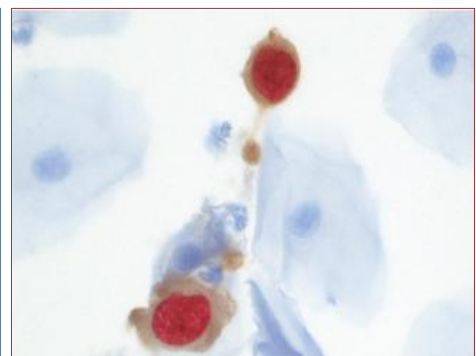
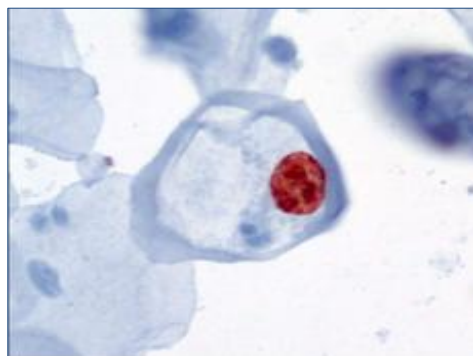
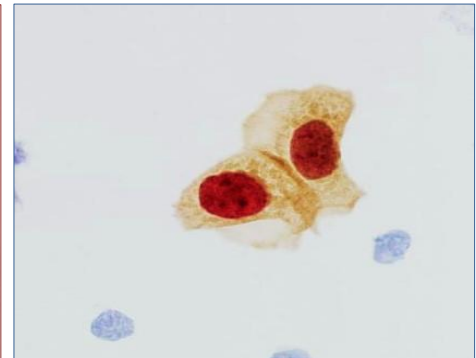
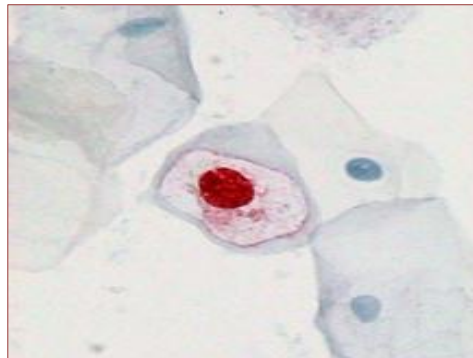




Δείκτες στη Διερεύνηση των Τραχηλικών Ενδοεπιθηλιακών Αλλοιώσεων

Πτυχιακή Εργασία
της
Σκόδρα Δέσποινας



Επιβλέπουσα:

Στυλιανή Μακρή – Κλινικός Κυτταρολόγος
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια ΑΤΕΙΘ

Θεσσαλονίκη
2016

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	4
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	5
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	6
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	7
Τράχηλος	9
Εξωτράχηλος	9
Κυτταρικές Στιβάδες Πολύστιβου πλακώδους Επιθηλίου Εξωτραχήλου	10
Ενδοτράχηλος	10
Ζώνη Μετάπτωσης	11
Ιός των Θηλωμάτων του Ανθρώπου	13
Μοριακή Δομή	14
Κύκλος Ζωής του Ιού HPV	16
Καρκίνος Τραχήλου Μήτρας	17
Επιδημιολογία	17
Αιτιολογία-Παράγοντες κινδύνου	19
Καρκινώματα	20
Διαβάθμιση CIN	22
Σταδιοποίηση FIGO	24
Καρκίνος Τραχήλου-Διαγνωστικές Μέθοδοι	25
Τεστ Παπανικολάου	25
Σύστημα Bethesda	26
Κυτταρολογία Υγρής Φάσης	28
Κολποσκόπηση	29
Τραχηλογραφία	30
Ανοσοκυτταροχημεία-Βιοδείκτες στην Ανίχνευση του Τραχηλικού Καρκίνου	31
p16Ink4A	32
Κυτταρικός Δείκτης Ki-67	35
MYC	37
Κυκλίνες	37
Τελομεράση	37
TOP2A & MCM2	39
MYBL2	40
Επιγενετική	42
Μεθυλίωση του DNA	43
Μεθυλίωση του DNA και καρκίνος	45
Επιγενετικοί Δείκτες	46
Host Methylation	46
Ιογενής και Κυτταρική Μεθυλίωση γονιδίου στην εξέλιξη της Τραχηλικής Νεοπλασίας της μήτρας	48
Νέοι Δείκτες Μεθυλίωσης	49

Θεραπεία	54
Βιβλιογραφία	56

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Ο Καρκίνος του τραχήλου της μήτρας είναι η 4^η σε συχνότητα μορφή καρκίνου στις γυναίκες. Η διάγνωση προδιηθητικών αλλοιώσεων του τραχηλικού επιθηλίου, πραγματοποιείται με τη συμβατική Μεθοδολογία και τη μεθοδολογία της Κυτταρομετρίας Υγρής Φάσης. Η κατανόηση της βιολογίας του HPV και της συσχέτισης του με προκαρκινικές και καρκινικές αλλοιώσεις, οδήγησαν στην ανακάλυψη μιας σειράς δεικτών, οι οποίοι με τη τεχνική της Ανοσοκυτταροχημείας, παίζουν σημαντικό ρόλο στη προσπάθεια βελτίωσης της πρόληψης και της διάγνωσης τα τελευταία χρόνια. Η Ανοσοκυτταροχημική ανίχνευση τους, έχει μεγάλη αξία στην μορφολογική εκτίμηση των αλλοιώσεων και στη πρόβλεψη της εξέλιξης τους. Η υπεροχή της ανοσοκυτταροχημικής διερεύνησης των ενδοεπιθηλιακών νεοπλασιών είναι σαφής, τόσο διαγνωστικά όσο και προγνωστικά.

Επιπλέον, η ανάλυση των δεικτών p16, Ki-67, MYC, Κυκλίνες, Τελομεράση, TOP2A, MCM2, καθώς και η μεθυλίωση του DNA, βελτιώνουν την ταυτοποίηση προκακοηθών αλλοιώσεων, που έχουν μεγάλο κίνδυνο να εξελιχθούν σε διηθητικό καρκίνο του τραχήλου της μήτρας

Η μεθυλίωση του DNA στη διερεύνηση ανίχνευσης του καρκίνου, προσφέρει μία ευκαιρία στον εντοπισμό δεικτών μεθυλίωσης, που θα μπορούσαν να βελτιώσουν ακόμα περισσότερο την πρόγνωση και τη διάγνωση της νόσου. Ταυτόχρονα, πραγματοποιούνται έρευνες για νέους δείκτες μεθυλίωσης, οι οποίοι θα συμβαλλούν σε μεγαλύτερο βαθμό στον εντοπισμό νεοπλασίας σε τραχηλικά επιχρίσματα.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα καθηγήτρια Δρ. Μακρή-Πατσαλά Στυλιανή, Ιατρό Κυτταρολόγο, Αναπληρώτρια καθηγήτρια του Τμήματος Ιατρικών Εργαστηρίων του Α.Τ.Ε.Ι. Θεσσαλονίκης, για την άψογη συνεργασία, τις συμβουλές και τις γνώσεις που μου προσέφερε καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου καθώς και για την σημαντική βοήθεια και καθοδήγηση στην εκπόνηση της παρούσας εργασίας.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας είναι η 4^η πιο κοινή μορφή καρκίνου και η 4^η πιο κοινή αιτία θανάτου από καρκίνο στις γυναίκες. Παγκόσμια, παρατηρούνται 600.000 νέες περιπτώσεις. Ο HPV αποτελεί το σημαντικότερο παράγοντα κινδύνου του τραχήλου της μήτρας. Έχουν περιγραφεί πάνω από 200 διαφορετικοί τύποι. Στους χαμηλού κινδύνου περιλαμβάνονται οι τύποι: 6, 11, 42, 43, 44, 54, 61,71,72,81,83,84,89, ενώ στους υψηλού κινδύνου οι τύποι: 16, 18, 31, 33, 34, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 60.

Τα συχνότερα καρκινώματα του τραχήλου της μήτρας είναι τα καρκινώματα από πλακώδες επιθήλιο, τα αδenoκαρκινώματα, τα αδenoπλακώδη καρκινώματα και τα μικροκυτταρικά νευροενδοκρινή καρκινώματα. Ο διηθητικός καρκίνος του τραχήλου της μήτρας αναπτύσσεται από πρόδρομες δυσπλαστικές αλλοιώσεις και αυτό συμβάλλει στην αποτελεσματικότητα του προληπτικού ελέγχου με το τεστ Παπανικολάου, τη Κυτταρολογία Υγρής Φάσης, τη Κολποσκόπηση που χρησιμοποιούνται ως διαγνωστικοί μέθοδοι στην Ανίχνευση και τη Διερεύνηση προκαρκινικών και καρκινικών αλλοιώσεων.

Έχουν γίνει σημαντικές προσπάθειες για την αναγνώριση βιοδεικτών. Η ανοσοκυτταροχημεία με τη χρήση δεικτών συγκεντρώνει τα περισσότερα πλεονεκτήματα από οποιαδήποτε άλλη Διαγνωστική Μέθοδο ή τεχνική στην πρόωμη διάγνωση. Η πρωτεΐνη p16 με τη χρήση της ανοσοκυτταροχημείας έδειξε ότι οι βλάβες χαμηλού βαθμού θετικές στο p16 έχουν μεγαλύτερο κίνδυνο υποτροπής σε σχέση με βλάβες αρνητικές στο p16. Εύρημα που τον καθιστά χρήσιμο δείκτη. Άλλοι δείκτες που χρησιμοποιούνται είναι: Ki-67, MYC, Κυκλίνες, Τελομεράση, TOP2A, MCM2, MYBL2 και οι επιγενετικοί δείκτες.

Έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί, έχουν εξετάσει την αλλαγή του γονιδίου μεθυλίωσης στα προκαρκινικά και καρκινικά στάδια και έχουν επικεντρωθεί στα υποψηφία σε γονίδια που αναγνωρίστηκαν στις καρκινικές τραχηλικές κυτταρικές σειρές. Διευρύνοντας το πεδίο της έρευνας, έτσι ώστε να συμπεριληφθούν προηγούμενα άγνωστα γονίδια, προσφέρεται μία ευκαιρία για τον εντοπισμό νέων δεικτών μεθυλίωσης. Με το πέρασμα των χρόνων, σταδιακά έχουν αναπτυχθεί πιο εξελιγμένες προσεγγίσεις για τον εντοπισμό νέων δεικτών μεθυλίωσης που θα συμβάλλουν ακόμα περισσότερο στον εντοπισμό νεοπλασίας σε τραχηλικά επιχρίσματα.

Τέλος, οι μορφές θεραπείας που εφαρμόζονται είναι η χειρουργική, η ακτινοθεραπεία και η χημειοθεραπεία, όπου χάρις στα Προγράμματα ανίχνευσης και θεραπείας η θνησιμότητα έχει μειωθεί σημαντικά.

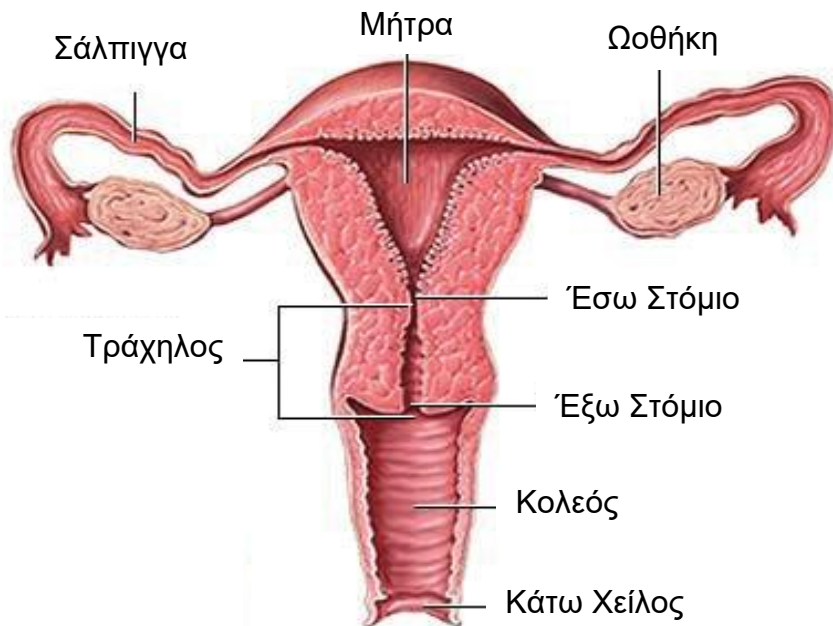
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

AGC	Atypical Glandular Cells (Άτυπα Πλακώδη Κύτταρα)
AIS	Adenocarcinoma in situ (Αδενοκαρκίνωμα in situ)
ASC-H	Atypical Squamous Cells-cannot exclude HSIL (Άτυπα Πλακώδη Κύτταρα που δεν αποκλείουν την ύπαρξη HGSIL)
ASCUS	Atypical Squamous Cells of Unknown Significance (Άτυπα Πλακώδη Κύτταρα Απροσδιόριστης Σημασίας)
CD4	Cluster of Differentiation 4 (T Βοηθητικά Κύτταρα)
CD8	Cluster of Differentiation 8 (T Κυτταροτοξικά Κύτταρα)
CDK	Cyclin-Dependent Kinase (Κυκλινο-Εξαρτώμενη Κινάση)
CDKN2A	Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A (Κυκλινο-Εξαρτώμενος Αναστολέας Κινάσης 2A)
CGH	Comparative Genomic Hybridization (Συγκριτικός Γονιδιωματικός Υβριδισμός)
CIN	Cervical Intraepithelial Neoplasia (Ενδοεπιθηλιακή Νεοπλασία του Τραχήλου της μήτρας)
CIS	Carcinoma in situ (Καρκίνωμα in situ)
CGIN	Cervical Glandular Intraepithelial Neoplasia (Ενδοεπιθηλιακή Αδενική Νεοπλασία του Τραχήλου)
DAB	Diaminobenzidine (Διαμινοβενζιδίνη)
DMH	Differential Methylation Hybridization (Υβριδισμός Διαφορικής Μεθυλίωσης)
DNMT	DNA Methyltransferase (DNA Μεθυλοτρανσφεράσες)
E1-E7	Early Proteins 1 to 7 (Πρώιμες Πρωτεΐνες 1 έως 7)
FIGO	International Federation of Gynecology and Obstetrics (Διεθνής Ομοσπονδία Γυναικολογίας και Μαιευτικής)
FFPE	Formalin-Fixed Paraffin-Embedded
HC-II	Hybrid Capture II (Τεχνική Σύλληψης Υβριδίου)
HDAC	Histone Deacetylases (Δεακετυλάσες των Ιστονών)
HRP	Horseshoe Peroxidase
HPV	Human Papilloma Virus (Ιός των Θηλωμάτων του Ανθρώπου)
ICC	Invasive Cervical Carcinoma (Διηθητικό Καρκίνωμα του Τραχήλου)
ICC	Immunocytochemistry (Ανοσοκυτταροχημεία)
IHC	Immunohistochemistry (Ανοσοϊστοχημεία)
L1-L2	Late Proteins 1 to 2 (Όψιμες Πρωτεΐνες 1 έως 2)
LBC	Liquid Based Cytology (Κυτταρολογία Υγρής Φάσης)
LEEP	Loop Electrosurgical Excision Procedure (Ηλεκτροχειρουργική Εκτέλεση Αφαίρεσης Παθολογικού Τμήματος Τραχηλικού Ιστού)
LOH	Loss Of Heterozygosity (Απώλεια Ετεροζυγωτίας)
MCM2	Minichromosome Maintenance 2

MSP	Methylation Specific PCR (ειδική για την Μεθυλίωση PCR)
MeCP1	Methyl Cytosine binding Protein
mRNA	messenger RNA (Αγγελιοφόρο RNA)
ORFs	Open Reading Frame (Ανοιχτό Πλαίσιο Ανάγνωσης)
p16INK4a	Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A (Αναστολέας Κυκλινο-Εξαρτώμενης Κινάσης 2A)
p53	Protein 53 (Ογκοκατασταλτική Πρωτεΐνη)
p107	Retinoblastoma-Like 1
PCR	Polymerase Chain Reaction (Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης)
pRb	Retinoblastoma protein (πρωτεΐνη Ρετινοβλαστώματος)
QMSP	Quantitative Methylation Specific PCR (Ποσοτική PCR ειδική για μεθυλίωση)
RNA	Ribonucleic Acid (Ριβονουκλεϊνικό Οξύ)
SAM	S-Adenosylmethionine (S-αδενοσινομεθειονίνη)
SIL	Squamous Intraepithelial Lesion (Πλακώδης Ενδοεπιθηλιακή Αλλοίωση)
TOP2A	Topoisomerase IIΑ (Τοποϊσομεράση IIΑ)
TRAP	Telomeric Repeat Amplification Protocol
WHO	World Health Organization (Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας)

ΤΡΑΧΗΛΟΣ

Ο τράχηλος αποτελεί το τελικό άκρο της μήτρας που προβάλλει εντός του κολεού. Το σχήμα του είναι κυλινδρικό και εντοπίζεται στο τραχηλικό κανάλι, το οποίο διασχίζει τον τράχηλο. Έχει δύο στόμια το έσω και το έξω τραχηλικό στόμιο. Διακρίνεται σε εξωτράχηλο και ενδοτράχηλο.



Εξωτράχηλος

Καλύπτεται από πολύστιβο πλακώδες μη κερατινοποιημένο επιθήλιο (stratified squamous nonkeratinized epithelium). Το πρότυπο πλακώδες επιθήλιο έχει πάχος 0,5 mm και παρέχει ένα προστατευτικό κάλυμμα στο κολπικό τμήμα του τραχήλου. Βρίσκεται σε συνέχεια με το πλακώδες επιθήλιο του κόλπου. Το πάχος του ποικίλλει με την ηλικία και κατά την διάρκεια του καταμήνιου παρουσιάζει πλήρη ωρίμανση, κάτω από την επίδραση των οιστρογόνων, ενώ με την επίδραση της προγεστερόνης ωριμάζει μέχρι και τα διάμεσα κύτταρα του πολύστιβου πλακώδους επιθηλίου. Σε απουσία προγεστερόνης-οιστρογόνων μετά την εμμηνόπαυση, το πάχος του επιθηλίου μειώνεται σημαντικά (ατροφικό επιθήλιο).

Το επιθήλιο χωρίζεται από το ινομυώδες στρώμα του τραχήλου με τη βασική μεμβράνη. Το στρώμα αποτελείται κυρίως από συνδετικό ιστό με ελαστικές ίνες και είναι πυκνότερο στον εξωτράχηλο και χαλαρό γύρω από τους ενδοτραχηλικούς αδένες.

Κυτταρικές Στιβάδες Πολύστιβου Πλακώδους Επιθηλίου Εξωτραχήλου

Στο εξωτραχηλικό επιθήλιο αναγνωρίζονται 4 κυτταρικές στιβάδες που αποτελούνται από 4 διαφορετικούς τύπους κυττάρων:

- **Βασική στιβάδα – Βασικά κύτταρα**

Είναι μία στιβάδα κυλινδρικών κυττάρων διαμέτρου 12μm, των οποίων η κύρια λειτουργία είναι η αναγέννηση του επιθηλίου. Ο πυρήνας τους είναι ωοειδής και παρουσιάζει μιτωτική δραστηριότητα (πυρήνιο, χρωμόκεντρα και περιστασιακά μιτώσεις). Τα κύτταρα της στιβάδας αυτής, βρίσκονται προσκολλημένα στο βασικό υμένα και παράγουν τα κύτταρα των υπερκείμενων στιβάδων. Σε φυσιολογικές συνθήκες η διαδικασία της αναγέννησης του επιθηλίου περιορίζεται στη βασική στιβάδα. Οι υπόλοιπες στιβάδες αντανακλούν κυρίως τα διαφορετικά στάδια ωρίμανσης των επιθηλιακών κυττάρων.

- **Παραβασική στιβάδα – Παραβασικά κύτταρα**

Αποτελείται από ώριμα πλακώδη κύτταρα με περισσότερο κυανόφιλο κυτταρόπλασμα, γι' αυτό φαίνονται λίγο μεγαλύτερα, από αυτά της βασικής στιβάδας. Τα κύτταρα της παραβασικής στιβάδας έχουν σχήμα στρόγγυλο ή ωοειδές, με ευμεγέθεις, κεντρικής εντόπισης πυρήνες.

- **Διάμεση στιβάδα – Διάμεσα κύτταρα**

Τα κύτταρα της διάμεσης στιβάδας έχουν σχήμα πλακώδες και φέρουν μικρούς κεντρικής εντόπισης πυρήνες. Είναι μεγαλύτερα σε μέγεθος από τα παραβασικά. Το κυτταρόπλασμα των διάμεσων κυττάρων είναι κυανόφιλο ή βασεόφιλο. Επίσης τα διάμεσα κύτταρα περιέχουν γλυκογόνο.

- **Επιπολής στιβάδα – Επιπολής κύτταρα**

Τα επιπολής κύτταρα έχουν μικρό πυκνωτικό πυρήνα κεντρικής εντόπισης και διάμετρο 2-3 μm. Το κυτταρόπλασμα είναι ηωσινόφιλο. Το Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης αποκαλύπτει την παρουσία κερατίνης στις επιφανειακές στιβάδες. Πλήρης ανάπτυξη της κερατίνης δεν παρατηρείται στο φυσιολογικό τραχηλικό επιθήλιο. Εντούτοις, κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες (πρόπτωση), τα επιπολής κύτταρα μπορεί να συνθέσουν μεγάλα ποσά κερατίνης και περιέχουν μεγάλη ποσότητα γλυκογόνου.

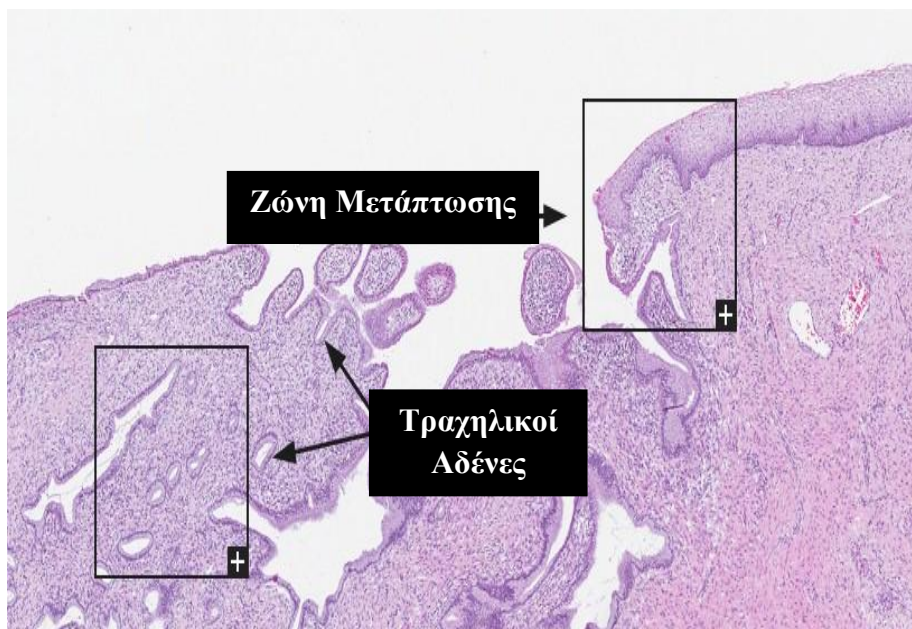
Ενδοτράχηλος

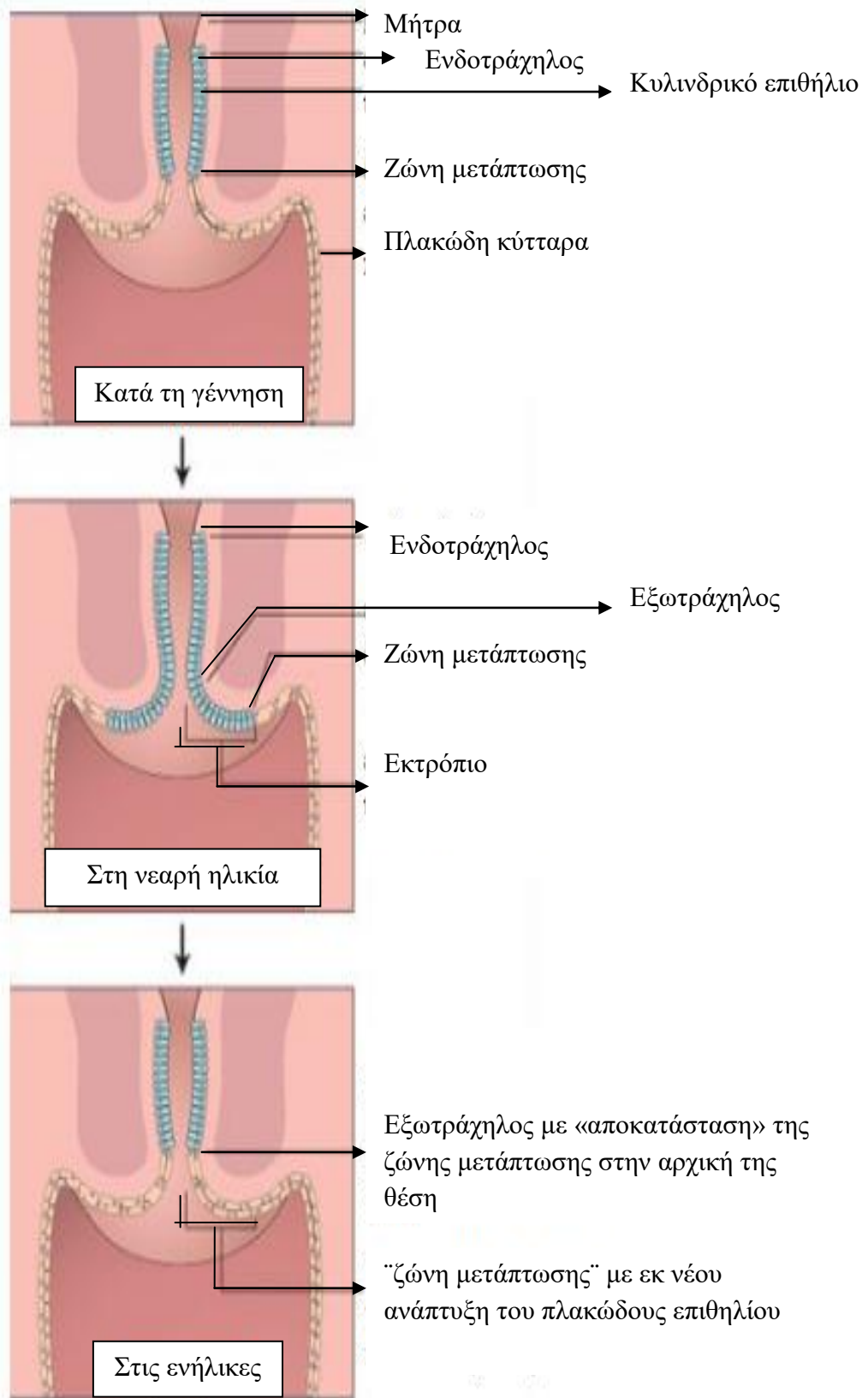
Επενδύεται από βλεννοεκκριτικό μονόστιβο κυλινδρικό επιθήλιο (mucus-secreting simple columnar epithelium) με κύτταρα βλεννοεκκριτικά και σπανιότερα κροσσωτά. Ο ενδοτράχηλος, μέσω του έσω τραχηλικού στομίου, επικοινωνεί με τη μητριάια κοιλότητα. Αποτελεί το εσωτερικό τμήμα του τραχήλου το οποίο διασχίζεται από το ενδοτραχηλικό κανάλι.

Ζώνη Μετάπτωσης

Το σημείο συνάντησης πλακώδους - αδενικού επιθηλίου, αδеноπλακώδης συμβολή, είναι γνωστή και ως ζώνη μετάπτωσης. Πριν από την εφηβεία, η ζώνη μετάπτωσης βρίσκεται στον τραχηλικό σωλήνα. Με την έναρξη της εφηβείας, όπως και κατά την κύηση, παρατηρείται εκτροπή του κυλινδρικού επιθηλίου του ενδοτραχήλου, με αποτέλεσμα η ζώνη μετάπτωσης να μετακινείται στο έξω τραχηλικό στόμιο ή και στην κοιλική επιφάνεια του εξωτραχήλου. Αυτό δημιουργεί την κλινική εικόνα «διάβρωσης» του τραχήλου. Πρόκειται για ατυχή όρο, καθώς η μεταβολή αυτή είναι φυσιολογική. Ο όρος εκτοπία είναι πιο κατάλληλος.

Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα, το κυλινδρικό επιθήλιο του ενδοτραχήλου να εκτίθεται στο χαμηλό pH της κοιλικής βλέννας και να υφίσταται πλακώδη μετάπλαση. Φαινόμενο φυσιολογικό και που σχετίζεται με υπερπλασία των εφεδρικών κυττάρων και άωρη πλακώδη μετάπλαση. Τα εφεδρικά κύτταρα, πολλαπλασιάζονται και αντικαθιστούν τα κυλινδρικά βλεννοπαράγωγα επιθηλιακά κύτταρα. Η περιοχή του πλακώδους επιθηλίου μεταξύ αρχικού και νέου πλακώδους επιθηλίου, ονομάζεται Ζώνη Μετασχηματισμού (Ζώνη Μετάπτωσης). Πρόκειται για περιοχή, στην οποία αναπτύσσεται η τραχηλική νεοπλασία.





Ανάπτυξη της Ζώνης μετάπτωσης στον Τράχηλο της Μήτρας.

ΙΟΣ ΤΩΝ ΘΗΛΩΜΑΤΩΝ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ (**Human Papillomavirus,HPV**)

Ο Ιός των Θηλωμάτων του ανθρώπου είναι ο πιο διαδεδομένος σεξουαλικά μεταδιδόμενος ιός τόσο σε άνδρες όσο και σε γυναίκες. Έχουν περιγραφεί περισσότεροι από 200 διαφορετικοί τύποι που διακρίνονται σε:

- **Χαμηλού Κινδύνου (Low Risk)**

Προκαλούν καλοήγη κονδυλώματα. Περιλαμβάνουν τους τύπους: 6, 11, 42, 43, 44, 54, 61, 62, 71, 72, 81, 83, 84 και 89. Οι HPV 6 και 11 ανευρίσκονται σε καλοήγη κονδυλώματα και συνήθως δεν σχετίζονται με κακοήγη εξαλλαγή. Ευθύνονται για το 90% των γεννητικών κονδυλωμάτων.

- **Υψηλού Κινδύνου (High Risk)**

Σχετίζονται με τον τραχηλικό καρκίνο και περιλαμβάνουν τους τύπους: 16,18,31,33,34,35,39,45,51,52,56,58,59,66. Ο HPV 16 και σε μικρότερο βαθμό ο HPV 18, ανευρίσκονται σε ενδοεπιθηλιακές νεοπλασίες του τραχήλου της μήτρας και στο 100% περίπου των καρκινωμάτων. Άλλοι HPV τύποι, όπως οι HPV 31 και 33 έχουν ανιχνευθεί επίσης σε καρκινώματα του τραχήλου της μήτρας.

Ο HPV ανήκει στην οικογένεια των ιών Papovna. Ονομάζεται έτσι επειδή προκαλεί θηλώματα. Το σωματίδιο του ιού έχει διάμετρο 54nm και αποτελείται από διπλή κυκλική έλικα DNA, μήκος περίπου 8kb. Περιβάλλεται από πρωτεϊνικό καψίδιο. Ο HPV μολύνει το επιθήλιο του δέρματος και των βλεννογόνων, από τα χέρια και τα ποδιά, μέχρι και την περιοχή των γεννητικών οργάνων. Ο χρόνος επώασης του ιού κυμαίνεται στους 2-3 μήνες.

Το DNA των ιών HPV εμφανίζει:

- είτε **επισωμάτωση**, βρίσκεται εκτός του DNA
- είτε **ενσωμάτωση**. Η ενσωμάτωση ιικού γονιδιώματος στο DNA του ξενιστή παρατηρείται συνήθως στην Υψηλού Βαθμού Ενδοεπιθηλιακή Νεοπλασία και στο Διηθητικό Ακανθοκυτταρικό Καρκίνωμα του τραχήλου της μήτρας.

Χαρακτηριστικά που σχετίζονται με την HPV λοίμωξη στον άνθρωπο είναι:

- **Κοιλοκυττάρωση**
- **Υπερκεράτωση**
- **Παρακεράτωση**
- **Θηλωμάτωση**
- **Κερατινοποίηση μεμονωμένων κυττάρων**
- **Παρουσία πολλαπλών πυρήνων.**

Τα μορφολογικά αυτά χαρακτηριστικά ανευρίσκονται συχνά στην Ενδοεπιθηλιακή Νεοπλασία του Αιδοίου, του Κόλπου και του Τραχήλου της μήτρας.

Μοριακή Δομή

Στο γενετικό υλικό του ιού HPV αντιπροσωπεύεται από τα γονίδια του. Η λειτουργική περιοχή του γονιδιώματος διακρίνεται σε 3 μέρη:

- **Πρώιμη (Early, E)**

Περιλαμβάνει 6 ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης που κωδικοποιούν τις πρώιμες πρωτεΐνες E1,E2,E4,E5,E6,E7.

Πρωτεΐνες E1 και E2

Εκφράζονται στα κύτταρα της παραβασικής στιβάδας, όπου είναι απαραίτητες για τη διατήρηση της σταθερότητας του ιικού DNA, και πιο συγκεκριμένα η E1 ελέγχει την αντιγραφή του ιικού γονιδιώματος και η E2 κωδικοποιεί έναν κατασταλτικό μεταγραφικό παράγοντα που αναστέλλει την μεταγραφή του υποκινητή P97, ο οποίος ελέγχει τη σύνθεση των πρωτεϊνών E6 και E7.

Πρωτεΐνες E6 και E7

Είναι οι κύριες ογκογενετικές πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην καρκινογένεση από τον HPV. Σε περίπτωση κακοήθους εξαλλαγής των κυττάρων, που επιτελείται με ενσωμάτωση του ιικού DNA στο γένωμα του ξενιστή, παρατηρείται διάσπαση του γονιδίου που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη E2 και επομένως, απώλεια έκφρασης της συγκεκριμένης πρωτεΐνης, με αποτέλεσμα η απώλεια της να προκαλεί την υπερέκφραση των E6 και E7 πρωτεϊνών.

Η πρωτεΐνη E6 των Υψηλού κινδύνου HPV τύπων είναι ικανή να προσδεθεί με την κυτταρική πρωτεΐνη p53, σχηματίζοντας ένα σύμπλοκο που εξουδετερώνει τη φυσιολογική ανταπόκριση των επιθηλιακών κυττάρων του τραχήλου της μήτρας στις βλάβες του DNA. Η E6 προκαλεί πρωτεόλυση της p53, μέσα από έναν μηχανισμό που εξαρτάται από την ουβικιτίνη, προσβάλλοντας τη φάση G1 του κυτταρικού κύκλου. Κατ' αυτό τον τρόπο, τίθεται εκτός λειτουργίας η p53 πρωτεΐνη, ένα ογκοκατασταλτικό γονίδιο ρυθμιστής του κυτταρικού κύκλου και επαγωγέας κυτταρικού θανάτου(απόπτωση). Οι HPV χαμηλού κινδύνου δεν φαίνεται να είναι ικανοί να σχηματίσουν σύμπλοκα με την p53 πρωτεΐνη.

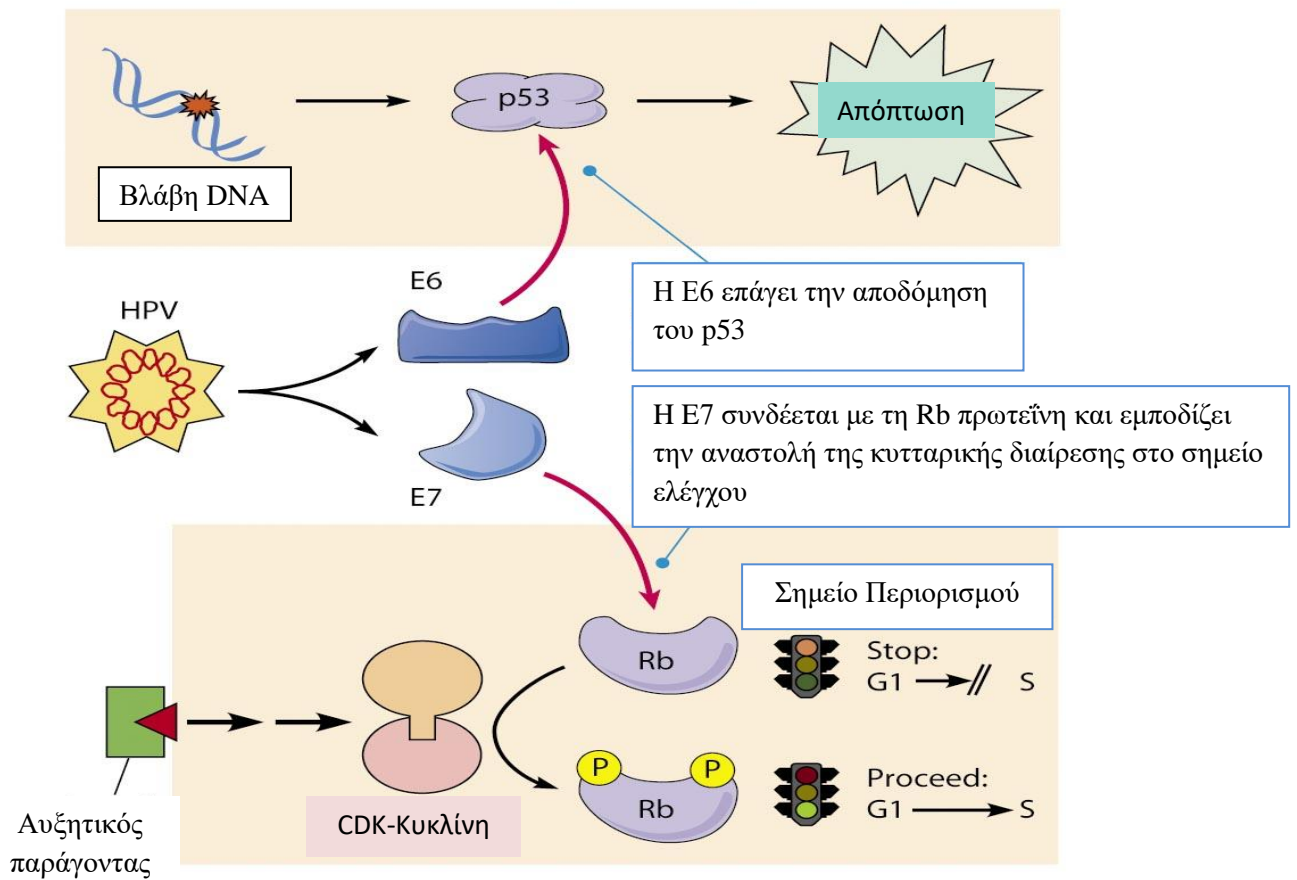
Η πρωτεΐνη E7 των Υψηλού κινδύνου HPV τύπων συνδέεται με την πρωτεΐνη-αναστολέα του ρετινοβλαστώματος(pRb). Η σύνδεση της προκαλεί την απελευθέρωση του μεταγραφικού παράγοντα E2F. Αυτό οδηγεί στην ενεργοποίηση ορισμένων γονιδίων-εξαρτώμενων από τον E2F, που απαιτούνται για τη σύνθεση του DNA και τον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Η E7 πρωτεΐνη απενεργοποιεί επίσης τις CDK1, CDKN1A/p21 και CDKN1B/p27. Επίσης, υπάρχει πιθανότητα να συνδέονται και να ενεργοποιούν τις κυκλίνες E και A.

Πρωτεΐνη E4

Συντελεί στην ωρίμανση του ιικού σωματιδίου, διαταράσσει τον κυτταροσκελετό και διευκολύνει την απελευθέρωση των ιικών σωματιδίων από τα διαφοροποιημένα κερατινοκύτταρα.

Πρωτεΐνη E5

Τροποποιεί το σήμα που προέρχεται από τους υποδοχείς των αυξητικών παραγόντων.



Ο ρόλος των E6 και E7 πρωτεϊνών στην HPV λοίμωξη.

- **Όψιμη (Late, L)**

Περιλαμβάνει 2 πλαίσια ανάγνωσης που εκφράζουν τις 2 όψιμες πρωτεΐνες L1 και L2. Τα όψιμα γονίδια L1 και L2 μεταγράφονται και μεταφράζονται σε δομικές πρωτεΐνες που ενθυλακώνουν το γονιδίωμα του ιού σε ένα καψίδιο για να το προστατέψουν. Μόλις το ιικό γονιδίωμα ενθυλακωθεί, το καψίδιο αποβάλλεται με μια ωρίμανση χημικής οξειδοαναγωγής, που σταθεροποιεί τα ιικά σωματίδια και αυξάνει την εξειδικευμένη μολυσματικότητα τους.

- **Περιοχή ελέγχου ή μη Κωδικοποιούσα περιοχή**

Περιλαμβάνει την περιοχή έναρξης πολλαπλασιασμού του ιικού DNA καθώς επίσης και ρυθμιστικές περιοχές ελέγχου της μεταγραφής των ανοιχτών πλαισίων ανάγνωσης. Ο διαχωρισμός των HPV γονιδίων σε πρώιμα και όψιμα γίνεται με βάση το χρόνο έκφρασης τους κατά τη φυσική εξέλιξη της HPV λοίμωξης.

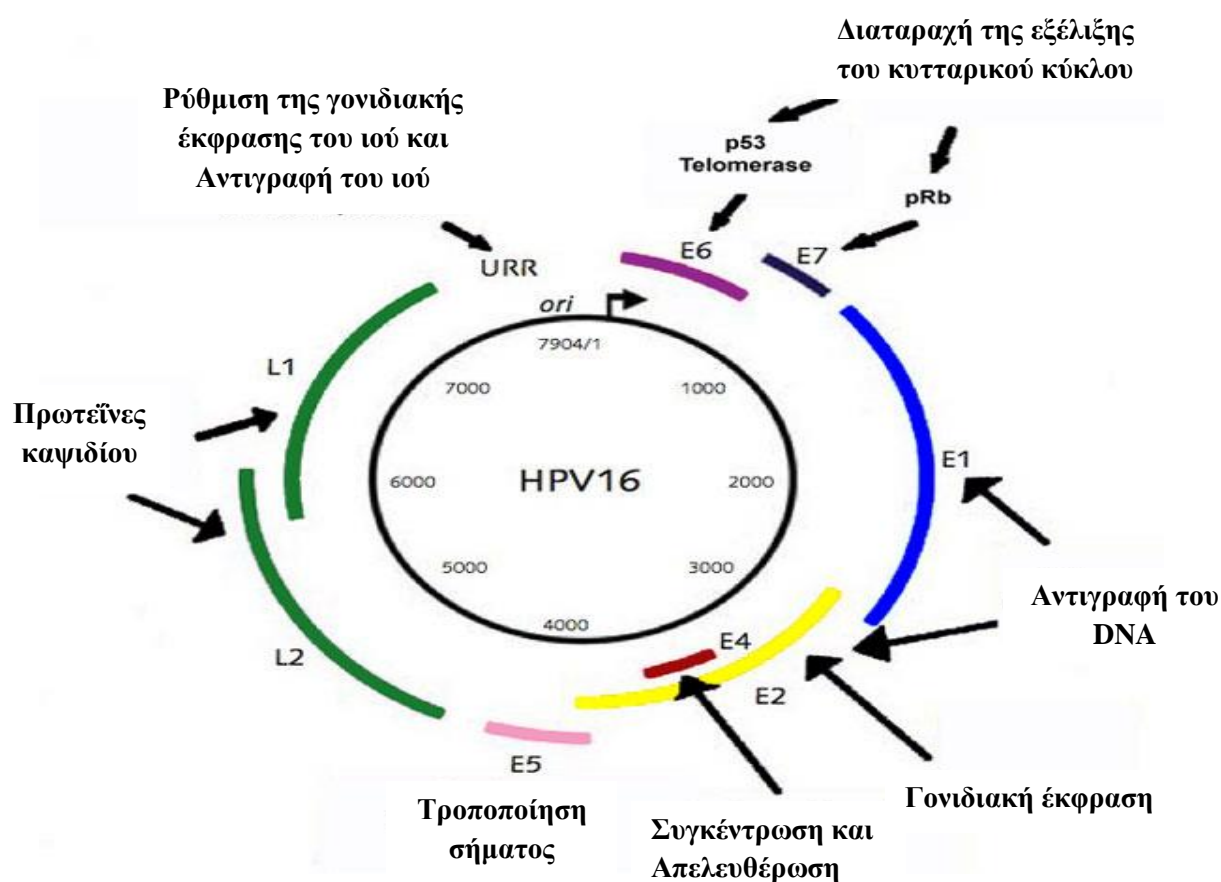
Κύκλος Ζωής του Ιού HPV

Ο ιός εισέρχεται στα βασικά κύτταρα του επιθηλίου του τραχήλου της μήτρας και απελευθερώνει το DNA του ιού στον πυρήνα. Στις κακοήθειες βλάβες που σχετίζονται με τους HPV-16 και HPV-18, το ιικό γονιδίωμα ενσωματώνεται στο κύτταρο με γραμμική μορφή (ενσωμάτωση του HPV DNA)

Για να συμβεί αυτό, το ιικό γονιδίωμα στα E1 και E2 ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης, υφίσταται ρήξη με αποτέλεσμα την απώλεια αυτών των γονιδίων, αλλά και των πρωτεϊνών που την κωδικοποιούν, οι οποίες είναι απαραίτητες για τη ρύθμιση της αντιγραφής και μεταγραφής του ιού. Αυτό έχει ως συνέπεια την αύξηση της έκφρασης των πρωτεϊνών E6 και E7.

Όταν το κύτταρο εντοπίζει το ιικό DNA τότε επιχειρεί να επισκευάσει το σφάλμα και Δεδομένου ότι αυτό το DNA είναι πολύ μεγάλο για να εξαλειφθεί, οι πρωτεΐνες p53 και pRb οδηγούν το μολυσμένο κύτταρο στην απόπτωση. Όμως οι HR-HPV προστατεύονται με αυτό τον κυτταρικό μηχανισμό και είναι σε θέση να συνθέσουν πρωτεΐνες, οι οποίες μπλοκάρουν σ' αυτό το κυψελοειδές σύστημα άμυνας. Οι E7 και E6 είναι σε θέση να εμποδίσουν την Rb και p53 αντίστοιχα. Έτσι οι E6 και E7 θα πρέπει να θεωρούνται ως ιογενή ογκογονίδια.

Επομένως, ο μηχανισμός της HPV καρκινογένεσης αρχίζει με την έκφραση των E6 και E7 που μπλοκάρουν την p53 και Rb και σχετίζονται με την αθανатоποίηση του κυττάρου που κινδυνεύει.



Δομή γονιδιώματος του ιού HPV.

ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΡΑΧΗΛΟΥ ΜΗΤΡΑΣ

Επιδημιολογία

Ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας είναι η 4^η πιο κοινή μορφή καρκίνου και η 4^η πιο κοινή αιτία θανάτου από καρκίνο στις γυναίκες. Το 2012 υπολογίστηκε ότι υπήρχαν 528.000 περιστατικά καρκίνου του τραχήλου της μήτρας και 266.000 θάνατοι παγκόσμια, ποσοστό που αντιστοιχεί στο 8% των συνολικών θανάτων από καρκίνο στις γυναίκες. Περιοχές με την υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης είναι η Λατινική Αμερική, η Υποσαχάρια Αφρική, η Νότια και Νοτιοανατολική Ασία, ενώ περιοχές με τη χαμηλότερη συχνότητα είναι η Δυτική Ευρώπη, η Βόρεια Αμερική, η Μέση Ανατολή και η Κίνα.

Στις χώρες με την υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης, η νόσος εμφανίζεται συνήθως σε προχωρημένα στάδια, λόγω απουσίας προληπτικού ελέγχου, όπου σε συνδυασμό με την έλλειψη ικανοποιητικών μέσων πρόληψης παρατηρείται αύξηση των θανάτων με ποσοστό το 13% των γυναικών με καρκίνο. Επίσης, η συνολική συχνότητα των γεννητικών λοιμώξεων εκτιμάται ότι περιλαμβάνει το 60-75% του σεξουαλικά ενεργού πληθυσμού στον κόσμο.

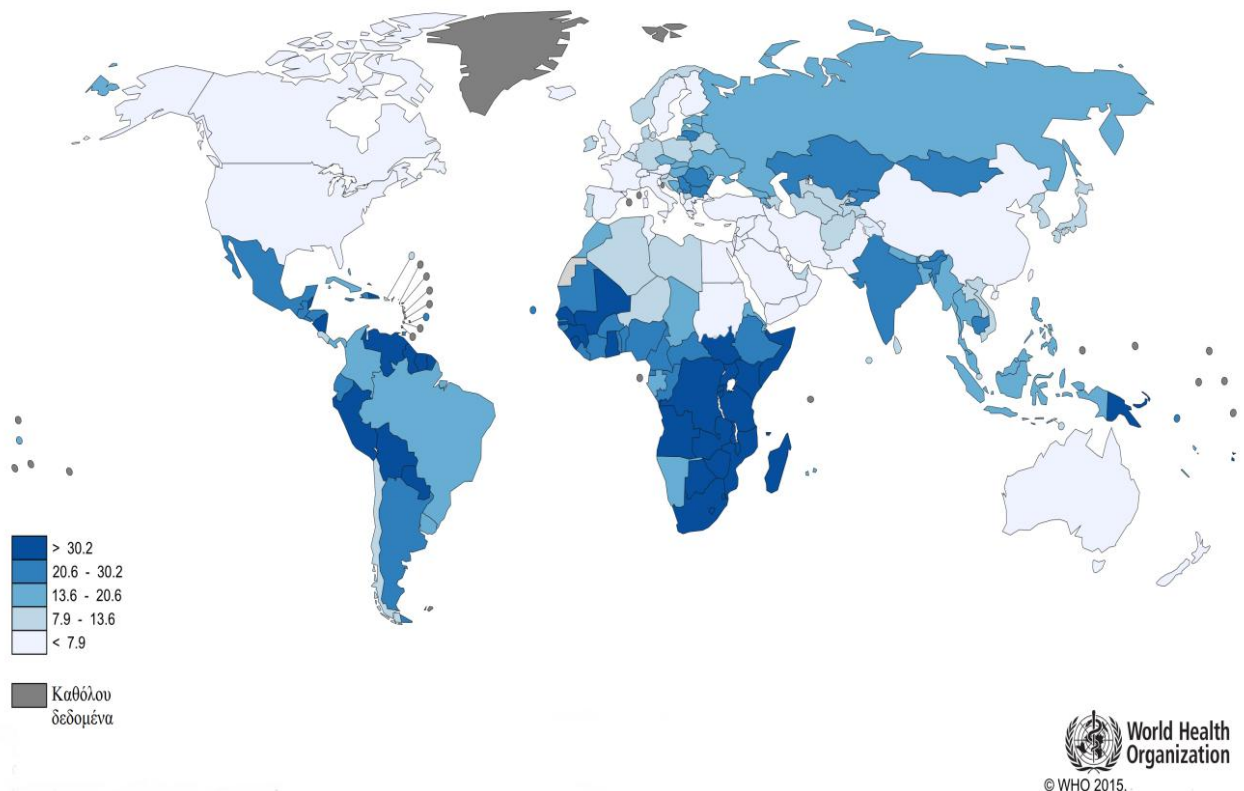
Παγκόσμια, περίπου παρατηρούνται 600.000 νέες περιπτώσεις γυναικών με καρκίνο του τραχήλου της μήτρας. Πολλές από αυτές θα εμφανίσουν σημαντική νοσηρότητα ή θνησιμότητα, καθώς η έγκαιρη ανίχνευση και η απουσία κατάλληλης ιατρικής θεραπείας δεν είναι δυνατή ή διαθέσιμη.

Στον Δυτικό κόσμο, η νόσος έχει μειωθεί τις τελευταίες δεκαετίες μέχρι και 60%, ωστόσο παραμένει ένα σημαντικό πρόβλημα. Το 2002 στην Ευρωπαϊκή Ένωση των 25 κρατών, διαγνώστηκαν 33.000 νέες περιπτώσεις καρκίνου τραχήλου της μήτρας και 15.000 περίπου γυναίκες κατέληξαν από τη νόσο. Ακόμα και ο σωστά οργανωμένος προληπτικός έλεγχος αδυνατεί να εξαλείψει τη διηθητική νόσο, που προσβάλλει μέρος του πληθυσμού, αν και υπάρχει η άποψη ότι το 65% των νέων κρουσμάτων αφορά γυναίκες που αποφεύγουν την προληπτική εξέταση.

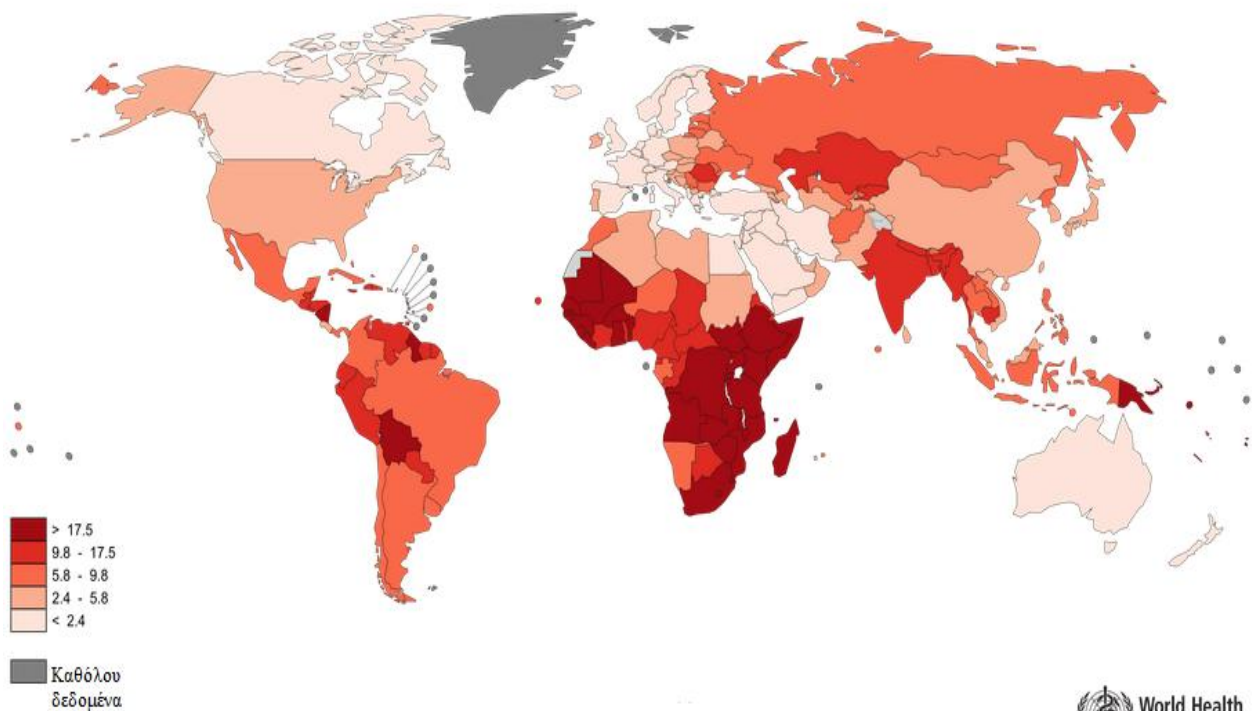
Στις ΗΠΑ, αποτελεί τον 8^ο συχνότερο καρκίνο των γυναικών, και κατατάσσεται μετά τον καρκίνο του ενδομητρίου και των ωοθηκών. Η συχνότητα και η θνησιμότητα μειώνεται στο μισό σε σχέση με τον υπόλοιπο κόσμο, χάρη στον προληπτικό έλεγχο. Το 2004, τα κρούσματα ήταν μόλις 7/100.000 γυναίκες. Ετήσια 6.2 εκατομμύρια νέες λοιμώξεις εμφανίζονται και στα δύο φύλα. Ο HPV των γυναικείων οργάνων είναι πολύ συνηθισμένος και αναγνωρίζεται 80% περίπου των σεξουαλικά ενεργών ατόμων.

Στο Ηνωμένο Βασίλειο η επίπτωση το 2006 ήταν 8.5/100.000, και αποτελεί τον 12ο συχνότερο καρκίνο στις γυναίκες, και τον 2ο πιο συχνό σε γυναίκες ηλικία κάτω των 35. Η θνησιμότητα φτάνει μόλις το 2.4/100.000 για το 2007. Στον Καναδά, το 2008 μόλις 1.300 γυναίκες διαγνώστηκαν με καρκίνο και 380 πέθαναν. Ενώ στην Αυστραλία, το 2005 εμφανίστηκαν 734 κρούσματα, με τον αριθμό των γυναικών να μειώνεται σταθερά κατά 5% ετήσια μετά την έναρξη του Προγράμματος ελέγχου του πληθυσμού το 1991.

Στην Ελλάδα, από στοιχεία των 3 μεγαλύτερων αντικαρκινικών νοσοκομείων και 7 πανεπιστημιακών κλινικών για το έτος 2004, προκύπτει ότι εμφανίστηκαν 398 νέες περιπτώσεις τραχηλικού καρκίνου, χωρίς να είναι γνωστά τα περιστατικά στα υπόλοιπα Νοσοκομεία και Κέντρα της χώρας. Υπολογίζεται ότι ετήσια διαγιγνώσκονται 600 περίπου νέες περιπτώσεις καρκίνου τραχήλου μήτρας και 250 γυναίκες πεθαίνουν. Η μέση ηλικία των γυναικών με καρκίνο του τραχήλου της μήτρας είναι περίπου 52 ετών. Τα περισσότερα κρούσματα αφορούν τις ηλικιακές ομάδες 30-39 ετών και 60-69 ετών. Στις ηλικιωμένες γυναίκες εμφανίζονται συχνότερα με προχωρημένη νόσο, σε σύγκριση με τις νεότερες, και αυτό ερμηνεύεται από τον πλημμελή ή αραιότερο προληπτικό έλεγχο στον οποίο υποβάλλονται. Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO) δημοσίευσε το 2015, στοιχεία σχετικά με την επίπτωση και τη θνησιμότητα του καρκίνου τραχήλου της μήτρας παγκόσμια.



Παγκόσμια συχνότητα εμφάνισης τραχηλικού καρκίνου (2012).



Παγκόσμια θνησιμότητα τραχηλικού καρκίνου (2012).

Αιτιολογία – Παράγοντες κινδύνου

Επιδημιολογικές μελέτες έδειξαν ότι η ανάπτυξη του τραχηλικού καρκίνου σχετίζεται με:

- **μικρή ηλικία έναρξης σεξουαλικών επαφών**
- **συχνότητα επαφών**
- **αριθμό σεξουαλικών συντρόφων**
- **κάπνισμα**
- **φυλή**
- **χαμηλή κοινωνικοοικονομική κατάσταση**
- **κατάσταση ανοσοανεπάρκειας**
- **αντισύλληψη.**

Αυτοί αποτελούν και τους παράγοντες κίνδυνου. Ισχυρότερη είναι η συσχέτιση του με τη σεξουαλική συμπεριφορά. Σήμερα έχει τεκμηριωθεί ότι τύποι των ιών των θηλωμάτων του ανθρώπου (HPV) αποτελούν τους σημαντικότερους παράγοντες κινδύνου.

Καρκινώματα

Τα συχνότερα καρκινώματα του τραχήλου της μήτρας είναι:

I. Καρκινώματα εκ πλακώδους επιθήλιου (75%)

- **Πλακώδης Ενδοεπιθηλιακή Βλάβη**

Η βλάβη συμβαίνει στην αδenoπλακώδη συμβολή, στη ζώνη μετάπλασης. Το φάσμα των μορφολογικών αλλαγών σχετίζεται με την HPV λοίμωξη του τραχήλου της μήτρας. Σχεδόν όλα τα διηθητικά καρκινώματα από πλακώδες επιθήλιο αρχίζουν από προκαρκινωμάτoδεις αλλοιώσεις του επιθήλιου, οι οποίες αναφέρονται ως CIN. Ωστόσο, δεν εξελίσσονται όλες οι περιπτώσεις CIN σε διηθητικό καρκίνο, πολλές μπορεί να παραμένουν αμετάβλητες ή ακόμα και να υποχωρήσουν, γι αυτό καθιερώθηκε ανάλογα με το βαθμό της βλάβης η ταξινόμηση CIN.

- **Μικροδιηθητικό Καρκίνωμα**

Η μικροδιήθηση, όπως έχει οριστεί ανάλογα με το βάθος της βλάβης και σύμφωνα με τη FIGO είναι $\leq 5\text{mm}$ βάθος και πλάτος $\leq 7\text{mm}$. Το βάθος μετράται από τη βάση του επιθήλιου μέχρι το βαθύτερο σημείο της εισβολής. Τα παθολογικά χαρακτηριστικά του, περιέχουν μια επεμβατική γλώσσα κακόηθων κυττάρων που διαπερνά τη βασική μεμβράνη και μια δεσμοπλαστική αντίδραση στο παρακείμενο στρώμα. Πρόσθετα χαρακτηριστικά, που βοηθούν στην αναγνώριση της διήθησης, είναι η διάτμηση ή οι περιθωριακές παρατυπίες της επιθηλιακής-στρωματικής σύγκλισης και η επικάλυψη ή αναδίπλωση του νεοπλασματικού επιθήλιου.

- **Διηθητικό Καρκίνωμα**

Κατά την εξέλιξη της νόσου, οι βλάβες μπορεί να παρουσιάζουν εξωφυτική, πολυποειδή ή θηλώδη εμφάνιση. Μια ενδοφυτική βλάβη μπορεί να οδηγήσει σε έναν διευρυμένο και οζώδη σκληρυμένο τράχηλο, κάτω από το άθικτο επιθήλιο. Επίσης, ο τράχηλος της μήτρας μπορεί να αναπτυχθεί σε μέγεθος και σχήμα. Μεγαλοκυτταρικά καρκινώματα εμφανίζονται ως ακανόνιστα φύλλα γωνιωδών έως στρογγυλών κυττάρων με αιχμηρά σύνορα κυττάρων και μεσοκυττάρειες γέφυρες, χοντρούς πυρήνες χρωματίνης, καθώς και προεξέχοντα πυρήνια.

II. Αδενοκαρκινώματα (20%)

Η αδενική νεοπλασία του τραχήλου της μήτρας είναι πιο σπάνια από την πλακώδη νεοπλασία, αν και η συχνότητα της αυξάνεται. Μπορεί να χωριστεί σε τρεις κατηγορίες:

- **Αδενοκαρκίνωμα in situ**

Το αδενοκαρκίνωμα in situ είναι ένα Ενδοεπιθηλιακό αδενικό νεόπλασμα του τραχήλου της μήτρας, το οποίο θεωρείται πρόδρομος διηθητικού αδενοκαρκινώματος. Ανιχνεύεται ολοένα και συχνότερα, παρατηρείται σε νεαρότερη ηλικία απ' ότi η κακοήθης αδενική νεοπλασία και συχνά συνυπάρχει με τη διηθητική νόσο και σχετίζεται περισσότερο με τον HPV-18 απ' ότi με τον HPV-16. Μπορεί να επεκταθεί 3cm προς τα πάνω μέσα στον ενδοτραχηλικό σωλήνα.

Τα κύρια μορφολογικά χαρακτηριστικά είναι:

- το κυτταρολογικά κακόηθες αδενικό επιθήλιο με διαστρωμάτωση
- η ατυπία
- η μιτωτική δραστηριότητα
- η συχνή απόπτωση χωρίς στρωματική εισβολή.

Οι κυτταρικές αλλαγές μπορεί να βρεθούν εστιακά στους αδένες και μπορεί να έχουν ενδοτραχηλικά κύτταρα ενδομητρίου, εντέρου ή μικτών κυτταρικών τύπων. Μερικές φορές η διάκριση αδενοκαρκινώματος *in situ* και μη νεοπλασματικού αδενικού επιθηλίου μπορεί να είναι δύσκολη.

- **Μικροδιηθητικό αδενοκαρκίνωμα**

Η έννοια του μικροδιηθητικού αδενοκαρκινώματος δεν έχει γίνει ακόμα αποδεκτή, αν και πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι αλλοιώσεις με βάθος $\leq 5\text{mm}$ συμπεριφέρονται παρόμοια με τα μικροδιηθητικά πλακώδη αδενοκαρκινώματα.

- **Αδενοκαρκινώματα**

Εξαιτίας της διαφοροποίησης έχουν παρατηρηθεί διάφοροι υπότυποι αδενοκαρκινώματος όπως: βλεννώδες αδενοκαρκίνωμα, αδενοκαρκινώματα εκ διαυγών κυττάρων, ορώδες αδενοκαρκίνωμα. Τα αδενοκαρκινώματα από διαυγή κύτταρα μπορεί να έχουν σχέση με την έκθεση σε διαιθυλοστιλβεστρούλη στην μήτρα, αλλά δεν έχουν καμία γνωστή ένωση με τον Ιό των θηλωμάτων του ανθρώπου. Το ορώδες αδενοκαρκίνωμα είναι σπάνιο και έχει κακή πρόγνωση.

III. Αδενοπλάκωδη καρκινώματα (20%)

Γίνεται όλο και περισσότερο αντιληπτό ότι ποσοστό των καρκινωμάτων του τραχήλου της μήτρας είναι μικτά αδενοπλάκωδη καρκινώματα, δηλαδή έχουν τόσο πλακώδη όσο και αδενικά χαρακτηριστικά. Αυτό γίνεται κατανοητό αν αναλογιστούμε ότι τα “άτυπα” εφεδρικά κύτταρα μπορούν να διαφοροποιηθούν είτε προς πλακώδη είτε προς αδενικά κύτταρα.

IV. Μικροκυτταρικά νευροενδοκρινή καρκινώματα(<5%).

- **Νευροενδοκρινείς όγκοι**

Περιλαμβάνουν τα καρκινοειδή, τα άτυπα καρκινοειδή, μεγάλα και μικρά νευροενδοκρινή καρκινώματα. Οι καρκινοειδείς όγκοι έχουν χαρακτηριστική οργανοειδή εμφάνιση. Πυρηνική ατυπία, νέκρωση και μιτωτική δραστηριότητα είναι τα κριτήρια που χρησιμοποιούνται για να γίνεται διάκριση μεταξύ τυπικών και άτυπων καρκινοειδών. Το μικροκυτταρικό καρκίνωμα αντιπροσωπεύει <5% του συνόλου των καρκινωμάτων του τραχήλου της μήτρας και είναι διαβόητο για την επιθετική του συμπεριφορά. Το μεγαλοκυτταρικό νευροενδοκρινικό καρκίνωμα είναι σπάνιο με άφθονο κυτταρόπλασμα, μεγάλο πυρήνα και πυρηνίσκους. Έχει κακή πρόγνωση παρόμοια με αυτή του μικροκυτταρικού νευροενδοκρινικού καρκινώματος.

Διαβάθμιση CIN

Ο όρος CIN (Cervical Intraepithelial Neoplasia), αναφέρεται στις αλλοιώσεις του πλακώδους επιθηλίου, οι οποίες θεωρούνται πρόδρομες αλλοιώσεις διηθητικού ακανθοκυτταρικού καρκινώματος. Σύμφωνα με το Σύστημα Bethesda, οι Προκαρκινωματώδεις αλλοιώσεις διακρίνονται σε δύο ομάδες:

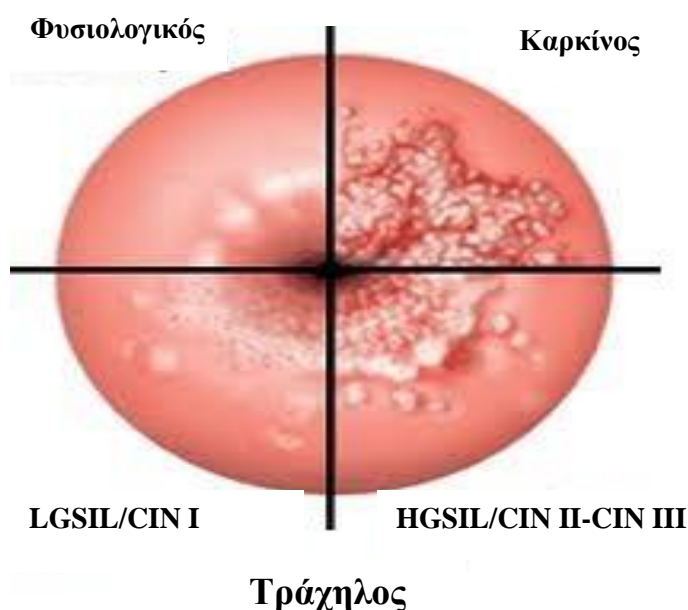
- Χαμηλού βαθμού πλακώδης ενδοεπιθηλιακή αλλοίωση (Low Grade Squamous Intraepithelial Lesion, LGSIL)
- Υψηλού βαθμού πλακώδης ενδοεπιθηλιακή αλλοίωση (High Grade Squamous Intraepithelial Lesion, HGSIL)

Βάσει των ιστολογικών ευρημάτων, οι προκαρκινωματώδεις αλλοιώσεις ταξινομούνται ως εξής:

CIN I - Ήπια δυσπλασία

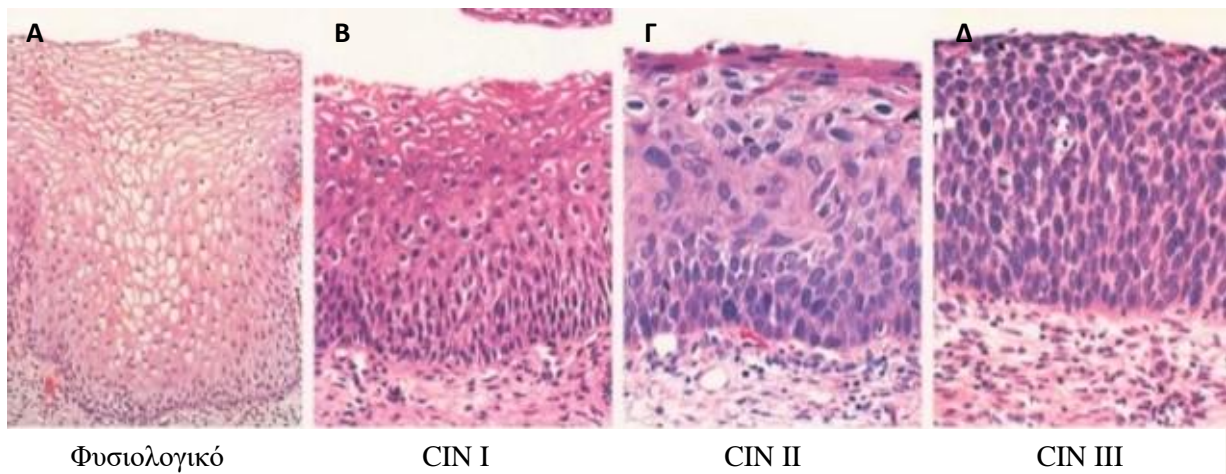
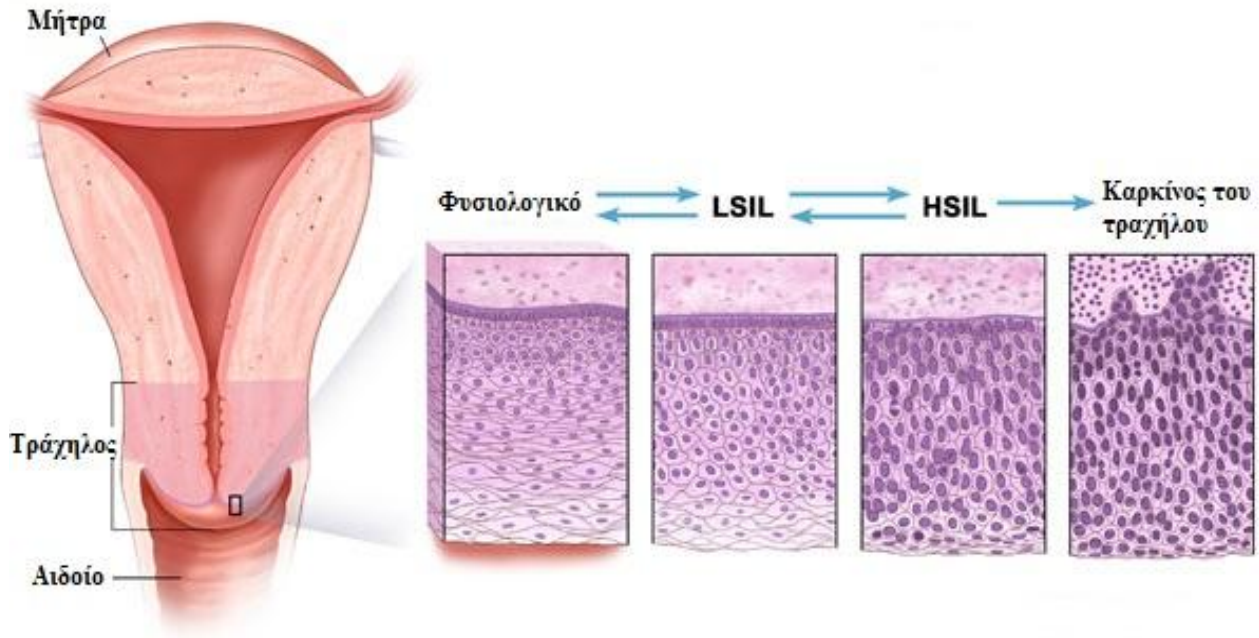
CIN II - Μέτρια δυσπλασία

CIN III - Σοβαρή δυσπλασία και Καρκίνωμα in situ



Ο κίνδυνος διήθησης μεγαλώνει όσο αυξάνεται η σοβαρότητα της αλλοίωσης. Περίπου στο 11% των περιπτώσεων με CIN I υπάρχει πιθανότητα να εξελιχθούν σε CIN3 σε διάστημα 3 ετών. Σε περισσότερες από 12% των περιπτώσεων με CIN III υπάρχει κίνδυνος να εξελιχθούν σε διηθητικό καρκίνο, αν δεν αντιμετωπιστούν θεραπευτικά. Υποστροφή παρατηρείται σε ποσοστό 30%. Η εμφάνιση άτυπων πυρηνοκινησιών έχει σχέση με τη ταχύτερη εξέλιξη σε διηθητικό

καρκίνωμα. Είναι φανερό ότι, όσο υψηλότερου βαθμού είναι η δυσπλασία, τόσο μεγαλύτερη είναι και η πιθανότητα της εξέλιξης. Γενικά η διαβάθμιση CIN βοηθάει στην κλινική αντιμετώπιση της νόσου.



Το φάσμα των αλλοιώσεων στην Τραχηλική Ενδοεπιθηλιακή Νεοπλασία (CIN):
 (Α) Φυσιολογικό πλακώδες επιθήλιο
 (Β) CIN I με κοιλοκυτταρική ατυπία
 (Γ) CIN II με προοδευτική ατυπία σε όλες τις στιβάδες του επιθηλίου
 (Δ) CIN III (καρκίνωμα in situ) με διάχυτη ατυπία και απώλεια της ωρίμανσης.

Σταδιοποίηση FIGO

Ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας σταδιοποιείται κλινικά σήμερα με βάση το Σύστημα FIGO (International Federation of Gynecology and Obstetrics). Η συγκεκριμένη σταδιοποίηση, έχει μεγάλη σημασία, γιατί μπορεί να βοηθήσει στο σχεδιασμό του τραχηλικού καρκίνου.

ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗ FIGO ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΤΡΑΧΗΛΟΥ ΤΗΣ ΜΗΤΡΑΣ	
Στάδιο I	Περιορίζεται στον τράχηλο της μήτρας
Στάδιο IA	Μικροσκοπική αλλοίωση, στρωματική διήθηση <5mm βάθος, <7mm σε πλάτος
Στάδιο IA1	<3mm σε βάθος, <7mm σε πλάτος
Στάδιο IA2	Στρωματική διήθηση >3mm και <5mm βάθος, <7mm σε πλάτος
Στάδιο IB	Προκλινική βλάβη μεγαλύτερη από σταδίου IA ή κλινικά ορατή (όλες οι μακροσκοπικές βλάβες, ακόμη και εκείνες με επιγανειακή διήθηση, είναι καρκίνοι σταδίου IB)
Στάδιο IB1	Μέγεθος: <4cm
Στάδιο IB2	Μέγεθος: >4cm
Στάδιο II	Αλλοιώσεις που εκτείνονται πέρα από τον τράχηλο της μήτρας, αλλά όχι επί του πλευρικού πυελικού τοιχώματος
Στάδιο IIA	IIA1: Περιλαμβάνει τα ανώτερα δύο τρίτα του κόλπου, δεν είναι εμφανής παραμήτρια εμπλοκή, ορατή αλλοίωση: <4cm στη μεγαλύτερη διάσταση IIA2: Περιλαμβάνει τα ανώτερα δύο τρίτα του κόλπου, δεν είναι εμφανής παραμήτρια εμπλοκή, ορατή αλλοίωση: >4cm στη μεγαλύτερη διάσταση
Στάδιο IIB	Εμφανής παραμήτρια συμμετοχή
Στάδιο III	Επέκταση στο πυελικό τοίχωμα ή υδρονέφρωση ή μη λειτουργικά νεφρά ή διήθηση στο χαμηλότερο τρίτο του κόλπου
Στάδιο IIIA	Περιλαμβάνει το κατώτερο ένα τρίτο του κόλπου, χωρίς επέκταση στο πλευρικό πυελικό τοίχωμα
Στάδιο IIIB	Επέκταση επί του πυελικού πλευρικού τοιχώματος ή υδρονέφρωση ή μη λειτουργικά νεφρά
Στάδιο IV	Πέρα από την αληθινή πύελο ή εμπλοκή του βλεννογόνου της ουροδόχου κύστης ή ορθού
Στάδιο IVA	Διήθηση στην ουροδόχο κύστη ή στο ορθικό βλεννογόνο
Στάδιο IVB	Εξάπλωση σε απομακρυσμένα όργανα

ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΡΑΧΗΛΟΥ - ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

Η ιδέα ότι ο διηθητικός καρκίνος του τραχήλου της μήτρας αναπτύσσεται από πρόδρομες δυσπλαστικές αλλοιώσεις εισήχθη για πρώτη φορά στις αρχές του 20^{ου} αιώνα. Στη δεκαετία του '60, με βάση τις κλινικές μελέτες και τα εργαστηριακά δεδομένα, διαπιστώθηκε ότι οι δυσπλαστικές βλάβες ήταν προδιηθητικές βλάβες. Προηγούνται της ανάπτυξης του διηθητικού καρκίνου του τραχήλου της μήτρας. Η παρουσία ενός Προδιηθητικού σταδίου, στο οποίο ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας μπορεί να διαγνωστεί και να αντιμετωπιστεί, τον καθιστά ιδανικό για την αποτελεσματικότητα του προληπτικού ελέγχου.

Τεστ Παπανικολάου (Pap test)

Το 1943, ο Γεώργιος Ν. Παπανικολάου δημοσίευσε από κοινού με τον Herbert F. Traut, μονογραφία με τον τίτλο «Διάγνωση του Καρκίνου της μήτρας, μέσω κολπικών επιχρισμάτων». Από τότε μέχρι και σήμερα έχει διαπιστωθεί ότι η εντόπιση των προκαρκινικών αλλοιώσεων συνέβαλε στη θεαματική μείωση των διηθητικών καρκίνων και της επακόλουθης θνησιμότητας των γυναικών στις χώρες όπου εφαρμόζονται Προγράμματα μαζικού πληθυσμιακού ελέγχου.

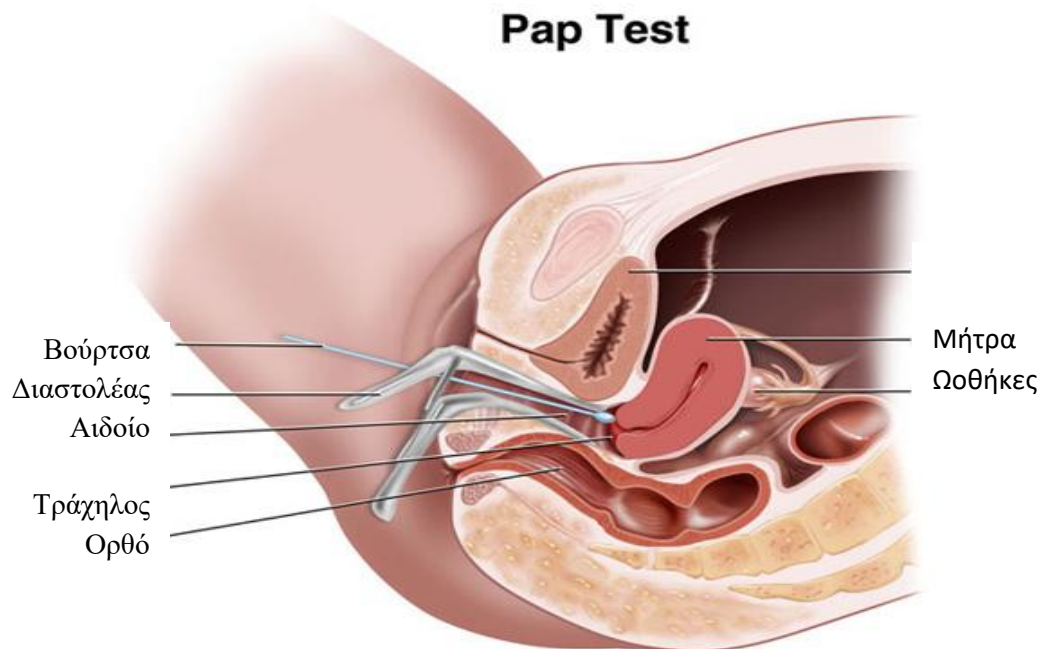
Η κυτταρολογική εξέταση αποφολιωμένων κυττάρων από τον τράχηλο της μήτρας εξακολουθεί να θεωρείται η κυριότερη μέθοδος για την έγκαιρη διάγνωση των προκαρκινικών αλλοιώσεων του καρκίνου τραχήλου της μήτρας. Αυτές οι αλλοιώσεις εμφανίζονται αρκετό χρονικό διάστημα πριν την εκδήλωση του καρκίνου, και γι αυτό το λόγο, η έγκαιρη διάγνωση και η αντιμετώπιση τους μπορεί να οδηγήσει στην αποτελεσματική πρόληψη της νόσου.

Η λήψη κολποτραχηλικών επιχρισμάτων γίνεται με εφαρμογή της σπάτουλας του Ayre για λήψη υλικού από τον εξωτράχηλο και με ψήκτρα για λήψη υλικού από τον ενδοτράχηλο. Με αυτόν τον τρόπο, συλλέγονται πλακώδη κύτταρα από το εξωτερικό μέρος του τραχήλου, αδενικά κύτταρα από τον ενδοτραχηλικό σωλήνα και μεταπλαστικά κύτταρα από τη ζώνη μετάπλασης. Στη συνέχεια το δείγμα επιστρώνεται σε αντικειμενοφόρα πλακίδια. Μονιμοποιείται με αιθανόλη. Μετά τη μονιμοποίηση, τα αντικειμενοφόρα πλακίδια υποβάλλονται σε ειδικές χρώσεις και στη συνέχεια, σε μικροσκοπική εξέταση στο Οπτικό Μικροσκόπιο.

Η εξέταση πρέπει να απέχει τουλάχιστον 48 ώρες από προηγηθείσες κολπικές πλύσεις, χρήση κολπικών ορμονικών ή φαρμακευτικών σκευασμάτων, σεξουαλική επαφή και Δεν πρέπει να γίνεται κατά τη διάρκεια της εμμηνορροσία. Σύμφωνα με την Κατάταξη κατά Παπανικολάου-Traut, τα κυτταρολογικά ευρήματα κατατάσσονται σε 5 κατηγορίες:

- **Κατηγορία I - Απουσία άτυπων κυττάρων**
- **Κατηγορία II - Παρουσία κυττάρων με στοιχεία φλεγμονώδους αλλοίωσης χωρίς χαρακτηριστικά κακοήθειας**
- **Κατηγορία III - Άτυπα κύτταρα ύποπτα κακοήθειας**
- **Κατηγορία IV – Ευρήματα ύποπτα για κακοήθεια**

- **Κατηγορία V - Ευρήματα συμβατά με κακοήθεια (παρατηρούνται καρκινικά κύτταρα).**



Σύστημα Bethesda

Σήμερα το Σύστημα Bethesda χρησιμοποιείται για την κατηγοριοποίηση των αποτελεσμάτων του Pap test ως ακολούθως:

1. Επάρκεια δείγματος

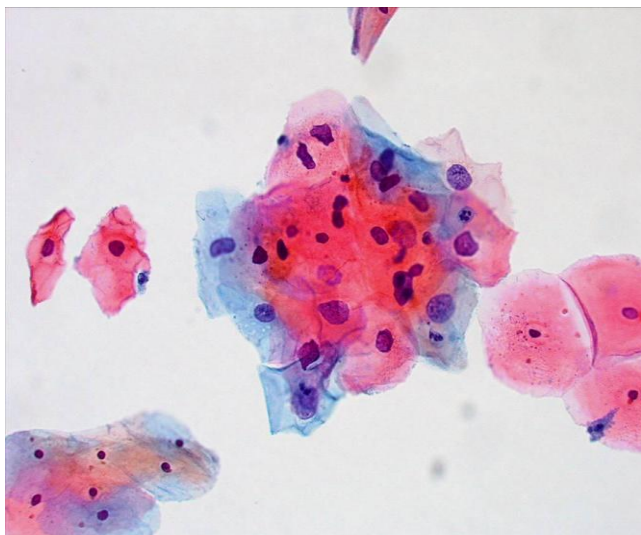
- Ικανοποιητική για αξιολόγηση
- Μη ικανοποιητική για αξιολόγηση

2. Ερμηνεία/Αποτέλεσμα

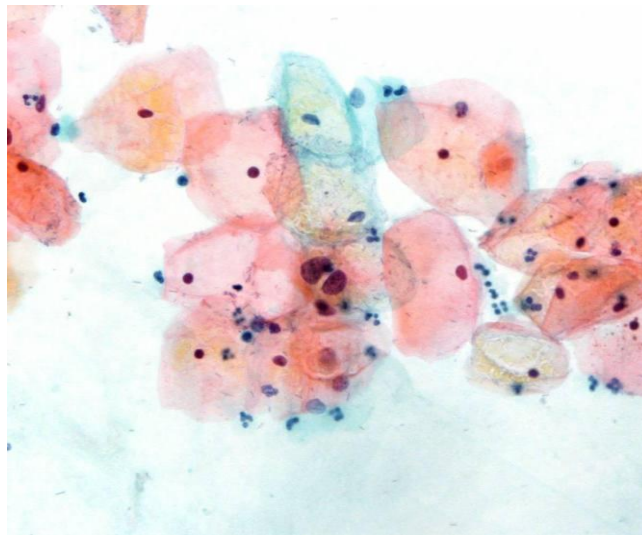
- Αρνητικό για Ενδοεπιθηλιακή βλάβη ή Κακοήθεια:
Μικροοργανισμοί, αντιδραστικές κυτταρικές αλλοιώσεις, κυλινδρικά κύτταρα, ατροφία
- Ανωμαλίες επιθηλιακών κυττάρων:
Πλακώδη κύτταρα:
 - άτυπα πλακώδη κύτταρα απροσδιόριστης σημασίας (ASCUS)
 - άτυπα πλακώδη κύτταρα με κίνδυνο να υποκρύπτεται υψηλόβαθμη πλακώδης αλλοίωση (ACH-H)
 - LSIL
 - HSIL
 - Καρκίνωμα εκ πλακωδών κυττάρων

Αδενικά κύτταρα:

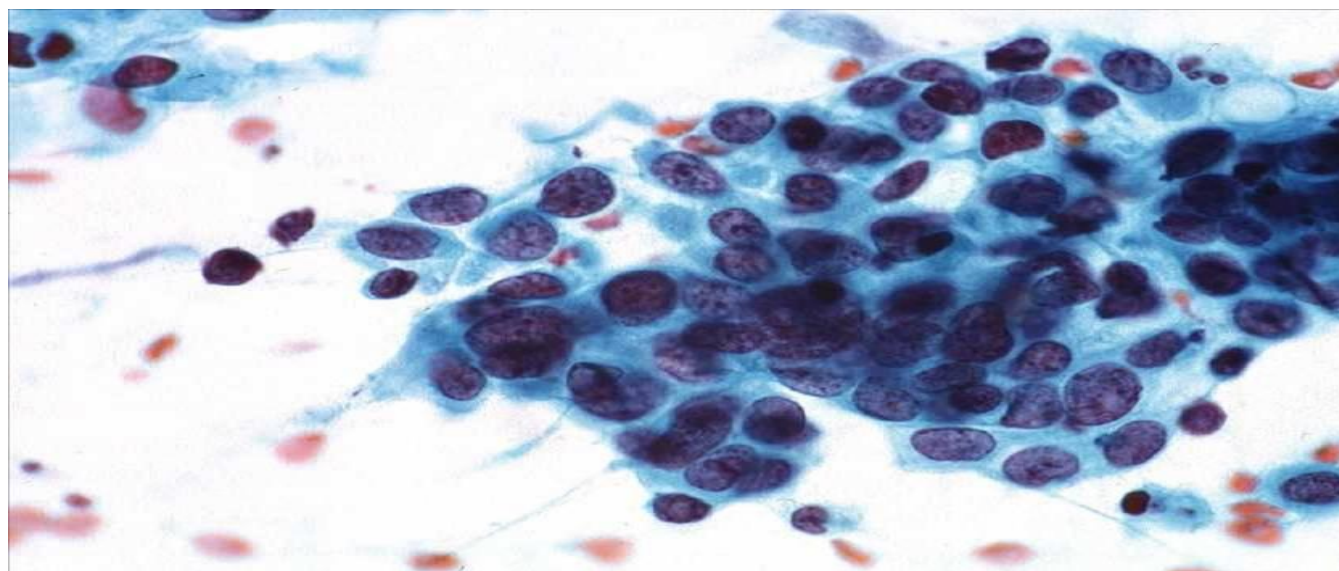
- άτυπα αδενικά κύτταρα (AGS)
 - άτυπα αδενικά κύτταρα μάλλον νεοπλασματικά
 - ενδοτραχηλικό αδenoκαρκίνωμα in situ
 - αδenoκαρκίνωμα
- Άλλο



LSIL/CIN I Ελαφρά πυρηνική αύξηση και άφθονο κυτταρόπλασμα. Διαφορετικά μεγέθη και σχήματα των πυρήνων.



HSIL/CIN II Ο πυρήνας καταλαμβάνει το μεγαλύτερο μέρος του κυττάρου και είναι υπερχρωματικός. Το σχήμα και το μέγεθος ποικίλει.



HSIL/CIN III Ο πυρήνας καταλαμβάνει περισσότερο από τα 2/3 του κυττάρου. Διαφορετικά μεγέθη και σχήματα των πυρήνων και ακανόνιστη κατανομή χρωματίνης

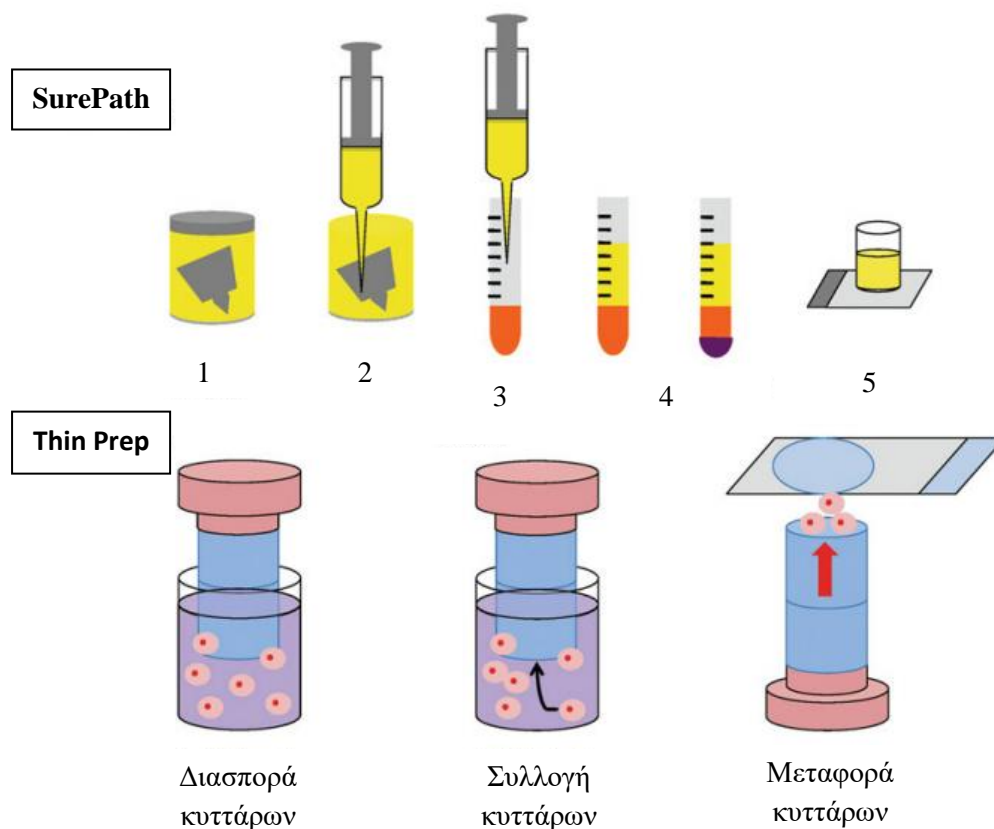
Κυτταρολογία Υγρής Φάσης (Liquid Based Cytology, LBC)

Σε αυτήν την τεχνική, αντί για την προετοιμασία του δείγματος στο Εργαστήριο με επίστρωση των αποφολιωμένων κυττάρων σε γυάλινη αντικειμενοφόρο πλάκα, τα κύτταρα συλλέγονται από τον τράχηλο με συνδυασμό σπάτουλας Ayre και ψήκτρας και στη συνέχεια, το δείγμα τοποθετείται σε συντηρητικό υγρό, για τη μεταφορά του στο Εργαστήριο, όπου υποβάλλεται σε επεξεργασία για την παρασκευή επιχρίσματος.

Δύο Συστήματα Κυτταρολογίας Υγρής Φάσης έχουν εγκριθεί από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας και Φαρμάκων (FDA) και αποτελούν τις πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες μεθόδους σε όλο τον κόσμο:

- το **SurePath Pap test (AutoCyte, TriPath Imaging)**
- το **Thin Prep Pap test (Cytoc Corporation, Marlborough, MA)**.

Στην εργαστηριακή διαδικασία στο Σύστημα SurePath περιλαμβάνεται: διαχωρισμός των κυττάρων από το ελαιώδη με φυγοκέντρηση και στη συνέχεια τα κύτταρα εναποτίθενται σε αντικειμενοφόρο πλάκα σε μια κυκλική περιοχή διαμέτρου 1.5-2cm. Στο Σύστημα ThinPrep τα κύτταρα απομακρύνονται από το ελαιώδη, με διήθηση μέσω φίλτρου και στη συνέχεια μεταφέρονται σε αντικειμενοφόρο πλάκα, όπου και χρωματίζονται.



SurePath (1) Vortex, (2) Κυτταρικός διαχωρισμός, (3) Εμπλουτισμός του δείγματος με Density reagent, (4) Ιζηματοποίηση με σχηματισμό σφαιρίδιου κυττάρου, (5) Τοποθέτηση του κυτταρικού δείγματος σε αντικειμενοφόρα πλακίδια και χρώση στο Prepstain.

Μελέτες έχουν αξιολογήσει τη συγκριτική απόδοση της Κυτταρολογίας Υγρής Φάσης και της Συμβατικής Κυτταρολογικής Εξέτασης με βάση:

- **την ευαισθησία**
- **την ειδικότητα**
- **τον χρόνο που απαιτείται για την αξιολόγηση των δειγμάτων**
- **την επάρκεια του δείγματος.**

Υπάρχει συμφωνία στο ότι η Κυτταρολογία Υγρής Φάσης βελτιώνει την επάρκεια του δείγματος και μειώνει το χρόνο εξέτασης, σε σύγκριση με τη συμβατική κυτταρολογία, αλλά εξακολουθεί να υπάρχει αντιπαράθεση σχετικά με την Ευαισθησία και την Ειδικότητα των δύο μεθόδων λόγω της έλλειψης καλά σχεδιασμένων συγκριτικών μελετών.

Κολποσκόπηση

Η Κολποσκόπηση, η επισκόπηση δέρματος και βλεννογόνων του κατώτερου γεννητικού συστήματος, γίνεται από εμφύσηση τους με ειδικά διαλύματα (οξικό οξύ 5% ή Lugol) και τη βοήθεια Κολποσκοπίου. Η κολποσκοπική εξέταση γίνεται μετά από εφαρμογή διαλύματος οξικού οξέος 3-5%. Το οξικό οξύ προκαλεί πήξη των εξωκυττάρων λευκωμάτων των κυττάρων της επιπολής στιβάδας παθολογικών περιοχών, με αποτέλεσμα αυτές να προσλαμβάνουν λευκό χρώμα. Η εξέταση ολοκληρώνεται με χρώση του τραχήλου με Ιωδιούχο υδατικό διάλυμα (Lugol), το οποίο χρωματίζει το φυσιολογικό πλακώδες επιθήλιο καφέ σκούρο (λόγω ύπαρξης γλυκογόνου στα κύτταρα) και χρησιμεύει στην οριοθέτηση της ζώνης μεταπτώσεως. Απουσία χρώσης σημαίνει απουσία γλυκογόνου, χωρίς αυτό να σημαίνει απαραίτητα επιθηλιακή βλάβη. Απαραίτητη προϋπόθεση για μια ικανοποιητική κολποσκοπική εξέταση αποτελεί η ακριβής εντόπιση της ζώνης μεταπτώσεως, θέση ανάπτυξης της HPV λοίμωξης. Η αξιολόγηση γίνεται με βάση την εμφάνιση των αλλοιώσεων:

- **Χροιιά**
- **Ανωμαλίες επιφάνειας**
- **Αρχιτεκτονική αγγείων**
- **Έκταση και**
- **Εντόπιση αλλοιώσεων**

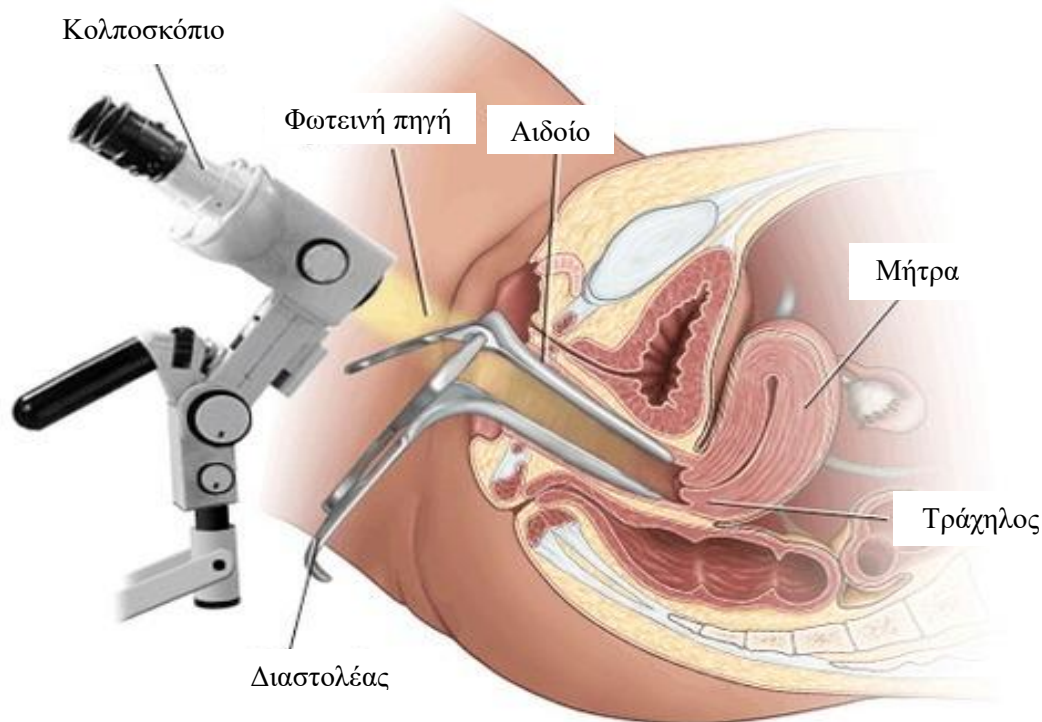


Κολποσκοπική εξέταση:
φυσιολογικός τράχηλος



Κολποσκοπική εξέταση:
CIN III

ΚΟΛΠΟΣΚΟΠΗΣΗ



Τραχηλογραφία

Χρησιμοποιείται ως μέθοδος συμπληρωματική του τεστ Παπανικολάου στον πληθυσμιακό έλεγχο για προκαρκινικές και καρκινικές αλλοιώσεις του τραχήλου της μήτρας. Στη τεχνική αυτή γίνεται εμβάπτιση του τραχήλου με διάλυμα οξικού οξέος 5% και ακολουθεί φωτογράφιση της ζώνης μετάπλασης. Στη συνέχεια οι ληφθείσες φωτογραφίες αποστέλλονται σε ειδικό, ο οποίος θα τις μεγενθύνει και θα τις αξιολογήσει.

Σύμφωνα με μελέτες, έχει αποδειχθεί πως η Τραχηλογραφία έχει μεγαλύτερη ευαισθησία, σε σύγκριση με το τεστ Παπανικολάου και είναι οικονομικά εφαρμόσιμη. Το κυριότερο μειονέκτημά της είναι το αυξημένο ποσοστό των ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων. Έχει επίσης αποδειχθεί ότι είναι το ίδιο αποτελεσματική, όσο τα επαναλαμβανόμενα τεστ Παπανικολάου και η Δοκιμασία τυποποίησης DNA του ιού HPV.

Ανοσοκυτταροχημεία (Immunocytochemistry, ICC) – Βιοδείκτες στην Ανίχνευση του Τραχηλικού Καρκίνου

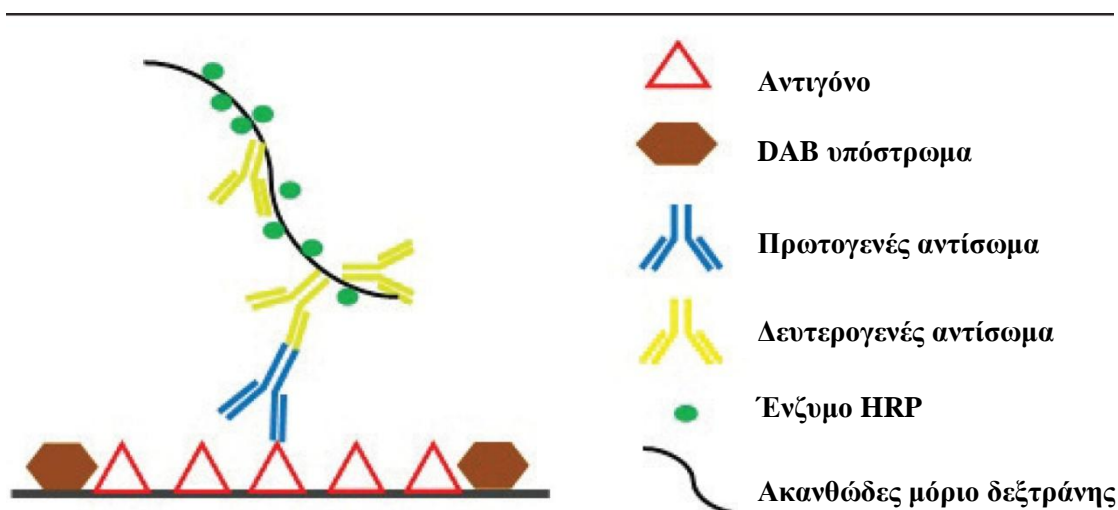
Τα τελευταία χρόνια έχουν γίνει σημαντικές προσπάθειες για την αναγνώριση βιοδεικτών για πιο αποτελεσματικά και οικονομικά Προγράμματα ανίχνευσης του Καρκίνου του τραχήλου της μήτρας. Το μεγαλύτερο ποσοστό της έρευνας έχει εστιαστεί στον ιό HPV. Οι περισσότερες προσεγγίσεις έχουν επικεντρωθεί στην ανίχνευση δεικτών απευθείας σε δείγματα τραχηλικού ιστού.

Η Ανοσοκυτταροχημεία είναι μια τεχνική που συνδυάζει 3 επιστήμες: την Κυτταρολογία, την Ανοσολογία και τη Χημεία. Ένα αντίσωμα κατευθύνεται προς ένα ειδικό αντιγόνο-στόχο και μια χημική αντίδραση λαμβάνει χώρα για να καταστήσει ορατό το σύμπλεγμα αντιγόνου-αντισώματος, εφόσον υπάρχει.

Επομένως, με τον όρο ανοσοκυτταροχημεία εννοούμε μία ομάδα ανοσοσεσημασμένων τεχνικών, που επιτυγχάνουν να καταστήσουν ορατά διάφορα αντιγόνα σε κυτταρολογικό δείγμα. Οι τεχνικές αυτές βασίζονται στην ικανότητα των ειδικών αντισωμάτων να εντοπίζουν και να συνδέονται με το αντίστοιχο αντιγόνο. Η σήμανση του αντισώματος, με τη βοήθεια χρωστικών (DAB) καθιστά το σύμπλεγμα αντιγόνου-αντισώματος ορατό.

Η ανοσοκυτταροχημεία, έγινε αποδεκτή σαν ένα απλό, έξυπνο και πρακτικό εργαλείο στη Διαγνωστική Κυτταρολογία με την εισαγωγή σεσημασμένων με ένζυμα αντισωμάτων. Επίσης, η εισαγωγή Μονοκλωνικών αντισωμάτων στην ανοσοκυτταροχημεία, προσέφερε στο Κυτταρολογικό Εργαστήριο μία ανεξάντλητη πηγή Ειδικών αντιδραστηρίων μεγάλης εξειδίκευσης για την ανίχνευση διάφορων αντιγόνων σε κύτταρα.

Η Ανοκυτταροστοχημεία σήμερα, συγκεντρώνει τα περισσότερα πλεονεκτήματα από οποιαδήποτε άλλη Διαγνωστική Μέθοδο ή Τεχνική. Προσφέρει επίσης, μεγάλη ευαισθησία και ειδικότητα. Οσον αφορά τον Καρκίνο του Τραχήλου της μήτρας αυτό οδήγησε, στην πρώιμη διάγνωση της νόσου με τη χρήση δεικτών.

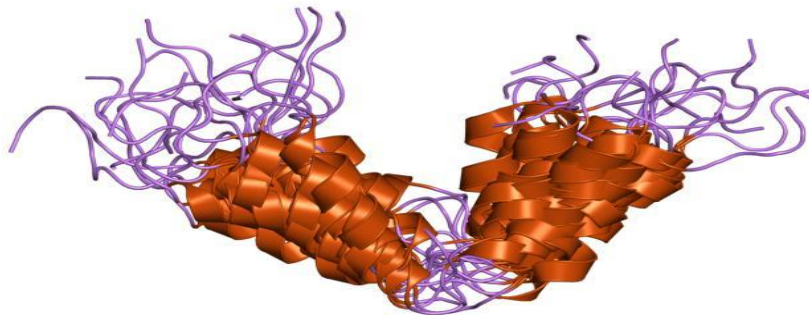


p16^{Ink4A} (Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A)

Η πρωτεΐνη p16 είναι ένας αναστολέας κυκλινο-εξαρτώμενης κινάσης, που στον άνθρωπο είναι κωδικοποιημένη από το CDN2A γονίδιο. Αποτελείται από 3 εξόνια, τα οποία κωδικοποιούν μια πυρηνική πρωτεΐνη που μπλοκάρει τον κυτταρικό κύκλο, προσδενόμενη στην CDK4 ή CDK6 και αναστέλλοντας τη δράση της κυκλίνης D. Απώλεια αυτής της λειτουργίας, και άρα της ανασταλτικής αυτής ικανότητας, μπορεί να οδηγήσει σε καρκινογένεση, λόγω απεριόριστου κυτταρικού πολλαπλασιασμού.

Συνεπώς, η p16 παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, επιβραδύνοντας τον από τη φάση G1 στη φάση S, με αδρανοποίηση των CDKs που φωσφορυλιώνουν την πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος (pRb). Συνεπώς, η p16 δρα ως ένα ογκοκατασταλτικό που συμμετέχει στην αποτροπή νεοπλασίας, ειδικά στο μελάνωμα, τον τραχηλικό καρκίνο και τον καρκίνο του οισοφάγου.

Σε φυσιολογικές συνθήκες εκφράζεται όταν τα κύτταρα υφίστανται κατάσταση γονιδιακού stress, σε σημαντική μείωση του μήκους των τελομεριδίων σε γηράσκοντες ιστούς. Η έκφραση του p16 σε αυτά τα κύτταρα προάγει άμεσα την μη αναστρέψιμη απόσυρση τους από τον κυτταρικό κύκλο και την είσοδο τους στη φάση G0 ή σε απόπτωση. Κατά συνέπεια, ανεξάρτητα από τον HPV, η έκφραση του δείκτη p16 παρατηρείται ορισμένες φορές και σε μεμονωμένα κύτταρα, τα οποία υφίστανται τροποποιήσεις στο φυσιολογικό πρόγραμμα διαφοροποίησης τους, λόγω γήρανσης ή γονιδιακού stress. Συγκεκριμένα, σε μεταπλαστικά ή ατροφικά επιθηλιακά κύτταρα, σε μεγαλύτερες γυναίκες, μπορεί να βρεθούν αυξημένα ποσά p16, τα οποία όμως δε σχετίζονται με ογκογενετική έκφραση του HPV.



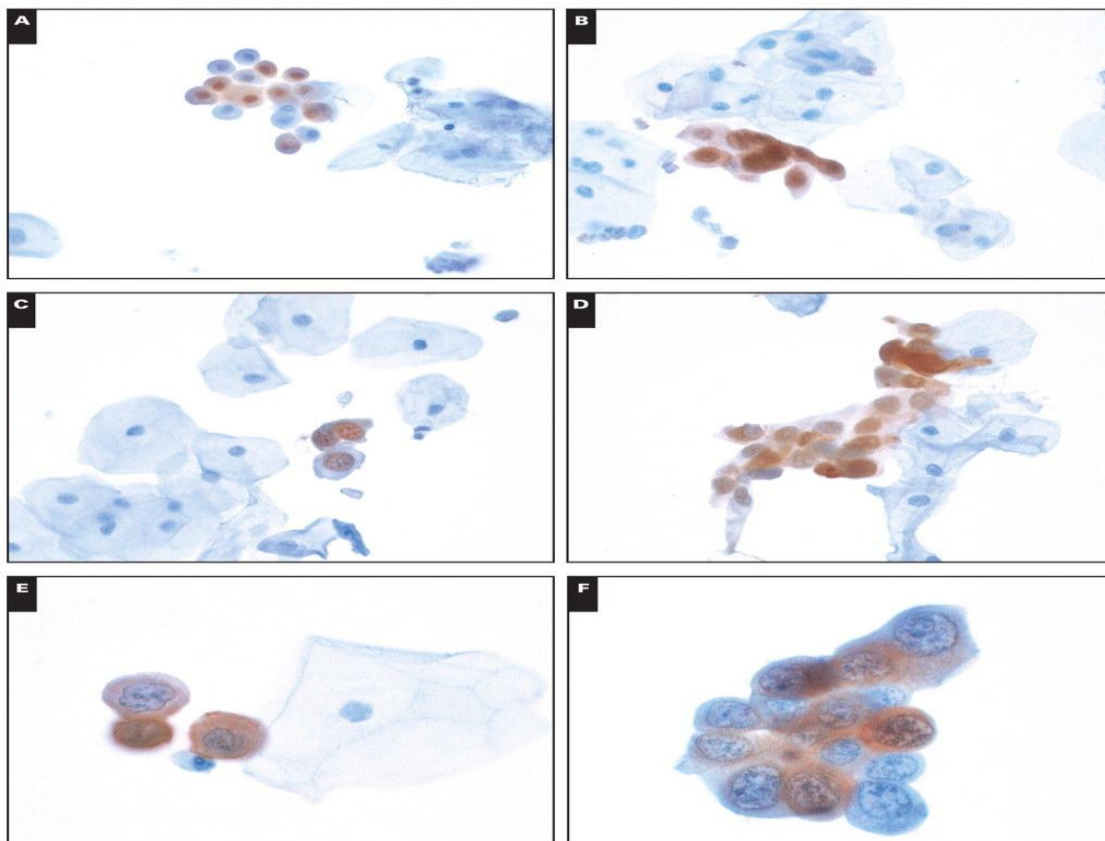
Αναπαράσταση μοριακής δομής της p16 πρωτεΐνης.

Η παθολογική έκφραση στα μεταπλαστικά κύτταρα, λόγω του HPV, φαίνεται σαν ένα διάχυτο πρότυπο ανοσοκυτταροχημικής σήμανσης στα πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα της βασικής και παραβασικής στιβάδας. Βασικά, όλα τα καρκινώματα του τραχήλου της μήτρας, οι CIN III δυσπλαστικές αλλοιώσεις και η πλειοψηφία των CIN II, βρέθηκαν να είναι θετικά με τη μέθοδο της ανοσοκυτταροχημείας. Αντιθέτως, μόνο ένα υποσύνολο των CIN I βλαβών είναι θετικό στον p16. Άρα η υπερέκφραση του p16 που ανιχνεύεται ανοσοκυτταροχημικά, έχει αποδειχθεί ότι αποτελεί μια χρήσιμη μέθοδο για τον έλεγχο του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας, αλλά και έναν αξιόπιστο δείκτη για την αξιολόγηση βιοψιών που σχετίζονται με την ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία του πρωκτού.

Η ανοσοκυτταροχημεία βελτίωσε την Κυτταρολογική εκτίμηση των τραχηλικών αλλοιώσεων σε σύγκριση με τη συμβατική χρώση Pap. Μελέτες έδειξαν ότι βλάβες χαμηλού βαθμού, θετικές στον p16 να έχουν μεγαλύτερο κίνδυνο υποτροπής σε σχέση με βλάβες p16 αρνητικές. Αυτό δείχνει ότι η p16 θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης για το διαχωρισμό των βλαβών, με υψηλό κίνδυνο υποτροπής, από αυτές που έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα υποστροφής.

Ο συνδυασμός της κλασικής κυτταρολογικής εξέτασης και της ανίχνευσης της υπερέκφρασης του p16 αυξάνει την ευαισθησία και ειδικότητα του τεστ, καθώς υπερέκφραση παρατηρείται στο 98% των HSIL, το 10% των LSIL και 1% στα φυσιολογικά δείγματα.

Η χρησιμότητα του δείκτη p16 είναι ένα πολύ σημαντικό εργαλείο για τη βελτίωση της διαγνωστικής ακρίβειας και αξιοπιστίας στην Κυτταρολογία των τραχηλικών αλλοιώσεων. Η ακρίβεια του p16 τεστ έχει επίσης αξιολογηθεί στη διαλογή στην κυτταρολογία των ASCUS και LSIL. Μια μεγάλη μετα-ανάλυση που συμπεριέλαβε 17 μελέτες, έδειξε ότι η ευαισθησία του p16 στην ανίχνευση των CIN II ή πιο προχωρημένων αλλοιώσεων ήταν 83,2% και 83,8% σε ASCUS και LSIL αντίστοιχα. Αντίστοιχα, η ειδικότητα ήταν 71% και 65,7%. Οι μελέτες επίσης έδειξαν, ότι ο p16 έχει στατιστικά σημαντική υψηλότερη ειδικότητα σε γυναίκες με ASCUS. Επιπλέον, η υπερέκφραση του p16 έχει δείξει ότι είναι ένας χρήσιμος βιοδείκτης για το CIN II ή για να προβλέψει την ανάπτυξη του CIN II μέσα σε 3 χρόνια μεταξύ γυναικών που είναι θετικές στον HPV, ιδιαίτερα εκείνες μεταξύ 35-60 ετών.



Κυτταρολογικά αποτελέσματα p16

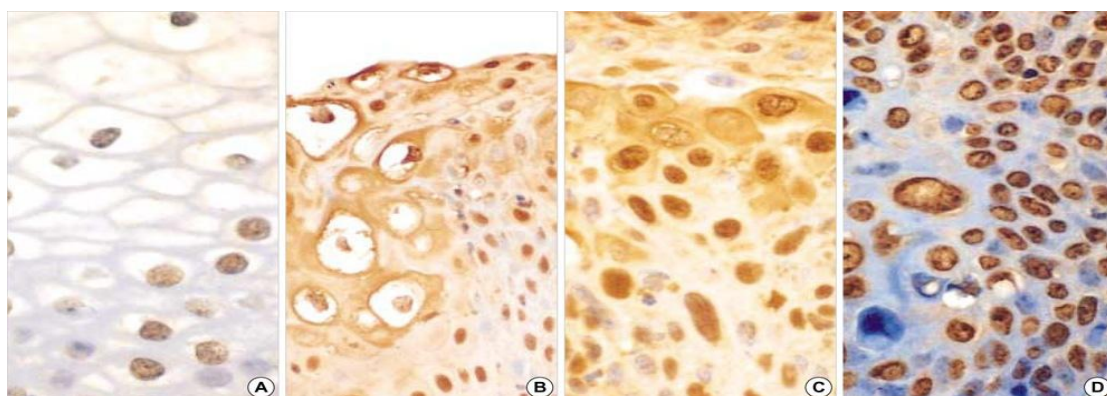
(A)ASC-US. p16 θετικό με μεταπλαστικά πλακώδη κύτταρα, χωρίς ανωμαλίες μορφολογικά

(B)ASC-US. p16 θετικό με πλακώδη κύτταρα που παρουσιάζουν οριακή δυσκαρύωση

(C)LSIL

(D)ASC-US. p16 θετικό με πλακώδη κύτταρα που παρουσιάζουν μέτρια δυσκαρύωση

(E)και (F)LSIL. p16 θετικό με πλακώδη κύτταρα που παρουσιάζουν έντονη δυσκαρύωση



Ανοσοϊστοχημεία για τον δείκτη p16. Πυρηνική χρώση στα βασικά κύτταρα του μη νεοπλασματικού τραχηλικού ιστού. (A)p16 ανοσοχρώση, (B) CIN I, (C) CIN III, (D) έντονη πυρηνική χρώση σε διηθητικό πλακώδες καρκίνωμα.

Κυτταρικός Δείκτης Ki-67

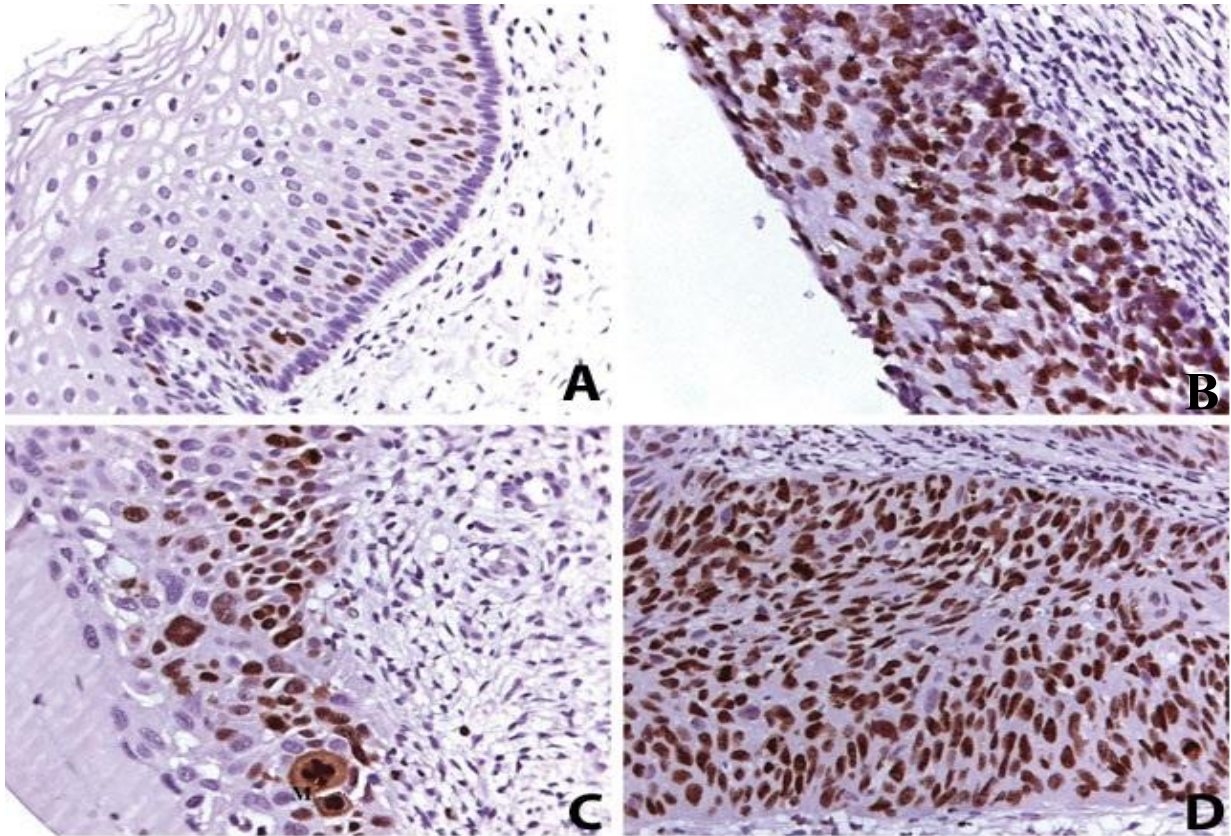
Το αντιγόνο KI-67, γνωστό και ως Ki-67 ή MKI67, είναι μια πρωτεΐνη που στον άνθρωπο κωδικοποιείται από το γονίδιο MKI67. Πρόκειται για μια νουκλεϊκή πρωτεΐνη που είναι απαραίτητη για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Επίσης σχετίζεται με τη μεταγραφή του ριβοσωμικού RNA. Η αδρανοποίηση του αντιγόνου KI-67 οδηγεί στην αναστολή της σύνθεσης του ριβοσωμικού RNA. Μπορεί να ανιχνευθεί με διάφορες ποιοτικές και ποσοτικές μεθόδους, συμπεριλαμβανομένων μονοκλωνικών αντισωμάτων (ανοσοκυτταροχημικές δοκιμασίες).

Κατά τη διάρκεια της μεσόφασης, το αντιγόνο KI-67 μπορεί αποκλειστικά να ανιχνευθεί στον πυρήνα του κυττάρου, ενώ στην μίτωση το μεγαλύτερο μέρος της πρωτεΐνης μεταφέρεται στην επιφάνεια των χρωμοσωμάτων. Η πρωτεΐνη Ki-67 εκφράζεται σε όλες τις φάσεις του κυτταρικού κύκλου (G1,S,G2 και μίτωση), εκτός από τη φάση Go. Σε μεταγενέστερα στάδια της μίτωσης (κατά τη διάρκεια της ανάφασης και της τελόφασης), υπάρχει μια απότομη μείωση στα επίπεδα της πρωτεΐνης Ki-67. Στο φυσιολογικό τραχηλικό πλακώδες επιθήλιο, η Ki-67 ανιχνεύεται στα παραβασικά επιθηλιακά στρώματα, όπως και σε κάποια βασικά.

Αν και η Ki-67 έχει χρησιμοποιηθεί ως δείκτης κυτταρικού πολλαπλασιασμού και βοηθά στην ταξινόμηση των CIN, πιστεύεται ότι δεν εμπλέκεται ειδικά στην τραχηλική καρκινογόνο διαδικασία. Παρά τις προόδους, στην κατανόηση του ρόλου του Ki-67 στην αξιολόγηση των τραχηλικών δυσπλαστικών αλλοιώσεων, η προγνωστική του αξία στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας εξακολουθεί να είναι αμφιλεγόμενη. Παρά το γεγονός ότι αρκετοί ερευνητές δεν έχουν συσχετίσει τον Ki-67 με την πρόγνωση του τραχηλικού καρκίνου, άλλοι έχουν προτείνει την σπουδαιότητα του Ki-67 στην αξιολόγηση της κινητικής των κυττάρων σε ανταπόκριση στη θεραπεία με ακτινοβολία. Έτσι, ο αναπτυσσόμενος όγκος όπως εκτιμάται από τον Ki-67, θεωρείται ότι έχει όφελος αν αντιμετωπιστεί με ακτινοβολία και η πρόγνωση μετά την ακτινοθεραπεία βελτιώνεται.

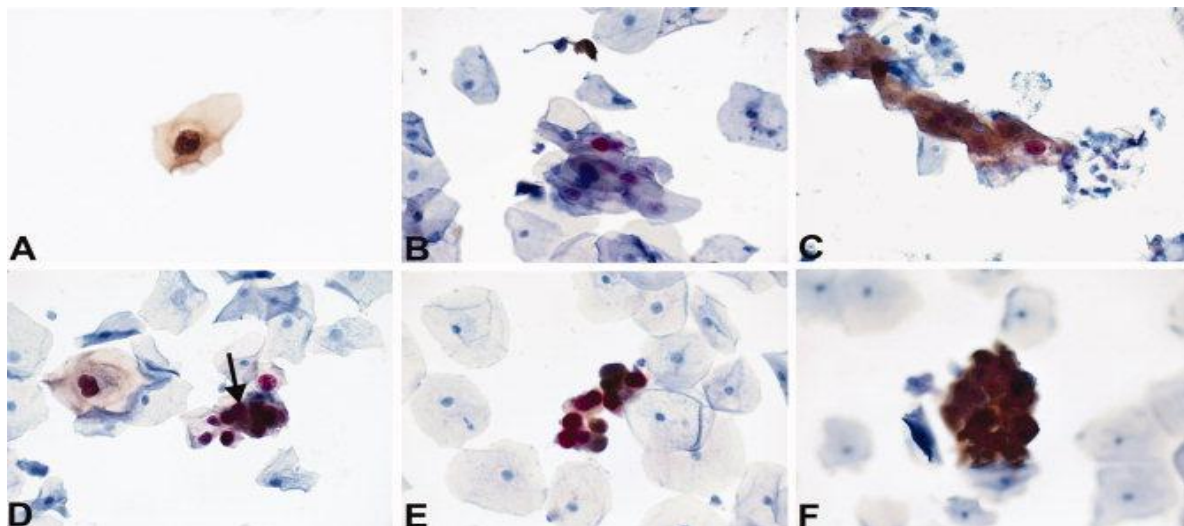
Η ανοσοποσοτική ανάλυση του Ki-67 σε CIN I και CIN II βιοψίες έχει αποδειχθεί ότι έχει μία ισχυρή ανεξάρτητη προγνωστική αξία για το βαθμό και την εξέλιξη της νόσου. Υπάρχουν, επίσης, σαφείς ενδείξεις για την προγνωστική αξία της χρώσης Ki-67 σε περιπτώσεις CIN, με αναφορές που δηλώνουν ότι η χρώση Ki-67 είναι ανώτερη από τη τυπική κυτταρολογική ταξινόμηση για την πρόβλεψη της εξέλιξης των CIN τραχηλικών δυσπλασιών.

Αρκετές μελέτες έχουν προτείνει, ότι η πρωτεΐνη Ki-67 μπορεί να είναι ένας ευαίσθητος βιολογικός δείκτης της εξέλιξης, ανεξάρτητα από την ηλικία και την εμμηνοπαυσιακή κατάσταση. Ο βιοδείκτης Ki-67 μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας για την εξέλιξη και τη βιολογική συμπεριφορά της τραχηλικής δυσπλασίας, ειδικά όταν η αξιολόγηση της HPV λοίμωξης απουσιάζει.



Ανοσοϊστοχημική έκφραση του Ki-67 σε ιστούς τραχήλου μήτρας.

- (A) Φυσιολογικά τραχηλικά επιθηλιακά κύτταρα. Θετικά Ki-67 κύτταρα εμφανίζονται κυρίως στο στρώμα των παραβασικών κυττάρων.
 (B) CIN III. Πυρηνική χρώση εμφανίζεται σε όλα τα επίπεδα των δυσπλαστικών επιθηλίων. (C) Μιτωτικά κυττάρων έδειξαν ανοσοθετικότητα στον Ki-67.
 (D) Τα κύτταρα του μικροκυτταρικού καρκινώματος (SCC) εμφανίζουν έντονη πυρηνική χρώση σε νεοπλασματικά κύτταρα.



Ανοσοκυτταροχημεία με διπλή χρώση p16 και Ki-67 σε τραχηλικά δείγματα (p16:καφέ, Ki-67:κόκκινο)

- (A) Πλακώδη κύτταρα θετικά για τον p16,
 (B) Μεταπλαστικά πλακώδη κύτταρα θετικά για τον Ki-67 αλλά αρνητικά για τον p16,
 (C) ASC-US, (D) LSIL, (E) HSIL, επιβεβαίωση βιοψίας για CIN III,
 (F) HSIL με έντονη έκφραση του p16 που όμως περιορίζει την ανίχνευση της έκφρασης του Ki-67, επιβεβαίωση βιοψίας για CIN III

MYC

Το Myc (c-Myc) είναι ένα ρυθμιστικό γονίδιο το οποίο κωδικοποιεί έναν παράγοντα μεταγραφής. Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από αυτό το γονίδιο είναι μία πολυλειτουργική, πυρηνική φωσφοπρωτεΐνη που παίζει ρόλο στην εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου, στην απόπτωση και στον κυτταρικό μετασχηματισμό.

Το κυτταρικό ογκογονίδιο Myc συχνά βρίσκεται ότι υπερεκφράζεται στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας, υποδεικνύοντας πως η ανίχνευση του μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση δυσπλαστικών βλαβών. Συγκεκριμένα, βρέθηκε ενίσχυση του Myc, μέσω PCR, σε ιστολογικά και κυτταρολογικά δείγματα σε αυξημένα επίπεδα, όσο αυξανόταν ο βαθμός του προκαρκινικού σταδίου.

Κυκλίνες (Cyclins)

Οι κυκλίνες είναι μία οικογένεια πρωτεϊνών που ελέγχουν την εξέλιξη των κυττάρων διαμέσου του κυτταρικού κύκλου με την ενεργοποίηση ενζύμων κυκλινοεξαρτώμενης κινάσης (Cdk). Η έκφραση πολλών κυκλινών έχει αναλυθεί σε βλάβες τόσο καρκινικές όσο και προκαρκινικές.

Πιο συγκεκριμένα, η κυκλίνη D1, η οποία κωδικοποιείται στον άνθρωπο από το CCND1 γονίδιο, βρέθηκε ότι υπερεκφράζεται σε χαμηλού βαθμού βλάβες, που οφείλονται σε LR-HPV, ενώ απουσίαζε σε βλάβες οι οποίες οφείλονται σε HR-HPV. Άλλες κυκλίνες όπως η A, B και E βρέθηκαν να υπερεκφράζονται σε προκαρκινικές τραχηλικές βλάβες.

Τελομεράση (Telomerase)

Η τελομεράση είναι ένα ριβονουκλεϊνικό πρωτεϊνικό ένζυμο που πολυμερίζει και συνεπώς, αυξάνει τις επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες που βρίσκονται στα άκρα του γραμμικού χρωμοσώματος, με αποτέλεσμα να σταθεροποιεί τα τελομερίδια. Τα τελομερίδια συμμετέχουν στη διατήρηση του μήκους των χρωμοσωμάτων και συνεπώς στη σταθερότητά τους.

Η δραστηριότητα της τελομεράσης είναι φυσιολογικό φαινόμενο των κυττάρων της αρχέγονης σειράς, αλλά και των περισσότερων ιστών, κατά τη διάρκεια της ανάπτυξής τους. Εκφράζεται στα εμβρυϊκά κύτταρα, σε βλαστικές σειρές κυττάρων αρρένων και θηλέων, σε αναπαραγόμενα κύτταρα ιστών με αυξημένες αναγεννητικές δυνατότητες (κύτταρα αιμοποιητικού, ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα, βασικά κύτταρα της επιδερμίδας κύτταρα των εντερικών κρυπτών).

Δραστηριότητα της έχει παρατηρηθεί επίσης στο 66 - 97% των κακοήθων νεοπλασμάτων. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι το 90% των γυναικολογικών καρκίνων εκφράζουν θετικότητα στην τελομεράση και πιο συγκεκριμένα η δραστηριότητά της ανιχνεύτηκε σε μεγάλο ποσοστό σε καρκίνους των ωοθηκών, του τραχήλου της μήτρας, του ενδομητρίου και του μαστού. Οι προνεοπλασματικές αλλοιώσεις, όπως ενδοεπιθηλιακές νεοπλασίες του τραχήλου μήτρας, καθώς και τα καλοήθη νεοπλάσματα, παρουσιάζουν αμελητέα δραστηριότητα της τελομεράσης.

Σύμφωνα με μελέτες, η δραστηριότητα της τελομεράσης ανιχνεύθηκε στο 96% των καρκίνων του τραχήλου της μήτρας, ενώ η δραστηριότητα της απουσίαζε σε υλικό φυσιολογικού ιστού. Ωστόσο, ο ρόλος της στις προκαρκινικές αλλοιώσεις (CIN) και στην εξέλιξη της νόσου παραμένει αδιευκρίνιστος.

Ερευνητές συνέκριναν τη δραστηριότητα της τελομεράσης σε υλικό απόξεσης τραχήλου και τομών κρουστάτη που ελήφθη από την ίδια ασθενή. Στο υλικό απόξεσης η τελομεράση ανιχνεύτηκε με βάση το Πρωτόκολλο TRAP, όπου η δραστηριότητά της παρουσίασε χαμηλή ευαισθησία στη διάγνωση των ενδοεπιθηλιακών αλλοιώσεων CIN II, CIN III και στο διηθητικό καρκίνο του τραχήλου, με αποτέλεσμα να μη θεωρείται αξιόπιστος δείκτης για πρόωμη διάγνωση. Σε τομές ψυκτικού όμως, η δραστηριότητα της τελομεράσης ήταν ανάλογη του βαθμού της ενδοεπιθηλιακής αλλοίωσης (CIN) και του διηθητικού καρκίνου, γεγονός που ενισχύει την άποψη ότι μπορεί να αποτελέσει πιθανό δείκτη εξέλιξης της νόσου.

Σύμφωνα με άλλες μελέτες που χρησιμοποίησαν τη Μέθοδο TRAP σε υλικό απόξεσης, είναι πιθανή η εμφάνιση ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων, εξαιτίας της παρουσίας μη δυσπλαστικών κυττάρων, θετικών στη τελομεράση, όπως κύτταρα με πλακώδη μετάπλαση και φλεγμονώδη κύτταρα. Έρευνες που πραγματοποιήθηκαν με τη Μέθοδο TRAP δεν παρατήρησαν διαφορές της έκφρασης της τελομεράσης, μεταξύ των διάφορων βαθμών δυσπλαστικών αλλοιώσεων.

Η χρήση νέων μονοκλωνικών αντισωμάτων, με την εφαρμογή ανοσοϊστοχημικών μεθόδων για την ανίχνευση της τελομεράσης, ανέδειξε υψηλότερο ποσοστό έκφρασης της τελομεράσης σε αλλοιώσεις CIN II και CIN III σε σχέση με CIN I και επιπλέον η έκφραση της τελομεράσης δεν ήταν μόνο πυρηνική αλλά και κυτταροπλασματική.

Στην παθογένεια της ενδοεπιθηλιακής νεοπλασίας και του διηθητικού καρκίνου εμπλέκεται η λοίμωξη HPV και κυρίως οι τύποι 16, 18, 31, 33, 35 του ιού. Μελετήθηκε ο ρόλος του DNA των ιών HPV 16 και 18 σε σχέση με τη δραστηριότητα της τελομεράσης ως δείκτες ενδοεπιθηλιακών αλλοιώσεων σε κυτταρολογικά επιχρίσματα. Η δραστηριότητας της τελομεράσης παρουσίασε διαγνωστική ευαισθησία 29,9% και διαγνωστική ακρίβεια 94% στις ενδοεπιθηλιακές νεοπλασίες CIN II/III, που επιβεβαιώθηκαν και με βιοψία. Οι υψηλού κινδύνου HPV 16 και 18 ανιχνεύθηκαν στο 70,1% των περιπτώσεων CIN II και CIN III με διαγνωστική ακρίβεια 62,5%.

Σε ανάλογη έρευνα, ο προσδιορισμός της δραστηριότητας της τελομεράσης παρουσίασε διαγνωστική ακρίβεια 95,8% σε ιστολογικές τομές και 79,1% σε υλικό απόξεσης, γυναίκες με αλλοιώσεις καρκίνου του τραχήλου. Σε ιστολογικές τομές η ανίχνευση του HPV 16/18 παρουσίασε διαγνωστική ακρίβεια 89,5% και 70,5% σε υλικό απόξεσης. Σύμφωνα με την ίδια μελέτη, υπήρξε συμφωνία 71% μεταξύ της δραστηριότητας της τελομεράσης και της λοίμωξης HPV 16 και 18. Η απουσία έκφρασης της τελομεράσης σε υλικό απόξεσης υγιών γυναικών ενισχύει την άποψη ότι μπορεί ν' αποτελέσει πιθανό δείκτη πρόωμης διάγνωσης του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας.

TOP2A & MCM2 (Topoisomerase IIa & Minichromosome Maintenance 2)

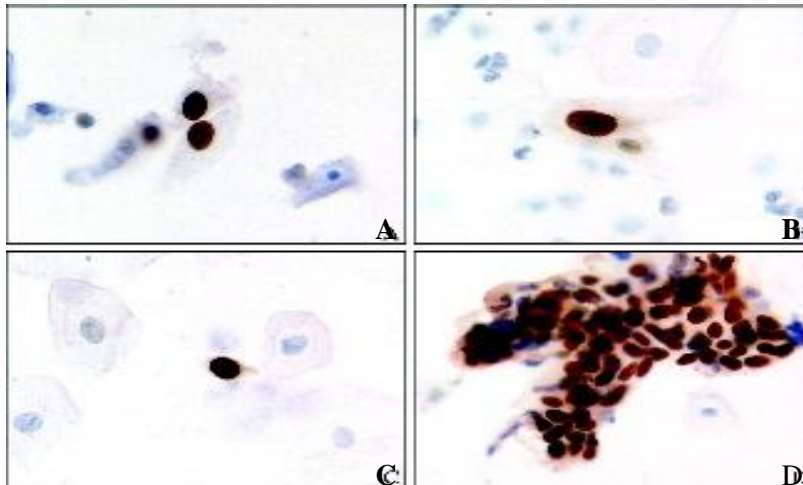
Η τοποϊσομεράση IIa (TOP2A) είναι ένα πυρηνικό ένζυμο που συμμετέχει στην αντιγραφή του DNA. Η έκφρασή του σχετίζεται με τον κυτταρικό κύκλο, με χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης που συμβαίνουν στη φάση Go και στη φάση G1 του κυτταρικού κύκλου. Μελέτες έχουν δείξει αυξημένη έκφραση της TOP2A σε καρκινικές τραχηλικές κυτταρικές σειρές και σε διηθητικό καρκίνο του τραχήλου της μήτρας. Ανοσοκυτταροχημική ανάλυση έδειξε επίσης αυξημένα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης TOP2A σε CIN και σε καρκίνο του τραχήλου της μήτρας, σε σύγκριση με το φυσιολογικό τραχηλικό επιθήλιο.

Η MCM2 ανήκει σε οικογένεια πρωτεϊνών, οι που επιτρέπουν την έναρξη της αντιγραφής του DNA. Συνεπώς είναι ένας δείκτης πολλαπλασιασμού. Αυτή η διαδικασία απαιτεί την οργανωμένη διάταξη των προαναπαραγόμενων (pre-replicative) συμπλόκων που αποτελούνται από τις MCM πρωτεΐνες, την πρωτεΐνη cdc6 και cdt1, πάνω στις θέσεις έναρξης της αντιγραφής, διάσπαρτα κατά μήκος κάθε χρωμοσώματος. Οι cdc6 και cdt1 δρουν ως πρωτεΐνες MCM-φόρτωσης. Μόλις τοποθετηθεί πάνω στη θέση έναρξης της αντιγραφής, το σύμπλοκο MCM σχηματίζει έναν εξαμερή δακτύλιο, ο οποίος δρα ως περιστροφικός κινητήρας που “αντλεί” DNA κατά μήκος του άξονα της ελικάσης. Καθώς προχωρά η αντιγραφή του DNA, οι MCM πρωτεΐνες είναι φωσφορυλιωμένες, το σύμπλοκο MCM διαχωρίζεται από τη χρωματίνη και εμποδίζεται από την περαιτέρω δέσμευσή με το DNA μέχρι το τέλος της μίτωσης, με την απενεργοποίηση των παραγόντων φόρτωσης cdc6 και cdt1.

Η απενεργοποίηση της cdc6 επιτυγχάνεται με φωσφορυλίωση, ενώ της cdt1, μέσω αναστολέα δέσμευσης. Η Υπερέκφραση των MCM2, MCM4, MCM5, MCM6, cdc6 και cdt1 έχει εντοπιστεί σε “πειράματα” γονιδιακής έκφρασης σύμφωνα με την παραδοχή ότι η κακή ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου είναι ένας βασικός παράγοντας για την ανάπτυξη του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας. Τόσο ανοσοϊστοχημικές αναλύσεις όσο και η PCR έχουν δείξει υπερέκφραση των cdc6, MCM3 και MCM5 στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας. Και πάλι, αρκετές μελέτες έχουν δείξει αυξημένη έκφραση της MCM2 και κάποιων άλλων από την οικογένεια MCM, σε προκαρκινικές και καρκινικές βλάβες του τραχήλου της μήτρας.

Η ProEx C είναι μία ανοσοϊστοχημική διαδικασία, η οποία αποτελείται από δύο μονοκλωνικά αντισώματα που κατευθύνονται ενάντια της TOP2A και της πρωτεΐνης MCM2. Μελέτες που χρησιμοποίησαν την ProEx C έχουν περιγράψει το χαρακτηριστικό πρότυπο χρώσης που παρατηρήθηκε σε CIN, όπου φαίνεται να αυξάνεται με την αύξηση του βαθμού της νόσου. Το πρότυπο χρώσης σε υψηλού βαθμού CIN δείχνει ισχυρή πυρηνική χρώση σε περισσότερο από το 50% των δυσπλαστικών κυττάρων, ενώ σε χαμηλού βαθμού CIN παρατηρούνται “λίγα ιχνη θετικών κυττάρων”.

Σε μια συνδυαστική προσέγγιση με p16 ανοσοχρώση, η ProEx C φαίνεται να έχει υψηλότερη ειδικότητα αλλά, μικρότερη ευαισθησία από τη p16 ανοσοχρώση για την ανίχνευση των CIN III+, γεγονός που υποδηλώνει ότι αυτός ο συνδυασμός, δηλαδή η χρησιμοποίηση αυτών των δύο βιοδεικτών, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη διάκριση των CIN II και CIN III βιοψιών των τραχηλικών δειγμάτων. Η χρήση του ProEx C για τη διάγνωση του χαμηλού βαθμού CIN είναι πιο αμφιλεγόμενη.



ProEx C TOP2A και MCM2 χρώση σε πιθανά συλλεγόμενα κλινικά δείγματα Παπανικολάου. Παρατηρείται διακριτή πυρηνική χρώση σε άτυπα κύτταρα από περιπτώσεις που έχουν διαγνωσθεί κυτταρολογικά ως:

(A) ASC-US, (B) LSIL, (C) HSIL, (D) HSIL ομάδα

MYBL2 (MYB Proto-oncogene Like 2)

Η MYBL2 είναι ένα μέλος της οικογένειας πρωτο-ογκογονιδίου MYB, που κωδικοποιούν πρωτεΐνες οι οποίες δεσμεύονται με DNA. Αυτές οι πρωτεΐνες εμπλέκονται στον πολλαπλασιασμό και στον έλεγχο της κυτταρικής διαφοροποίησης. Κάθε στάδιο μεταγραφής φαίνεται να ελέγχεται στενά κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου από έναν E2F-εξαρτώμενο μηχανισμό, που προκαλείται σε ένα υψηλό επίπεδο μόνο στο τέλος της φάσης G1 και της φάσης S. Αυτό υποδηλώνει, ότι η MYBL2 εμπλέκεται στην ενεργοποίηση των γονιδίων που συμμετέχουν στην εξέλιξη της φάσης G1/S.

Επίσης, έχει αποδειχθεί ότι παίζει ρόλο στην αποτροπή της απόπτωσης και επιπλέον, τα επίπεδα έκφρασης της είναι επηρεασμένα από τον HPV16. Επιπρόσθετα, φαίνεται ότι υπάρχει υπερέκφραση της MYBL2 σε περιπτώσεις CIN, CGIN και διηθητικό καρκίνο του τραχήλου της μήτρας.

Σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε, η έκφραση της πρωτεΐνης MYBL2 αξιολογήθηκε σε 30 περιπτώσεις FFPE προκαρκινικών και καρκινικών βλαβών του τραχήλου της μήτρας. Η έκφραση της MYBL2 απουσίαζε σε 6 περιπτώσεις με φυσιολογικό τραχηλικό επιθήλιο και ήταν έντονα θετικές σε περιπτώσεις με προκαρκινικές και καρκινικές βλάβες του τραχήλου, αν και η έκφραση της χάθηκε στα τελικά διαφοροποιημένα κύτταρα.

Σε όλα τα θετικά περιστατικά, το πρότυπο χρώσης που εντοπίστηκε ήταν πυρηνικό. Και στις περιπτώσεις CIN και στις περιπτώσεις διηθητικού πλακώδους καρκινώματος, βρέθηκε μια μειονότητα διάσπαρτης μικρής ομάδας πληθυσμού με έντονη θετικότητα στην MYBL2. Τα ευρήματα δείχνουν ενισχυμένη γονιδιακή θέση για την MYBL2 στις καρκινικές τραχηλικές κυτταρικές σειρές του HPV-16. Επιπλέον, υπάρχει αύξηση της έκφρασης της MYBL2 στα επίπεδα του mRNA στις καρκινικές τραχηλικές κυτταρικές σειρές, με ανοσοκυτταροχημική ανάλυση που

αποδεικνύει επίσης την έκφραση της πρωτεΐνης σε περιπτώσεις με CIN, CGIN και διηθητικό καρκίνο του τραχήλου της μήτρας.

Η συνεχής βιολογική γονιδιακή ενίσχυση, η υπερέκφραση του mRNA και η έκφραση της πρωτεΐνης, αναδεικνύει την πληρότητα της MYBL2 ως ένα δυνητικό βιοδείκτη του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας.

Σαφέστατα υπάρχει μία αλληλοσχέτιση μεταξύ των πρωτεϊνών του HR-HPV (E6 και E7), της πρωτεΐνης E2F και της MYBL2. Η πρωτεΐνη E7 έχει αποδειχθεί ότι αλληλεπιδρά με την pRb, μία ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη, και την p107. Υπό κανονικές συνθήκες, η λειτουργία της pRb ή της p107 να δεσμεύσει τον E2F, έναν κυτταρικό μεταγραφικό παράγοντα, που ελέγχει την έκφραση αρκετών γονιδίων, σημαντικών για την είσοδο και την εξέλιξη μέσα στον κυτταρικό κύκλο, αποτρέποντας έτσι τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Η E7 πρωτεΐνη μπορεί να συνδεθεί με την pRb ή την p107, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση του μεταγραφικού παράγοντα E2F.

Η E2F είναι γνωστό ότι επηρεάζει τα επίπεδα έκφρασης ενός αριθμού πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου, συμπεριλαμβανομένων την MYBL2, την p16, τις κυκλίνες A και E και την cdc6, πολλών από των οποίων έχουν εμπλακεί στην καρκινογένεση του τραχήλου της μήτρας.

Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι η ογκοπρωτεΐνη E7 είναι ικανή να ενεργοποιήσει άμεσα την MYBL2 ακόμη και στις αρχές της φάσης G1. Αυτό οφείλεται στην μετατόπιση ενός κατασταλτικού συμπλόκου που περιέχει την p107, από μια κρίσιμη θέση δέσμευσης της E2F κοντά στη θέση έναρξης μεταγραφής. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, η απορύθμιση της φυσιολογικής έκφρασης της MYBL2 να μπορεί να συμβάλει στο ογκογόνο δυναμικό της E7. Είναι λογικό ότι, σε κύτταρα με νέα έκφραση της E7 πρωτεΐνης να επιτυγχάνεται μέγιστη κινητική αλληλεπίδραση μεταξύ της E2F και της MYBL2, οδηγώντας σε υψηλά επίπεδα την έκφραση της MYBL2 σε αυτά τα κύτταρα.

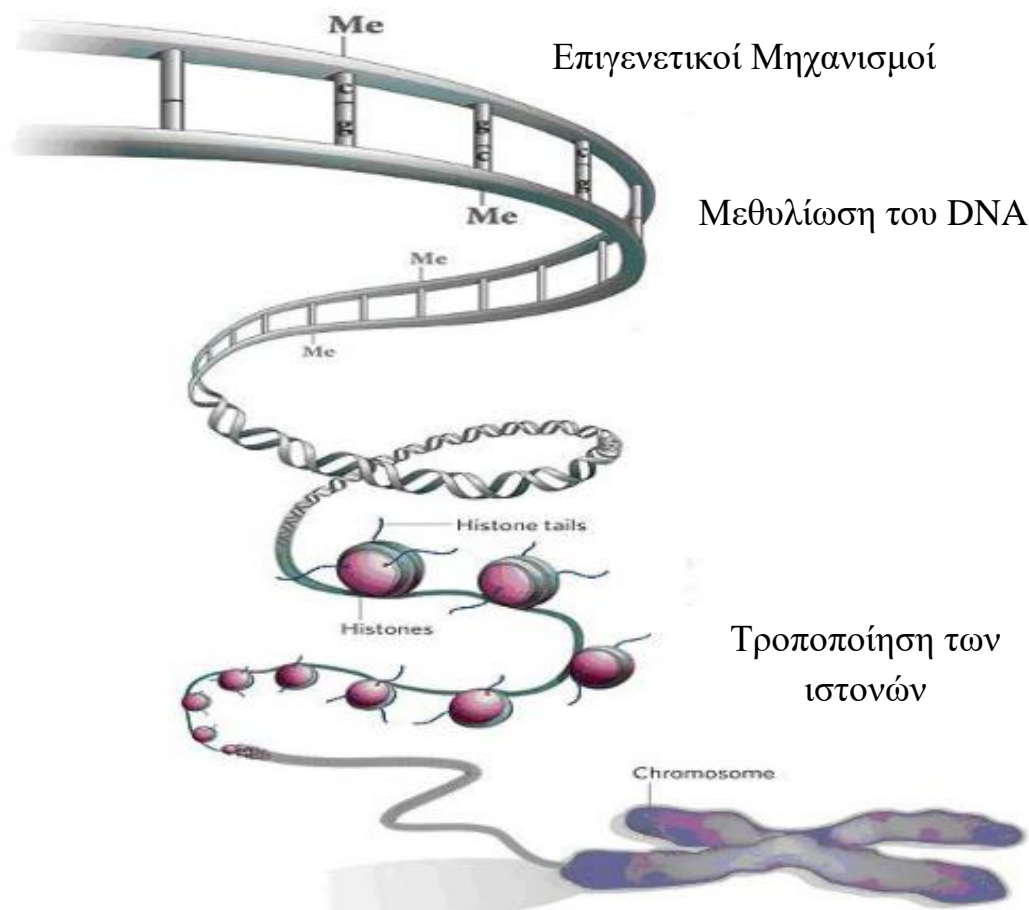
Στην μελέτη που πραγματοποιήθηκε προτείνουν την πρωτεΐνη MYBL2 ως βιοδείκτη για την τραχηλική καρκινογένεση. Η απουσία έκφρασης της στο φυσιολογικό τραχηλικό επιθήλιο την κάνει χρήσιμη στην ανάλυση των CIN και cGIN. Επιπλέον, φαίνεται ότι στοχεύοντας την ογκοπρωτεΐνη E7 των HR-HPV, μπορεί να επιτευχθεί σημαντική διαταραχή της έκφρασης της MYBL2. Σαφώς, θα πρέπει να διαλευκανθούν πλήρως τα πρότυπα έκφρασης της MYBL2 στην HPV λοίμωξη.

ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΗ

Επιγενετική είναι η μελέτη κληρονομήσιμων αλλαγών στην έκφραση των γονιδίων, χωρίς αλλαγές στην αλληλουχία του DNA. Κατά τον Berger η επιγενετική συνδέει το γονιδίωμα με το γονότυπο και τις περιβαλλοντικές επιρροές, καθορίζοντας έτσι το μεταγραφικό μοτίβο και ως εκ τούτου και το φαινότυπο του κυττάρου. Οι τρεις κύριοι επιγενετικοί μηχανισμοί είναι:

- η μεθυλίωση του DNA
- οι τροποποιήσεις της ιστόνης
- η ύπαρξη μικρο-RNAs (miRNAs).

Και οι τρεις μηχανισμοί μπορούν να ρυθμίσουν τη μεταγραφή των γονιδίων τροποποιώντας την πρόσβαση στους υποκινητές γονιδίων (gene promoters) και στις ρυθμιστικές περιοχές.



ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ ΤΟΥ DNA

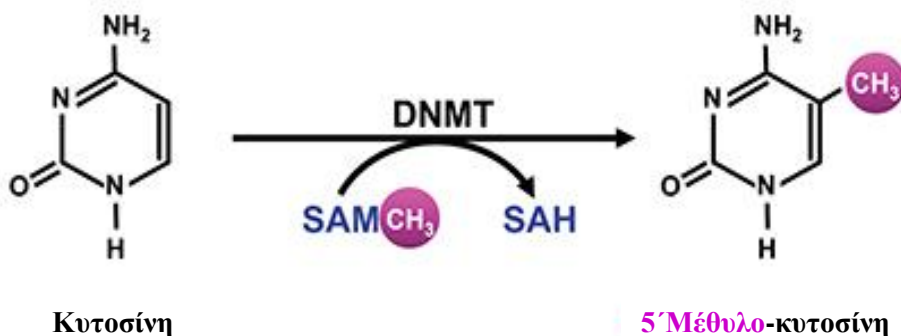
Η μεθυλίωση του DNA είναι μία βιοχημική τροποποίηση, η οποία συναντάται συχνά στα ευκαρυωτικά κύτταρα και αποτελεί ένα από τα σημεία από τα οποία ξεκινάνε οι μεταβολές της χρωματίνης που είναι υπεύθυνες για την απενεργοποίηση και τη διατήρηση της γονιδιακής ηρεμίας (gene silencing).

Η τροποποίηση αυτή αφορά την προσθήκη μιας μεθυλο-ομάδας στο δακτύλιο της κυτοσίνης στην 5'-CpG-3' αλληλουχία και καταλύεται *in vivo* από τα ένζυμα DNA μεθυλοτρανσφεράσες (DNMT1, DNMT3a και DNMT3b). Η S-αδενοσινομεθειονίνη (SAM) είναι ο δότης της μεθυλοομάδας.

Η συχνότητα των CpG δινουκλεοτιδίων είναι πολύ μικρότερη από την αναμενόμενη, με βάση τη συχνότητα των C και G βάσεων στο DNA. Από τα υπάρχοντα CpG δινουκλεοτίδια περίπου το 60-90% είναι μεθυλιωμένα και αυτή η υψηλή συχνότητα παρέχει μία πιθανή αιτιολόγηση της ελαττωμένης συχνότητας CpG. Εφόσον, οι κυτοσίνες του DNA υπόκεινται σε αυτόματη υδρολυτική απαμίνωση προς ουρακίλη, όταν η κυτοσίνη (C) που υφίσταται μετάλλαξη αναγνωρίζεται από τους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA, απομακρύνεται και αντικαθίσταται. Αντίθετα, όταν η 5'-μεθυλοκυτοσίνη υφίσταται την ίδια απαμίνωση, η βάση που προκύπτει δεν είναι ουρακίλη αλλά θυμίνη (T). Έτσι, η χαμηλή συχνότητα CpG δινουκλεοτιδίων μάλλον αντανακλά τη σταδιακή τους απώλεια μέσω αυτής της διαδικασίας C \rightleftharpoons T χημικής μετάπτωσης που αποτελεί το συχνότερο πολυμορφισμό στον ανθρώπινο πληθυσμό και από τις συχνότερες μεταλλάξεις στον καρκίνο.

Τα περισσότερα από τα CpG δινουκλεοτίδια που έχουν διατηρηθεί είναι διασκορπισμένα στο γονιδίωμα, όμως κάποια βρίσκονται σε πολύ υψηλή συγκέντρωση σε περιοχές που ονομάζονται CpG νησίδες. Πρόκειται για περιοχές του γονιδιώματος μήκους 500-2000 ζευγών βάσεων. Οι CpG νησίδες αποτελούν το 0.7% του ανθρώπινου γονιδιώματος και περιέχουν το 7% των CpG δινουκλεοτιδίων.

Συνοψίζοντας, η μεθυλίωση του DNA παρατηρείται κυρίως στα CpG δινουκλεοτίδια και έχει παρατηρηθεί ότι τα περισσότερα CpG του γονιδιώματος είναι μεθυλιωμένα. Όταν τα δινουκλεοτίδια αυτά δεν είναι μεθυλιωμένα θεωρείται ότι έχουν κάποιο ρυθμιστικό ρόλο.



Μεθυλίωση του DNA

MicroRNAs (miRNAs)

Τα MicroRNAs είναι μικρά μη κωδικοποιημένα μόρια RNA(περιέχει περίπου 22 νουκλεοτίδια), τα οποία βρίσκονται στα φυτά, στα ζώα και σε μερικούς ιούς. Τα ώριμα miRNAs έχουν μήκος 19 με 25 βάσεις, ενώ τα πρόδρομα miRNAs έχουν μήκος 70 με 100 βάσεις. Το πρόδρομο μόριο κόβεται σε τμήματα με τη δράση της κυτταροπλασματικής RNase III Dicer. Το ένα τμήμα εκφυλίζεται ενώ το άλλο τμήμα αποτελεί το ώριμο miRNA.

Στα ζώα, τα ώριμα miRNAs με τη σύνδεση τους στην 3'-αμετάφραστη περιοχή συγκεκριμένων mRNAs στόχων, έχουν ρυθμιστικό ρόλο στην έκφραση των γονιδίων. Η ρυθμιστική δράση μπορεί να αφορά, είτε την παρεμπόδιση της μετάφρασης, είτε λιγότερο συχνά τον εκφυλισμό του mRNA. Η ανακάλυψη αυτής της τάξης γονιδίων αποκάλυψε την ύπαρξη ενός νέου μηχανισμού γονιδιακής ρύθμισης, που παίζει σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη και σε πολλές κυτταρικές διαδικασίες, όπως η διαφοροποίηση, η απόπτωση και η κυτταρική ανάπτυξη.

Τα miRNAs σε σχέση με την επιγενετική μπορούν να επηρεάσουν τους επιγενετικούς μηχανισμούς στοχεύοντας σε ένζυμα κλειδιά, τα οποία σχετίζονται με την επιγενετική μνήμη. Από την άλλη μεριά, η επιγενετική μπορεί να ρυθμίζει την έκφραση των miRNAs.

Ο μηχανισμός με τον οποίο η μεθυλίωση του DNA μπορεί να καταστείλει την μεταγραφή βασίζεται στην ύπαρξη πρωτεϊνών που συνδέονται με το μεθυλιωμένο DNA. Η ικανότητα της πρωτεΐνης MeCP1 (Methyl Cytosine binding Protein) να καταστέλλει τη μεταγραφή, εξαρτάται από το βαθμό της μεθυλίωσης και την ισχύ του προαγωγέα. Ένας ασθενής προαγωγέας μπορεί να ανασταλεί ακόμα και από χαμηλό επίπεδο μεθυλίωσης, ενώ ένας ισχυρός προαγωγέας αναστέλλεται μόνο σε μεγάλο βαθμό μεθυλίωσης, η οποία οδηγεί σε ισχυρή σύνδεση με την MeCP1.

Η σύνδεση των MeCPs στο μεθυλιωμένο DNA οδηγεί στη δημιουργία συμπλέγματος, το οποίο αποτελείται από πρωτεΐνες, ανάμεσα στις οποίες βρίσκονται οι δεακετυλάσες των ιστονών (HDAC), οι οποίες αποτελούν μέρος του μηχανισμού της χρωματίνης. Η αποκετυλίωση των ιστονών είναι μία από τις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις που οδηγούν στο σχηματισμό ετεροχρωματίνης και στην καταστολή της γονιδιακής έκφρασης.

Μεθυλίωση του DNA και Καρκίνος

Μελέτες που πραγματοποιήθηκαν, οδήγησαν αρχικά στην υπόθεση ότι οι μεταβολές της μεθυλίωσης στον καρκίνο αφορούσαν μόνο γενικευμένη απομεθυλίωση του γονιδιώματος που θα μπορούσε να οδηγήσει σε μαζική υπερέκφραση ογκογονιδίων. Ωστόσο, βρέθηκε ότι η απομεθυλίωση αυτή αφορά μόνο CpG δινουκλεοτίδια, τα οποία είναι διασκορπισμένα στο γονιδίωμα και όχι αυτά που βρίσκονται σε CpG νησίδες.

Δύο μπορεί να είναι οι συνέπειες της απόμεθυλίωσης του γονιδιώματος:

- η απώλεια ελέγχου της μεταγραφής σε φυσιολογικά «σιωπηρές» περιοχές, που θα μπορούσε να οδηγήσει σε έκφραση ικών και άλλων φυσιολογικά απενεργοποιημένων γονιδίων
- η περικεντρομεριδιακή αστάθεια, καθώς οι περιοχές του κεντρομεριδίου χρειάζονται αυξημένα επίπεδα μεθυλίωσης για τη σωστή λειτουργία τους.

Η δεύτερη μεταβολή που παρατηρείται στον καρκίνο είναι η υπερμεθυλίωση των CpG νησίδων σε περιοχές προαγωγέων γονιδίων, η οποία σχετίζεται με τη καταστολή της μεταγραφής και αποτελεί, μαζί με τις μεταλλάξεις, μηχανισμό για την αδρανοποίηση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων.

Όσον αφορά τη διάγνωση και τη θεραπεία ασθενειών, ένα πλεονέκτημα σε σχέση με τους γενετικούς δείκτες είναι ότι οι μεταλλάξεις μπορούν να εμφανιστούν σε πολλαπλές θέσεις και μπορεί να είναι διαφόρων τύπων. Επίσης, στα πρώιμα στάδια μπορεί να είναι αντιστρεπτές. Η υπερμεθυλίωση εμφανίζεται στην ίδια περιοχή για κάθε γονίδιο και για κάθε μορφή καρκίνου. Αν και είναι πεδίο αντικρουόμενων απόψεων, πιθανολογείται η ύπαρξη φαινότυπου μεθυλίωσης, δηλαδή μεθυλίωση συγκεκριμένων ομάδων γονιδίων για κάποια νεοπλάσματα. Επιπλέον, η ανίχνευση υπερμεθυλίωσης είναι ένα θετικό στοιχείο σε ένα πλήθος φυσιολογικών κυττάρων.

Τα πιθανά κλινικά οφέλη από τη χρήση δεικτών τα οποία βασίζονται στην υπερμεθυλίωση είναι:

- Χρήση της υπερμεθυλίωσης των CpG νησίδων ως προγνωστικό δείκτη για τη συμπεριφορά κακοηθών νεοπλασμάτων.
- Ανίχνευση καρκινικών κυττάρων, χρησιμοποιώντας ως δείκτη για τα καρκινικά κύτταρα την υπερμεθυλίωση των CpG νησίδων. Ως δείκτες μεθυλίωσης θα πρέπει να χρησιμοποιούνται CpG νησίδες, οι οποίες εμφανίζονται υπερμεθυλιωμένες σε καρκινικά κύτταρα, αλλά ποτέ μεθυλιωμένες σε φυσιολογικά κύτταρα.
- Η υπερμεθυλίωση των CpG νησίδων ως στόχος για θεραπεία.

Αν και έχει γίνει πολύ σημαντική πρόοδος τα τελευταία χρόνια, η διερεύνηση της μεθυλίωσης του DNA ως εργαλείο ανίχνευσης του καρκίνου, παραμένει σε γενικές γραμμές μια ακαδημαϊκή μελέτη. Παγκοσμίως, ένας αριθμός προσπαθειών έχουν θέσει τα θεμέλια για τον καθορισμό βιοδεικτών για διάφορους τύπους καρκίνου.

Επιγενετικοί Δείκτες

Έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί, έχουν εξετάσει τις αλλαγές του γονιδίου μεθυλίωσης στα προκαρκινικά στάδια και στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας. Η περισσότερη εργασία στο τομέα του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας, έχει επικεντρωθεί στα υποψήφια γονίδια που αναγνωρίστηκαν με την εικόνα της γονιδιακής ρύθμισης στις καρκινικές τραχηλικές κυτταρικές σειρές και ιστούς ή έχουν προταθεί να παίζουν ρόλο στην ανάπτυξη του όγκου σε θέσεις διαφορετικές από τον τράχηλο της μήτρας. Λίγες έρευνες εκμεταλλεύτηκαν τη τεχνολογία μικροσυστοιχιών ή άλλων χαρακτηριστικών προσεγγίσεων για να αναγνωρίσουν διαφορικά μεθυλιωμένα γονίδια.

Διευρύνοντας το πεδίο της έρευνας, έτσι ώστε να συμπεριληφθούν προηγούμενα άγνωστα γονίδια, προσφέρεται μια ευκαιρία για τον εντοπισμό νέων δεικτών που θα μπορούσαν να είναι χρήσιμοι κλινικά. Επιπλέον, οι περισσότεροι δείκτες μεθυλίωσης που έχουν μελετηθεί εκτεταμένα, προέρχονται από την μελέτη του γονιδιώματος του ξενιστή. Ωστόσο, υπάρχουν όλο και περισσότερες ενδείξεις ότι η DNA μεθυλίωση του HPV επίσης να είναι σημαντική στην τραχηλική καρκινογένεση και θα μπορούσε να δώσει επιπλέον δείκτες για τον έλεγχο και την πρόγνωση.

Η μεθυλίωση του γονιδίου RASSF1 βρέθηκε στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας και φαίνεται να συμπληρώνει τις συχνές απώλειες LOH(Loss of Heterozygosity) και CGH(Comparative Genomic Hybridization) που ανιχνεύονται στη 3p21 περιοχή.

Η TSLC1 έχει περιγραφεί ως ένα κυτταρικό ογκοκατασταλτικό γονίδιο, το οποίο εμπλέκεται στην ανάπτυξη του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας. Επιπλέον, βρέθηκε να αδρανοποιείται με μεθυλίωση σε Υψηλού βαθμού δυσπλασίες και σε καρκινώματα στον τράχηλο της μήτρας.

Μελέτες που παρουσιάστηκαν για τη μεθυλίωση σε κυτταρολογικά και ιστολογικά δείγματα γυναικών με CIN και καρκίνο του τραχήλου της μήτρας, χρησιμοποίησαν τρία γονίδια-στόχους: DAPK1, RARB, TWIST1. Οι ερευνητές βρήκαν 60% ευαισθησία και 95% ακρίβεια για την ανίχνευση του CIN3.

Host Methylation

Στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας έχει μελετηθεί η μεθυλίωση πολλών γονιδίων. Ο πίνακας 1, παραθέτει μεμονωμένα γονίδια, όπου η κατάσταση μεθυλίωσης σε κλινικά δείγματα έχει δημοσιευθεί σε τουλάχιστον 3 μελέτες και συνοψίζει τη συχνότητα μεθυλίωσης για κάθε γονίδιο σε φυσιολογικά, υψηλού βαθμού και καρκινικά δείγματα. Υπάρχει μία μεγάλη ποικιλομορφία των ρόλων που παίζουν αυτά τα γονίδια σε φυσιολογικές κυτταρικές διαδικασίες. Σε γενικές γραμμές, αυτά τα γονίδια είναι αρνητικοί ρυθμιστές της κυτταρικής ανάπτυξης και κινητικότητας, άρα είναι πιθανό, ότι είναι πιο συχνά μεθυλιωμένοι και πιθανότατα

«σε ηρεμία», στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας και στις προκαρκινικές αλλοιώσεις.

Μία ανασκόπηση των δεικτών μεθυλίωσης στην ανίχνευση του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας, ανέφερε ότι συνολικά 68 γονίδια είχαν αναλυθεί σε 51 μελέτες χρησιμοποιώντας κλινικά δείγματα. Από αυτήν την ανασκόπηση, επιπρόσθετα γονίδια έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία που δείχνουν διαφορετικά επίπεδα μεθυλίωσης κατά τη σύγκριση καρκίνων του τραχήλου της μήτρας με φυσιολογικά δείγματα. Ωστόσο, αναγνωρίσιμες αλλαγές στα πρότυπα μεθυλίωσης σε προκαρκινικές καταστάσεις θα είναι σημαντικό για βιοδείκτες, οι οποίοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν για πρόωπη ανίχνευση. Μερικές μελέτες έδειξαν ότι, η συχνότητα της μεθυλίωσης του DNA των υποψήφιων γονιδίων αυξάνεται με την αύξηση της σοβαρότητας της τραχηλικής αλλοίωσης, γεγονός που υποδηλώνει ότι αυτές οι αλλαγές προκύπτουν νωρίς στην καρκινική ανάπτυξη και είναι μία πιθανή πηγή βιοδεικτών για έγκαιρη ανίχνευση του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας.

Γονίδιο	Αριθμός μελετών	Συχνότητα μεθυλίωσης (αριθμός θετικών)			Πλήρες Όνομα
		Φυσιολογικά	CIN2/3	HSIL Καρκινικά	
<i>DAPK</i>	22	0.068 (33)	0.296 (158)	0.582 (659)	Death-associated protein kinase-1
<i>RASSF1</i>	17	0.031 (10)	0.102 (31)	0.141 (175)	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member-1
<i>CDH1</i>	15	0.159 (37)	0.129 (36)	0.521 (456)	Cadherin 1, E-cadherin
<i>CDKN2A/p16</i>	15	0.049 (17)	0.131 (26)	0.220 (187)	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
<i>MGMT</i>	12	0.091 (33)	0.124 (37)	0.183 (124)	0-6 methylguanine-DNA methyltransferase
<i>RARB</i>	12	0.045 (15)	0.130 (40)	0.343 (169)	Retinoic acid receptor-β
<i>CADMI</i>	10	0.256 (43)	0.385 (106)	0.657 (236)	Cell adhesion molecule 1
<i>FHIT</i>	10	0.072 (21)	0.020 (2)	0.398 (268)	Fragile histidine triad gene
<i>TIMP3</i>	9	0 (0)	0.107 (6)	0.189 (82)	TIMP metalloproteinase inhibitor 3
<i>TERT</i>	7	0.156 (12)	0.388 (73)	0.628 (120)	Telomerase reverse transcriptase
<i>CDH13</i>	5	0.177 (25)	0.047 (7)	0.391 (79)	Cadherin 13, H-cadherin
<i>PAX1</i>	4	0 (0)	0.356 (36)	0.917 (33)	Paired box 1
<i>TFPI2</i>	4	0.200 (20)	0.342 (13)	0.721 (88)	Tissue factor pathway inhibitor 2
<i>CCNA</i>	3	0.108 (8)	0.387 (24)	0.696 (94)	Cyclin A2
<i>MAL</i>	3	0.098 (4)	0.577 (71)	0.942 (227)	T-lymphocyte maturation-associated protein
<i>TWIST</i>	3	0.0928 (4)	0.403 (27)	0.362 (68)	Twist homolog 1

ΠΙΝΑΚΑΣ 1: Δείκτες μεθυλίωσης που μελετήθηκαν σε καρκινικά δείγματα

Κριτήρια ένταξης: γονίδια τα οποία έχουν μελετηθεί σε φυσιολογικά, υψηλού βαθμού και καρκινικά δείγματα: γονίδια τα οποία έχουν δείξει χαμηλό βαθμό μεθυλίωσης (<20%) σε φυσιολογικά δείγματα που αυξήθηκαν σε προκαρκινικές αλλοιώσεις ή/και καρκινικά δείγματα: γονίδια τα οποία έχουν αναφερθεί σε τουλάχιστον 3 μελέτες: ή γονίδια τα οποία έχουν χρησιμοποιηθεί σε μία ομάδα δεικτών.

Ιογενής και Κυτταρική Μεθυλίωση γονιδίου στην εξέλιξη της Τραχηλικής Νεοπλασίας της μήτρας

Αρχικές μελέτες έχουν προτείνει ότι η κατανόηση της μεθυλίωσης του HPV γονιδιώματος, θα μπορούσε να οδηγήσει στην ανακάλυψη περισσότερων βιοδεικτών για την ανίχνευση και την εξέλιξη του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας. Οι περιοχές του υποκινητή των E6 και E7 είναι συχνότερα μεθυλιωμένες στα πιο προχωρημένα στάδια της εξέλιξης του όγκου και το επίπεδο της μεθυλίωσης έχει συσχετιστεί με την έκφραση του mRNA στην E6.

Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η μεθυλίωση του ιικού και κυτταρικού DNA, είναι πιθανός βιοδείκτης για τη βελτίωση της ακρίβειας του τραχηλικού ελέγχου και για τη διαλογή της μη φυσιολογικής κυτταρολογίας ή των HR-HPV θετικών γυναικών. Η άμεση σχέση μεταξύ της κατάστασης μεθυλίωσης του HPV L1 γονιδίου και της διάγνωσης του CIN II, φαίνεται να είναι σχετικά σύμφωνη στις περισσότερες μελέτες. Ωστόσο, η σχέση μεταξύ μεθυλίωσης στην ανώτερη ρυθμιστική περιοχή των HPV γονιδιωμάτων και του CIN II, είναι αμφιλεγόμενο δεδομένο ότι κάποιες μελέτες βρήκαν μειωμένη μεθυλίωση των CpG νησίδων εντός της ρυθμιστικής περιοχής του HPV, ενώ άλλες μελέτες αναφέρουν αυξημένη μεθυλίωση σε κάποιες ιογενείς περιοχές.

Δύο μελέτες περιέγραψαν την ολοκληρωμένη ανάλυση της μεθυλίωσης πλήρους γονιδιώματος του HPV16, HPV31, HPV18 και HPV45. Οι ερευνητές ανακάλυψαν ότι, τα αυξημένα επίπεδα της DNA μεθυλίωσης στα ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης των L1, L2, E2 και E4 ήταν σημαντικά συσχετιζόμενα με CIN II ή χειρότερα.

Η μεθυλίωση του DNA μερικών ανθρώπινων γονιδίων φαίνεται να είναι επίσης ένα σχετικό γεγονός για την ανάπτυξη του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας. Η θεραπεία των τραχηλικών κυτταρικών σειρών με παράγοντες απομεθυλίωσης, σε συνδυασμό με την έκφραση μικροσυστοιχιών, επέτρεψε την αναγνώριση των γονιδίων που κωδικοποιούνται για SPARC και TFPI2 ως υψηλά μεθυλιωμένα στον διηθητικό καρκίνο του τραχήλου της μήτρας.

Μια άλλη προσέγγιση, βασισμένη στο RLGS (Restriction Landmark Genomic Scanning), επέτρεψε την αναγνώριση των γονιδίων που κωδικοποιούνται για NOL4 και LHFPL4 ως μεθυλιωμένα στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας. Η χρήση του υβριδισμού διαφορικής μεθυλίωσης (Differential Methylation Hybridization, DMH), χρησιμοποιώντας μία σειρά δοκιμών μεθυλίωσης, επέτρεψε την αναγνώριση των SOX1, NKX6-1, PAX1, WT1 και LMX1A ως συχνά μεθυλιωμένα γονίδια στις προκαρκινικές καταστάσεις και στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας.

Επιπλέον, η ποσοτική ανάλυση της μεθυλίωσης του DNA αυτών των γονιδίων, δείχνει τη πιθανότητα της χρήσης αυτών για την ανίχνευση CIN III και χειρότερων βλαβών.

Η κατάσταση μεθυλίωσης πολυάριθμων άλλων γονιδίων έχει εξεταστεί στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας. Μεταξύ 15 γονιδίων που έχουν αξιολογηθεί σε 5 ή περισσότερες μελέτες, μόνο 3 από αυτά (DAPK1, CADM1, RARB) βρέθηκαν σε όλες

τις μελέτες με σταθερή αυξημένη μεθυλίωση στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας. Παρ' όλα αυτά, μερικές πολύ ευαίσθητες και ειδικές μέθοδοι αναπτύχθηκαν για να ανιχνεύσουν τη μεθυλίωση γονιδίων, όπως η ειδική για τη μεθυλίωση PCR.

Νέοι βιοδείκτες, όπως η ιική και κυτταρική μεθυλίωση, μπορεί να αντιπροσωπεύουν τους πιο ακριβείς δείκτες για την εξέλιξη του καρκίνου. Ωστόσο, τα αποτελέσματα των νέων υποσχόμενων βιοδεικτών είναι σε γενικές γραμμές βασισόμενες σε μικρό αριθμό δειγμάτων, γι αυτό χρειάζονται περισσότερες κλινικές δοκιμές για να προσδιοριστεί η κλινική αξία αυτών των νέων δοκιμασιών.

Τα δεδομένα για τους δείκτες μεθυλίωσης, τόσο στον ξενιστή όσο και στους ιούς, στον έλεγχο του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας, έχουν προέλθει από μικρές, ετερογενείς μελέτες, περιορίζοντας την απόδειξη της κλινικής τους χρησιμότητας. Αν και κάποιες μικρές ομάδες, όπως η CADM1 και MAL, είναι πολλά υποσχόμενες ως τεστ διαλογής για την θετικότητα του HPV στις γυναίκες, παρ' όλα αυτά η καλύτερη ομάδα ή συνδυασμός δεικτών δεν έχει ακόμα προσδιοριστεί ή επιβεβαιωθεί.

Νέοι Δείκτες Μεθυλίωσης

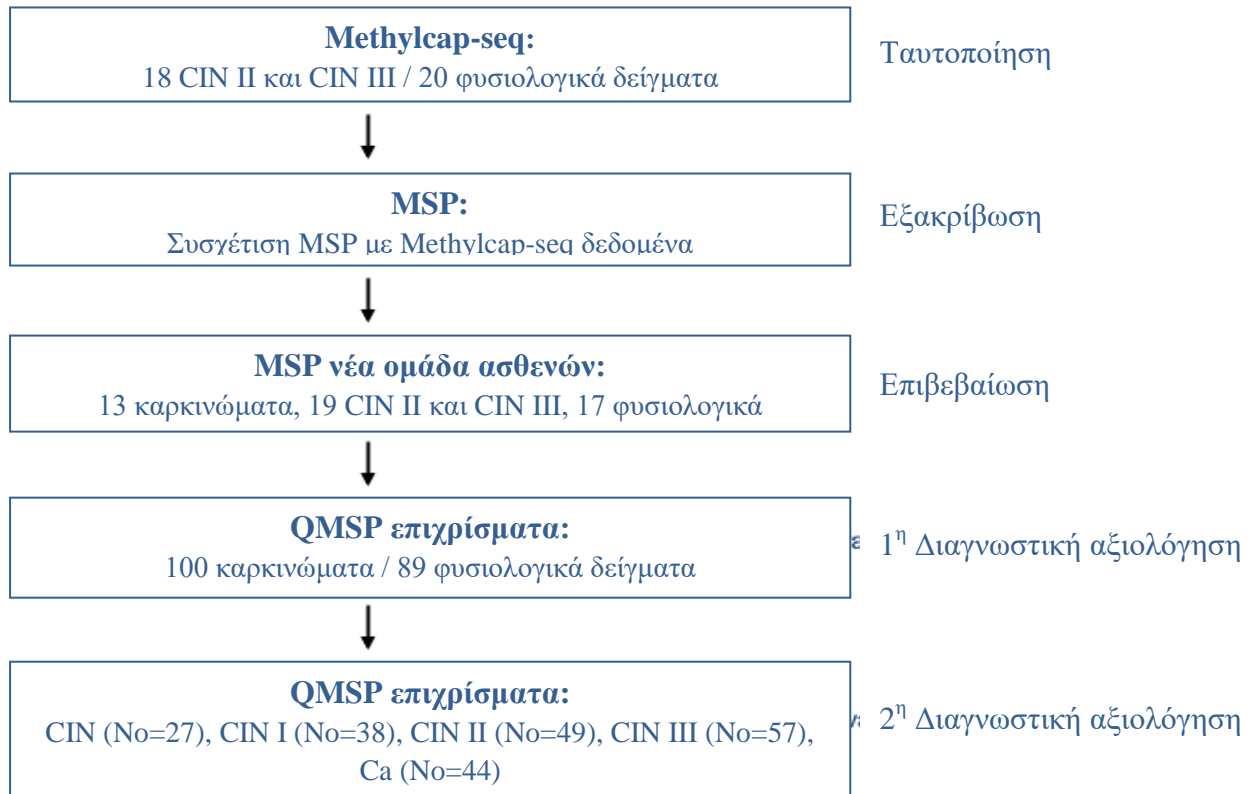
Ο κυτταρολογικός έλεγχος των τραχηλικών επιχρισμάτων είναι η πιο διαδεδομένη μέθοδος που χρησιμοποιείται για τον έλεγχο του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας, αλλά δεν είναι η ιδανική, καθώς η ευαισθησία για την ανίχνευση CIN2+ είναι μόνο περίπου 55%. Η καρκινογένεση του τραχήλου της μήτρας έχει άμεση σχέση με τον HR-HPV. Μεγάλες τυχαίες ελεγχόμενες δοκιμές έδειξαν ότι η ευαισθησία του HR-HPV ελέγχου είναι σημαντικά υψηλότερη σε σχέση με τον κυτταρολογικό έλεγχο. Με βάση αυτά τα δεδομένα, ξεκινώντας το 2016, η Ολλανδία είναι από τις πρώτες χώρες που εφαρμόζουν HR-HPV έλεγχο, ως βασικό έλεγχο του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας πάνω στον πληθυσμό. Ωστόσο, η ειδικότητα του HR-HPV ελέγχου, ειδικά στον έλεγχο ενός νέου πληθυσμού, είναι σχετικά χαμηλή. Τελικά, στο κοντινό μέλλον, η επικράτηση του CIN και του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας πιθανώς θα μειωθεί στις χώρες που θέσπισαν ως βασική πρόληψη τον εμβολιασμό. Επομένως, χρειάζονται άλλοι βιοδείκτες, τόσο με υψηλή ευαισθησία όσο και με υψηλή ειδικότητα, ως νέα εργαλεία ελέγχου για τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας.

Διαφορετικά μοτίβα μεθυλίωσης του DNA σε δείγματα με φυσιολογικά και κακόηθων αλλοιώσεων, αποτελούν εξαιρετικούς στόχους για διαγνωστικές προσεγγίσεις, οι οποίες βασίζονται στη PCR ειδική στη μεθυλίωση (Methylation Specific PCR, MSR). Η υπερμεθυλίωση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων είναι ένα πρώιμο γεγονός στην καρκινογένεση του τραχήλου της μήτρας και επομένως, η ανάλυση της υπερμεθυλίωσης μπορεί να είναι ιδιαίτερα σχετική για την έγκαιρη διάγνωση της τραχηλικής νεοπλασίας. Η αξιολόγηση των δεικτών μεθυλίωσης σε τραχηλικά δείγματα για την ανίχνευση CIN και καρκίνο του τραχήλου της μήτρας είναι εφικτό, όμως η απόκτηση δεικτών μεθυλίωσης τόσο με υψηλή ευαισθησία όσο και με υψηλή ειδικότητα εξακολουθεί να παραμένει μία πρόκληση.

Με το πέρασμα των χρόνων, έχουν σταδιακά αναπτυχθεί πιο εξελιγμένες προσεγγίσεις για τον εντοπισμό νέων δεικτών μεθυλίωσης σε ένα εύρος γονιδίων. Ανάμεσα σε διάφορες μελέτες από άλλες ομάδες, έγινε μία φαρμακολογική αποκάλυψη της περιοχής του υποκινητή σε συνδυασμό με την επανέκφραση, όπως αναλύεται με μικροσυστοιχίες, υψηλής απόδοσης ποσοτική μεθυλίωση-ειδική PCR (QMSP) με μία πλατφόρμα OpenArray και τη μέθυλο-DNA ανοσοκαθίζηση, με αποτέλεσμα την αποκάλυψη και επιβεβαίωση των γονιδίων: C13ORF18, JAM3, EPB41L3 και TERT. Αυτά τα γονίδια έδειξαν ότι η ευαισθησία για την ανίχνευση CIN II+ σε HR-HPV θετικό πληθυσμό κυμαίνεται μεταξύ 43-71% και η ειδικότητα μεταξύ 89-100%. Ωστόσο, μέχρι τώρα οι περισσότερες τακτικές για την ανακάλυψη νέων δεικτών μεθυλίωσης βασιζόταν στη διαφορά του καρκινικού και του φυσιολογικού. Χρησιμοποιώντας σειρές νέας γενιάς, θα δημιουργείται ένα μοναδικό μεθυλίωμα από κάθε δείγμα. Μετά την αναγνώριση νέων δεικτών μεθυλίωσης για (προ)κακοήγη νεοπλασία του τραχήλου της μήτρας μέσω αυτής της προσέγγισης, μπορεί να γίνει η επιβεβαίωση και η διαγνωστική εκτίμηση αυτών των νέων δεικτών.

Ταυτοποίηση διαφοροποιημένων μεθυλιωμένων γονιδίων από τη MethylCap-αλληλουχία

Για τον εντοπισμό νέων δεικτών μεθυλίωσης για CIN II ή CIN II+ , εφαρμόστηκε το σχέδιο όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα.



Διάγραμμα για την ταυτοποίηση νέων δεικτών μεθυλίωσης.

Με λίγα λόγια, χρησιμοποιήθηκε εύρος γονιδίων για να συγκριθούν τα χαρακτηριστικά της μεθυλίωσης του DNA των δυσπλαστικών τραχηλικών κυττάρων με τα φυσιολογικά τραχηλικά κύτταρα.

Εξακρίβωση και Επιβεβαίωση των σημαντικότερων 15 διαφοροποιημένων μεθυλιωμένων γονιδίων

Για την εξακρίβωση των δεδομένων της MethypCap-seq, συλλέχτηκαν τα πρώτα 15 από τα 163 αναγνωρισμένα γονίδια. Εκκινητές της MSP (Methylation Specific PCR) σχεδιάστηκαν και θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για τα 14 από τα 15 γονίδια. Η εξακρίβωση των επιλεγμένων 14 γονιδίων έδειξε για 11 γονίδια μία σημαντική συσχέτιση μεταξύ της MSP και των δεδομένων της MethylCap-seq. Ένα γονίδιο (PCDH17) παρουσίασε υψηλή επίπεδα μεθυλίωσης στα λευκοκύτταρα και αποκλείστηκε για περαιτέρω εξακρίβωση, προκειμένου να αποφευχθούν τα ψευδώς θετικά σήματα μεθυλίωσης σε δείγματα υγιών γυναικών. Τα υπόλοιπα 10 γονίδια πέρασαν την εξακρίβωση και συνέχισαν στο επόμενο βήμα για την επιβεβαίωση. Ο Πίνακας 2 δείχνει μία γενική εικόνα των γονιδίων που συνέχισαν στα διάφορα στάδια επιβεβαίωσης.

Πίνακας 2. Εξακρίβωση, επιβεβαίωση και διαγνωστική αξιολόγηση των 15 σημαντικότερων γονιδίων.

Σειρά	Γονίδιο	Optimized	Εξακρίβωση	Επιβεβαίωση	1η διαγνωστική αξιολόγηση	2η διαγνωστική αξιολόγηση
1	ZSCAN1	Ναι	Ναι	Ναι	Ναι	Ναι
2	PCDH17	Ναι	Όχι ^a			
3	ST6GALNAC5	Ναι		Ναι	Ναι	Ναι
4	CLIC6	Ναι	Όχι			
5	RP11-89 K21.1.1	Ναι	Όχι			
6	ANKRD18CP	Ναι	Ναι	Ναι	Ναι	Ναι
7	PAX2 ^b	Ναι	Ναι	Ναι	Όχι	
8	CDH6	Ναι	Ναι	Ναι	Ναι	Ναι
9	GFRA1	Ναι	Ναι	Ναι		Yes
10	IRX1	Ναι	Όχι			
11	POU4F3	Ναι	Ναι	Όχι ^a		
12	GATA4	Ναι	Ναι	Ναι	Ναι	Ναι
13	MKX	Όχι				
14	PAX2 ^b	Ναι	Όχι			
15	KCNIP4	Ναι	Ναι	Ναι	Ναι	Ναι
16	LHX8	Ναι	Ναι	Ναι	Ναι	Ναι

^aΑποκλείονται λόγω υψηλής μεθυλίωσης στα λευκοκύτταρα

^bΊδιο γονίδιο, διαφορετική περιοχή

Το δεύτερο στάδιο επιβεβαίωσης έγινε με MSP σε απομονωμένο DNA από FFPE ιστό, από μία νέα ανεξάρτητη τυχαία επιλεγμένη ομάδα ασθενών, στην οποία υπήρχαν 13 με καρκίνο του τραχήλου της μήτρας, 19 HSIL (8 CIN2, 8 CIN3 και 3 adCIS) και 17 φυσιολογικά. Από τα 10 γονίδια που μελετήθηκαν, στα 9 γονίδια δεν υπήρξε μεθυλίωση, σχεδόν σε όλα τα φυσιολογικά δείγματα. Επίσης, υπήρξε σημαντική διαφορά μεθυλίωσης μεταξύ φυσιολογικών και HSIL βλαβών και πάλι μικρή μεθυλίωση έως καθόλου στα λευκοκύτταρα. Τα γονίδια τα οποία επιλέχτηκαν για περαιτέρω διαγνωστική αξιολόγηση στα τραχηλικά δείγματα είναι τα: *ZSCAN1*, *ST6GALNAC5*, *ANKRD18CP*, *PAX2*, *CDH6*, *GFRA1*, *GATA4*, *KCNIP4*, και *LHX8* (Πίνακας 3).

Πίνακας 3. Θετικότητα μεθυλίωσης σε μία ομάδα FFPE δειγμάτων για να επιβεβαιώσει αποτελέσματα της υψηλής μεθυλίωσης σε CIN II+ αλλοιώσεις και όχι μεθυλίωση σε φυσιολογικά δείγματα των πρόσφατα νέων δεικτών μεθυλίωσης.

Γονίδιο	Φυσιολογικό	CIN2	CIN3	adCIS	Καρκίνωμα
<i>ZSCAN1</i>	4/16	8/8	7/8	3/3	12/13
<i>ST6GALNAC5</i>	0/16	1/6	4/8	2/3	9/12
<i>ANKRD18CP</i>	0/16	1/8	1/7	2/3	6/12
<i>PAX2</i>	1/14	6/8	7/8	3/3	5/13
<i>CDH6</i>	1/15	3/8	4/8	3/3	7/13
<i>GFRA1</i>	0/12	2/8	3/8	2/3	10/12
<i>POU4F3^a</i>	2/14	6/7	3/7	3/3	11/12
<i>GATA4</i>	0/17	3/8	2/7	3/3	10/13
<i>KCNIP4</i>	0/17	6/8	5/8	3/3	10/12
<i>LHX8</i>	1/16	3/8	4/8	3/3	7/13

^a Αποκλείονται λόγω υψηλής μεθυλίωσης στα λευκοκύτταρα

Διαγνωστική Αξιολόγηση από τη QMSP
για τα Φυσιολογικά/LSIL έναντι των HSIL

Χρησιμοποιήθηκαν 215 δείγματα ασθενών, τα οποία παρουσίαζαν μία ανωμαλία σε Pap επιχρίσματα. Τα 8 γονίδια που δοκιμάστηκαν, εμφάνισαν διαφοροποιημένη μεθυλίωση στα φυσιολογικά έναντι των καρκινικών δειγμάτων. Τα επίπεδα μεθυλίωσης αυξήθηκαν και στα 8 γονίδια που αναλύθηκαν (ZSCAN1, ST6GALNAC5, ANKRD18CP, CDH6, GFRA1, GATA4, KCNIP4 και LHX8). Στον παρακάτω πίνακα αναφέρονται τα νέα γονίδια καθώς και η ευαισθησία και η ειδικότητα που εμφανίζουν για CIN II και CIN III+(Πίνακας 4)

Πίνακας 4. Αποτελέσματα ευαισθησίας και ειδικότητας των CIN II και CIN III+ σε τραχηλικά δείγματα από ασθενείς που παρουσιάζουν μία ανωμαλία στα Pap επιχρίσματα (No=215)

Γονίδιο	Ευαισθησία CIN2+	Ειδικότητα CIN2+	Ευαισθησία CIN3+	Ειδικότητα CIN3+
Νέα γονίδια				
ZSCAN1	93 %	26 %	94 %	19 %
ST6GALNAC5	90 %	15 %	92 %	16 %
ANKRD18CP	61 %	82 %	69 %	71 %
CDH6	73 %	60 %	80 %	53 %
GFRA1	46 %	92 %	57 %	87 %
GATA4	84 %	44 %	87 %	35 %
KCNIP4	99 %	8 %	99 %	6 %
LHX8	80 %	40 %	87 %	43 %
Known genes				
C13ORF18	40 %	95 %	49 %	89 %
EPB41L3	69 %	79 %	81 %	71 %
JAM3	63 %	91 %	72 %	78 %
TERT	82 %	46 %	90 %	42 %
HPV test				

Συμπερασματικά, έγινε ταυτοποίηση αρκετών νέων δεικτών μεθυλίωσης για την ανίχνευση νεοπλασίας σε τραχηλικά επιχρίσματα. Αυτοί οι νέοι δείκτες θα μπορούσαν να εφαρμοστούν σε HR-HPV θετικές γυναίκες.

ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας μπορεί να θεραπευθεί αν ανιχνευθεί έγκαιρα. Παλαιότερα, ο καρκίνος αυτός αποτελούσε έναν από τους κύριους λόγους θνησιμότητας των γυναικών. Σήμερα χάρις στα προγράμματα ανίχνευσης και θεραπείας η θνησιμότητα έχει μειωθεί σημαντικά. Ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας είναι ο δεύτερος συχνότερος καρκίνος των γυναικείων γενετικών οργάνων μετά από τον καρκίνο της ωοθήκης. Μετά από αυτόν ακολουθεί ο καρκίνος του ενδομητρίου με μικρότερη συχνότητα.

Τρεις μορφές θεραπείας εφαρμόζονται:

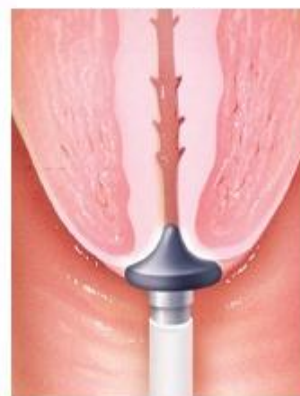
- **Χειρουργική**

Είναι μία από τις βασικές μεθόδους θεραπευτικής αντιμετώπισης για τον καρκίνο του τραχήλου. Τα είδη χειρουργικών επεμβάσεων είναι: κωνοειδής εκτομή, ολική υστεροεκτομή, αμφοτερόπλευρη σαλπυγγο-ωοθηκεκτομή, ριζική υστερεκτομή, κρυοχειρουργική, χειρουργική επέμβαση με λέιζερ, διαθερμία με βρόχους (LEEP).

LEEP



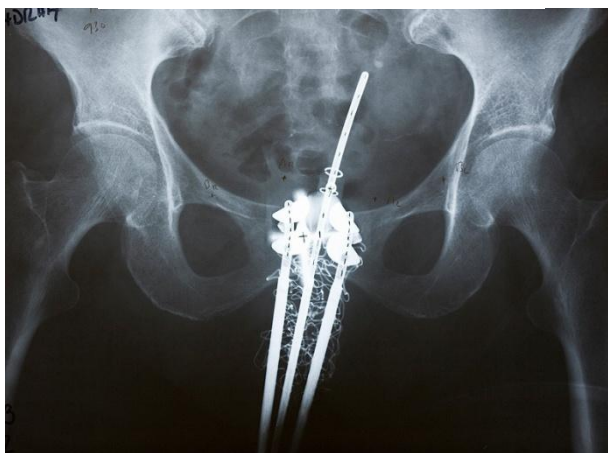
Κρυοχειρουργική



- **Ακτινοθεραπεία**

Η εξωτερική ακτινοθεραπεία ή τηλεθεραπεία γίνεται με μηχάνημα ακτινοβολίας που βρίσκεται έξω από το σώμα και εκπέμπει την ακτινοβολία προς τον καρκινικό ιστό. Η εσωτερική ακτινοθεραπεία ή βραχυθεραπεία χρησιμοποιεί ραδιενεργό ουσία ενσωματωμένη σε βελόνες, καλώδια, κεφαλές ή καθετήρες που τοποθετούνται απευθείας μέσα ή κοντά στην καρκινική εστία.

Βραχυθεραπεία



- **Χημειοθεραπεία**

Χρησιμοποιεί φαρμακευτικούς παράγοντες για να αναστείλει την αύξηση των καρκινικών κυττάρων, προκαλώντας είτε το θάνατο είτε τη διακοπή της διαίρεσης των κυττάρων. Όταν η χημειοθεραπεία χορηγείται από το στόμα ή εγχέεται ενδοφλέβια ή ενδομυϊκά, τα φάρμακα εισέρχονται στην κυκλοφορία του αίματος προσεγγίζοντας τα καρκινικά κύτταρα σε όλη την έκταση του σώματος (συστηματική χημειοθεραπεία). Όταν οι χημειοθεραπευτικοί παράγοντες τοποθετούνται απευθείας στη σπονδυλική στήλη, σε μια κοιλότητα του σώματος όπως η κοιλία, ή σε ένα όργανο, επιδρούν κατά κύριο λόγο στα καρκινικά κύτταρα των συγκεκριμένων περιοχών. Ο τρόπος

χορήγησης της χημειοθεραπείας εξαρτάται από τον τύπο και το στάδιο του καρκίνου.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Άρθρα

A. Boers, R. Wang, R. W. Van Leeuwen, H.G. Klip, et al.: Discovery of new Methylation markers to improve screening for cervical intraepithelial Neoplasia grade 2/3. *Clinical Epigenetics*. 2016; 8:29: 1-16

Cara M. Martin, John J. O’Leary.: Histology of cervical intraepithelial Neoplasia and the role of biomarkers. *Science Direct*. 2011: 605-615

Eun-Kyoung Vim, Jong-Sup Park.: The role of HPV E6 and E7 Oncoproteins in HPV-associated cervical carcinogenesis. *Cancer Res Treat*. 2005: 321-323

Iana Lesnikova, Marianne Lidang, Stephen Hamilton-Dutoit, Jorn Koch.: p16 as a diagnostic marker of cervical neoplasia: a tissue microarray study of 796 archival specimens. *Diagnostic Pathology*. 2009; 4:22: 1-7

K.P. Nephew et al.: Epigenetic gene silencing in cancer initiation and progression. *Cancer Letters*. 2003: 125-133

Maria Lina Tornesello, Luigi Bunnaguro, Paolo Giorgi-Rossi, Franco M. Bunnaguro.: Viral and Cellular Biomarkers in the Diagnosis of Cervical Intraepithelial Neoplasia and Cancer. *Biomed Research International*. 2013: 1-10

Nicolas Wentzensen and Magnus.: Biomarkers in cervical cancer screening. *Cancer Early Detection*. 2007: 315-325

Nicolas Wentzeusen, Barbara Fetterman et al.: p16/Ki-67 Dual Stain Cytology for Detection of Cervical Precancer in HPV-positive Women. *JNCI J Natl Cancer Inst*. 2015; 107(12): 1-8

Qi-Chang Yung, Yan Zhu, Hang-Bing Liou et al.: A cocktail of MCM2 and TOP2A, p16 and Ki-67 as Biomarkers for the improved diagnosis of cervical intraepithelial lesion. *Department of Pathology*. 2013; 1:21-27

Sharan LimiMi Ja LEE et al.: Efficacy of p16 and Ki-67 immunostaining in the detection of squamous intraepithelial lesions in a high-risk HPV group. *Oncology Letters*. 2016: 1447-1452

SL. Berger.: The Complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature*. 2007: 407-412

Takaaki Sano, Tetsunari Oyama, Kenji Kashiwabara et al.: Expression Status of p16 protein is associated with Human Papillomavirus Oncogenic Potential in Cervical and Genital Lesions. *American Journal of Pathology*. 1998: 1741-1748

Vikrant V Sahasrabudde, Patricia Luhn Nicolas Wentzense.: Human papillomavirus and cervical cancer: biomarkers for improved prevention efforts. Future Microbiol. 2011; 6(9): 1-10

A. Τσίπης, Α.Μ. Αθανασιάδου, Π. Αθανασιάδου: ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΤΕΛΟΜΕΡΑΣΗΣ ΣΤΟ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΟ. Γυναικολογία-Μαιευτική. 2007; 2 : 126-136

Βιβλία

Lunette Denny, Rolando Herrero et al.: Cancer, 3^η Έκδοση. Εκδόσεις DISEASE CONTROL PRIORITIES, 2015

Bruce Alberts, Dennis Bray, Karen Hopkin et al.: Βασικές αρχές κυτταρικής βιολογίας, 2^η Έκδοση. Εκδόσεις Πασχαλίδης, 2006

Hang M. Kantarjian, Robert A. Wolff, Charles A Koller: ΙΑΤΡΙΚΗ ΟΓΚΟΛΟΓΙΑ, 2^η Έκδοση. Εκδόσεις Παρισιάνου, 2016

J. C. E Underwood, S.S Cross: Γενική και Συστηματική Παθολογική Ανατομική, 5^η Έκδοση. Εκδόσεις Παρισιάνου, 2011

Leslie P. Gartner, James L. Hiatt: Ιστολογία, 3^η Έκδοση. Εκδόσεις Παρισιάνου, 2011

Vinay Kumar, Abur K. Abbas, Nelson Fausto, Richard N. Mitchel: Robbins Βασική Παθολογική Ανατομία, 8^η Έκδοση. Εκδόσεις Παρισιάνου, 2011

Πηγές από το Διαδίκτυο

ΚΕΕΛΠΝΟ: Επιγενετική και περιβαλλοντικές εκθέσεις
<http://www2.keelpno.gr/blog/?p=2860>

Eurocytology: Ανατομία του τραχήλου της μήτρας
<http://www.eurocytology.eu/el/course/462>

Eurocytology: Επιδημιολογία του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας
<http://www.eurocytology.eu/el/course/467>

Wikipedia
<https://en.wikipedia.org>