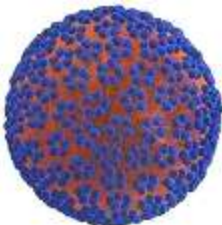


# **Ανίχνευση υπερέκφρασης mRNA των ογκογονιδίων E6/E7 του ιού HPV με Κυτταρομετρία Ροής**

**Χριστίνα Κοτταρίδη**

Βιολόγος, Εργαστήριο Διαγνωστικής Κυτταρολογίας  
Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Αθηνών



# Κυτταρομετρία ροής και HPV

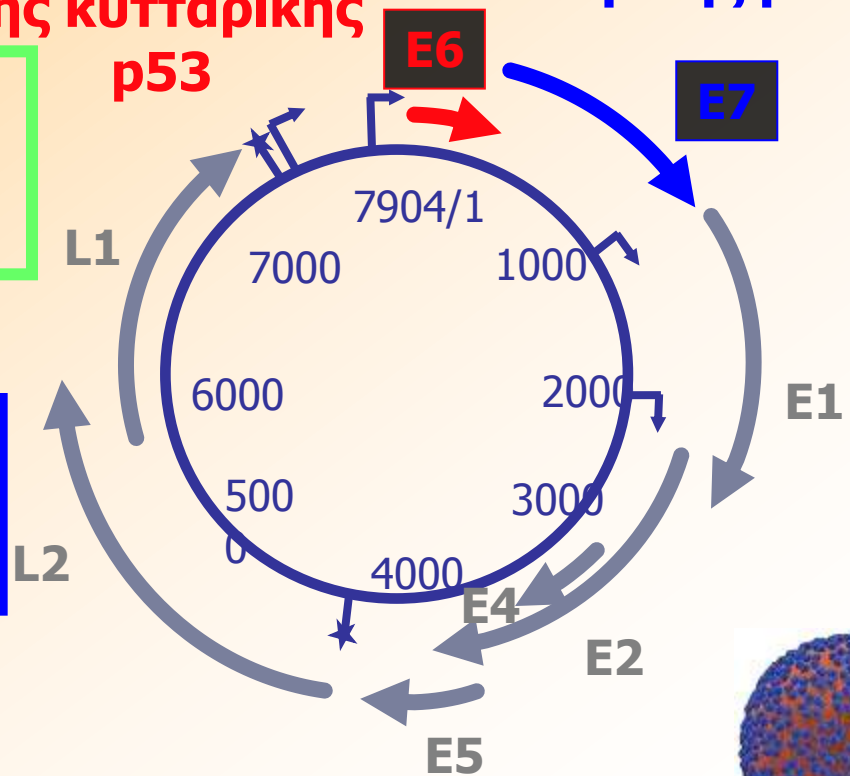
- Υπερέκφραση των ογκογονιδίων E6 και E7

- Κυτταρική αθανατοποίηση
- Κακοήθη μετασχηματισμό

- ✓ Άθικτα κύτταρα
- ✓ Ενδοκυττάριο mRNA

απενεργοποίηση της κυτταρικής p53

απενεργοποίηση της κυτταρικής pRb

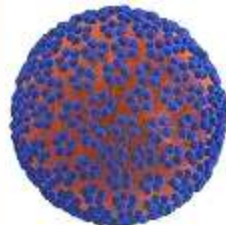


# Κυτταρομετρία ροής και HPV

- HPV OncoTect™ (Invirion Diagnostics)



- Ενσωμάτωση του ιού στο γενωμικό DNA
- Ανίχνευση της υπερέκφρασης του mRNA των γονιδίων E6 και E7 των ογκογόνων τύπων HPV

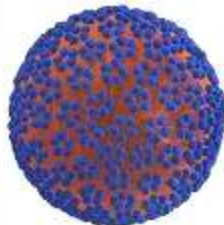


# Ανάλυση δεδομένων

- Κυτταρόμετρο ροής - 488 nm argon laser

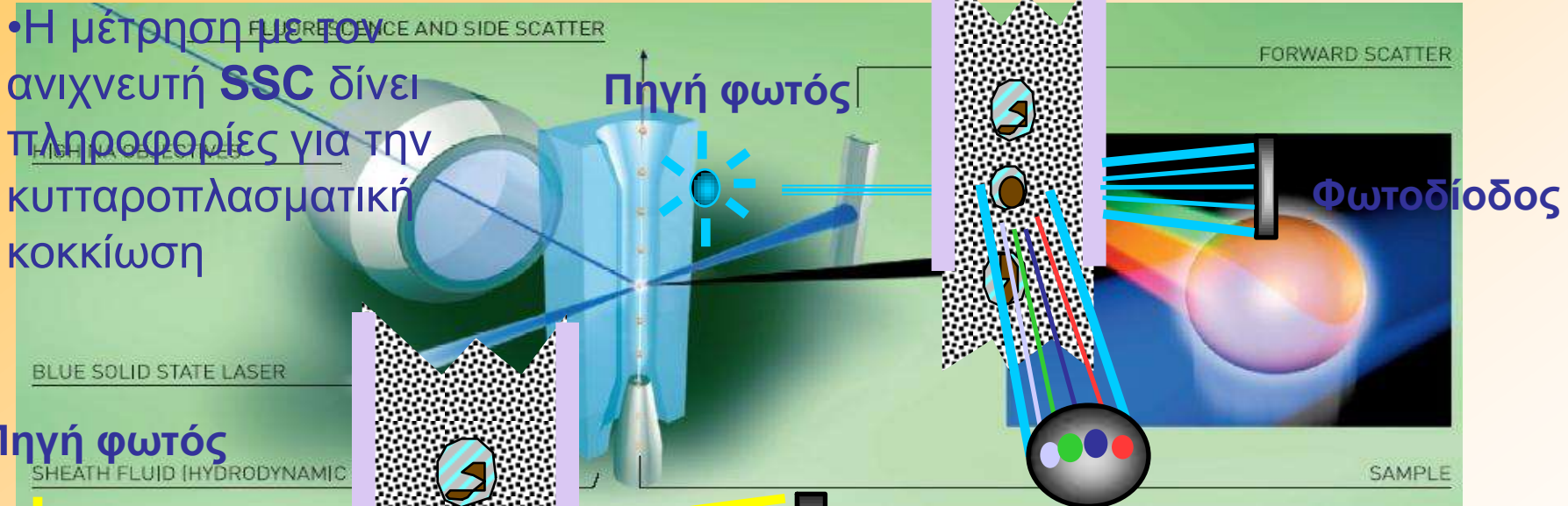


- Μονάδα ηλεκτρονικού υπολογιστή για την επεξεργασία των σημάτων



# Ανάλυση δεδομένων

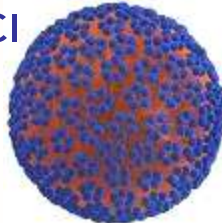
• Η μέτρηση με τον ανιχνευτή **SSC** δίνει πληροφορίες για την κυτταροπλασματική κοκκίωση



Πηγή φωτός  
SHEATH FLUID (HYDRODYNAMIC FOCUSING)  
Πηγή φωτός (αργόν-ιον)

Φωτοδίοδος

Υδραυλικό σύστημα αναγκάζει τα κύτταρα να ρέουν το ένα μετά το άλλο μπροστά σε μια **LASER** μέτρηση με τον ανιχνευτή **FSC** είναι αντίστοιχη του μεγέθους του κυττάρου και χρησιμοποιείται για να ξεχωρίσει διαφορετικά είδη κυττάρων

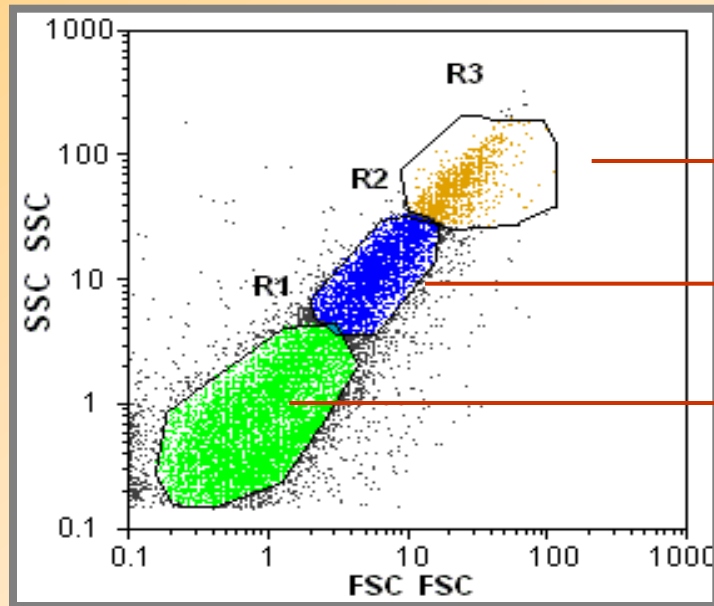


# Έλεγχος επάρκειας του δείγματος

• Ελάχιστος αριθμός κυττάρων εξωτραχήλου (Bethesda 2001) → 5000

• Κριτήρια επάρκειας (Grundhoefer and Patterson)

- ✓ Κύτταρα Εξωτραχήλου >1%
- ✓ Κύτταρα Ενδοτραχήλου >1%
- ✓ Φλεγμονώδη Κύτταρα <20%

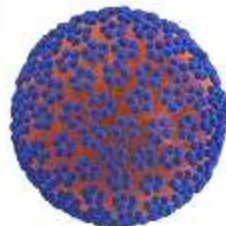


Φλεγμονώδη Κύτταρα 8,6%

Κύτταρα Ενδοτραχήλου 21,15%

Κύτταρα Εξωτραχήλου 70,23%

Region	Count
R1	5494
R2	1655
R3	673

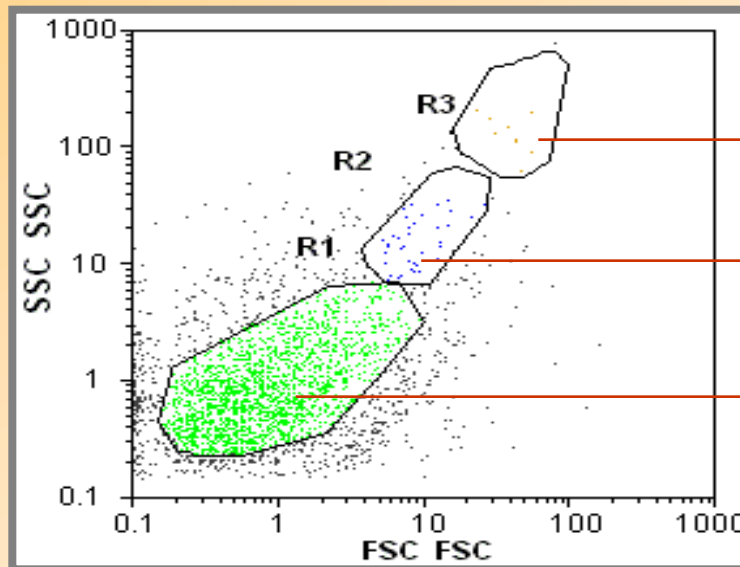


# Έλεγχος επάρκειας του δείγματος

• Ελάχιστος αριθμός κυττάρων εξωτραχήλου (Bethesda 2001) → 5000

• Κριτήρια επάρκειας (Grundhoefer and Patterson)

- ✓ Κύτταρα Εξωτραχήλου >1%
- ✓ Κύτταρα Ενδοτραχήλου >1%
- ✓ Φλεγμονώδη Κύτταρα <20%

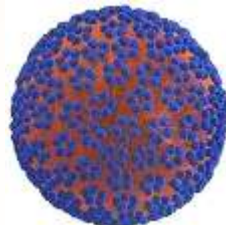


Φλεγμονώδη Κύτταρα 0,51%

Κύτταρα Ενδοτραχήλου 0,81%

Κύτταρα Εξωτραχήλου 84,2%

Region	Count
R1	5942
R2	60
R3	36

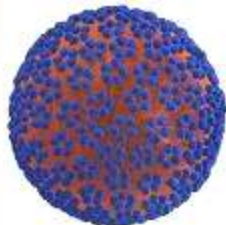


# OncoTect™ test (Invirion Diagnostics)

Κύτταρα εναιωρήματος φιαλιδίου υγρής φάσης ThinPrep® (1 ml-max  $10^6$  κύτταρα)

Μονιμοποιούνται και καθίστανται διαπερατά (PermiFlow, Invirion Diagnostics) (90 min)

In situ υβριδοποίηση FAM σημασμένου μίγματος HPV ιχνηθετών σε άθικτα κύτταρα του εξωτραχήλου (30 min)





# Αποτέλεσμα OncoTect

- **Αρνητικό**

↓  
απουσία ανίχνευσης  
υπερέκφρασης  
mRNA E6 και E7

↓  
απουσία ενσωμάτωσης του  
ιού

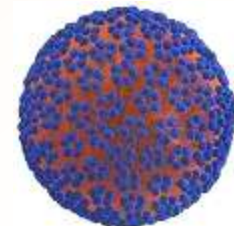
↓  
ποσοστό φθοριζόντων  
κυττάρων < 1,5%

- **Θετικό**

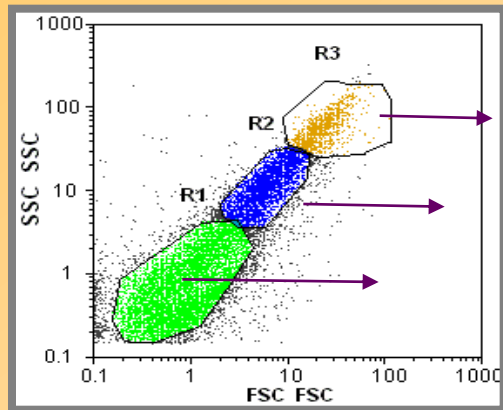
↓  
ανίχνευση  
υπερέκφρασης  
mRNA E6 και E7

↓  
ιός ενσωματωμένος

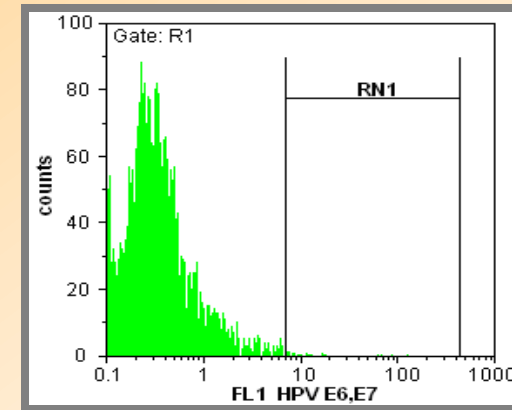
↓  
ποσοστό φθοριζόντων  
κυττάρων > 1,5%



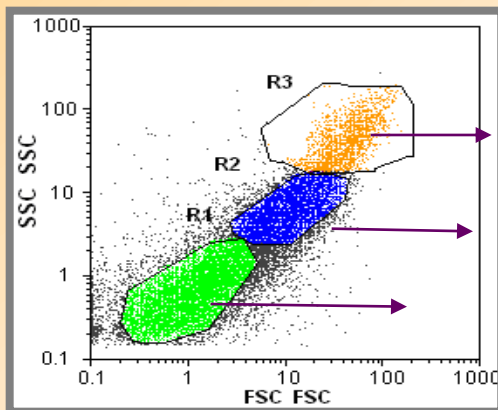
**Δείγμα «εντός φυσιολογικών ορίων» - ποσοστό φθοριζόντων κυττάρων 0,5%  
αρνητικό για υπερέκφραση mRNA E6 και E7**



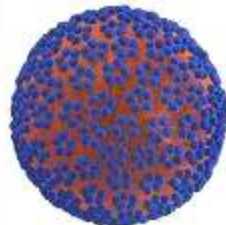
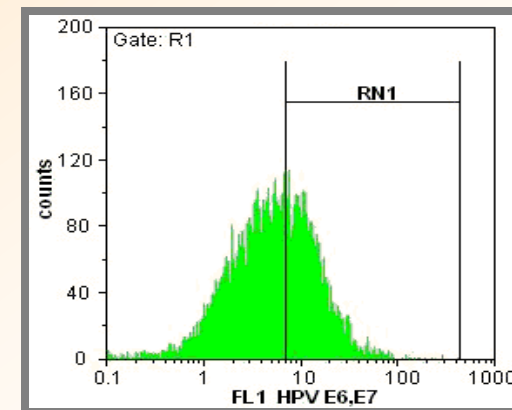
φλεγμονώδη κύτταρα  
κύτταρα ενδοτραχήλου  
κύτταρα εξωτραχήλου



**Δείγμα «LgSIL/CINI» - ποσοστό φθοριζόντων κυττάρων 23%  
θετικό για υπερέκφραση mRNA E6 και E7**



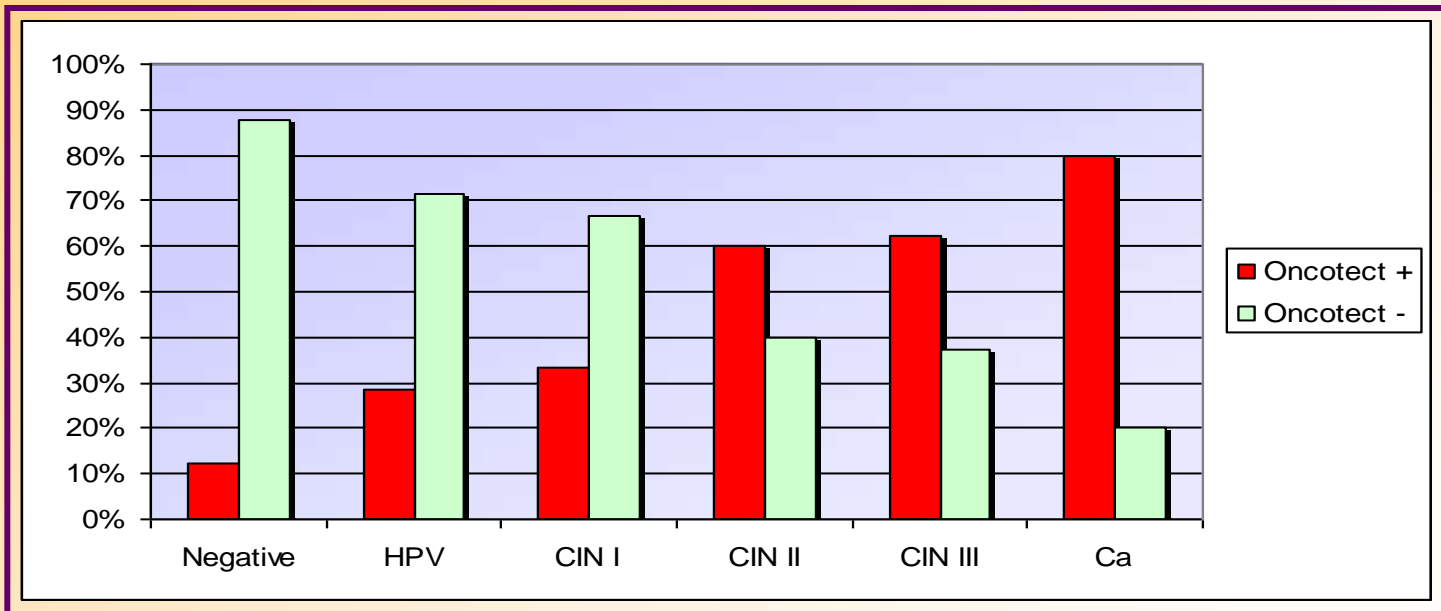
φλεγμονώδη κύτταρα  
κύτταρα ενδοτραχήλου  
κύτταρα εξωτραχήλου



# Αποτελέσματα

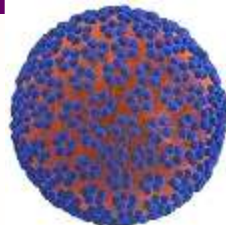
## Σύγκριση Ιστολογικής-OncoTect HPV mRNA Θετικότητας

	Negative	HPV	CIN I	CIN II	CIN III	Ca	Σύνολο
<b>Oncotect +</b>	130	14	18	15	10	8	195
<b>Oncotect -</b>	923	35	36	10	6	2	1012
<b>Σύνολο</b>	1053	49	54	25	16	10	1207



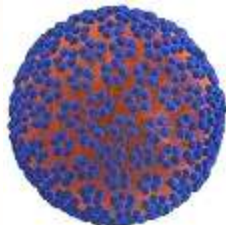
**Ειδικότητα CINII+ 85,99%**

**Ευαισθησία CINII+ 64,71%**



# Συμπεράσματα

- Θετικότητα στα CIN I +
  - ✓ πραγματικός πληθυσμός με ενεργό λοίμωξη-  
περιορίζεται το screening / 6 μήνες στο θετικό πληθυσμό
- Θετικότητα στα CIN II +
  - ✓ τα περιστατικά που θα υποτροπιάσουν μετά από  
θεραπεία αν παραμείνει η έκφραση του mRNA των  
E6/E7



# Συμπεράσματα

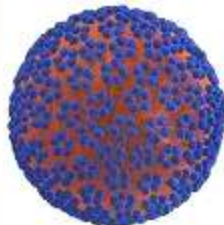
✓ Με το OncoTect test μετράται η ενεργότητα των ογκοπρωτεϊνών που είναι και το πραγματικό μέτρο εκτίμησης της ανάπτυξης καρκινογόνων αλλαγών

✓ Σχετικά σύντομη τεχνική

**Δεν μπορεί να διακρίνει τον τύπο του ιού**

ΟΛΩΝ ΤΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΥΨΗΛΟΥ  
ΚΙΝΔΥΝΟΥ

✓ Απαιτείται μόλις 1 ml  
εναιωρήματος κυττάρων σε  
ThinPrep



# Εργαστήριο Διαγνωστικής Κυτταρολογίας, Π.Γ.Ν. «ΑΤΤΙΚΟΝ»

Διευθυντής: Π. Καρακίτσος, Αν. Καθηγητής

## Μονάδα αναλυτικής και ποσοτικής κυτταρολογίας

### Προσωπικό:

- Ι. Γεωργουλάκης, Λέκτορας
- Α. Κατέρης, Φυσικός
- Σ. Τσούκος, Φυσικός
- Χ. Κοτταρίδη, Βιολόγος
- Α. Σπαθης, Βιολόγος

### Εφαρμογές

- Στατική Κύτταρομετρία
- Κυτταρομετρία Ροής

## Μονάδα λειτουργικής κυτταρολογίας

### Προσωπικό:

- Ζ. Χριστώνη, Μοριακή Βιολόγος
- Α. Μαρούγγα, Βιοχημικός

### Εφαρμογές

- FISH, CISH
- Άνοσοκυτταροχημεία

## Μονάδα τεχνητής νοημοσύνης

### Προσωπικό:

- Α. Πουλιάκης
- Κ. Κουτρούμπας
- Τ. Μεγαλοπούλου

## Μονάδα μοριακής κυτταρολογίας

### Προσωπικό:

- Α. Χρανιώτη, Βιοχημικός
- Χ. Κοτταρίδη, Βιολόγος
- Ζ. Χριστώνη, Μοριακή βιολόγος
- Α. Σπάθης, Βιολόγος
- Μ. Αλεπάκη, Βιολόγος
- Λ. Αγά, Βιολόγος

### Εφαρμογές:

- PCR, RT-PCR, qPCR
- DNA Microarrays

## Μονάδα διαγνωστικής κυτταρολογίας

**ΙΑτρικό προσωπικό Ε.Κ.Π.Α.:** Ι. Γεωργουλάκης, Λέκτορας

**ΙΑτρικό προσωπικό Ε.Σ.Υ.:** Μ. Σταματάκη, Διευθύντρια, Κυτταρολόγος

Α. Ανοιος, Επιμελητής Α, Κυτταρολόγος

Ν. Μάργαρη, Επικουρική ιατρός, Κυτταρολόγος

Χ. Μεριστούδης, Επι. ιατρός, Κυτταρολόγος

### Τεχνολόγοι :

- Σ. Καζίκα, Α. Λέκκα, Α. Σταμουλακάτου, Κ. Κωνσταντοπούλου

### Γραμματεία:

- Π. Τσιάρα, Ε. Αθανασιάδη

### Εφαρμογές

- Αποφωλιδωτική κυτταρολογία, Παρακεντίσεις λεπτής βελόνης
- Κυτταροχημικές χρώσεις

## Μονάδα τηλε-κυτταρολογίας

### Προσωπικό:

- Σ. Τσούκος, Φυσικός
- Α. Κατέρης, Φυσικός
- Ν. Στεργίου, Ηλεκτρολόγος μηχανικός

### Εφαρμογές:

- Συμβουλευτική διάγνωση εξ'αποστάσεως
- Τηλε-διάσκεψης
- Τηλε-εκπαίδευσης