

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

“ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΝΕΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ: ΕΡΕΥΝΑ, ΚΥΚΛΟΦΟΡΙΑ ΚΑΙ ΠΡΟΣΒΑΣΗ”

Τίτλος: Μελέτη πολυμορφισμών των γονιδίων UCK1, UCK2 που σχετίζονται με το μεταβολισμό της 5-αζακυτιδίνης σε ασθενείς με Μυελοδυσπλαστικά Νεοπλάσματα (ΜΔΣ)

Χριστίνα-Νεφέλη Κοντανδρεοπούλου

Βιολόγος

Αθήνα, 2024

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: Νικόλαος Δρακούλης, Καθηγητής Φαρμακολογίας και Κλινικής Φαρμακολογίας, Τμήμα Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ

ΜΕΛΟΣ: Παναγιώτης Θ. Διαμαντόπουλος, Επίκουρος Καθηγητής Παθολογίας-Αιματολογίας, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ

ΜΕΛΟΣ: Αναστάσιος Κόλλιας, Καθηγητής Παθολογίας, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ

Στους γονείς μου..

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία υλοποιήθηκε στο πλαίσιο του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών « Ανάπτυξη Νέων Φαρμάκων: Έρευνα, Κυκλοφορία και Πρόσβαση» κατά τη διάρκεια του ακαδημαϊκού έτους 2023-2024.

Πριν προχωρήσω στην έκθεση της παρούσας εργασίας θα ήθελα να εκφράσω τις θερμότερες ευχαριστίες μου σε όλους όσοι συνέβαλλαν στην ολοκλήρωσή της.

Πρώτα από όλα, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαιτέρως τον Καθηγητή κ. Νικόλαο Δρακούλη, επιβλέποντα καθηγητή και επιστημονικό υπεύθυνο της παρούσας εργασίας, για την επιστημονική υποστήριξη, τη συνεχή βοήθεια, τις πολύτιμες συμβουλές και την καθοδήγηση καθ'όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της.

Ευχαριστώ θερμά τη Βιοτεχνολόγο κα. Άννια Τσολάκου για τη συνεχή υποστήριξη και καθοδήγηση κατά τη διάρκεια των πειραματικών διεργασιών, όπως και όλη την ερευνητική ομάδα της Κλινικής Φαρμακολογίας και Φαρμακογονιδιωματικής.

Ένα ιδιαίτερο ευχαριστώ στον Επίκουρο Καθηγητή κ. Παναγιώτη Διαμαντόπουλο, μέλος της τριμελούς επιτροπής για την παροχή όλων των δειγμάτων ασθενών και των κλινικών τους δεδομένων, καθώς επίσης για την αμέριστη υποστήριξη του κατά τη διάρκεια του προγράμματος και το χρόνο που διέθεσε για την εξέταση της εργασίας και τις συμβουλές που μου παρείχε.

Ευχαριστώ επίσης τον Καθηγητή κ. Αναστάσιο Κόλλια, έτερο μέλος της τριμελούς επιτροπής για το χρόνο που διέθεσε και τα πολύτιμα σχόλια του.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στους γονείς μου για τη στήριξη και συμπαράσταση τους σε κάθε ακαδημαϊκό μου βήμα.

Περιέχόμενα

Περίληψη	7
Abstract.....	9
1. Εισαγωγή.....	11
1.1. Τα Μυελοδυσπλαστικά Νεοπλάσματα	11
1.1.1. Εισαγωγικά Στοιχεία	11
1.2. Ταξινόμηση των Μυελοδυσπλαστικών Νεοπλασμάτων.....	13
1.2.1. Συστήματα Ταξινόμησης	13
1.2.2 Προγνωστικά Συστήματα.....	21
1.3 Παθοφυσιολογία των Μυελοδυσπλαστικών Νεοπλασμάτων	27
1.3.1 Το γενετικό υπόβαθρο των ΜΔΣ	27
1.3.2 Το επιγενετικό υπόβαθρο των ΜΔΣ.....	29
1.4 Θεραπευτικές προσεγγίσεις	29
1.4.1 Επιγενετική θεραπεία στα Υψηλότερου Κινδύνου Μυελοδυσπλαστικά Νεοπλάσματα	31
1.4.2 Μηχανισμός δράσης υπομεθυλιωτικών παραγόντων.....	33
1.4.3 Μεταβολισμός της 5-αζακυτιδίνης.....	37
1.5 Γενετικό Υπόβαθρο	39
1.5.1 Γονίδιο κινάσης ουριδίνης-κυτιδίνης 1	39
1.6 Σκοπός.....	45
2. Υλικά και Μέθοδοι	46
2.1 Ασθενείς.....	46
2.2 Μέθοδοι.....	47
2.2.1 Απομόνωση DNA	47
2.2.2 Πρωτόκολλο απομόνωσης DNA	48
2.2.3 Φωτομέτρηση DNA.....	50
2.3 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR).....	52
2.4 Kompetitive allele specific PCR (KASP)	54
2.4.1 Αναλυτική διαδικασία KASP.....	58
2.5 Στατιστική ανάλυση.....	62
3 Αποτελέσματα.....	63
3.1 Συχνότητα κατανομής του πολυμορφισμού rs2296957 του γονιδίου UCK1 σε ασθενείς με ΥΚ-ΜΔΣ και ΧΚ-ΜΔΣ.....	65
3.1.1 Κατανομή αλληλόμορφων.....	65
3.1.2 Κατανομή γονοτύπων	67

3.2	Συχνότητα κατανομής του πολυμορφισμού rs189473964 του γονιδίου UCK1 σε ασθενείς με ΥΚ-ΜΔΣ και ΧΚ-ΜΔΣ	69
3.2.1	Κατανομή αλληλόμορφων	69
3.2.2	Κατανομή γονοτύπων	71
3.3	Συχνότητα κατανομής του πολυμορφισμού rs3904960 του γονιδίου UCK1 σε ασθενείς με ΥΚ-ΜΔΣ και ΧΚ-ΜΔΣ.....	73
3.3.1	Κατανομή αλληλόμορφων	73
3.3.2	Κατανομή γονοτύπων	75
3.4	Συχνότητα κατανομής του πολυμορφισμού rs2296956 του γονιδίου UCK1 σε ασθενείς με ΥΚ-ΜΔΣ και ΧΚ-ΜΔΣ.....	77
3.4.1	Κατανομή αλληλόμορφων	77
3.4.2	Κατανομή γονοτύπων	79
3.5	Συσχέτιση κατανομής των γονοτύπων με την ολική επιβίωση των ασθενών 83	
3.6	Συσχέτιση κατανομής των γονοτύπων με την ανταπόκριση των ασθενών στη θεραπεία με 5-αζακυτιδίνη.....	83
3.7	Παραμετρική συσχέτιση κατανομής των γονοτύπων με βασικές παραμέτρους της νόσου	86
3.7.1	Μεταγγίσεις ερυθρών αιμοσφαιρίων και αιμοπεταλίων	86
3.8	Σχετικοί λόγοι κατανομής γονοτύπων των πολυμορφισμών.....	87
3.9	Μη παραμετρική συσχέτιση των γονοτύπων με αιματολογικούς δείκτες ...	88
4	Συζήτηση	90
5	Βιβλιογραφία.....	97
6	Εκτεταμένη Σύνοψη.....	105

Περίληψη

Τα Μυελοδυσπλαστικά νεοπλάσματα (ΜΔΣ) είναι κλωνικά νοσήματα του μυελού των οστών, τα οποία χαρακτηρίζονται από αναποτελεσματική αιμοποίηση, τα οποία οδηγούν σε κυτταροπενίες, όπως αναιμία, ουδετεροπενία και θρομβοπενία, ενώ έχουν την τάση να εξελίσσονται σε οξεία μυελογενή λευχαιμία. Η 5-αζακυτιδίνη είναι η θεραπεία πρώτης γραμμής για ΜΔΣ υψηλού κινδύνου (ΥΚ-ΜΔΣ), λόγω της ικανότητάς της να επηρεάζει τη μεθυλίωση του DNA. Στο εσωτερικό των κυττάρων ενεργοποιείται από το ένζυμο κινάση ουριδίνης-κυτιδίνης (UCK).

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η διερεύνηση της πιθανής συσχέτισης της ανταπόκρισης στη θεραπεία με 5-αζακυτιδίνη ασθενών με ΥΚ-ΜΔΣ με το γονότυπο τους μετά από σύγκριση των γονοτύπων των πολυμορφισμών rs2296957, rs189473964, rs3904960 και rs2296956 του γονιδίου *UCK1*.

Για την ανάλυση των πολυμορφισμών, δείγματα μυελού των οστών συλλέχθηκαν από 54 ασθενείς με ΜΔΣ (35 άνδρες και 19 γυναίκες, με διάμεση ηλικία τα 74 έτη). Χρησιμοποιώντας γονοτυπική ανάλυση (Kompetitive Allele Specific PCR) αναδείχθηκε μία στατιστικά μη σημαντική, ωστόσο ισχυρή τάση συσχέτισης του πολυμορφισμού rs2296956 με καλύτερη ανταπόκριση στη θεραπεία με 5-αζακυτιδίνη ($p=0.07$). Επιπλέον, υπήρξε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ της παρουσίας του πολυμορφισμού rs3904960 και της ανάγκης μεταγγίσεων ερυθρών αιμοσφαιρίων ($p=0.03$).

Συνοψίζοντας, ο προστατευτικός ρόλος που φαίνεται να προσδίδουν οι γονότυποι για το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο του rs3904960 ως προς την ανάγκη για μεταγγίσεις ερυθρών αιμοσφαιρίων αποτελεί σημαντικό εύρημα,

ενώ η τάση που παρατηρήθηκε για τον πολυμορφισμό rs2296956 στην ανταπόκριση στη θεραπεία χρήζει περαιτέρω διερεύνησης, ώστε να εξεταστεί κατά πόσο οι πολυμορφισμοί του *UCK1* μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως προγνωστικοί βιοδείκτες της ανταπόκρισης στη θεραπεία, συμβάλλοντας στην εξατομίκευση της θεραπείας για τους ασθενείς.

Abstract

Myelodysplastic neoplasms (MDS) are clonal disorders of the bone marrow, characterized by ineffective hematopoiesis, leading to cytopenias such as anemia, neutropenia, and thrombocytopenia. In advanced stages, they may progress to acute myeloid leukemia (AML). Azacitidine is the first-line treatment for high-risk MDS (HR-MDS) due to its ability to incorporate into DNA or RNA and irreversibly bind methyltransferase. Within cells, it is activated by the enzyme uridine-cytidine kinase (UCK).

This study aims to investigate the possible association of the response to azacitidine treatment in HR-MDS patients with their genotype, by comparing the genotypes of the polymorphisms rs2296957, rs189473964, rs3904960, and rs2296956 of the *UCK1* gene.

For the analysis of these polymorphisms, bone marrow samples were collected from 54 MDS patients (35 males and 19 females, with a median age of 74 years). Using genotypic analysis (Kompetitive Allele Specific PCR), a non-statistically significant trend was found between the rs2296956 polymorphism and a better response to azacitidine treatment ($p=0.07$). Additionally, a statistically significant correlation was observed between the presence of the rs3904960 polymorphism and the need for red blood cell transfusions ($p=0.03$).

In conclusion, the protective role that the genotypes for the mutated allele of rs3904960 appear to offer concerning the need for red blood cell transfusions is an important finding. Moreover, the trend observed for the rs2296956 polymorphism in response to treatment requires further investigation to assess

whether *UCK1* polymorphisms can be used as predictive biomarkers for treatment efficacy, contributing to personalized treatment for patients.

1. Εισαγωγή

1.1. Τα Μυελοδυσπλαστικά Νεοπλάσματα

1.1.1. Εισαγωγικά Στοιχεία

Τα μυελοδυσπλαστικά νεοπλάσματα [αντικατάσταση του όρου μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα (ΜΔΣ) με βάση τη αναθεωρημένη ταξινόμηση κατά τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO) 2022] αντιπροσωπεύουν μια ετερογενή ομάδα κλωνικών νοσημάτων του μυελού των οστών. [1] Χαρακτηρίζονται από αναποτελεσματική αιμοποίηση που οδηγεί σε κυτταροπενίες στο περιφερικό αίμα, με συνήθη κλινική εικόνα την αναιμία, την ουδετεροπενία και/ή τη θρομβοπενία. Επίσης χαρακτηρίζονται από αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης οξείας μυελογενούς λευχαιμίας (ΟΜΛ), αν και πολλοί ασθενείς καταλήγουν από τις επιπλοκές της νόσου πριν φτάσουν σε αυτό το στάδιο. Ο σημερινός διαδεδομένος όρος «μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα» προτάθηκε από τον Bennett το 1982. [2] Για την διάγνωση των ΜΔΣ έχει οριστεί ως ελάχιστο μορφολογικό κριτήριο, η εμφάνιση δυσπλασιών σε τουλάχιστον 10% των κυττάρων σε οποιαδήποτε μυελική σειρά στο μυελό των οστών. [3] Η ετήσια επίπτωση της νόσου είναι περίπου 5 περιπτώσεις ασθενών ΜΔΣ ανά 100.000 άτομα ανά έτος στις Ηνωμένες Πολιτείες και στην Ευρώπη η αντίστοιχη επίπτωση είναι περίπου 10-15 περιστατικά ανά 100.000 άτομα ετησίως. Η επίπτωση της νόσου αυξάνεται με την ηλικία του ασθενούς σε περίπου εικοσιπέντε περιστατικά ΜΔΣ ανά 100.000 άτομα ετησίως (για ασθενείς άνω των 65 ετών). Η μέση ηλικία διάγνωσης της νόσου είναι τα 70 έτη και η συχνότητα εμφάνισης στους άνδρες είναι μεγαλύτερη της συχνότητας

εμφάνισης στις γυναίκες (πιο συγκεκριμένα τα ετήσια ποσοστά εμφάνισης στους άνδρες είναι περίπου 5 περιπτώσεις ανά 100.000 άτομα, έναντι 3 περιπτώσεων ανά 100.000 άτομα που καταγράφονται στις γυναίκες). [4] Η συχνότητα εμφάνισης στους άνδρες είναι αυξημένη σε σύγκριση με τις γυναίκες με εξαίρεση τον υπότυπο del(5q). Η εμφάνιση των ΜΔΣ σε ηλικία κάτω των 50 ετών είναι γενικά σπάνια. [5, 6]

Μεταξύ των παραγόντων υψηλού κινδύνου εκδήλωσης της νόσου, συμπεριλαμβάνεται η ηλικία, το φύλο, η κατανάλωση αλκοόλ, το κάπνισμα, η έκθεση σε ιονίζουσα ακτινοβολία, η ανοσοκατασταλτική θεραπεία, η έκθεση σε βενζόλιο και άλλες περιβαλλοντικές/επαγγελματικές εκθέσεις. Αυτοί οι παράγοντες κινδύνου εκτιμάται ότι ευθύνονται για τη νόσο σε ποσοστό περίπου 20-30% των περιπτώσεων, οι οποίες περιγράφονται ως δευτεροπαθή ΜΔΣ. [7, 8] Μια διαδεδομένη κατηγορία δευτεροπαθών ΜΔΣ είναι αυτά που σχετίζονται με τη θεραπεία (t-MDS), καθώς ασθενείς που έλαβαν χημειοθεραπεία ή/και ακτινοθεραπεία στο παρελθόν έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα εμφάνισης ΜΔΣ. Τα δευτεροπαθή ΜΔΣ συνήθως είναι υψηλού κινδύνου (ΜΔΣ-ΥΚ) και εξελίσσονται σε ΟΜΛ με κακή πρόγνωση. [9, 10] Η ΟΜΛ είναι επιθετική κακοήθεια που προσβάλλει το αίμα και τον μυελό των οστών, εξελίσσεται γρήγορα και απειλητικά για τη ζωή εάν δεν αντιμετωπιστεί έγκαιρα. Η ακριβής αιτία της παθογένεσης της ΟΜΛ δεν είναι πλήρως κατανοητή, αλλά ορισμένοι παράγοντες κινδύνου μπορεί να αυξήσουν την πιθανότητα εμφάνισης της νόσου, όπως η έκθεση σε χημικές ουσίες ή ακτινοβολία, το κάπνισμα, ορισμένες γενετικές διαταραχές και η προηγούμενη έκθεση σε χημειοθεραπεία ή ακτινοθεραπεία. [11]

Τα υπόλοιπα ιδιοπαθή ΜΔΣ εντάσσονται στην κατηγορία των πρωτοπαθών ΜΔΣ. Τρία κύρια αίτια που φαίνεται να συμβάλλουν στην παθογένεση των πρωτοπαθών ΜΔΣ είναι: α) οι σωματικές μεταλλάξεις, που συνήθως επηρεάζουν το μάτισμα, τη συναρμολόγηση του πρόδρομου RNA και τα γονίδια που επηρεάζουν τη μεθυλίωση του DNA, β) η επιγενετική τροποποίηση γονιδίων που ελέγχουν την ανάπτυξη και τη διαφοροποίηση των πρόδρομων αιμοποιητικών κυττάρων και γ) κυτταροτοξικοί μηχανισμοί λόγω της παρουσίας μη φυσιολογικών ή αποπτωτικών αρχεγόνων αιμοποιητικών κυττάρων ή από το τροποποιημένο μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών. Ανεξάρτητα από τους παθογενετικούς μηχανισμούς, το αποτέλεσμα είναι σταδιακή ανάπτυξη των δυσλειτουργικών κλώνων που τελικά επικρατούν, οδηγώντας έτσι στην εκδήλωση της νόσου. [12,13]

1.2. Ταξινόμηση των Μυελοδυσπλαστικών Νεοπλασμάτων

1.2.1. Συστήματα Ταξινόμησης

Αρχικά τα ΜΔΣ περιγράφονταν ως ανθεκτικές μορφές αναιμίας που δεν ανταποκρίνονταν στις συνήθεις θεραπευτικές προσεγγίσεις, ενώ αναφέρονταν επίσης και ως “προλευχαιμία”. Το 1976 και στην αναθεώρηση του 1982 μία συνεργατική ομάδα μεταξύ επιστημόνων από τη Γαλλία, την Αμερική και τη Βρετανία (French-American-British Morphology group, FAB) καθιέρωσε το πρώτο σύστημα ταξινόμησης για τα ΜΔΣ χαρακτηρίζοντας τα για πρώτη φορά ως ξεχωριστές αιματολογικές οντότητες και αποτέλεσε το βασικό εργαλείο ταξινόμησης για πολλά χρόνια. [14] (Πίνακας 1)

Ο κύριος παράγοντας για την ταξινόμηση κατά FAB ήταν η εξέταση των μορφολογικών χαρακτηριστικών των κυττάρων του αίματος και του μυελού των

οστών των ασθενών και είχε ως αποτέλεσμα την διάκριση πέντε βασικών υποτύπων ΜΔΣ:

- Ανθεκτική αναιμία (RA, Refractory anemia)
- Ανθεκτική αναιμία με δακτυλιοειδής σιδηροβλάστες (RARS)
- Ανθεκτική αναιμία με περίσσεια βλαστών (RAEB)
- Ανθεκτική αναιμία με περίσσεια βλαστών σε μετατροπή (RAEB-T)
- Χρόνια μυελομονοκυττατική λευχαιμία (CMML)

Πίνακας 1. Ταξινόμηση ΜΔΣ κατά FAB

	Ανθεκτική Αναιμία (RA)	RA με δακτυλιοειδείς σιδηροβλάστες (RARS)	RA με περίσσεια βλαστών (RAEB)	RAEB σε μετατροπή (RAEB-t)	Χρόνια Μυελομονοκυτταρική Λευχαιμία (CMML)
% Βλάστες στο μυελό των οστών	<5%	<5% >15% (δακτ.σιδηρ.)	5-20%	21-30%	≤20%
% Βλάστες στο περιφερικό αίμα	≤1%	≤1%	<5%	≥5%	<5% >1000 μονκύτταρα/μl

Ωστόσο, λόγω μειονεκτημάτων που εμφάνισε το συγκεκριμένο σύστημα ταξινόμησης, το 1999 ο WHO πρότεινε μία νέα ταξινόμηση των ΜΔΣ με αρκετές αλλαγές στο μέχρι πρότινος σύστημα ταξινόμησης κατά FAB, ώστε να ανανεωθούν τα κριτήρια διάγνωσης και να βελτιωθεί η προγνωστική τους αξία, μέχρι που το 2008 η νέα ταξινόμηση πρότεινε τους εξής υπότυπους ΜΔΣ [15, 16, 17]:

- Ανθεκτική κυτταροπενία (RCUD) (μεταξύ των οποίων μπορεί να είναι η ανθεκτική αναιμία RA, η ανθεκτική ουδετεροπενία RN και η ανθεκτική θρομβοπενία RT)
- Ανθεκτική αναιμία με δακτυλιοειδείς σιδηροβλάστες (RARS)
- Ανθεκτική κυτταροπενία με πολυγραμμική δυσπλασία (RCMD)
- Ανθεκτική αναιμία με περίσσεια βλαστών-I (RAEB-I)
- Ανθεκτική αναιμία με περίσσεια βλαστών-II (RAEB-II)
- Αταξινόμητος υπότυπος ΜΔΣ (MDS-U)
- ΜΔΣ με χρωμοσωμική ανωμαλία del(5q)

Τα κριτήρια διάγνωσης και οι παραπάνω νέοι υπότυποι όπως καθορίστηκαν από την αναθεωρημένη ταξινόμηση κατά WHO 2008 συνοψίζονται στον πίνακα 2.

Τα μοριακά χαρακτηριστικά της νόσου τα οποία ταυτοποιήθηκαν με τη χρήση της τεχνολογίας προσδιορισμού αλληλούχισης επόμενης γενιάς (Next Generation Sequencing, NGS) παρείχαν νέες γνώσεις για την κατανόηση της παθοφυσιολογίας της νόσου και αποκάλυψαν διαγνωστικούς και προγνωστικούς δείκτες. Με την εμφάνιση τόσων νέων πληροφοριών, η αναθεώρηση των κριτηρίων κατάταξης κατέστη αναγκαία. Έτσι η αναθεωρημένη έκδοση WHO 2016 εισήγαγε βελτιώσεις σχετικά με τις

κυτταροπενίες, τις μορφολογικές αλλαγές και την επίδραση των γενετικών πληροφοριών στη διάγνωση και ταξινόμηση των ΜΔΣ.

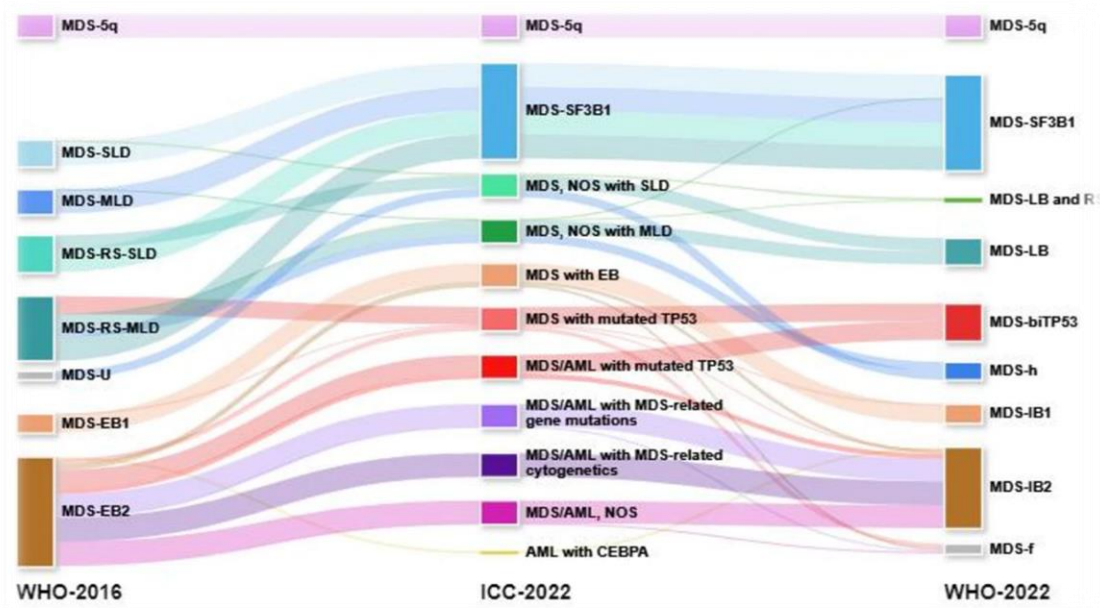
Η ταξινόμηση των μυελοδυσπλαστικών νεοπλασμάτων της 5ης έκδοσης [18] κατά WHO 2022 αναδιοργανώνει τις κατηγορίες ΜΔΣ, δίνοντας έμφαση στις ιστολογικές και γενετικές εξετάσεις του ασθενούς (Εικόνα 1). Τα ΜΔΣ με αποσιώπηση *TP53* λόγω διαλληλικής μετάλλαξης (MDS*b1*TP53) εισάγονται ως νέος υπότυπος αντικαθιστώντας άλλους υποτύπους ΜΔΣ. [19] Η παρουσία της μετάλλαξης *SF3B1* με μειωμένο αριθμό βλαστών θεωρείται διαγνωστική κατηγορία ΜΔΣ (MDS-SF3B1) και αντικαθιστά την προηγούμενη ταξινόμηση ΜΔΣ με δακτυλιοειδείς σιδηροβλάστες (MDS-RS). [20] Εισάγονται επίσης δύο νέες κατηγορίες, αυτές των υποπλαστικών ΜΔΣ (MDS-h) και αυτών με ίνωση (MDS-f), υπότυποι οι οποίοι υπογραμμίζουν τη σημασία της βιοψίας μυελού των οστών κατά την αρχική διάγνωση της νόσου.

Στους υποτύπους που προκύπτουν κατόπιν ιστολογικών εξετάσεων, προκύπτει η ταξινόμηση ΜΔΣ με μειωμένο αριθμό βλαστών (MDS-LB) και ΜΔΣ με αυξημένο αριθμό βλαστών (MDS-IB).

Πίνακας 2. Ταξινόμηση ΜΔΣ κατά WHO 2008

Υπότυπος	Περιφερικό Αίμα	Μυελός των οστών
Ανθεκτική κυτταροπενία με μονογραμμική δυσπλασία (RCUD) Ανθεκτική Αναιμία (RA) Ανθεκτική ουδετεροπενία (RN) Ανθεκτική θρομβοπενία (RT)	Μία ή δύο κυτταροπενίες 0-1% βλάστες	Μονογραμμική δυσπλασία Δυσπλασία στο $\geq 10\%$ των κυττάρων <5% βλάστες <15% Δακτυλιοειδείς σιδηροβλάστες
Ανθεκτική αναιμία με δακτυλιοειδείς σιδηροβλάστες (RARS)	Αναιμία 0% βλάστες	Δυσπλασία ερυθράς σειράς μόνο $\geq 15\%$ Δακτυλιοειδείς σιδηροβλάστες
Ανθεκτική αναιμία με περίσσεια βλαστών-1 (RAEB-I)	Κυτταροπενίες <5% βλάστες Όχι ραβδία Auer Μονοκύτταρα <1X109/l	Μονογραμμική ή πολυγραμμική δυσπλασία 5-9% βλάστες Όχι ραβδία Auer
Ανθεκτική αναιμία με περίσσεια βλαστών-2 (RAEB-II)	Κυτταροπενίες 5-19% βλάστες Ραβδία Auer \pm Μονοκύτταρα <1X109/l	Μονογραμμική ή πολυγραμμική δυσπλασία 10-19% βλάστες Ραβδία Auer \pm
Αταξινόμητο ΜΔΣ (MDS-U)	Κυτταροπενίες $\leq 1\%$ βλάστες	Δυσπλασία στο <10% των κυττάρων αλλά τυπική κυτταρογενετική ανωμαλία RCUD/RCMD με 1% βλάστες στο περιφερικό αίμα RCUD με παγκυτταροπενία
ΜΔΣ σχετιζόμενο με μεμονωμένη ανωμαλία del(5q)	Αναιμία Φυσιολογικά ή αυξημένα αιμοπετάλια 0-1% βλάστες	Φυσιολογικά ή αυξημένα μεγακαρυοκύτταρα με υπολοβιωμένους πυρήνες <5% βλάστες Μεμονωμένη κυτταρογενετική ανωμαλία del(5q) Όχι ραβδία Auer

Εικόνα 1. Σύγκριση αναθεωρημένων εκδόσεων WHO 2016 και 2022. [18]



Η επιτροπή Διεθνούς Συναινετικής Ταξινόμησης (International Consensus Classification, ICC) των μυελικών νεοπλασμάτων και της οξείας λευχαιμίας προχώρησε σε ανανέωση της ταξινόμησης των ΜΔΣ το Σεπτέμβριο του 2022, θέτοντας τη νόσο σε μια ευρύτερη ομάδα κλωνικών κυτταροπενιών απροσδιόριστης σημασίας (clonal cytopenia of undetermined significance, CCUS). [21] Βάσει της νέας ταξινόμησης η μορφολογική δυσπλασία παραμένει το κύριο χαρακτηριστικό διάκρισης των ΜΔΣ από άλλες κλωνικές κυτταροπενίες. Οι μεταλλάξεις *SF3B1* και *TP53* θεωρούνται ενδεικτικές παθολογικής κατάστασης σε έναν κυτταροπενικό ασθενή. Η κατηγορία του ΜΔΣ με μεταλλαγμένο *SF3B1* (που περιλαμβάνει τις περιπτώσεις που ταξινομούσαν ως ΜΔΣ με δακτυλιοειδείς σιδηροβλάστες) και η κατηγορία του ΜΔΣ με μεταλλαγμένο *TP53* εισήχθησαν ως δύο νέες γενετικά καθορισμένες κατηγορίες ταξινόμησης και η κατηγορία του αταξινομήτου υποτύπου MDS (MDS-U) καταργήθηκε. [22] Η 5η αναθεώρηση WHO επιμένει στον επίσημο ορισμό της «κλωνικής αιμοποίησης απροσδιόριστου δυναμικού» (CHIP). Επιπλέον, η ασυμφωνία επεκτείνεται και ως προς το ελάχιστο ποσοστό βλαστών που ορίζουν την ΟΜΛ με καθοριστικές γενετικές ανωμαλίες (ελάχιστο 10% για το ICC, όχι συγκεκριμένο % για WHO) με το ICC να προχωράει στη δημιουργία μιας νέας κατηγορίας αυτής της ΜΔΣ/ΟΜΛ με 10%-19% βλάστες και εξάλειψη της κατηγορίας MDS-IB2. [23]

1.2.2 Προγνωστικά Συστήματα

Πέρα από τα συστήματα ταξινόμησης, η έρευνα γύρω από τα ΜΔΣ πολύ νωρίς στράφηκε στην εύρεση προγνωστικών παραγόντων καθώς η πορεία της νόσου μπορεί να είναι εξαιρετικά ετερογενής. Τα προγνωστικά συστήματα αξιοποιούνται για την αξιολόγηση της νόσου καθώς και την απόφαση έναρξης θεραπείας. Το πρώτο διεθνές προγνωστικό σύστημα (International Prognostic Scoring System, IPSS) για τα ΜΔΣ δημοσιεύτηκε το 1997 και βασιζόταν κυρίως στην ταξινόμηση κατά FAB. [24] Το IPSS βοηθάει στην ταξινόμηση των ΜΔΣ ασθενών σε τέσσερις κατηγορίες κινδύνου. Εφαρμόζεται και στην WHO ταξινόμηση, χρησιμοποιείται ευρέως στην κλινική πράξη και διαχωρίζει τους ασθενείς σε τέσσερις κατηγορίες κινδύνου λαμβάνοντας υπόψη τις κυτταροπενίες, τα κυτταρογενετικά δεδομένα καθώς και το ποσοστό των βλαστών. (Πίνακας 3.)

Πίνακας 3. Το προγνωστικό σύστημα IPSS

	Βαθμός					IPSS κατηγορίες	Βαθμός
	0	0.5	1	1.5	2	Χαμηλού	0
Βλάστες %	<5	5-10		11-20	21-30	Ενδιάμεσου I	0.5-1
Κυτταροπενίες	0-1	2-3				Ενδιάμεσου II	1.5-2.0
Καρυότυπος	Ευνοϊκός	Ενδιάμεσος	Δυσμενής			Υψηλού	2.5-3.5

Το 2012 δημοσιεύτηκε η αναθεωρημένη έκδοση του προγνωστικού συστήματος IPSS (Revised International Prognostic Scoring System/IPSS-R) όπου διατηρήθηκαν οι παράμετροι που αξιοποιούσε το προηγούμενο σύστημα αυξάνοντας τις κατηγορίες κινδύνου σε πέντε όπως συνοψίζονται στον πίνακα 4 αξιολογώντας κλινικοεργαστηριακές πληροφορίες όπως το βάθος των κυτταροπενιών, που εμφανίζουν προγνωστική αξία. [25]

Πίνακας 4. Το προγνωστικό σύστημα IPSS-R

	Βαθμός							IPSS-R κατηγορίες	Βαθμός
	0	0.5	1	1.5	2	3	4		
								Πολύ χαμηλού	0-1.5
Βλάστες %	≤2	5-10	2-5		5-10	>10		Χαμηλού	1.5-3.0
Αιμοσφαιρίνη (g/dL)	≥10	2-3	8-10	<8				Ενδιάμεσου	3.5-4.5
Αιμοπετάλια (x10³/mm³)	≥100	50-100	<50					Υψηλού	4.5-6.0
Ουδετερόφιλα (x100/mm³)	≥0.8	<0.8						Πολύ υψηλού	>6.0
Καρυότυπος	Πολύ καλός		Καλός		Ενδιάμεσος	Κακός	Πολύ κακός		

Το 2007 δημοσιεύτηκε και ένα προγνωστικό σύστημα που βασιζόταν εξ'ολοκλήρου στην WHO ταξινόμηση (WPSS) όπως συνοψίζεται στον πίνακα 5, χωρίς ωστόσο να καταφέρει να αντικαταστήσει την αξία του συστήματος IPSS στην καθημερινή κλινική πράξη ίσως λόγω της χρήσης υποκειμενικών κριτηρίων για την κατάταξη των ασθενών. [26] Τέλος, το 2022 δημοσιεύτηκε ένα προγνωστικό σύστημα βασισμένο στη κλινική σημασία των μεταλλάξεων [Molecular International Prognostic System (IPSS-M)], το οποίο λαμβάνει υπόψιν μεταλλάξεις σε 31 γονίδια. [27] Τονίζεται ιδιαίτερα η σημασία των αλλαγών στα γονίδια FLT3 (TKD ή ITD) και KMT2A-PTD (MLLPTD) οι οποίες αν και πολύ σπάνιες, έχουν εξαιρετικά δυσμενή επίδραση στην πρόγνωση. Για το TP53, η παρουσία δύο ή περισσότερων μεταλλάξεων, μιας μετάλλαξης και μιας διαγραφής (del(17p)) ή μιας μετάλλαξης με ουδέτερη απώλεια ετεροζυγωτίας έχουν σημαντικό ρόλο. Σχετικά με το SF3B1, η θετική προγνωστική σημασία χάνεται, εάν συνυπάρχει με del(5q) ή με μετάλλαξη σε ένα από τα ακόλουθα γονίδια: BCOR, BCORL1, NRAS, RUNX1, SRSF2 ή STAG2. [27]

Πίνακας 5. Το Προγνωστικό Σύστημα WPSS

	Τιμή				WPSS κατηγορίες	
	0	1	2	3	Πολύ χαμηλού	0
WHO κατηγορία	RA, RARS, 5q	RCMD, RCMD-RS	RAEB-I	RAEB-II	Χαμηλού	1
Καρυότυπος	Ευνοϊκός	Ενδιάμεσος	Δυσμενής		Ενδιάμεσου	2
Ανάγκη μεταγγίσεων	Όχι	Τακτική			Υψηλού	3-4
					Πολύ υψηλού	5-6

1.3 Παθοφυσιολογία των Μυελοδυσπλαστικών Νεοπλασμάτων

Τα ΜΔΣ αποτελούν όπως αναφέρθηκε μια ομάδα νοσημάτων με μεγάλη ετερογένεια στα χαρακτηριστικά τους. Το παθοβιολογικό τους υπόβαθρο αντανακλώντας αυτήν την ετερογένεια είναι αρκετά πολύπλοκο και περιλαμβάνει μια σειρά από μηχανισμούς όπως είναι η απόπτωση, η διαφοροποίηση των αρχέγονων κυττάρων, γενετικοί όσο και επιγενετικοί μηχανισμοί, αλλά και μηχανισμοί που αφορούν το ανοσοποιητικό σύστημα. [28, 29] Οι ασθενείς ΜΔΣ παρουσιάζουν συμπτώματα που σχετίζονται με κυτταροπενίες, κόπωση λόγω αναιμίας, λοιμώξεις λόγω ουδετεροπενίας, πετέχειες και άλλες βλεννογόνιες αιμορραγίες λόγω θρομβοπενίας. [30]

1.3.1 Το γενετικό υπόβαθρο των ΜΔΣ

Πληθώρα μεταλλάξεων έχει βρεθεί ότι συμμετέχει στην παθοβιολογία των ΜΔΣ. Οι πρόσφατες εξελίξεις στη μοριακή διάγνωση έχουν βελτιώσει την κατανόηση της παθοφυσιολογίας των ΜΔΣ μέσω της ανίχνευσης κυτταρογενετικών ανωμαλιών και μεταλλάξεων. Κυτταρογενετικές ανωμαλίες αναφέρονται περίπου στους μισούς ασθενείς ΜΔΣ, με την πιο κοινή κυτταρογενετική βλάβη να είναι η απώλεια στο 5q [del(5q)], ενώ υπολογίζεται ότι περίπου το 89% των ασθενών εμφανίζουν ογκογόνες μεταλλάξεις στο γονιδίωμα τους. [31] Πολλαπλές μεταλλάξεις γονιδίων έχουν βρεθεί σε ασθενείς ΜΔΣ, συμπεριλαμβανομένων γονιδίων υπεύθυνων για τη μεθυλίωση του DNA (*TET2*, *DNMT3A*, *IDH1/2*), το μάτισμα του πρόδρομου RNA (*SF3B1*, *SRSF*, *ZRSR2*, *U2AF1*, *U2AF2*, *SF1*, *PRPF8*, *LUC7L2*, *DDX41*), την τροποποίηση της χρωματίνης (*ASXL1*, *EZH2*, *KMT2*, *SUZ12*, *JARID2*,

KDM6A, PHF6, EED, EP300), τη μεταγωγή σήματος (*FLT3, JAK2, MPL, GNAS, KIT, CALR, CSF3R, NOTCH1/2, KRAS, NRAS, CBL, NF1, PTPN11*), την κωδικοποίηση μεταγραφικών παραγόντων (*TP53, PPM1D, RUNX1, ETV1, GATA2, ETV6, CUX1, IRF1, CEBPA, BCOR, LAMB4*), το σύμπλοκο κοχεσίνης (*STAG2, CTCF, SMC1A, RAD21, SMC3*), την επιδιόρθωση του DNA (*ATM, BRCC3, DLRE1C, FANCA-L, BRCA2, RAD21*). [32, 33, 34] Επιπλέον, συγκεκριμένες μεταλλάξεις έχουν συνδεθεί με ορισμένους φαινοτύπους, όπως η μετάλλαξη στο γονίδιο *SF3B1* η οποία έχει συνδεθεί με τον υπότυπο MDS-SF3B1 [35, 36, 37] Αρκετές γονιδιακές μεταλλάξεις σε γονίδια όπως *TP53, EZH2, ETV6, RUNX1* και *ASXL1* σχετίζονται με δυσμενή πρόγνωση. [38] Το προφίλ των μεταλλάξεων των ασθενών μπορεί να βοηθήσει στην ταχύτερη εκτίμηση και τη γρήγορη κατηγοριοποίηση του κινδύνου και στον εντοπισμό κατάλληλων θεραπειών, συμπεριλαμβανομένων και στοχευμένων θεραπειών. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι το προφίλ μετάλλαξης ενός ασθενούς συνήθως αλλάζει από τη στιγμή της αρχικής διάγνωσης μετά από χημειοθεραπεία ή μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων. Αξίζει να σημειωθεί ότι το φάσμα των μεταλλάξεων που παρατηρούνται στα ΜΔΣ επικαλύπτεται σημαντικά με μεταλλάξεις που εμφανίζονται σε άλλες καταστάσεις που σχετίζονται με τα ΜΔΣ, όπως η κλωνική αιμοποίηση απροσδιόριστου δυναμικού (CHIP), οι κλωνικές κυτταροπενίες απροσδιόριστης σημασίας (CCUS) και η εξέλιξη σε ΟΜΛ. Τα γενετικά αίτια των ΜΔΣ φαίνεται να είναι ποικίλα, καθώς κανένα μεταλλαγμένο γονίδιο δεν βρίσκεται σε περισσότερο από το ένα τρίτο των ασθενών με ΜΔΣ. [39]

1.3.2 Το επιγενετικό υπόβαθρο των ΜΔΣ

Επιγενετικές αλλαγές ονομάζονται εκείνες οι αλλαγές που τροποποιούν την γονιδιακή έκφραση χωρίς ωστόσο να αλλάζει η ακολουθία του DNA. [40] Η μεθυλίωση των υποκινητών αποτελεί έναν τέτοιο φυσιολογικό μηχανισμό αποσιώπησης γονιδίων. [41] Σε διάφορες μορφές καρκίνου ο μηχανισμός αυτός είναι απορρυθμισμένος, με πολλά ογκοκατασταλτικά γονίδια να είναι υπερμεθυλιωμένα και άρα αποσιωπημένα. [42] Στα ΜΔΣ ανευρίσκονται υπερμεθυλιωμένα γονίδια και μάλιστα έχει αναφερθεί πως αυτά αυξάνονται καθώς εξελίσσεται η νόσος. [43] Τα γονίδια αυτά επηρεάζουν διάφορες κυτταρικές λειτουργίες όπως είναι οι ογκοκατασταλτικοί μηχανισμοί, [44] ο κυτταρικός κύκλος, η απόπτωση, η επιδιόρθωση του DNA [45] και η σηματοδότηση μέσω των μονοπατιών WNT και MAPK. [46] Επιπλέον ένας από τους ρυθμιστές μεταβολισμού της 5-αζακυτιδίνης, το γονίδιο *RRM1* έχει βρεθεί να έχει μεθυλιωμένο υποκινητή σε ασθενείς με ΜΔΣ οι οποίοι ανταποκρίνονται στη θεραπεία με 5-αζακυτιδίνη. [47]

1.4 Θεραπευτικές προσεγγίσεις

Η θεραπευτική προσέγγιση των ασθενών με ΜΔΣ αποσκοπεί τόσο στη βελτίωση των τιμών των αιματολογικών εξετάσεων του περιφερικού αίματος (δηλαδή αύξηση των επιπέδων της αιμοσφαιρίνης, μείωση της αιμορραγίας και των λοιμώξεων), όσο και στη βελτίωση της συνολικής πορείας της νόσου. Η επιλογή της θεραπείας για νεοδιαγνωσμένο ή ανθεκτικό υπότυπο εξαρτάται από τη διαστρωμάτωση κινδύνου, τη φυσική κατάσταση

(συμπεριλαμβανομένων των συννοσηροτήτων) και την καταλληλότητα του ασθενούς για αλλογενή μεταμόσχευση. [48] Η κατηγοριοποίηση των ασθενών σε υψηλότερου και χαμηλότερου κινδύνου ΜΔΣ με βάση τα IPSS και IPSS-R καθορίζει τη θεραπευτική προσέγγιση που εφαρμόζεται. Επί του παρόντος, για τους ασθενείς υψηλότερου κινδύνου τρεις φαρμακευτικές ουσίες είναι εγκεκριμένες από τον FDA για τη θεραπεία της νόσου: αζακυτιδίνη, δεσιταβίνη και λεναλιδομίδη. Η καθεμία φαρμακευτική ουσία εγκρίθηκε κατόπιν ελέγχου της αποτελεσματικότητας της δράσης τους στη μείωση των απαιτήσεων μετάγγισης, καθυστέρηση εξέλιξης σε ΟΜΛ, στη βελτίωση της ποιότητας ζωής και της συνολικής επιβίωσης (overall survival, OS). Οι θεραπευτικές επιλογές για τους ασθενείς χαμηλότερου κινδύνου περιλαμβάνουν μεταγγίσεις ερυθρών αιμοσφαιρίων, εξωγενή χορήγηση ερυθροποιητίνης σε ασθενείς μη μεταγγισιοεξαρτώμενους, G-CSF (Granulocyte Colony Stimulating Factor) σε ασθενείς με ουδετεροπενία και θεραπεία με λεναλιδομίδη η οποία είναι αποτελεσματική σε ασθενείς με χαμηλό αριθμό χρωμοσώματος 5q και μπορεί να μειώσει τις μεταγγισιοεξαρτώμενες ανάγκες και να βελτιώσει την αιματολογική κατάσταση. Επιπλέον, το 2020 εγκρίθηκε η λουспаτεрсέπτη (ένας παράγοντας ωρίμανσης των ερυθρών αιμοσφαιρίων, μια ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη που δεσμεύει επιλεγμένους συνδέτες της οικογένειας του αυξητικού παράγοντα-β (TGF-β). Με δέσμευση σε συγκεκριμένους ενδογενείς συνδέτες (π.χ. GDF11, ακτιβίνη Β), η λουспаτεрсέпτη αναστέλλει το μονοπάτι Smad2/3, με αποτέλεσμα την ωρίμανση των ερυθροκυττάρων μέσω της διαφοροποίησης των ερυθροειδών βλαστοκυττάρων. Η λουспаτεрсέпτη εγκρίθηκε για ασθενείς χαμηλού κινδύνου ΜΔΣ με αναιμία και δακτυλιοειδείς σιδηροβλάστες, οι οποίοι

εμφάνισαν ανθεκτικότητα σε παράγοντες διέγερσης της ερυθροποίησης και υποβάλλονται σε συχνές μεταγγίσεις. [49]

1.4.1 Επιγενετική θεραπεία στα Υψηλότερου Κινδύνου Μυελοδυσπλαστικά Νεοπλάσματα

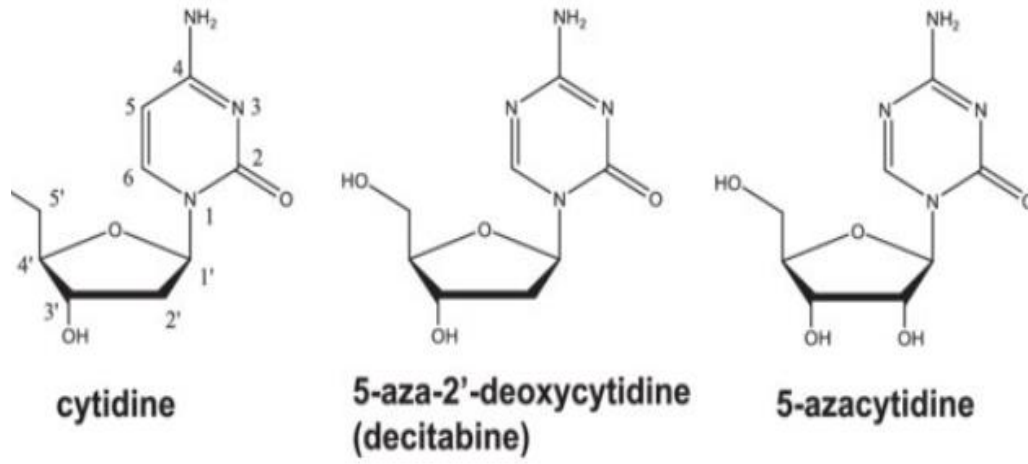
Στα υψηλότερου κινδύνου ΜΔΣ όπως αυτά ορίζονται από το IPSS οι συμβατικές θεραπείες έχουν πτωχά αποτελέσματα με διάμεση επιβίωση λιγότερο από ένα έτος αλλά και χαμηλή ποιότητα ζωής. Θεραπεία επιλογής αποτελεί η επιγενετική θεραπεία και πιο συγκεκριμένα οι υπομεθυλιωτικοί παράγοντες (ΥΜΠ) που οδηγούν σε παράταση επιβίωσης και επιβράδυνση της εξέλιξης σε ΟΜΛ. [50] Οι ΥΜΠ παράγοντες δρουν αναστέλλοντας τη δραστηριότητα ενζύμων που ονομάζονται μεθυλτρανσφεράσες του DNA (DNMTs), τα οποία εμπλέκονται στην προσθήκη μεθυλομάδων στο DNA. [51] Η μεθυλίωση του DNA μπορεί να οδηγήσει στη σίγαση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων, τα οποία μπορούν να συμβάλουν στην ανάπτυξη νεοπλασιών. Τα δεδομένα από την έγκυρη πηγή στατιστικών για τον καρκίνο στις ΗΠΑ, Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER), έδειξαν ότι οι ασθενείς με ΜΔΣ στις ΗΠΑ έχουν μικρότερη και χαμηλότερης ποιότητας πενταετή συνολική επιβίωση (OS) κατά 31,3% σε σύγκριση με ασθενείς με άλλου τύπου καρκίνο (π.χ. προστάτη (84,3%), μαστού (81,5%), μη-Hodgkin λέμφωμα (61,6%), χρόνια μυελογενής λευχαιμία (57,8%) και πολλαπλό μυέλωμα (40,7%). [52] Ο μηχανισμός τόσο της πρωτογενούς όσο και της δευτερογενούς αντίστασης παραμένει εν πολλοίς άγνωστος. [53] Για ασθενείς με ΥΚ-ΜΔΣ ως κύρια προτεραιότητα της θεραπείας τίθεται η καθυστέρηση της εξέλιξης της

νόσου, βελτιώνοντας τη συνολική επιβίωση και επιτρέποντας χρονικά τη μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων για πιθανή επίτευξη ίασης. Πριν από την έναρξη της θεραπείας, οι ασθενείς αξιολογούνται ως προς την καταλληλότητα για μεταμόσχευση, συμπεριλαμβανομένης της ηλικίας και των συννοσηροτήτων που χαρακτηρίζουν τον ασθενή. [54] Όλοι οι ασθενείς, ανεξαρτήτως κινδύνου, θα πρέπει να λαμβάνουν υποστηρικτική φροντίδα, που περιλαμβάνει μεταγγίσεις ερυθρών αιμοσφαιρίων για αντιμετώπιση συμπτωματικής αναιμίας ή μεταγγίσεις αιμοπεταλίων για την αντιμετώπιση πιθανών αιμορραγικών επεισοδίων, αντιβιοτικά για βακτηριακές λοιμώξεις και χηλικά σύμπλοκα δέσμησης σιδήρου για την αντιμετώπιση της υπερφόρτωσης σιδήρου λόγω των μεταγγίσεων. [55] Σε ΥΚ-ΜΔΣ, η χηλική θεραπεία του σιδήρου συνιστάται κατά προτίμηση για εκείνους που ανταποκρίνονται σε θεραπεία με ΥΜΠ ή έχουν προγραμματισμένη μεταμόσχευση. [56]

1.4.2 Μηχανισμός δράσης υπομεθυλιωτικών παραγόντων

Τα γονίδια που βρίσκονται επιγενετικά απορρυθμισμένα σε νεοπλασματικές παθήσεις αφορούν πληθώρα κυτταρικών μηχανισμών όπως είναι ο έλεγχος του κυτταρικού κύκλου, η απόπτωση, η ανοσολογική αναγνώριση η αγγειογένεση ακόμα και η διαφυγή των καρκινικών κυττάρων και η μετάσταση. Σε αντίθεση με τις δομικές αλλαγές του γονιδιώματος που οδηγούν σε μόνιμη απώλεια της γονιδιακής έκφρασης, οι επιγενετικές αλλαγές μπορούν να αναστραφούν φαρμακολογικά, με αποτέλεσμα την γονιδιακή επανέκφραση και αποκατάσταση των φυσιολογικών κυτταρικών λειτουργιών. [57] Έτσι, η δράση των επιγενετικών φαρμάκων και των ΥΜΠ είναι πλειοτροπική καθώς θα μπορούσαν δυνητικά να επηρεάσουν όλες τις παραπάνω διαδικασίες επηρεάζοντας συνολικά την βιολογία και το δυναμικό των νεοπλασματικών και όχι μόνο, κυττάρων [58] Ο ΥΜΠ που χρησιμοποιείται ευρέως ως θεραπευτική προσέγγιση στα ΥΚ-ΜΔΣ είναι η 5-αζακυτιδίνη. Πρόκειται για ένα ανάλογο κυτιδίνης στο οποίο ο C στη θέση 5' στον δακτύλιο πυριμιδίνης έχει αντικατασταθεί από ένα άτομο αζώτου (Εικόνα 2).

Εικόνα 2. Χημικές δομές κυτιδίνης-δεσιταβίνης και 5-αζακυτιδίνης [59]



Αρχικά, προορίζονταν για κυτταροτοξικό φάρμακο. Ωστόσο, η χορήγηση του σε χαμηλή δόση έδειξε τη δυνατότητα απομεθυλίωσης του DNA με αδρανοποίηση της DNMT-1. [60] Μετά την κυτταρική πρόσληψη, η αζακυτιδίνη μετατρέπεται κυρίως σε τριφωσφορική αζακυτιδίνη, η οποία ενσωματώνεται στο RNA. Ένα μικρότερο ποσοστό της χορηγούμενης αζακυτιδίνης, περίπου 10%-20%, μετατρέπεται σε τριφωσφορική 5-αζα-2-δεοξυκυτιδίνη μέσω του ενζύμου ριβονουκλεοτιδική αναγωγή και είναι διαθέσιμη για ενσωμάτωση στο DNA. Σε υψηλές δόσεις, το DNA δεν είναι σε θέση να επανέλθει στην πρότερη κατάσταση και επέρχεται κυτταρικός θάνατος. Ωστόσο, σε χαμηλότερες δόσεις τα σχηματιζόμενα σύμπλοκα αποδομούνται από το πρωτεόσωμα, με αποτέλεσμα την αποκατάσταση του DNA. [61] Παρόλη την ευρεία χρήση της και 15 χρόνια μετά την πρώτη έγκριση της, ο μηχανισμός δράσης παραμένει ασαφής καθώς δεν είναι γνωστός ούτε ο κυτταρικός τύπος ούτε το μοριακό επίπεδο στο οποίο δρα. [62] Η μη σύνδεση του βαθμού υπομεθυλίωσης με την απόκριση των ασθενών [63] οδήγησε στην ανεύρεση εναλλακτικού τρόπου δράσης όπως η άμεση κυτταροτοξικότητα μέσω αναστολής της πρωτεϊνοσύνθεσης [64] ενώ τα τελευταία χρόνια αναγνωρίζεται ιδιαίτερα ο ανοσορρυθμιστικός της ρόλος [65] με τα δεδομένα ωστόσο να είναι ασαφή. Από τη μία, σε *in vitro* και *in vivo* μελέτες έχει δειχθεί ότι η 5-αζακυτιδίνη αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό και την ενεργοποίηση των CD4+ T λεμφοκυττάρων αναστέλλοντας τον κυτταρικό κύκλο [66], ενώ ταυτόχρονα αυξάνει τα T ρυθμιστικά (Tregs) λεμφοκύτταρα [67]. Η 5-αζακυτιδίνη επηρεάζει πόλωση των T κυττάρων σε *in vitro* πειράματα, ενώ *in vivo* φαίνεται να επηρεάζει κυρίως τον άξονα των Thelper17/Tregs λεμφοκυττάρων μειώνοντας

τα πρώτα [68]. Επιπλέον, η 5-αζακυτιδίνη φαίνεται να απομεθυλιώνει το γονίδιο για το ανοσοκατασταλτικό μόριο programmed cell death 1 (PD1) στα T λεμφοκύτταρα σε ασθενείς με ΜΔΣ γεγονός που συσχετίστηκε με χειρότερη πρόγνωση της νόσου [69]. Από την άλλη, οι ΥΜΠ και η 5-αζακυτιδίνη πιο συγκεκριμένα έχειδειχθεί ότι αυξάνουν την ανοσογονικότητα των νεοπλασματικών κυττάρων [70] και ενεργοποιούν την μεσολαβούμενη από τα T κύτταρα λύση τους. Τα τελευταία χρόνια είχε προταθεί η θεωρία πως η 5-αζακυτιδίνη αυξάνει την ανοσογονικότητα των νεοπλασματικών κυττάρων αυξάνοντας τη μεταγραφή των ενδογενών ρετροϊών και μέσω αυτών ενεργοποιείται το μονοπάτι της ιντερφερόνης και η ανοσολογική απόκριση [71]. Έχειδειχθεί πως ασθενείς που φέρουν μετάλλαξη στο γονίδιο *TET2* έχουν υψηλότερα ποσοστά απόκρισης στην θεραπεία αν και η διάρκεια της απόκρισης και η επιβίωση δεν διαφέρει σημαντικά από τους ασθενείς με το γονίδιο αγρίου τύπου. [72] Ανεξάρτητα από την ύπαρξη μεταλλάξεων σε άλλη μελέτη, η γονιδιακή έκφραση εμφάνιζε διαφορετικά πρότυπα σε αποκρινόμενους και μη αποκρινόμενους ασθενείς, με τους αποκρινόμενους να υπερεκφράζουν γονίδια που σχετίζονται με τον κυτταρικό κύκλο. [73]

Αρκετές αναφορές έχουν επικεντρωθεί στην πρόβλεψη της ανταπόκρισης. Για ασθενείς με ΥΚ-ΜΔΣ παράγοντες όπως είναι ο φυσιολογικός καρυότυπος, το ποσοστό βλαστών του μυελού των οστών και η απουσία προηγούμενης έκθεσης σε χημειοθεραπεία συσχετίστηκαν με καλύτερη απόκριση σε θεραπεία με υπομεθυλιωτικούς παράγοντες. Ο διπλασιασμός του αριθμού των αιμοπεταλίων μετά τον πρώτο κύκλο χορήγησης αζακυτιδίνης βρέθηκε ότι προβλέπει μεγαλύτερη ολική επιβίωση για τους ασθενείς με ΜΔΣ, ΧΜΜΛ ή ΟΜΛ. Ωστόσο, είναι σημαντικό να βελτιωθεί περαιτέρω η ανεύρεση

προγνωστικών παραγόντων απόκρισης σε θεραπεία με ΥΜΠ. Οι μεταλλάξεις στα γονίδια *TET2*, *DNMT3* και *ASXL1* σχετίζονται με καλύτερη ανταπόκριση των ασθενών με ΥΚ-ΜΔΣ στη θεραπεία με 5-αζακυτιδίνη. Ωστόσο, αυτοί οι γενετικοί παράγοντες δεν έχουν ακόμη σαφώς συσχετιστεί με διαφορές στην συνολική επιβίωση των ασθενών. [74, 75, 76]

1.4.3 Μεταβολισμός της 5-αζακυτιδίνης

Το νουκλεοσιδικό ανάλογο (NA) 5-αζακυτιδίνη μιμείται τη φυσιολογική κυτιδίνη όσον αφορά στην πρόσληψη και την ενεργοποίηση της, ώστε να επιτευχθεί η φαρμακολογική της δράση. Η μεταφορά των NA όπως η 5-αζακυτιδίνη διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης πραγματοποιείται με τη συμβολή πρωτεϊνών-μεταφορέων. [77, 78] Με βάση δεδομένα *in vitro*, ο μεταβολισμός της 5-αζακυτιδίνης δεν φαίνεται να μεσολαβείται από ισοένζυμα του κυτοχρώματος P450 (CYPs), UDP-τρανσφεράσες του γλυκουρονικού οξέος (UGTs), σουλφοτρανσφεράσες (SULTs) και τρανσφεράσες της γλουταθειόνης (GSTs). Συνεπώς, αλληλεπιδράσεις που σχετίζονται με αυτά τα ένζυμα μεταβολισμού *in vivo* θεωρούνται απίθανες. Κλινικά σημαντικές ανασταλτικές ή επαγωγικές δράσεις της αζακυτιδίνης στα ένζυμα του κυτοχρώματος P450 είναι απίθανες. Στο εσωτερικό των κυτάρων η 5-αζακυτιδίνη ενεργοποιείται από το ένζυμο κινάση ουριδίνης-κυτιδίνης (UCK), το οποίο αποτελείται από δύο υπομονάδες, τις UCK1 και UCK2. [79, 80]. Η UCK1 καταλύει την αρχική φωσφορυλίωση της 5-αζακυτιδίνης σε μονοφωσφορική 5-αζακυτιδίνη (5-aza-UMP), η οποία φωσφορυλιώνεται περαιτέρω σε 5-aza-UDP και 5-aza-UTP, οι οποίες μπορούν να ενσωματωθούν στο RNA. Περίπου το 80%-90% της

ενεργοποιημένης αζακυτιδίνης ενσωματώνεται στο RNA οδηγώντας στην παραγωγή mRNA και τη διαταραχή του μεταβολισμού των πρωτεϊνών. [81, 82] Για την ενσωμάτωση στο DNA, μετατρέπεται σε 5-aza-dCTP μέσω της ριβονουκλεοτιδικής αναγωγής και περαιτέρω φωσφορυλίωσης. Περίπου 10%-20% της ενεργοποιημένης 5-αζακυτιδίνης μετατρέπεται σε δεσιταβίνη μέσω της ριβονουκλεοτιδικής αναγωγής και ενσωματώνεται στο νεοσυντιθέμενο DNA, οδηγώντας σε αναστολή της DNMT1 και τελικά υπομεθυλίωση του DNA. [82] Η υπομεθυλίωση του DNA μπορεί να επανεργοποιήσει αποσιωπημένα ογκοκατασταλτικά και ρυθμιστικά γονίδια, επάγωντας καταστολή του κυτταρικού κύκλου, διαφοροποίηση και απόπτωση.

1.4.4 Κλινικές επιπτώσεις της δράσης της UCK1

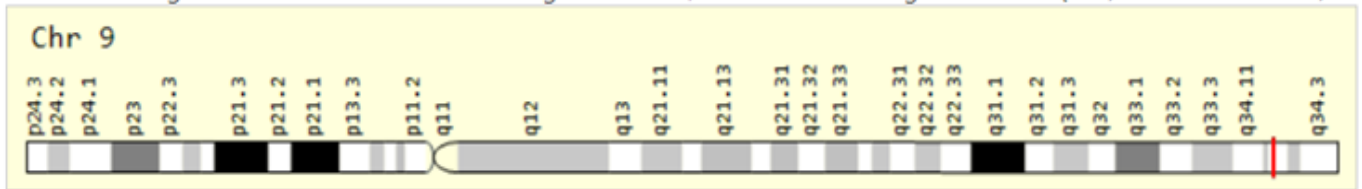
Υψηλή δραστηριότητα της UCK1 ενισχύει τη μετατροπή της 5-αζακυτιδίνης στις ενεργές μορφές της και οδηγεί σε αυξημένη ενσωμάτωση στο RNA και το DNA, ενισχύοντας έτσι την κυτταροτοξικότητα του φαρμάκου. Ασθενείς με υψηλότερη έκφραση της UCK1 μπορεί να έχουν καλύτερα κλινικά αποτελέσματα. Μελέτες έχουν δείξει πως υψηλά μεταγραφικά επίπεδα του *UCK1* συσχετίζονται με την ανταπόκριση και την παρατεταμένη ολική επιβίωση ασθενών με ΥΚ-ΜΔΣ. [83] Αυτό ενισχύει την ιδέα χρήσης του *UCK1* ως προγνωστικού βιοδείκτη της ανταπόκρισης στη θεραπεία με 5-αζακυτιδίνη. Αντίθετα, η μειωμένη δράση του ενζύμου έχει ως αποτέλεσμα την αναποτελεσματική φωσφορυλίωση της 5-αζακυτιδίνης, μειώνει τη θεραπευτική της αποτελεσματικότητα και μπορεί να οδηγήσει σε ανθεκτικότητα των νεοπλασματικών κυττάρων λόγω ανεπαρκούς ενεργοποίησης του φαρμάκου. [84, 85]

1.5 Γενετικό Υπόβαθρο

1.5.1 Γονίδιο κινάσης ουριδίνης-κυτιδίνης 1

Το γονίδιο *UCK1* βρίσκεται στο χρωμόσωμα 9 στη θέση 9q34.12, δηλαδή στο μακρύ βραχίονα (q) του χρωμοσώματος 9 στη θέση 34.12 και πιο συγκεκριμένα εκτείνεται μεταξύ των βάσεων 131,523,801 έως 131,531,264 του χρωμοσώματος (Εικόνα 3). [86] Είναι υπεύθυνο για την κωδικοποίηση της πρωτεΐνης UCK1, η οποία αποτελεί μία από τις δύο ταυτοποιημένες πρωτεΐνες της οικογενείας των κινασών ουριδίνης-κυτιδίνης (UCKs) μαζί με τη UCK2. Όπως αναφέρθηκε οι UCKs είναι ριβονουκλεοτιδικές κινάσες πυριμιδίνης οι οποίες καταλύουν τη φωσφορυλίωση της ουριδίνης και της κυτιδίνης στις μονοφωσφορικές μορφές της, UMP και CMP αντίστοιχα. [87, 88] Αυτό είναι το πρώτο βήμα στην οδό περίσωσης (διάσωσης) της πυριμιδίνης. Η UMP και η CMP φωσφορυλιώνονται περαιτέρω από την κινάση UMP-CMP και τις κινάσες διφωσφορικών νουκλεοσιδίων σε UTP και CTP αντίστοιχα. [89]

Εικόνα 3. Θέση γονιδίου UCK1 στο χρωμόσωμα 9



Η UCK1 είναι μία πρωτεΐνη 277 αμινοξέων με μοριακό βάρος 31 kDa και εκφράζεται καθολικά σε όλους τους υγιείς ιστούς. Η UCK2 είναι μία πρωτεΐνη 261 αμινοξέων με μοριακό βάρος 29 kDa και η έκφρασή της περιορίζεται στον ανθρώπινο πλακούντα και σε διάφορα νεοπλασματικά κύτταρα. [90] Οι ανθρώπινες UCK1 και UCK2 παρουσιάζουν 72% ομολογία αλληλουχίας. [90] Πολλοί από τους μηχανισμούς πρωτογενούς ανθεκτικότητας στα ΝΑ σχετίζονται με αλλαγές σε γονίδια που συμμετέχουν στο μεταβολισμό τους, όπως το *UCK1*. [90] Πιθανές μεταλλαγές ή/και αλλαγές στα επίπεδα έκφρασης των νουκλεοσιδικών ενεργοποιητών ή αδρανοποιητών έχουν συσχετιστεί με την ανταπόκριση ή μη των ασθενών σε θεραπεία με κυταραβίνη και με την ολική επιβίωση τους. [91, 92] Η διαφορική έκφραση του *UCK1* σε ΥΚ-ΜΔΣ όπως αυτή προκύπτει από τη διεθνή βιβλιογραφία μπορεί με τη σειρά της να οφείλεται στην ύπαρξη συγκεκριμένων γενετικών πολυμορφισμών (Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs). Συγκεκριμένα σε μελέτη στην οποία συμμετείχαν 42 ασθενείς με ΜΔΣ παραγματοποιήθηκε αλληλούχιση του γονιδίου *UCK1*. Μελετήθηκαν τέσσερις πολυμορφικοί τόποι οι οποίοι αντιστοιχούσαν σε γνωστούς SNPs, ένας από τους οποίους ανήκει σε κωδικοποιητική αλληλουχία του εξονίου 6 (rs2296957, Ala180Ser) και τρεις από αυτούς σε μη κωδικοποιές αλληλουχίες (rs3904960 στο ιντρόνιο 1, rs2296956 και rs189473964 στο ιντρόνιο 3). [85] Ωστόσο, δε φαίνεται να ισχύει το ίδιο για το *UCK2*. Παρόλο που θεωρητικά και τα δύο ένζυμα φωσφορυλιώνουν την 5-αζακυτιδίνη στο μονοφωσφορικό της ανάλογο, έχει προταθεί πως δρουν ανεξάρτητα και δεν επιδρούν το ίδιο στο μεταβολισμό του μορίου, με το *UCK2* να σχετίζεται αμελητέα με αυτόν. [85] Τα μεταγραφικά

επίπεδα του γονιδίου δεν παρουσιάζουν στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με παραμέτρους όπως η ανταπόκριση στη θεραπεία ή η ολική επιβίωση ασθενών με ΜΔΣ. [85, 86]. Για αυτό το λόγο στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας, το γονίδιο UCK2 δε μελετήθηκε περαιτέρω.

1.5.1.1. Γενετικός πολυμορφισμός rs2296957 του γονιδίου UCK1

Ο πολυμορφισμός rs2296957 εντοπίζεται στο έκτο εξόνιο του γονιδίου UCK1 και συγκεκριμένα στη θέση 9:131525948 στον κλώνο με κατεύθυνση 5'→3'. Εκεί πραγματοποιείται αντικατάσταση της κυτοσίνης C σε θυμίνη T (C>T). Στο σύνολο του γενικού πληθυσμού στην Ευρώπη το T νουκλεοτίδιο εμφανίζεται σε μεγαλύτερο ποσοστό. Ο πιο συχνός γονότυπος είναι ο ομόζυγος για το αλληλόμορφο T (T:T). Αμέσως μετά ακολουθεί ο ομόζυγος για το αλληλόμορφο C (C:C) και τέλος, ο λιγότερος συχνός είναι ο ετερόζυγος γονότυπος (T:C). Το αρχέγονο νουκλεοτίδιο είναι το C. [93] Ωστόσο, όπως αναφέρθηκε για τη συχνότητα των αλληλομόρφων, κατά τη διάρκεια της εξελικτικής διαδικασίας το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο επικράτησε και πλέον αποτελεί το φυσικό αλληλόμορφο. Η αντικατάσταση της κυτοσίνης από θυμίνη οδηγεί σε μία παρανοηματική μεταλλαγή που επηρεάζει το αμινοξύ στη θέση 180 της προκύπτουσας πρωτεΐνης. Συγκεκριμένα έχουμε αντικατάσταση της αλανίνης από σερίνη (Ala180Ser).

1.5.1.2 Γενετικός πολυμορφισμός rs3904960 του γονιδίου UCK1

Ο πολυμορφισμός rs3904960 βρίσκεται στο πρώτο ιντρόνιο του γονιδίου UCK1 και συγκεκριμένα στη θέση 9:131530744 στον κλώνο με κατεύθυνση 5'→3'. Εκεί πραγματοποιείται αντικατάσταση της αρχέγονης γουανίνης G σε θυμίνη T. Στο σύνολο του γενικού πληθυσμού στην Ευρώπη το T νουκλεοτίδιο

εμφανίζεται σε μεγαλύτερο ποσοστό. Ο πιο συχνός γονότυπος είναι ο ομόζυγος για το αλληλόμορφο T (T:T). Αμέσως μετά ακολουθεί ο ετερόζυγος γονότυπος G:T και τέλος ο λιγότερο συχνός είναι ομόζυγος για το αλληλόμορφο G γονότυπος (G:G). [94]

1.5.1.3 Γενετικός πολυμορφισμός rs2296956 του γονιδίου UCK1

Ο πολυμορφισμός rs2296956 βρίσκεται στο τρίτο ιντρόνιο του γονιδίου UCK1 και στη θέση 9:131529397 στον κλώνο με κατεύθυνση 5'→3'. Σε αυτήν την περίπτωση το αρχέγονο και φυσιολογικό αλληλόμορφο G, το οποίο εμφανίζεται σε μεγαλύτερο ποσοστό στον πληθυσμό αντικαθίσταται από το αλληλόμορφο C. Ο πιο συχνός γονότυπος είναι ο ετερόζυγος (C:G). Αμέσως μετά ακολουθεί ο ομόζυγος για το φυσιολογικό αλληλόμορφο G (G:G) και τέλος ο λιγότερος συχνός είναι ο ομόζυγος για το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο (C:C) [95]

1.5.1.4 Γενετικός πολυμορφισμός rs189473964 του γονιδίου UCK1

Ο πολυμορφισμός rs189473964 βρίσκεται στο τρίτο ιντρόνιο του γονιδίου UCK1 και στη θέση 9:131529283 στον κλώνο με κατεύθυνση 5'→3'. Σε αυτήν την περίπτωση το αρχέγονο και φυσιολογικό αλληλόμορφο C, το οποίο εμφανίζεται στο σύνολο σχεδόν του πληθυσμού αντικαθίσταται από το αλληλόμορφο T. Ο πιο συχνός γονότυπος είναι ο ομόζυγος (C:C) και αμέσως μετά ακολουθεί ο ετερόζυγος γονότυπος (C:T). Δεν υπάρχει αναφορά για εμφάνιση του ομόζυγου γονότυπου (T:T). Η αντικατάσταση αυτή της κυτοσίνης από θυμίνη φαίνεται να συμβαίνει σε περιοχή πολυπυριμιδίνης του ιντρονίου, χωρίς ωστόσο να είναι γνωστό αν ρυθμίζει διαδικασίες όπως το μάτισμα του RNA, η πολυαδενυλίωση και η ωρίμανση του 3' ακρου. [96]

Με δεδομένο το ότι το γονίδιο UCK1 έχει πρωταρχικό ρόλο στη βιομετατροπή της 5-αζακυτιδίνης, η μελέτη των πολυμορφισμών του κρίνεται απαραίτητη, καθώς μπορεί να επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα του μορίου, καθώς πιθανές διαφοροποιήσεις στη δραστικότητα του ενζύμου που οφείλονται στις ανωτέρω γενετικές παραλλαγές θα μπορούσαν να επηρεάσουν το ρυθμό μετατροπής της 5-αζακυτιδίνης στην ενεργό μορφή της.

1.6 Σκοπός

Σκοπός της παρούσας ερευνητικής εργασίας είναι η διερεύνηση της πιθανής συσχέτισης της ανταπόκρισης στη θεραπεία με 5-αζακυτιδίνη ασθενών με ΥΚ-ΜΔΣ με το γονότυπο τους μετά από σύγκριση των γονοτύπων των πολυμορφισμών rs2296957, rs189473964, rs3904960 και rs2296956 του γονιδίου UCK1, το οποίο εμπλέκεται στο μεταβολισμό του φαρμάκου μεταξύ ΥΚ-ΜΔΣ και ΧΚ-ΜΔΣ. Απώτερος σκοπός της σύγκρισης αυτής είναι η συσχέτιση αυτών των δεδομένων με κλινικά αποτελέσματα.

2. Υλικά και Μέθοδοι

Η συλλογή και επεξεργασία των δειγμάτων των ασθενών έλαβε χώρα στο Αιματολογικό τμήμα της Α Παθολογικής κλινικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, του Γενικού Νοσοκομείου Αθηνών Λαϊκό και οι αναλύσεις τους πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο της Ερευνητικής ομάδας της Κλινικής Φαρμακολογίας και Φαρμακογονιδιωματικής του Τμήματος Φαρμακευτικής της Σχολής Ειστημών Υγείας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, σε συνεργασία με το Ερευνητικό εργαστήριο της Α Παθολογικής Κλινικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, του Γενικού Νοσοκομείου Αθηνών Λαϊκό, την περίοδο μεταξύ Ιανουαρίου 2024 και Ιουνίου 2024.

2.1 Ασθενείς

Δείγματα μυελού των οστών συλλέχθηκαν από 54 ασθενείς με ΜΔΣ κατά τη διάγνωση της νόσου σύμφωνα με την κατάταξη του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας 2022. Πρόκειται για ασθενείς με διάγνωση ΥΚ-ΜΔΣ στους οποίους χορηγήθηκε 5-αζακυτιδίνη. Ασθενείς με διάγνωση ΧΚ-ΜΔΣ χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες “ομάδα ελέγχου”.

Οι ασθενείς ενημερώθηκαν για το σκοπό της μελέτης, το είδος του δείγματος και τη διαδικασία και τήρηση του απορρήτου μέσω ειδικού εντύπου συγκατάθεσης (Informed Consent, IC). Όλοι οι ασθενείς έδωσαν την έγγραφη συγκατάθεσή τους για να χρησιμοποιηθούν τα δημογραφικά, προσωπικά και γενετικά τους δεδομένα για τους σκοπούς της μελέτης κατόπιν ανωνυμοποίησης και αποταυτοποίησης των δειγμάτων τους. Τα δείγματα των

ασθενών φέρουν μόνο ένα μοναδικό αριθμό, ο οποίος δεν αναγράφεται στο IC έγγραφο και φυλάσσεται στο νοσοκομείο.

2.2 Μέθοδοι

2.2.1 Απομόνωση DNA

Για τη διαδικασία απομόνωσης του DNA συλλέχθηκαν από κάθε ασθενή 10 ml μυελού των οστών με αναρρόφηση μικρής ποσότητας με ηπαρινισμένη σύριγγα. Στη συνέχεια, τα δείγματα μεταφέρθηκαν στο ερευνητικό εργαστήριο της κλινικής, εντός μίας ώρας από τη λήψη, όπου ανωνυμοποιήθηκαν λαμβάνοντας νέο κωδικό.

Η αρχή μεθόδου απομόνωσης βασίζεται στην ειδική σύσταση των μεμβρανών (silica membrane technology). Με τη χρήση ειδικών ρυθμιστικών διαλυμάτων για έκπλυση και ρύθμιση του pH, κατάλληλων συγκεντρώσεων αλάτων και διαδοχικών φυγοκεντρήσεων, οι στήλες αυτές κατακρατούν από το κυτταρικό εκχύλισμα μόνο το DNA, το οποίο προσροφάται μέσω ενός ισχυρού σταδίου φυγοκέντρωσης στη μεμβράνη, ενώ οι πρωτεΐνες και οι λοιπές προσμίξεις αφήνονται να απομακρυνθούν από τη στήλη. Το DNA το οποίο λαμβάνεται εκλούεται σε ελαφρώς αλκαλικό διάλυμα (elution buffer) και είναι έτοιμο για χρήση. Το DNA φυλάσσεται στους -20°C μετά την απομόνωσή του και παραμένει εκεί μέχρι τη χρήση του.

Για την απομόνωση γενωμικού DNA από το μυελό των οστών ασθενών με ΜΔΣ, χρησιμοποιήθηκαν:

- Στήλες απομόνωσης νουκλεϊκών οξέων (Invitrogen PureLink™ Genomic Mini Kit, Thermo Fisher Scientific, USA).

- Λυτικό διάλυμα (PureLink Genomic Lysis/Binding Buffer)
- RNάση A (20 mg/mL)
- PureLink Genomic Digestion Buffer
- Διάλυμα έκπλυσης (Wash Buffer) 1
- Διάλυμα έκπλυσης (Wash Buffer) 2
- Διάλυμα έκλουσης (Elution Buffer)
- Πρωτεϊνάση K (20 mg/mL)
- Spin columns με σωλήνες περισυλλογής (Collection Tubes)
- Σωλήνες περισυλλογής (Collection Tubes)
- Πιπέτες ακριβείας 0,1-20 μ L, 10-100 μ L, 100-1000 μ L (Gilson, Γαλλία)
- Στόμια πιπετών μίας χρήσης 20 μ L, 100 μ L, 1000 μ L
- Σωληνάκια τύπου Eppendorf 1,5 mL και 2,0 mL
- Κυψελίδες
- Απόλυτη αιθανόλη EtOH
- Διπλά απιονισμένο νερό (ddH₂O)
- Μικροφυγόκεντρος
- Συσσκευή vortex
- Heat block
- Φωτόμετρο (Biophotometer, Eppendorf)

2.2.2 Πρωτόκολλο απομόνωσης DNA

Για την απομόνωση γενετικού υλικού από κύτταρα μυελού των οστών με PureLink™ Genomic DNA Purification Kit, Invitrogen (Thermo Scientific) ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:

1. Θέρμανση του heat block στους 55°C.

2. Προσθήκη 200 μL αναρροφήματος μυελού από κάθε δείγμα σε tubes των 1,5 mL.
3. Προσθήκη 20 μL πρωτεΐνάσης K, ανάδευση στη συσκευή Vortex
4. Προσθήκη 20 μL RNAσης A, ανάδευση στη συσκευή Vortex
5. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 2 λεπτά
6. Προσθήκη 200 μL Genomic/Lysis Binding Buffer και ανάδευση στη συσκευή Vortex.
7. Επώαση στους 55°C για δέκα λεπτά.
8. Προσθήκη 200 μL αιθανόλης 96-100% και ανάδευση.
9. Μεταφορά του περιεχομένου του tube σε στήλη με φίλτρο η οποία βρίσκεται μέσα σε collection tube.
10. Φυγοκέντρηση στις 10.000 rpm για 1 λεπτό. Με τη φυγοκέντρηση πραγματοποιείται διήθηση του μίγματος με αποτέλεσμα το επιθυμητό DNA να κατακρατείται στον ηθμό.
11. Απόρριψη του receiver tube και τοποθέτηση του φίλτρου σε νέο receiver tube.
12. Προσθήκη 500 μL ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης (Wash Buffer 1).
13. Φυγοκέντρηση στις 10.000 rpm για 1 λεπτό.
14. Απόρριψη του receiver tube και τοποθέτηση του φίλτρου σε νέο receiver tube.
15. Προσθήκη 500 μL ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης (Wash Buffer 2).
16. Φυγοκέντρηση στη μέγιστη ταχύτητα (rpm) για 3 λεπτά.
17. Απόρριψη του receiver tube και τοποθέτηση του φίλτρου σε νέο receiver tube.
18. Προσθήκη 200 μL διαλύματος έκλουσης (Elution Buffer).

19. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 2 λεπτά.
20. Φυγοκέντρηση στη μέγιστη ταχύτητα (rpm 12000 για 2 λεπτά).
21. Επανάληψη των βημάτων 17 και 18.
22. Απόρριψη των στηλών. Μεταφορά του υγρού που λαμβάνεται και περιέχει το DNA σε tube των 1,5 mL και αποθήκευση στους -20°C για μελλοντική χρήση ή άμεση φωτομέτρηση και PCR.

2.2.3 Φωτομέτρηση DNA

2.2.3.1 Αρχή μεθόδου

Φωτομέτρηση είναι εκείνη η διαδικασία με την οποία ελέγχεται η καθαρότητα και μετράται η ποσότητα του απομονωμένου DNA. Η φασματοφωτομετρία βασίζεται στην ικανότητα των μορίων να απορροφούν εκλεκτικά μέρος της ακτινοβολίας του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος. Η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία αλληλεπιδρά με την ύλη προκαλώντας διέγερση των ηλεκτρονίων των εξωτερικών στιβάδων και παροδική μετάπτωσησή τους σε μοριακά τροχιακά υψηλότερων ενεργειών. Κατά την αποδιέγερσή τους, τα μόρια αποδίδουν την ενέργεια που έχει απορροφηθεί είτε με τη μορφή θερμότητας είτε με τη μορφή φωσφορισμού ή φθορισμού. [97]

Στη φασματοφωτομετρία υπεριώδους/ορατού (Ultraviolet/Visible, UV/Vis) με μήκος κύματος 200-750 nm, κάθε χημική ένωση παρουσιάζει τη μέγιστη απορρόφηση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας σε ένα χαρακτηριστικό μήκος κύματος (λ_{\max}). Τα νουκλεϊκά οξέα εμφανίζουν το μέγιστο της απορρόφησης τους στα 260 nm. Κατά τη φωτομέτρηση μετρείται η απορρόφηση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας στο λ_{\max} και με βάση το

νόμο Lambert-Beer υπολογίζεται η συγκέντρωση των νουκλεϊκών οξέων με βάση την απορρόφηση αυτή.

Η μέτρηση της απορρόφησης της μονοχρωματικής ακτινοβολίας πραγματοποιείται με το φασματοφωτόμετρο. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε το φασματοφωτόμετρο απλής δέσμης BioPhotometer (Eppendorf-Germany) το οποίο αποτελείται από:

- Μία πηγή ακτινοβολίας
- Έναν επιλογέα μήκους κύματος που απομονώνει μονοχρωματική ακτινοβολία από το σύνολο του φάσματος που εκπέμπει η πηγή ακτινοβολίας
- Μία κυψελίδα, στην οποία τοποθετείται διάλυμα
- Έναν ανιχνευτή, που μετράει το εξερχόμενο μονοχρωματικό φως σε ηλεκτρικό ρεύμα
- Ένα όργανο καταγραφής, που περιλαμβάνει μια αναλογική ή ψηφιακή οθόνη στην οποία εμφανίζονται οι μετρήσεις της απορρόφησης. [98]

2.2.3.2 Διαδικασία φωτομέτρησης

Τα βήματα που ακολουθούνται για τη διαδικασία της φωτομέτρησης είναι τα εξής:

1. Προσθήκη 70 μL water for injection στην κυψελίδα
2. Φωτομέτρηση ύδατος (BLANK)
3. Απόρριψη ύδατος
4. Προσθήκη στην κυψελίδα 68 μL water for injection και 2 μL δείγματος DNA και ανάδευση.

5. Επιλογή αραίωσης
6. Φωτομέτρηση δείγματος DNA

Για την εκτίμηση της καθαρότητας του δείγματος μετριέται η απορρόφηση σε δύο μήκη κύματος, στα 260 nm και στα 280 nm και στη συνέχεια υπολογίζεται ο λόγος των δύο απορροφήσεων A_{260nm}/A_{280nm} :

- Ο χαρακτηριστικός λόγος διαλύματος καθαρού DNA A_{260nm}/A_{280nm} είναι 1,8, συνεπώς λόγος μεταξύ 1,5 και 2 είναι αποδεκτός.
- Τιμές λόγου $A_{260nm}/A_{280nm} < 1,7$ είναι ενδεικτικές της ύπαρξης προσμίξεων, συνήθως πρωτεϊνών.

Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του DNA βασίζεται στο νόμο Lambert-Beer και αναμένεται συγκέντρωση εντός του εύρους 5 έως 50 ng/μL, καθώς σε αυτές τις τιμές εμφανίζεται γραμμική συσχέτιση με την απορρόφηση στα 260 nm. Λαμβάνοντας υπόψιν ότι το διάλυμα καθαρού δίκλωνου DNA που έχει στα 260 nm απορρόφηση $A_{260nm}=1$ έχει συγκέντρωση 50 ng/μL, η συγκέντρωση του απομονωμένου DNA υπολογίζεται από τον τύπο [99]:

$$C \text{ (ng/}\mu\text{L)} = A_{260nm} \times 50$$

2.3 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase chain reaction, PCR) είναι ίσως η ευρύτερα χρησιμοποιούμενη μέθοδος της μοριακής βιολογίας, με αναρίθμητες εφαρμογές τόσο σε ερευνητικό όσο και σε διαγνωστικό επίπεδο. Η PCR είναι μια ενζυμική μέθοδος ενίσχυσης συγκεκριμένων τμημάτων γενετικού υλικού *in vitro*. Κατά τη διάρκεια μιας τυπικής αντίδρασης PCR το

επιθυμητό τμήμα γενετικού υλικού πολλαπλασιάζεται μέχρι και ένα τρισεκατομμύριο φορές, γεγονός που είναι απαραίτητο για μετέπειτα χειρισμούς, όπως η ηλεκτροφόρηση, η πέψη με ένζυμα περιορισμού, η ανάγνωση της αλληλουχίας βάσεων κ.ά.

Η αντίδραση PCR πραγματοποιείται σε τρία στάδια, τα οποία επαναλαμβάνονται διαδοχικά (εικόνα 4):

1. Αποδιάταξη: Οι δύο αλυσίδες του DNA διαχωρίζονται (αποδιατάσσονται) με θέρμανση σε θερμοκρασία 94-95° C για περίπου 30 sec έως 1 min.
2. Υβριδισμός εκκινητών: Με μείωση της θερμοκρασίας στους 55-65° C για περίπου 30 sec έως 1 min, οι εκκινητές υβριδίζονται στις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες στο εκμαγείο DNA.
3. Επιμήκυνση: Για τη σύνθεση της νέας αλυσίδας αυξάνουμε τη θερμοκρασία στους 72° C, χρησιμοποιώντας τη συμπληρωματική αλληλουχία DNA ως εκμαγείο.

Η ταχύτητα σύνθεσης της νέας αλυσίδας είναι της τάξης των 1000 bp ανά λεπτό.

Τα παραπάνω στάδια επαναλαμβάνονται από 25 έως 35 φορές. [100] Η PCR εκτελείται στον θερμικό κυκλοποιητή (Thermal cycler), συσκευή που φέρει θερμαινόμενη πλάκα που μπορεί να εναλλάσσει θερμοκρασίες με ταχύτητα και ακρίβεια. Ο θερμικός κυκλοποιητής είναι μια προγραμματιζόμενη συσκευή, στην οποία μπορούμε να ρυθμίσουμε την επιθυμητή θερμοκρασία και τη διάρκεια κάθε σταδίου αλλά και τη διαδοχή τους.

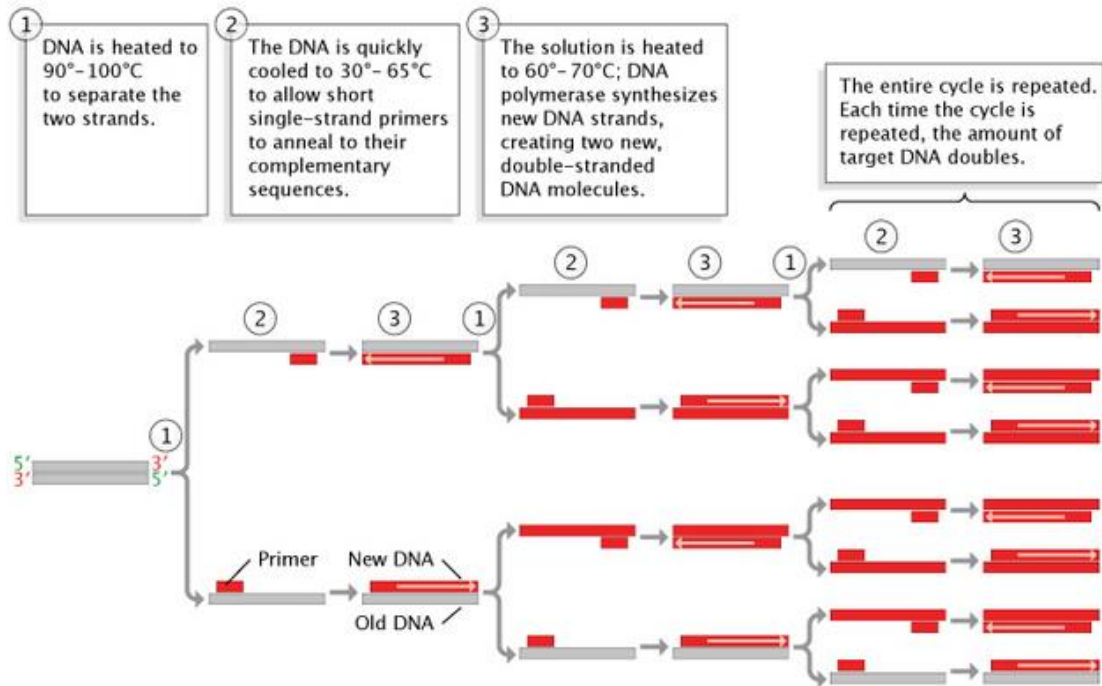
2.4 Kompetitive allele specific PCR (KASP)

Για τους σκοπούς της παρούσας εργασίας πραγματοποιήθηκε γονοτύπηση σε panel με βάση την τεχνολογία KASP. Η συγκεκριμένη μεθοδολογία βασίζεται στην kompetitive allele-specific PCR (KASP) ειδική για την αλληλόμορφο-ανταγωνιστική PCR που επιτρέπει την αναγνώριση και των δύο αλληλομόρφων για μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς (SNPs) καθώς και για προσθήκες και απαλοιφές βάσεων σε συγκεκριμένους γονιδιακούς τόπους. Το KASP Assay μίγμα περιέχει τρία ειδικά για αναλύσεις ολιγονουκλεοτίδια χωρίς σήμανση: δύο εκκινητές ειδικούς για τα αλληλόμορφα με κατεύθυνση εκείνη της οδηγού αλυσίδας και έναν ακόμα κοινό εκκινητή αντίστροφης κατεύθυνσης. Η διάκριση των δύο αλληλόμορφων επιτυγχάνεται μέσω της ανταγωνιστικής σύνδεσης των δύο ειδικών για κάθε αλληλόμορφο εκκινητών, κάθε ένας από τους οποίους φέρει στο άκρο του μια μοναδική αλληλουχία που αντιδρά με δύο κασέτες FRET (fluorescence resonant energy transfer) και δίνει ισχυρό σήμα λόγω του τελικού σημείου φθορισμού. Η αναγνώριση γίνεται με τη βοήθεια δύο διαφορετικών δεικτών που σηματοδοτούν κασέτες FRET. Ο ένας είναι ο FAM™ και ο άλλος είναι ο HEX™. Αναλυτικότερα, στον θερμικό κυκλοποιητή ο ειδικός για το κάθε αλληλόμορφο εκκινητής δεσμεύεται από την περιοχή σύνδεσης και επιμηκύνεται, προσαρμόζοντας την αλληλουχία που φέρει στο άκρο του στον νεοσυντιθέμενο κλώνο. Η συμπληρωματική αλληλουχία δημιουργείται σε ακόλουθους κύκλους PCR επιτρέποντας στην κασέτα FRET να συνδεθεί στο DNA. Η κασέτα FRET δεν θα αποσιωπάται πλέον και θα εκπέμπει φθορισμό. Αν σε έναν δεδομένο SNP έχουμε μονοζυγωτία, τότε μόνο ένα από τα δύο σήματα φθορισμού θα ενεργοποιηθεί,

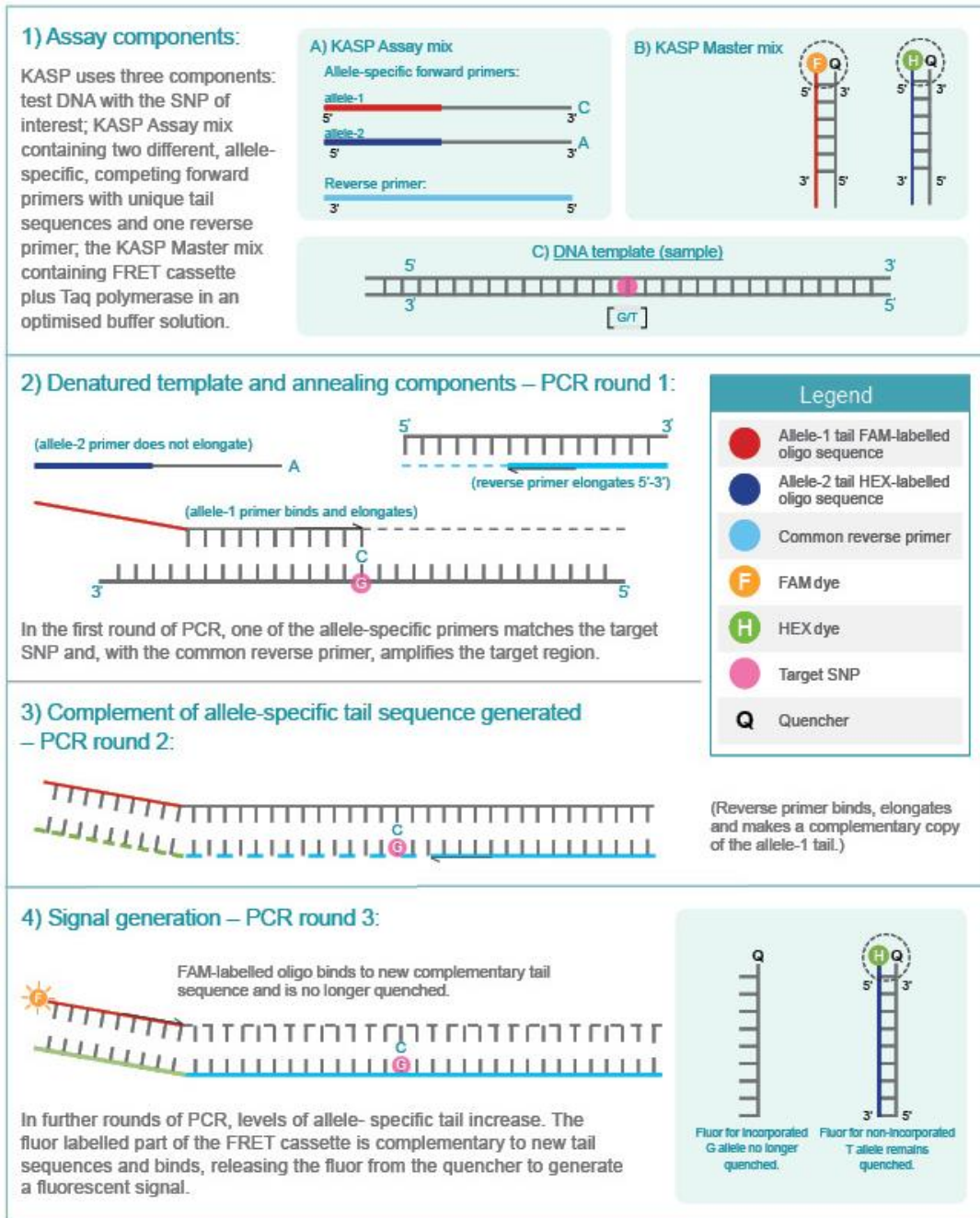
ενώ αν έχουμε ετεροζυγωτία τότε θα έχουμε έναν μικτό φθορισμό. (Εικόνα 5)

[101, 102]

Εικόνα 4. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) [100]



Εικόνα 5. Αναλυτικά βήματα KASP PCR [102]



Στο πείραμά μας χρησιμοποιήθηκε ο αναλυτής Light Cycler 480 (LC 480) (Roche Diagnostics, Germany). Πρόκειται για ένα ταχύ θερμικό κυκλοποιητή ο οποίος επιτρέπει την ταυτόχρονη ενίσχυση και ανίχνευση των νουκλεϊκών οξέων-στόχων. Έχει τη δυνατότητα ταυτόχρονης ανάλυσης 96 δειγμάτων με όγκους από 20 έως 100 μL και χρησιμοποιεί πέντε φίλτρα διέγερσης και έξι φίλτρα εκπομπής, τα οποία συνδυάζονται κατάλληλα για την ακριβή ανίχνευση του φθορισμού. Αποτελείται από δύο συστήματα:

1. Τη μονάδα θερμικού κυκλοποιητή, που συνοδεύεται από τη θέση υποδοχής των πλακών πολλαπλών θέσεων
2. Τη μονάδα ανίχνευσης, που αποτελείται από τη λαμπα, την οπτική μονάδα και την κάμερα.

2.4.1 Αναλυτική διαδικασία KASP

Ο χώρος στον οποίο θα πραγματοποιηθεί η ανάμιξη των αντιδραστηρίων ακτινοβολείται με υπεριώδη ακτινοβολία. Ακολούθως, απολυμαίνονται με υπεριώδη ακτινοβολία οι πιπέτες, τα tips και τα υπόλοιπα σκεύη που θα χρησιμοποιηθούν κατά τη διαδικασία.

Το KASP TF Master Mix περιέχει τις καθολικές κασέτες FRET, παθητική βαφή αναφοράς ROX™, Ταq πολυμεράση, ελεύθερα νουκλεοτίδια και MgCl_2 σε ένα βελτιστοποιημένο ρυθμιστικό διάλυμα. Το νερό που χρησιμοποιείται είναι δις-απεσταγμένο και ελεύθερο ουσιών που μπορούν να αναστείλουν την PCR. Όλα τα αντιδραστήρια φυλάσσονται στην κατάψυξη σε θερμοκρασία -20°C . Η κατασκευάστρια εταιρεία (LGC Biosearch Technologies, Hoddesdon, UK) των εκκινήτων (primers) και των ολιγονουκλεοτιδικών ανιχνευτών (probes)

προτείνει συγκεκριμένο πρωτόκολλο για την επιτυχή διεξαγωγή των εκαστοτε PCR. Οι οδηγίες χρήσης περιλαμβάνονται στο kit datasheet το οποίο είναι διαφορετικό για κάθε πολυμορφισμό που θα μελετηθεί.

Οι αναλογίες των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση των πολυμορφισμών με τη διαδικασία KASP αναγράφονται στον πίνακα 6 και οι συνθήκες της αντίδρασης στον πίνακα 7.

Πίνακας 6. Παρασκευή μίγματος αντίδρασης

Αντιδραστήρια	Ποσότητες (μL)
KASP Mix	5
Probe	0.14
DNA	5

Πίνακας 7. Συνθήκες αντίδρασης στον αναλυτή Light Cycler 480

Πρόγραμμα	Denatura- tion	Cycling			Melting			Cooling
Παράμετρος								
Analysis Mode	None	Quantification			Melting Curve			None
Cycles	1	45			1			1
Target [°C]	95	95	60	72	95	40	75	40
Hold [hh:mm:ss]	00:10:00	00:00:10	00:00:10	00:00:15	00:00:30	00:02:00	00:00:00	00:00:30
Ramp Rate [°C/s] 96	4.4	4.4	2.2	4.4	4.4	1.5	-	1.5
Acquisition Mode	None	None	Single	None	None	None	Continuous	None
Acquisitions [per °C]							3	

2.5 Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με τη χρήση του προγράμματος SPSS Statistics (έκδοση 25 για Windows). Χρησιμοποιήθηκαν τα χ^2 Pearson και Fisher test, για την αξιολόγηση της γραμμικής συσχέτισης των συνεχών μεταβλητών σε μικρά δείγματα. Για το σκοπό αυτό, σχεδιάστηκαν πίνακες συνάφειας 2x2. Επιπλέον υπολογίστηκαν οι σχετικοί λόγοι συμπληρωματικών πιθανοτήτων (Odds ratio-OR) καθώς και τα ανίστοιχα διαστήματα εμπιστοσύνης (Confidence Interval, CI) 95%. Ως OR ορίζεται η πιθανότητα εμφάνισης ενός φαινομένου ανάλογα με την έκθεση σε ένα συγκεκριμένο παράγοντα. Η μέθοδος Kaplan-Meier χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση των καμπύλων επιβίωσης, ενώ το Mann-Whitney U test εφαρμόστηκε για τη σύγκριση μεταξύ μίας συνεχούς μεταβλητής με μη κανονική κατανομή και μίας ασυνεχούς μεταβλητής μεταξύ δύο δειγμάτων. Ο στατιστικός έλεγχος έγινε σε επίπεδο σημαντικότητας $p=0.05$.

3 Αποτελέσματα

Στη μελέτη περιλήφθησαν 54 ασθενείς εκ των οποίων 35 άνδρες και 19 γυναίκες, που εξετάστηκαν στο Αιματολογικό τμήμα της Α Παθολογικής κλινικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών μεταξύ των ετών 2015 και 2024 και έπασχαν από ΜΔΣ. Η διάμεση ηλικία ήταν 74 έτη (εύρος: 34-90). Τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών που συμμετείχαν στην παρούσα εργασία παρουσιάζονται στον πίνακα 8.

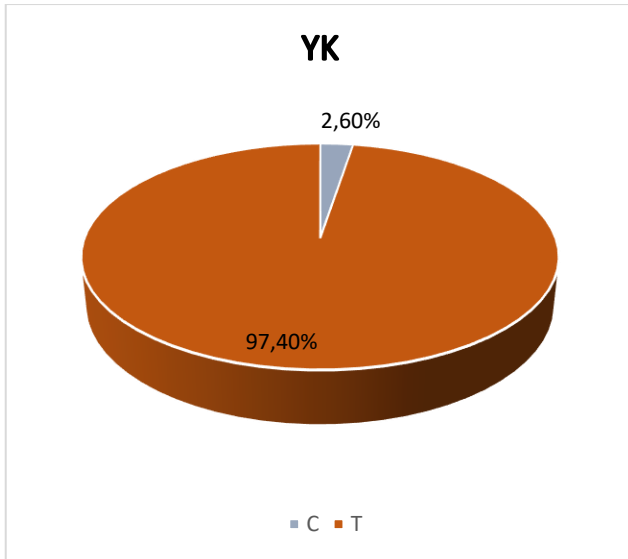
Πίνακας 8 . Χαρακτηριστικά των ασθενών.

Μεταβλητές	Αποτελέσματα
Αριθμός ασθενών, N	54
Φύλο άρρεν, N (%)	53 (64.8)
Ηλικία	74 (34-90)
WHO category, N (%)	
MDS-SLD	12 (22.2)
MDS-SLD-RS	2 (3.7)
MDS-MLD	12 (22.2)
EB-1	8 (14.8)
EB-2	17 (31.5)
MDS-MPN	3 (31.6)
Αιμοσφαιρίνη, (εύρος)	9.8 (5-13)
MCV, (εύρος)	91.8 (63.4-121.6)
Ουδετερόφιλα, (εύρος)	1.6 (0.2-13.9)
Αιμοπετάλια, (εύρος)	130.000 (16.000-468.000)
Κυτταροενίεις, N (%)	
1	17 (31.5)
2	22 (40.7)
3	15 (27.8)
IPSS category (στη διάγνωση), N (%)	
Χαμηλό	15 (27.8)
Ενδιάμεσο-1	20 (37)
Ενδιάμεσο-2	14 (25.9)
Υψηλό	5 (9.3)
IPSS-R category (στη διάγνωση), N (%)	
Πολύ χαμηλό	4 (7.4)
Χαμηλό	22 (40.7)
Ενδιάμεσο	9 (16.7)
Υψηλό	14 (25.9)
Πολύ υψηλό	5 (9.3)
Μεταγγίσεις ερυθρών αιμοσφαιρίων, N (%)	26 (48.1)
Μεταγγίσεις αιμοπεταλίων, N (%)	5 (9.3)

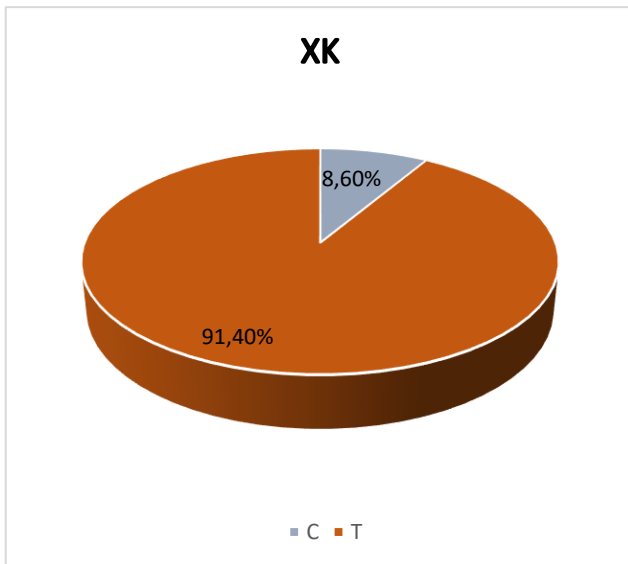
3.1 Συχνότητα κατανομής του πολυμορφισμού rs2296957 του γονιδίου UCK1 σε ασθενείς με ΥΚ-ΜΔΣ και ΧΚ-ΜΔΣ

3.1.1 Κατανομή αλληλόμορφων

Για τον πολυμορφισμό rs2296957 (C>T), το φυσικό αλληλόμορφο ταυτίζεται με την ύπαρξη του μεταλλαγμένου, καθώς υπάρχει σε μεγαλύτερο ποσοστό στον πληθυσμό. Στο σύνολο των ασθενών, το αλληλόμορφο C εμφανίζεται επτά φορές (6,5%), ενώ το αλληλόμορφο T 101 φορές (93,5%). Στους ασθενείς με ΥΚ-ΜΔΣ το αλληλόμορφο C εμφανίζεται 1 φορά (2,6%), ενώ το T 37 φορές (97,4%). (Γράφημα 1, Πίνακας 9) Στους ασθενείς με ΧΚ-ΜΔΣ τα αλληλόμορφα εμφανίζονται 6 (8,6%) και 64 (91,4%) φορές αντίστοιχα. (Γράφημα 2, Πίνακας 9)



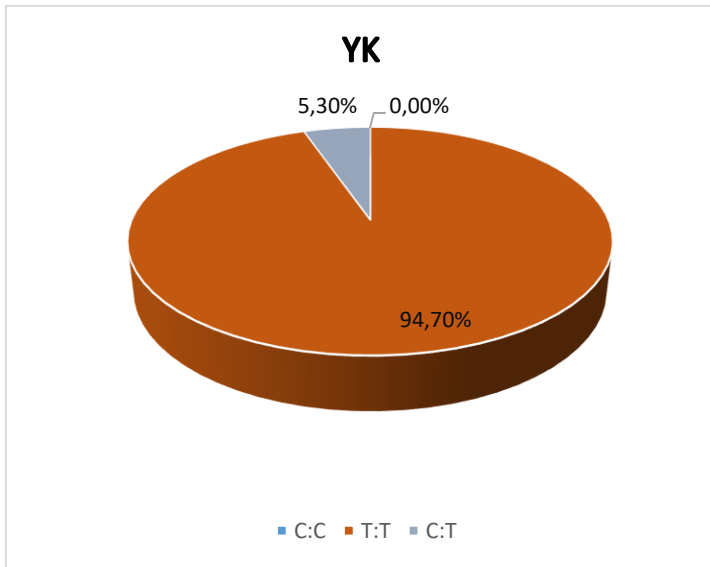
Γράφημα 1. Κατανομή αλληλόμορφων του πολυμορφισμού rs2296957 του γονιδίου UCK1 στους ασθενείς με ΥΚ-ΜΔΣ



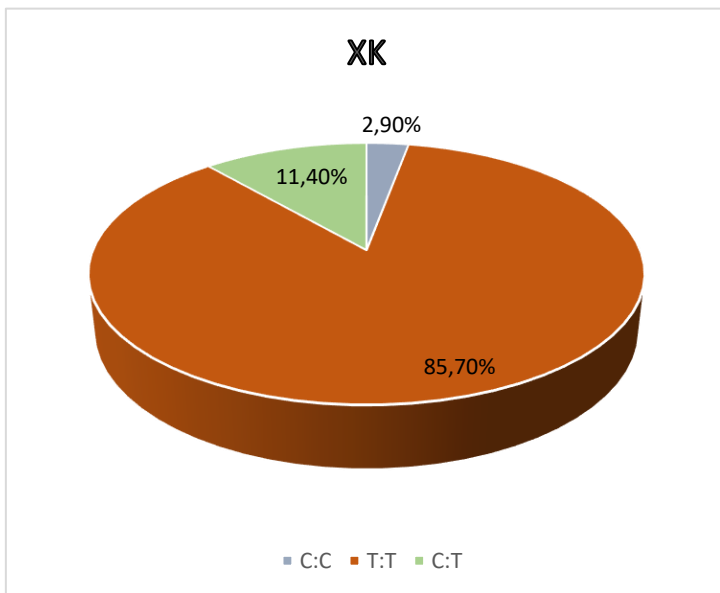
Γράφημα 2. Κατανομή αλληλόμορφων του πολυμορφισμού rs2296957 του γονιδίου UCK1 στους ασθενείς με ΧΚ-ΜΔΣ

3.1.2 Κατανομή γονοτύπων

Η πλειοψηφία των ασθενών με ΥΚ-ΜΔΣ, για τον πολυμορφισμό rs2295957 του γονιδίου UCK1, φέρει τον ομόζυγο μεταλλαγμένο γονότυπο T:T σε ποσοστό 94,7% (N=18). Ο ετερόζυγος γονότυπος C:T για το φυσικό μεταλλαγμένο T εμφανίζεται σε ποσοστό 5,3% (N=1). Ο ομόζυγος γονότυπος C:C για το αλληλόμορφο C δεν εμφανίζεται στο δείγμα των ΥΚ-ΜΔΣ (Γράφημα 3, Πίνακας 10) Η πλειοψηφία των ασθενών με ΧΚ-ΜΔΣ, φέρει τον ομόζυγο μεταλλαγμένο γονότυπο T:T σε ποσοστό 85,7% (N=30). Ο ετερόζυγος γονότυπος C:T για το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο T εμφανίζεται σε ποσοστό 11,4% (N=4), ενώ ένας από τους ασθενείς φέρει τον ομόζυγο γονότυπο C:C (2,9%) (Γράφημα 4, Πίνακας 10). Από τη στατιστική επεξεργασία, δε φαίνεται να υπάρχει συσχέτιση του πολυμορφισμού με την ταξινόμηση των ασθενών στις ομάδες υψηλότερου και χαμηλότερου κινδύνου ($p=0.648$)



Γράφημα 3. Κατανομή γονοτύπων του πολυμορφισμού rs2296957 του γονιδίου UCK1 στους ασθενείς με ΥΚ-ΜΔΣ



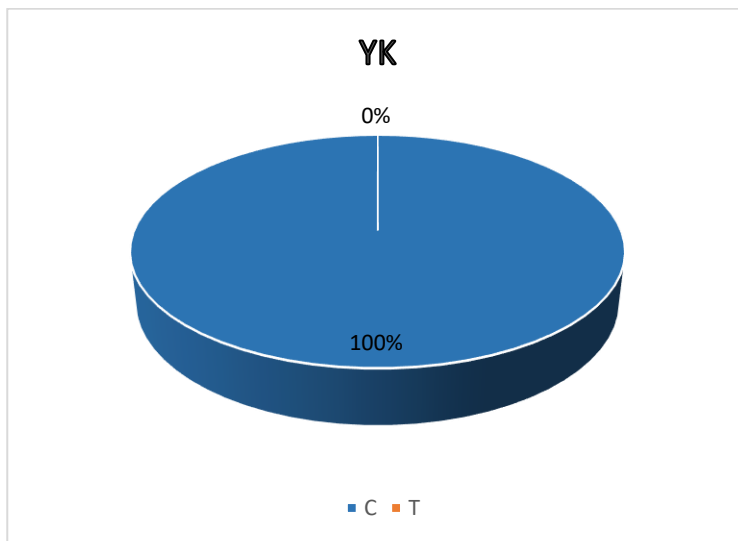
Γράφημα 4. Κατανομή γονοτύπων του πολυμορφισμού rs2296957 του γονιδίου UCK1 στους ασθενείς με ΧΚ-ΜΔΣ

3.2 Σύχνότητα κατανομής του πολυμορφισμού rs189473964 του γονιδίου

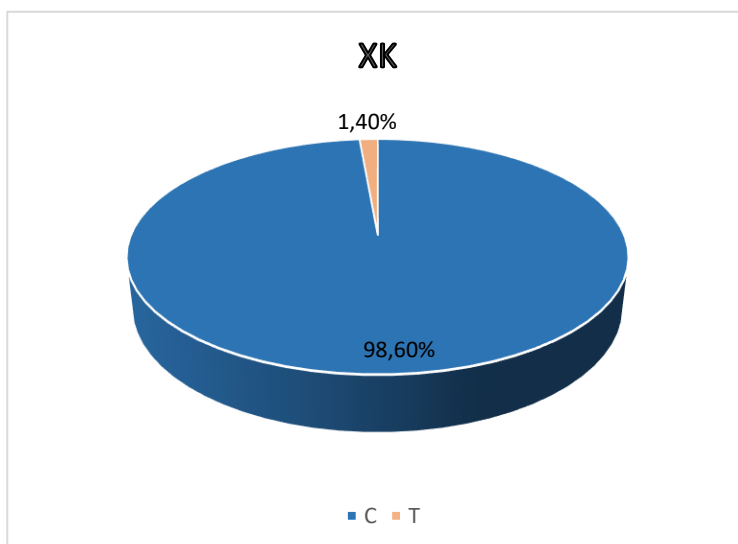
UCK1 σε ασθενείς με ΥΚ-ΜΔΣ και ΧΚ-ΜΔΣ

3.2.1 Κατανομή αλληλόμορφων

Για τον πολυμορφισμό rs189473964 (C>T), το φυσικό αλληλόμορφο είναι το C. Το αλληλόμορφο T ταυτίζεται με το μεταλλαγμένο. Στο σύνολο των ασθενών, το αλληλόμορφο C εμφανίζεται 108 φορές (99,1%), ενώ το αλληλόμορφο T μία φορά (0,93%). Στους ασθενείς με ΥΚ-ΜΔΣ το αλληλόμορφο C εμφανίζεται στο σύνολο του δείγματος. (Γράφημα 5, Πίνακας 9) Στους ασθενείς με ΧΚ-ΜΔΣ το αλληλόμορφο C εμφανίζεται 69 φορές (98,6%), ενώ το T εμφανίζεται 1 φορά (1,4%) . (Γράφημα 6, Πίνακας 9)



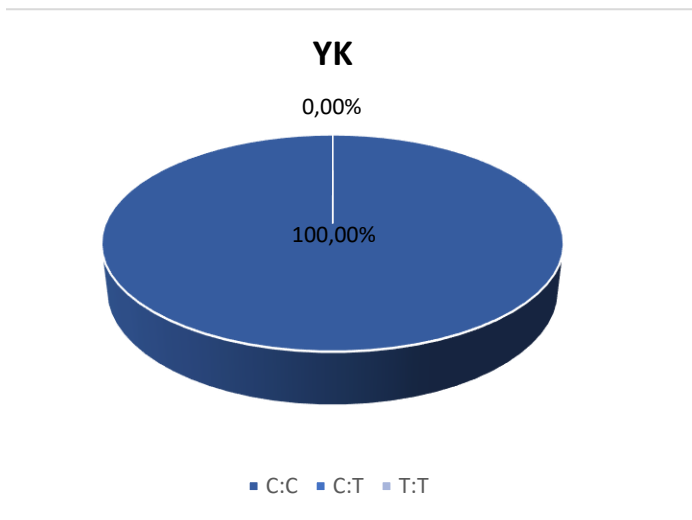
Γράφημα 5.
Κατανομή
αλληλόμορφων του
πολυμορφισμού
rs189473964 του
γονιδίου UCK1 στους
ασθενείς με ΥΚ-ΜΔΣ



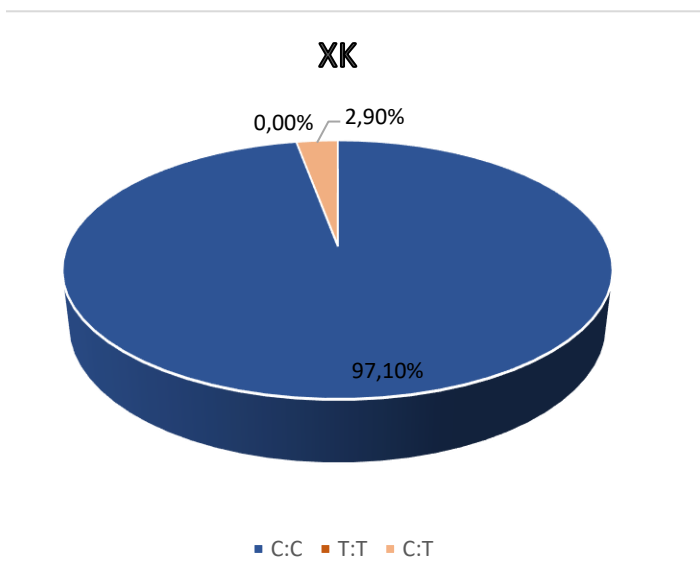
Γράφημα 6.
Κατανομή
αλληλόμορφων του
πολυμορφισμού
rs189473964 του
γονιδίου UCK1 στους
ασθενείς με ΧΚ-ΜΔΣ

3.2.2 Κατανομή γονοτύπων

Στους ασθενείς με ΥΚ-ΜΔΣ, για τον πολυμορφισμό rs189473964 του γονιδίου UCK1, τον ομόζυγο φυσικό γονότυπο C:C φέρει το σύνολο του δείγματος (100%) (N=19). Κανένας από τους ασθενείς δε φέρει τον ομόζυγο για το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο γονότυπο T:T ή τον ετερόζυγο γονότυπο C:T. (Γράφημα 7, Πίνακας 10) Η πλειοψηφία των ασθενών με ΧΚ-ΜΔΣ, φέρει τον ομόζυγο φυσικό γονότυπο C:C σε ποσοστό 97,1% (N=34). Ο ετερόζυγος γονότυπος C:T για το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο T εμφανίζεται σε ποσοστό 2,9% (N=1). Κανένας από τους ασθενείς αυτούς δεν εμφανίζει τον ομόζυγο για το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο γονότυπο T:T. (Γράφημα 8, Πίνακας 10) Η ύπαρξη του πολυμορφισμού δε φαίνεται να σχετίζεται με την ταξινόμηση σε ΥΚ-ΜΔΣ και ΧΚ-ΜΔΣ ($p=0.648$)



Γράφημα 7. Κατανομή γονοτύπων του πολυμορφισμού rs189473964 του γονιδίου UCK1 στους ασθενείς με ΥΚ-ΜΔΣ

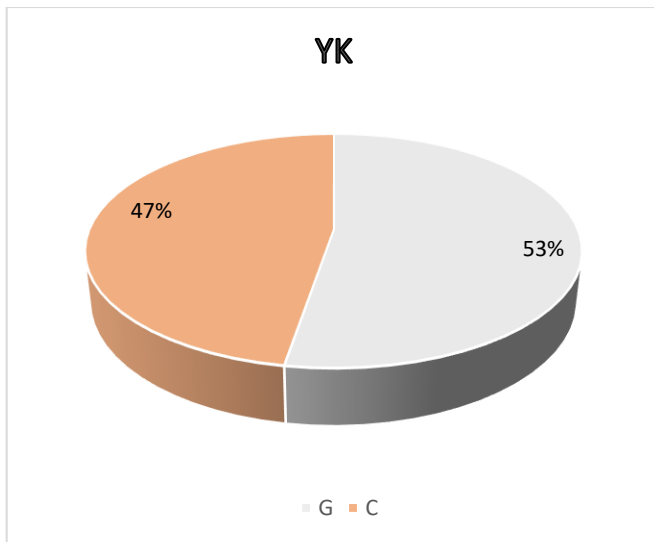


Γράφημα 8. Κατανομή γονοτύπων του πολυμορφισμού rs189473964 του γονιδίου UCK1 στους ασθενείς με ΧΚ-ΜΔΣ

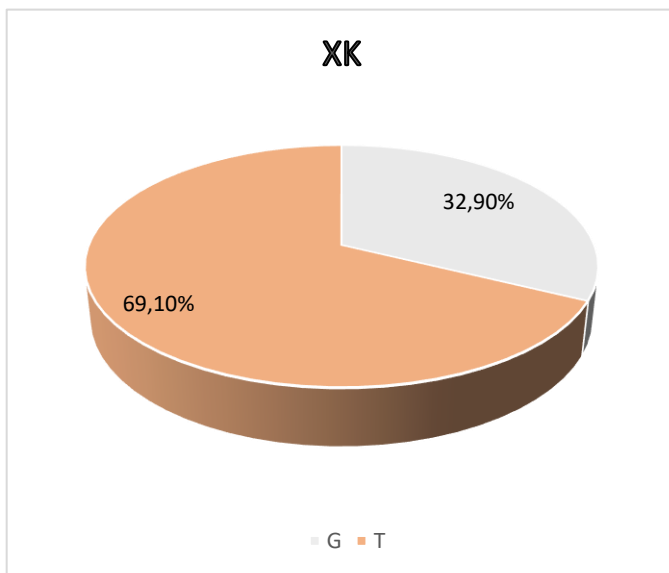
3.3 Σύχνοτητα κατανομής του πολυμορφισμού rs3904960 του γονιδίου UCK1 σε ασθενείς με ΥΚ-ΜΔΣ και ΧΚ-ΜΔΣ

3.3.1 Κατανομή αλληλόμορφων

Για τον πολυμορφισμό rs3904960 (G>T), το φυσικό αλληλόμορφο το οποίο βρίσκεται και στο μεγαλύτερο ποσοστό του πληθυσμού, ταυτίζεται με την ύπαρξη του μεταλλαγμένου αλληλόμορφου T. Στο σύνολο των ασθενών, το αλληλόμορφο G εμφανίζεται 31 φορές (28,7%), ενώ το αλληλόμορφο T 77 φορές (71.3%). Στους ασθενείς με ΥΚ-ΜΔΣ το αλληλόμορφο G εμφανίζεται 8 φορές (21%), ενώ το T 30 φορές (79%). (Γράφημα 9, Πίνακας 9) Στους ασθενείς με ΧΚ-ΜΔΣ το αλληλόμορφο G εμφανίζεται 23 φορές (32,9%), ενώ το αλληλόμορφο T εμφανίζεται 47 φορές (67,1%) (Γράφημα 10, Πίνακας 9)



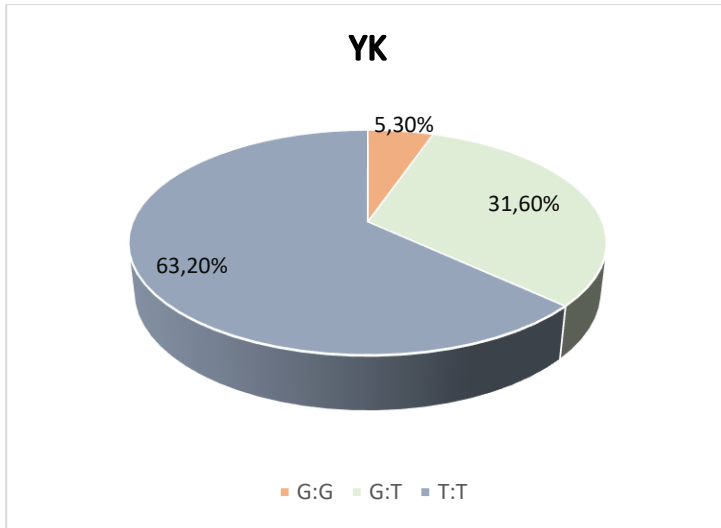
Γράφημα 9.
Κατανομή αλληλόμορφων του πολυμορφισμού rs3904960 του γονιδίου UCK1 στους ασθενείς με ΥΚ-ΜΔΣ



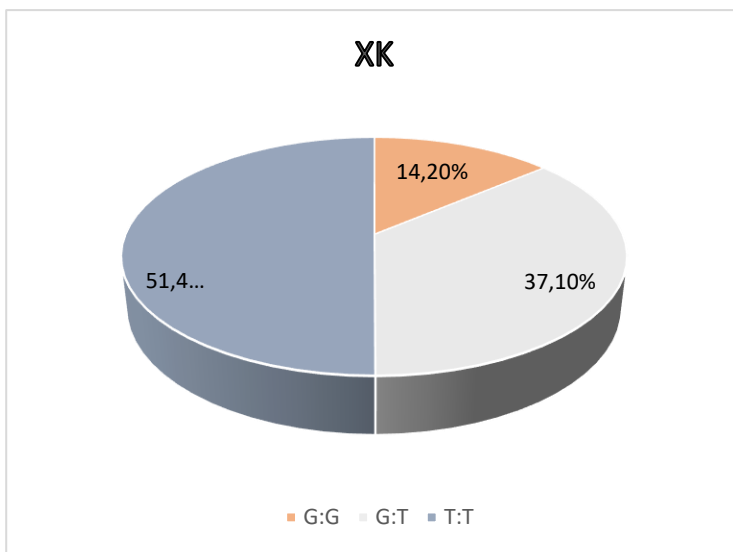
Γράφημα 10.
Κατανομή αλληλόμορφων του πολυμορφισμού rs3904960 του γονιδίου UCK1 στους ασθενείς με ΧΚ-ΜΔΣ

3.3.2 Κατανομή γονοτύπων

Στο σύνολο των ασθενών, για τον πολυμορφισμό rs3904960 του γονιδίου UCK1, τον ομόζυγο μεταλλαγμένο γονότυπο T:T φέρει ποσοστό 53,7% (N=29). Ο ετερόζυγος γονότυπος G:T για το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο T εμφανίζεται σε ποσοστό 35,2% (N=19). Ο ομόζυγος για το αλληλόμορφο γονότυπος G:G εμφανίζεται σε ποσοστό 11,1% (N=6). Στο σύνολο των ασθενών με ΥΚ-ΜΔΣ, τον ομόζυγο γονότυπο G:G φέρει ποσοστό 5,3% (N=1). Ο ετερόζυγος γονότυπος G:T για το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο T εμφανίζεται σε ποσοστό 31,6% (N=6) και ο ομόζυγος για το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο T γονότυπος T:T σε ποσοστό 63,2% (N=12) (Γράφημα 11, Πίνακας 10) Στο σύνολο των ασθενών με ΧΚ-ΜΔΣ, τον ομόζυγο μεταλλαγμένο γονότυπο T:T φέρει ποσοστό 51,4% (N=18). Ο ετερόζυγος γονότυπος G:T για το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο T εμφανίζεται σε ποσοστό 37,1% (N=13). Ο ομόζυγος για το αλληλόμορφο G γονότυπο G:G εμφανίζεται σε ποσοστό 14,2% (N=5) (Γράφημα 12, Πίνακας 10) Η ταξινόμηση των ασθενών σε ΥΚ-ΜΔΣ και ΧΚ-ΜΔΣ δε σχετίζεται από την εμφάνιση του πολυμορφισμού στο δείγμα του πληθυσμού. ($p=0.302$)



Γράφημα 11.
Κατανομή
γονοτύπων του
πολυμορφισμού
rs3904960 του
γονιδίου UCK1
στους ασθενείς με
ΥΚ-ΜΔΣ

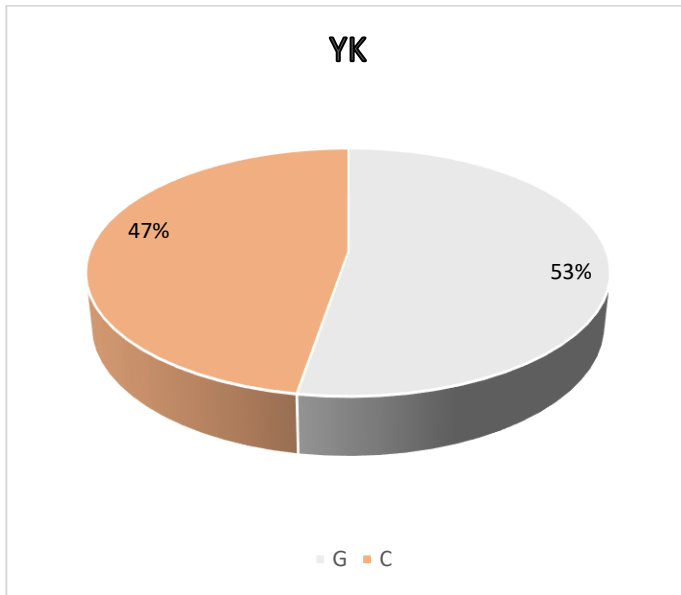


Γράφημα 12.
Κατανομή
γονοτύπων του
πολυμορφισμού
rs3904960 του
γονιδίου UCK1
στους ασθενείς με
ΧΚ-ΜΔΣ

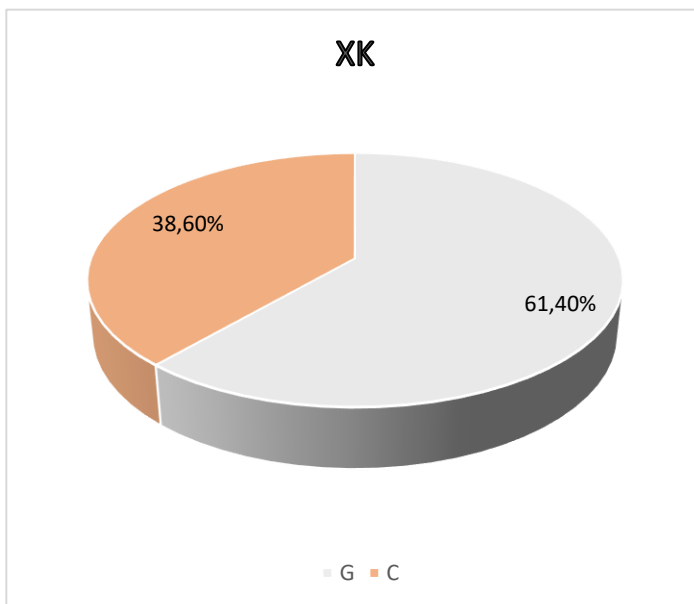
3.4 Σύχνητα κατανομής του πολυμορφισμού rs2296956 του γονιδίου UCK1 σε ασθενείς με ΥΚ-ΜΔΣ και ΧΚ-ΜΔΣ

3.4.1 Κατανομή αλληλόμορφων

Για τον πολυμορφισμό rs2296956 (G>C), το φυσικό αλληλόμορφο είναι το G. Στο σύνολο των ασθενών, το αλληλόμορφο G εμφανίζεται 63 φορές (58,3%), ενώ το αλληλόμορφο C 45 φορές (41,7%). Στους ασθενείς με ΥΚ-ΜΔΣ τόσο το αλληλόμορφο G εμφανίζεται 20 φορές (52,6%) και το αλληλομορφο C 18 φορές (47,3%). (Γράφημα 13, Πίνακας 9) Στους ασθενείς με ΧΚ-ΜΔΣ το αλληλόμορφο G εμφανίζεται 43 φορές (61,4%), ενώ το αλληλόμορφο C εμφανίζεται 27 φορές (38,6%) (Γράφημα 14, Πίνακας 9)



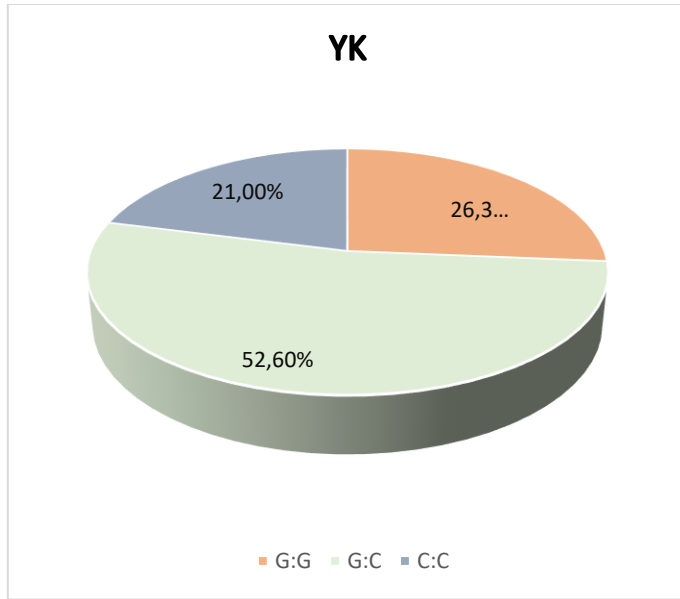
Γράφημα 13.
Κατανομή αλληλομόρφων του πολυμορφισμού rs2296956 του γονιδίου UCK1 στους ασθενείς με ΥΚ-ΜΔΣ



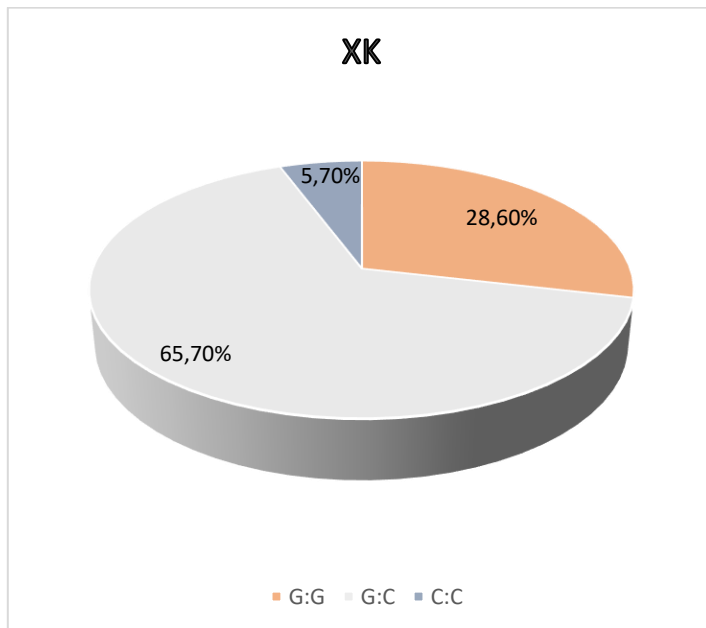
Γράφημα 14.
Κατανομή αλληλομόρφων του πολυμορφισμού rs2296956 του γονιδίου UCK1 στους ασθενείς με ΧΚ-ΜΔΣ

3.4.2 Κατανομή γονοτύπων

Στο σύνολο των ασθενών, για τον πολυμορφισμό rs2296956 του γονιδίου UCK1, τον ομόζυγο για το φυσικό γονότυπο G:G φέρει ποσοστό 27,8% (N=15). Ο ετερόζυγος γονότυπος G:C για το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο C εμφανίζεται σε ποσοστό 61,1% (N=33). Ο ομόζυγος για το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο γονότυπος C:C εμφανίζεται σε ποσοστό 11,1% (N=6). Στο σύνολο των ασθενών με ΥΚ-ΜΔΣ, τον ομόζυγο φυσικό γονότυπο G:G φέρει ποσοστό 26,3% (N=5). Ο ετερόζυγος γονότυπος G:C για το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο C εμφανίζεται σε ποσοστό 52,6% (N=10) και ο ομόζυγος για το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο C γονότυπος C:C σε ποσοστό 21% (N=4). (Γράφημα 15, Πίνακας 10) Στο σύνολο των ασθενών με ΧΚ-ΜΔΣ, τον ομόζυγο φυσικό γονότυπο G:G φέρει ποσοστό 28,6% (N=10). Ο ετερόζυγος γονότυπος G:C για το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο C εμφανίζεται σε ποσοστό 65,7% (N=23), ενώ ο ομόζυγος για το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο C γονότυπος C:C εμφανίζεται σε ποσοστό 5,7% (N=2) (Γράφημα 16, Πίνακας 10) Η παρουσία του πολυμορφισμού, όπως φάνηκε από τη στατιστική επεξεργασία δε φαίνεται να επηρεάζει το διαχωρισμό των ασθενών σε ΥΚ-ΜΔΣ και ΧΚ-ΜΔΣ. ($p=0.562$)



Γράφημα 15. Κατανομή γονοτύπων του πολυμορφισμού rs2296956 του γονιδίου UCK1 στους ασθενείς με ΥΚ-ΜΔΣ



Γράφημα 16. Κατανομή γονοτύπων του πολυμορφισμού rs2296956 του γονιδίου UCK1 στους ασθενείς με ΧΚ-ΜΔΣ

Πίνακας 9. Κατανομή αλληλόμορφων των πολυμορφισμών rs2296957, rs189473964, rs3904960, rs2296956 του γονοδίου UCK1 σε δείγμα ασθενών ΥΚ-ΜΔΣ και ΧΚ-ΜΔΣ.

	Αλληλόμορφο	Ασθενείς ΥΚ-ΜΔΣ (N=19)	Ασθενείς ΧΚ-ΜΔΣ (N=35)
rs2296957	T	37 (97,4%)	64 (91,4%)
	C	1 (2,6%)	6 (8,6%)
rs189473964	C	38 (100%)	69 (98,6%)
	T	-	1 (1,4%)
rs3904960	T	30 (79%)	47 (67,1%)
	G	8 (21%)	23 (32,9%)
rs2296956	G	20 (52,6%)	43 (61,4%)
	C	18 (47,3%)	27 (38,6%)

Πίνακας 10. Κατανομή των γονοτύπων των πολυμορφισμών rs2296957, rs189473964, rs3904960, rs2296956 του γονοδίου UCK1 σε δείγμα ασθενών ΥΚ-ΜΔΣ και ΧΚ-ΜΔΣ.

	Γονότυποι	Ασθενείς ΥΚ-ΜΔΣ (N=19)	Ασθενείς ΧΚ-ΜΔΣ (N=35)
rs2296957	T:T	18 (94,7%)	30 (85,7%)
	C:T	1 (5,3%)	4 (11,4)
	C:C	-	1 (2,9%)
rs189473964	C:C	19 (100%)	34 (97,1%)
	C:T	-	1 (2,9)
	T:T	-	-
rs3904960	G:G	1 (5,3%)	5 (14,2%)
	G:T	6 (31,6%)	13 (37,1%)
	T:T	12 (63,2%)	18 (51,4%)
rs2296956	G:G	5 (26,3%)	10 (28,6%)
	G:C	10 (52,6%)	23 (65,7%)
	C:C	4 (21%)	2 (5,7%)

3.5 Συσχέτιση κατανομής των γονοτύπων με την ολική επιβίωση των ασθενών

Για την εκτίμηση της ολικής επιβίωσης των ασθενών με ΜΔΣ ανάλογα με το γονότυπο που φέρουν, χρησιμοποιήθηκαν ως εργαλείο ανάλυσης οι καμπύλες Kaplan-Meier. Η ανάλυση έδειξε πως κανένας από τους υπό μελέτη γονοτύπους δε σχετίζεται σε στατιστικά σημαντικό βαθμό με τη συνολική επιβίωση στις ομάδες ασθενών που ελέγχθηκαν [rs2296957 ($p=0.358$), rs189473964 ($p=0.358$), rs3904960 ($p=0.256$), rs2296956 ($p=0.158$)].

3.6 Συσχέτιση κατανομής των γονοτύπων με την ανταπόκριση των ασθενών στη θεραπεία με 5-αζακυτιδίνη

Από το σύνολο των 54 ασθενών θεραπεία με 5-αζακυτιδίνη έλαβαν οι 27 από αυτούς, για τους οποίους υπήρχαν δεδομένα ανταπόκρισης. Έπειτα από στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων και σύγκριση των συχνοτήτων κατανομής των αλληλομόρφων και γονοτύπων, κανένας από τους πολυμορφισμούς δε φαίνεται να σχετίζεται με την ολική ανταπόκριση στη θεραπεία, παρά μόνο υποδηλώνεται μία τάση συσχέτισης του rs2296956 με τους ασθενείς που είχαν ολική ($N=1$), μερική ύφεση ($N=2$) της νόσου ή βελτίωση των αιματολογικών τους παραμέτρων ($N=1$) ($p=0.07$) Από τον πίνακα 11, για τον εν λόγω πολυμορφισμό προκύπτει πως ο σχετικός λόγος (Odds Ratio) είναι ίσος με 5.3, το οποίο σημαίνει πως υπάρχει η πιθανότητα ένα άτομο του δείγματος να είναι ετερόζυγος ή ομόζυγος για τον πολυμορφισμό δηλαδή να φέρει το αλληλόμορφο (C) και να ανταποκρίνεται στη θεραπεία είναι 5.3 φορές

μεγαλύτερη από το να ανταποκρίνεται στη θεραπεία και να μην είναι φορέας του αλληλόμορφου αυτού.

Πίνακας 11. Σύγκριση γονοτύπων (G:G vs G:C και C:C) για τον πολυμορφισμό rs2296956 του γονιδίου UCK1 στο δείγμα ασθενών με τα δεδομένα ανταπόκρισης στη θεραπεία με 5-αζακυτιδίνη

	Ασθενείς με ανταπόκριση στη θεραπεία	Ασθενείς χωρίς ανταπόκριση στη θεραπεία	OR	CI (95%)	p-value
G:G	3 (11.1%)	16 (59.3%)	5.33	0.83-34.09	0.07
G:C + C:C	4 (14.8%)	4 (14.8%)			

3.7 Παραμετρική συσχέτιση κατανομής των γονοτύπων με βασικές παραμέτρους της νόσου

3.7.1 Μεταγγίσεις ερυθρών αιμοσφαιρίων και αιμοπεταλίων

3.7.1.1 rs2296957

Από το συνολικό δείγμα ασθενών οι οποίοι έφεραν το πολυμορφικό αλληλόμορφο, ανάγκη μεταγγίσεων ερυθρών αιμοσφαιρίων εμφάνισε το 47,2% (N=25), καθώς επίσης και ο ένας ασθενής με το φυσιολογικό γονότυπο. Αντίστοιχα, μεταγγίσεις αιμοπεταλίων χρειάστηκε το 9,4% (N=5) των ασθενών με το πολυμορφικό αλληλόμορφο, ενώ ο ένας ασθενής με το φυσιολογικό γονότυπο δεν προχώρησε σε μεταγγιση αιμοπεταλίων. Από τη στατιστική ανάλυση δεν προέκυψε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στην παρουσία του πολυμορφισμού και τόσο την ανάγκη μετάγγισης ερυθρών αιμοσφαιρίων ($p=0.542$) όσο και την ανάγκη μετάγγισης αιμοπεταλίων ($p=0.907$)

3.7.1.2 rs189473964

Αντίστοιχα ποσοστά με αυτά για τον πολυμορφισμό rs2296957, ανέδειξε η στατιστική ανάλυση για τον rs189473964 σχετικά με την ανάγκη μεταγγίσεων ερυθρών αιμοσφαιρίων. Μεταγγίσεις αιμοπεταλίων πραγματοποιήθηκαν σε ποσοστό 9,4% (N=5) των ασθενών που φέρουν το φυσιολογικό αλληλόμορφο, ενώ κανένας από τους ασθενείς με τον πολυμορφισμό δε χρειάστηκε μετάγγιση αιμοπεταλίων. Ωστόσο, από την ανάλυση δε φάνηκε να επηρεάζει η παρουσία του πολυμορφισμού την ανάγκη μεταγγίσεων ερυθρών αιμοσφαιρίων ($p=0.542$) και αιμοπεταλίων ($p=0.907$) (Πίνακας 12)

3.7.1.3 rs3904960

Το σύνολο των ασθενών με φυσιολογικό γονότυπο (N=6) χρειάστηκε μεταγγίση ερυθρών αιμοσφαιρίων, ενώ αντίστοιχα από τους ασθενείς που φέρουν τον πολυμορφισμό, το 47,6% (N=20) εμφάνισε ανάγκη μεταγγίσεων. Η στατιστική ανάλυση ανέδειξε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ της παρουσίας του πολυμορφισμού και της ανάγκης μεταγγίσεων ερυθρών αιμοσφαιρίων ($p=0.03$), προσδίδοντας προστατευτικό ρόλο στον πολυμορφικό γονότυπο ενώ δε συνέβη το ίδιο με την ανάγκη μεταγγίσεων αιμοπεταλίων ($p=0.541$) (Πίνακας 12)

3.7.1.4 rs2296956

Σχετικά με τον πολυμορφισμό rs2296956 από το σύνολο των ασθενών οι οποίοι δεν εμφάνισαν ανάγκη μεταγγίσεων ερυθρών αιμοσφαιρίων, το 68,8% (N=15) έφερε το πολυμορφικό αλληλόμορφο και αντίστοιχα το 69,3% (N=18) των ασθενών με ανάγκη μετάγγισης. ($p=0.591$) Το 71,4% (N=35) των ασθενών χωρίς ανάγκη μετάγγισης αιμοπεταλίων έφεραν τον πολυμορφισμό και το 80% (N=4) όσων χρειάστηκαν μετάγγιση ($p=0.572$) (Πίνακας 12)

3.8 Σχετικοί λόγοι κατανομής γονοτύπων των πολυμορφισμών.

Για τους πολυμορφισμούς rs2296957 και rs189473964 η πιθανότητα ένας ασθενής να έχει ανάγκη μεταγγίσεων ερυθρών αιμοσφαιρίων και να είναι ομόζυγος ή ετερόζυγος για τους πολυμορφισμούς είναι 1.14 φορές μεγαλύτερη από την πιθανότητα να έχει ανάγκη μεταγγίσεων και να μη φέρει το αλληλόμορφο. Αντίστοιχα για τον rs189473964 και την ανάγκη μεταγγίσεων αιμοπεταλίων η πιθανότητα είναι 4.8 φορές μεγαλύτερη από την πιθανότητα να έχει ανάγκη μεταγγίσεων και να μη φέρει το αλληλόμορφο. Για

τον πολυμορφισμό rs2296956 η πιθανότητα ένα άτομο να έχει ανάγκη μεταγγίσεων ερυθρών αιμοσφαιρίων και αιμοπεταλίων και να είναι ομόζυγος ή ετερόζυγος για τον πολυμορφισμό είναι 1.05 και 1.6 φορές μεγαλύτερη από την πιθανότητα να έχει ανάγκη μεταγγίσεων και να μη φέρει το αλληλόμορφο. Ωστόσο, τα αποτελέσματα όπως φάνηκε από τα p-values δεν κατέδειξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές. (Πίνακας 12)

3.9 Μη παραμετρική συσχέτιση των γονοτύπων με αιματολογικούς δείκτες

Για τη σύγκριση των επιπέδων παραμέτρων όπως η ηλικία στη διάγνωση, η αιμοσφαιρίνη, ο μέσος όγκος ερυθρών αιμοσφαιρίων, ο απόλυτος αριθμός λευκών αιμοσφαιρίων, αιμοπεταλίων, ουδετερόφιλων, μονοκυττάρων και λεμφοκυττάρων με την παρουσία των υπο μελέτη πολυμορφισμών στο σύνολο των ασθενών με ΜΔΣ χρησιμοποιήθηκε το Mann-Whitney U test. Κανένας από τους παραπάνω παράγοντες δε συσχετίστηκε με την παρουσία των πολυμορφισμών.

Πίνακας 12. Σύγκριση κατανομής των γονοτύπων των πολυμορφισμών rs2296957, rs189473964, rs3904960 και rs2296956 του γονιδίου UCK1 στο δείγμα ασθενών με την ανάγκη μεταγγίσεων ερυθρών αιμοσφαιρίων και αιμοπεταλίων.

	Μεταγγίσεις RBC			Μεταγγίσεις PLT		
	OR	CI (95%)	p-value	OR	CI (95%)	p-value
rs2296957	1.14	0.07-19.26	0.931	-	-	-
rs189473964	1.14	0.05-14.92	0.962	4.8	0.37-62.79	0.23
rs3904960	-	-	-	-	-	-
rs2296956	1.05	0.31-3.57	0.937	1.6	0.16-15.6	0.686

4 Συζήτηση

Η αναζήτηση και εύρεση γενετικών παραγόντων στο γονιδίωμα των ασθενών με ΜΔΣ μπορεί να συνδράμουν στη διαμόρφωση του γενετικού τους προφίλ και να επηρεάσουν την ανταπόκριση τους στη φαρμακευτική αγωγή. Ο εντοπισμός τους μπορεί να συμβάλει στην πρόγνωση και τη βέλτιστη αντιμετώπισή της. Η ένταξη τους στην κλινική πρακτική μπορεί να διευκολύνει επίσης στην εύρεση του κατάλληλου δοσολογικού σχήματος για τον εκάστοτε ασθενή. Στην παρούσα εργασία συμμετείχαν 54 ασθενείς με ΜΔΣ, 23 από τους οποίους έλαβαν θεραπεία με 5-αζακυτιδίνη. Μελετήθηκε η κατανομή των πολυμορφισμών rs2296957, rs189473964, rs3904960 και rs2296956 του γονιδίου *UCK1*, το οποίο ενεργοποιεί το μεταβολισμό της αζακυτιδίνης στα κύτταρα, σε ασθενείς με ΥΚ-ΜΔΣ και ΧΚ-ΜΔΣ, καθώς και η συσχέτιση τους με τα βασικά χαρακτηριστικά των ασθενών, τις αιματολογικές τους παραμέτρους, την ανταπόκριση στη θεραπεία και την πρόγνωση των ασθενών. [87] Η επιλογή των συγκεκριμένων πολυμορφισμών βασίστηκε στην υπάρχουσα διεθνή βιβλιογραφία. [85] Σε μελέτη διερεύνησης των μοριακών γεγονότων που οδηγούν στη διαφορική έκφραση του *UCK1* και στο κατά πόσο αυτή επηρεάζεται από την παρουσία διαφορετικών γονιδιακών αλληλομόρφων, πραγματοποιήθηκε αλληλούχιση του γονιδίου η οποία ανέδειξε τους υπό μελέτη γενετικούς τόπους. [85] Ωστόσο, η συγκεκριμένη μελέτη [85] αποτελεί τη μόνη αναφορά στην πιθανή επίδραση των πολυμορφισμών του *UCK1* στην ανταπόκριση στη θεραπεία με 5-αζακυτιδίνη. Για αυτό το λόγο και για το γεγονός πως το γονίδιο *UCK1* εμπλέκεται άμεσα στην πρώτη κρίσιμη φάση ενεργοποίησης των ΝΑ, στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε περαιτέρω ανάλυση και επιπλέον σύγκριση των πολυμορφισμών με τις βασικές

αιματολογικές και μη παραμέτρους της νόσου. Η μελέτη αυτών των πολυμορφισμών εντάσσεται στη γενικότερη φαρμακογονιδιωματική προσέγγιση, όπου οι γενετικές πληροφορίες χρησιμοποιούνται για τη βελτιστοποίηση των θεραπειών με βάση το ατομικό γονιδιακό προφίλ. Η διευρεύνηση και κατανόηση της δράσης των πολυμορφισμών μπορεί να βοηθήσει στην πρόβλεψη της ατομικής ανταπόκρισης στη θεραπεία και στη βελτιστοποίηση της διαχείρισης των ασθενών, καλύπτοντας σε ένα βαθμό το κενό που υπάρχει στην καθημερινή κλινική πράξη.

Η πρόγνωση των ασθενών που πάσχουν από ΜΔΣ εμφανίζει σημαντική ετερογένεια με ορισμένους ασθενείς να ζουν αρκετά έτη μετά τη διάγνωση, ενώ άλλους να ζουν μόνο μερικούς μήνες, παρά τη χορήγηση θεραπείας. [103] Τα αποτελέσματα της μελέτης μας έδειξαν πως η παρουσία των πολυμορφισμών δε φαίνεται να σχετίζεται άμεσα με την ταξινόμηση των ασθενών σε ΥΚ-ΜΔΣ και ΧΚ-ΜΔΣ, καθώς η στατιστική ανάλυση δεν κατέδειξε σημαντικές διαφορές. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε ένα βαθμό στον πολυπαραγοντικό χαρακτήρα της νόσου, καθώς διαφορετικοί γενετικοί και επιγενετικοί παράγοντες επηρεάζουν την παθοφυσιολογία της. Οι παράγοντες που καθορίζουν τη διαστρωμάτωση κινδύνου στα ΜΔΣ μπορεί να εξαρτώνται από άλλες «μοριακές υπογραφές» και όχι από την ύπαρξη πολυμορφισμών του *UCK1*. Ωστόσο, τα αποτελέσματα της περιγραφικής ανάλυσης και της κατανομής των γονοτύπων, έδειξαν πως για τον πολυμορφισμό rs2296957 όλοι οι ασθενείς ΥΚ-ΜΔΣ ήταν ομόζυγοι ή ετερόζυγοι για το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο (T), ενώ κανένας από αυτούς δεν έφερε το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο (T) για τον πολυμορφισμό rs189473964. Αυτά τα αποτελέσματα μπορεί να οφείλονται στη φυσική ποικιλότητα και τις στατιστικές αποκλίσεις που υπάρχουν σε μικρά δείγματα,

υποδηλώνοντας τυχαίο εύρημα ή αδύναμη συσχέτιση, χωρίς να είναι επαρκή, για να θεωρηθεί η παρουσία ή η απουσία των μεταλλαγμένων αλληλομόρφων παράγοντας κινδύνου. Αυτές οι ενδείξεις απαιτούν περαιτέρω διερεύνηση σε μεγαλύτερο δείγμα ασθενών για να διαπιστωθεί η πραγματική τους επίδραση. Έχει αποδειχθεί ότι περίπου 40% ως 60% των ασθενών με ΥΚ-ΜΔΣ εμφανίζουν ευνοϊκή ανταπόκριση στη θεραπεία με 5-αζακυτιδίνη ή δεσιταμπίνη. [104, 105, 54, 106] Το γονίδιο UCK1 κωδικοποιεί ένα ένζυμο κρίσιμο για τον μεταβολισμό της 5-αζακυτιδίνης. Η 5-αζακυτιδίνη, ως νουκλεοσιδικό ανάλογο φωσφορυλιώνεται για να μετατραπεί στη δραστική της μορφή, μια διαδικασία στην οποία εμπλέκεται το *UCK1*. Οι πολυμορφισμοί του γονιδίου UCK1, όπως οι rs2296957, rs189473964, rs3904960, και rs2296956, μπορεί να επηρεάσουν την αποτελεσματικότητα αυτού του ενζύμου και, κατά συνέπεια, τον μεταβολισμό της 5-αζακυτιδίνης και την ανταπόκριση του ασθενούς στη θεραπεία. Στην παρούσα μελέτη, στο σύνολο των ασθενών, παρατηρήθηκε μια τάση συσχέτισης του πολυμορφισμού rs2296956 με την ανταπόκριση στη θεραπεία με 5-αζακυτιδίνη ($p=0.07$), υποδηλώνοντας ότι ενδέχεται να έχει ρυθμιστικό ρόλο στη φωσφορυλίωση της, επηρεάζοντας τη θεραπευτική της δράση και την ανταπόκριση ορισμένων ασθενών, αν και τα αποτελέσματα δεν είναι στατιστικά σημαντικά, κάτι που μπορεί να οφείλεται στο σχετικά χαμηλό αριθμό ασθενών που έλαβαν θεραπεία με 5-αζακυτιδίνη. Αυτή η ένδειξη απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση με μεγαλύτερο δείγμα για την επιβεβαίωση αυτής της τάσης. Ασθενείς με πολυμορφισμούς που μειώνουν τη δραστηριότητα του ενζύμου μπορεί να εμφανίζουν χαμηλότερη βιομετατροπή της 5-αζακυτιδίνης, με αποτέλεσμα τη μειωμένη θεραπευτική ανταπόκριση. Αντίθετα, αυξημένη δραστηριότητα του ενζύμου μπορεί να συσχετίζεται με

καλύτερη ανταπόκριση στη θεραπεία. Γενετικές παραλλαγές στα γονίδια που εμπλέκονται στον μεταβολισμό της 5-αζακυτιδίνης θα μπορούσαν να επηρεάσουν την ανταπόκριση στη θεραπεία. Σε πρόσφατη εργασία βρέθηκε ότι ασθενείς ΜΔΣ με χαμηλά mRNA επίπεδα RRM1, του ενζύμου που είναι υπεύθυνο για την παραγωγή δεοξυριβονουκλεοτιδίων και συμμετέχει στο μεταβολισμό του φαρμάκου, έχουν καλύτερη ανταπόκριση στην 5-αζακυτιδίνη. [107] Αυτή η συσχέτιση έχει θεωρητική βάση, καθώς η αναστολή του ενζύμου οδηγεί σε μείωση των επιπέδων των δεοξυριβονουκλεοτιδίων, το οποίο επηρεάζει τη σύνθεση και επιδιόρθωση του DNA. Αντίστοιχα, θα μπορούσε να διερευνηθεί κατά πόσο η παρουσία μεταλλάξεων σε συγκεκριμένα σημεία του *UCK1* μπορούν να επηρεάσουν τη φωσφορυλίωση της 5-αζακυτιδίνης και άρα τη θεραπευτική της δράση. Ωστόσο, σε άλλη μελέτη [85] δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση των πολυμορφισμών του *UCK1* με την ανταπόκριση στη θεραπεία, γεγονός που υποδεικνύει ότι οι συσχετίσεις αυτές ενδέχεται να εξαρτώνται από το ευρύτερο γονιδιακό περιβάλλον ή άλλους επιγενετικούς παράγοντες.

Από την ανάλυση επιβίωσης με τη μέθοδο Kaplan-Meier, φάνηκε ότι οι πολυμορφισμοί δεν συσχετίστηκαν με την ολική επιβίωση στους ασθενείς με ΜΔΣ. Πρόκειται για ένα εύρημα με θεωρητική βάση, καθώς είναι μάλλον απίθανο να επηρεαστεί η ολική επιβίωση των ασθενών εφόσον δεν επηρεάζεται στατιστικώς σημαντικά η ανταπόκριση στη θεραπεία. Αυτό μπορεί να σημαίνει ότι η παρουσία των συγκεκριμένων γονοτύπων των πολυμορφισμών του *UCK1* δεν επηρεάζουν το βήμα της διαδικασίας μεταβολισμού του φαρμάκου που παρεμβαίνει το *UCK1* και άρα δεν είναι καθοριστικό για την κλινική δράση του παράγοντα.

Σημαντικό φαίνεται να είναι το αποτέλεσμα από τη μελέτη της συσχέτισης των πολυμορφισμών με την ανάγκη για μεταγγίσεις. Συγκεκριμένα, η παρουσία του rs3904960 βρέθηκε να σχετίζεται στατιστικά σημαντικά με την ανάγκη μεταγγίσεων ερυθρών αιμοσφαιρίων ($p=0.03$) υποδηλώνοντας πως οι ασθενείς που φέρουν το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο ενδέχεται να έχουν μειωμένη ανάγκη για μεταγγίσεις. Ωστόσο, από τα αποτελέσματά μας δε φάνηκε να υπάρχει συσχέτιση με τα αρχικά επίπεδα αιμοσφαιρίνης, κάτι που θα ήταν αναμενόμενο, καθώς μεταγγίσεις χρειάζονται ασθενείς με χαμηλότερη αιμοσφαιρίνη. Παρότι δεν υπήρχε τέτοιου είδους συσχέτιση, αυτή η ανάγκη για μεταγγίσεις μπορεί να σχετίζεται με την ταχύτητα εξέλιξης της νόσου. Το εύρημα αυτό είναι σημαντικό για την κατανόηση της επίδρασης των γονιδιακών πολυμορφισμών στην εξέλιξη της νόσου και στην κλινική αντιμετώπιση των ασθενών με ΜΔΣ, καθώς μπορεί να οδηγήσει σε πιο εξατομικευμένες θεραπείες με βάση το γενετικό τους προφίλ.

Τέλος, φάνηκε ότι οι παράμετροι που εξετάστηκαν, όπως η ηλικία διάγνωσης, η αιμοσφαιρίνη, ο απόλυτος αριθμός λευκών αιμοσφαιρίων και αιμοπεταλίων, δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των γονότυπων, υποδηλώνοντας ότι οι συγκεκριμένοι πολυμορφισμοί δεν επηρεάζουν τις βασικές παραμέτρους, τουλάχιστον στο δείγμα που μελετήθηκε και τουλάχιστον στην έναρξη της νόσου για την οποία έχουμε καταγεγραμμένα δεδομένα.

Οι περιορισμοί της συγκεκριμένης μελέτης οι οποίοι μπορεί να ερμηνεύουν σε ένα βαθμό τη μη στατιστική σημαντικότητα κάποιων αποτελεσμάτων, αφορούν στο μικρό μέγεθος δείγματος, την ετερογένεια της νόσου, αλλά και τη γενετική ετερογένεια των ασθενών, καθώς οι γενετικοί πολυμορφισμοί μπορεί να έχουν

διαφορετικές επιπτώσεις σε διαφορετικές υποομάδες ασθενών. Η έλλειψη μοριακών δεδομένων NGS από τους ασθενείς στερεί πληροφορίες σχετικά με τις γενετικές μεταλλάξεις και τη δυνατότητα ακριβούς εκτίμησης του προγνωστικού κινδύνου και άρα την καθοδήγηση της κατάλληλης θεραπευτικής στρατηγικής. Επιπλέον, οι πολυμορφισμοί του γονιδίου ενδέχεται να επηρεάζουν τη φαρμακοδυναμική και τη φαρμακοκινητική της 5-αζακυτιδίνης. Ο μεταβολισμός της 5-αζακυτιδίνης επηρεάζει την ανταπόκριση στη θεραπεία, αλλά αυτό δεν σημαίνει απαραίτητα ότι θα επηρεάσει την πρόγνωση ή τη βαρύτητα της νόσου, όπως ανακλάται στην κατηγοριοποίηση σε ΥΚ-ΜΔΣ και ΧΚ-ΜΔΣ.

Συνοψίζοντας, η μελέτη της κατανομής των πολυμορφισμών του γονιδίου UCK1 σε ασθενείς με ΜΔΣ ανέδειξε ορισμένα ενδιαφέροντα ευρήματα, αν και τα περισσότερα από αυτά δεν ήταν στατιστικά σημαντικά. Ο προστατευτικός ρόλος που φαίνεται να προσδίδουν οι γονότυποι για το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο του rs3904960 ως προς την ανάγκη για μεταγγίσεις ερυθρών αιμοσφαιρίων αποτελεί σημαντικό εύρημα, ενώ η τάση που παρατηρήθηκε για τον πολυμορφισμό rs2296956 στην ανταπόκριση στη θεραπεία χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.

Τα δεδομένα της ανάλυσης επιβίωσης δεν έδειξαν σημαντικές διαφορές στην επιβίωση των ασθενών ανάλογα με τους γονότυπους, ενώ η μη συσχέτιση των αιματολογικών παραμέτρων με τους πολυμορφισμούς, δείχνει ότι οι πολυμορφισμοί αυτοί δεν επηρεάζουν τις βασικές αιματολογικές παραμέτρους. Μελλοντικές μελέτες, με μεγαλύτερο δείγμα και πιο λεπτομερή γενετική ανάλυση, θα μπορούσαν να αυξήσουν την ισχύ της μελέτης και να επιτρέψουν την καλύτερη κατανόηση των πιθανών επιδράσεων αυτών των

πολυμορφισμών. Η διερεύνηση συνδυαστικών επιδράσεων διαφόρων πολυμορφισμών που αφορούν τον μεταβολισμό της 5-αζακυτιδίνης θα μπορούσε να είναι αντικείμενο μελλοντικής έρευνας, καθώς οι πολυμορφισμοί του *UCK1* θα μπορούσαν να αλληλεπιδρούν με άλλους γενετικούς παράγοντες και να επηρεάζουν συνολικά την πορεία της νόσου και την ανταπόκριση στη θεραπεία. Μια πιο ολοκληρωμένη προσέγγιση που θα περιλαμβάνει την ανάλυση επιγενετικών τροποποιήσεων και περιβαλλοντικών παραγόντων θα μπορούσε να βοηθήσει στην καλύτερη κατανόηση της πολύπλοκης σχέσης μεταξύ γενετικών πολυμορφισμών και ΜΔΣ, οδηγώντας στη δημιουργία εξατομικευμένων θεραπευτικών στρατηγικών.

5 Βιβλιογραφία

- ¹ Kurzrock R. Myelodysplastic syndrome overview. *Semin Hematol.* 2002 Jul;39(3 Suppl 2):18-25. doi: 10.1053/shem.2002.35981. PMID: 12214289.
- ² Bennett JM, Catovsky D, et al. Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol.* 1982 Jun;51(2):189-99.
- ³ Tefferi A, Vardiman JW. Myelodysplastic syndromes. *N Engl J Med.* 2009 Nov 5;361(19):1872-85.
- ⁴ Wang F, Ni J, Wu L, Wang Y, He B, Yu D. Gender disparity in the survival of patients with primary myelodysplastic syndrome. *J Cancer.* 2019 Jan 30;10(5):1325-1332.
- ⁵ Mufti GJ, McLornan DP, van de Loosdrecht AA, Germing U, Hasserjian RP. Diagnostic algorithm for lower-risk myelodysplastic syndromes. *Leukemia.* 2018 Aug;32(8):1679-1696.
- ⁶ Ma X. Epidemiology of myelodysplastic syndromes. *Am J Med.* 2012 Jul;125(7 Suppl):S2-5.
- ⁷ Aul C, Giagounidis A, et al. Epidemiological features of myelodysplastic syndromes: results from regional cancer surveys and hospital-based statistics. *Int J Hematol.* 2001 Jun;73(4):405-410.
- ⁸ Nisse C, Haguenoer JM, Grandbastien B, Preudhomme C, Fontaine B, Brillet JM, Lejeune R, Fenaux P. Occupational and environmental risk factors of the myelodysplastic syndromes in the North of France. *Br J Haematol.* 2001 Mar;112(4):927-35.
- ⁹ Finch SC. Myelodysplasia and radiation. *Radiat Res.* 2004 May;161(5):603-6.
- ¹⁰ de Witte T, Bowen D, et al. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for MDS and CMML: recommendations from an international expert panel. *Blood.* 2017 Mar 30;129(13):1753-1762.
- ¹¹ Rund D, Ben-Yehuda D. Therapy-related leukemia and myelodysplasia: evolving concepts of pathogenesis and treatment. *Hematology.* 2004 Jun;9(3):179-87.
- ¹² Calvi LM, Li AJ, et al. What is the role of the microenvironment in MDS? *Best Pract Res Clin Haematol.* 2019 Dec;32(4):101113. doi: 10.1016/j.beha.2019.101113.
- ¹³ Li AJ, Calvi LM. The microenvironment in myelodysplastic syndromes: Niche-mediated disease initiation and progression. *Exp Hematol.* 2017 Nov;55:3-18.
- ¹⁴ Vardiman J. The classification of MDS: from FAB to WHO and beyond. *Leuk Res.* 2012 Dec;36(12):1453-8. doi: 10.1016/j.leukres.2012.08.008.
- ¹⁵ Nösslinger T, Reisner R, et al. Myelodysplastic syndromes, from French-American-British to World Health Organization: comparison of classifications on 431 unselected patients from a single institution. *Blood.* 2001 Nov 15;98(10):2935-41.
- ¹⁶ Germing U, Strupp C, Kuendgen A, Aivado M, Giagounidis A, Hildebrandt B, Aul C, Haas R, Gattermann N. Refractory anaemia with excess of blasts (RAEB): analysis of reclassification according to the WHO proposals. *Br J Haematol.* 2006 Jan;132(2):162-7.

-
- ¹⁷ Hong M, He G. The 2016 Revision to the World Health Organization Classification of Myelodysplastic Syndromes. *J Transl Int Med*. 2017 Sep 30;5(3):139-143.
- ¹⁸ Zhang Y, Wu J, et al. Comparison of the revised 4th (2016) and 5th (2022) editions of the World Health Organization classification of myelodysplastic neoplasms. *Leukemia*. 2022 Dec;36(12):2875-2882.
- ¹⁹ Bernard E, Nannya Y, et al. Implications of TP53 allelic state for genome stability, clinical presentation and outcomes in myelodysplastic syndromes. *Nat Med*. 2020 Oct;26(10):1549-1556. doi: 10.1038/s41591-020-1008-z. Epub 2020 Aug 3. Erratum in: *Nat Med*. 2021 Mar;27(3):562. Erratum in: *Nat Med*. 2021 May;27(5):927.
- ²⁰ Malcovati L, Stevenson K, et al. SF3B1-mutant MDS as a distinct disease subtype: a proposal from the International Working Group for the Prognosis of MDS. *Blood*. 2020 Jul 9;136(2):157-170.
- ²¹ Arber DA, Orazi A, et al. International Consensus Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemias: integrating morphologic, clinical, and genomic data. *Blood*. 2022 Sep 15;140(11):1200-1228
- ²² Hasserjian RP, Orazi A, et al. The International Consensus Classification of myelodysplastic syndromes and related entities. *Virchows Arch*. 2023 Jan;482(1):39-51.
- ²³ Alaggio R, Amador C, et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Lymphoid Neoplasms. *Leukemia*. 2022 Jul;36(7):1720-1748.
- ²⁴ Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, Fenaux P, Morel P, Sanz G, et al. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood*. 1997 Mar 15;89(6):2079–88.
- ²⁵ Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J, Sanz G, Garcia-Manero G, Solé F, et al. Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2012 Sep 20;120(12):2454–65
- ²⁶ Malcovati L, Germing U, Kuendgen A, Della Porta MG, Pascutto C, Invernizzi R, et al. Time-dependent prognostic scoring system for predicting survival and leukemic evolution in myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2007 Aug 10;25(23):3503–10
- ²⁷ Bernard E, Tuechler H, Greenberg PL, et al. Molecular International Prognostic Scoring System for Myelodysplastic Syndromes. *NEJM Evid*. 2022 Jul;1(7):EVIDoa2200008.
- ²⁸ Visconte V, Tiu RV, et al. Pathogenesis of myelodysplastic syndromes: an overview of molecular and non-molecular aspects of the disease. *Blood Res*. 2014 Dec;49(4):216–27.
- ²⁹ Wang C, Yang Y, et al. Immune dysregulation in myelodysplastic syndrome: Clinical features, pathogenesis and therapeutic strategies. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2018 Feb;122:123-132.
- ³⁰ Aleshin A, Greenberg PL. Molecular pathophysiology of the myelodysplastic syndromes: insights for targeted therapy. *Blood Adv*. 2018 Oct 23;2(20):2787-2797.

-
- ³¹ Chiereghin C, Travaglino E, Zampini M, Saba E, Saitta C, Riva E, Bersanelli M, Della Porta MG. The Genetics of Myelodysplastic Syndromes: Clinical Relevance. *Genes (Basel)*. 2021 Jul 27;12(8):1144.
- ³² Kontandreopoulou CN, Kalopisis K, et al. The genetics of myelodysplastic syndromes and the opportunities for tailored treatments. *Front Oncol*. 2022 Oct 20;12:989483.
- ³³ Shallis RM, Ahmad R, Zeidan AM. The genetic and molecular pathogenesis of myelodysplastic syndromes. *Eur J Haematol*. 2018 Sep;101(3):260-271.
- ³⁴ Ning Y, Zhang Y, et al. Cytogenetics and molecular genetics of myelodysplastic neoplasms. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2023 Dec;36(4):101512.
- ³⁵ Huber S, Haferlach T, et al. SF3B1 mutated MDS: Blast count, genetic co-abnormalities and their impact on classification and prognosis. *Leukemia*. 2022 Dec;36(12):2894-2902.
- ³⁶ Malcovati L, Stevenson K, et al. SF3B1-mutant MDS as a distinct disease subtype: a proposal from the International Working Group for the Prognosis of MDS. *Blood*. 2020 Jul 9;136(2):157-170.
- ³⁷ Patnaik MM, Lasho T. Myelodysplastic syndrome/myeloproliferative neoplasm overlap syndromes: a focused review. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2020 Dec 4;2020(1):460-464.
- ³⁸ Bejar R. How do molecular aberrations guide therapy in MDS? *Best Pract Res Clin Haematol*. 2021 Dec;34(4):101324.
- ³⁹ Papaemmanuil E, Gerstung M, et al. Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2013 Nov 21;122(22):3616-27; quiz 3699.
- ⁴⁰ Portela A, Esteller M. Epigenetic modifications and human disease. *Nat Biotechnol*. 2010 Oct;28(10):1057-68
- ⁴¹ Kim M, Costello J. DNA methylation: an epigenetic mark of cellular memory. *Exp Mol Med*. 2017 Apr 28;49(4):e322.
- ⁴² Kulis M, Esteller M. DNA methylation and cancer. *Adv Genet*. 2010;70:27-56.
- ⁴³ Itzykson R, Fenaux P. Epigenetics of myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. 2014 Mar;28(3):497-506.
- ⁴⁴ Jiang Y, Dunbar A, Gondek LP, Mohan S, Rataul M, O'Keefe C, et al. Aberrant DNA methylation is a dominant mechanism in MDS progression to AML. *Blood*. 2009 Feb 5;113(6):1315-25.
- ⁴⁵ Khan H, Vale C, Bhagat T, Verma A. Role of DNA methylation in the pathogenesis and treatment of myelodysplastic syndromes. *Semin Hematol*. 2013 Jan;50(1):16-37.
- ⁴⁶ Me F, L S, et al. MDS and secondary AML display unique patterns and abundance of aberrant DNA methylation [Internet]. Vol. 114, *Blood*. *Blood*; 2009 [cited 2021 Jan 11]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19652201/>
- ⁴⁷ Kontandreopoulou CN, Diamantopoulos PT, et al. Bone marrow ribonucleotide reductase mRNA levels and methylation status as prognostic factors in patients with myelodysplastic syndrome treated with 5-Azacytidine. *Leuk Lymphoma*. 2022 Mar;63(3):729-737.

-
- ⁴⁸ Greenberg, P, Stone et al. NCCN Guidelines® Insights: Myelodysplastic Syndromes, Version 3.2022. *J Natl Compr Canc Netw* 20, 106–117.
- ⁴⁹ Fenaux, P., Platzbecker, U et al. Luspatercept in Patients with Lower-Risk Myelodysplastic Syndromes. *N Engl J Med* 382, 2020, 140–151.
- ⁵⁰ Fenaux P, Mufti GJ, et al. Efficacy of azacitidine compared with that of conventional care regimens in the treatment of higher-risk myelodysplastic syndromes: a randomised, open-label, phase III study. *Lancet Oncol.* 2009 Mar;10(3):223-32.
- ⁵¹ Sato T, Issa JJ, et al. DNA Hypomethylating Drugs in Cancer Therapy. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2017 May 1;7(5):a026948.
- ⁵² Stein EM, Bonifacio G, et al. Treatment patterns and outcomes in patients with myelodysplastic syndromes treated with hypomethylating agents: a SEER-Medicare analysis. *Leuk Lymphoma.* 2021 Jun;62(6):1411-1421.
- ⁵³ Prébet T, Gore SD, et al. Outcome of high-risk myelodysplastic syndrome after azacitidine treatment failure. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2011 Aug 20;29(24):3322–7.
- ⁵⁴ Germing, U., Schroeder, et al. 2019. Novel therapies in low- and high-risk myelodysplastic syndrome. *Expert Rev Hematol* 12,893–908.
- ⁵⁵ Greenberg, P.L., Garcia-Manero, G., et al. 2013. A randomized controlled trial of romiplostim in patients with lower intermediate-risk myelodysplastic syndrome receiving decitabine. *Leuk Lymphoma*,54, 321–328.
- ⁵⁶ Platzbecker, U., 2019. Treatment of MDS. *Blood* 133, 1096–1107.
- ⁵⁷ Issa JP. Epigenetic changes in the myelodysplastic syndrome. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2010 Apr;24(2):317-30.
- ⁵⁸ Sigalotti L, Fratta E, Coral S, Cortini E, Covre A, Nicolay HJM, et al. Epigenetic drugs as pleiotropic agents in cancer treatment: biomolecular aspects and clinical applications. *J Cell Physiol.* 2007 Aug;212(2):330–44.
- ⁵⁹ Issa JP, Kantarjian HM. Targeting DNA methylation. *Clin Cancer Res.* 2009 Jun 15;15(12):3938-46. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-2783. Epub 2009 Jun 9. PMID: 19509174; PMCID: PMC2732562.
- ⁶⁰ Götze K, Müller-Thomas C, Peschel C. The role of azacitidine in the management of myelodysplastic syndromes (MDS). *Cancer Manag Res.* 2009 Oct 9;1:119-30. doi: 10.2147/cmr.s4721. PMID: 21188130; PMCID: PMC3004663.
- ⁶¹ Derissen EJ, Beijnen JH, Schellens JH. Concise drug review: azacitidine and decitabine. *Oncologist.* 2013;18(5):619-24.
- ⁶² Odenike O. Incorporating novel approaches in the management of MDS beyond conventional hypomethylating agents. *Hematol Am Soc Hematol Educ Program.* 2017 Dec 8;2017(1):460–9.
- ⁶³ Voso MT, Santini V, et al. Why methylation is not a marker predictive of response to hypomethylating agents. *Haematologica.* 2014 Apr;99(4):613–9.

-
- ⁶⁴ Stresemann C, Bokelmann I, et al. Azacytidine causes complex DNA methylation responses in myeloid leukemia. *Mol Cancer Ther.* 2008 Sep;7(9):2998–3005.
- ⁶⁵ Li H, Chiappinelli KB, Guzzetta AA, Easwaran H, Yen R-WC, Vatapalli R, et al. Immune regulation by low doses of the DNA methyltransferase inhibitor 5-azacytidine in common human epithelial cancers. *Oncotarget.* 2014 Feb 15;5(3):587–98
- ⁶⁶ Sánchez-Abarca LI, Gutierrez-Cosio S, Santamaría C, Caballero-Velazquez T, Blanco B, Herrero-Sánchez C, et al. Immunomodulatory effect of 5-azacytidine (5-azaC): potential role in the transplantation setting. *Blood.* 2010 Jan 7;115(1):107–21.
- ⁶⁷ Choi J, Ritchey J, Prior JL, Holt M, Shannon WD, Deych E, et al. In vivo administration of hypomethylating agents mitigate graft-versus-host disease without sacrificing graft-versusleukemia. *Blood.* 2010 Jul 8;116(1):129–39
- ⁶⁸ Bontkes HJ, Ruben JM, Alhan C, Westers TM, Ossenkoppele GJ, van de Loosdrecht AA. Azacytidine differentially affects CD4(pos) T-cell polarization in vitro and in vivo in high risk myelodysplastic syndromes. *Leuk Res.* 2012 Jul;36(7):921–30.
- ⁶⁹ Ørskov AD, Treppendahl MB, Skovbo A, Holm MS, Friis LS, Hokland M, et al. Hypomethylation and up-regulation of PD-1 in T cells by azacytidine in MDS/AML patients: A rationale for combined targeting of PD-1 and DNA methylation. *Oncotarget.* 2015 Apr 20;6(11):9612–26.
- ⁷⁰ Topper MJ, Vaz M, Marrone KA, Brahmer JR, Baylin SB. The emerging role of epigenetic therapeutics in immuno-oncology. *Nat Rev Clin Oncol.* 2020 Feb;17(2):75–90.
- ⁷¹ Ao G, Tm F, Mk B, R L, Mb T, K G, et al. 5-Azacytidine treatment sensitizes tumor cells to Tcell mediated cytotoxicity and modulates NK cells in patients with myeloid malignancies. Vol. 4, *Blood cancer journal.* *Blood Cancer J;* 2014. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24681961/>
- ⁷² Itzykson R, Kosmider O, et al. Impact of TET2 mutations on response rate to azacytidine in myelodysplastic syndromes and low blast count acute myeloid leukemias. *Leukemia.* 2011 Jul;25(7):1147–52.
- ⁷³ Unnikrishnan A, Papaemmanuil E, Beck D, Deshpande NP, Verma A, Kumari A, et al. Integrative Genomics Identifies the Molecular Basis of Resistance to Azacytidine Therapy in Myelodysplastic Syndromes. *Cell Rep.* 2017 Jul 18;20(3):572–85.
- ⁷⁴ Breccia, M., Loglisci, G et al. Application of French prognostic score to patients with International Prognostic Scoring System intermediate-2 or high risk myelodysplastic syndromes treated with 5-azacytidine is able to predict overall survival and rate of response. *Leuk Lymphoma.* 2012; 53, 985–986.
- ⁷⁵ Itzykson R, Fenaux P. Predicting the outcome of patients with higher-risk myelodysplastic syndrome treated with hypomethylating agents. *Leuk Lymphoma.* 2012 May;53(5):760-2.
- ⁷⁶ van der Helm, L.H., Alhan, C., et al. Platelet doubling after the first azacytidine cycle is a promising predictor for response in myelodysplastic syndromes (MDS), chronic myelomonocytic leukaemia (CMML) and acute myeloid leukaemia (AML) patients in the Dutch azacytidine compassionate named patient programme. *Br J Haematol* 155, 2011; 599–606. X
- ⁷⁷ 4 Rius M, Stresemann C, et al. Human concentrative nucleoside transporter 1-mediated uptake of 5-azacytidine enhances DNA demethylation. *Mol Cancer Ther* 2009; 8: 225–231.

⁷⁸ Pastor-Anglada M, Cano-Soldado P, et al. Cell entry and export of nucleoside analogues. *Virus Res* 2005; 107: 151–164.

⁷⁹ Santini V. Azacitidine: activity and efficacy as an epigenetic treatment of myelodysplastic syndromes. *Expert Rev Hematol.* 2009 Apr;2(2):121-7. doi: 10.1586/ehm.09.6. PMID: 21083445.

⁸⁰ Valencia A, Masala E, et al. Expression of nucleoside-metabolizing enzymes in myelodysplastic syndromes and modulation of response to azacitidine. *Leukemia.* 2014 Mar;28(3):621-8.

⁸¹ Li LH, Olin EJ, et al. Cytotoxicity and mode of action of 5-azacytidine on L1210 leukemia. *Cancer Res* 1970; 30: 2760–2769.

⁸² Aimiwu J, Wang H, Chen P, Xie Z, Wang J, Liu S et al. RNA-dependent inhibition of ribonucleotidoreductase is a major pathway for 5-azacytidine activity in acute myeloid leukemia. *Blood* 2012; 119: 5229–5238

⁸³ Le Pannéer MM, Diesch J, et al. Different Gene Sets Are Associated With Azacitidine Response In Vitro Versus in Myelodysplastic Syndrome Patients. *Hemasphere.* 2022 Oct 25;6(11):e792.

⁸⁴ Diesch J, Zwick et al. A clinical-molecular update on azanucleoside-based therapy for the treatment of hematologic cancers. *Clin Epigen.* 2016;2016:1–11.

⁸⁵ Fenaux, P., Mufti, et al. (2009). Efficacy of azacitidine compared with that of conventional care regimens in the treatment of higher-risk myelodysplastic syndromes: a randomised, open-label, phase III study. *The Lancet Oncology*, 10(3), 223-232.

⁸⁶ <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=UCK1>

⁸⁷ Qian, Y., Ding, Q, et al. (2014) Phosphorylation of uridine and cytidine by uridine-cytidine kinase. *J. Biotechnol.* 188, 81–87

⁸⁸ Cheng, N., Payne, R.C. and Traut, T.W. (1986) Regulation of uridine kinase: evidence for a regulatory site. *J. Biol. Chem.* 261, 13006–13012

⁸⁹ Van Rompay, A.R., Johansson, M. and Karlsson, A. (1999) Phosphorylation of deoxycytidine analog monophosphates by UMP-CMP kinase: molecular characterization of the human enzyme. *Mol. Pharmacol.* 56, 562–569

⁹⁰ Galmarini CM, Mackey JR, et al. Nucleoside analogues: mechanisms of drug resistance and reversal strategies. *Leukemia* 2001; 15: 875–890

⁹¹ Rathe SK, Largaespada DA. Deoxycytidine kinase is downregulated in Ara-C resistant acute myeloid leukemia murine cell lines. *Leukemia* 2010; 24: 1513–1515

⁹² Yin B, Tsai ML, et al. A microarray study of altered gene expression after cytarabine resistance in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2007; 21: 1093–1097

⁹³ https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;g=ENSG00000130717;r=9:131523801-131531264;v=rs2296957;vdb=variation;vf=606029330#population_freq_EUR

⁹⁴https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;g=ENSG00000130717;r=9:131523801-131531264;v=rs3904960;vdb=variation;vf=606070874

⁹⁵https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;g=ENSG00000130717;r=9:131523801-131531264;v=rs2296956;vdb=variation;vf=606029329

⁹⁶https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;g=ENSG00000130717;r=9:131523801-131531264;v=rs189473964;vdb=variation;vf=607859258

⁹⁷ Clark W. and Christopher K. An Introduction to DNA: Spectrophotometry, Degradation, and the 'Frankengel' Experiment. Association for Biology Laboratory Education, 2001, Chapter 5, 81-99.

⁹⁸ Eppendorf. Eppendorf Biophotometer: Operating Manual. Hamburg, Germany: Eppendorf, 2005.

⁹⁹ Trumbo TA, Schultz E, et al. Applied spectrophotometry: analysis of a biochemical mixture. *Biochem Mol Biol Educ*. 2013 Jul-Aug;41(4):242-50.

¹⁰⁰ Zhu H, Zhang H, Xu Y, et al. PCR past, present and future. *Biotechniques*. 2020 Oct;69(4):317-325.

¹⁰¹ <https://biosearch-cdn.azureedge.net/assetsv6/how-does-kasp-work.jpg>

¹⁰² He C, Holme J, et al. SNP genotyping: the KASP assay. *Methods Mol Biol*. 2014;1145:75-86. doi: 10.1007/978-1-4939-0446-4_7. PMID: 24816661.

¹⁰³ Kasprzak A, Nachtkamp K, Gattermann N, et al. Assessing the Prognosis of Patients with Myelodysplastic Syndromes (MDS). *Cancers (Basel)*. 2022 Apr 12;14(8):1941.

¹⁰⁴ Kantarjian H, Issa JP, Rosenfeld CS, et al. Decitabine improves patient outcomes in myelodysplastic syndromes: results of a phase III randomized study. *Cancer* 2006; 106: 1794–1803.

¹⁰⁵ Kantarjian H, Oki Y, Garcia-Manero G, et al. Results of a randomized study of 3 schedules of low-dose decitabine in higher-risk myelodysplastic syndrome and chronic myelomonocytic leukemia. *Blood* 2007; 109: 52–57.

¹⁰⁶ Silverman LR, Demakos EP, Peterson BL, et al. Randomized, controlled trial of azacitidine in patients with the myelodysplastic syndrome: a study of the Cancer and Leukemia Group B. *J Clin Oncol* 2002; 20: 2429–2440.

¹⁰⁷ Kontandreopoulou CN, Diamantopoulos PT, Giannopoulos A, et al. Bone marrow ribonucleotide reductase mRNA levels and methylation status as prognostic factors in patients with myelodysplastic syndrome treated with 5-Azacitidine. *Leuk Lymphoma*. 2022 Mar;63(3):729-737. doi: 10.1080/10428194.2021.1998484. Epub 2021 Nov 5. PMID: 34738857.

6. Εκτεταμένη Σύνοψη

Τα Μυελοδυσπλαστικά Νεοπλάσματα [αντικατάσταση του όρου μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα (ΜΔΣ) με βάση τη αναθεωρημένη ταξινόμηση κατά WHO 2022] αποτελούν μια ετερογενή ομάδα κλωνικών διαταραχών του μυελού των οστών που οδηγούν σε ανώμαλη και αναποτελεσματική αιμοποίηση. Αυτές οι διαταραχές προκαλούν συχνά κυτταροπενίες, όπως αναιμία, ουδετεροπενία και θρομβοπενία. Οι ασθενείς με ΜΔΣ εμφανίζουν συχνά συμπτώματα όπως κόπωση, λοιμώξεις λόγω μειωμένων ουδετερόφιλων και αιμορραγίες λόγω χαμηλών επιπέδων αιμοπεταλίων. Σε προχωρημένα στάδια της νόσου, τα ΜΔΣ μπορεί να εξελιχθούν σε οξεία μυελογενή λευχαιμία (ΟΜΛ), μια ιδιαίτερα επικίνδυνη μορφή καρκίνου του αίματος. Για την διάγνωση των ΜΔΣ έχει οριστεί ως ελάχιστο μορφολογικό κριτήριο, η εμφάνιση δυσπλασιών σε τουλάχιστον 10% των κυτάρων σε οποιαδήποτε μυελική σειρά στο μυελό των οστών. Μεταξύ των παραγόντων υψηλού κινδύνου παθογένεσης της νόσου, συμπεριλαμβάνεται η ηλικία, το φύλο, η κατανάλωση αλκοόλ, το κάπνισμα, η έκθεση σε ιονίζουσα ακτινοβολία, η ανοσοκατασταλτική θεραπεία, η έκθεση σε βενζόλιο και άλλες περιβαλλοντικές/επαγγελματικές εκθέσεις.

Τρία κύρια αίτια που φαίνεται να συμβάλλουν στην παθογένεση των ΜΔΣ είναι:

- α) οι σωματικές μεταλλάξεις, που συνήθως επηρεάζουν το μάτισμα, τη συναρμολόγηση του πρόδρομου RNA και τα γονίδια που επηρεάζουν τη μεθυλίωση του DNA, β) η επιγενετική τροποποίηση γονιδίων που ελέγχουν την ανάπτυξη και τη διαφοροποίηση των πρόδρομων αιμοποιητικών κυτάρων και
- γ) κυτταροτοξικοί μηχανισμοί λόγω της παρουσίας μη φυσιολογικών ή αποπτωτικών αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων ή από το τροποποιημένο

μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών. Ανεξάρτητα από τους παθογενετικούς μηχανισμούς, το αποτέλεσμα είναι σταδιακή εξάπλωση των δυσλειτουργικών κλώνων, οδηγώντας έτσι στην ανάπτυξη της νόσου.

Η θεραπευτική προσέγγιση των ασθενών με ΜΔΣ αποσκοπεί τόσο στη βελτίωση των τιμών των αιματολογικών εξετάσεων του περιφερικού αίματος (δηλαδή αύξηση των επιπέδων της αιμοσφαιρίνης, μείωση της αιμορραγίας και των λοιμώξεων), όσο και στη βελτίωση της συνολικής πορείας της νόσου. Η επιλογή της θεραπείας για νεοδιαγνωσμένο ή ανθεκτικό υπότυπο εξαρτάται από τη διαστρωμάτωση κινδύνου, τη φυσική κατάσταση (συμπεριλαμβανομένων των συννοσηροτήτων) και την καταλληλότητα του ασθενούς για αλλογενή μεταμόσχευση.

Στα υψηλού κινδύνου ΜΔΣ όπως αυτά ορίζονται από το IPSS οι συμβατικές θεραπείες έχουν πτωχά αποτελέσματα με διάμεση επιβίωση λιγότερο από ένα έτος αλλά και χαμηλή ποιότητα ζωής. Θεραπεία επιλογής αποτελεί η επιγενετική θεραπεία και πιο συγκεκριμένα οι απομεθυλιωτικοί παράγοντες (ΥΜΠ) που οδηγούν σε παράταση επιβίωσης και επιβράδυνση της εξέλιξης σε ΟΜΛ. Οι απομεθυλιωτικοί παράγοντες δρουν αναστέλλοντας τη δραστηριότητα των ενζύμων που ονομάζονται μεθυλτρανσφεράσες του DNA, τα οποία εμπλέκονται στην προσθήκη μεθυλομάδων στο DNA. Η δράση των επιγενετικών φαρμάκων και των ΥΜΠ είναι πλειοτροπική καθώς θα μπορούσαν δυνητικά να επηρεάσουν όλες τις παραπάνω διαδικασίες επηρεάζοντας συνολικά την βιολογία και το δυναμικό των καρκινικών και όχι μόνο, κυτάρων. Ο ΥΜΠ που χρησιμοποιείται ευρέως ως θεραπευτική προσέγγιση στα ΥΚ-ΜΔΣ είναι η 5-αζακυτιδίνη. Πρόκειται για ένα ανάλογο κυτιδίνης στο οποίο η θέση 5'

του C στον δακτύλιο πυριμιδίνης έχει αντικατασταθεί από ένα άτομο αζώτου. Μιμείται τη φυσιολογική κυτιδίνη όσον αφορά στην πρόσληψη και την ενεργοποίηση της, ώστε να επιτευχθεί η φαρμακολογική της δράση. Η μεταφορά των NA όπως η 5-αζακυτιδίνη διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης πραγματοποιείται με τη συμβολή πρωτεϊνών-μεταφορέων. Με βάση δεδομένα *in vitro*, ο μεταβολισμός της 5-αζακυτιδίνης δεν φαίνεται να μεσολαβείται από ισοένζυμα του κυτοχρώματος P450 (CYPs), UDP-τρανσφεράσες του γλυκουρονικού οξέος (UGTs), σουλφοτρανσφεράσες (SULTs) και τρανσφεράσες της γλουταθειόνης (GSTs). Στο εσωτερικό των κυτάρων η 5-αζακυτιδίνη ενεργοποιείται από το ένζυμο κινάση ουριδίνης-κυτιδίνης (UCK) η οποία καταλύει την αρχική φωσφορυλίωση της 5-αζακυτιδίνης σε μονοφωσφορική 5-αζακυτιδίνη (5-aza-UMP), η οποία φωσφορυλιώνεται περαιτέρω σε 5-aza-UDP και 5-aza-UTP, τα οποία μπορούν να ενσωματωθούν στο RNA. Το γονίδιο UCK1 βρίσκεται στο χρωμόσωμα 9 στη θέση 9q34.12, δηλαδή στο μακρύ βραχίονα (q) του χρωμοσώματος 9 στη θέση 34.12 και πιο συγκεκριμένα εκτείνεται μεταξύ των βάσεων 131,523,801 έως 131,531,264 του χρωμοσώματος. Η διαφορική έκφραση του *UCK1* σε ΥΚ-ΜΔΣ όπως αυτή προκύπτει από τη διεθνή βιβλιογραφία μπορεί με τη σειρά της να οφείλεται στην ύπαρξη συγκεκριμένων γενετικών πολυμορφισμών (Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs). Συγκεκριμένα σε μελέτη στην οποία συμμετείχαν 42 ασθενείς με ΜΔΣ παραγματοποιήθηκε αλληλούχιση του γονιδίου *UCK1*. Μελετήθηκαν τέσσερις πολυμορφικοί τόποι οι οποίοι αντιστοιχούσαν σε γνωστούς πολυμορφισμούς ενός νουκλεοτιδίου, ένας από τους οποίους ανήκει σε κωδικοποιητική αλληλουχία του εξονίου 6 (rs2296957, Ala180Ser) και τρεις

από αυτούς σε ιντρονιακές αλληλουχίες (rs3904960 στο ιντρόνιο 1, rs2296956 και rs189473964 στο ιντρόνιο 3).

Σκοπός

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η διερεύνηση της πιθανής συσχέτισης μεταξύ της ανταπόκρισης των ασθενών με υψηλού κινδύνου ΜΔΣ στη θεραπεία με 5-αζακυτιδίνη και των πολυμορφισμών του γονιδίου UCK1. Η ανάλυση επικεντρώνεται στους τέσσερις πολυμορφισμούς: rs2296957, rs189473964, rs3904960 και rs2296956. Αυτοί οι γενετικοί πολυμορφισμοί μπορεί να επηρεάζουν τη δραστηριότητα της κινάσης UCK1 και συνεπώς την αποτελεσματικότητα της θεραπείας με 5-αζακυτιδίνη.

Υλικά και Μέθοδοι

Ασθενείς

Στη μελέτη συμμετείχαν 54 ασθενείς με ΜΔΣ, εκ των οποίων 35 άνδρες και 19 γυναίκες, με διάμεση ηλικία τα 74 έτη. Οι ασθενείς διαγνώστηκαν με υψηλού κινδύνου ΜΔΣ και έλαβαν θεραπεία με 5-αζακυτιδίνη σύμφωνα με τα καθιερωμένα πρωτόκολλα θεραπείας. Κατά τη διάρκεια της μελέτης, οι ασθενείς παρακολουθήθηκαν για την ανταπόκρισή τους στη θεραπεία, η οποία αξιολογήθηκε βάσει αιματολογικών παραμέτρων και της ανάγκης για μεταγγίσεις ερυθρών αιμοσφαιρίων και αιμοπεταλίων.

Μέθοδοι

Για τη γονοτυπική ανάλυση των πολυμορφισμών rs2296957, rs189473964, rs3904960 και rs2296956 του γονιδίου UCK1, συλλέχθηκαν δείγματα μυελού

των οστών από τους ασθενείς. Η απομόνωση του DNA από τα δείγματα πραγματοποιήθηκε μέσω της εφαρμογής μεθόδων απομόνωσης DNA και αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR).

Ακολούθως, η γονοτυπική ανάλυση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τη μέθοδο Kompetitive Allele Specific PCR (KASP), η οποία επιτρέπει τον ταυτόχρονο προσδιορισμό πολλαπλών πολυμορφισμών με υψηλή ακρίβεια. Οι γονοτυπικές συχνότητες καταγράφηκαν για τους τέσσερις πολυμορφισμούς, και οι συσχετίσεις τους με την ανταπόκριση στη θεραπεία και άλλες κλινικές παραμέτρους αναλύθηκαν στατιστικά.

Η στατιστική ανάλυση περιελάμβανε τη χρήση παραμετρικών και μη παραμετρικών μεθόδων για την αξιολόγηση των συσχετίσεων μεταξύ των πολυμορφισμών και των κλινικών εκβάσεων. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές θεωρήθηκαν για τιμές p μικρότερες από 0.05.

Αποτελέσματα

Κατανομή αλληλόμορφων και γονοτύπων

Οι αναλύσεις των δειγμάτων έδειξαν τις ακόλουθες συχνότητες κατανομής των αλληλόμορφων και γονοτύπων για τους τέσσερις πολυμορφισμούς του γονιδίου UCK1:

- Για τον πολυμορφισμό rs2296957, ο πιο συχνός γονότυπος ήταν ο ομόζυγος για το αλληλόμορφο T (T:T).
- Ο πολυμορφισμός rs189473964 παρουσίασε υψηλότερη συχνότητα ετερόζυγων ατόμων με τον γονότυπο G

-
- Ο πολυμορφισμός rs3904960 παρουσίασε συχνότητα υψηλότερη σε ασθενείς με το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο T.
 - Ο πολυμορφισμός rs2296956 παρουσίασε ισχυρή τάση συσχέτισης με την ανταπόκριση στη θεραπεία, με τους ασθενείς που φέρουν το αλληλόμορφο C να παρουσιάζουν καλύτερη απόκριση.

Συσχέτιση με την ανταπόκριση στη θεραπεία

Αναλύοντας την ανταπόκριση στη θεραπεία, διαπιστώθηκε μια ισχυρή τάση συσχέτισης μεταξύ του πολυμορφισμού rs2296956 και της καλύτερης ανταπόκρισης στη θεραπεία με 5-αζακυτιδίνη.

Ο πολυμορφισμός rs3904960 συσχετίστηκε σημαντικά με την ανάγκη για μεταγγίσεις ερυθρών αιμοσφαιρίων. Οι ασθενείς που φέρουν το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο T είχαν μικρότερη ανάγκη για μεταγγίσεις, υποδεικνύοντας έναν προστατευτικό ρόλο αυτού του πολυμορφισμού στην αιμοποίηση και τη διαχείριση της αναιμίας που προκαλεί η νόσος.

Αντίθετα, οι πολυμορφισμοί rs2296957 και rs189473964 δεν έδειξαν στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την ανταπόκριση στη θεραπεία ή την ανάγκη για μεταγγίσεις, παρόλο που παρατηρήθηκαν κάποιες τάσεις που ενδέχεται να αξίζουν περαιτέρω διερεύνησης.

Συζήτηση

Τα ευρήματα της μελέτης υποδεικνύουν ότι οι πολυμορφισμοί του γονιδίου UCK1 μπορεί να διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στην απόκριση των

ασθενών στη θεραπεία με 5-αζακυτιδίνη. Η αποκάλυψη ότι ο πολυμορφισμός rs2296956 εμφανίζει μία τάση συσχέτισης με καλύτερη ανταπόκριση στη θεραπεία είναι ιδιαίτερα σημαντική, καθώς παρέχει μια πρώτη ένδειξη ότι το γενετικό προφίλ των ασθενών μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως προγνωστικός δείκτης για την εξατομίκευση της θεραπείας. Αυτή η πληροφορία θα μπορούσε να βοηθήσει τους γιατρούς να προσαρμόσουν τη θεραπεία με βάση το γενετικό υπόβαθρο των ασθενών, βελτιώνοντας έτσι την αποτελεσματικότητα της θεραπείας.

Ο πολυμορφισμός rs3904960, που σχετίζεται με τη μειωμένη ανάγκη για μεταγγίσεις, μπορεί να έχει σημαντικές κλινικές επιπτώσεις, ιδίως σε ασθενείς με ΜΔΣ που απαιτούν συχνές μεταγγίσεις λόγω της κυτταροπενίας. Οι ασθενείς που φέρουν τον πολυμορφισμό αυτόν ενδέχεται να είναι σε θέση να διαχειριστούν καλύτερα τις επιπτώσεις της νόσου, μειώνοντας την ανάγκη για υποστηρικτικές θεραπείες όπως οι μεταγγίσεις.

Παρότι οι πολυμορφισμοί rs2296957 και rs189473964 δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις με την ανταπόκριση στη θεραπεία, τα δεδομένα που συλλέχθηκαν υποδηλώνουν ότι μπορεί να υπάρχουν άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν την αλληλεπίδραση μεταξύ αυτών των πολυμορφισμών και της αποτελεσματικότητας της 5-αζακυτιδίνης. Περαιτέρω έρευνα είναι απαραίτητη για την καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών που εμπλέκονται.

Συμπεράσματα

Η μελέτη καταλήγει στο συμπέρασμα ότι οι πολυμορφισμοί του γονιδίου UCK1 ίσως θα μπορούσαν να διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο στη διαμόρφωση της απόκρισης στη θεραπεία με 5-αζακυτιδίνη σε ασθενείς με ΜΔΣ. Ο πολυμορφισμός rs2296956 δείχνει να είναι ένας πιθανός προγνωστικός βιοδείκτης, ενώ ο rs3904960 φαίνεται να επηρεάζει την ανάγκη για μεταγγίσεις ερυθρών αιμοσφαιρίων.

Η δυνατότητα χρήσης αυτών των πολυμορφισμών ως προγνωστικών δεικτών θα μπορούσε να προσφέρει νέες ευκαιρίες για την εξατομίκευση της θεραπείας στα ΜΔΣ, βελτιώνοντας την ποιότητα ζωής και την πρόγνωση της νόσου στους ασθενείς. Μελλοντικές μελέτες σε μεγαλύτερα δείγματα ασθενών και σε βάθος ανάλυση των μηχανισμών που συνδέουν τους πολυμορφισμούς αυτούς με την ανταπόκριση στη θεραπεία θα είναι κρίσιμες για την αξιοποίηση αυτών των ευρημάτων.