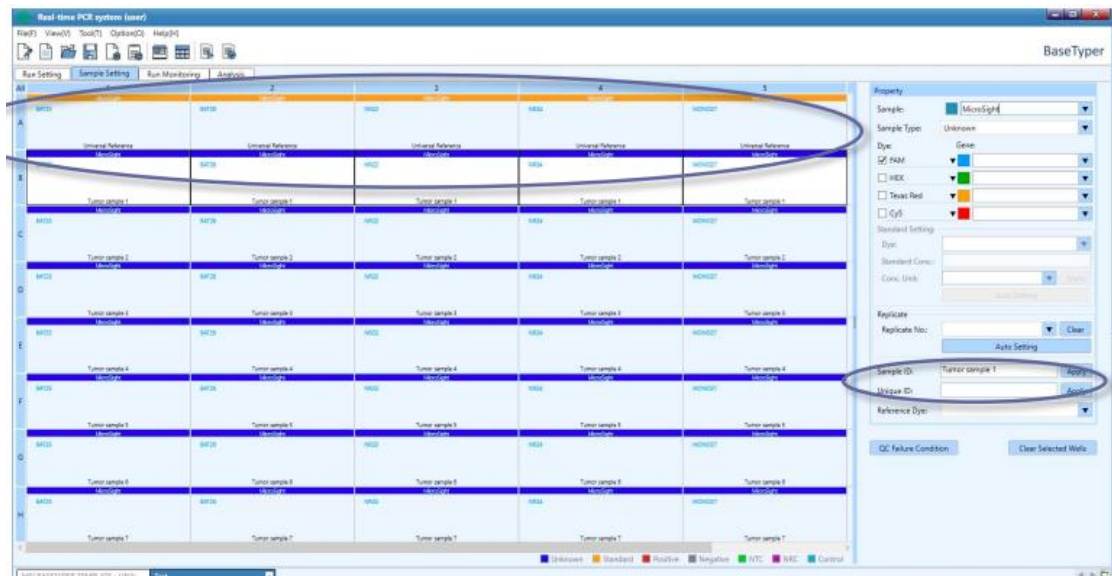
- Για τη σειρά A1-A5: Στο πλαίσιο Sample ID πληκτρολογούμε το ID του δείγματος μετά το "Normal". Πατάμε "enter".
- Για τη σειρά B1-B5: Στο πλαίσιο Sample ID πληκτρολογούμε το sample ID μετά το "Tumour". Πατάμε "enter".
- Επαναλαμβάνουμε την ίδια διαδικασία για όλες τις σειρές που περιέχουν δείγματα.



Εικόνα 40: Επεξεργασία ονομασίας δειγμάτων (paired-analysis).

Για την Unpaired-Sample analysis:

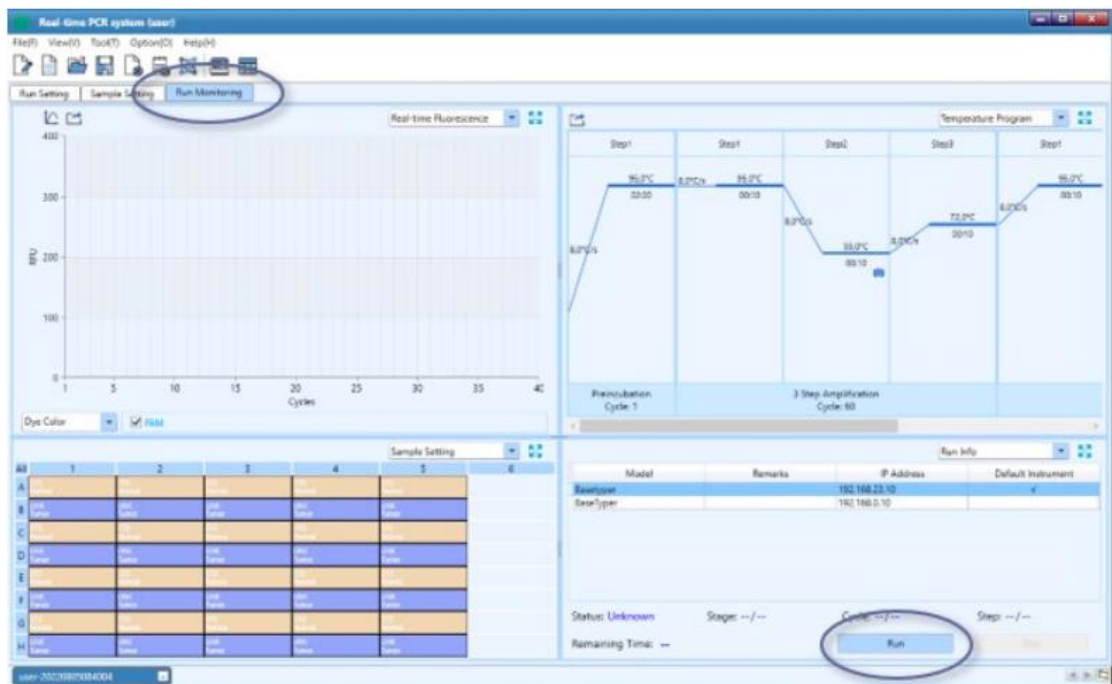
- Αφήνουμε την ονομασία για τις θέσεις A1-A5 ως έχει.
- Για τη σειρά B1-B5: Διαγράφουμε το όνομα "Tumour sample 1" και πληκτρολογούμε το όνομα του δείγματός μας στο πεδίο Sample ID . Πιέζουμε το πλήκτρο "enter" στο πληκτρολόγιο.
- Επαναλαμβάνουμε τη διαδικασία για όλες τις σειρές που περιέχουν δείγματα.



Εικόνα 41: Ρύθμιση ονομασίας δειγμάτων για Unpaired analysis.

## ΕΚΚΙΝΗΣΗ ΤΗΣ ΕΚΤΕΛΕΣΗΣ

1. Μεταβαίνουμε στην καρτέλα παρακολούθησης Run Monitoring.
2. Επιλέγουμε το όργανο στο πεδίο Model στο παράθυρο Run Info και επιλέγουμε την ένδειξη Run.



Εικόνα 4240: Εκκίνηση του run.

## ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Οι μικροδορυφορικές αλληλουχίες αξιολογούνται μεμονωμένα συγκρίνοντας τις ιδιότητες τήξης των αμπλικονίων του DNA του όγκου του ασθενούς με εκείνες που παρατηρούνται κατά την εφαρμογή του φυσιολογικού DNA του ασθενούς (paired analysis) ή του καθολικού DNA αναφοράς (unpaired analysis). Τόσο τα μικρότερα όσο και τα μεγαλύτερα αμπλικόνια των μικροδορυφόρων αποτελούν ενδείξεις αστάθειας.

Η τιμή Ct της ανάλυσης MONO27 χρησιμοποιείται για να επικυρώσει ότι η συγκέντρωση του πολλαπλασιαζόμενου DNA στο δείγμα είναι αποδεκτή. Αυτό επιτυγχάνεται με την ανάγνωση της τιμής Ct για το MONO27 για κάθε δείγμα (συμπεριλαμβανομένου του universal reference για unpaired analysis) στο Analysis Abs Quant (Stage2\_Step2). Εάν η τιμή Ct για το MONO27 είναι μεγαλύτερη από 35, η συγκέντρωση του δείγματος είναι πολύ χαμηλή και η εκτέλεση είναι άκυρη.

Προκειμένου να δούμε τα αποτελέσματα της ανάλυσης πιέζουμε Analysis Settings και επιλέγουμε Manual Baseline. Αλλάζουμε τον κύκλο έναρξης σε έναν κύκλο μετά την εξαφάνιση του αέρα (π.χ. 15) και τον κύκλο λήξης σε έναν αριθμό κύκλων πριν από την εκθετική φάση των καμπυλών PCR (π.χ. 20). Επιλέγουμε την ένδειξη OK.

Well	Dye	Start Cycle	End Cycle	Start Cycle	End Cycle
A1	FAM	5	29	15	20
A2	FAM	2	29	15	20
A3	FAM	4	26	15	20
A4	FAM	5	26	15	20
A5	FAM	5	27	15	20
A6	FAM	2	27	15	20
B1	FAM	5	29	15	20
B2	FAM	5	29	15	20

Dye	Gene	Auto Threshold	Manual Threshold
FAM	NR22	607.24	607.24
FAM	NR24	431.43	431.43
FAM	MONO27	-1.58	-1.58

Εικόνα 43: Προσαρμογή των παραμέτρων για ανάλυση των αποτελεσμάτων.



## ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

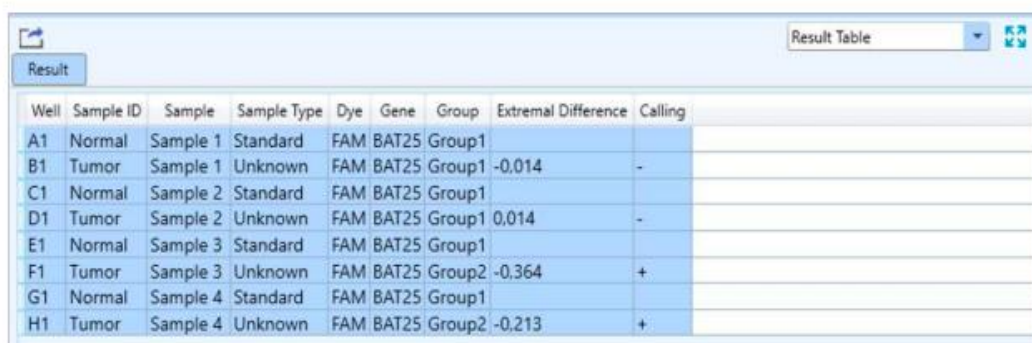
Αξιολόγηση της σταθερότητας των μικροδορυφορικών τόπων για paired και unpaired δείγματα.

1. Μεταβαίνουμε στην καρτέλα Analysis και επιλέγουμε New Analysis.
2. Επιλέγουμε High Resolution Melt στο παράθυρο New Analysis.
3. Επιλέγουμε All Select στο παράθυρο Select HRM Gene και τέλος την ένδειξη OK.

Στη συνέχεια θα ανοίξουν πέντε καρτέλες HRM, μία για κάθε γονιδιακό τόπο. Πηγαίνουμε στο HRM BAT25 (Stage3). Στην ενότητα Πίνακας αποτελεσμάτων απεικονίζονται τα αποτελέσματα για συγκεκριμένο κάθε φορά γενετικό τόπο.

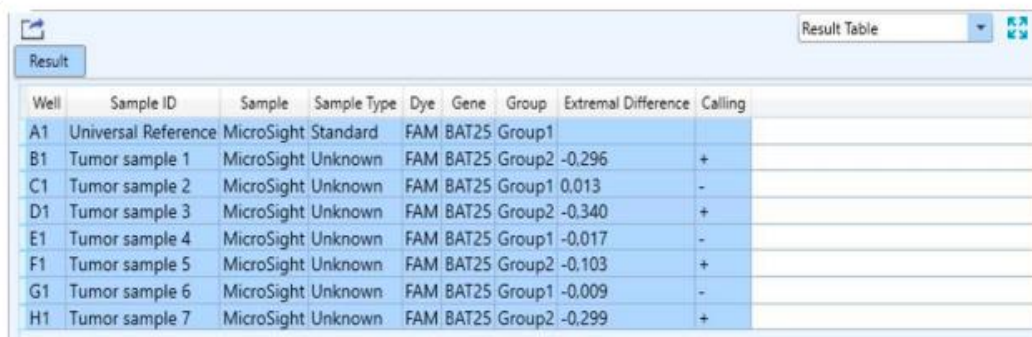
Ένα "+" στη στήλη "Calling" σημαίνει ότι το δείγμα είναι ασταθές σε αυτόν τον τόπο και ένα "-" στη στήλη "Calling" σημαίνει ότι το δείγμα είναι σταθερό. Επαναλαμβάνουμε για BAT26, NR22, NR24 και MONO27. Ένα παράδειγμα paired και unpaired ανάλυσης παρουσιάζεται στην Εικόνα 44.

**A.**



Well	Sample ID	Sample	Sample Type	Dye	Gene	Group	Extremal Difference	Calling
A1	Normal	Sample 1	Standard	FAM	BAT25	Group1		
B1	Tumor	Sample 1	Unknown	FAM	BAT25	Group1	-0.014	-
C1	Normal	Sample 2	Standard	FAM	BAT25	Group1		
D1	Tumor	Sample 2	Unknown	FAM	BAT25	Group1	0.014	-
E1	Normal	Sample 3	Standard	FAM	BAT25	Group1		
F1	Tumor	Sample 3	Unknown	FAM	BAT25	Group2	-0.364	+
G1	Normal	Sample 4	Standard	FAM	BAT25	Group1		
H1	Tumor	Sample 4	Unknown	FAM	BAT25	Group2	-0.213	+

**B.**



Well	Sample ID	Sample	Sample Type	Dye	Gene	Group	Extremal Difference	Calling
A1	Universal Reference	MicroSight	Standard	FAM	BAT25	Group1		
B1	Tumor sample 1	MicroSight	Unknown	FAM	BAT25	Group2	-0.296	+
C1	Tumor sample 2	MicroSight	Unknown	FAM	BAT25	Group1	0.013	-
D1	Tumor sample 3	MicroSight	Unknown	FAM	BAT25	Group2	-0.340	+
E1	Tumor sample 4	MicroSight	Unknown	FAM	BAT25	Group1	-0.017	-
F1	Tumor sample 5	MicroSight	Unknown	FAM	BAT25	Group2	-0.103	+
G1	Tumor sample 6	MicroSight	Unknown	FAM	BAT25	Group1	-0.009	-
H1	Tumor sample 7	MicroSight	Unknown	FAM	BAT25	Group2	-0.299	+

**Εικόνα 44:** A. Paired sample analysis. B. Unpaired sample analysis. Το σύμβολο "+" αντιπροσωπεύει τα δείγματα με μικροδορυφορική αστάθεια στον εκάστοτε δείκτη. Το σύμβολο "-" αντιπροσωπεύει τη μικροδορυφορική σταθερότητα στον εκάστοτε δείκτη.



Τα δείγματα των ασθενών στην paired ανάλυση κατηγοριοποιούνται είτε ως σταθερά (MSS, μηδέν ασταθείς τόποι), είτε ως χαμηλού βαθμού ασταθή (MSI-L, ένας ασταθής τόπος) είτε ως υψηλού βαθμού ασταθή (MSI-H, δύο ή περισσότεροι ασταθείς τόποι). Στην unpaired ανάλυση τα δείγματα των ασθενών κατηγοριοποιούνται είτε ως σταθερά (MSS, μηδέν έως δύο ασταθείς τόποι) είτε ως υψηλού βαθμού ασταθή (MSI-H, τρεις ή περισσότεροι ασταθείς τόποι).

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήσαμε δείγματα από 50 γυναίκες με καρκίνο του ενδομητρίου που υποβλήθηκαν σε χειρουργική επέμβαση στη Γυναικολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας. Απομονώσαμε γενωμικό DNA από νεοπλασματικό και παρακείμενο φυσιολογικό ιστό ανά ασθενή. Από τις ιστολογικές εκθέσεις των ασθενών συλλέξαμε τις κλινικοιστολογικές παραμέτρους και τις καταγράψαμε διασφαλίζοντας την προστασία των προσωπικών δεδομένων των ασθενών. Μετά την ολοκλήρωση της πειραματικής διαδικασίας εκτιμήσαμε το MSI status των δειγμάτων μέσω της τριχοειδικής ηλεκτροφόρησης στο σύστημα QIAXCEL ADVANCED και για επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήσαμε το μηχάνημα BaseTyper™ 48 Real-Time PCR. Για την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα SPSS και για την δημιουργία των γραφημάτων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα υπολογιστικών φύλλων Microsoft Excel. Συνοψίζονται τα ακόλουθα χαρακτηριστικά των ασθενών:

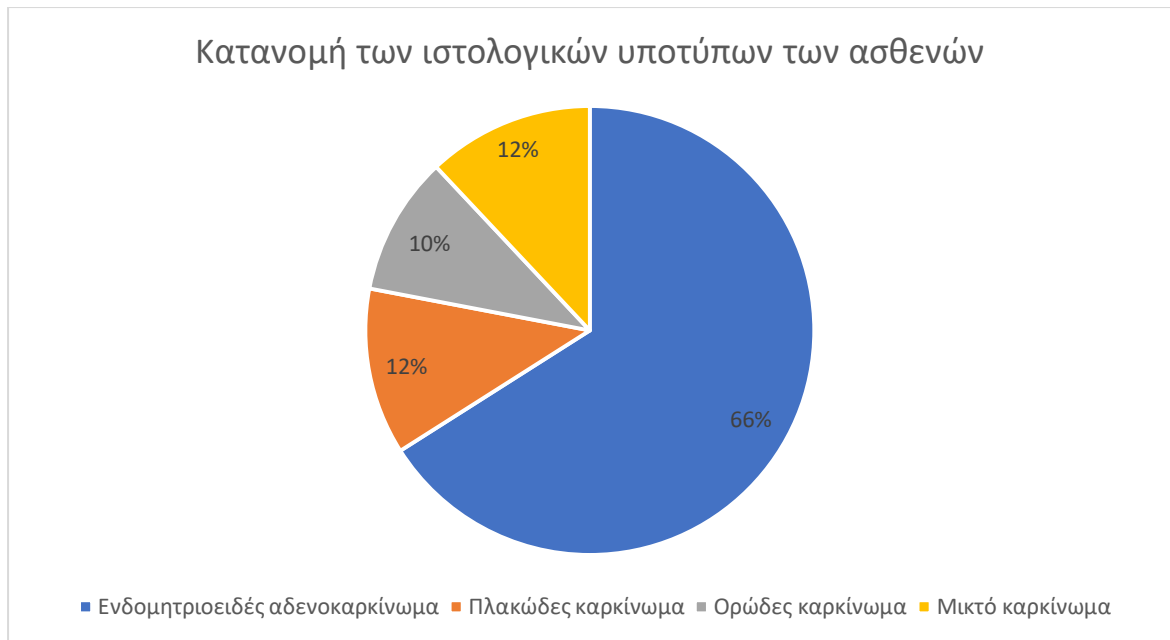
**Πίνακας 5:** Κλινικοιστολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών της μελέτης.

<i>Παράμετρος</i>	<i>Αριθμός ασθενών</i>	<i>Ποσοστό %</i>	
<i>Ιστολογικός τύπος</i>	Ενδομητριοειδές αδενοκαρκίνωμα	33	66
	Πλακώδες καρκίνωμα	6	12
	Ορώδες καρκίνωμα	5	10
	Μικτό καρκίνωμα	6	12
	<i>Βαθμός Διαφοροποίησης</i>	Υψηλή	16
	Μέτρια	22	44
	Χαμηλή	12	24
<i>Διήθηση μυομητρίου</i>	<50%	35	70
	≥50%	15	30
<i>Διάμετρος όγκου</i>	≤2cm	19	38
	>2cm	31	62
<i>Παρουσία Διήθησης του όγκου</i>	Ναι	22	44
	Όχι	28	56
<i>BAT25</i>	Σταθερός	39	78
	Ασταθής	11	22
<i>BAT26</i>	Σταθερός	37	74
	Ασταθής	13	26
<i>NR27</i>	Σταθερός	47	94
	Ασταθής	3	6
<i>Μικροδορυφορική αστάθεια</i>	Καμία	25	50
	Χαμηλή	22	44
	Υψηλή	3	6

Ο μέσος όρος ηλικίας των ασθενών ήταν τα 62,3 έτη. Η ηλικία των ασθενών κυμαίνονταν από 46 έως 83 έτη.

Οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν με βάση τον ιστολογικό τους υπότυπο. Το 66% των ασθενών διαγνώστηκε με ενδομητριοειδές αδενοκαρκίνωμα (33/50), το 12% με μικτό καρκίνωμα (6/50), το 12% με πλακώδες αδενοκαρκίνωμα (6/50) και το 10% με ορώδες καρκίνωμα (5/50). Η κατανομή των ιστολογικών τύπων απεικονίζεται στο Γράφημα 1.

### Κατανομή των ιστολογικών υποτύπων των ασθενών



**Γράφημα 1:** Κατανομή των ιστολογικών υποτύπων.

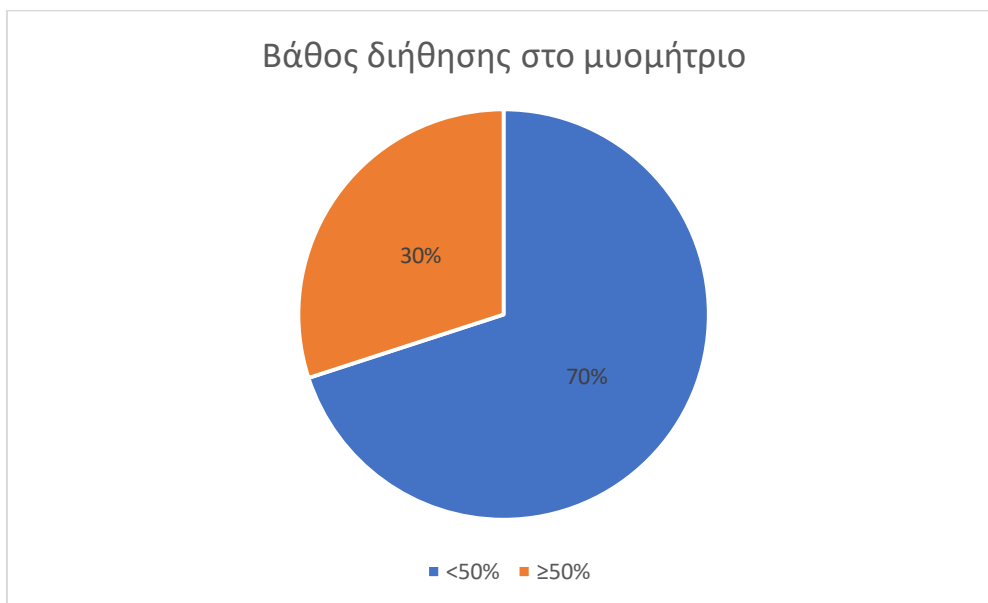
Στη συνέχεια οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν με βάση το βαθμό διαφοροποίησης σε υψηλού, μέτριου και χαμηλού βαθμού διαφοροποίησης των όγκων. Υψηλού βαθμού διαφοροποίησης χαρακτηρίζονται οι καλώς διαφοροποιημένοι όγκοι, ενώ χαμηλού βαθμού διαφοροποίησης χαρακτηρίζονται οι αδιαφοροποίητοι όγκοι.

- 16 στους 50 ασθενείς (32%) διαγνώστηκαν με όγκους υψηλής διαφοροποίησης
- 22 στους 50 ασθενείς (44%) διαγνώστηκαν με όγκους μέτριας διαφοροποίησης
- 12 στους 50 ασθενείς (24%) διαγνώστηκαν με όγκους χαμηλής διαφοροποίησης



**Γράφημα 2:** Βαθμός διαφοροποίησης των όγκων.

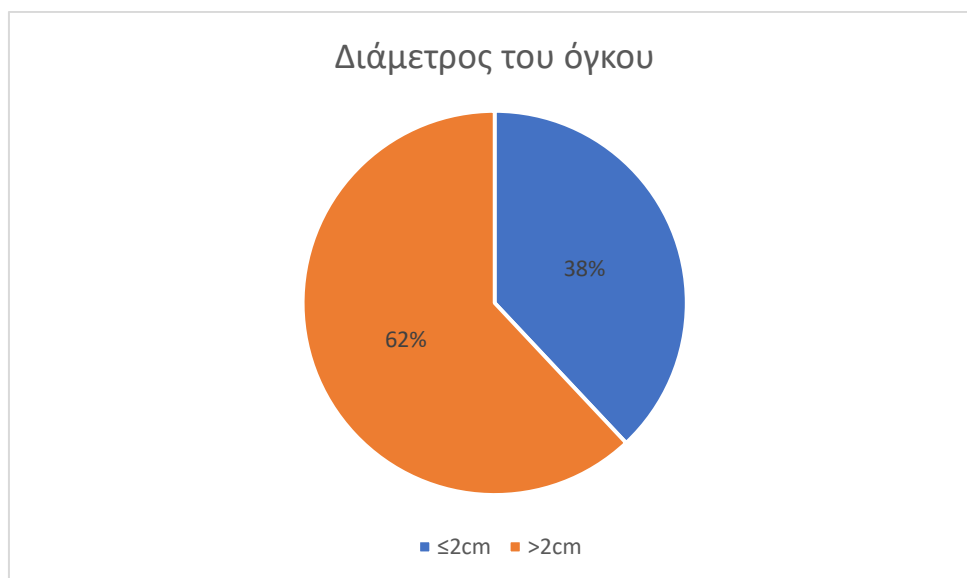
Στη συνέχεια οι ασθενείς κατανεμήθηκαν με βάση το βάθος διήθησης στο μυομήτριο ( $\geq 50\%$ ). Το 70% (35/50) των ασθενών παρουσίασαν διήθηση του μυομητρίου  $< 50\%$  ενώ στο 30% (15/50) η διήθηση ξεπερνούσε το  $\geq 50\%$  του πάχους του ενδομητρίου.



**Γράφημα 3:** Βάθος διήθησης στο μυομήτριο των ασθενών της μελέτης.

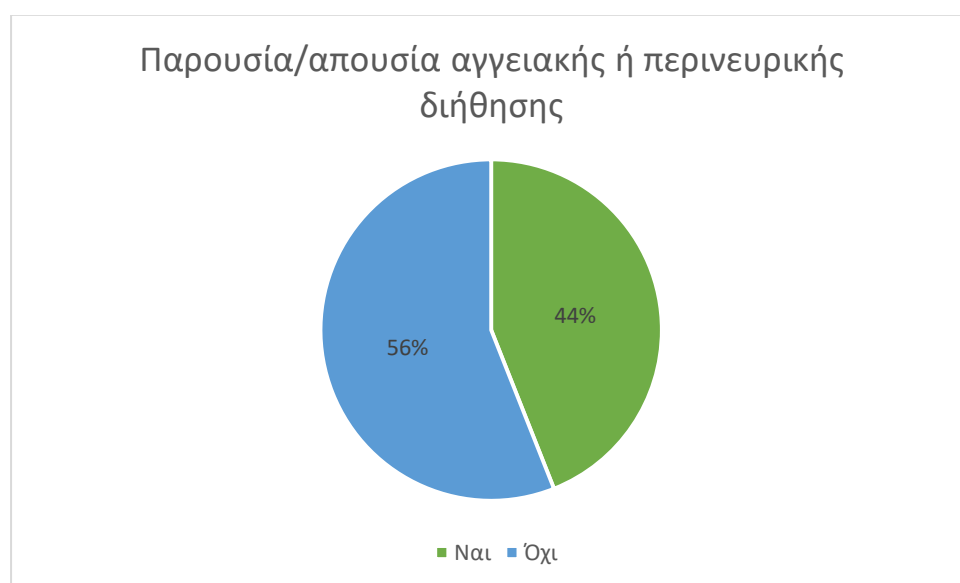
Ως προς τη διάμετρο των όγκων, οι όγκοι κατηγοριοποιήθηκαν με βάση τη διάμετρο και όριο cut-off τα 2 εκατοστά, βάσει των μετρήσεων των Schink et al (1991).

Στα αποτελέσματά μας φαίνεται πως το 62% (31/50) των ασθενών είχε όγκους διαμέτρου άνω των 2 εκατοστών, ενώ το 38% (19/50) των ασθενών είχε όγκους διαμέτρου κάτω των 2 εκατοστών.



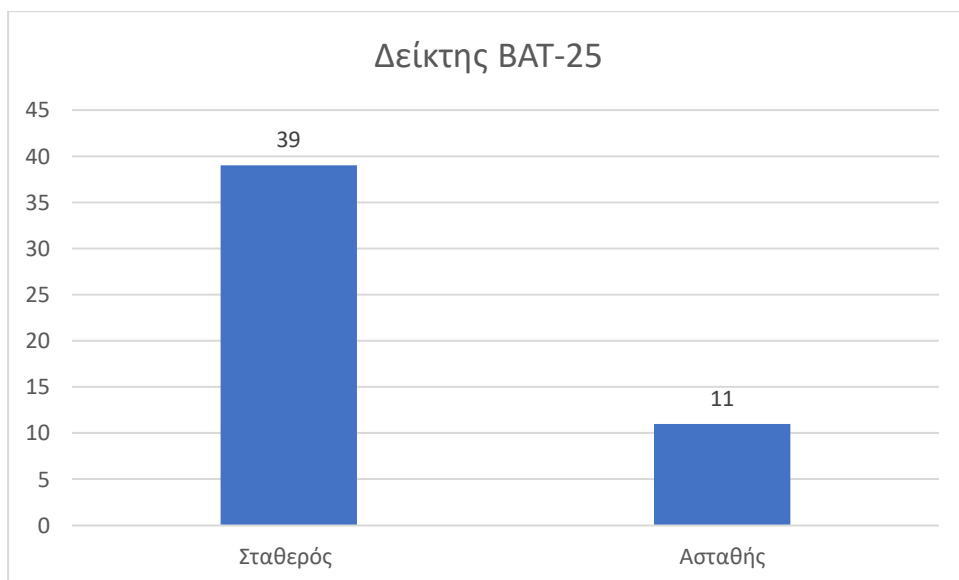
**Γράφημα 4:** Κατανομή ασθενών με βάση τη διάμετρο του όγκου.

Τέλος, αξιολογήσαμε την παρουσία ή απουσία λεμφαγγειακής ή περινευρικής διήθησης. Σε ποσοστό της τάξης του 44% (22/50 ασθενείς) οι ασθενείς είχαν διηθημένους όγκους, ενώ ποσοστό της τάξης του 56% (28/50 ασθενείς) δεν παρουσίαζαν αγγειακή ή περινευρική διήθηση.



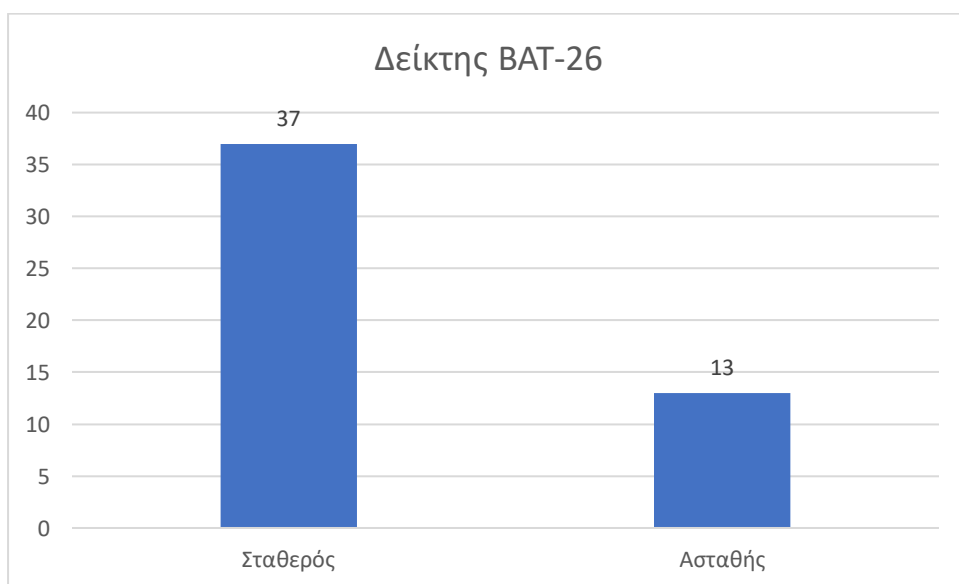
**Γράφημα 5:** Παρουσία/απουσία αγγειακής ή περινευρικής διήθησης.

Για την εκτίμηση της μικροδορυφορικής αστάθειας εξετάστηκε το προφίλ των μονονουκλεοτιδικών μικροδορυφορικών δεικτών BAT25, BAT26, NR27. Σε ό,τι αφορά τον δείκτη BAT25 σε 39/50 ασθενείς (78%) ήταν σταθερός στο φυσιολογικό και στον νεοπλασματικό ιστό του εκάστοτε ασθενούς. Ωστόσο, 11/50 ασθενείς (22%) παρουσίαζαν διαφορές στον συγκεκριμένο δείκτη.



**Γράφημα 6:** Μεταβολές του δείκτη BAT-25 μεταξύ φυσιολογικών και νεοπλασματικών ιστών των ασθενών.

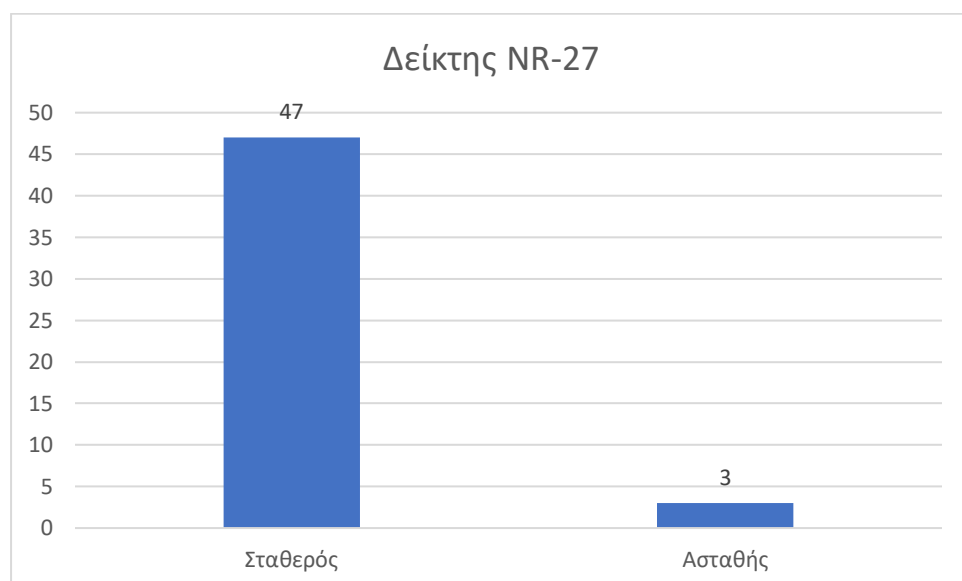
Η ανάλυση του δείκτη BAT26 έδειξε σταθερότητα στην πλειοψηφία των ασθενών (37/50 ασθενείς, 74%), ενώ μεταβλήθηκε σε 13/50 (26%) ασθενείς.



**Γράφημα 7:** Μεταβολές του δείκτη BAT-26 μεταξύ φυσιολογικών και νεοπλασματικών ιστών των ασθενών.

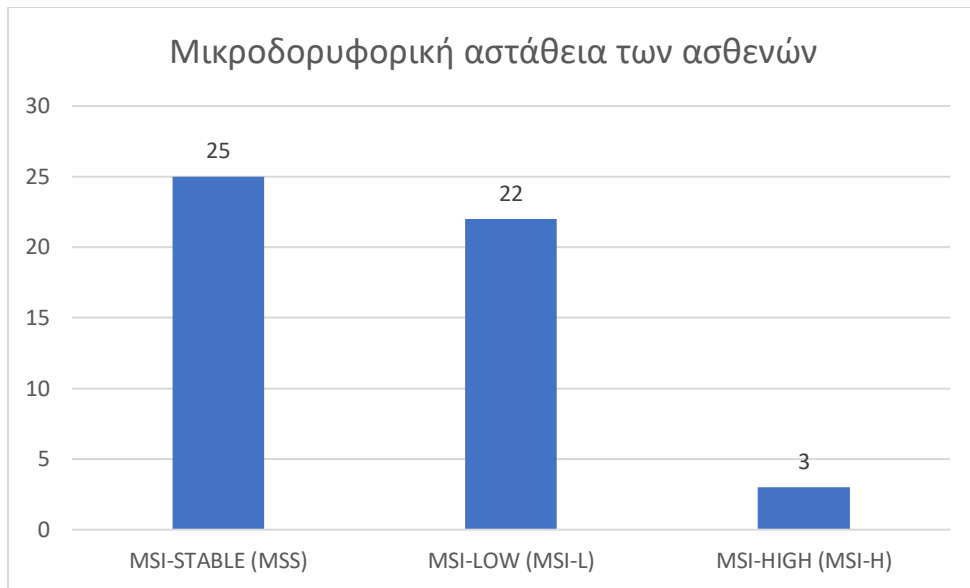


Η εκτίμηση του μονονουκλεοτιδικού δείκτη NR27 ανέδειξε 3/50 (6%) ασθενείς με μεταβολές, ενώ ο δείκτης NR27 παρέμεινε σταθερός σε 47/50 (94%) ασθενείς.



**Γράφημα 8:** Μεταβολές του δείκτη NR27 μεταξύ φυσιολογικών και νεοπλασματικών ιστών των ασθενών.

Για τον προσδιορισμό της μικροδορυφορικής αστάθειας (MSI), αξιολογήθηκε ο συνδυασμός των τριών μικροδορυφορικών δεικτών. Για να χαρακτηρίσουμε τα δείγματά μας, εξετάσαμε τις διαφορές μεταξύ του νεοπλασματικού και του παρακείμενου φυσιολογικού ιστού. Επιπρόσθετα, θεωρήσαμε πως οποιαδήποτε μεταβολή άνω των 3 νουκλεοτιδίων κατά την τριχοειδή ηλεκτροφόρηση αποτελεί διαφορά. Στα αποτελέσματά μας, 25/50 ασθενείς (50%) δεν παρουσίαζαν μικροδορυφορική αστάθεια, 22/50 ασθενείς (44%) παρουσίαζαν χαμηλή μικροδορυφορική αστάθεια (μεταβολή ενός δείκτη) και 3/50 ασθενείς (6%) εμφάνισαν υψηλή μικροδορυφορική αστάθεια (μεταβολή > δύο δεικτών).

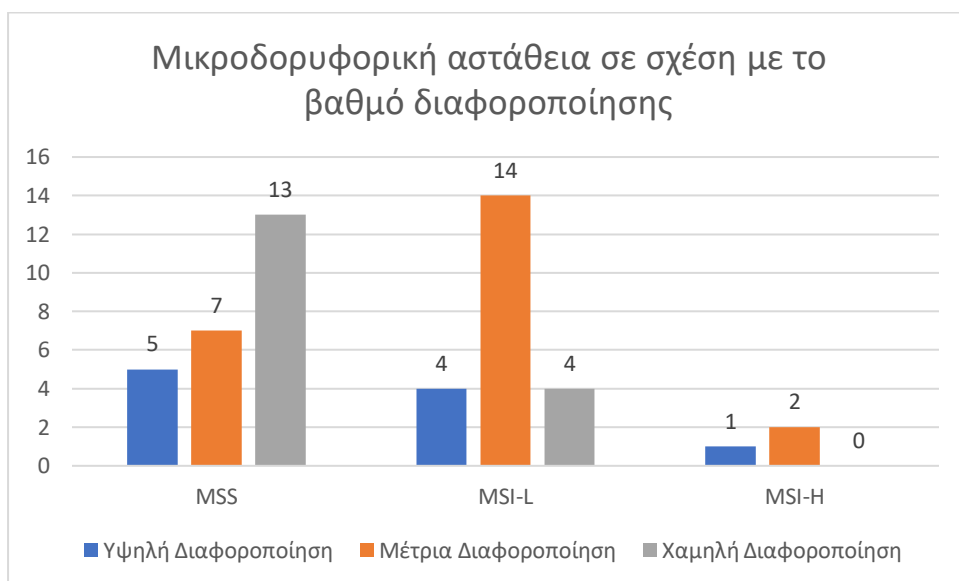


**Γράφημα 9:** Μικροδορυφορική αστάθεια των ασθενών.

Η στατιστική ανάλυση δεν αποκάλυψε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ των μονονουκλεοτιδικών δεικτών BAT25, BAT26 και NR27 και των κλινικοπαθολογικών παραμέτρων των ασθενών, όπως ο ιστολογικός τύπος του καρκίνου, ο βαθμός διαφοροποίησης του όγκου, η έκταση της διήθησης του μυομητρίου, η διάμετρος του καρκινώματος ή η παρουσία άλλων διηθήσεων. Συγκεκριμένα, μεταξύ των ασθενών με απουσία μικροδορυφορικής αστάθειας, 5/25 ασθενείς (20%) διαγνώστηκαν με υψηλής διαφοροποίησης όγκους, 7/25 ασθενείς (28%) με μέτριας διαφοροποίησης όγκους και 13/25 ασθενείς (52%) διαγνώστηκαν με χαμηλής διαφοροποίησης νεοπλάσματα. Στους ασθενείς με χαμηλή μικροδορυφορική αστάθεια, 4/22 ασθενείς (18%) διαγνώστηκαν με νεοπλάσματα υψηλής διαφοροποίησης, 14/22 ασθενείς (64%) διαγνώστηκαν με νεοπλάσματα μέτριας διαφοροποίησης και 4/22 ασθενείς (22%) διαγνώστηκαν με νεοπλάσματα χαμηλής διαφοροποίησης. Στους ασθενείς με υψηλή μικροδορυφορική αστάθεια, 1/3 (33,3%) είχε υψηλής διαφοροποίησης νεόπλασμα, 2/3 (66,6%) ασθενείς διαγνώστηκαν με νεόπλασμα μέτριας διαφοροποίησης και κανένας ανάμεσα στους 3 ασθενείς δεν διαγνώστηκε με νεόπλασμα χαμηλής διαφοροποίησης. Η συσχέτιση είναι στατιστικώς σημαντική ( $p=0.001$ ) και υποδεικνύει ότι τα νεοπλάσματα χωρίς μικροδορυφορική αστάθεια είναι συχνότερα στους όγκους χαμηλής διαφοροποίησης, ενώ εκείνα με χαμηλή μικροδορυφορική αστάθεια είναι συχνότερα στους όγκους μέτριας διαφοροποίησης..

**Πίνακας 6:** Συσχέτιση μικροδορυφορικής αστάθειας και βαθμού διαφοροποίησης του όγκου.

	MSS	MSI-L	MSI-H
Υψηλή Διαφοροποίηση	5	4	1
Μέτρια Διαφοροποίηση	7	14	2
Χαμηλή Διαφοροποίηση	13	4	0

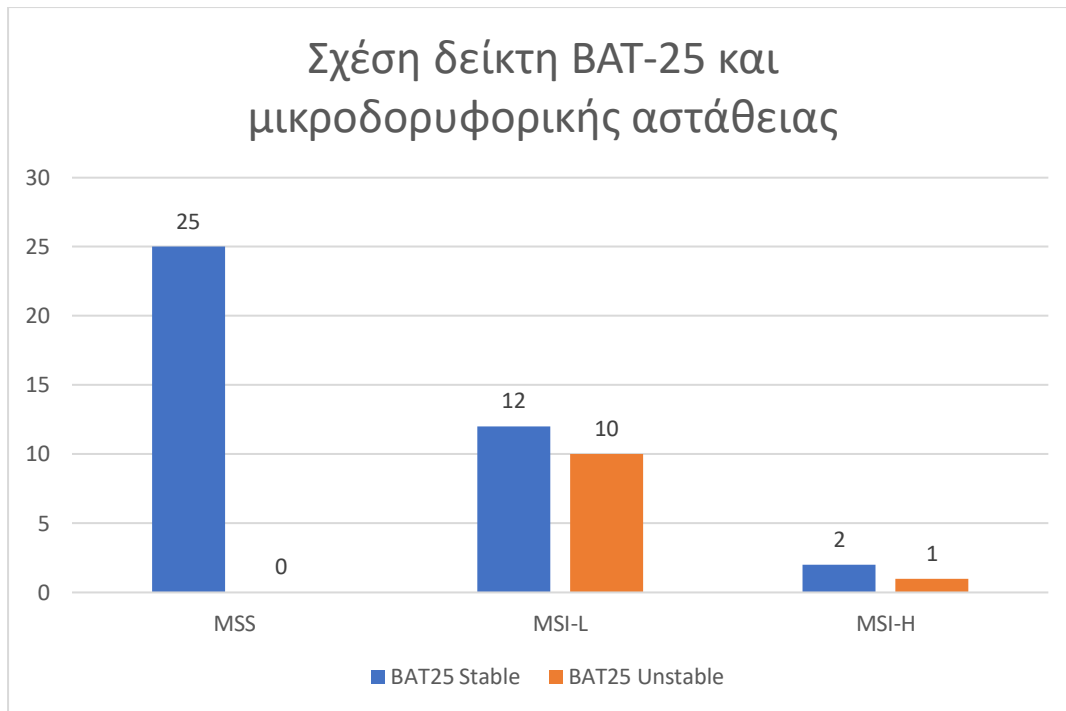


**Γράφημα 10:** Συσχέτιση μικροδορυφορικής αστάθειας και βαθμού διαφοροποίησης του όγκου.

Επιπροσθέτως, εξετάστηκε η ενδεχόμενη συσχέτιση των επιμέρους δεικτών με το είδος της μικροδορυφορικής αστάθειας. Σε ό,τι αφορά τον δείκτη BAT25 25/39 ασθενείς (64%) χωρίς μεταβολή του δείκτη BAT25 δεν είχαν μικροδορυφορική αστάθεια, 12/39 ασθενείς (30%) χωρίς μεταβολή του δείκτη παρουσίαζαν χαμηλή μικροδορυφορική αστάθεια ενώ 2/39 ασθενείς (5%) δίχως μεταβολή του δείκτη παρουσίαζαν υψηλή μικροδορυφορική αστάθεια. Κατά αντιστοιχία, 10/11 ασθενείς (91%) με μεταβολές του δείκτη BAT25 είχαν χαμηλή μικροδορυφορική αστάθεια και 1/11 ασθενείς (9%) είχαν υψηλή μικροδορυφορική αστάθεια. Η συσχέτιση είναι στατιστικώς σημαντική ( $p=0.001$ ).

**Πίνακας 7:** Συσχέτιση του δείκτη BAT-25 με το βαθμό μικροδορυφορικής αστάθειας.

	BAT25 Stable	BAT25 Unstable
MSS	25	0
MSI-L	12	10
MSI-H	2	1

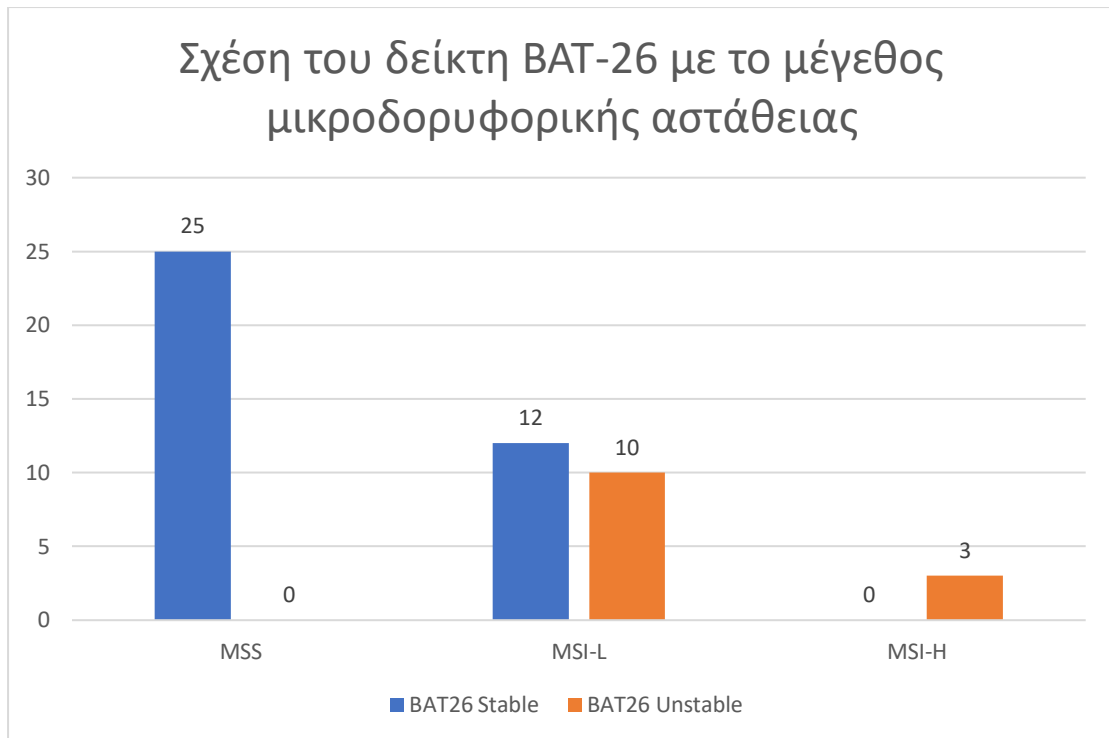


**Γράφημα 11:** Συσχέτιση του δείκτη BAT-25 με το μέγεθος μικροδορυφορικής αστάθειας.

Αντίστοιχη διαδικασία ακολουθήθηκε και για τον δείκτη BAT26. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα. Παρατηρήθηκε πως 25/37 ασθενείς (67%) δίχως μεταβολές του δείκτη δεν παρουσίασε μικροδορυφορική αστάθεια, 12/37 (32%) ασθενείς δίχως μεταβολές του δείκτη παρουσίαζαν χαμηλή μικροδορυφορική αστάθεια και κανένας ασθενής δεν παρουσίασε υψηλή μικροδορυφορική αστάθεια δίχως να παρουσιάζει μεταβολή στον δείκτη BAT26. Αντιστοίχως, 10/13 (69%) ασθενείς με μεταβολές στο δείκτη BAT26, παρουσίασαν χαμηλού βαθμού μικροδορυφορική αστάθεια ενώ 3/13 (23%) ασθενείς με μεταβολές στο δείκτη παρουσίασαν υψηλού βαθμού μικροδορυφορική αστάθεια.

**Πίνακας 8:** Συσχέτιση του δείκτη BAT-26 με το βαθμό μικροδορυφορικής αστάθειας.

	BAT26 Stable	BAT26 Unstable
<b>MSS</b>	25	0
<b>MSI-L</b>	12	10
<b>MSI-H</b>	0	3



**Γράφημα 12:** Συσχέτιση του δείκτη BAT-26 με το μέγεθος μικροδορυφορικής αστάθειας.

Ο δείκτης NR27 που μελετήθηκε δεν έδειξε καμία στατιστικά σημαντική συσχέτιση με το είδος της μικροδορυφορικής αστάθειας των όγκων ( $p > 0.005$ ).

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο καρκίνος του ενδομητρίου συγκαταλέγεται στους συχνότερους καρκίνους (6η θέση) μεταξύ των γυναικών παγκοσμίως (Kanorienne D et al., 2014). Στην Ευρώπη καταλαμβάνει την τέταρτη σε συχνότητα και τη δέκατη τρίτη σε θνησιμότητα θέση (Bray F et al., 2005). Αυτός ο τύπος καρκίνου αναπτύσσεται σχεδόν αποκλειστικά σε γυναίκες που βρίσκονται στη μετεμμηνοπαυσιακή περίοδο. Ο συχνότερος ιστολογικός υπότυπος είναι το αδενοκαρκίνωμα ενδομητριοειδούς τύπου ή τύπου I (70-80% όλων των καρκίνων του ενδομητρίου) και ένας άλλος, λιγότερο συχνός, υπότυπος είναι το αδενοκαρκίνωμα μη ενδομητριοειδούς τύπου ή τύπου II (20-30% όλων των καρκίνων του ενδομητρίου) (Kanorienne D et al., 2014). Ο καρκίνος του ενδομητρίου τύπου I είναι συνήθως ορμονοεξαρτώμενος και εμφανίζεται σε γυναίκες που εκτίθενται σε οιστρογόνα. Είναι συνήθως καλώς διαφοροποιημένος και έχει χαμηλό μεταστατικό δυναμικό και ικανότητα διήθησης (Sherman ME, 2000). Ο καρκίνος του ενδομητρίου τύπου II δε σχετίζεται με διέγερση από οιστρογόνα ή προγεσταγόνα και προέρχεται από ατροφικούς ενδομητρικούς ιστούς. Είναι ελάχιστα διαφοροποιημένος, παρουσιάζει υψηλή πιθανότητα διήθησης στο μυομήτριο και μετάστασης και συνεπώς παρουσιάζει χειρότερη πρόγνωση.

Σε αρκετές μελέτες έχουν εντοπιστεί συγκεκριμένες μοριακές γενετικές αλλαγές στους δύο αυτούς τύπους καρκινώματος (Liu FS, 2007). Μία από τις μοριακές μεταβολές που σχετίζονται με τον ενδομητριοειδή τύπο (καρκίνος του ενδομητρίου τύπου I) είναι η μικροδορυφορική αστάθεια (MSI), η οποία υποδηλώνει ελαττώματα στο σύστημα επιδιόρθωσης των λανθασμένων ζευγών βάσεων (MMR). Οι μικροδορυφόροι συνιστούν σύντομες, επαναλαμβανόμενες νουκλεοτιδικές αλληλουχίες στο ανθρώπινο γονιδίωμα (Kanorienne D et al., 2014). Λόγω της επαναλαμβανόμενης δομής τους, οι μικροδορυφόροι είναι επιρρεπείς σε σφάλματα κατά την διαδικασία της αντιγραφής. Συνήθως, τα σφάλματα αυτά επιδιορθώνονται από το σύστημα επιδιόρθωσης του DNA, ωστόσο το σύστημα αυτό μπορεί να αποτύχει με αποτέλεσμα την εμφάνιση μικροδορυφορικής αστάθειας. Οι μικροδορυφόροι κατά κανόνα παρουσιάζουν τον ίδιο αριθμό νουκλεοτιδικών επαναλήψεων σε καρκινικό και υγιή ιστό του ίδιου ατόμου, ωστόσο η ανεπάρκεια του συστήματος MMR μπορεί να οδηγήσει σε εκτεταμένες αλλαγές στον αριθμό των επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών.

Το 1998, το Εθνικό Ινστιτούτο Καρκίνου (ΗΠΑ) συνέστησε μια ομάδα 5 μονο/ή δι-νουκλεοτιδικών δεικτών για τον προσδιορισμό της MSI. Ο όγκος ταξινομείται ως MSI-high (MSI-H) εάν παρουσιάζει αστάθεια σε τουλάχιστον 2 από τους 5 δείκτες, ως MSI-low (MSI-L) εάν 1 στους 5 δείκτες παρουσιάζει αστάθεια και μικροδορυφορικά σταθερός (MSS) εάν δεν παρατηρείται αστάθεια σε κανέναν από τους πέντε δείκτες. Ο φαινότυπος MSI εμφανίζεται έως και στο 30% των ΕΚ και μπορεί να προκληθεί από σωματικές ή κληρονομικές μεταλλάξεις στα γονίδια που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες του επιδιορθωτικού μηχανισμού MMR. Η κληρονομική διαταραχή, που ορίζεται ως σύνδρομο Lynch (LS), ακολουθεί αυτοσωμικό επικρατή τύπο κληρονόμησης και σχετίζεται με υψηλότερο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου κατά τη διάρκεια της ζωής και αποτελεί περίπου το 3% των ΕΚ. Η μικροδορυφορική αστάθεια ορίστηκε πρόσφατα ως προγνωστικός βιοδείκτης για την ανταπόκριση στη ανοσοθεραπεία, όπου χρησιμοποιούνται αναστολείς ανοσολογικών σημείων ελέγχου. Τα τελευταία χρόνια, η εκτίμηση του MSI ως βιοδείκτη για την επιλογή ασθενών που θα κάνουν χρήση της ανοσοθεραπείας έχει καταστεί ιδιαίτερα σημαντική στον ΕΚ. Ο προσδιορισμός αξιόπιστων μεθοδολογιών ελέγχου είναι ζωτικής σημασίας καθώς επιτρέπουν την καλύτερη θεραπευτική αντιμετώπιση των ασθενών.

Στο καρκίνωμα του ενδομητρίου, η σχέση μεταξύ των κλινικοπαθολογικών παραμέτρων (οι οποίες είναι γνωστό ότι σχετίζονται με την πρόγνωση της νόσου) και της κατάστασης MSI δεν είναι ακόμη σαφής. Ο επιπολασμός της MSI στο σποραδικό καρκίνωμα του ενδομητρίου έχει ανιχνευθεί σε ποσοστό από 9% έως 45% (Κανοριene D et al., 2014). Ορισμένες μελέτες έχουν εξετάσει τη σχέση μεταξύ κλινικοπαθολογικών παραμέτρων και της κατάστασης MSI με αντικρουόμενα αποτελέσματα (λόγοι είναι το μικρό μέγεθος του δείγματος, η αναδρομική ανάλυση, οι διαφορετικοί δείκτες MSI και η ένταξη από κοινού των διαφορετικών ιστολογικών υποτύπων). Η πλειονότητα των δημοσιευμένων αναλύσεων δείχνει ότι το MSI-H είναι πιο συχνότερο στα ενδομητριοειδούς τύπου I καρκινώματα του ενδομητρίου σε σχέση με τα μη ενδομητριοειδούς τύπου II. Έχει αναφερθεί επίσης ότι οι όγκοι του ενδομητρίου με υψηλή μικροδορυφορική αστάθεια σχετίζονται με εις βάθος διήθηση του μυομητρίου και υψηλότερο στάδιο του όγκου. Άλλες μελέτες δεν έδειξαν κάποια πιθανή συσχέτιση της μικροδορυφορικής αστάθειας με το βαθμό διαφοροποίησης και το στάδιο του όγκου (Κανοριene D et al., 2014). Σε ελάχιστες μελέτες αναφέρεται συσχέτιση του σταδίου του όγκου με την παρουσία υψηλής μικροδορυφορικής αστάθειας (Basil JB et al., 2000).

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση της μικροδορυφορικής αστάθειας σε ασθενείς με καρκίνο του ενδομητρίου με την ανάπτυξη και χρήση της μεθοδολογίας της τριχοειδικής ηλεκτροφόρησης στο σύστημα QIAxcel Advanced και η σύγκριση του MSI status των ασθενών με τα κλινικοπαθολογικά τους χαρακτηριστικά.

Συμπεριλάβαμε στη μελέτη 50 ασθενείς με μέση ηλικία τα 62,3 έτη και ηλικιακό εύρος:46-83 έτη. Ενδομητριοειδούς τύπου αδενοκαρκίνωμα εντοπίστηκε σε 33/50 ασθενείς (66%), πλακώδες αδενοκαρκίνωμα διαγνώστηκε σε 6/50 ασθενείς (12%), ορώδες καρκίνωμα είχαν 5/50 ασθενείς (10%) και μικτού τύπου καρκίνωμα διαγνώστηκε σε 6/50 ασθενείς (12%). Όγκοι υψηλής διαφοροποίησης παρατηρήθηκαν σε 16/50 ασθενείς (32%), όγκοι μέτριας διαφοροποίησης σε 22/50 ασθενείς (44%) και όγκοι χαμηλής διαφοροποίησης σε 12/50 ασθενείς (24%). Σε 35/50 ασθενείς (70%) η διήθηση του μυομητρίου ήταν μικρότερη από 50%, ενώ σε 15/50 (30%) η διήθηση του μυομητρίου ήταν  $\geq 50\%$ . 31/50 ασθενείς (62%) είχαν όγκους με διάμετρο άνω των δύο εκατοστών, ενώ 19/50 ασθενείς (38%) έφεραν όγκους μικρότερης διαμέτρου. Εξετάσαμε τις μεταβολές των μονονουκλεοτιδικών δεικτών BAT25, BAT26 και NR27 σε κάθε ασθενή, συγκρίνοντας στην πλειοψηφία αυτών DNA από νεοπλασματικό και παρακείμενο φυσιολογικό ιστό. 25/50 ασθενείς (50%) δεν είχαν μικροδορυφορική αστάθεια, 22/50 ασθενείς (44%) παρουσίαζαν χαμηλή μικροδορυφορική αστάθεια και 3/50 ασθενείς (6%) έδειξαν υψηλή μικροδορυφορική αστάθεια.

Διευρενήθηκαν οι μονονουκλεοτιδικοί δείκτες BAT25, BAT26 και NR27 που βρίσκονται στα γονίδια *KIT*, *MSH2* και *BIRC* αντίστοιχα. Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι ο δείκτης BAT26 παρουσιάζει έντονη μεταβλητότητα. Στη δική μας μελέτη, τόσο ο BAT26, όσο και ο δείκτης BAT25, παρουσίασαν τη μεγαλύτερη ετερογένεια. Έχει αναφερθεί σε προηγούμενες μελέτες ότι οι δύο αυτοί δείκτες είναι αρκετοί για τη διερεύνηση της μικροδορυφορικής αστάθειας στον καρκίνο του ενδομητρίου, καθώς ως μονονουκλεοτιδικοί δείκτες είναι εξαιρετικά αξιόπιστοι. Το εύρημα αυτό συνάδει με τα αποτελέσματά μας, τα οποία έδειξαν ότι οι δείκτες BAT25 και BAT26 ήταν συχνότερα ασταθείς σε σχέση με τον δείκτη NR27 και συσχετίστηκαν θετικά με την παρουσία μικροδορυφορικής αστάθειας στους ασθενείς που εξετάστηκαν ( $p < 0,001$ ). Οι Campanella et al. (2014) παρουσίασαν παρόμοια αποτελέσματα. Μια προηγούμενη έρευνα τόσο σε δείγματα καρκίνου του παχέος εντέρου όσο και σε κυτταρικές σειρές αποκάλυψε πως οι δείκτες BAT25 και BAT26



είχαν τη μεγαλύτερη αστάθεια μεταξύ των δεικτών που μελετήθηκαν, γεγονός που συνάδει επίσης με τα αποτελέσματα μας.

Ως προς τη μεθοδολογία που ακολουθήσαμε, η ανάπτυξη και χρήση της τριχοειδικής ηλεκτροφόρησης με το σύστημα QIAxcel Advanced φαίνεται να αποτελεί μία πολλά υποσχόμενη μέθοδο. Η παράλληλη ανάλυση ορισμένων δειγμάτων στην BaseTyper PCR επιβεβαίωσε την ανάλυση των αποτελεσμάτων μας με τη χρήση της τριχοειδικής ηλεκτροφόρησης, γεγονός που μπορεί να επιτρέψει την εφαρμογή της για γρήγορη και οικονομική ανάλυση υψηλού αριθμού δειγμάτων. Ωστόσο, τα ευρήματά μας αποτελούν ενδείξεις σε μικρό αριθμό ασθενών, ο οποίος θα πρέπει να αυξηθεί, ώστε να επιβεβαιώσει με μεγαλύτερη ασφάλεια και στατιστική σημαντικότητα τα αποτελέσματά μας. Το γεγονός ότι οι πρόσφατες κατευθυντήριες οδηγίες συνιστούν τον έλεγχο της μικροδορυφορικής αστάθειας σε όλους τους καρκίνους του ενδομητρίου, δείχνει την προγνωστική και διαγνωστική αξία της, καθώς συμβάλλει στην επιλογή των ασθενών που μπορούν να ωφεληθούν από τη λήψη ανοσοθεραπείας.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 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>
- Basil JB, Goodfellow PJ, Rader JS, Mutch DG, Herzog TJ. Clinical significance of microsatellite instability in endometrial carcinoma. *Cancer*. 2000 Oct 15;89(8):1758-64. doi: 10.1002/1097-0142(20001015)89:8<1758::aid-cnrc16>3.0.co;2-a. PMID: 11042571
- 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
- Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, et al. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res* 1998;58:5248–57.
- Bogani G, Ray-Coquard I, Concin N, Ngoi NYL, Morice P, Enomoto T, Takehara K, Denys H, Lorusso D, Coleman R, Vaughan MM, Takano M, Provencher D, Sagae S, Wimberger P, Póka R, Segev Y, Kim SI, Kim JW, Candido Dos Reis FJ, Mariani A, Leitao MM Jr, Makker V, Rustum NA, Vergote I, Zannoni GF, Tan DSP, McCormack M, Bini M, Lopez S, Raspagliesi F, Panici PB, di Donato V, Muzii L, Colombo N, Scambia G, Pignata S, Monk BJ, (2022). Clear cell carcinoma of the endometrium. *Gynecol Oncol*, 164(3):658-666. doi: 10.1016/j.ygyno.2022.01.012. Epub 2022 Jan 19. PMID: 35063279.
- Bonneville, R., Krook, M. A., Kautto, E. A., Miya, J., Wing, M. R., Chen, H.-Z., Roychowdhury, S. (2017). Landscape of Microsatellite Instability Across 39 Cancer Types. *JCO Precision Oncology*, (1), 1–15. doi:10.1200/po.17.00073
- Bray F, Loos AH, Oostindier M, Weiderpass E. Geographic and temporal variations in cancer of the corpus uteri: incidence and mortality in pre- and postmenopausal women in Europe. *Int J Cancer*. 2005 Oct 20;117(1):123-31. doi: 10.1002/ijc.21099. PMID: 15880435
- 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
- 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. *Eur J Hum Genet*. 2014 Jul;22(7):875-80. doi: 10.1038/ejhg.2013.256. Epub 2013 Nov 6. PMID: 24193342; PMCID: PMC4060109
- Concin N, Matias-Guiu X, Vergote I, Cibula D, Mirza MR, Marnitz S, Ledermann J, Bosse T, Chargari C, Fagotti A, Fotopoulou C, Gonzalez Martin A, Lax S, Lorusso D, Marth C, Morice P, Nout RA, O'Donnell D, Querleu D, Raspollini MR, Sehouli J, Sturdza A, Taylor A, Westermann A, Wimberger P, Colombo N, Planchamp F, Creutzberg CL, (2021). ESGO/ESTRO/ESP guidelines for the

- management of patients with endometrial carcinoma. *Int J Gynecol Cancer*. Jan;31(1):12-39. doi: 10.1136/ijgc-2020-002230. Epub 2020 Dec 18. PMID: 33397713
- Chekmareva M, Ellenson LH, Pirog EC. Immunohistochemical differences between mucinous and microglandular adenocarcinomas of the endometrium and benign endocervical epithelium. *Int J Gynecol Pathol*. 2008;27(4):547– 54.
- Cho KR, Cooper K, Croce S, Djordevic B, Herrington S, Howitt B, Hui P, Ip P, Koebel M, Lax S, Quade BJ, Shaw P, Vidal A, Yemelyanova A, Clarke B, Hedrick Ellenson L, Longacre TA, Shih IM, McCluggage WG, Malpica A, Oliva E, Parkash V, Matias-Guiu X, (2019). International Society of Gynecological Pathologists (ISGyP) Endometrial Cancer Project: Guidelines From the Special Techniques and Ancillary Studies Group. *Int J Gynecol Pathol*. Jan;38 Suppl 1(Iss 1 Suppl 1):S114-S122. doi: 10.1097/PGP.0000000000000496. PMID: 29521846; PMCID: PMC6296838.
- Dedeurwaerdere, F. et al. (2021) Comparison of microsatellite instability detection by immunohistochemistry and molecular techniques in colorectal and endometrial cancer [Preprint]. doi:10.21203/rs.3.rs-130862/v1.
- Denschlag, D., Ulrich, U., & Emons, G. (2011). The Diagnosis and Treatment of Endometrial Cancer. *Deutsches Aerzteblatt Online*. doi:10.3238/arztebl.2011.0571
- 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
- Duska, L. R., Garrett, A., Rueda, B. R., Haas, J., Chang, Y., & Fuller, A. F. (2001). Endometrial Cancer in Women 40 Years Old or Younger. *Gynecologic Oncology*, 83(2), 388–393. doi:10.1006/gyno.2001.6434
- EVANSMETCALF, E. (1998). Profile of women 45 years of age and younger with endometrial cancer\*1. *Obstetrics & Gynecology*, 91(3), 349–354. doi:10.1016/s0029-7844(97)00668-6
- Evrard, C. and Alexandre, J. (2021) ‘Predictive and prognostic value of microsatellite instability in Gynecologic Cancer (endometrial and ovarian)’, *Cancers*, 13(10), p. 2434. doi:10.3390/cancers13102434.
- Ciriano FD Jr, Robboy SJ, Dodge RK, Bentley RC, Krigman HR, Synan IS, Soper JT, Clarke-Pearson DL. The outcome of stage I-II clinically and surgically staged papillary serous and clear cell endometrial cancers when compared with endometrioid carcinoma. *Gynecol Oncol*. 2000 Apr;77(1):55-65. doi: 10.1006/gyno.2000.5737. PMID: 10739691.
- Guo YE, Liu Y, Zhang W, Luo H, Shu P, Chen G, Li Y, (2022). The clinicopathological characteristics, prognosis and immune microenvironment mapping in MSI-H/MMR-D endometrial carcinomas. *Discov Oncol*. 13(1):12. doi: 10.1007/s12672-022-00466-5. PMID: 35239036; PMCID: PMC8894509.
- Hampel H, Frankel W, Panescu J, Lockman J, Sotamaa K, Fix D, Comeras I, La Jeunesse J, Nakagawa H, Westman JA, Prior TW, Clendenning M, Penzone P, Lombardi J, Dunn P, Cohn DE, Copeland L, Eaton L, Fowler J, Lewandowski G, Vaccarello L, Bell J, Reid G, de la Chapelle A. Screening for Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer) among endometrial cancer patients. *Cancer Res*. 2006;66(15):7810–7817

- Hirschowitz L, Ganesan R, McCluggage WG. WT1, p53 and hormone receptor expression in uterine serous carcinoma. *Histopathology*. 2009;55(4):478–82
- Hoeijmakers, J. H. J. (2001). DNA repair mechanisms. *Maturitas*, 38(1), 17–22. doi:10.1016/s0378-5122(00)00188-2
- Imai, K., & Yamamoto, H. (2007). Carcinogenesis and microsatellite instability: the interrelationship between genetics and epigenetics. *Carcinogenesis*, 29(4), 673–680. doi:10.1093/carcin/bgm228
- 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.
- Junqueira LC, Carneiro J. *Βασική Ιστολογία*, 5η Ελληνική έκδοση. Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης: 597-605.
- Kandoth C, Schultz N, Cherniack AD, Akbani R, Liu Y, Shen H, Robertson AG, Pashtan I, Shen R, Benz CC, Yau C, Laird PW, Ding L, Zhang W, Mills GB, Kucherlapati R, Mardis ER, Levine DA (2013). Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma. *Nature*. 2013 May 2;497(7447):67-73. doi: 10.1038/nature12113. Erratum in: *Nature*. Aug 8;500(7461):242. PMID: 23636398; PMCID: PMC3704730
- Kanopienė, D., Smailytė, G., Vidugirienė, J., & Bacher, J. (2014). Impact of microsatellite instability on survival of endometrial cancer patients. *Medicina*, 50(4), 216–221. doi:10.1016/j.medici.2014.09.002
- Kanopiene D, Vidugiriene J, Valuckas KP, Smailyte G, Uleckiene S, Bacher J. Endometrial cancer and microsatellite instability status. *Open Med (Wars)*. 2014 Nov 11;10(1):70-76. doi: 10.1515/med-2015-0005. PMID: 28352680; PMCID: PMC5152958.
- 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 Review. *RadioGraphics*, 29(2), 495–507
- Kucuk, A, Demir, H, Ozdemir, C, Beypinar, I, Baykare, M, Arioz, DT., (2022). "Microsatellite instability (MSI) in endometrial cancer; frequency and prognostic significance" *Annals of Clinical and Analytical Medicine*, 13(02). Available at: <https://doi.org/10.4328/acam.20995>.
- 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
- Kurman RJ, Carcangiu ML, Herrington CS, Young RH. *World Health Organization of Tumours of Female Reproductive Organs*. IARC Press, 2014; 125-132.
- Lax S.F. (2016) "Pathology of endometrial carcinoma," *Advances in Experimental Medicine and Biology*, pp. 75–96. Available at: [https://doi.org/10.1007/978-3-319-43139-0\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-319-43139-0_3).
- Lax S.F, Pizer ES, Ronnett BM, et al. Clear cell carcinoma of the endometrium is characterized by a distinctive profile of p53, Ki-67, estrogen, and progesterone receptor expression. *Hum Pathol*. 1998; 29:551–558.
- Li, K., Luo, H., Huang, L., Luo, H., & Zhu, X. (2020). Microsatellite instability: a review of what the oncologist should know. *Cancer Cell International*, 20(1). doi:10.1186/s12935-019-1091-8

- Liu FS. Molecular carcinogenesis of endometrial cancer. *Taiwan J Obstet Gynecol.* 2007 Mar;46(1):26-32. doi: 10.1016/S1028-4559(08)60102-3. PMID: 17389185.
- Llobet D, Pallares J, Yeramian A, et al. Molecular pathology of endometrial carcinoma: practical aspects from the diagnostic and therapeutic viewpoints. *J Clin Pathol.* 2009;62(9):777-85.
- Longacre TA, Chung MH, Jensen DN, et al. Proposed criteria for the diagnosis of well-differentiated endometrial carcinoma. A diagnostic test for myoinvasion. *Am J Surg Pathol* 1995;19:371-406.
- Mahdi H, Chelariu-Raicu A, Slomovitz BM. Immunotherapy in endometrial cancer. *Int J Gynecol Cancer.* 2023 Mar 6;33(3):351-357. doi: 10.1136/ijgc-2022-003675. PMID: 36878570.
- Mazur MT, Kurman RJ. *Diagnosis of Endometrial Biopsies and Curetings. A Practical Approach*, 2nd edition. Springer 2005; 7-34.
- Mjos S, Werner HMJ, Birkeland E et al. PIK3CA exon9 mutations associate with reduced survival, and are highly concordant between matching primary tumors and metastases in endometrial cancer. *Sci Rep.* 2017;7(1):10240
- 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
- Murali R, Davidson B, Fadare O, Carlson JA, Crum CP, Gilks CB, Irving JA, Malpica A, Matias-Guiu X, McCluggage WG, Mittal K, Oliva E, Parkash V, Rutgers JKL, Staats PN, Stewart CJR, Tornos C, Soslow RA. High-grade Endometrial Carcinomas: Morphologic and Immunohistochemical Features, Diagnostic Challenges and Recommendations. *Int J Gynecol Pathol.* 2019 Jan;38 Suppl 1(Iss 1 Suppl 1): S40-S63. doi: 10.1097/PGP.0000000000000491. PMID: 30550483; PMCID: PMC6296248.
- Murali, R., Soslow, R.A. and Weigelt, B. (2014) “Classification of endometrial carcinoma: More than two types,” *The Lancet Oncology*, 15(7). Available at: [https://doi.org/10.1016/s1470-2045\(13\)70591-6](https://doi.org/10.1016/s1470-2045(13)70591-6).
- Nakayama, K. et al. (2012) “Endometrial serous carcinoma: Its molecular characteristics and histology-specific treatment strategies,” *Cancers*, 4(3), pp. 799–807. Available at: <https://doi.org/10.3390/cancers4030799>.
- Nesina IP, Iurchenko NP, Nespryadko SV et al. The study of chromosomal instability in patients with endometrial cancer. *Exp Oncol.* 2014;36(3):202-6.
- Pathiraja P, Dhar S, Haldar K. Serous endometrial intraepithelial carcinoma: a case series and literature review. *Cancer Manag Res.* 2013; 5:117-22
- Parkash V, Carcangui ML: Endometrioid endometrial adenocarcinoma with psammoma bodies. *Am J Surg Pathol* 21: 399– 406, 1997
- Parkash V, Fadare O, Tornos C, McCluggage WG. Committee Opinion No. 631: Endometrial Intraepithelial Neoplasia. *Obstet Gynecol.* 2015 Oct;126(4):897
- Quddus MR, Sung CJ, Zhang C, Lawrence WD. Minor serous and clear cell components adversely affect prognosis in “mixed-type” endometrial carcinomas: a clinicopathologic study of 36 stage-I cases. *Reprod Sci.* 2010;17(7):673–8
- 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

- Schultheis AM, Martelotto LG, De Filippo MR et al. TP53 Mutational Spectrum in Endometrioid and Serous Endometrial Cancers. *Int J Gynecol Pathol*. 2016;35(4):289-300
- Scully RE, Barlow JF. "Mesonephroma" of ovary. Tumor of Müllerian nature related to the endometrioid carcinoma. *Cancer*. 1967 Sep;20(9):1405-17. doi: 10.1002/1097-0142(196709)20:9<1405::aid-cncr2820200907>3.0.co;2-b. PMID: 6038390.
- Shen, Y. et al. (2023) 'Minimally invasive approaches for the early detection of endometrial cancer', *Molecular Cancer*, 22(1). doi:10.1186/s12943-023-01757-3.
- Sherman ME. Theories of endometrial carcinogenesis: a multidisciplinary approach. *Mod Pathol*. 2000 Mar;13(3):295-308. doi: 10.1038/modpathol.3880051. PMID: 10757340.
- Singh G, Puckett Y. Endometrial Hyperplasia. [Updated 2023 Jul 17]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560693/>
- Steinbakk A, Malpica A, Sleva A, Gudlaugsson E, Janssen EA, Arends M, Kruse AJ, Yinhuo Y, Feng W, Baak JP. High frequency microsatellite instability has a prognostic value in endometrial endometrioid adenocarcinoma, but only in FIGO stage 1 cases. *Cell Oncol (Dordr)*. 2011 Oct;34(5):457-65. doi: 10.1007/s13402-011-0040-x. Epub 2011 May 6. Erratum in: *Cell Oncol (Dordr)*. 2011 Oct;34(5):509-10. PMID: 21547578.
- 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
- Van der Meer AC, Hanna LS. Development of endometrioid adenocarcinoma despite Levonorgestrel-releasing intrauterine system: a case report with discussion and review of the RCOG/BSGE Guideline on the Management of Endometrial Hyperplasia. *Clin Obstet Gynecol*. 2017 Feb;7(1):54-57
- Van Nyen, T., Moiola, C. P., Colas, E., Annibali, D., & Amant, F. (2018). Modeling Endometrial Cancer: Past, Present, and Future. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(8), 2348. doi:10.3390/ijms19082348
- Wang ZM, Wan XH, Sang GY et al. miR-15a-5p suppresses endometrial cancer cell growth via Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway by inhibiting WNT3A. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2017;21(21):4810-4818
- Wolfman W, Leyland N, Heywood M et al. Asymptomatic endometrial thickening. *J Obstet Gynaecol Can*. 2010;32(10):990-999.
- Yates MS, Schmandt R et al. Endometrial Cancers With Activating KRas Mutations Have Activated Estrogen Signaling and Paradoxical Response to MEK Inhibition. *Int J Gynecol Cancer*. 2017;27(5):854-862
- Yoon G, Koh CW, Yoon N et al. Stromal p16 expression is significantly increased in endometrial carcinoma. *Oncotarget*. 2017;8(3):4826-4836.
- Zaanan A, Meunier K, Sangar F, Fléjou JF, Praz F. Microsatellite instability in colorectal cancer: from molecular oncogenic mechanisms to clinical implications. *Cell Oncol (Dordr)*. 2011 Jun;34(3):155-76. doi: 10.1007/s13402-011-0024-x. Epub 2011 Apr 12. Erratum in: *Cell Oncol (Dordr)*. 2011 Jun;34(3):277-8. PMID: 21484480.

Zaino RJ, Kurman R, Herbold D et al: The significance of squamous differentiation in endometrial carcinoma: Data from a Gynecologic Oncology Group study. *Cancer* 68: 2293– 2302, 1991

Zaino RJ, Kurman RJ, Brunetto VL et al. Villoglandular 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

Ανατομία του γεννητικού συστήματος της γυναίκας- Παναγιώτης Χριστόπουλος

Εισαγωγή στη Φυσιολογία του ανθρώπου , Sherwood et al