



**UNIWERSYTET
MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU**

Collegium Medicum
im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy

Bydgoszcz 2024 r.



**UNIWERSYTET
MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU**

Wydział Lekarski
Collegium Medicum w Bydgoszczy

Łukasz Szukalski

**Analiza epigenetycznych modyfikacji DNA w
leukocytach i moczu dorosłych pacjentów z ostrą
białaczką szpikową (AML) oraz zespołami
mielodysplastycznymi (MDS)**

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

Promotor:
dr hab. n. med. Jarosław Czyż, prof. UMK

Bydgoszcz 2024

Spis treści

1. Wstęp	6
1.1 AML – etiopatogeneza, rozpoznanie i leczenie	6
1.2 Zespół mielodysplastyczny jako stan poprzedzający AML.....	15
1.3 Rola procesów epigenetycznych w rozwoju komórkowym.....	20
1.4 Zmiany epigenetyczne jako czynnik rozwoju AML i MDS oraz innych nowotworów hematologicznych	24
2. Cele pracy	30
3. Pacjenci i metodyka	31
3.1 Charakterystyka pacjentów	31
3.2 Metodyka badania	31
3.3 Izolowanie leukocytów z pobranej krwi obwodowej	33
3.4 Izolowanie DNA z komórek jądrazstych krwi obwodowej i hydroliza DNA do deoksynukleozydów.....	34
3.5 Ultrasprawa chromatografia cieczowa z tandemową detekcją mas (2D-UPLC-MS/MS)	35
3.6 Analiza modyfikacji epigenetycznych DNA w moczu.....	36
3.7 Metoda analizy ekspresji mRNA genów za pomocą RT-qPCR	37
3.8 Metoda analizy mutacji genetycznych.....	38
3.9 Metody analizy statystycznej.....	40
4. Wyniki	41
4.1 Wartość wyjściowego substratu szlaku aktywnej demetylacji - 5-mdC (5-metylodeoksycytozyny) w DNA leukocytów.....	41
4.2 Wartość pierwszego produktu aktywnej demetylacji - 5-hmdC (5-hydroksymetylodeoksycytozyny) w DNA leukocytów	42
4.3 Wartość drugiego produktu aktywnej demetylacji 5-fdC (5-formylodeoksycytozyny) w DNA leukocytów	43

4.4 Wartość trzeciego produktu aktywnej demetylacji 5-cadC (5-karboksydeoksycytozyny) w DNA leukocytów.....	44
4.5 Wartość wyjściowego substratu aktywnej demetylacji - 5-mdC (5-metylodeoksycytozyny) w moczu	45
4.6 Wartość pierwszego produktu aktywnej demetylacji - 5-hmdC (5-hydroksymetylodeoksycytozyny) w moczu	46
4.7 Wartość produktu aktywnej demetylacji - 5-hmC (5-hydroksymetylocytozyny) w moczu	47
4.8 Wartość produktu aktywnej demetylacji - 5-fC (5-formylocytozyny) w moczu	48
4.9 Wartość produktu aktywnej demetylacji - 5-caC (5-karboksytozyny) w moczu.....	49
4.10 Wartość 5-hmdU (5-hydroksymetylodeoksyuracylu) w moczu	50
4.11 Wartość 5-hmU (5-hydroksymetylouracylu) w moczu	51
4.12 Wartości 5-hmdC (5-hydroksymetylodeoksycytozyny) w DNA leukocytarnym w zależności od odsetka blastów w szpiku kostnym u pacjentów z AML i MDS.....	52
4.13 Korelacja pomiędzy odsetkiem blastów w szpiku kostnym, a wartością 5-hmdC w DNA leukocytarnym.	53
4.14 Mutacje genów zaangażowanych w procesy epigenetyczne	54
4.15 Ekspresja mRNA genów zaangażowanych w procesy epigenetyczne	55
4.16 Ekspresja mRNA <i>TET2</i> oraz poziom 5-hmdC w DNA leukocytarnym w zależności od statusu mutacji genu <i>TET2</i> w grupie pacjentów z AML.....	57
4.17 Wartości produktów aktywnej demetylacji u pacjentów z zespołami mielodysplastycznymi w zależności od ryzyka R-IPSS	58
4.18 Wyjściowy poziom 5-mdC w DNA leukocytarnym u pacjentów z MDS w zależności od wystąpienia transformacji do AML.....	59
4.19 Krzywa ROC transformacji MDS do AML w zależności od poziomu 5-mdC w DNA u pacjentów z MDS	60

4.20 Wyjściowy poziom 5-mdC oraz pochodnych procesu aktywnej demetylacji w DNA leukocytarnym oraz w moczu u pacjentów z AML leczonych chemioterapią intensywną w zależności od osiągnięcia remisji całkowitej po leczeniu.....	61
4.21 Krzywa przeżycia pacjentów z AML leczonych chemioterapią intensywną w zależności od osiągnięcia remisji całkowitej po leczeniu.....	62
4.22 Krzywa przeżycia pacjentów z AML leczonych chemioterapią intensywną w zależności od stężenia 5-mdC w moczu w momencie diagnozy.....	63
5. Dyskusja.....	66
6. Wnioski.....	83
7. Streszczenie.....	84
8. Summary.....	86
9. Bibliografia.....	88
10. Załączniki.....	102
10.1 Wykaz stosowanych skrótów.....	102
10.2 Zgoda Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Mikołaja Kopernika przy Collegium Medicum w Bydgoszczy.....	106

1. Wstęp

1.1 AML – etiopatogeneza, rozpoznanie i leczenie

Ostra białaczka szpikowa (AML, ang. acute myeloid leukemia) jest chorobą nowotworową wywodzącą się z komórek linii mieloidalnej szpiku kostnego. U podstaw rozwoju AML leży niekontrolowana proliferacja niedojrzałych komórek blastycznych, która wypiera proces różnicowania i podziału komórek dojrzałych. To z kolei skutkuje nagromadzeniem w szpiku kostnym komórek we wczesnych fazach rozwojowych, co ostatecznie prowadzi do niewydolności szpiku kostnego i śmierci [1].

Wśród pacjentów dorosłych AML stanowi 80% wszystkich ostrych białaczek, a mediana wieku chorych wynosi 67 lat [1]. Zapadalność na AML wynosi około 5/100 000 mieszkańców/rok i wzrasta wraz z wiekiem, a wśród mężczyzn choroba występuje częściej niż wśród kobiet [2].

Objawy AML wynikają z wypierania poszczególnych linii komórkowych w szpiku kostnym przez komórki blastyczne. Wyparcie układu czerwonokrwinkowego skutkuje anemią, która manifestuje się postępującym osłabieniem, zawrotami głowy oraz dolegliwościami stenokardialnymi. Wyparcie układu megakariocytarnego wiąże się z obniżoną liczbą płytek krwi, co u pacjenta może powodować krwawienia z jam ciała oraz skazę skórno-śluzówkową. Wreszcie, zajęcie szpiku kostnego przez klon białaczkowy prowadzi do obniżenia liczby neutrocytów we krwi obwodowej, co ma poważne konsekwencje dla pacjenta w postaci infekcji bakteryjnych oraz niekiedy grzybiczych [1]. AML może przebiegać również z naciekami narządowymi, głównie wątroby, śledziony i węzłów chłonnych, a także dziąseł i skóry. Wysoka leukocytoza krwi obwodowej u pacjentów z AML może spowodować zaburzenia jej przepływu w naczyniach włosowatych, co definiowane jest mianem leukostazy. Do częstych, lecz niespecyficznych objawów ostrej białaczki szpikowej należy dodać również poty nocne oraz utratę masy ciała [1].

Przy stawianiu diagnozy AML kluczowe są badania laboratoryjne krwi obwodowej oraz badanie cytologiczne i immunofenotypowe szpiku kostnego, a kryteria diagnostyczne rozpoznania ostrej białaczki szpikowej oparte są między innymi o odsetek mieloblastów w szpiku kostnym lub krwi obwodowej [3].

Niezbędnym elementem diagnostyki AML jest ocena czynników cytogenetyczno-molekularnych dokonywana metodą cytogenetyki klasycznej, FISH oraz PCR lub NGS.

Stwierdzenie t(8;21), inv(16), t(16;16) lub t(15;17) w badaniu cytogenetycznym lub FISH upoważnia do rozpoznania AML niezależnie od odsetka komórek blastycznych w szpiku kostnym i krwi obwodowej. Do rutynowych badań molekularnych wykonywanych obowiązkowo u każdego pacjenta z AML w ciągu pierwszych 3-5 dni od postawienia diagnozy należy ocena obecności mutacji *NPM1*, *FLT3*, *IDH1* i *IDH2*, a także rearanżacji *PML::RARA*, *CBFB::MYH11*, *RUNX1::RUNX1T1*, *KMT2A* oraz *BCR::ABL1* [4]. W ciągu pierwszego cyklu leczenia należy ponadto oznaczyć status genów warunkujących rozpoznanie AML z mutacjami genowymi zależnymi od mielodysplazji, tj. *BCOR*, *EZH2*, *RUNX1*, *SF3B1*, *SRSF2*, *STAG2*, *U2AF1*, *ZRSR2*, *ASXL1*, a także geny *TP53* i *DDX41*. Badania cytogenetyczno-molekularne są niezbędne do przyporządkowania pacjenta z AML do konkretnego typu ostrej białaczki szpikowej według obowiązującej klasyfikacji [4].

Przed 2022 rokiem odsetek mieloblastów w szpiku kostnym lub krwi obwodowej uprawniający do rozpoznania ostrej białaczki szpikowej wynosił $\geq 20\%$, a obowiązującą klasyfikacją była publikowana przez IARC (International Agency for Research on Cancer) klasyfikacja Światowej Organizacji Zdrowia (WHO, World Health Organization) [5]. Aktualnie obowiązująca klasyfikacja ICC (ang. International Consensus Classification) obniżyła wymagany minimalny odsetek blastów do 10% w przypadku AML ze zmianami cytogenetyczno-molekularnymi znanymi jako unikatowe dla ostrych białaczek szpikowych, a także wprowadziła nową grupę MDS/AML, obejmującą pacjentów z odsetkiem blastów większym niż 10%, ale mniejszym niż 20%, **tab. 1** [3].

Nowa klasyfikacja usunęła ponadto AML zależną od terapii (tAML, ang. *therapy related AML*) oraz AML ze zmianami zależnymi od mielodysplazji (AML-MRC, ang. *myelodysplasia related changes AML*) jako osobne typy ostrej białaczki szpikowej. Zamiast tego, wprowadzono trzy kwalifikatory diagnostyczne, do których należy przyporządkować chorego po określeniu konkretnego typu AML. Należą do nich: 1. Związany z terapią (chemioterapią, radioterapią, immunoterapią), 2. Progresujący z MDS (zespołu mielodysplastycznego) lub MDS/MPN (zespołu mielodysplastycznego/zespołu mieloproliferacyjnego), lub 3. Związany z predyspozycją germinálną [3].

Jak wcześniej wspomniano, kluczową rolę w rozwoju AML mają czynniki cytogenetyczno-molekularne, a przyczyną wzrostu dominującego klonu niedojrzałych komórek linii mieloidalnej jest systematyczne nabywanie przez komórki somatycznych mutacji

genetycznych, które zaburzają procesy dojrzewania i apoptozy hematopoetycznych komórek macierzystych (HSCs, *ang. Hematopoietic Stem Cells*) [6].

tab. 1 Klasyfikacja ostrych białaczek szpikowych wg. ICC 2022 (dla każdego typu AML lub MDS/AML podano odsetek blastów uprawniający do rozpoznania choroby).

Ostra białaczka promielocytowa (APL) z t(15;17)(q24.1;q21.2)/PML::RARA ≥ 10%
APL z innymi rearanżacjami RARA ¹ ≥ 10%
AML z t(8;21)(q22;q22.1)/RUNX1::RUNX1T1 ≥ 10%
AML z inv(16)(p13.1q22) lub t(16;16)(p13.1;q22)/CBFB::MYH11 ≥ 10%
AML z t(9;11)(p21.3;q23.3)/MLLT3::KMT2A ≥ 10%
AML z innymi rearanżacjami KMT2A ² ≥ 10%
AML z t(6;9)(p22.3;q34.1)/DEK::NUP214 ≥ 10%
AML z inv(3)(q21.3q26.2) lub t(3;3)(q21.3;q26.2)/GATA2; MECOM(EVI1) ≥ 10%
AML z innymi rearanżacjami MECOM ³ ≥ 10%
AML z innymi rzadko nawracającymi translokacjami ≥ 10%
AML z t(9;22)(q34.1;q11.2)/BCR::ABL1 ⁴ ≥ 20%
AML z mutacją NPM1 ≥ 10%
AML z mutacjami bZIP CEBPA ≥ 10%
AML i MDS/AML z mutacją TP53 10-19% (MDS/AML) i ≥ 20% (AML)
AML i MDS/AML z mutacjami genowymi zależnymi od mielodysplazji 10-19% (MDS/AML) i ≥ 20% (AML) Zdefiniowane mutacjami w ASXL1, BCOR, EZH2, RUNX1, SF3B1, SRSF2, STAG2, U2AF1 lub ZRSR2
AML ze zmianami cytogenetycznymi zależnymi od mielodysplazji 10-19% (MDS/AML) i ≥ 20% (AML) Zdefiniowane jako obecność kariotypu złożonego (≥ 3 niezależne klonalne aberracje chromosomalne przy nieobecności innych definiujących jednostkę nawracających zmian genetycznych), del(5q)/t(5q)/add(5q), -7/del(7q), +8, del(12p)/t(12p)/add(12p), i(17q), -17/add(17p) or del(17p), del(20q), i/lub klonalne aberracje idic(X)(q13)
AML inaczej nieokreślona (NOS) 10-19% (MDS/AML) i ≥ 20% (AML)
Mięsak mieloidalny

¹Zawiera AML z t(1;17)(q42.3;q21.2)/IRF2BP2::RARA; t(5;17)(q35.1;q21.2)/NPM1::RARA; t(11;17)(q23.2;q21.2)/ZBTB16::RARA; kryptyczna inv(17q) lub del(17)(q21.2q21.2)/STAT5B::RARA, STAT3::RARA; inne geny ulegające rzadko rearanżacji z RARA:TBL1XR1 (3q26.3), FIP1L1 (4q12), BCOR (Xp11.4).

²Zawiera AML z t(4;11)(q21.3;q23.3)/AFF1::KMT2A; t(6;11)(q27;q23.3)/AFDN::KMT2A;t(10;11)(p12.3;q23.3)/MLLT10::KMT2A; t(10;11)(q21.3;q23.3)/TET1::KMT2A; t(11;19)(q23.3;p13.1)/KMT2A::ELL; t(11;19)(q23.3;p13.3)/KMT2A::MLLT1.

³Zawiera AML z t(2;3)(p11.2;q26.2)/MECOM::?; t(3;8)(q26.2;q24.2)/MYC,MECOM; t(3;12)(q26.2;p13.2)/ETV6::MECOM; t(3;21)(q26.2;q22.1)/MECOM::RUNX1.

⁴Kategoria MDS/AML nie może być używana dla AML z BCR::ABL1.

Dotychczas zidentyfikowano setki mutacji genowych pełniących potencjalną rolę w rozwoju AML, ale tylko części z nich przypisano wartość prognostyczną [4]. Na podstawie występowania tych mutacji oraz konkretnych zaburzeń cytogenetycznych grupa ELN (European LeukemiaNET) dokonała podziału pacjentów z AML na tych o korzystnym, pośrednim oraz niekorzystnym ryzyku i względem tej stratyfikacji oraz stanu ogólnego pacjenta ustalana jest strategia leczenia, **tab. 2** [4].

tab. 2 Stratyfikacja ryzyka cytogenetyczno-molekularnego w AML według ELN 2022

Ryzyko	Cecha genetyczna
Korzystne	<ul style="list-style-type: none"> • t(8;21)(q22;q22.1)/RUNX1::RUNX1T1 • inv(16)(p13.1q22) lub t(16;16)(p13.1;q22)/CBFB::MYH11 • mutacja NPM1 bez FLT3-ITD <ul style="list-style-type: none"> • mutacja CEBPA*
Pośrednie	<ul style="list-style-type: none"> • mutacja NPM1 z FLT3-ITD • WT NPM1 z FLT3-ITD (bez niekorzystnych czynników cytogenetycznych) • t(9;11)(p21.3;q23.3)/MLL3::KMT2A • Aberracje cytogenetyczne lub molekularne niesklasyfikowane jako korzystne lub niekorzystne
Niekorzystne	<ul style="list-style-type: none"> • t(6;9)(p23.3;q34.1)/DEK::NUP214 • t(v;11q23.3)/rearanżacja KMT2A • t(9;22)(q34.1;q11.2)/BCR::ABL1 • t(8;16)(p11.2;p13.3)/KAT6A::CREBBP • inv(3)(q21.3q26.2) lub t(3;3)(q21.3;q26.2)/GATA2, MECOM(EVI1) • t(3q26.2;v)/rearanżacja MECOM(EVI1) <ul style="list-style-type: none"> • -5 lub del(5q); -7; -17/abn(17p) • kariotyp złożony, kariotyp monosomalny • mutacja ASXL1, BCOR, EZH2, RUNX1, SF3B1, SRSF2, STAG2, U2AF1, i/lub ZRSR2 <ul style="list-style-type: none"> • mutacja TP53

*mutacja przesuwająca ramkę odczytu obejmująca region zasadowy zamka leucynowego genu CEBPA

Pacjenci obciążeni mutacją *TP53* i jednocześnie złożonym karyotypem mają najgorsze rokowanie, zaś pacjenci z mutacją genu *NPM1* przy jednoczesnym braku mutacji *FLT3-ITD* są klasyfikowani do ryzyka korzystnego i mogą liczyć na całkowite wyleczenie bez stosowania alloHSCT [4].

U znaczącego odsetka pacjentów z AML identyfikuje się ponadto mutacje genów, których produkty modyfikują DNA komórek szpiku kostnego w sposób prowadzący do zmiany ich funkcji i w efekcie do rozwoju klonu białaczkowego. Taki pośredni mechanizm zmiany funkcji komórki określaną jest mianem procesu epigenetycznego. Chociaż mutacje genów zaangażowanych w procesy epigenetyczne nie znalazły się w aktualnej stratyfikacji ryzyka cytogenetyczno-molekularnego według ELN 2022, pełnią one kluczową rolę w leukemogenezie i zostały omówione w dalszej części pracy.

Leczenie AML u pacjentów młodszych oraz nieobciążonych licznymi chorobami towarzyszącymi ma na celu doprowadzenie do całkowitego wyleczenia i polega na podawaniu chemioterapii indukującej oraz - u części pacjentów – następczym przeszczepie komórek macierzystych [1, 4]. Terapię pacjentów starszych niż 65-70 lat prowadzi się z intencją wydłużenia życia i poprawy komfortu przeżycia, chociaż część chorych może być także kwalifikowana do chemioterapii indukującej i alloHSCT pod warunkiem dobrego stanu ogólnego i braku chorób towarzyszących [4]. Najbardziej obciążona chorobami towarzyszącymi część starszych pacjentów nie jest kwalifikowana do terapii przeciwnowotworowej i w tej grupie chorych stosuje się leczenie paliatywne [7].

Leczenie klasyczne

U pacjentów kwalifikujących się do intensywnej chemioterapii indukującej standardem leczenia pierwszego rzutu na świecie jest schemat „3+7”, czyli kombinacja antybiotyku antracyklinowego - najczęściej daunorubicyny podawanej przez 3 kolejne dni w skojarzeniu z arabinozydem cytozyny (Ara-C, cytarabina) podawanym przez 7 dni [8]. Cytarabina jest antymetabolitem, który po wejściu do komórki nowotworowej ulega fosforylacji do aktywnego trójfosforanu – Ara-CTP. Związek ten wywiera efekt cytotoksyczny wobec komórki w dwojaki sposób: pośrednio poprzez inhibicję polimerazy DNA oraz bezpośrednio poprzez wbudowywanie się w łańcuch DNA, co powoduje jego przerwanie i zahamowanie syntezy DNA [9]. Efekt cytotoksyczny antracyklin wywołany jest natomiast poprzez trwałe wiązanie się

tych leków z helisą DNA i bezpośrednio hamowanie jej replikacji [10]. Wykazano jednak, że daunorubicyna blokuje również aktywność topoizomerazy II, która w normalnych warunkach reguluje konformację helisy DNA poprzez tworzenie przejściowych nacięć w obrębie helisy. W przypadku inhibicji topoizomerazy II tymczasowe nacięcia zostają utrwalone, co prowadzi do akumulacji nadmiarowych przerw w obrębie nici DNA i śmierci komórki [11].

Za pomocą schematu „3+7” całkowitą remisję uzyskuje 57-82% młodszych pacjentów (poniżej 60 r.ż.) oraz 54-64% pacjentów w wieku 60 lat i więcej [12-15]. U 4,5-12% pacjentów leczonych chemioterapią indukującą następuje zgon w trakcie leczenia związany najczęściej z rozwinięciem infekcji, progresją choroby podstawowej lub krwawieniem [12, 15]. W ciągu ostatnich czterech dekad wśród pacjentów indukowanych schematem "3+7" nastąpiła poprawa w zakresie odsetków uzyskiwanych remisji całkowitych, długości całkowitego przeżycia, odsetka nawrotów oraz odsetka wczesnych zgonów, a przyczynę tego progresu upatruje się w stosowaniu wyższych dawek chemioterapeutyków [16]. Udowodniono bowiem, że stosując daunorubicynę w dawce 90mg/m² dziennie uzyskuje się wyższe odsetki remisji całkowitych i niższe odsetki nawrotów niż w przypadku dawki 45mg/m² [12, 13, 15]. W innym badaniu nie wykazano przewagi 90mg/m² daunorubicyny w stosunku do dawki 60mg/m² [17]. W efekcie tych badań obecne wytyczne nie zalecają stosowania daunorubicyny w dawce niższej niż 60mg/m² dziennie [4]. W przeciwieństwie do daunorubicyny, nie udowodniono korzyści ze zwiększania dawki cytarabiny w schematach indukujących remisję w AML i obecnie dawki wyższe niż 1000mg/m² nie są rekomendowane w chemioterapii indukującej [18, 19].

W 2012 roku opublikowano wyniki dużego randomizowanego badania klinicznego trzeciej fazy, w którym wykazano, że dodanie analogu puryn - kladrybiny do chemioterapii „3+7” w ramach leczenia indukującego remisję pacjentów z AML wiąże się z wyższym odsetkiem remisji całkowitych oraz dłuższym przeżyciem całkowitym, niż w przypadku leczenia wyłącznie schematem „3+7” [20]. Różnica była największa w grupie pacjentów pomiędzy 50., a 60. rokiem życia oraz tych z niekorzystnym ryzykiem cytogenetyczno-molekularnym.

Pacjenci obciążeni ostrą białaczką szpikową zależną od terapii (t-AML, *ang. therapy-related AML*) mogą odnieść korzyść z leczenia preparatem CPX-351 – kombinacją daunorubicyny z cytarabiną w postaci liposomalnej. W tej szczególnie źle rokującej grupie chorych lek ten

wykazał przewagę w stosunku do standardowej terapii „3+7” w zakresie przeżycia całkowitego i wydłużył jego medianę o prawie cztery miesiące [21].

U pacjentów z AML, którzy w wyniku chemioterapii indukującej uzyskali remisję całkowitą dalsze postępowanie uzależnione jest od ryzyka cytogenetyczno-molekularnego [4]. Pacjenci z niekorzystnym lub pośrednim ryzykiem docelowo powinni zostać poddani allogenicznej transplantacji komórek krwiotwórczych (alloHSCT), zaś pacjenci, którzy mają korzystne ryzyko otrzymują dwa do czterech cykli konsolidujących remisję, najczęściej wysokodawkowaną cytarabiną (HiDAC, *ang. high dose Ara-C*) [4]. Alternatywą dla leczenia konsolidującego u pacjentów z korzystnym ryzykiem, a także dla alloHSCT u pacjentów z ryzykiem pośrednim pozostaje autologiczne przeszczepienie komórek macierzystych (autoHSCT), które należy rozważyć w przypadku osiągnięcia remisji całkowitej z ujemną mierzalną chorobą resztkową (MRD, *ang. measurable residual disease*) [1, 4].

W ramach klasycznej chemioterapii ośrodki hematologiczne mogą oferować pacjentom starszym oraz najbardziej obciążonym także kombinację kladrybiny z niskodawkową cytarabiną (LD-AraC, *ang. Low Dose AraC*), za pomocą której u jednej trzeciej pacjentów uzyskuje się całkowitą remisję [22].

Leczenie demetylujące oraz terapie celowane

Do 2020 roku standardem terapii AML u pacjentów którzy nie kwalifikują się do intensywnej chemioterapii i allogenicznego przeszczepu komórek macierzystych pozostawało leczenie demetylujące z wykorzystaniem azacytydyny lub decytabiny. Te analogi cytydyny blokują syntezę DNA komórek klonu AML bezpośrednio poprzez wbudowywanie się w nić DNA, czym wywołują efekt cytotoksyczny. Jednocześnie jednak mają zdolność do blokowania metylotransferaz – enzymów odpowiedzialnych za metylację cytozyny w obrębie łańcucha DNA. W ten sposób poprzez usuwanie grup metylowych (demetylację) przywracają prawidłową konformację DNA i funkcję komórek [23]. Mechanizm metylacji i demetylacji cytozyny łańcucha DNA jest podstawowym procesem epigenetycznym i został omówiony szczegółowo w dalszej części pracy. Leki demetylujące zostały przebadane w kilku randomizowanych badaniach klinicznych i w grupie pacjentów z AML niekwalifikujących się do intensywnej chemioterapii i alloHSCT udowodniły swoją skuteczność poprzez wydłużenie mediany przeżycia całkowitego o kilka miesięcy w stosunku do terapii standardowych [24-26].

W 2020 roku przez FDA, a w 2021 roku przez EMA został zarejestrowany schemat leczenia oparty na kombinacji azacytydyny z doustnym inhibitorem białka bcl2 – wenetoklaksem. Konformacja wenetoklaksu pozwala na przyłączenie się jego cząsteczki do białka antyapoptotycznego bcl2 w miejscu wiązania się z białkami proapoptotycznymi. Dzięki temu dochodzi do uwolnienia białek proapoptotycznych (m.in. BIM i BAX), które poprzez cytochrom C na błonie mitochondrialnej uruchamiają kaskadę kaspaz, co prowadzi do apoptozy komórki nowotworowej [27]. Obecnie kombinacja wenetoklaksu z azacytydyną jest standardem leczenia pacjentów z ostrą białaczką szpikową, u których nie jest możliwe zastosowanie intensywnej chemioterapii z powodu wieku lub chorób towarzyszących. Schemat ten w randomizowanym badaniu klinicznym trzeciej fazy wydłużył medianę całkowitego przeżycia w tej grupie chorych do 14,7 miesięcy w stosunku do 9,6 miesięcy uzyskanych w grupie pacjentów przyjmujących azacytydynę w monoterapii, a odsetek zgonów w ciągu 30 dni od rozpoczęcia leczenia wyniósł jedynie siedem procent [28].

Okolo jedna trzecia pacjentów z AML obarczona jest mutacją genu *FLT3* (*ang. fms-like tyrosine kinase 3*) która stanowi o niekorzystnym rokowaniu [29]. W tej grupie chorych możliwe jest zastosowanie celowanego inhibitora *FLT3* – midostauryny, która dodana do standardowej chemioterapii „3+7” u pacjentów kwalifikujących się do leczenia intensywnego istotnie wydłuża medianę przeżycia całkowitego [30]. Od 2019 roku dla pacjentów z mutacją *FLT3*, którzy są oporni na pierwszą linię terapii lub doszło u nich do wznowy AML dostępny jest w Europie gilterytynib, który w badaniu klinicznym trzeciej fazy wydłużył medianę przeżycia całkowitego do ponad dziewięciu miesięcy w stosunku do prawie sześciu miesięcy uzyskanych w grupie pacjentów otrzymujących chemioterapię ratunkową [31]. W tym badaniu monoterapia gilterytynibem pozwoliła także na uzyskanie dwukrotnie większego odsetka remisji całkowitych w stosunku do ramienia kontrolnego.

Pacjenci z nieleczoną uprzednio AML, której komórki wykazują ekspresję błonową receptora CD33, mogą odnieść korzyść z terapii celowanej gemtuzumabem ozogamycyny. Lek ten dodany do standardowej chemioterapii „3+7” w grupie pacjentów z korzystnym i pośrednim ryzykiem cytogenetyczno-molekularnym wydłużył w badaniu klinicznym trzeciej fazy czas wolny od nawrotu białaczki w stosunku do grupy kontrolnej którą stanowili pacjenci otrzymujący chemioterapię „3+7” bez gemtuzumabu [32]. Mediana przeżycia całkowitego w tym badaniu była dłuższa w ramieniu badanym, jednak różnica ta była nieistotna statystycznie.

Do terapii celowanych w ostrej białaczce szpikowej należy również wybiórczy inhibitor dehydrogenazy izocytrynianowej 1 (*IDH1*) - ivosidenib. Pacjenci z mutacją *IDH1* odnoszą ogromną korzyść z terapii skojarzonej tego leku z azacytydyną [33]. Ponieważ lek ten ingeruje w proces aktywnej demetylacji komórkowego DNA, jego mechanizm działania został opisany w dalszej części pracy.

Pomimo stosunkowo wysokiego odsetka remisji całkowitych, jakie udaje się osiągnąć za pomocą dostępnych terapii, odsetek 5-letnich nawrotów wśród pacjentów z AML w grupie ryzyka pośredniego i niekorzystnego jest bardzo wysoki i wynosi odpowiednio 74% i 88% [34]. W grupie pacjentów z ryzykiem korzystnym do wznowy białaczki po pięciu latach dochodzi u 47% [34]. W związku ze złym rokowaniem, ciężkim przebiegiem oraz wysoką śmiertelnością, etiopatogeneza ostrej białaczki szpikowej pozostaje od wielu lat obiektem intensywnych badań.

1.2 Zespół mielodysplastyczny jako stan poprzedzający AML

U części pacjentów ostra białaczka szpikowa rozwija się na podłożu poprzedzającego ją zespołu mielodysplastycznego (MDS, *ang. myelodysplastic syndrome*) [4]. MDS to heterogenna grupa chorób nowotworowych układu krwiotwórczego charakteryzująca się zmianami dysplastycznymi komórek szpiku kostnego, cytopeniami we krwi obwodowej oraz zwiększonym ryzykiem transformacji w AML [35, 36]. Choroba dotyka w większym odsetku mężczyzn, a częstość zachorowań wynosi 3-4 przypadki/100 000 osób i rośnie wraz z wiekiem [37]. Zidentyfikowanym czynnikiem ryzyka wystąpienia MDS jest wcześniejsze narażenie na chemioterapię lub radioterapię [36]. Pierwotnie uważano, że przyczyną choroby jest zaburzenie regulacji apoptozy w obrębie linii komórkowych szpiku kostnego, prowadzące w efekcie do cytopenii. Obecnie wiadomo, że u podstaw patogenezy zespołów mielodysplastycznych leży zaburzenie funkcji krwiotwórczej komórki macierzystej, spowodowane czynnikami genetycznymi, zapalnymi i immunologicznymi [38-41]. Podobnie jak w AML, mutacje genów biorących udział w regulacji epigenetycznej są powszechne wśród pacjentów z zespołami mielodysplastycznymi i prawdopodobnie pełnią rolę w etiopatogenezie MDS [42]. Mutacje w *TET2* opisywane są u 19-26% pacjentów z zespołami mielodysplastycznymi, mutacje w *ASXL1* – u 14%, a *SF3B1* – u 28%. Rzadziej spotykane są mutacje w genach *IDH1* i *IDH2*, które występują u 1-2% pacjentów z MDS [42-45]. Objawy choroby wynikają bezpośrednio z zaburzenia funkcji szpiku kostnego i powstających w efekcie cytopenii krwi obwodowej, a należą do nich przede wszystkim: infekcje, krwawienia oraz wtórne do anemii osłabienie i pogorszenie tolerancji wysiłku. Zgodnie z wytycznymi ESMO z 2020 roku (ESMO, European Society for Medical Oncology) do postawienia diagnozy MDS konieczne jest wykonanie aspiracji szpiku kostnego oraz trepanobiopsji [36]. Pierwsze badanie pozwala na ocenę oraz odsetek zmian dysplastycznych w komórkach, a także na określenie odsetka blastów. Drugie badanie określa komórkowość szpiku kostnego oraz jego architekturę i jest kluczowe w diagnostyce różnicowej MDS. U pacjenta z postawionym rozpoznaniem zespołu mielodysplastycznego należy wykonać badanie cytogenetyczne, które w części przypadków może pozwolić na zastosowanie terapii celowanej, ale ma także kluczowe znaczenie dla stratyfikacji rokowniczej i w związku z tym – ryzyka transformacji MDS do AML [35, 46]. Obecnie podstawowym narzędziem do oceny prognostycznej zespołów mielodysplastycznych jest skala IPSS-R, która dzieli pacjentów z MDS na 5 grup ryzyka i uwzględnia: odsetek blastów w szpiku kostnym, cytopenie we krwi obwodowej oraz kariotyp

pacjenta, **tab. 3.** [46]. Do 2022 roku zespoły mielodysplastyczne, podobnie jak AML były podzielone według obowiązującej klasyfikacji WHO, aktualizowanej co kilka lat przez IARC, a ostatnie jej wydanie miało miejsce w 2016 roku [5]. Aktualnie w związku z brakiem konsensusu dotyczącego odsetka blastów rozgraniczającego zespół mielodysplastyczny od ostrej białaczki szpikowej poza najnowszą klasyfikacją WHO z 2022 roku dostępna jest również klasyfikacja ICC 2022, obie zamieszczone odpowiednio w **tab. 4.** i **tab. 5.** [3, 47]. Pomimo pewnych różnic, w obu klasyfikacjach zwiększyła się rola czynników genetycznych jako różnicujących poszczególne typy MDS, a ich podział nie jest warunkowany niemal wyłącznie czynnikami morfologicznymi jak dotychczas.

tab. 3 Klasyfikacja ryzyka MDS wg IPSS-R

Cecha prognostyczna	0	0,5	1	1,5	2	3	4
Cytogenetyka	Bardzo korzystna		Korzystna		Pośrednia	Niekorzystna	Bardzo niekorzystna
Odsetek blastów w szpiku kostnym(%)	<=2		>2-<5%		5-10%	>10%	
Hemoglobina (g/dl)	=>10		8-<10	<8			
Płytki krwi (G/l)	=>100	50-<100	<50				
Neutrocyty (G/l)	=>0,8	<0,8					
RYZYKO	PUNKTACJA RYZYKA						
Bardzo niskie	<=1,5						
Niskie	>1,5 - 3						
Pośrednie	>3 - 4,5						
Wysokie	>4,5 - 6						
Bardzo wysokie	>6						

Strategia leczenia zespołów mielodysplastycznych ustalana jest jednak w odniesieniu do ryzyka według klasyfikacji IPSS-R [36]. Pacjenci z ryzykiem bardzo niskim, niskim oraz niektórzy z ryzykiem pośrednim są umownie zaliczani do zespołów mielodysplastycznych niższego

ryzyka i leczenie tych pacjentów ma na celu zmniejszenie częstości przetoczeń składników krwi, poprawę komfortu życia oraz opóźnienie transformacji do ostrej białaczki szpikowej [35, 36]. Możliwości terapeutyczne obejmują lenalidomid u pacjentów z zespołem 5q-, luspatercept u pacjentów z MDS z mutacją *SF3B1*, chelatory żelaza u pacjentów narażonych na częste przetoczenia koncentratu krwinek czerwonych, a także erytropoetynę (EPO, *ang. erythropoietin*) i G-CSF (czynnik wzrostu kolonii granulocytarnej, *ang. granulocyte colony stimulating factor*) [48-52]. U części chorych z MDS niskiego ryzyka jest stosowana wyłącznie obserwacja.

tab. 4 Klasyfikacja zespołów mielodysplastycznych wg ICC 2022

	Liczba linii objętych dysplazją	Cytopenie	Blasty w szpiku kostnym (BM) i krwi obwodowej (PB)	Kariotyp ¹	Mutacje
MDS z mutacją <i>SF3B1</i>	Zwykle $\geq 1^2$	≥ 1	<5% BM <2% PB	Dowolny, za wyjątkiem izolowanej del(5q), -7/del(7q), abn3q26.2 lub kariotypu złożonego	<i>SF3B1</i> ($\geq 10\%$ VAF), bez <i>TP53</i> lub <i>RUNX1</i>
MDS z del(5q)	Zwykle $\geq 1^2$	≥ 1	<5% BM <2% PB ³	del(5q) z maksymalnie jedną dodatkową zmianą, za wyjątkiem -7/del(7q)	Dowolne, za wyjątkiem <i>TP53</i>
MDS, NOS bez dysplazji	0	≥ 1	<5% BM <2% PB ³	-7/del(7q) lub kariotyp złożony	Dowolne, za wyjątkiem <i>TP53</i> lub <i>SF3B1</i> ($\geq 10\%$ VAF)
MDS, NOS z jednoliniową dysplazją	1	≥ 1	<5% BM <2% PB ³	Dowolny, za wyjątkiem spełniającego kryteria MDS-del(5q)	Dowolne, za wyjątkiem <i>TP53</i> ; nie spełniające kryteriów MDS- <i>SF3B1</i>
MDS, NOS z wieloliniową dysplazją	≥ 2	≥ 1	<5% BM <2% PB ³	Dowolny, za wyjątkiem spełniającego kryteria MDS-del(5q)	Dowolne, za wyjątkiem <i>TP53</i> ; nie spełniające kryteriów MDS- <i>SF3B1</i>
MDS z nadmiarem blastów (MDS-EB)	Zwykle $\geq 1^2$	≥ 1	5-9% BM, 2-9% PB ³	Dowolny	Dowolne, za wyjątkiem <i>TP53</i>
MDS/AML	Zwykle $\geq 1^2$	≥ 1	10-19% BM lub PB	Dowolny, za wyjątkiem zmian definiujących AML	Dowolne, za wyjątkiem <i>NPM1</i> , bZIP <i>CEBPA</i> lub <i>TP53</i>

BM=szpik kostny, PB = krew obwodowa

¹rearanżacja BCR::*ABL1* lub jakiegokolwiek rearanżacje związane z nowotworami mieloidalnymi/limfoidalnymi z eozynofilią i fuzjami genowymi kinazy tyrozynowej wykluczają diagnozę MDS, nawet w przypadku obecnej cytopenii.

²Chociaż dysplazja jest zwykle obecna w tych podtypach, nie jest wymagana.

³Chociaż 2% blastów we krwi obwodowej uprawnia do zaklasyfikowania MDS jako MDS-EB, to obecność 1% blastów we krwi obwodowej potwierdzona dwukrotnie w osobnym badaniu także kwalifikuje się jako MDS-EB.

Dla pacjentów z ryzykiem bardzo wysokim, wysokim oraz u części pacjentów z ryzykiem pośrednim według IPSS-R ośrodki hematologiczne mogą zaoferować lek demetylujący – opisaną wcześniej azacytydynę, szczególnie gdy odsetek blastów w szpiku kostnym przekracza 10%. W randomizowanym badaniu klinicznym III fazy dla pacjentów z zespołami mielodysplastycznymi wysokiego ryzyka terapia azacytydyną wykazała korzyść w stosunku do chemioterapii klasycznej lub BSC (*ang. Best Supportive Care, najlepsza terapia wspomagająca*) wydłużając medianę przeżycia całkowitego z 15 miesięcy w grupie kontrolnej do 24,5 miesiąca w grupie badanej [53].

tab. 5 Klasyfikacja zespołów mielodysplastycznych wg WHO 2022

	Odsetek blastów	Zmiany genetyczne
MDS ze zdefiniowanymi zaburzeniami genetycznymi		
MDS z niskim odsetkiem blastów i izolowaną delecją 5q (MDS-5q)	<5% BM i <2% PB	delecja 5q - izolowana lub z jednym innym zaburzeniem cytogenetycznym innym niż monosomia 7 lub delecja 7q
MDS z niskim odsetkiem blastów i mutacją <i>SF3B1</i> ^a (MDS- <i>SF3B1</i>)		nieobecność delecji 5q, monosomia 7 lub kariotyp złożony mutacja <i>SF3B1</i>
MDS z bialleliczną mutacją <i>TP53</i> (MDS-bi <i>TP53</i>)	<20% BM i PB	zwykle kariotyp złożony dwie lub więcej mutacje <i>TP53</i> lub jedna mutacja z udowodnioną utratą liczby kopii <i>TP53</i> lub utratą heterozygotyczności (cnLOH)
MDS, zdefiniowane morfologicznie		
MDS z niskim odsetkiem blastów (MDS-LB)	<5% BM i <2% PB	
MDS, hipoplastyczny ^b (MDS-h)		
MDS ze zwiększonym odsetkiem blastów (MDS-IB)		
MDS-IB1	5–9% BM lub 2–4% PB	
MDS-IB2	10-19% BM lub 5–19% PB lub pałeczki Auera	
MDS z włóknieniem (MDS-f)	5–19% BM; 2–19% PB	

BM=szpik kostny, PB = krew obwodowa

^aWykrycie $\geq 15\%$ obrączkowanych syderoblastów może zastępować wykrycie mutacji *SF3B1*. Akceptowana terminologia: MDS z niskim odsetkiem blastów i obrączkowymi syderoblastami.

^bZgodnie z definicją, $\leq 25\%$ komórkowości szpiku kostnego, dostosowane względem wieku.

W związku z wykazaniem przewagi azacytydyny nad chemioterapią intensywną oraz niskodawkową nie jest zalecane stosowanie tych metod leczenia w zespołach mielodysplastycznych wysokiego ryzyka, chociaż dopuszcza się użycie chemioterapii klasycznej przed alloHSCT [36].

Azacytydyna wykazała również wysoką skuteczność w zespołach mielodysplastycznych niższego ryzyka [54]. Alternatywą dla zarejestrowanych leków pozostają badania kliniczne [36]. U pacjentów z wysokim ryzykiem transformacji do ostrej białaczki szpikowej należy jednak dążyć do zmiany historii naturalnej choroby za pomocą allogenicznego przeszczepu szpiku kostnego, który pozostaje jedyną potencjalną terapią leczniczą w tej grupie chorych [35, 36]. Ze względu na zwykle zaawansowany wiek chorych oraz liczne obciążenia towarzyszące ta metoda leczenia może zostać wykorzystana u niewielkiego odsetka pacjentów [55].

Postępowanie w zespołach mielodysplastycznych wysokiego ryzyka u pacjentów kwalifikujących się do alloHSCT jest zatem niemal identyczne jak u pacjentów z ostrą białaczką szpikową, a różnice pomiędzy obiema jednostkami chorobowymi wyraźnie zacierają się. Jedna czwarta pacjentów z MDS wysokiego i bardzo wysokiego ryzyka ulega transformacji do ostrej białaczki szpikowej w czasie krótszym niż półtora roku [46]. Etiopatogeneza obu jednostek chorobowych ma zatem wspólne podłoże, a ich rozdział ze względu na odsetek blastów w szpiku kostnym jest arbitralny [56].

W związku z dużym podobieństwem zespołów mielodysplastycznych wysokiego ryzyka do ostrej białaczki szpikowej w aktualnej klasyfikacji ICC 2022 wyodrębniono grupę MDS/AML, co z założenia ma ułatwić pacjentom dotychczas reprezentującym obie jednostki chorobowe udział we wspólnych badaniach klinicznych [3, 56].

1.3 Rola procesów epigenetycznych w rozwoju komórkowym

Genom organizmu eukariotycznego jest zawarty w każdej jego komórce i definiuje jego fenotyp poprzez ekspresję konkretnych genów i syntezę odpowiadających im białek. Jednak dynamika i charakter wzrostu komórek organizmu zapisanego w sekwencji nukleotydów jest zależna od czynników epigenetycznych - 'znamion chemicznych' dodanych do DNA, RNA oraz białek chromatyny i wpływających na ich funkcję [57].

Czynniki epigenetyczne modulują funkcję genomu na poziomie różnych komórek mimo tej samej sekwencji nukleotydów w każdej z nich [57]. Mogą zwiększać aktywność poszczególnych genów poprzez indukowanie ich ekspresji, bądź osłabiać ich funkcję poprzez ich wyciszenie (ang. gene silencing). Zestaw modyfikatorów epigenetycznych określa się mianem epigenomu. W przeciwieństwie do genomu, jest on wysoce zróżnicowany względem różnych komórek organizmu i zmienny w zależności od licznych czynników zewnętrznych.

Najlepiej poznanym i jednym z najważniejszych przykładów regulacji epigenetycznej jest metylacja DNA. W organizmach eukariotycznych proces ten zachodzi wyłącznie poprzez przyłączanie grupy metylowej CH₃ do atomu C 5' cytozyny w obrębie dinukleotydu CpG helisy DNA, co wiąże się z utworzeniem w jej miejscu 5-metylocytozyny (5-mCyt) [57, 58].

Metylacja cytozyny w obrębie promotorów genów wywołuje przede wszystkim ich wyciszenie i w konsekwencji brak możliwości ich ekspresji, co skutkuje zahamowaniem transkrypcji i translacji. Zahamowanie transkrypcji genów poprzez metylację ich promotorów zachodzi poprzez rekrutację korepresorów [59].

Metylacja DNA komórek hematopoetycznych pnia (HSC – ang. *Hematopoietic Stem Cells*) ma kluczowe znaczenie dla ich dojrzewania i różnicowania, ponieważ za jej pomocą wyciszane są geny odpowiedzialne za podtrzymanie 'nieodjrzałego statusu' komórki macierzystej, a pobudzane do ekspresji są geny biorące udział w różnicowaniu konkretnych linii komórkowych z HSC [60]. Tłumaczy to, dlaczego proces ten jest niezbędny w rozwoju embrionalnym organizmu, jednak wiadomo, że zachodzi przez całe jego życie [57]. O ile metylacja CpG występującego w obrębie promotora genu jest nieodwracalna, o tyle odwracalna jest metylacja CpG występującego poza promotorem genu [61].

Metylacja cytozyny w obrębie dinukleotydu CpG zachodzi przy udziale metylotransferaz, m.in. DNMT3A, kodowanej przez gen *DNMT3A*. W badaniu Subramaniam i wsp. myszy pozbawione

genu *DNMT3A* umierały w ciągu 4 tygodni od narodzin [62]. Wpływ mutacji *DNMT3A* na rozwój nowotworów hematologicznych poprzez zaburzenie metylacji CpG jest znaczący i został omówiony w dalszej części pracy.

Procesem przeciwstawnym do metylacji CpG jest demetylacja, która polega na katalizowaniu reakcji utleniania 5-metylocytozyny (5-mCyt) do 5-hydroksymetylocytozyny (5-hmCyt) i zachodzi przy udziale białek z rodziny TET (*ang. Ten Eleven Translocation enzymes*), kodowanych przez geny *TET1*, *TET2* oraz *TET3* [63, 64].

Pierwsza publikacja opisująca oksydację 5-mCyt do 5-hmCyt przez dioksygenazę TET1 oraz wyjaśniająca potencjalną rolę białek TET w regulacji epigenetycznej ukazała się w 2009 roku. W modelu mysim pozbawionym *Tet1* metodą interferencji RNA uzyskiwano obniżenie poziomu 5-hmCyt w DNA komórek jądrzastych, czym potwierdzono mechanizm demetylujący kodowanej przez *Tet1* dioksygenazy [63]. Oksydacja przeprowadzana przez białka TET jest zależna od alfa-ketoglutaranu (inaczej 2-oksylglutaranu, 2OG), który powstaje w cyklu Krebsa z izocytrynianu przy udziale dehydrogenazy izocytrynianowej 1. i 2. (IDH1/2) oraz jonów Fe^{2+} [63]. Mutacja w genie *IDH1/2*, kodującej dehydrogenazę izocytrynianową 1. i 2. zaburza proces demetylacji pozbawiając *TET2* substratu do przeprowadzanej reakcji oraz bezpośrednio go blokując przy udziale 2-oksylglutaranu i implikuje przebieg AML oraz MDS (**rozdział 1.4**).

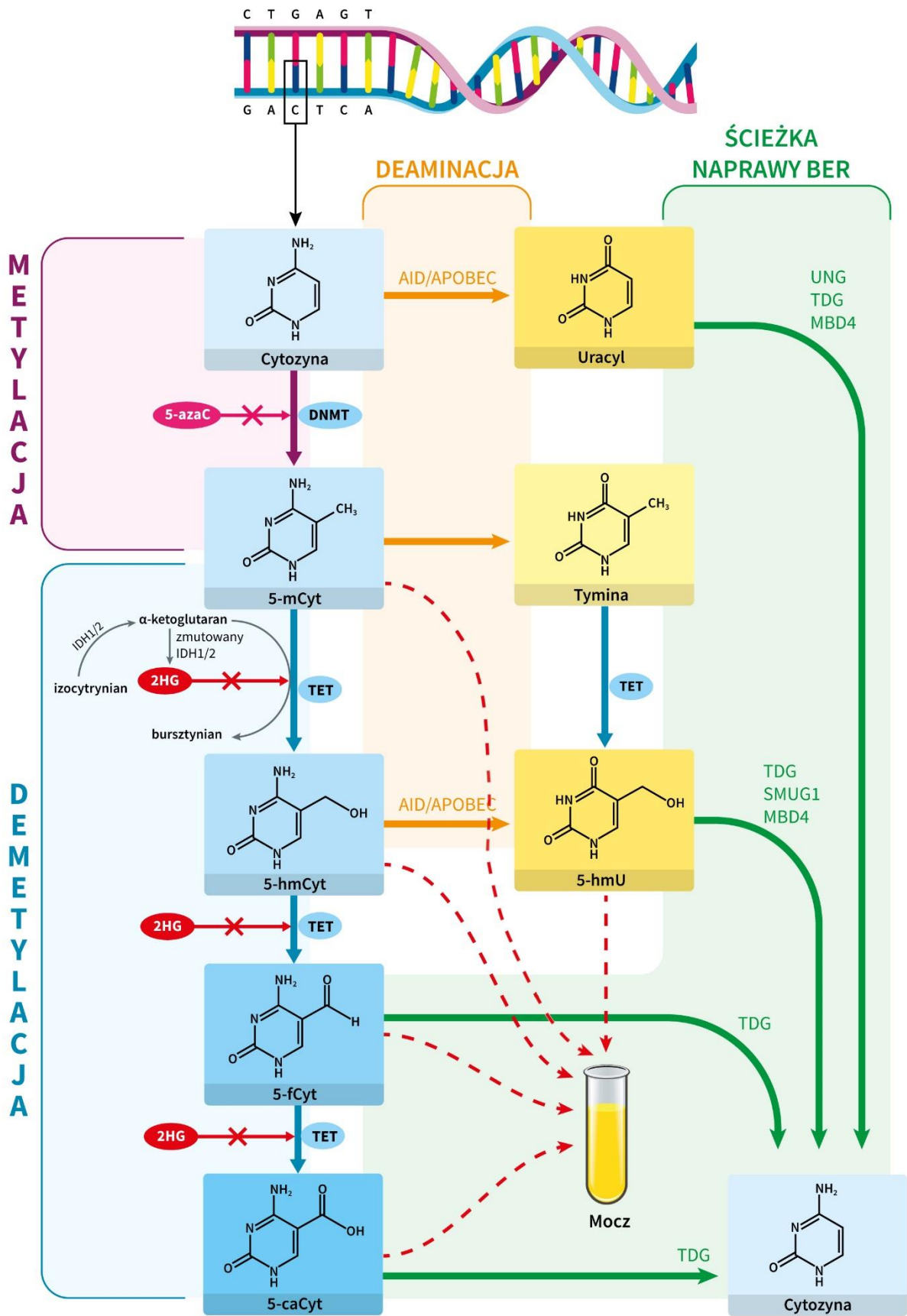
Dioksygenazy kodowane przez geny z rodziny *TET* utleniają nie tylko 5-mCyt do 5-hmCyt, ale także są odpowiedzialne za oksydację 5-hmCyt do dalszych produktów szlaku demetylacji, takich jak 5-formylocytozyny (5-fCyt) oraz 5-karboksycytozyny (5-caCyt) [65-67]. Powstałe w ten sposób produkty szlaku demetylacji zostają wycięte z nici DNA i zastąpione cytozyną za pomocą systemu naprawczego BER (*ang. Base Excision Repair*), w którym kluczową rolę odgrywa glikozylaza TDG (*ang. Thymine-DNA Glycosylase*) [68]. Dodatkowo białka TET utleniają tyminę do 5-hydroksymetylouracylu (5-hmUra), który również zostaje usunięty przez system BER z nici DNA. Opisany powyżej proces został zilustrowany na **rycinie 1**.

Dla prawidłowego funkcjonowania systemu naprawczego BER glikozylaza TDG jest niezbędna, a jej usunięcie z modelu mysiego skutkowało nagromadzeniem 5-fCyt oraz 5-caCyt w DNA komórek macierzystych myszy, co tłumaczy jej rolę w wycinaniu produktów szlaku demetylacji [69, 70]. Opisany powyżej proces wymiany produktów szlaku demetylacji na cytozynę w helisie DNA przy udziale systemu BER określa się łącznie jako TET-TDG-BER-zależną aktywną

demetylację DNA [69, 71]. Za pomocą tego mechanizmu może zostać przywrócona ekspresja wyciszonych metylacją genów.

Sama cytozyna, jak i produkty aktywnej demetylacji DNA mogą być poddane działaniu innego modyfikatora epigenetycznego – genu *AID*, kodującego deaminazę cytydyny i przekształcającego cytozynę w uracyl oraz 5-hmC w 5-hydroksymetylouracyl (5-hmU) [72].

Ostatecznie, produkty szlaku demetylacji trafiają w momencie podmieniania ich na cytozynę do krwi obwodowej, a następnie zostają wydalone z moczem (*ryc. 1*).



ryc. 1 Schemat szlaków metylacji i TET-TDG-BER-zależnej demetylacji DNA

1.4 Zmiany epigenetyczne jako czynnik rozwoju AML i MDS oraz innych nowotworów hematologicznych

Metylacja cytozyny dinukleotydu CpG występującego w obrębie promotorów genów supresji nowotworu (*ang. tumour suppressor genes*) wydaje się mieć duże znaczenie w rozwoju klonu komórek AML. Dla większości typów AML opisywane są zaburzenia epigenetyczne w postaci hipermetylacji promotorów genów: apoptozy, różnicowania oraz supresji nowotworów [73-76]. Zaburzenia te są wynikiem mutacji genów zaangażowanych w metylację i demetylację CpG. Opisany wcześniej gen *DNMT3A* odpowiedzialny za metylację genów biorących udział w różnicowaniu komórek macierzystych i supresji guzów nowotworowych jest zmutowany u 15-25% pacjentów z AML. Jeszcze częściej (29-34%) jego mutacje występują u pacjentów z AML i prawidłowym kariotypem (CN-AML, *ang. cytogenetically-normal AML*) [58, 77-79]. W badaniu Challen i wsp. zaobserwowano spadek globalnej metylacji w komórkach potomnych wobec pozbawionej genu *DNMT3A* komórki macierzystej, a także hipometylację regionów promotorowych genów odpowiedzialnych za funkcję multipotencjalną komórek HSC oraz ich różnicowanie [80]. Można wnioskować, że hipometylacja spowodowana utratą genu *DNMT3A* (jak w badaniach eksperymentalnych) lub jego mutacjami (jak w przebiegu AML) jest bezpośrednio związana z ekspansją komórek macierzystych przy jednoczesnym zahamowaniu różnicowania tych komórek w prawidłowe, zróżnicowane komórki szpiku kostnego i krwi obwodowej, co z kolei leży u podstaw patogenezy AML. Nie bez powodu badacze określają mutacje w *DNMT3A* jako 'mutacje założycielskie' AML (*ang. 'founder mutations'*) [81, 82].

Również wśród pacjentów z zespołami mielodysplastycznymi poprzedzającymi AML, mutacje w obrębie *DNMT3A* są powszechne [83]. Prawdopodobnie więc, występują one na wczesnym etapie leukemogenezy. Taką teorię wspierają badania Krönke i wsp., w których analizowano geny 55 pacjentów z AML. O ile mutacje w obrębie genu *NPM1* wycofywały się u części pacjentów w momencie nawrotu choroby, o tyle u wszystkich pięciu pacjentów z mutacjami w obrębie *DNMT3A* pozostawały one obecne przy wznowie AML, co może świadczyć o ich obecności we wczesnych formach komórek progenitorowych [84]. Także badania Corces-Zimmerman i wsp. udowadniają, że mutacje genów odpowiedzialnych za modyfikację DNA w mechanizmie (de)metylacji występują we wczesnych formach pluripotencjalnych komórek macierzystych, zdolnych do różnicowania w konkretne linie komórkowe szpiku kostnego, a co więcej, pozostają w komórce po terapii, prowadzą do klonalnej ewolucji w czasie remisji i są

przyczyną wznowy AML, stąd określane są mianem ‘mutacji przedbiałaczkowych’ (*ang. preleucemic mutations*) [85].

Jednak za zaburzenia metylacji i jej prawdopodobny wpływ na rozwój AML i MDS odpowiedzialne są nie tylko mutacje w *DNMT3A*. W procesy te zaangażowany jest szereg innych czynników epigenetycznych.

Jednym z nich jest wcześniej wspomniany gen *TET2*, zlokalizowany na ramieniu długim chromosomu 4 (locus *4q24*) i odpowiedzialny za demetylację 5-mCyt. Mutacje typu utraty funkcji (*ang. loss-of-function*) w *TET2* zostały zidentyfikowane po raz pierwszy u pacjentów z nowotworami szpiku kostnego [86]. Prowadzą one do ograniczenia aktywności katalitycznej kodowanej przez *TET2* oksygenazy Tet2 i przez to do zablokowania możliwości wykorzystania przez nią alfa-ketoglutaranu lub jonów Fe^{2+} , w efekcie czego nie przeprowadza ona procesu demetylacji prawidłowo [64, 87]. Niesie to za sobą nagromadzenie pierwotnie zmetylowanej postaci CpG, czyli 5-metylocytozyny i jednocześnie obniżenie stężenia 5-hydroksymetylocytozyny [64, 88-90]. Moran-Crusio i wsp. jako pierwsi wykonali eksperyment *in vivo* na modelu mysim pozbawionym genu *TET2* i udowodnili, że konsekwencją utraty Tet2 jest zwiększona proliferacja komórek pnia oraz zwiększona produkcja homogennych, niezróżnicowanych komórek macierzystych (HSC). Najważniejszą obserwacją tego badania była jednak inicjacja procesu mieloproliferacji *in vivo* u myszy po 20 tygodniach, tj. narastanie splenomegalii, monocytozy i neutrocytozy oraz hematopoezy pozaszpikowej, a także charakterystyczna dla ostrych białaczek obecność młodych form komórek linii granulocytarnej w rozmazie krwi obwodowej (*ang. left shift*) [90]. Taki zestaw objawów występujących u myszy jest spójny ze szczególnym typem zespołu mielodysplastycznego – przewlekłą białaczką mielomonocytową, CMML (*ang. Chronic Myelomonocytic Leukemia*), często poprzedzającą AML. Ten fakt znajduje swoje odzwierciedlenie w publikacjach dotyczących pacjentów z CMML2, wśród których mutacje *TET2* typu *loss-of-function* opisywano u 20-50% z nich [73, 91]. W innym badaniu Ko i wsp. wykazano, że dioksygenaza Tet2 odpowiedzialna jest za powstrzymywanie ekspansji komórek macierzystych w szpiku kostnym, zatem jej brak lub defekt powinien uruchamiać proces niekontrolowanej proliferacji wczesnych form rozwojowych komórek szpiku [73]. Quivoron i wsp. opisując swój model *in vivo* myszy pozbawionej Tet2 wykazali nagromadzenie u 4-6-miesięcznych myszy komórek LSK (*ang. LSK cells*, wczesne formy krwiotwórczych komórek macierzystych w modelach mysich) oraz

komórek pnia [89]. Dodatkowo, założyli hodowle komórkowe z komórek LSK i wykazali, że w hodowli komórek pozbawionych *Tet2* w obu allelach (*Tet2*^{-/-}) pochodzące z niej komórki po 12 miesiącach wykazywały mniejsze zróżnicowanie oraz podtrzymanie niedojrzałego fenotypu niż w grupie kontrolnej. Jednocześnie zaobserwowali narastanie leukocytozy oraz hepatosplenomegalii u 4-miesięcznych myszy *Tet2*^{-/-}, co nie było obserwowane u zdrowych kontroli. Autorzy tego badania posunęli się o krok dalej stawiając hipotezę, zgodnie z którą tworzenie mutacji *TET2* typu loss-of-function stanowi wczesny etap leukemogenezy i zasugerowali, by przyszłe terapie były wycelowane w komórki pnia i macierzyste, celem eradykacji wczesnego klonu nowotworowego [89]. Jednocześnie w ich ocenie, samo zaburzenie funkcji TET2 nie jest wystarczające do rozwoju białaczki, a jedynie indukuje początkowy, niezbędny etap leukemogenezy, która dopełnia się w zależności od obecności innych zaburzeń genetycznych [89].

Z przeprowadzonych badań *in vitro* oraz *in vivo* na modelach zwierzęcych można wnioskować, że mutacje *TET2* typu loss-of-function upośledzają prawidłową hematopoezę poprzez zaburzenie oksydacji 5-mCyt do 5-hmCyt w konkretnych genach biorących udział w dojrzewaniu i różnicowaniu komórek HSC, co potencjalnie uruchamia proces leukemogenezy.

Mutacje typu utraty funkcji genu *TET2* występują u 10-23% pacjentów z AML [86, 87, 90]. W badaniu Ko i wsp. DNA wyizolowane z komórek szpiku kostnego lub krwi obwodowej trzynastu pacjentów z AML i mutacją *TET2* wykazało znacznie niższe stężenia 5-hmCyt niż DNA wyizolowane z komórek osób zdrowych lub pacjentów z AML nieobjętych mutacją *TET2* [64]. U pacjentów z AML i korzystnym ryzykiem genetycznym udowodniono, że mutacje w *TET2* związane są z krótszym czasem wolnym od zdarzeń (EFS, *ang. Event-Free Survival*), niższym odsetkiem remisji całkowitych (CR, *ang. Complete Remission*) oraz krótszym przeżyciem całkowitym (OS, *ang. Overall Survival*), a zatem stanowią niekorzystny czynnik rokowniczy [87]. Jednocześnie nie wykazano związku rokowniczego w zależności od rodzaju mutacji *TET2*.

Poza AML mutacje *TET2* opisuje się powszechnie również w zespołach mielodysplastycznych, gdzie obecne są u 19-26% pacjentów, a także u pacjentów z zespołami mieloproliferacyjnymi oraz mastocytozą, przy czym dla każdej jednostki chorobowej częstość ich występowania jest różna, **tab. 6** [73, 86, 92-95].

tab. 6 Częstość występowania mutacji TET2 w wybranych nowotworach hematologicznych

Nowotwór hematologiczny	Częstość występowania mutacji TET2	Badanie
Ostra białaczka szpikowa	10-23%	<i>Moran-Crusio K et al. Cancer Cell. 2011;20:11-24</i> <i>Metzeler KH et al. J Clin Oncol. 2011;29:1373-1381</i> <i>Delhommeau F et al. N Engl J Med 2009;360:2289-2301</i>
Zespoły mielodysplastyczne	19-26%	<i>Ko M et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011;108:14566-71</i> <i>Gurnari C et al. Blood Adv. 2022;6:100-107</i> <i>Delhommeau F et al. N Engl J Med 2009;360:2289-2301</i>
Mielofibroza	14-17%	<i>Delhommeau F et al. N Engl J Med 2009;360:2289-2301</i> <i>Tefferi A et al. Leukemia. 2009;23:905-11</i>
Nadpłytkowość samoistna	5%	<i>Delhommeau F et al. N Engl J Med 2009;360:2289-2301</i> <i>Tefferi A et al. Leukemia. 2009;23:905-11</i>
Czerwienica prawdziwa	16%	<i>Delhommeau F et al. N Engl J Med 2009;360:2289-2301</i> <i>Tefferi A et al. Leukemia. 2009;23:905-11</i>
Mastocytoza	29%	<i>Tefferi A et al. Leukemia. 2009;23:900-904</i>
Przewlekła białaczka mielomonocytoza	20-50%	<i>Abdel-Wahab O et al. Blood 2009;114: 144-147</i>

Zarówno zespoły mielodysplastyczne, jak i zespoły mieloproliferacyjne mają potencjał transformacji do ostrej białaczki szpikowej, a mediana czasu progresji danej jednostki chorobowej do AML jest różna, jednak mimo licznych badań nie udało się dotąd ustalić

konkretnych czynników genetycznych ani epigenetycznych warunkujących ryzyko oraz czas wystąpienia transformacji. Hipotezę zakładającą rolę czynników epigenetycznych w procesie transformacji zespołów mieloproliferacyjnych do ostrej białaczki szpikowej sprawdzano w szeregu badań [88, 96, 97]. W analizie genów 63 pacjentów z AML wtórnymi do zespołów mieloproliferacyjnych (sAML, *ang. secondary AML*) u ponad jednej czwartej z nich opisano mutacje w genie *TET2*, a u kolejnych dziesięciu procent - mutacje w *IDH1* [97]. Podobną częstość występowania tych mutacji opisano w grupach kontrolnych, które stanowili pacjenci z AML *de novo* oraz pacjenci z AML zależnymi od mielodysplazji. Jednak wśród pacjentów z AML wtórnymi do zespołów mieloproliferacyjnych u 43% z nich mutacje w *TET2* były obecne jedynie w próbkach pobranych w stadium AML, a nieobecne podczas diagnozy zespołu mieloproliferacyjnego, co może sugerować ich rolę w procesie transformacji zespołu mieloproliferacyjnego do ostrej białaczki szpikowej [97].

Kolejnymi genami występującymi często w postaci zmutowanej u pacjentów z AML i MDS są *IDH1* kodująca dehydrogenazę izocytrynianową 1. oraz *IDH2* kodująca dehydrogenazę izocytrynianową 2. Enzymy te katalizują reakcję, w wyniku której powstaje alfa-ketoglutaran, będący substratem reakcji utleniania 5-mCyt do 5-hmCyt przeprowadzanej przez Tet2 [98, 99]. Mutacje w genach *IDH1* i *IDH2* u pacjentów z AML po raz pierwszy zostały opisane przez Mardis i wsp. w 2009 roku [100]. W wyniku ich obecności w miejsce alfa-ketoglutaranu powstaje onkometabolit – 2-hydroksyglutaran (2-HG), który nie może zostać wykorzystany przez Tet2 w procesie demetylacji 5-mCyt do 5-hmCyt [98, 99]. Jak wykazano kilka lat później, mutacje *IDH1* i *IDH2* występują wyłącznie przy niezmutowanej postaci *TET2*, a produkowany przez zmutowane *IDH1* i *IDH2* 2-hydroksyglutaran (2-HG) hamuje aktywność *TET2* doprowadzając do globalnej hipermetylacji DNA [75, 98, 99, 101, 102]. W tym przypadku funkcje i dalszy los komórek macierzystych szpiku kostnego są więc zaburzone przez mutacje *IDH1* oraz *IDH2*, które prowadzą do zaburzenia procesu oksydacji 5-mCyt do 5-hmCyt i w efekcie całego procesu demetylacji [103].

Odkrycie kluczowej roli mutacji *IDH1* i *IDH2* w epigenetycznym podłożu ostrej białaczki szpikowej doprowadziło do wynalezienia inhibitorów tych genów, odpowiednio ivosidenibu oraz enasidenibu. Pierwszy z wymienionych leków w terapii skojarzonej z azacytydyną dokonał przełomu, wydłużając medianę przeżycia pacjentów obciążonych mutacją *IDH1* i niekwalifikujących się do chemioterapii intensywnej z dotychczasowych 8 miesięcy do 24

miesiący i został w maju 2022 roku zarejestrowany przez FDA w trybie przyspieszonym w tej grupie chorych [33].

Udowodniono tym samym kluczowe znaczenie mechanizmu epigenetycznego w rozwoju ostrej białaczki szpikowej i wykorzystano go jako cel terapeutyczny.

Wielu autorów badań dotyczących podłoża epigenetycznego nowotworów zwraca uwagę na fakt, iż dotychczas jako cel terapeutyczny chorób rozrostowych ustanawiano powtarzalne mutacje genowe, występujące powszechnie w danym typie nowotworu. Jednak obecność i ekspresja powtarzalnych mutacji genowych jest ściśle związana z występowaniem mechanizmów epigenetycznych, które są zaburzone na długo przed wystąpieniem choroby. Zaburzenia te powinny być więc obiektem intensywnych badań prowadzących do odkrywania nowych opcji terapeutycznych wycelowanych w procesy epigenetyczne, jak również ustalania nowych markerów diagnostycznych oraz cech odróżniających stadia zaawansowania poszczególnych nowotworów.

Przedstawione powyżej badania dowodzą kluczowego znaczenia modyfikatorów epigenetycznych w etiopatogenezie nowotworów hematologicznych, a dostępne metody diagnostyczne umożliwiają pomiar ich aktywności u wybranych grup pacjentów. Analiza częstości występowania mutacji genów zaangażowanych w procesy epigenetyczne, ich ekspresji na poziomie molekularnym, a także ilościowy pomiar produktów szlaku aktywnej demetylacji mają na celu wyodrębnienie cech charakterystycznych dla konkretnych typów nowotworów hematologicznych celem bardziej precyzyjnego różnicowania ich. Mierzalne różnice w aktywności mechanizmów epigenetycznych potencjalnie mogą stać się markerami diagnostycznymi dla poszczególnych jednostek chorobowych oraz ich stadiów zaawansowania, a także czynnikami predykcyjnymi oraz rokowniczymi dla nowotworów hematologicznych, w szczególności ostrych białaczek szpikowych oraz zespołów mielodysplastycznych.

2. Cele pracy

Głównym celem niniejszej pracy jest ocena procesów epigenetycznych u pacjentów dorosłych z ostrą białaczką szpikową (AML) oraz zespołami mielodysplastycznymi (MDS).

Cele szczegółowe dotyczą:

1. Analizy poziomów produktów aktywnej demetylacji w DNA leukocytarnym z krwi obwodowej dorosłych pacjentów z AML i MDS oraz grupy kontrolnej.
2. Analizy stężeń produktów aktywnej demetylacji w moczu pacjentów dorosłych z AML i MDS oraz grupy kontrolnej celem oceny zaangażowania mechanizmów naprawczych modyfikacji epigenetycznych w tych grupach pacjentów.
3. Analizy ekspresji mRNA genów zaangażowanych w procesy epigenetyczne w grupie pacjentów z AML i MDS oraz w grupie kontrolnej i ich wpływ na szlak TET-TDG-BER aktywnej demetylacji DNA.
4. Oceny częstości występowania mutacji genów zaangażowanych w procesy epigenetyczne u pacjentów dorosłych z AML i MDS.
5. Oceny wpływu wyjściowych poziomów produktów demetylacji w DNA leukocytarnym oraz stężeń tych produktów w moczu na dane kliniczne: ryzyko transformacji MDS do AML, odpowiedź na chemioterapię indukującą oraz długość życia pacjentów z AML.

3. Pacjenci i metodyka

3.1 Charakterystyka pacjentów

Pomiędzy 2016, a 2021 rokiem do badania włączono 62 pacjentów rasy kaukaskiej z nowo rozpoznanym, nieleczonym AML (48% płci męskiej, 52% płci żeńskiej; mediana wieku 64 lat; zakres 30-88 lat) oraz 42 pacjentów rasy kaukaskiej z nowo rozpoznanym, nieleczonym MDS (52% płci męskiej, 48% płci żeńskiej; mediana wieku 74 lata; zakres 20-87 lat), których rekrutowano w Klinice Hematologii Szpitala Uniwersyteckiego nr 2 im. Jana Biziela w Bydgoszczy oraz w Oddziale Hematologii Wielospecjalistycznego Szpitala Miejskiego im. Mikołaja Kopernika w Toruniu. Do grupy kontrolnej zrekrutowano 52 pacjentów rasy kaukaskiej (42% płci męskiej, 58% płci żeńskiej; mediana wieku 53 lata, zakres 33-71 lat) zgłaszających się do Szpitala Uniwersyteckiego nr 2 im. Jana Biziela w Bydgoszczy celem uczestnictwa w narodowych programach przesiewowych chorób nowotworowych. W grupie kontrolnej wykluczono pacjentów z nowotworami, chorobami hematologicznymi oraz ciężkimi chorobami towarzyszącymi. Dodatkowo, u wszystkich pacjentów z grupy kontrolnej wykonano cytometrię przepływową krwi obwodowej celem wykluczenia komórek atypowych oraz oceny proporcji poszczególnych typów komórek jądrzastych. Badanie uzyskało zgodę Komisji Bioetycznej przy Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, UMK w Toruniu (nr wniosku KB 404/2016). Wszystkim pacjentom przedstawiono „Informację dla pacjenta oraz formularz zgody na udział w badaniu naukowym”. Od wszystkich pacjentów uzyskano świadomą zgodę na udział w badaniu naukowym. Wszystkie procedury badania były prowadzone zgodnie z deklaracją helsińską. Szczegółową charakterystykę pacjentów włączonych do badania zamieszczono w **tab. 7**.

Materiał pochodzący od pacjentów pobierano w momencie ustalenia rozpoznania, przed inicjacją terapii przeciwnowotworowej lub innej terapii wykierowanej w AML lub MDS.

3.2 Metodyka badania

Z każdym pacjentem włączanym do badania został zebrany szczegółowy wywiad lekarski oraz przeprowadzone zostało badanie fizykalne. Następnie przed inicjacją leczenia wycelowanego w AML/MDS pobrano 20 ml krwi żyłnej oraz około 40 ml moczu celem wykonania oznaczeń laboratoryjnych.

tab. 7 Charakterystyka grupy badanej pacjentów włączonych do badania

		Liczba pacjentów, n
Pacjenci z AML		62
Wiek	<60 lat	23 (37%)
	≥60 lat	39 (63%)
Płeć	<i>Mężczyźni</i>	30 (48%)
	<i>Kobiety</i>	32 (52%)
Odsetek blastów w szpiku kostnym	20-30%	10 (16%)
	>30%	46 (74%)
Ryzyko cytogenetyczno-molekularne	<i>Niskie</i>	7 (11%)
	<i>Pośrednie</i>	29 (47%)
	<i>Wysokie</i>	14 (23%)
Pacjenci z MDS		42
Wiek	<60 lat	8 (19%)
	≥60 lat	34 (81%)
Płeć	<i>Mężczyźni</i>	22 (52%)
	<i>Kobiety</i>	20 (48%)
Podtyp wg WHO 2008	<i>RA</i>	2 (5%)
	<i>RARS</i>	2 (5%)
	<i>RCMD</i>	12 (29%)
	<i>Zespół 5q-</i>	1 (2%)
	<i>RAEB-1</i>	11 (26%)
	<i>RAEB-2</i>	13 (31%)
	<i>MDS-U</i>	1 (2%)
Ryzyko wg R-IPSS	<i>Bardzo niskie</i>	5 (12%)
	<i>Niskie</i>	9 (21%)
	<i>Pośrednie</i>	10 (24%)
	<i>Wysokie</i>	7 (17%)
	<i>Bardzo wysokie</i>	10 (24%)

Pobrana krew była przekazywana każdorazowo z Kliniki Hematologii Szpitala Uniwersyteckiego nr 2 im. Jana Biziela w Bydgoszczy (Kierownik Kliniki: dr hab. n. med. Jarosław Czyż, prof. UMK) w ciągu 1-2 godzin od pobrania do Katedry Biochemii Klinicznej Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu (Kierownik Katedry: prof. dr hab. Marek Foksiński).

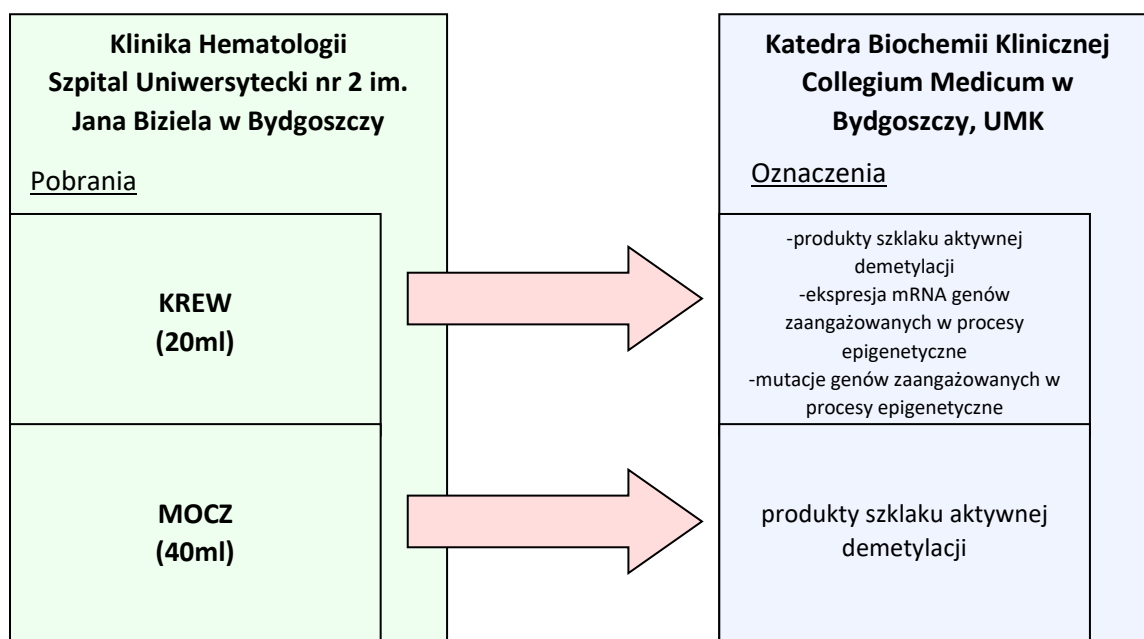
Krew pobierano do probówki z heparyną litową, którą poddano odwirowaniu z względną siłą obrotową 1500 x g przez 10 minut celem odseparowania osocza, a następnie wykonano izolację leukocytów. Proces izolowania leukocytów z krwi obwodowej, a także izolowania DNA, hydrolizy wyizolowanego DNA do deoksynukleozydów oraz izolowania RNA opisano w dalszej części pracy. Powyższy proces umożliwił wykonanie oznaczeń u wszystkich pacjentów produktów szklaku aktywnej demetylacji z DNA leukocytnego, ekspresji mRNA genów oraz mutacji genów zaangażowanych w procesy epigenetyczne.

Pobrana próbka moczu po przetransportowaniu do Katedry Biochemii Klinicznej była mrożona do temperatury -20° , a następnie uzupełniana mieszaniną wzorców wewnętrznych. Powyższy proces umożliwił wykonanie u wszystkich pacjentów oznaczeń produktów szklaku aktywnej demetylacji trafiających do moczu. Oznaczenia zarówno z leukocytów krwi obwodowej, jak i z moczu wykonywano metodą chromatografii cieczowej z tandemową detekcją mas w układzie dwuwymiarowym. Na **rycinie 2**. przedstawiono schematycznie proces kolekcji próbek badanych i ich transportu do docelowego laboratorium.

3.3 Izolowanie leukocytów z pobranej krwi obwodowej

Krew pobrano do probówki z heparyną litową, którą poddano odwirowaniu z względną siłą obrotową 1500 x g przez 10 minut, następnie usunięto osocze i dodano medium hodowli komórek krwi RPMI (Merck, USA), którym rozcieńczono krew w stosunku 1:1. W kolejnym etapie użyto 15-mililitrowe probówki PP z płynem do izolacji leukocytów Histopaque 1119 (Sigma Aldrich, St. Louise, MO, USA) w objętości 3ml, do których przeniesiono odwirowaną i rozcieńczoną medium krew. Probówki odwirowano z względną siłą obrotową 2000 x g (Heraus Megafuge, Thermo Fisher Scientific) przez 40 minut w temperaturze pokojowej z wyłączonym hamulcem, a następnie zebrano z nich interfazę leukocytów do 15-mililitrowych probówek PP. W kolejnym etapie ponownie dokonano rozcieńczania medium hodowlanym RPMI w stosunku 1:1, a następnie odwirowano probówki w temperaturze 4°C z względną siłą obrotową 2000 x

g przez 15 minut. Po kolejnym płukaniu i wirowaniu odrzucono supernatant, a uzyskany osad leukocytów umieszczono w temperaturze -80°C.



ryc. 2 Schematyczny proces kolekcji próbek i wykonywanych badań laboratoryjnych

3.4 Izolowanie DNA z komórek jądrzastych krwi obwodowej i hydroliza DNA do deoksynukleozydów

Do uzyskanego osadu leukocytów zawieszono w buforze B [mesylan deferoksaminy 0,15mmol/L, tris-HCL, 10mmol/L, sól disodowa kwasu etylenotetradiaminowego Na₂EDTA, 5mmol/L i pH 8,0] dodano roztwór laurylosiarczanu sodu (SDS) o końcowym stężeniu 0,5%. Zawiesinę dokładnie wymieszano pipetą Pasteura, a następnie inkubowano w łaźni wodnej przez 30 minut w temperaturze 37° C. Następnie do zawiesiny dodano proteinazę K przy końcowym stężeniu 4 mg/mL i inkubowano przez półtorej godziny w temperaturze 37° C. Preparat schłodzono do 4° C, przeniesiono do probówki wirówkowej i dodano do niego mieszaninę fenol:chloroform:alkohol izoamylowy w stosunku 25:24:1. Za pomocą energicznego potrząsania z preparatu wyekstrahowano fazę wodną, do której dodano mieszaninę chloroform:alkohol izoamylowy w stosunku 24:1. Za pomocą alkoholu etylowego o końcowym stężeniu 70% v/v uzyskano wytrącenie DNA. W kolejnym etapie osad DNA płukano etanolem i rozcieńczano w 50 mikrolitrach wody destylowanej.

W celu wykonania hydrolizy DNA do deoksynukleozydów posłużono się procedurą opublikowaną przez Gackowskiego i współtwórców [104]. Do uwodnionego DNA dodano roztwór octanu amonu 200 mmol/l (Merck, USA) z chlorkiem cynku 0,2mmol/l, pH 4,6 (1:1 v/v) (Merck, USA), 100U nukleazy P1 (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) i 10 mikrogramów tetrahydrydurydyny (Merck, USA). Zabieg ten wykonano celem zahamowania aktywności deaminaz cytydyny. Preparat był inkubowany przez trzy godziny w temperaturze 37° C, a następnie dodano do niego 10% (v/v) NH₄OH i 6U fosfatazy alkalicznej (rSAP, New England Biolabs, Ipswich, MA, USA). Preparat poddano półtoragodzinnej inkubacji w temperaturze 37st. C, a następnie wykonano ultrafiltrację uzyskanych hydrolizatów DNA w filtrach mikrowirówkowych Milipore NMWL5000 (Merck, USA).

3.5 Ultrasprawa chromatografia cieczowa z tandemową detekcją mas (2D-UPLC-MS/MS)

Otrzymane w wyniku hydrolizy związki wzbogacono o mieszaninę znakowanych izotopowo standardów wewnętrznych w stosunku objętościowym 4:1 do końcowego stężenia 50 fmol/μL. Rozdział chromatograficzny wykonano za pomocą systemu Waters ACQUITY 2D-UPLC, przy czym dla pierwszego wymiaru chromatografii wykorzystano detektor fotodiodowy (DAD) do oceny ilościowej niezmodyfikowanych deoksynukleozydów (dN) i 5-mdC. Do oceny ilościowej 5-hmdC, 5-fdC, 5-cadC i 5-hmdU wykorzystano spektrometr masowy z tandemową detekcją mas, XEVO TQ-XS (Waters, USA).

Rozdział chromatograficzny odbywał się w dwóch etapach: na pierwszej kolumnie dokonał się rozdział z wykorzystaniem detektora fotodiodowego przy jednoczesnym odpowiednim sterowaniu czasem retencji frakcji na drugiej kolumnie. Dzięki temu możliwa była analiza ilościowa poziomu niezmodyfikowanych deoksynukleozydów.

Rozdział na drugiej kolumnie odbywał się z wykorzystaniem standardów wewnętrznych znakowanych izotopami i umożliwiał ilościową analizę badanych modyfikacji. Następnie w obrębie chromatogramów wyliczono pola powierzchni pików odpowiadających analizowanym modyfikacjom i standardom wewnętrznym, przy czym ich stosunek określił jednocześnie stosunek wartości badanych modyfikacji do wartości standardów wewnętrznych.

Zastosowana metodyka była zgodna z procedurą opisaną w publikacji Gackowski i wsp. [104].

3.6 Analiza modyfikacji epigenetycznych DNA w moczu

Do analizy 5-mdC, 5-hmdC, 5-hmCyt, 5-fCyt, 5-caCyt, 5-hmU i 5-hmdU w moczu użyto dwuwymiarowej ultrasprawniej chromatografii cieczowej z tandemową spektrometrią mas (2D-UPLC-MS/MS). Wszystkie próbki badanego moczu zostały wzbogacone mieszaniną znakowanych izotopowo wzorców wewnętrznych w stosunku objętościowym 4:1 i poddane filtracji przed analizą. 2D-UPLC-MS/MS składał się z pompy gradientowej i autosamplera dla chromatografii pierwszego wymiaru oraz pompy gradientowej i tandemowego kwadropolowego spektrometru ze źródłem jonów UniSpray dla chromatografii drugiego wymiaru. Oba systemy były powiązane z systemem kolumn wyposażonym w programowalne grzejniki kolumn oraz dwa dwupozycyjne i sześcioportowe zawory przełączające. Wykorzystano następujące kolumny:

-kolumna CORTECS UPLC T3 (1,6 μm , 3 mm \times 150 mm) z prekolumną CORTECS T3 VanGuard (1.6 μm , 2.1 mm \times 5 mm) dla pierwszego wymiaru

-kolumna Waters ACQUITY UPLC CSH C18 (1,7 μm , 2.1 mm \times 100 mm) dla drugiego wymiaru

-kolumna Waters XSelect CSH C18 column (3,5 μm , 3 mm \times 20 mm) jako kolumna transferowa

Do generacji strumienia w układzie chromatograficznym w fazie rozcieńczeń wykorzystano pompę izokratyczną Waters 515.

Układ chromatograficzny działał w trybie tzw. "heart cutting", tzn. wybrana część fazy ruchomej z pierwszego wymiaru była przekazywana do kolumny transferowej za pomocą sześcioportowego zaworu przełączającego, który pełnił rolę podajnika dla drugiego wymiaru układu chromatograficznego.

Systemem chromatograficznym zarządzano za pomocą oprogramowania MassLynx 4.1 (Waters, USA), zaś ilościową analizę badanych pochodnych epigenetycznych wykonano przy użyciu oprogramowania Target Lynx (Target, Włochy).

Spektrometrię mas wykonano przy użyciu tandemowego kwadropolowego spektrometru Waters Xevo TQ-S wyposażonego w źródło jonów UniSpray.

Do detekcji mas wykorzystano następującą konfigurację: temperatura źródła: 150° C, przepływ gazu desolwatacyjnego: 1000 l/h, przepływ gazu w stożku: 150 l/h, temperatura desolwatacji: 500° C. Optymalizacja odpowiedzi detektora została osiągnięta poprzez infuzję

10 μ M analizowanych związków rozpuszczonych w wodzie (przepływ 10 μ L/min) w strumieniu fazy ruchomej przy użyciu systemu Fluidics działającego w trybie mieszanym.

Wydalenie modyfikacji epigenetycznych do moczu oszacowano w stosunku do kreatyniny.

3.7 Metoda analizy ekspresji mRNA genów za pomocą RT-qPCR

Próbki krwi przeznaczone do izolacji RNA rozmrażano w temperaturze pokojowej przez dwie godziny. Izolacja RNA z krwi obwodowej została wykonana przy pomocy PAXgene blood RNA kit (Qiagen, Niemcy) według standardowej procedury dostarczonej przez producenta. Stężenie i czystość wyizolowanego RNA były oceniane za pomocą spektrofotometru NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, USA). Stosunek absorbancji A_{260}/A_{280} był wyznacznikiem zanieczyszczenia białkami, zaś stosunek A_{260}/A_{230} był wyznacznikiem zanieczyszczenia polisacharydami, fenolem oraz solami chaotropowymi.

Żel agarozowy przygotowano poprzez połączenie roztworu agarozy w rozcieńczeniu 1,2% z buforem TBE (Tris, kwas borowy, EDTA), następnie roztwór wylano na saneczki elektroforetyczne do ostygnięcia. Elektroforeza została wykonana przy napięciu 95 V przez 20 minut. Następnie żel wybarwiono bromkiem etydyny lub barwnikiem SimplySafe.

Do dalszej analizy wykorzystano próbki o stężeniu końcowym RNA większym niż 50ng/ μ l. Syntezę cDNA wykonano metodą odwrotnej transkrypcji z wykorzystaniem zestawu do odwrotnej transkrypcji (Applied Biosystems, nr katalogowy 43-688-14) zgodnie z dostarczoną przez producenta instrukcją. Wykorzystano do niej 0,5 mikrograma RNA z każdej otrzymanej próbki. Reakcja została przeprowadzona za pomocą termocyklera Mastercycler (Eppendorf, Niemcy). Celem wykluczenia zanieczyszczenia genomowego DNA reakcja odwrotnej transkryptazy uwzględniała również kontrole negatywne. Uzyskany cDNA został wykorzystany do ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy (qPCR) lub przechowany w -20° C.

Analizę transkryptów genów TET1, TET2, TET3, TDG, IDH1 oraz IDH2 wykonano za pomocą ilościowej RT-PCR (RT-qPCR) przy wykorzystaniu specyficznych starterów (**tab. 8**) i sond hydrolizujących pozyskanych z platformy Universal Probe Library (UPL, Roche). Sondy zostały wyznakowane fluoresceiną (FAM) przy końcu 5' oraz ciemnym czynnikiem wygaszającym przy końcu 3'.

tab. 8 Sekwencja starterów wiodących i starterów odwrotnych

Gen	Sekwencja startera wiodącego	Sekwencja startera odwrotnego
<i>TET1</i>	5'-TCTGTTGTTGTGCCTCTGGA-3'	5'-GCCTTTAAAACCTTTGGGCTTC-3'
<i>TET2</i>	5'-GCCTTTGCTCCTGTTGAGTT-3'	5'-ACAAGGCTGCCCTCTAGTTG-3'
<i>TET3</i>	5'-CACTCCGGAGAAGATCAAGC-3'	5'-GGACAATCCACCCTTCAGAG-3'
<i>TDG</i>	5'-GAATGGAAGCGGAGAACG-3'	5'-TTGCTGTTCATTCACAACCTGC-3'
<i>IDH1</i>	5'-GGGTGTGCCAGTGCTAAAC-3'	5'-GTGTTGAGATGGACGCCTATTTG-3'
<i>IDH2</i>	5'-AGAATTTTAGGACCCCGTCT-3'	5'-CGGTCTGCCACAAAGTCTG-3'

Poziom ekspresji wszystkich badanych genów został znormalizowany do genów referencyjnych: dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej (*G6PD*), białka wiążącego kasetę TATA (*TBP*), aktyny (*ACTB*) oraz syntazy uroporfirynogenowej (*HMBS*) [105].

Każdy roztwór reakcyjny RT-PCR został przygotowany z uzyskanego cDNA na podstawie standardowych procedur dla zestawu LightCycler 480 Probe Master Mix (Roche, Szwajcaria). Reakcje przeprowadzono na 96-dołkowej płytce. Dodatkowo, poza próbkami badanymi każda płytka zawierała także kontrolę negatywną reakcji. Reakcję RT-qPCR przeprowadzono w aparacie LightCycler 480 II (Roche, Szwajcaria), a ekspresję genów wyrażono w odniesieniu do genów referencyjnych przy użyciu oprogramowania tego aparatu. Reakcja dla każdego genu została wystandaryzowana względem krzywej standardowej celem oceny efektywności amplifikacji.

Analiza ekspresji mRNA badanych genów została przeprowadzona zgodnie z metodyką opisaną w publikacji Dziaman i wsp. [105].

3.8 Metoda analizy mutacji genetycznych

Analiza mutacji genowych związanych z sekwencjonowaniem DNA odbyła się w dwóch etapach:

1. Metodę wysokorozdzielczego topnienia matrycy HRM (*ang. High Resolution Melting*) wykorzystano jako screening do detekcji nosicieli mutacji analizowanych genów [106, 107]. Metoda HRM-PCR została wykorzystana przy pomocy aparatu LightCycler480 (Roche, Mannheim, Niemcy) przy użyciu odpowiadających par primerów oligonukleotydów (TIB Molbiol) zaprojektowanych według referencyjnych sekwencji genomowych (na podstawie bazy NCBI Genome Data Viewer lub przeglądarki UCSC Genome), **tab. 9**. Warunki reakcji

wykorzystującej roztwór 5x HOT FIREPol® EvaGreen® HRM Mix (Solis Biodyne, Estonia) zostały zapewnione zgodnie z wytycznymi producenta. Wszystkie analizy HRM PCR zostały wykonane dwukrotnie. Celem potwierdzenia swoistości amplifikacji, produkty PCR z każdej pary primerów zostały sprawdzone metodą elektroforezy w żelu agarozowym. Do analizy danych wykorzystano oprogramowanie LightCycler Software.

tab. 9 Sekwencje starterów wykorzystanych przy metodzie HRM

Gen	Starter wiodący	Starter odwrotny
IDH1 (R132)	GGCTTGTGAGTGGATGGGTA	GCAAAATCACATTATTGCCAAC
IDH2 (R140)	GCTGCAGTGGGACCACTATT	GGACTAGGCGTGGGATGTTT
IDH2 (R172)	TCTGCAAAAACATCCCACGC	CAAGAGGATGGCTAGGCGAG
TET2 (P1237)	GTGAGGCTGCAGTGATTGTG	ATTCCTCAGCGTCTCGGTA
TET2 (R1261)	AGGAAATACGGCACGCTCAC	TGCACGCTGAACTCTCTTCC
TET2 (P1237- R1262)	CATCCTGGTGTGGGAAGGAA	CCCTGGGCTTCACTTACTCT
TET2 (G1869)	ATCCTGACATTGGGGGAGTG	GGTGGGGTGATTCTATTGGG
TET2 (N1902- G1913)	GCCACAACCCCTTTAAAGAAT	AGGCTCCCGTTTCACTTTTT
TET2 (P1367)	CAGATTGAATATGAACACAGAGCA	GCATGAGCACAGAAGTCCAA
TET2 (H1382)	CTCAGGGGTCACTGCATGTT	TGTCCTCAGCCCAACTTACC
TET2 (F1287- S1303)	TTTGGTCTTTTGATTTTTCAGGA	TCATCCCCAAGCAGCTTAAA
TET2 (R1404)	TCAACTAGGCCACCAACACAAA	CCCACTCCCAACTCATCCA
TET2 (R1465)	AGTGTGGAAGCTCAGGAGGAG	TGATGGGGGCAAAACCAAAATAATT
TET2 (A1341)	CCTGTCCACTCTTATGGCACC	GCAGTGGTTTCAACAATTAAGAGGA
TET2 (D688- S689)	AGCTGGAGCACAAGTCACAAA	CTGGGATGGTTGTGTTTGTGC
TET2 (E1178)	ATCCAGTTTGCTTGGCGTAG	ATCCCTGAGAACTTTTGCCTTC

2. Celem potwierdzenia wiarygodności testu HRM wszystkie próbki z wykrytymi mutacjami zostały jednocześnie przeanalizowane za pomocą bezpośredniego sekwencjonowania i sprawdzone pod kątem oceny typu mutacji i specyficznego locus [108]. Końcowe produkty PCR zostały zakwalifikowane i dwukierunkowo zsekwencjonowane za pomocą analizatora SeqStudio Genetic Analyzer (Applied Biosystems; Thermo Fisher Scientific Inc., USA). Wszystkie zmiany nukleotydów wykryte przez dwukierunkowe sekwencjonowanie zostały sprawdzone przy użyciu baz danych Sangera.

3.9 Metody analizy statystycznej

Uzyskane w pracy wyniki przedstawiono jako medianę wartości, przedziały międzykwartylowe oraz zakresy nieodstające. Analizę statystyczną opracowano za pomocą oprogramowania Statistica 13.3 PL (Dell Inc. 2017. Palo Alto, CA, USA, wersja 13.). Do potwierdzenia rozkładu normalnego badanych zmiennych ilościowych wykorzystano test Kolmogorova-Smirnova z korektą Lillieforsa oraz ocenę wizualną uzyskanych histogramów. Dane, dla których potwierdzono rozkład normalny poddano bezpośredniej analizie statystycznej, a dane, dla których nie potwierdzono rozkładu normalnego przekształcono za pomocą Box-Cox i poddano analizie parametrycznej. Zmienne przypisane poszczególnym grupom pacjentów porównywano za pomocą jednowymiarowego, niesparowanego testu t studenta, dwustronnego. Różnice istotne statystycznie potwierdzono testem nieparametrycznym U Manna-Whitneya. W analizach, w których nie zachowano jednorodności wariancji użyto testu z niezależną estymacją wariancji. Do oceny jakości klasyfikatora wykorzystano krzywą ROC (ang. *Receiver Operating Characteristic*) z oceną czułości, swoistości oraz pola pod wykresem krzywej (AUC, ang. *area under curve*). Do zilustrowania długości przeżycia całkowitego badanych grup wykorzystano krzywą przeżycia Kaplana-Meiera z testem log-rank. W analizach wykorzystano także model regresji logistycznej Coxa z oceną współczynnika hazardu (HR, ang. *hazard ratio*) i relatywnego ryzyka (RR, ang. *relative risk*). Celem oceny jednorodności wariancji dwóch próbek populacji wykorzystano dokładny test Fishera. Dla porównania zmiennych powiązanych dla dwóch równolicznych prób wykorzystano test sumy rang Wilcoxon. W wykonanych analizach uznano poziom istotności statystycznej jako $p < 0,05$.

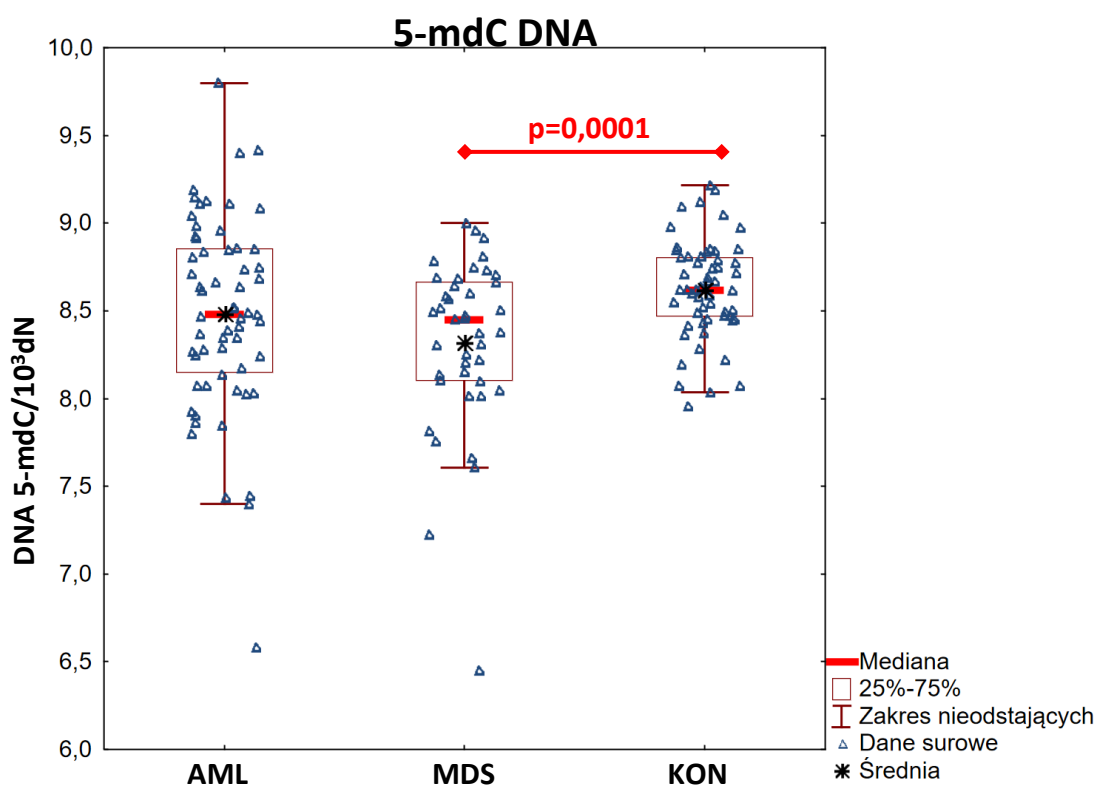
4. Wyniki

4.1 Wartość wyjściowego substratu szlaku aktywnej demetylacji - 5-mdC (5-metylodeoksycytozyny) w DNA leukocytów

U pacjentów z zespołami mielodysplastycznymi obserwowano istotnie niższą wartość 5-mdC w DNA leukocytarnym w porównaniu z grupą kontrolną, przy istotności statystycznej $p=0,0001$ (tab. 10. i ryc. 3.). Nie stwierdzono różnic istotnych statystycznie pomiędzy grupą pacjentów z AML, a grupą pacjentów z MDS oraz pomiędzy grupą pacjentów z AML i grupą kontrolną.

tab. 10 Wartości 5-mdC w DNA leukocytarnym pacjentów z AML, MDS oraz w grupie kontrolnej (wyrażone w jednostkach/ 10^3 dN)

			Znamiennność statystyczna (p)			
			AML v KON	MDS v KON	AML v MDS	
5-mdC	AML	MDS	0,079	0,0001	0,1444	
	Średnia + odch. standardowe					
	8,48 ± 0,56	8,33 ± 0,49				8,62 ± 0,28
	Mediana + przedziały międzykwartylowe					
	8,48 (8,1514 - 8,8539)	8,45 (8,1058 - 8,6634)				
		8,62 (8,47 - 8,805)				



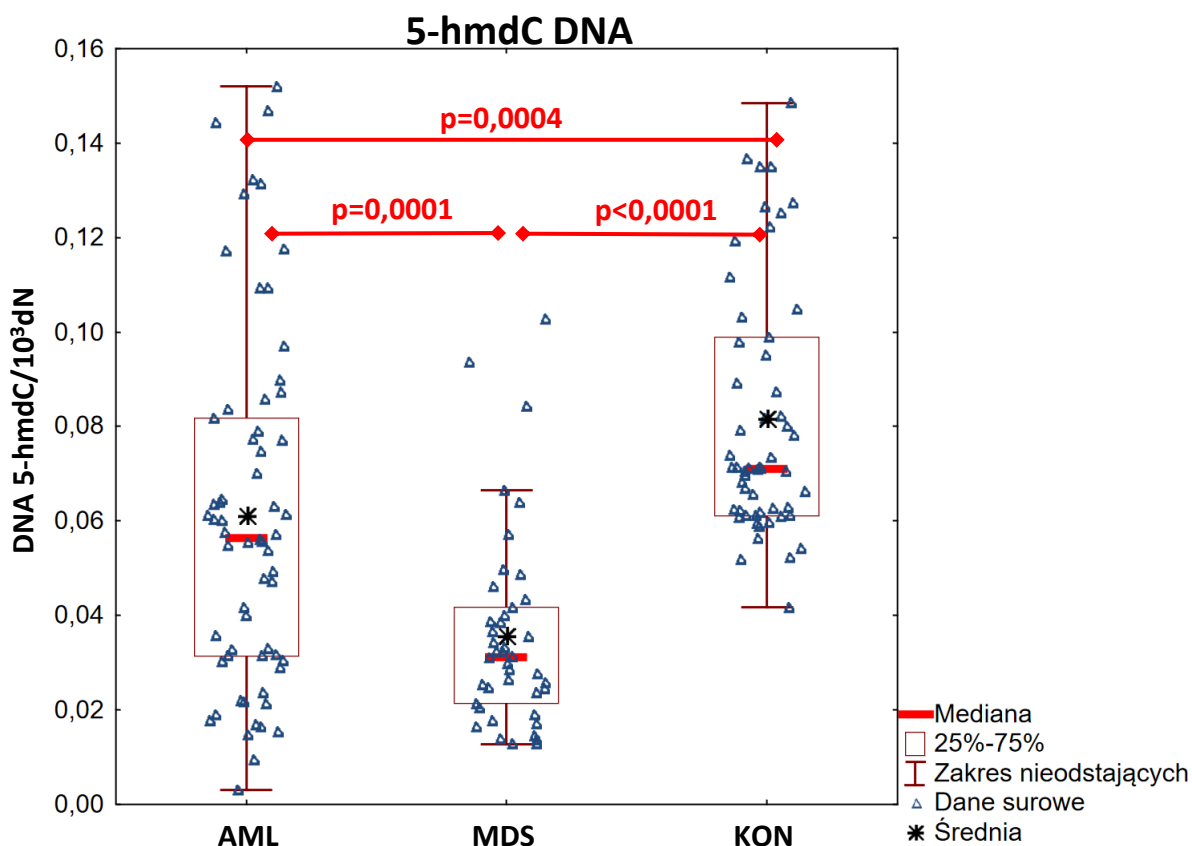
ryc. 3. Wykres ramka-wąsy wartości 5-mdC w DNA leukocytarnym pacjentów z AML, MDS oraz w grupie kontrolnej (wyrażone w jednostkach/ 10^3 dN).

4.2 Wartość pierwszego produktu aktywnej demetylacji - 5-hmdC (5-hydroksymetylodeokscytosyny) w DNA leukocytów

U pacjentów z AML oraz zespołami mielodysplastycznymi obserwowano istotnie niższą wartość 5-hmdC w DNA leukocytarnym w porównaniu z grupą kontrolną, w obu przypadkach uzyskano istotność statystyczną (*tab. 11.* i *ryc. 4.*). U pacjentów z zespołami mielodysplastycznymi wykazano mniejsze niż w AML wartości 5-hmdC w DNA leukocytarnym przy $p=0,0001$.

tab. 11 Wartości 5-hmdC w DNA leukocytarnym pacjentów z AML, MDS oraz w grupie kontrolnej (wyrażone w jednostkach/ 10^3 dN)

			Znamiennność statystyczna (p)			
			AML v KON	MDS v KON	AML v MDS	
5-hmdC	AML	MDS	0,0004	<0,0001	0,0001	
	Średnia + odch. standardowe					
	0,061±0,038	0,036±0,021				0,082±0,028
	Mediana + przedziały międzykwartylowe					
	0,057 (0,0314- 0,0819)	0,031 (0,0214-0,0417)				
		0,071 (0,0611-0,0988)				



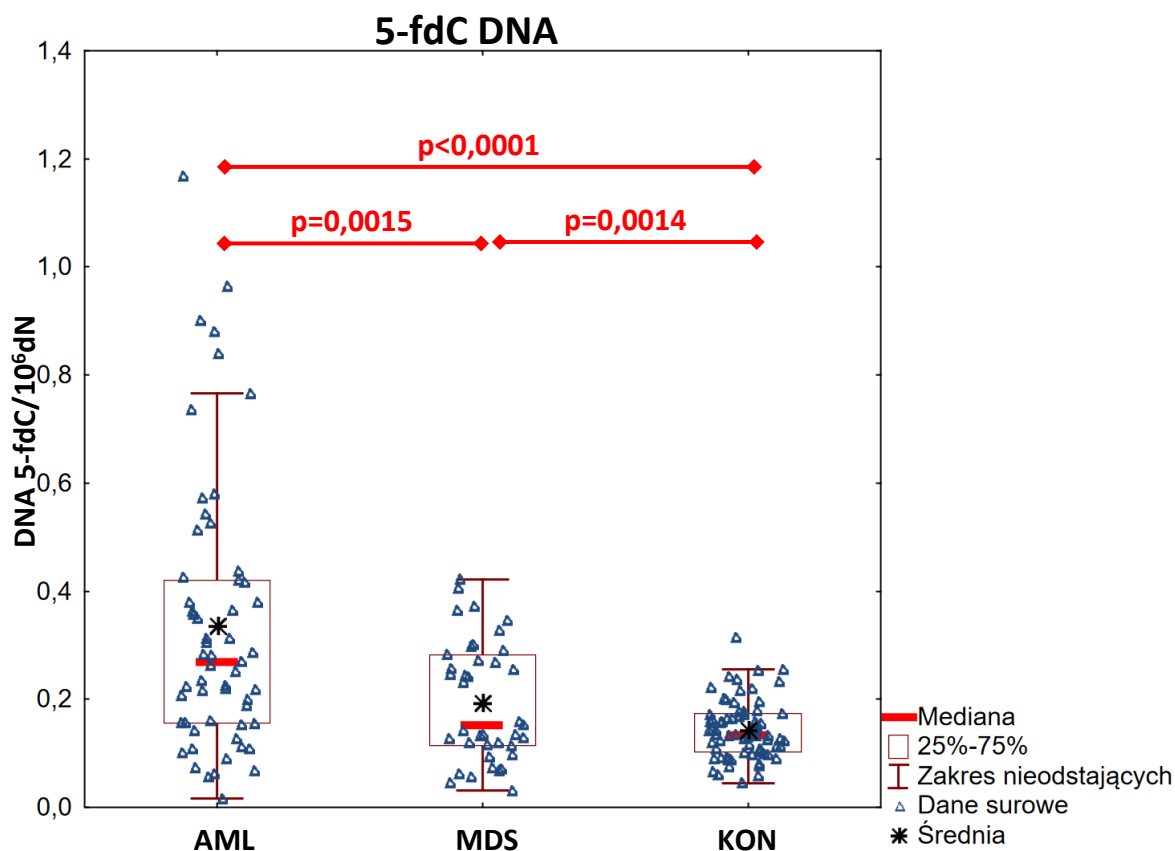
ryc. 4. Wykres ramka-wąsy wartości 5-hmdC w DNA leukocytarnym pacjentów z AML, MDS oraz w grupie kontrolnej (wyrażone w jednostkach/ 10^3 dN).

4.3 Wartość drugiego produktu aktywnej demetylacji 5-fdC (5-formylodeoksyctozyny) w DNA leukocytów

Najwyższą wartość 5-fdC w DNA leukocytarnym wykazano w grupie pacjentów z AML, zaś najniższą w grupie kontrolnej (**tab. 12.** i **ryc. 5.**). Różnice pomiędzy grupami AML i MDS oraz pomiędzy grupami AML i grupą kontrolną były znaczące i wykazano dla nich istotność statystyczną.

tab. 12 Wartości 5-fdC w DNA leukocytarnym pacjentów z AML, MDS oraz w grupie kontrolnej (wyrażone w jednostkach/ 10^6 dN)

			Znamiennność statystyczna (p)		
			AML v KON	MDS v KON	AML v MDS
Średnia + odch. standardowe					
5-fdC	AML	0,34 ± 0,25	<0,0001	0,0014	0,0015
	MDS	0,20 ± 0,11			
	KON	0,14 ± 0,05			
Mediana + przedziały międzykwartylowe					
	AML	0,27 (0,1556 - 0,4202)			
	MDS	0,15 (0,1145 - 0,2817)			
	KON	0,13 (0,1031-0,1734)			



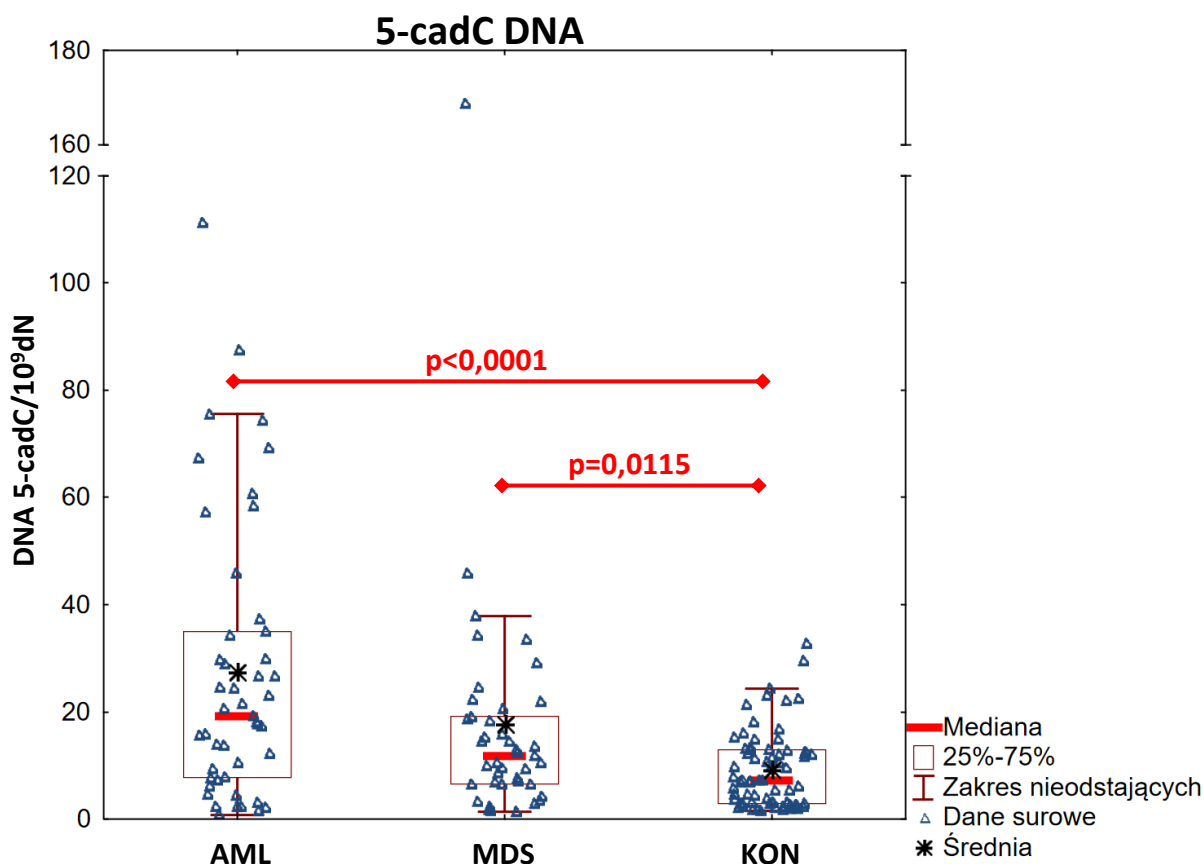
ryc. 5. Wykres ramka-wąsy wartości 5-fdC w DNA leukocytarnym pacjentów z AML, MDS oraz w grupie kontrolnej (wyrażone w jednostkach/ 10^6 dN).

4.4 Wartość trzeciego produktu aktywnej demetylacji 5-cadC (5-karboksydeoksycytozyny) w DNA leukocytów

Podobnie jak w przypadku 5-fdC, najwyższą wartość 5-cadC w DNA leukocytarnym wykazano w grupie pacjentów z AML, zaś najniższą w grupie kontrolnej (**tab. 13.** i **ryc. 6.**). Różnice pomiędzy grupą AML i kontrolną, a także pomiędzy MDS i grupą kontrolną były znaczące i wykazano dla nich istotność statystyczną. Różnica pomiędzy grupami AML i MDS była na granicy istotności statystycznej ($p=0,0884$).

tab. 13 Wartości 5-cadC w DNA leukocytarnym pacjentów z AML, MDS oraz w grupie kontrolnej (wyrażone w jednostkach/ 10^9 dN)

5-cadC	AML	MDS	KON	Znamiennność statystyczna (p)		
	Średnia + odch. standardowe			AML v KON	MDS v KON	AML v MDS
	27,40±26,02	17,76±26,37	9,29±7,2	<0,0001	0,0115	0,0884
Mediana + przedziały międzykwartylowe						
19,24 (7,749-34,981)	11,92 (6,587-19,176)	7,31 (2,963-12,865)				



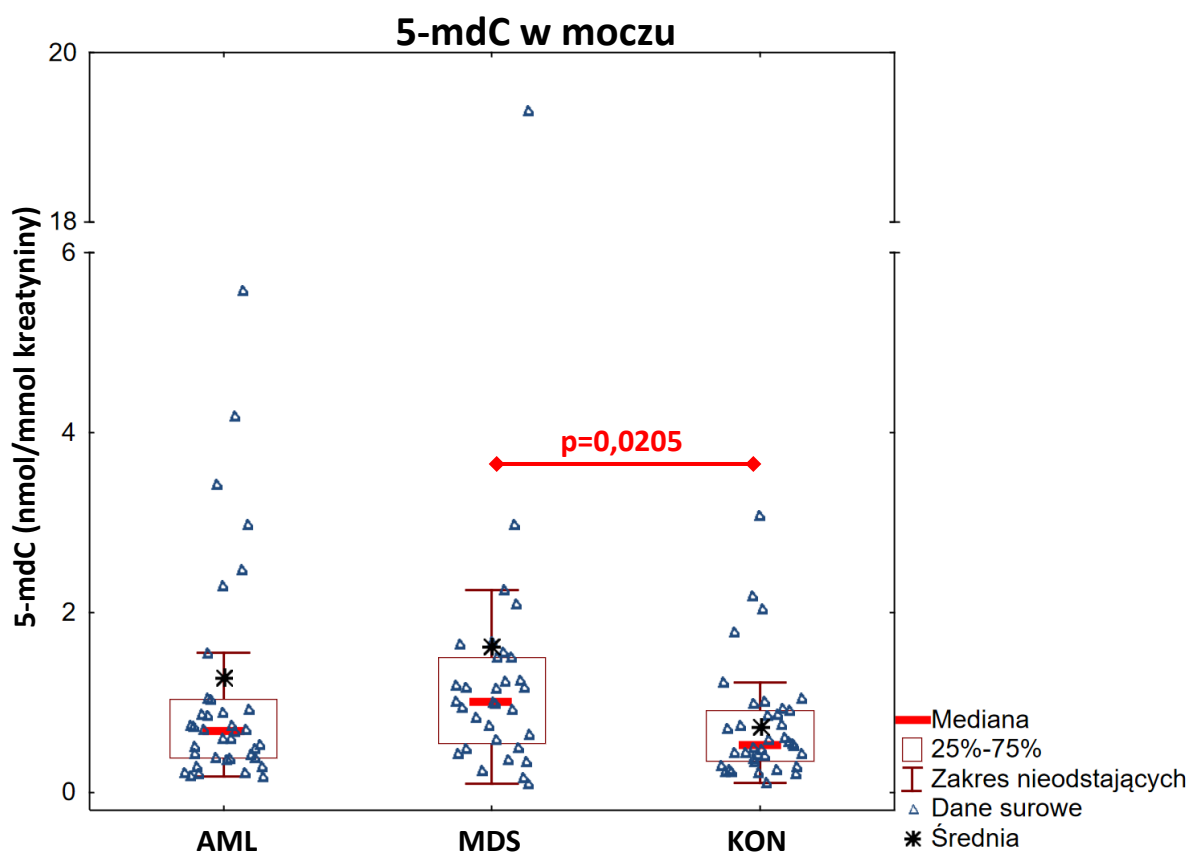
ryc. 6. Wykres ramka-wąsy wartości 5-cadC w DNA leukocytarnym pacjentów z AML, MDS oraz w grupie kontrolnej (wyrażone w jednostkach/ 10^9 dN).

4.5 Wartość wyjściowego substratu aktywnej demetylacji - 5-mdC (5-metylodeoksyctozyny) w moczu

Zaobserwowano, że w grupach AML i MDS wartości 5-mdC były wyższe niż w grupie kontrolnej, jednak istotność statystyczną wykazano jedynie dla grupy pacjentów z MDS (**tab. 14. i ryc. 7.**).

tab. 14 Wartości 5-mdC w moczu pacjentów z AML, MDS oraz w grupie kontrolnej (wyrażone w nmol/mmol kreatyniny)

5-mdC	AML	MDS	KON	Znamiennosc statystyczna (p)		
	Średnia + odch. standardowe			AML v KON	MDS v KON	AML v MDS
	1,28 ± 1,83	1,62 ± 3,29	0,73 ± 0,62	0,2029	0,0205	0,302
Mediana + przedziały międzykwartylowe						
0,68 (0,3856-1,0378)	1 (0,5426-1,5007)	0,53 (0,346-0,9081)				



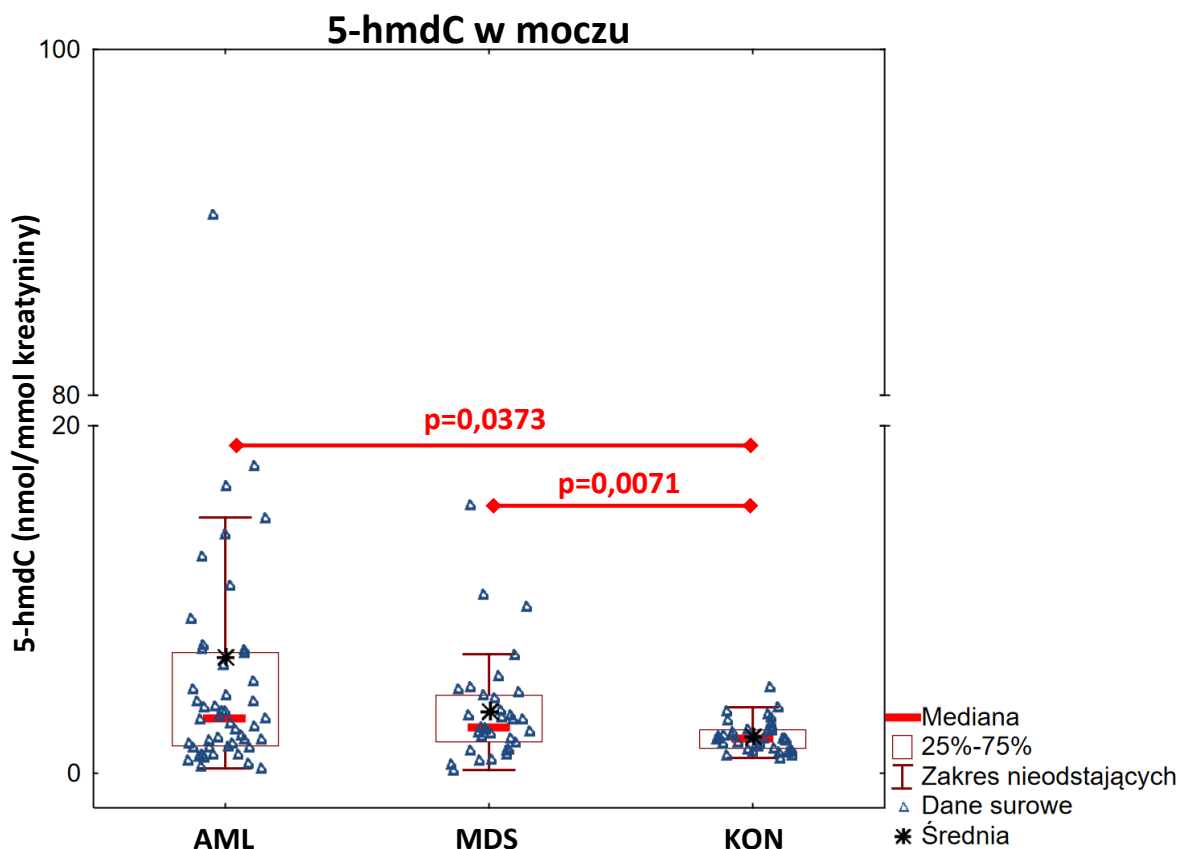
ryc. 7. Wykres ramka-wąsy wartości 5-mdC w moczu pacjentów z AML, MDS oraz w grupie kontrolnej (wyrażone w nmol/mmol kreatyniny).

4.6 Wartość pierwszego produktu aktywnej demetylacji - 5-hmdC (5-hydroksymetylodeokscytozyny) w moczu

Zaobserwowano, że w grupach AML i MDS wartości 5-hmdC były wyższe niż w grupie kontrolnej, w obu zestawieniach wykazano różnicę istotną statystycznie (tab. 15. i ryc. 8.).

tab. 15 Wartości 5-hmdC w moczu pacjentów z AML, MDS oraz w grupie kontrolnej (wyrażone w nmol/mmol kreatyniny)

5-hmdC	AML	MDS	KON	Znamienność statystyczna (p)		
				AML v KON	MDS v KON	AML v MDS
	Średnia + odch. standardowe			0,0373	0,0071	0,4259
	6,72 ± 13,31	3,62 ± 3,15	2,14 ± 0,87			
Mediana + przedziały międzykwartylowe				0,0373	0,0071	0,4259
	3,20 (1,5848-6,9323)	2,61 (1,7907-4,476)	2,03 (1,439-2,4877)			



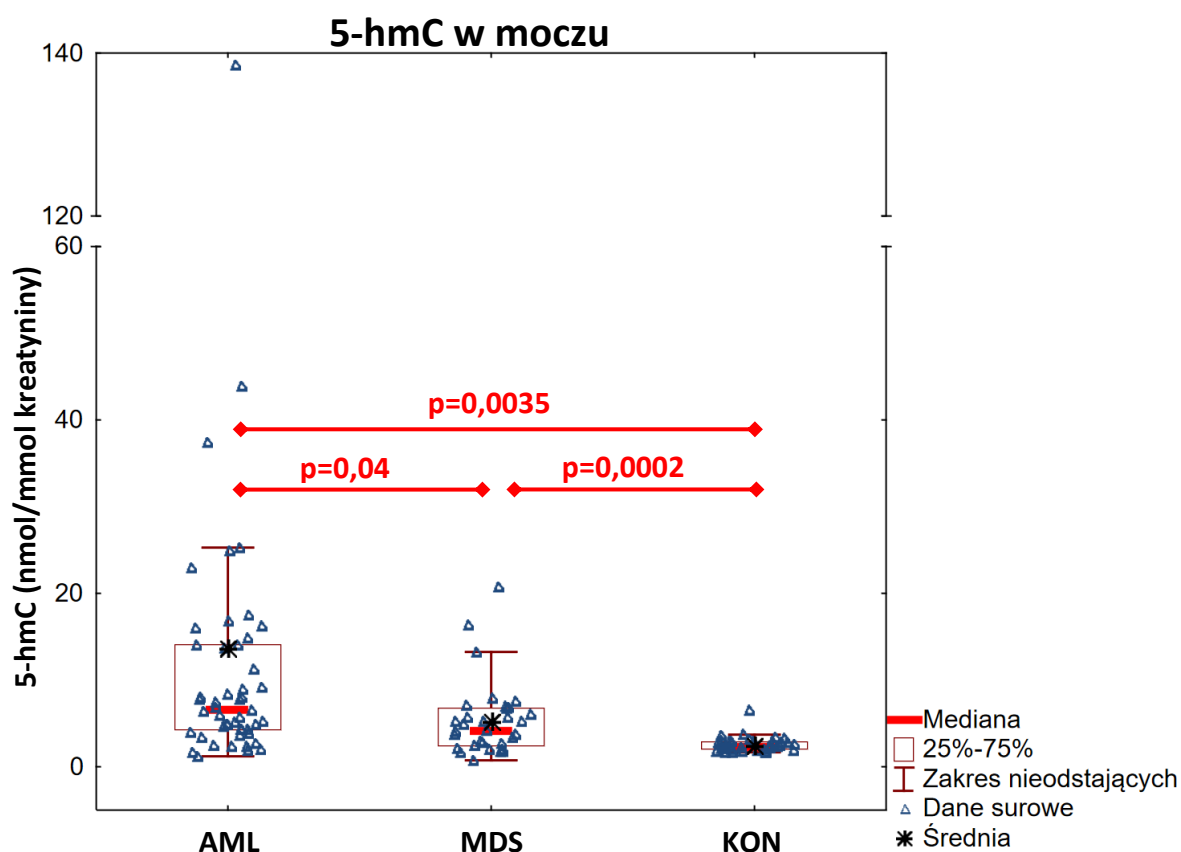
ryc. 8. Wykres ramka-wąsy wartości 5-hmdC w moczu pacjentów z AML, MDS oraz w grupie kontrolnej (wyrażone w nmol/mmol kreatyniny).

4.7 Wartość produktu aktywnej demetylacji - 5-hmC (5-hydroksymetylocytozyny) w moczu

Najniższą wartość 5-hmC w moczu wykazano w grupie kontrolnej, wyższą w grupie pacjentów z MDS i najwyższą w grupie pacjentów z AML. Wszystkie różnice były istotne statystycznie (tab. 16. i ryc. 9).

tab. 16 Wartości 5-hmC w moczu pacjentów z AML, MDS oraz w grupie kontrolnej (wyrażone w nmol/mmol kreatyniny)

			Znamiennność statystyczna (p)			
			AML v KON	MDS v KON	AML v MDS	
5-hmC	AML	MDS	0,0035	0,0002	0,04	
	Średnia + odch. standardowe					
	13,72±22,85	5,31±4,29				2,55±0,87
	Mediana + przedziały międzykwartylowe					
	6,71	4,15				
	(4,2604-14,0984)	(2,4019-6,8)			(2,0470-2,8655)	



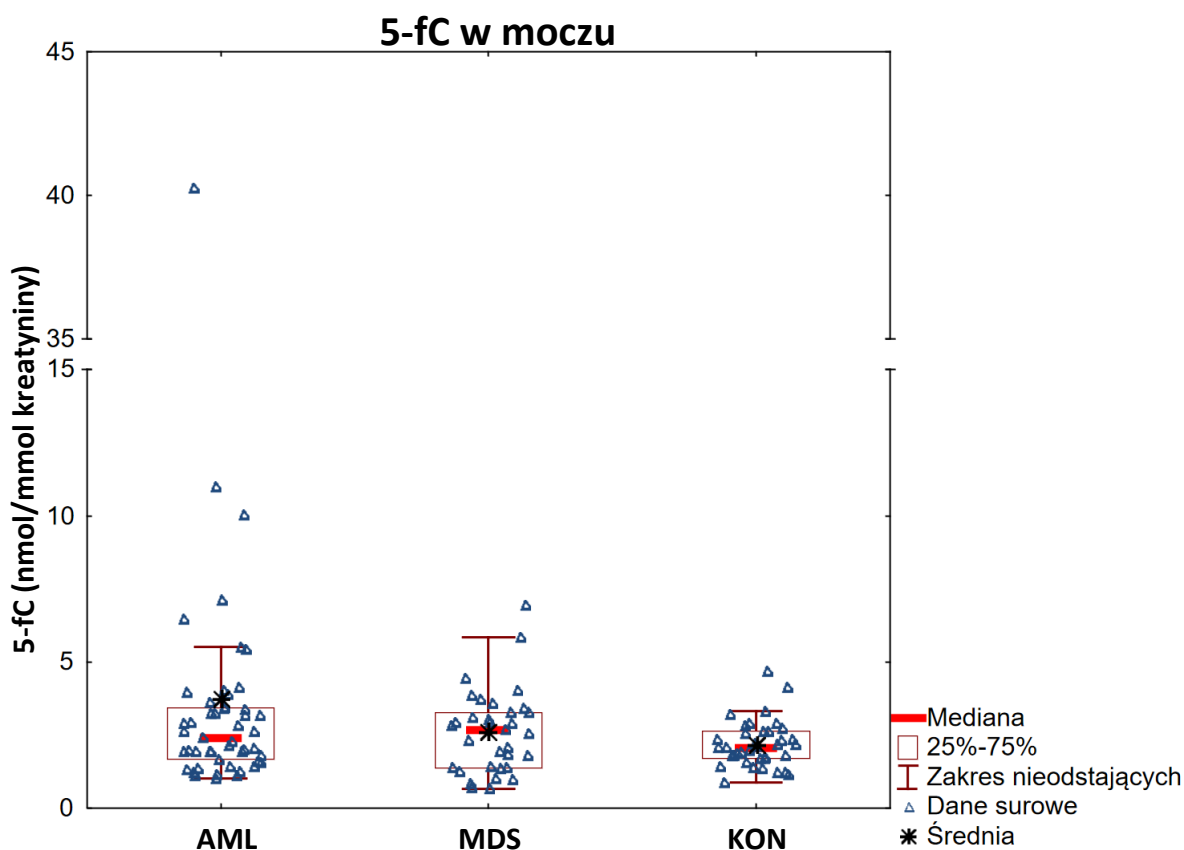
ryc. 9. Wykres ramka-wąsy wartości 5-hmC w moczu pacjentów z AML, MDS oraz w grupie kontrolnej (wyrażone w nmol/mmol kreatyniny).

4.8 Wartość produktu aktywnej demetylacji - 5-fC (5-formylocytozyny) w moczu

Podobnie jak w przypadku 5-hmdC oraz 5-hmC najniższą wartość 5-fC w moczu wykazano w grupie kontrolnej, wyższą w grupie pacjentów z MDS i najwyższą w grupie pacjentów z AML. Różnice nie były jednak istotne statystycznie (tab. 17. i ryc. 10).

tab. 17 Wartości 5-fC w moczu pacjentów z AML, MDS oraz w grupie kontrolnej (wyrażone w nmol/mmol kreatyniny)

				Znamienność statystyczna (p)		
				AML v KON	MDS v KON	AML v MDS
5-fC	AML	MDS	KON	0,095	0,1095	0,2663
	<i>Średnia + odch. standardowe</i>					
	3,75±5,71	2,61±1,44	2,17±0,79			
5-fC	<i>Mediana + przedziały międzykwartylowe</i>			0,095	0,1095	0,2663
	2,42 (1,6792-3,42)	2,7 (1,3828-3,26)	2,06 (1,7127-2,6264)			

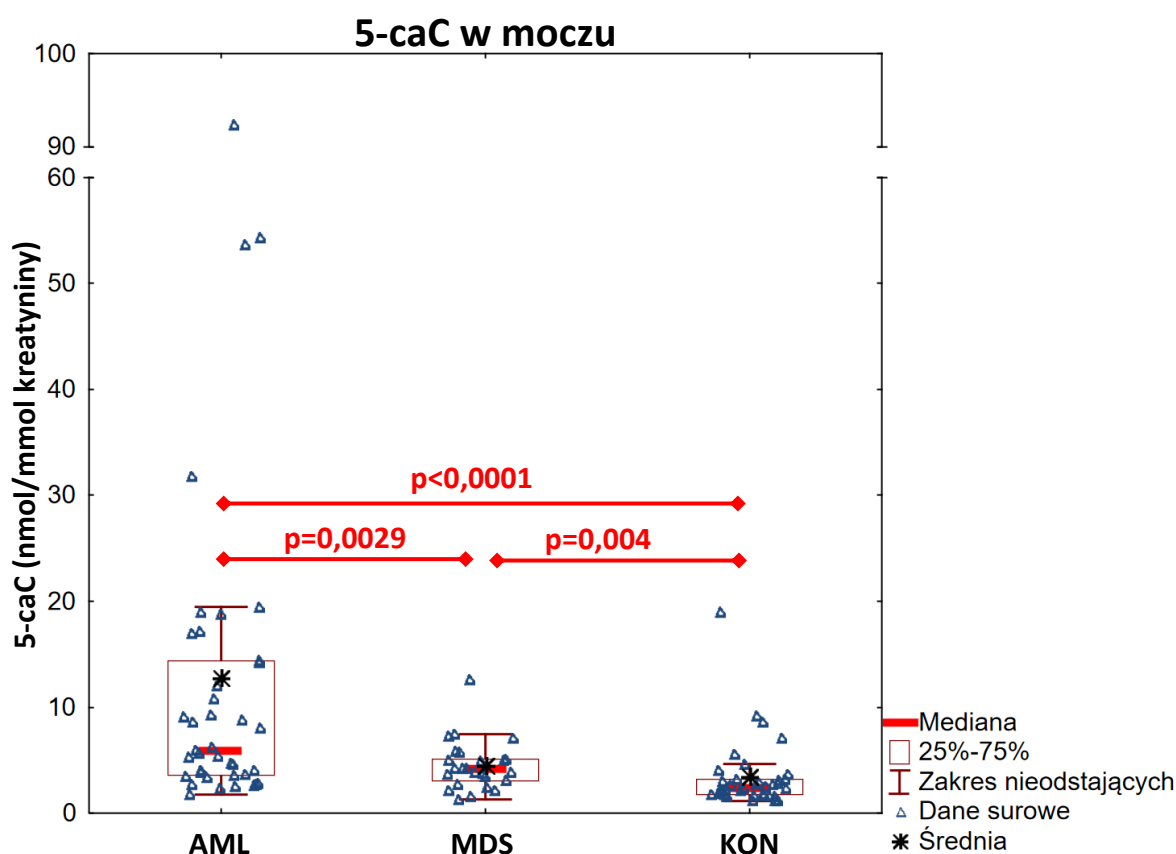


ryc. 10. Wykres ramka-wąsy wartości 5-fC w moczu pacjentów z AML, MDS oraz w grupie kontrolnej (wyrażone w nmol/mmol kreatyniny).

4.9 Wartość produktu aktywnej demetylacji - 5-caC (5-karboksycytozyny) w moczu
 Podobnie jak w przypadku 5-hmdC, 5-hmC oraz 5-fC najniższą wartość 5-caC w moczu wykazano w grupie kontrolnej, wyższą w grupie pacjentów z MDS i najwyższą w grupie pacjentów z AML. We wszystkich zestawieniach potwierdzono istotność statystyczną (**tab. 18.** i **ryc. 11.**).

tab. 18 Wartości 5-caC w moczu pacjentów z AML, MDS oraz w grupie kontrolnej
 (wyrażone w nmol/mmol kreatyniny)

	AML	MDS	KON	Znamiennosc statystyczna (p)		
				AML v KON	MDS v KON	AML v MDS
				<i>Średnia + odch. standardowe</i>	12,81±17,8	4,5±2,37
<i>Mediana + przedziały międzykwartylowe</i>	5,95 (3,5421-14,3562)	4,21 (3,0748-5,0941)	2,45 (1,7463-3,1954)			



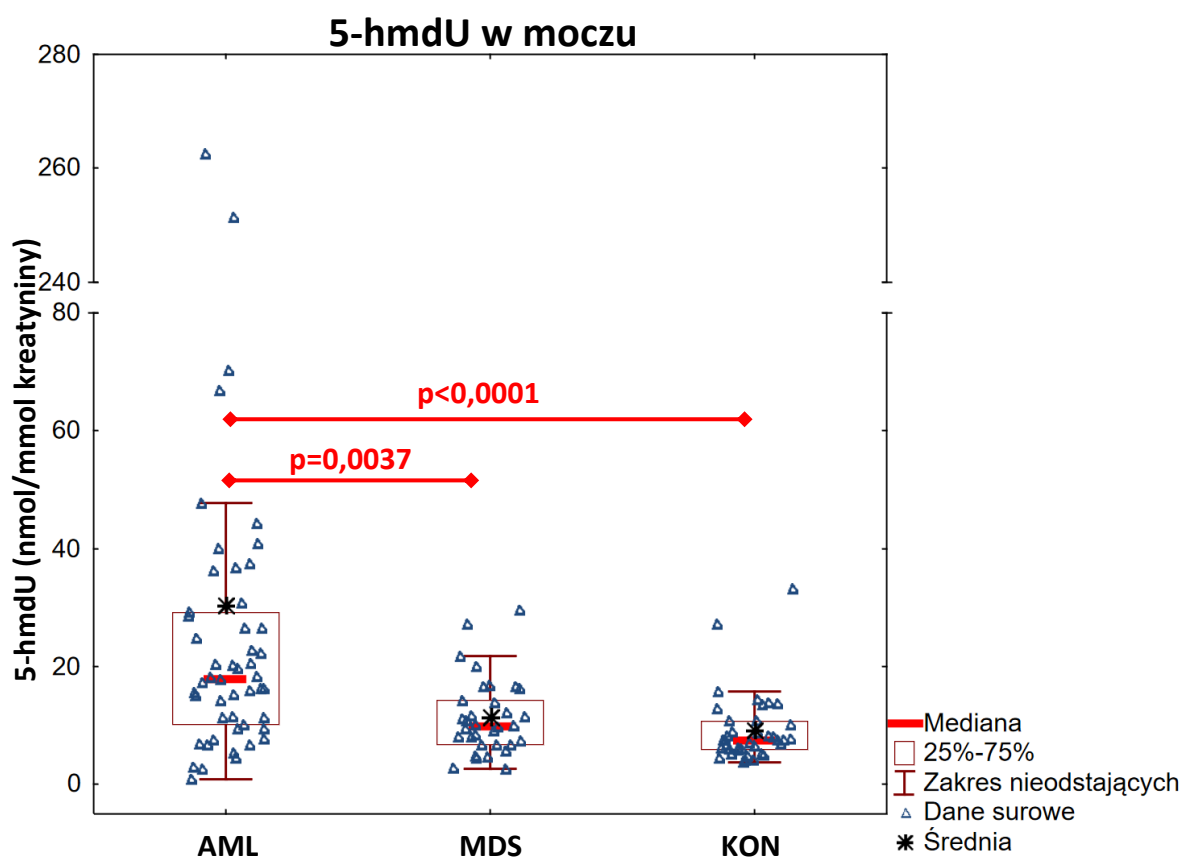
ryc. 11. Wykres ramka-wąsy wartości 5-caC w moczu pacjentów z AML, MDS oraz w grupie kontrolnej (wyrażone w nmol/mmol kreatyniny).

4.10 Wartość 5-hmdU (5-hydroksymetylodeoksyuracylu) w moczu

Podobnie jak w przypadku 5-hmdC, 5-hmC, 5-fC oraz 5-caC najniższą wartość 5-hmdU w moczu wykazano w grupie kontrolnej, wyższą w grupie pacjentów z MDS i najwyższą w grupie pacjentów z AML. Różnica pomiędzy grupą MDS i grupą kontrolną nie była istotna statystycznie (*tab. 19. i ryc. 12.*).

tab. 19 Wartości 5-hmdU w moczu pacjentów z AML, MDS oraz w grupie kontrolnej (wyrażone w nmol/mmol kreatyniny)

	AML	MDS	KON	Znamiennność statystyczna (p)		
				AML v KON	MDS v KON	AML v MDS
		Średnia + odch. standardowe				
5-hmdU	30,41±49,08	11,37±6,46	9,22±5,96	<0,0001	0,1679	0,0037
	Mediana + przedziały międzykwartyłowe					
	17,93 (10,1771-29,2193)	9,95 (6,7277-14,3312)	7,52 (5,9311-10,78)			



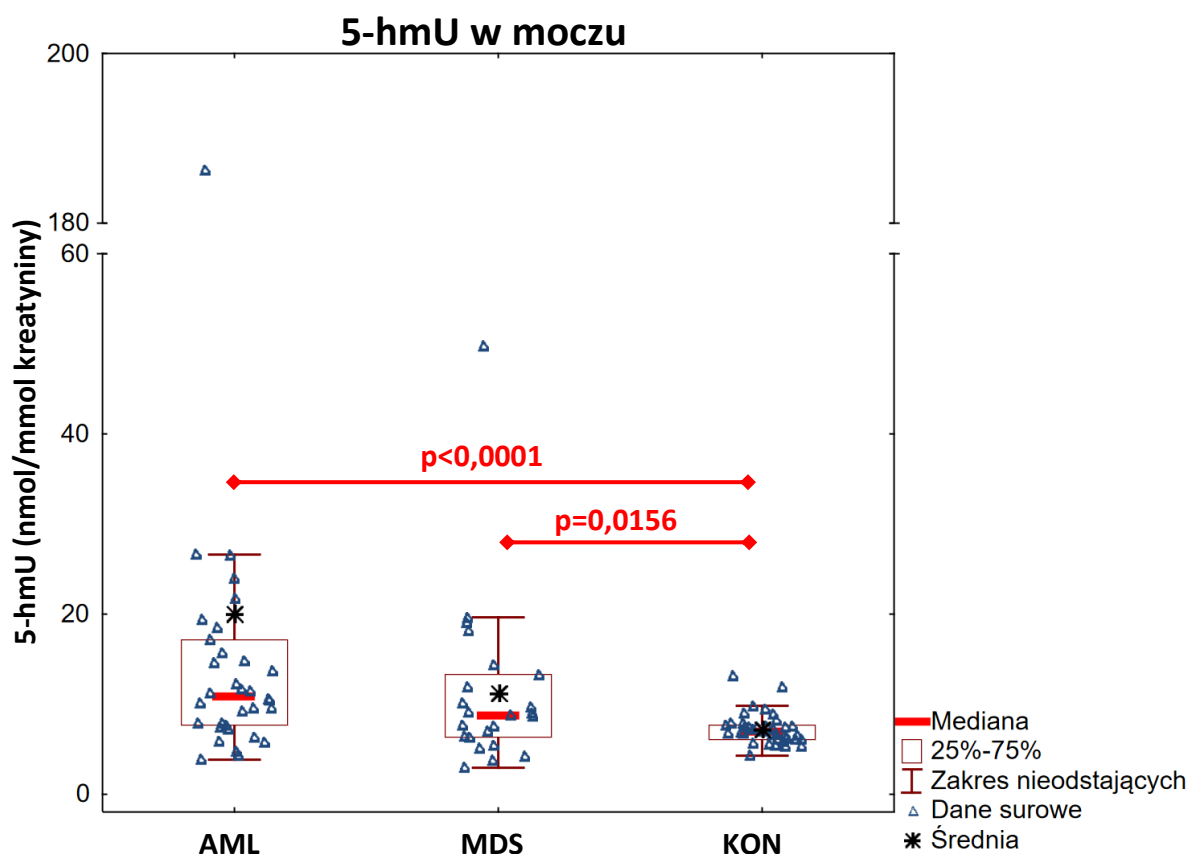
ryc. 12. Wykres ramka-wąsy wartości 5-hmdU w moczu pacjentów z AML, MDS oraz w grupie kontrolnej (wyrażone w nmol/mmol kreatyniny).

4.11 Wartość 5-hmU (5-hydroksymetylouracylu) w moczu

Podobnie jak w przypadku wszystkich analizowanych produktów aktywnej demetylacji, najniższą wartość 5-hmU w moczu wykazano w grupie kontrolnej, wyższą w grupie pacjentów z MDS i najwyższą w grupie pacjentów z AML. Różnica pomiędzy grupą pacjentów z AML i MDS była na granicy istotności statystycznej (**tab. 20. i ryc. 13**).

tab. 20 Wartości 5-hmU w moczu pacjentów z AML, MDS oraz w grupie kontrolnej (wyrażone w nmol/mmol kreatyniny)

	AML	MDS	KON	Znamiennność statystyczna (p)		
				AML v KON	MDS v KON	AML v MDS
5-hmU	Średnia + odch. standardowe			<0,0001	0,0156	0,1036
	20,08±34,31	11,2 ± 9,63	7,23 ± 1,75			
	Mediana + przedziały międzykwartyłowe					
	10,88 (7,6274-17,0947)	8,79 (6,2694-13,2694)	6,92 (6,0519-7,6577)			



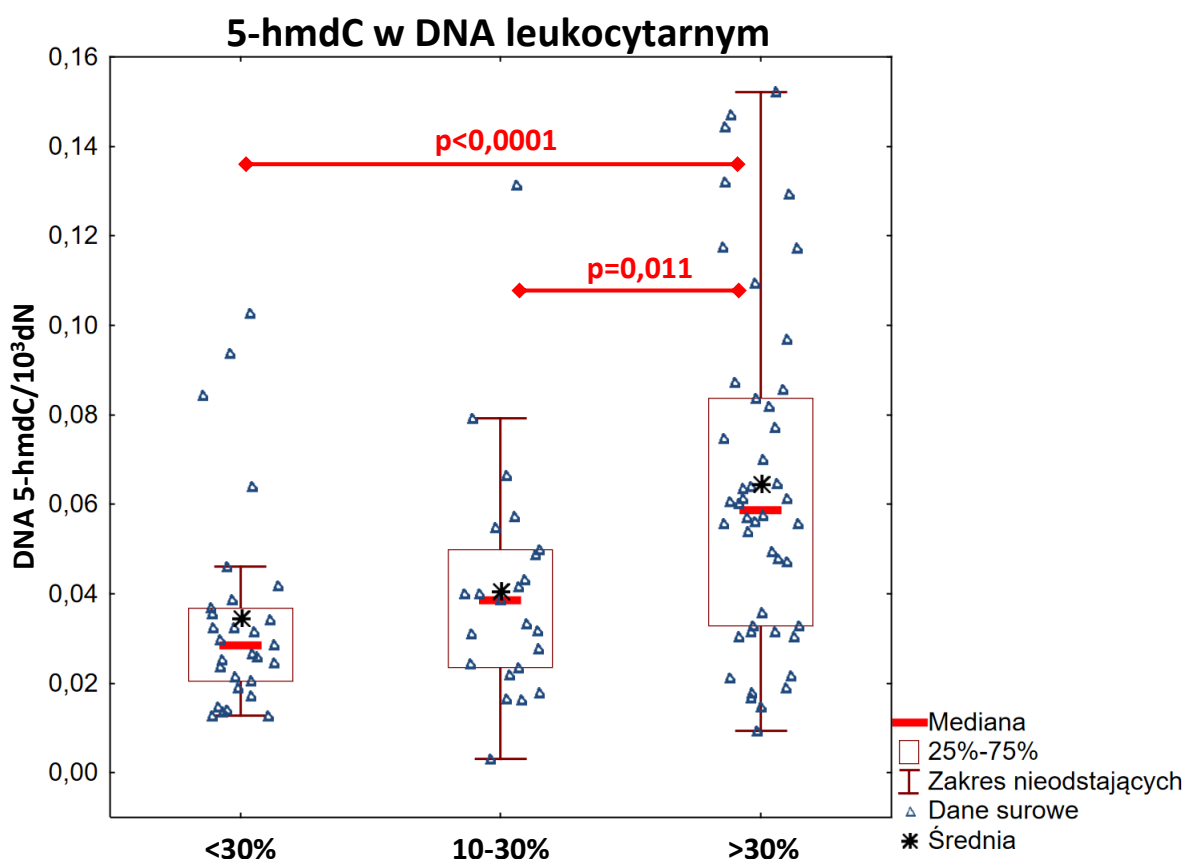
ryc. 13. Wykres ramka-wąsy wartości 5-hmU w moczu pacjentów z AML, MDS oraz w grupie kontrolnej (wyrażone w nmol/mmol kreatyniny).

4.12 Wartości 5-hmdC (5-hydroksymetylodeoksycytozyny) w DNA leukocytarnym w zależności od odsetka blastów w szpiku kostnym u pacjentów z AML i MDS

W grupie pacjentów z najwyższym odsetkiem blastów w szpiku kostnym (>30% blastów, n=46) wykazano wyższe wartości 5-hmdC w DNA leukocytarnym niż w grupie pacjentów z pośrednim odsetkiem blastów (10-30% blastów, n=23) i znacznie wyższe wartości niż w grupie pacjentów z najniższym odsetkiem blastów (<10% blastów, n=29). W obu przypadkach różnice były istotne statystycznie (*tab. 21. i ryc. 14.*).

tab. 21 Wartości 5-hmdC w DNA leukocytarnym pacjentów z AML i MDS w zależności od odsetka blastów w szpiku kostnym (wyrażone w jednostkach/ 10^3 dN)

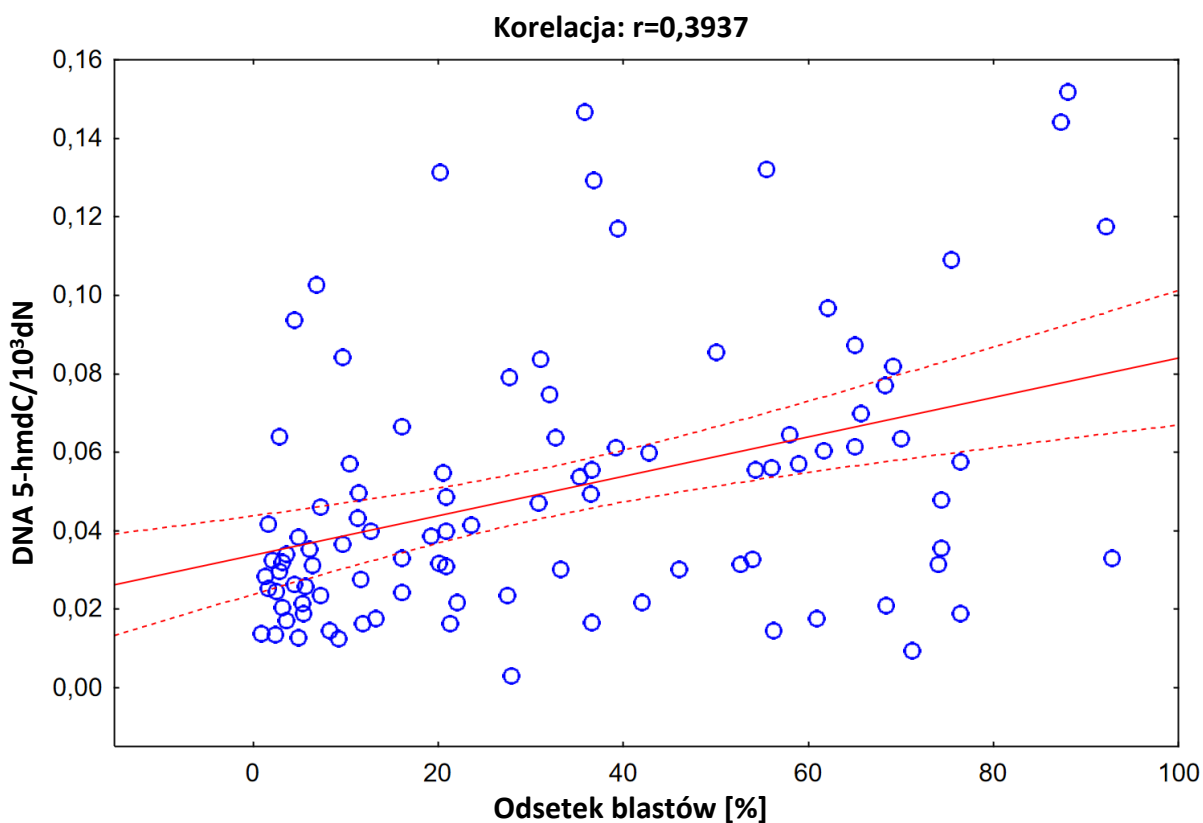
	<10%	10-30%	>30%
	Średnia + odch. standardowe		
	0,0346 ± 0,0234	0,0408 ± 0,0265	0,0645 ± 0,0379
	Mediana + przedziały międzykwartylowe		
5-hmdC	0,0285 (0,0205- 0,0367)	0,0388 (0,0236- 0,0498)	0,0588 (0,0328- 0,0837)



ryc. 14. Wykres ramka-wąsy wartości 5-hmdC w DNA leukocytarnym pacjentów z AML i MDS w zależności od odsetka blastów w szpiku kostnym (wyrażone w jednostkach/ 10^3 dN)

4.13 Korelacja pomiędzy odsetkiem blastów w szpiku kostnym, a wartością 5-hmdC w DNA leukocytarnym.

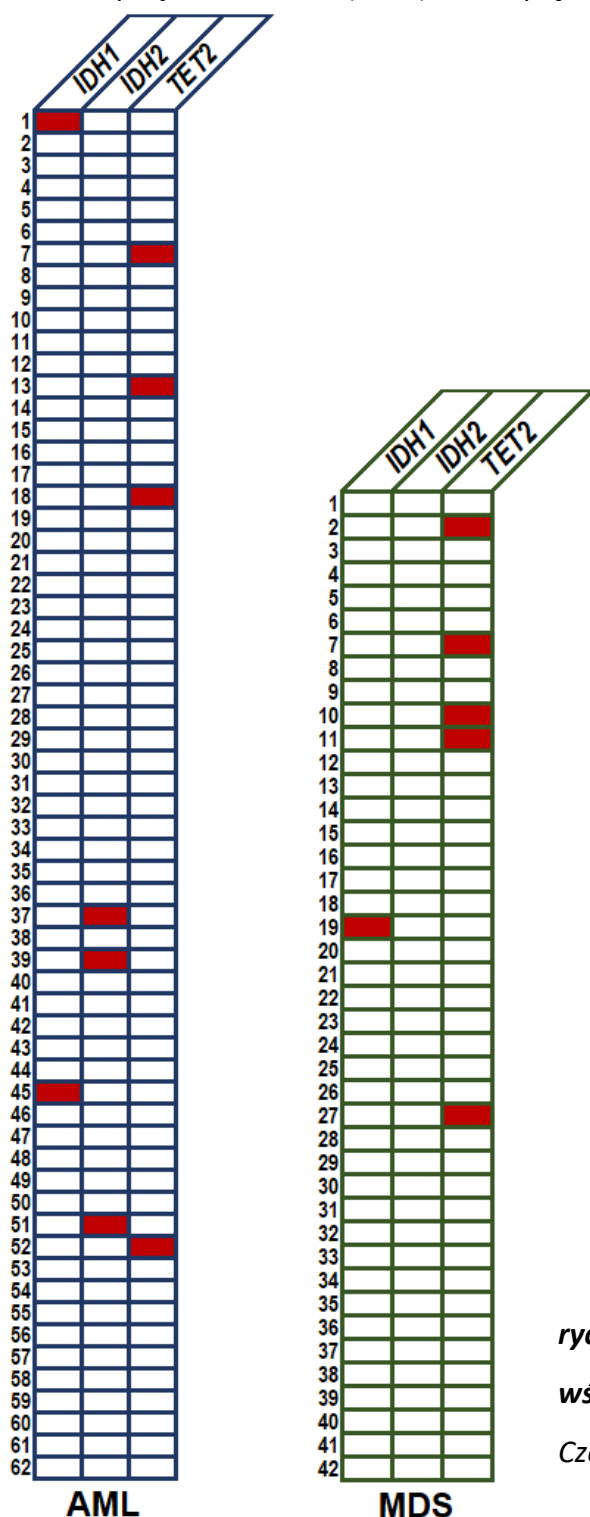
Zależność pomiędzy narastaniem odsetka blastów w szpiku kostnym, a wartością 5-hmdC w DNA leukocytarnym u pacjentów z AML i MDS potwierdzono również poprzez wykazanie korelacji przy $r=0,3937$ i $p<0,0001$.



ryc. 15. Wykres korelacji pomiędzy odsetkiem blastów w szpiku kostnym (wyrażone w procentach) a wartością 5-hmdC w DNA leukocytarnym (wyrażone w jednostkach/10³dN).

4.14 Mutacje genów zaangażowanych w procesy epigenetyczne

Zidentyfikowano mutację *IDH1* u dwóch (3,23%) pacjentów z AML oraz u jednego (2,4%) pacjenta z MDS. We wszystkich przypadkach była to mutacja R132. Wykryto mutację *IDH2* u trzech (4,8%) pacjentów z AML. W dwóch przypadkach była to mutacja R140, a w jednym – R172. Wśród pacjentów z MDS nie wykryto mutacji w obrębie *IDH2*. Mutacje *TET2* wykryto u czterech pacjentów z AML (6,5%) oraz u pięciu pacjentów z MDS (11,9%).



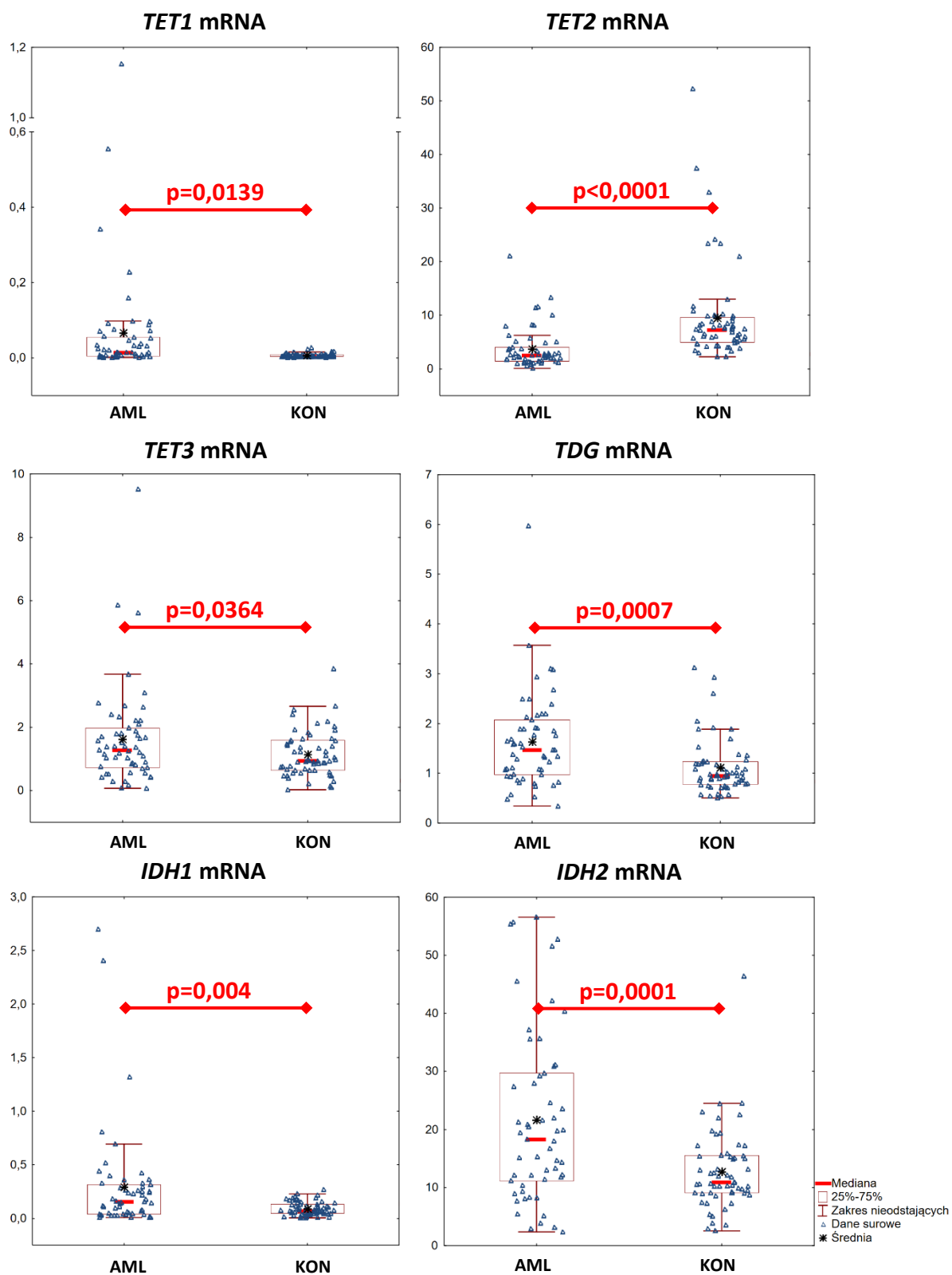
ryc. 16. Rozkład mutacji *IDH1*, *IDH2* oraz *TET2* wśród badanych pacjentów z AML i MDS. Czerwone pole oznacza obecność mutacji.

4.15 Ekspresja mRNA genów zaangażowanych w procesy epigenetyczne

Analizując wartości ekspresji mRNA genów zaangażowanych w procesy epigenetyczne zaobserwowano istotnie statystycznie niższą ekspresję *TET2* u pacjentów z AML w porównaniu z grupą kontrolną, podczas gdy wartości ekspresji mRNA *TET1* oraz *TET3* były wyższe w grupie pacjentów z AML (**tab. 22.**, **ryc. 17.**). Ekspresja mRNA genu *TDG* była znacznie wyższa w grupie AML w stosunku do grupy kontrolnej przy $p=0,0007$. Również wartości ekspresji mRNA genów *IDH1* oraz *IDH2* były wyższe u pacjentów z AML niż w grupie kontrolnej przy wysokiej znamienności statystycznej, odpowiednio $p=0,004$ oraz $p=0,0001$. Poziom ekspresji mRNA genu *IDH1* wyższy niż w grupie kontrolnej odnotowano również w przypadku grupy pacjentów z MDS ($p=0,0412$), a parametr ten był jedynym różnicującym grupę pacjentów z MDS z grupą kontrolną. W pozostałych przypadkach wartości ekspresji mRNA nie różniły się istotnie statystycznie od grupy kontrolnej.

tab. 22 Wartości ekspresji genów *TET1*, *TET2*, *TET3*, *TDG*, *IDH1* oraz *IDH2* u pacjentów z AML, MDS oraz w grupie kontrolnej.

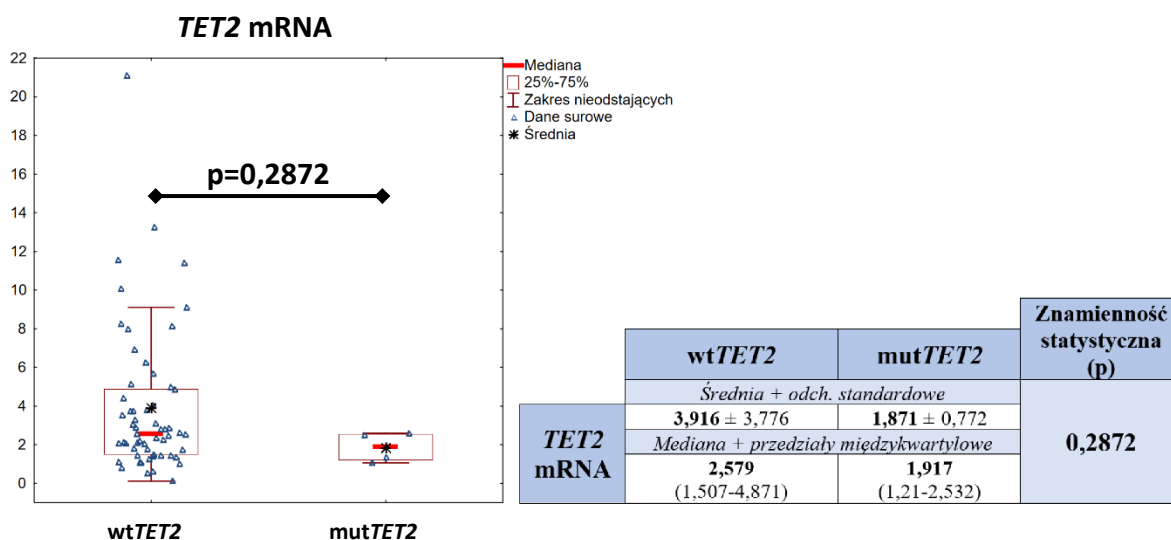
	AML	MDS	KON	Znamienność statystyczna (p)		
	Średnia + odchylenie standardowe			AML v KON	MDS v KON	AML v MDS
	Mediana + przedziały międzykwartylowe					
TET1	0,068 ± 0,177	0,0061 ± 0,0096	0,0069 ± 0,005	0,0139	0,6477	0,0129
	0,015 (0,0045- 0,0547)	0,00267 (0,00081-0,0052)	0,00537 (0,0039-0,0086)			
TET2	3,734 ± 3,788	9,656 ± 7,560	9,511 ± 8,887	<0,0001	0,9341	<0,0001
	2,487 (1,437- 4,05)	7,4805 (3,485- 14,15)	7,2975 (4,917-9,602)			
TET3	1,641 ± 1,582	1,123 ± 1,3	1,148 ± 0,722	0,0364	0,9183	0,1059
	1,291 (0,7303- 1,9746)	0,63445 (0,22505- 1,853)	0,9441 (0,6428 - 1,585)			
TDG	1,631 ± 0,938	1,427 ± 1,495	1,124 ± 0,547	0,0007	0,2471	0,4255
	1,474 (0,9715- 2,073)	0,98565 (0,71375 - 1,616)	0,9534 (0,7827 - 1,232)			
IDH1	0,295 ± 0,499	0,179 ± 0,225	0,091 ± 0,063	0,004	0,0412	0,2257
	0,1558 (0,0386- 0,3141)	0,0935 (0,0344 - 0,205)	0,07205 (0,0449 - 0,1331)			
IDH2	21,66 ± 14,79	10,93 ± 10,65	12,78 ± 6,8	0,0001	0,3571	0,0001
	18,3 (11,11- 29,742)	6,251 (4,799 - 13,79)	10,92 (9,096 - 15,54)			



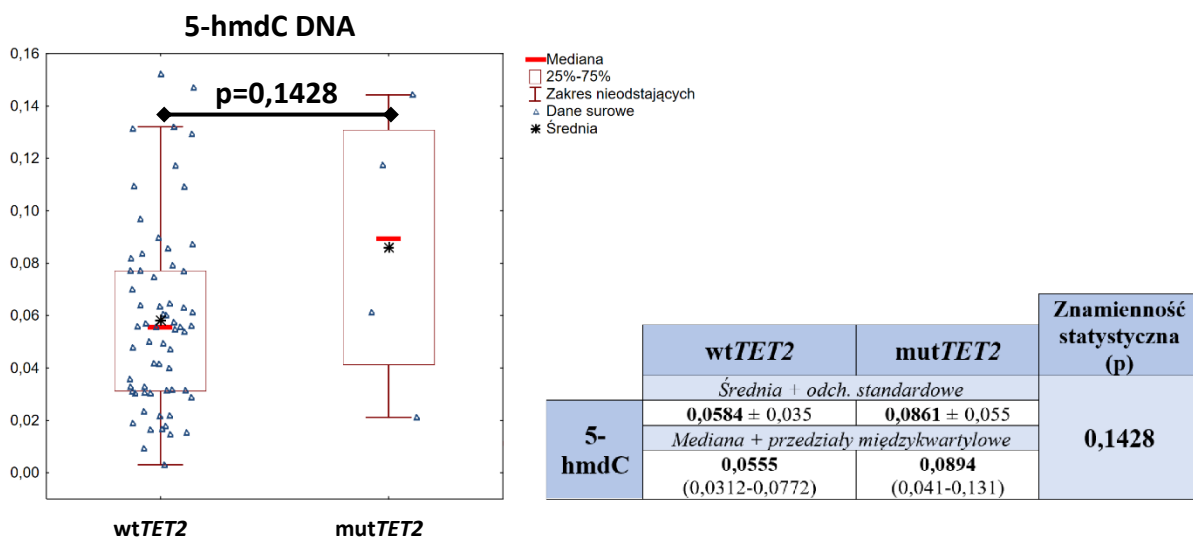
ryc. 17. Wykresy ramka-wąsy poziomów ekspresji genów *TET1*, *TET2*, *TET3*, *TDG*, *IDH1* oraz *IDH2* u pacjentów z AML oraz w grupie kontrolnej.

4.16 Ekspresja mRNA *TET2* oraz poziom 5-hmdC w DNA leukocytarnym w zależności od statusu mutacji genu *TET2* w grupie pacjentów z AML

Pacjenci z AML obarczeni mutacją w genie *TET2* (*mutTET2*) nie wykazali niższych wartości ekspresji *TET2* ani niższego poziomu 5-hmdC w leukocytarnym DNA niż pacjenci pozbawieni mutacji w tym genie (*wtTET2*).



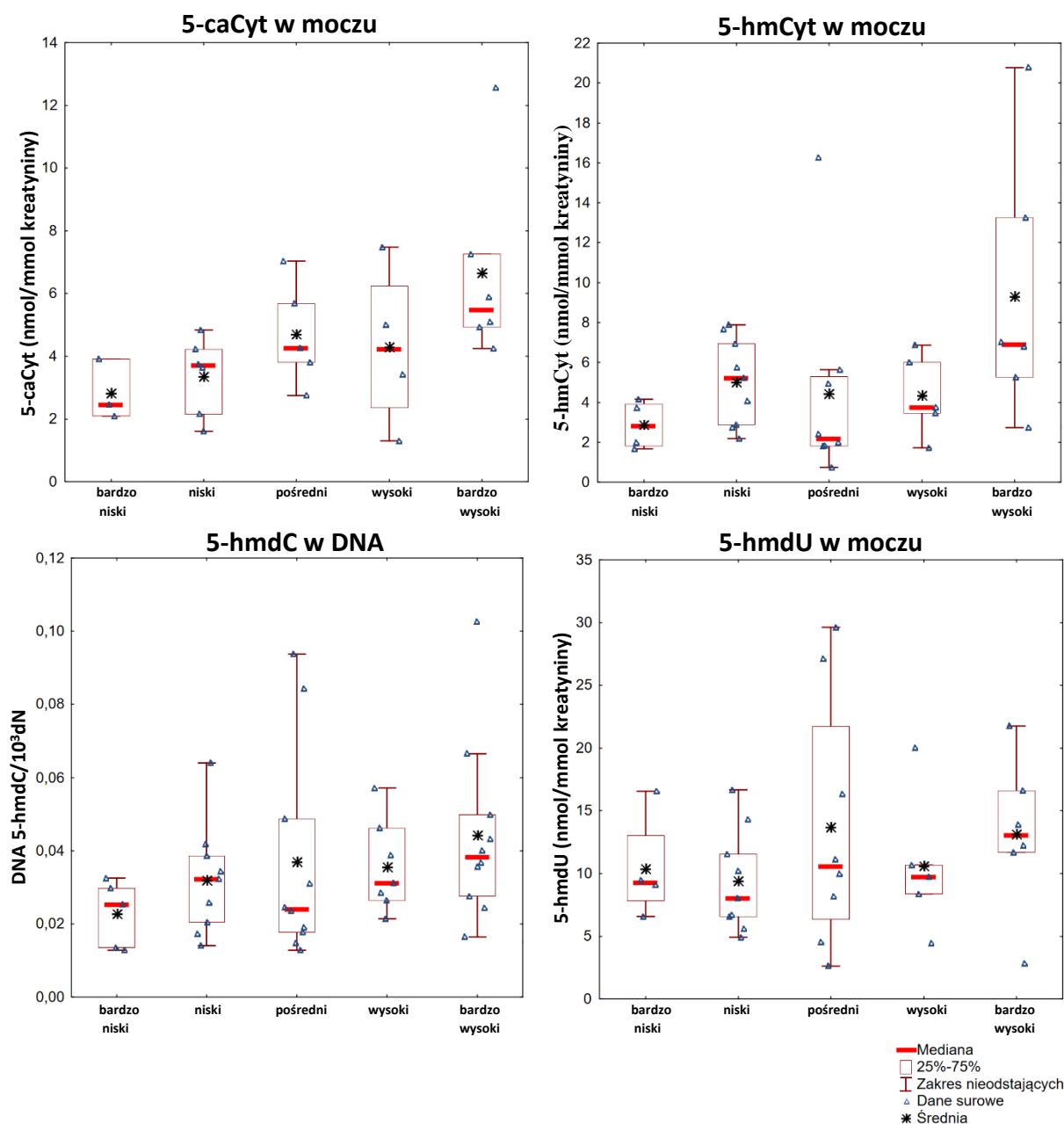
ryc. 18. Poziom ekspresji mRNA *TET2* pacjentów z AML w zależności od obecności mutacji w genie *TET2*.



ryc. 19. Wartości 5-hmdC w DNA leukocytarnym pacjentów z AML w zależności od obecności mutacji w genie *TET2* (wyrażone w jednostkach/ 10^3 dN).

4.17 Wartości produktów aktywnej demetylacji u pacjentów z zespołami mielodysplastycznymi w zależności od ryzyka R-IPSS

W przypadku wartości 5-caCyt w moczu, 5-hmCyt w moczu, 5-hmdC w DNA leukocytarnym oraz 5-hmdU w moczu zaobserwowano wizualną zależność pomiędzy badanymi parametrami, a kategorią ryzyka w skali R-IPSS (*ryc. 20*). W związku z niską liczebnością badanych kohort nie uzyskano różnic istotnych statystycznie.



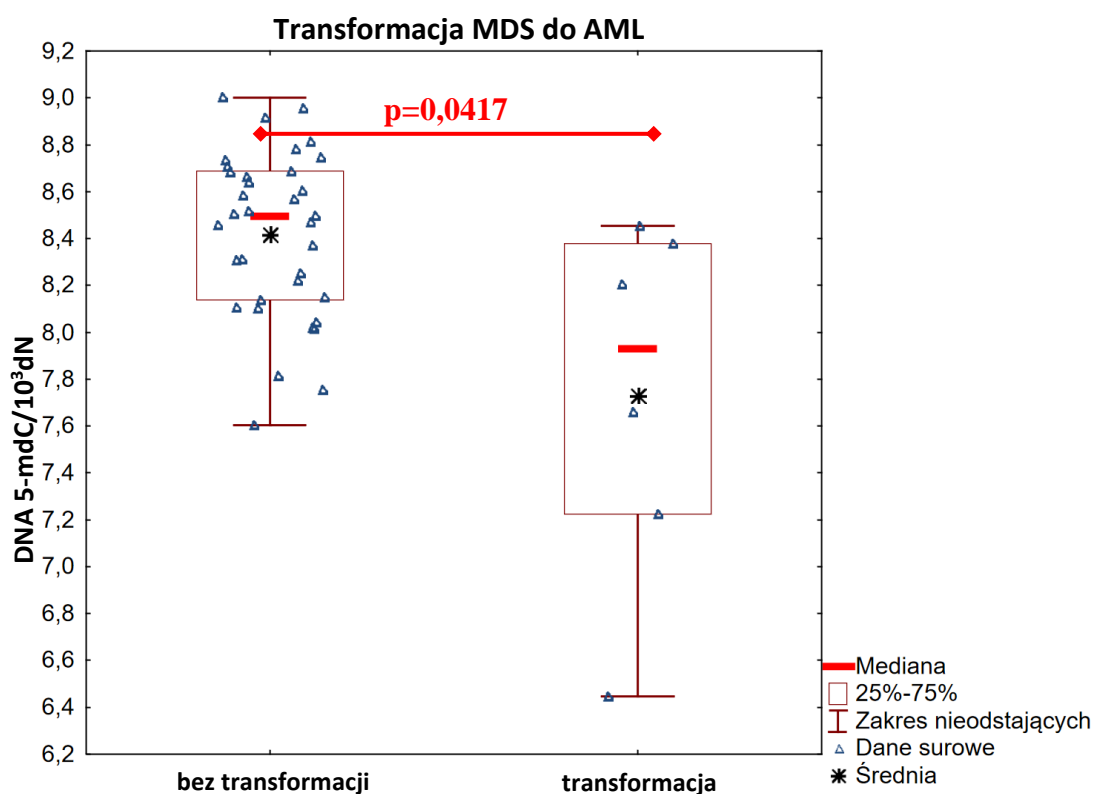
ryc. 20. Wykresy ramka-wąsy wartości wybranych produktów demetylacji u pacjentów z zespołami mielodysplastycznymi w zależności od ryzyka R-IPSS.

4.18 Wyjściowy poziom 5-mdC w DNA leukocytarnym u pacjentów z MDS w zależności od wystąpienia transformacji do AML

Spośród 42 pacjentów z MDS włączonych do analizy u siedmiu z nich (16,67%) doszło do transformacji w AML. Pacjenci, u których doszło do transformacji mieli niższy wyjściowy poziom 5-mdC w DNA leukocytarnym niż pacjenci, u których nie doszło do transformacji, przy znamienności statystycznej $p=0,0417$ (ryc. 21). Dla wszystkich pozostałych produktów demetylacji nie znaleziono różnic istotnych statystycznie pomiędzy badanymi grupami.

tab. 23 Wartości 5-mdC w DNA leukocytarnym pacjentów z MDS w zależności od transformacji do AML (wyrażone w jednostkach/ 10^3 dN).

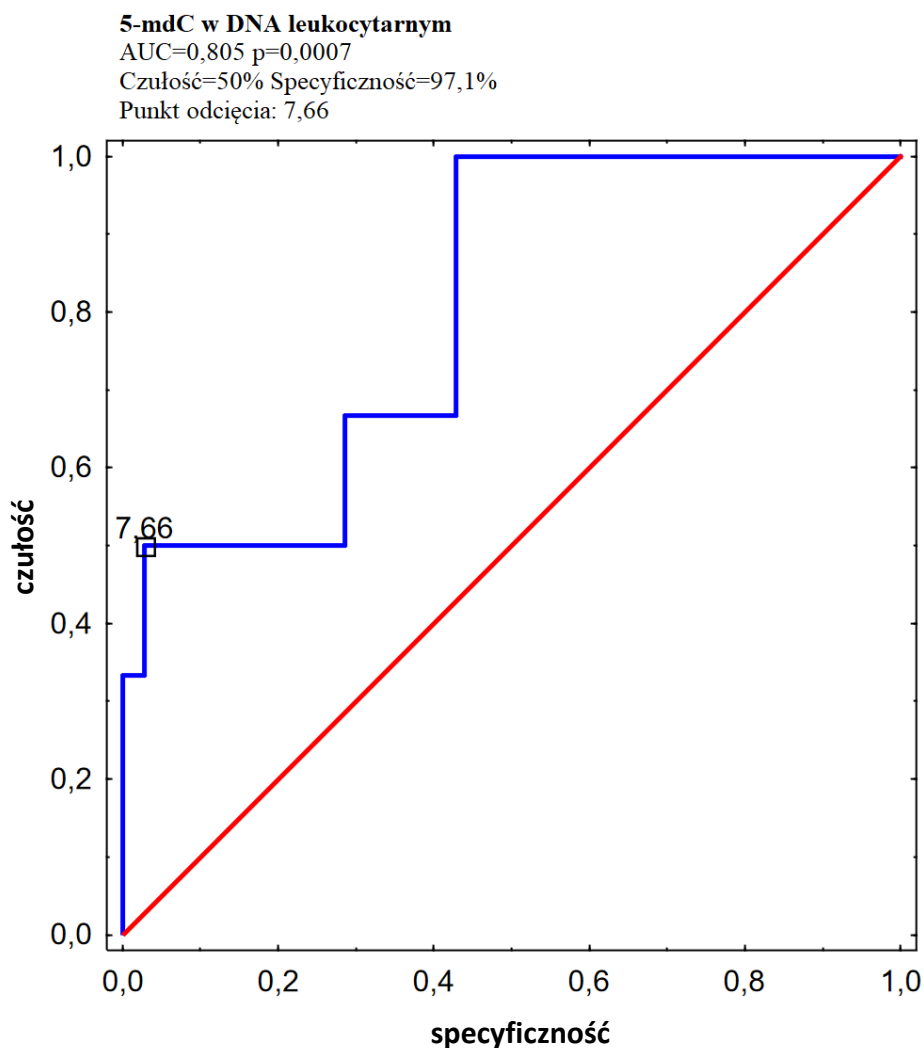
		Znamienność statystyczna (p)	
5-mdC	MDS bez transformacji	MDS z transformacją do AML	0,0417
	Średnia + odch. standardowe		
	8,4 ± 0,35	7,73 ± 0,78	
	Mediana + przedziały międzykwartylowe		
8,5 (8,1371- 8,6874)	7,93 (7,2246- 8,379)		



ryc. 21. Wykres ramka-wąsy poziomy 5-mdC w DNA leukocytarnym u pacjentów z MDS w zależności od transformacji do AML.

4.19 Krzywa ROC transformacji MDS do AML w zależności od poziomu 5-mdC w DNA u pacjentów z MDS

Celem oceny poprawności wartości 5-mdC w DNA jako klasyfikatora różnicującego grupę pacjentów z MDS o wyższym i niższym ryzyku transformacji MDS do AML wykonano krzywą ROC i uzyskano $AUC=0,805$ przy wysokiej istotności statystycznej ($p=0,0007$), **ryc. 22**. Czułość testu przy punkcie odcięcia 7,66 wyniosła 50%, a specyficzność 97,1%.



ryc. 22. Krzywa ROC transformacji MDS do AML w zależności od poziomu 5-mdC w DNA u pacjentów z MDS.

4.20 Wyjściowy poziom 5-mdC oraz pochodnych procesu aktywnej demetylacji w DNA leukocytarnym oraz w moczu u pacjentów z AML leczonych chemioterapią intensywną w zależności od osiągnięcia remisji całkowitej po leczeniu

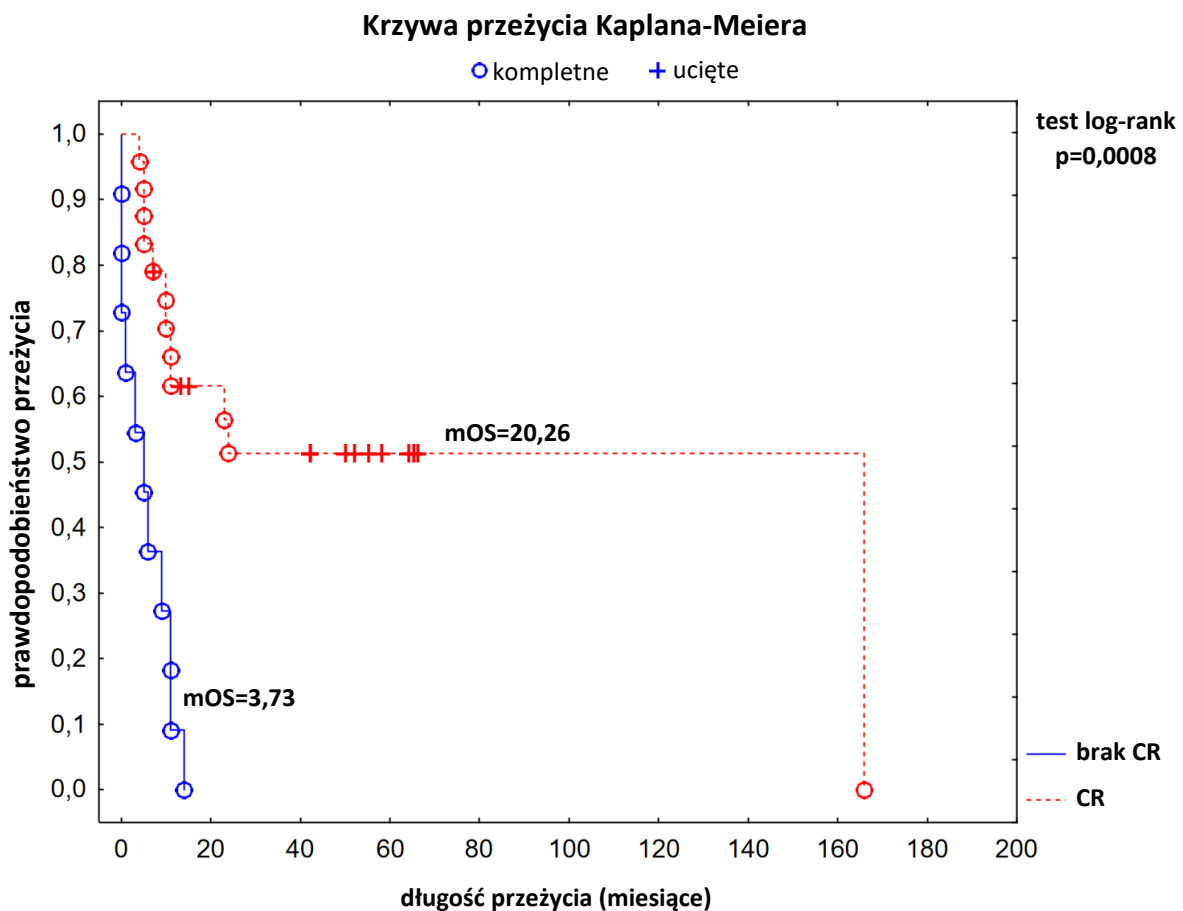
Spośród sześćdziesięciu dwóch (n=62) pacjentów z AML włączonych do badania, trzydziestu sześciu (n=36) było leczonych intensywną chemioterapią według schematu „3+7” (por. roz. „Wstęp”). W tej grupie dwudziestu pięciu (n=25) pacjentów uzyskało remisję całkowitą po leczeniu, zaś jedenastu (n=11) nie uzyskało remisji całkowitej. Wyjściowy poziom 5-mdC oraz żadna z pochodnych procesu aktywnej demetylacji mierzona w DNA leukocytarnym oraz w moczu nie miały wpływu na uzyskaną przez pacjentów odpowiedź na leczenie (**tab. 24**).

tab. 24. Wartości 5-mdC oraz pochodnych procesu aktywnej demetylacji w DNA leukocytarnym oraz w moczu pacjentów z AML leczonych chemioterapią intensywną w zależności od odpowiedzi na leczenie (wartości 5-mdC oraz 5-hmdC w DNA wyrażone w jednostkach/10³dN, wartości 5-fdC w DNA wyrażone w jednostkach/10⁶dN, wartości 5-cadC w DNA wyrażone w jednostkach/10⁹dN, wartości wszystkich produktów demetylacji w moczu wyrażone w nmol/mmol kreatyniny).

		Remisja całkowita (CR)	Brak remisji całkowitej	Znamienność statystyczna (p)
		Średnia + odchylenie standardowe		
		Mediana + przedziały międzykwartylowe		
DNA	5-mdC	8,386 ± 0,557	8,532 ± 0,345	0,431
		8,385 (8,132 - 8,71)	8,612 (8,246 - 8,802)	
	5-hmdC	0,069 ± 0,037	0,054 ± 0,04	0,3042
		0,061 (0,036 - 0,09)	0,056 (0,018 - 0,075)	
5-fdC	0,318 ± 0,234	0,317 ± 0,287	0,9947	
	0,263 (0,154 - 0,426)	0,219 (0,072 - 0,542)		
5-cadC	22,21 ± 14,17	26,55 ± 28,96	0,6083	
	18,68 (13,65 - 26,75)	14,34 (4,479 - 48,66)		
MOCZ	5-mdC	1,172 ± 2,27	1,548 ± 1,764	0,6601
		0,565 (0,382 - 0,808)	0,816 (0,418 - 2,475)	
	5-hmdC	9,694 ± 20,09	5,146 ± 4,594	0,489
		2,969 (1,612 - 6,6)	3,898 (1,902 - 7,166)	
	5-hmC	18,02 ± 34	12,45 ± 12,23	0,622
		6,427 (3,011 - 12,7)	10,07 (4,671 - 14,87)	
	5-fC	4,634 ± 8,694	2,822 ± 0,74	0,5416
		1,976 (1,421 - 3,384)	2,824 (2,283 - 3,159)	
	5-caC	15,21 ± 24,81	8,113 ± 5,576	0,4682
		5,624 (3,854 - 12,03)	5,954 (4,055 - 10,76)	
5-hmdU	41,86 ± 74,37	20,55 ± 12,92	0,3801	
	15,68 (11,25 - 30,05)	19,16 (9,366 - 22,24)		
5-hmU	32,49 ± 53,88	14,61 ± 6,983	0,3666	
	10,51 (7,627 - 19,35)	12,47 (9,801 - 19,33)		

4.21 Krzywa przeżycia pacjentów z AML leczonych chemioterapią intensywną w zależności od osiągnięcia remisji całkowitej po leczeniu

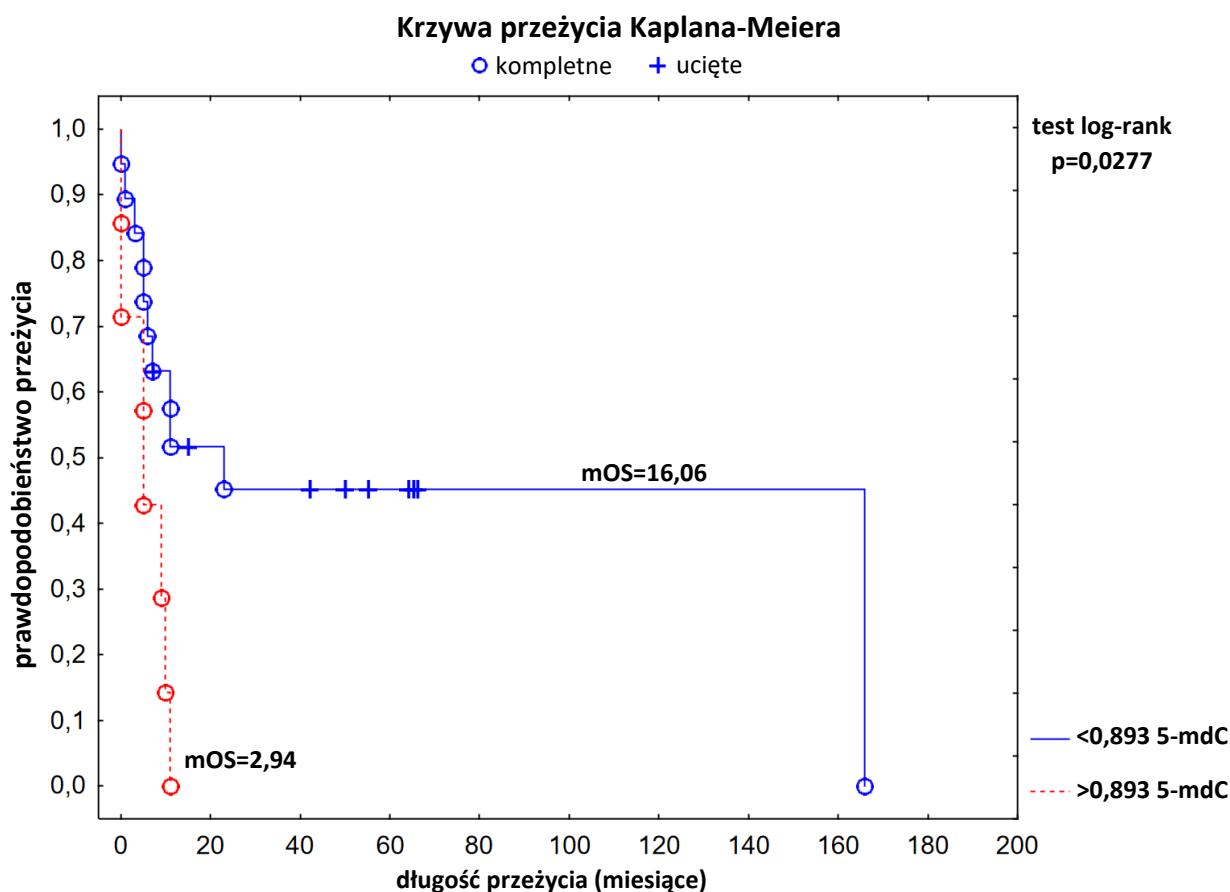
Pacjenci z AML, którzy po chemioterapii indukującej „3+7” uzyskali remisję całkowitą (CR, n=25, krzywa oznaczona kolorem czerwonym) mieli dłuższą medianę przeżycia całkowitego (mOS=20,26 miesiąca) od pacjentów z AML, którzy po chemioterapii intensywnej „3+7” nie uzyskali remisji całkowitej (n=11, krzywa oznaczona kolorem niebieskim, mOS=3,73), przy wysokiej istotności statystycznej, wartość p testu log-rank=0,0008.



ryc. 23. Krzywa przeżycia Kaplana-Meiera pacjentów z AML leczonych chemioterapią intensywną w zależności od odpowiedzi na leczenie.

4.22 Krzywa przeżycia pacjentów z AML leczonych chemioterapią intensywną w zależności od stężenia 5-mdC w moczu w momencie diagnozy

Za pomocą krzywej ROC wyznaczono punkt odcięcia o wartości 0,893 nmol/mmol kreatyniny 5-mdC w moczu jako potencjalnie różnicującej ≥ 12 -miesięczny i < 12 -miesięczny OS w grupie pacjentów z AML leczonych intensywną chemioterapią „3+7” i wykonano analizę przeżycia Kaplana-Meiera. Wśród pacjentów z AML leczonych intensywną chemioterapią „3+7” pomiary 5-mdC w moczu były dostępne dla dwudziestu sześciu pacjentów. Pacjenci z wyjściowym stężeniem 5-mdC w moczu niższym niż 0,893 nmol/mmol kreatyniny (n=19) mieli dłuższe przeżycie całkowite (mOS=16,06 miesięcy), niż pacjenci z poziomem 5-mdC wyższym niż 0,893 nmol/mmol kreatyniny (n=7, mOS=2,94 miesięcy), co potwierdzono testem log-rank przy istotności statystycznej $p=0,0277$ i przedstawiono na wykresie Kaplana-Meiera (**ryc. 24.**).



ryc. 24. Krzywa przeżycia Kaplana-Meiera pacjentów z AML leczonych chemioterapią intensywną w zależności od wyjściowego stężenia 5-mdC w moczu (krzywa niebieska dotyczy pacjentów ze stężeniem 5-mdC poniżej 0,893 nmol/mmol kreatyniny, zaś krzywa czerwona dotyczy pacjentów ze stężeniem 5-mdC powyżej 0,893 nmol/mmol kreatyniny).

Analiza wieloczynnikowa wpływu stężenia 5-mdC w moczu na długość przeżycia (OS) z uwzględnieniem wyjściowego ryzyka cytogenetyczno-molekularnego oraz statusu transplantacji komórek macierzystych nie była możliwa z powodu zbyt małej liczności badanych kohort. Sprawdzone jednak, czy w badanej grupie (pacjentów z dostępnym pomiarem 5-mdC w moczu) czynniki te mają wpływ na długość przeżycia osobno, **tab. 26**.

tab. 25 Charakterystyka próby pacjentów z AML kwalifikujących się do chemioterapii intensywnej z dostępnym pomiarem 5-mdC w moczu w podziale na czynnik całkowitej remisji

Charakterystyka	N	Kohorta ogółem ^a	Całkowita remisja		p ^c
			nie, n ₁ = 10 ^a	tak, n ₂ = 16 ^a	
Wiek, lat	26	58,50 (49,50, 64,00)	60,50 (55,25, 64,00)	57,50 (48,00, 63,50)	0,527
Płeć:	26				0,428 ^d
kobieta		11 (42,31%) ^b	3 (30,00%) ^b	8 (50,00%) ^b	
mężczyzna		15 (57,69%) ^b	7 (70,00%) ^b	8 (50,00%) ^b	
Kariotyp:	25				1,000 ^d
korzystny		8 (32,00%) ^b	3 (33,33%) ^b	5 (31,25%) ^b	
pośredni lub niekorzystny		17 (68,00%) ^b	6 (66,67%) ^b	11 (68,75%) ^b	

^a Mdn (Q1, Q3), ^b n (%), ^c Dokładny test Fishera, ^d Test sumy rang Wilcoxona

Jak wykazano, status cytogenetyczno-molekularny nie różnił się istotnie między grupami ($p=1,000$), **tab. 25**.

Sprawdzono efekt allogenicznej transplantacji komórek macierzystych oraz osobno wyjściowego statusu cytogenetyczno-molekularnego na co najmniej roczne przeżycie pacjentów z AML z korektą na płeć pacjenta.

tab. 26 Oszacowane efekty allogenicznej transplantacji komórek macierzystych oraz wyjściowego statusu cytogenetyczno-molekularnego na roczne przeżycie po leczeniu z korektą na płeć pacjenta

Zmienna objaśniająca	Przeżycie co najmniej 12 miesięcy po leczeniu			
	RR	CI 95%	p	N _{obs}
Przeszczep szpiku kostnego [tak]	7,52	1,93 – 41,99	0,007	26
Kariotyp [pośredni lub niekorzystny]	1,63	0,54 – 5,21	0,401	25

W grupie pacjentów z AML, którzy otrzymali chemioterapię indukującą i dla których dostępny był pomiar 5-mdC w moczu wykazano, że pacjenci którzy odbyli allogeniczną transplantację komórek macierzystych mieli znacznie wyższe prawdopodobieństwo przeżycia co najmniej 12 miesięcy po leczeniu chemioterapią intensywną (przy współczynniku ryzyka wynoszącym 7,52 z istotnością statystyczną $p=0,007$). Nie wykazano, by w tej grupie pacjentów wyjściowy status cytogenetyczno-molekularny miał wpływ na przeżycie przynajmniej 12-miesięczne (współczynnik ryzyka 1,63 nie był statystycznie istotny przy $p = 0,401$).

5. Dyskusja

Odkrycie w 2009 roku roli białek z rodziny TET w zakresie oksydacji 5-metylocytozyny do 5-hydroksymetylocytozyny i dalszej demetylacji 5-hmCyt do pochodnych (5-formylocytozyny i 5-karboksycytozyny) pozwoliło zrozumieć szlak aktywnej demetylacji w genomie ssaków [63, 65]. W kolejnych latach, po opracowaniu metod pomiaru ilościowego produktów epigenetycznych wykazano, że 5-hmCyt występuje w DNA komórek wszystkich ssaków, a jej globalne stężenia wahają się pomiędzy 0,005%, a 0,7% wszystkich par zasad, w których skład wchodzi cytozyna [109, 110]. Udowodniono także, że aktywność szlaku demetylacji może być różna w poszczególnych tkankach, a najwyższy globalny poziom 5-hmCyt wykazano w tkance mózgu i wątroby, zaś najniższy w tkankach serca [111, 112]. Najwięcej uwagi poświęcono jednak badaniu aktywności i zaburzeń szlaku demetylacji w tkankach nowotworowych. Liczne prace publikowane w latach dziesiątych obecnego stulecia udowodniły, że cechą charakterystyczną tkanek nowotworowych jest globalna hipermetylacja (zwiększenie poziomu 5-mCyt i jednocześnie obniżenie poziomu 5-hmCyt) [113]. Wykazano to w przypadku nowotworów m.in. skóry, nerek, prostaty, wątroby, żołądka, piersi, płuc, jelita grubego i mózgu [114-117]. Dodatkowo znaleziono korelację pomiędzy wzrostem guzów nowotworowych, a spadkiem poziomu 5-hmCyt w DNA komórkowym (a zatem nasileniem procesu metylacji) [118, 119]. Co więcej, wykazano, że zmniejszony globalny poziom 5-hmCyt pogarsza prognozę i skraca długość życia pacjentów z nowotworami: wątrobowokomórkowym, żołądka, przełyku, nerek, piersi, mózgu oraz krtani [120-126]. Niedawno pomiarów ilościowych produktów aktywnej demetylacji dokonano na grupie pięćdziesięciu pięciu pacjentów pediatrycznych z ostrą białaczką limfoblastyczną (ALL, ang. *acute lymphoblastic leukemia*) [127]. Również w tym przypadku dowiedziono, że procesy demetylacji są silnie zaburzone u pacjentów chorych, a globalny poziom 5-hmCyt był znacznie niższy w grupie dzieci z ALL, niż w grupie kontrolnej. Co więcej, u dzieci uzyskujących remisję całkowitą poziomy modyfikatorów epigenetycznych wracały do podobnych jak w grupie kontrolnej.

Analizując bazy publikacji można zauważyć jednak, że niewiele badań dotyczących pomiarów modyfikatorów epigenetycznych poświęconych zostało nowotworom hematologicznym dorosłych, a w szczególności ostrej białaczce szpikowej i zespołom mielodysplastycznym. Jak wykazano we wstępie do pracy, w grupie pacjentów z AML i MDS mutacje genów

zaangażowanych w aktywną demetylację występują niezwykle często (por. Wstęp, s. 27), zatem analiza ilościowa poszczególnych produktów i pochodnych procesu aktywnej demetylacji wydaje się być szczególnie interesująca. W niniejszej pracy wykorzystano dedykowaną metodologię opartą na technologii dwuwymiarowej ultrasprawnej chromatografii cieczowej z tandemową spektrometrią mas (2D-UPLC-MS/MS) do pomiarów ilościowych wszystkich znanych produktów aktywnej demetylacji DNA, a więc: 5-mCyt (5-metylocytozyny), 5-hmCyt (5-hydroksymetylocytozyny), 5-fCyt (5-formylocytozyny), 5-caCyt (5-karboksycytozyny) oraz 5-hmUra (5-hydroksymetylouracylu) we krwi oraz moczu. Technika 2D-UPLC-MS/MS umożliwia obecnie najbardziej precyzyjny pomiar modyfikatorów epigenetycznych i charakteryzuje się znacznie wyższą czułością niż dostępne metody immunoenzymatyczne [104, 128]. Jest to szczególnie istotne, biorąc pod uwagę ledwie wykrywalne wartości produktów epigenetycznych w genomie ludzkim: w niektórych badaniach na tysiąc cząsteczek 5-hmCyt przypada zaledwie jedna cząsteczka 5-formylocytozyny, zaś 5-karboksycytozyna występuje jeszcze rzadziej [109, 129].

W pracy potwierdzono, że obniżenie globalnego poziomu 5-hmC w DNA jest cechą charakterystyczną również ostrej białaczki szpikowej oraz zespołów mielodysplastycznych. W obu przypadkach uzyskano różnicę istotną statystycznie względem grupy kontrolnej (**tab. 11, ryc. 4**).

Wcześniej w grupach MDS i AML udowodniono globalny spadek poziomu 5-hmCyt, chociaż w jednej pracy różnicę istotną statystycznie znaleziono jedynie w grupie pacjentów z mutacjami epigenetycznymi *TET2*, *IDH1* i *IDH2* [64, 95, 103, 130]. Rola tych mutacji genowych na szlak aktywnej demetylacji została szczegółowo omówiona w rozdziale „Wstęp”, a spadek poziomu 5-hmCyt w ich przebiegu wydaje się być oczywisty. Nietatwo jednak wytłumaczyć globalny spadek poziomu 5-hmCyt w grupie pacjentów z AML, u których nie stwierdzono tych mutacji [131-133]. Publikacje, w których potwierdzono hipermetylację u pacjentów z AML i MDS wolnych od mutacji epigenetycznych potwierdzają, że na obniżenie stężenia 5-hmCyt mają wpływ inne czynniki, które wymagają omówienia.

W 2022 roku w czasopiśmie *Blood Advances* Gurnari i współtwórcy wykazali na dużej grupie pacjentów z zespołami mielodysplastycznymi, że deplecja 5-hmCyt może występować niezależnie od statusu mutacji genu *TET2* [95]. Co więcej, także obniżona ekspresja *TET2* mRNA została wykazana nie tylko w grupie pacjentów z mutacją *TET2*, lecz także wśród

pacjentów nieobciążonych tą mutacją. Pojedyncze doniesienia potwierdzające obniżoną ekspresję mRNA *TET2* w MDS i AML były publikowane już wcześniej, ale dopiero od kilku lat wskazuje się na zaburzenie funkcji dioksygenazy *TET2* niezależnie od statusu mutacji genu ją kodującego [134-136]. Rzeczywiście, podobne zjawisko zaobserwowano w niniejszej pracy w grupie pacjentów z AML: zarówno obniżona ekspresja mRNA *TET2* oraz deplecja 5-hmC były cechami charakterystycznymi całej grupy AML, ale niezależnymi od mutacji genu *TET2* (por. **tab. 22** i **ryc. 17, 18** oraz **19**).

Jak zatem udowodniono, utrata funkcji *TET2* prowadząca do globalnej hipermetylacji nie zawsze jest wywołana jego mutacją. Czynniki prowadzące do utraty funkcji genu *TET2* określono w literaturze anglojęzycznej zbiorczo mianem ‘tetopatii’ (ang. tetopathies).

Jedną z potencjalnych tetopatii może być inhibicja deacetylazy histonowej (HDAC, ang. histone deacetylase). Blokowanie jednej z nich – HDAC4 – prowadziło do zmniejszenia ekspresji *TET2* mRNA (ang. downregulation) w komórkach MDS i AML, co skutkowało obniżeniem 5-hmCyt niezależnie od statusu mutacji *TET2* [137]. Innym udowodnionym czynnikiem obniżającym poziom 5-hmCyt są mikroRNA (miRNA, ang. microRNA). W zespołach mielodysplastycznych miR-22 wykazuje zwiększoną ekspresję (ang. upregulation) i poprzez atakowanie *TET2* obniża jego ekspresję, przez co zmniejsza produkcję 5-hmCyt w procesie aktywnej demetylacji [138]. W badaniach eksperymentalnych transgeniczne modele mysie ze zwiększoną ekspresją miR-22 rozwijały klon niezróżnicowanych komórek blastycznych linii mieloidalnej oraz kliniczne cechy zespołów mielodysplastycznych i mieloproliferacyjnych (zmiany dysplastyczne w linii czerwonokrwinkowej, granulocytarnej i megakariocytarnej; splenomegalię z naciekiem komórek mieloidalnych; leukopenię oraz anemię), a 70% z nich rozwinęło białaczkę szpikową w ciągu dwóch lat [139]. Przy okazji potwierdzono również in vivo obniżenie ekspresji *TET2* mRNA oraz znaczny spadek poziomu 5-hmCyt w DNA w wyniku bezpośredniego działania miR-22. W innej pracy zidentyfikowano ponad trzydzieści mikroRNA mających zdolność obniżania ekspresji *TET2* i wtórnie do tego, zmniejszania poziomu 5-hmCyt [140]. Co więcej, potwierdzono, że część z nich wykazuje nadekspresję w AML wolnej od mutacji *TET2* (wild-type *TET2*), co może stanowić kolejne wytłumaczenie obniżonego poziomu 5-hmCyt u pacjentów z AML nieobciążonych mutacjami epigenetycznymi (przypis: w tym przypadku mikroRNA są kolejnymi tetopatiami).

W odniesieniu do poziomu 5-hmC w DNA, w niniejszej pracy wykazano także istotną statystycznie korelację pomiędzy odsetkiem blastów w szpiku kostnym, a wartością 5-hmC w DNA leukocytarnym (**tab. 21, ryc. 14-15**). Ta zależność została udowodniona już wcześniej, jednak inną metodą [141].

W czasopiśmie *Blood* opublikowano wyniki badania, w którym ustalano globalny poziom 5-hmCyt u dwustusześciu pacjentów do 60. roku życia z AML, co badano metodą tandemowej spektrometrii mas z chromatografią cieczową [103]. Odkryto, że u zdrowych ludzi poziom 5-hmCyt mieści się w wąskim zakresie (+/- 1,5x w stosunku do mediany), zaś u pacjentów z AML zakres ten jest znacznie większy (+/- 15x w stosunku do mediany). Różnice istotne statystycznie były widoczne w grupie z mutacjami *TET2* i *IDH1/2*, gdzie poziom 5-hmCyt był niższy niż w grupie zdrowych ludzi. Badacze podzielili ponadto pacjentów z AML względem poziomu 5-hmCyt. W grupie z najniższymi wartościami 5-hmCyt mieścili się niemal wyłącznie pacjenci z mutacjami *TET2* oraz *IDH1/2*. Zaskakująco, pacjenci z wysokimi wartościami 5-hmCyt mieli krótsze przeżycie całkowite i udowodniono to analizą wieloczynnikową (wysoki poziom 5-hmCyt był niezależnym czynnikiem złej prognozy). Dodatkowo, u pacjentów z AML uzyskujących remisję dochodziło do normalizacji poziomu 5-hmCyt po leczeniu.

5-formylocytozyna (5-fCyt) i 5-karboksycytozyna (5-caCyt) w DNA

Pierwsze ilościowe pomiary 5-fCyt i 5-caCyt w komórkach myszy wykazały, że ich poziom jest wielokrotnie niższy niż poziom 5-mCyt i 5-hmCyt i stanowi poniżej 0.002% par zasad zawierających cytozynę [65, 70, 142]. W roku 2013 metodą spektrometrii mas z chromatografią cieczową wykonano natomiast pierwsze pomiary 5-fCyt w DNA komórek ludzkich, **tab. 27**. [129]. Podobnie jak w przypadku badań na tkankach mysich wykazano, że poziom 5-fCyt jest zależny od tkanek i jest 10-1000 razy niższy od poziomu 5-hmCyt. Jednocześnie poziom 5-fCyt jest zawsze nieznacznie wyższy od poziomu 5-caCyt.

Jest to zgodne z modelem TDG-BER-zależnej aktywnej demetylacji DNA, ponieważ 5-hmCyt jest pierwszym produktem aktywnej demetylacji DNA (dlatego jest jej najwięcej) i jednocześnie substratem dla wszystkich kolejnych (**ryc. 1, rozdział „Wstęp”**). 5-CaCyt powstaje z kolei z oksydacji 5-fCyt również na drodze aktywnej demetylacji DNA, dlatego jej stężenie jest najniższe.

tab. 27. Poziomy (jednostki/10⁶ nukleozydów) 5-hmdC, 5-fdC i 5-cadC w komórkach i tkankach mysich i ludzkich mierzone za pomocą HPLC-MS/MS. Dane na podstawie publikacji [124]

	5-hmdC	5-fdC	5-cadC
Komórki HeLa	31,2	0,67	0,27
Komórki czerniaka (ludzkie)	12,2	0,69	0,29
Zarodkowe komórki macierzyste (mysie)	680	14,5	3,4
Tkanka mózgowa (ludzka)	1550	1,7	0,15
Tkanka mózgowa (mysia)	560	1,4	1,2

W niniejszej pracy te zależności zostały potwierdzone metodą spektrometrii mas z chromatografią cieczową. Niezależnie od badanej grupy (AML, MDS, grupa kontrolna) poziom 5-hmCyt był zawsze znacznie wyższy od poziomu 5-fCyt, a poziom 5-caCyt był zawsze najniższy (por. *ryc. 4, ryc. 5 oraz ryc. 6, rozdział „Wyniki”*). Analizując bazy publikacji nie znaleziono pracy, w której oznaczano by wcześniej 5-fCyt oraz 5-caCyt w DNA pacjentów z AML i MDS.

Zaskakująco, w przypadku oznaczeń 5-fCyt oraz 5-caCyt w DNA stwierdzono poziomy najwyższe w grupie pacjentów z AML, pośrednie wśród pacjentów z MDS i najniższe u osób zdrowych (por. *ryc. 5 i ryc. 6, rozdział „Wyniki”*). Różnice były znaczące i w każdym przypadku wykazano istotność statystyczną. Wydawałoby się, że skoro poziom 5-hmCyt był niższy w grupie AML i MDS, to stężenia jego produktów również powinny być niższe, niż w populacji osób zdrowych. Jednak jak wykazano na grupie pacjentów z MDS we wcześniej cytowanej publikacji Gurnari i wsp., w przypadku utraty funkcji demetylującej dioksygenazy TET2 (w wyniku mutacji genu *TET2* lub innej tetopatii) może dochodzić do nadekspresji genu *TET3* i w efekcie zwiększenia aktywności katalitycznej dioksygenazy TET3 [95]. Taki kompensujący mechanizm prowadzi do przywrócenia hydroksymetylacji w szlaku aktywnej demetylacji DNA i w efekcie może odpowiadać za wzrost poziomu 5-fCyt oraz 5-caCyt. Nie jest jasne, czy w tym systemie naprawczym bierze udział dioksygenaza TET1, jednak hipoteza taka wydaje się być prawdopodobna, zwłaszcza biorąc pod uwagę bardzo wysokie podobieństwo domen katalitycznych dioksygenaz TET1, TET2 oraz TET3 [143, 144].

Hipoteza dotycząca kompensującej roli genów *TET1* i *TET3* w sytuacji supresji funkcji dioksygenazy *TET2* wywołanej dowolną tetopatią znalazła swoje poparcie w niniejszej pracy. W grupie pacjentów z AML wykazano bowiem znacznie podwyższone względem osób zdrowych wartości ekspresji mRNA genów *TET1* oraz *TET3* przy jednoczesnym spadku ekspresji *TET2* (**tab. 22, ryc. 17**), przy czym w każdym przypadku różnice miały wysoką znamienność statystyczną.

Liczba prac omawiających zależności pomiędzy ekspresją mRNA genów z rodziny TET w nowotworach hematologicznych jest niewielka, jednak w tym przypadku cennych informacji dostarczają badania przeprowadzane *in vitro* oraz na modelach zwierzęcych. W jednej z prac wykazano, że pozbawienie mysich komórek embrionalnych jednocześnie wszystkich trzech dioksygenaz z rodziny Tet, tj. Tet1, Tet2 oraz Tet3 (ang. triple-KOs Tet1/2/3) zatrzymuje ich dalsze różnicowanie, a zatem uniemożliwia rozwój embrionu i docelowo organizmu [145]. Jednocześnie jednak, jak udowodniono na modelu zwierzęcym, utrata wyłącznie dioksygenazy Tet2 wiązała się z przeżyciem myszy, co już wówczas sugerowało kompensacyjny charakter poszczególnych dioksygenaz Tet względem siebie [146]. Do podobnych wniosków doszli Dawlaty i współtwórcy, których myszy model podwójnego KO Tet1/2 nie był związany ze śmiercią myszy, jednak prowadził do znacznego nasilenia metylacji w obrębie leukocytarnego DNA [147]. Wreszcie, pozbawienie myszy jednocześnie Tet1 oraz Tet3 powodowało także hipermetylację (co wykazano poprzez spadek poziomu 5-hmCyt i nagromadzenie 5-mCyt), ale również nie było dla myszy letalne [148].

Wydaje się, że przytoczone eksperymenty prowadzone na komórkach macierzystych, badania na modelach zwierzęcych, a także zawarta w tej pracy analiza zdają się potwierdzać silną zależność pomiędzy aktywnością poszczególnych trzech dioksygenaz rodziny TET i w związku z tym białka te oraz geny je kodujące należy traktować jako wzajemnie uzupełniający się system.

Pomiary produktów demetylacji w moczu

W znakomitej większości badań dotyczących pomiarów produktów aktywnej demetylacji u pacjentów onkologicznych do oceny ich stężeń wykorzystuje się komórkowe DNA, a metoda immunoenzymatyczna dominuje nad spektrometrią mas. Wiadomo jednak, że produkty aktywnej demetylacji, szczególnie 5-fCyt i 5-caCyt hamują replikację DNA i w związku z tym po

rozpoznaniu przez system naprawczy BER zostają przy udziale glikozylazy TDG wycięte z nici DNA i zastąpione cytozyną [68]. Jak opisano we wstępie do pracy i zilustrowano na rycinie 1, wycięte z DNA produkty aktywnej demetylacji trafiają do krwiobiegu i ostatecznie zostają wydalone z moczem [149]. W związku z tym za zasadne uznano wykonanie pomiarów produktów aktywnej demetylacji bezpośrednio z moczu. W związku ze spodziewanymi niewielkimi stężeniami tych produktów w moczu, do analizy posłużono się ponownie dwuwymiarową ultrasprawną chromatografią cieczą z tandemową spektrometrią mas (2D-UPLC-MS/MS), a więc metodą charakteryzującą się najwyższą czułością pomiarów w odniesieniu do modyfikatorów epigenetycznych.

Uzyskane wyniki były spójne dla wszystkich produktów aktywnej demetylacji, bowiem w każdym przypadku najwyższe stężenie w moczu odnotowano u pacjentów z AML, pośrednie u pacjentów z MDS i najniższe w grupie kontrolnej. W zdecydowanej większości przypadków różnice pomiędzy badanymi grupami były znaczące i uzyskano istotność statystyczną, w pozostałych przypadkach wykazano trend. Na podstawie analizy baz publikacji stwierdzono, że dotychczas nie wykonywano pomiarów produktów aktywnej (de)metylacji w moczu u chorych na AML i zespoły mielodysplastyczne, zatem w literaturze brak jest danych potwierdzających lub kwestionujących uzyskane w niniejszej pracy wyniki. Jedyne doniesienie, w którym wykonywano analizy modyfikacji epigenetycznych w moczu przy użyciu podobnej metodyki dotyczą raka jelita grubego i wykazano w nim wyższe stężenia wszystkich pochodnych procesu aktywnej demetylacji w moczu niż w grupie osób zdrowych, chociaż wysoką znamienność statystyczną znaleziono tylko dla pomiaru 5-hmdC [128]. Pomimo skąpości publikacji poruszających omawiane zagadnienie wiadomo jednak, że obecność produktów demetylacji w moczu odzwierciedla produkt naprawy DNA dokonany przez system BER i w związku z tym - stopień nasilenia zaburzeń epigenetycznych w DNA komórkowym [149]. Co więcej, potwierdzona na dużej próbie osób zdrowych jest korelacja pomiędzy poziomem produktów demetylacji w DNA komórkowym, a ich stężeniem w moczu [150].

Na podstawie powyższych można zatem wnioskować, że pacjenci z AML charakteryzują się najbardziej zaburzonym epigenomem, a aberracje w jego obrębie są znacznie bardziej nasilone niż w grupie pacjentów z zespołami mielodysplastycznymi i jeszcze bardziej, niż w grupie kontrolnej, gdzie epigenom jest zaburzony jedynie w niewielkim stopniu. Jest to zgodne

z przytoczonymi we wstępie do pracy hipotezami, które zakładają, że zaburzenia epigenetyczne są podwaliną dla procesu leukemogenezy: u ludzi zdrowych są nieobecne lub obecne w niewielkim stopniu, a stopień ich nasilenia zwiększa się wraz z ekspansją klonu białaczkowego, w tym przypadku poprzez zespoły mielodysplastyczne do ostrej białaczki szpikowej. Zdaje się to potwierdzać również wykres poziomu 5-hmdC, w którym zaobserwowano korelację w odniesieniu do odsetka blastów w szpiku kostnym (**ryc. 15**).

Zespół mielodysplastyczny jest w większości przypadków stanem poprzedzającym ostrą białaczkę szpikową, zatem mniejsze nasilenie zaburzeń w obrębie szlaku aktywnej demetylacji w tej grupie wydaje się być uzasadnione. Interesujące natomiast są różnice w poziomach wybranych produktów aktywnej demetylacji, które wykazano w odniesieniu do stadium R-IPSS reprezentowanego przez pacjentów z zespołami mielodysplastycznymi. Dla 5-hmdC w DNA, 5-hmC w moczu, 5-caC w moczu oraz 5-hmdU w moczu zaobserwowano narastanie stężenia produktów demetylacji (odzwierciedlających aktywność zaburzeń epigenetycznych) wraz ze wzrostem stadium zaawansowania zespołu mielodysplastycznego (**ryc. 20**). Ponieważ po podzieleniu grupy pacjentów z MDS na podgrupy względem stadium R-IPSS liczność poszczególnych kohort była niewielka, nie uzyskano istotności statystycznej pomiędzy grupami ani krzywej korelacji. Interesujące byłoby zatem powtórzenie badania na większej grupie pacjentów.

Doskonałym wykładnikiem nasilenia procesów naprawy zmetylowanego DNA, a więc aktywności procesu demetylacji wydaje się być pomiar ekspresji mRNA *TDG* – genu odpowiedzialnego za syntezę glikozylazy tymidynowej. Wiadomo, że rola tego enzymu w procesie aktywnej demetylacji DNA jest kluczowa i polega na usuwaniu 5-formylocytozyny oraz 5-karboksycytozyny z DNA, przy czym pochodne te trafiają następnie do krwiobiegu i ostatecznie zostają wydalone z moczem (por. **ryc. 1** oraz „**Wstęp**”, **str. 21**). Jak przedstawiono w **tab. 22** i na **ryc. 17** w pracy wykazano znacznie wyższą ekspresję mRNA genu *TDG* w grupie pacjentów z AML w stosunku do grupy kontrolnej, co potwierdzono wysoką znamiennością statystyczną. Wykonując przegląd literatury, nie znaleziono wielu publikacji dotyczących aktywności tego genu w nowotworach. W jednej z nich wykazano, że u pacjentów z rakiem jelita grubego poziomy ekspresji *TDG* w tkankach guza były znacznie wyższe, niż w odpowiadających im zdrowych tkankach [151]. Wpływ glikozylazy TDG na proliferację komórek raka jelita grubego poprzez szlak sygnalizacyjny Wnt (ang. *Wnt signaling pathway*)

udowodniono eksperymentalnie, a usunięcie *TDG* za pomocą shRNA (ang. small-hairpin RNA) skutkowało zahamowaniem dalszego wzrostu guza *in vitro* oraz *ex vivo*. Manusco i wsp. udowodnili z kolei, że inaktywacja *Tdg* w komórkach czerniaka modelu mysiego powoduje zahamowanie ich dalszego podziału, co może sugerować, że glikozylaza TDG jest niezbędna do wzrostu komórek również tego guza [152]. Niedawno zwiększoną ekspresję mRNA genu *TDG* wykazano również w obrębie dość dużej grupy pacjentów pediatrycznych z ostrą białaczką limfoblastyczną, a grupę tę porównywano do osób zdrowych [127].

W grudniu 2022 opublikowano zaś w *Science* dość niespodziewane odkrycie dotyczące glikozylazy TDG. Okazało się, że podczas wycinania 5-fC oraz 5-caC z DNA na drodze TET-TDG-BER aktywnej demetylacji mogą powstawać w jednym łańcuchu nici DNA przerwy spowodowane brakiem jednego nukleotydu [153]. Udowodniono zatem, że wycinana przez glikozylazę TDG i system BER 5-formylocytozyna lub 5-karboksycytozyna nie zawsze zostaje z powodzeniem zastąpiona czystą cytozyną. Wytworzone przerwy w nici DNA nieuzupełnione prawidłową cząsteczką cytozyny w ocenie autorów wspomnianej publikacji prowadzą do uszkodzenia DNA komórki i docelowo mogą spowodować jej apoptozę. Eksperyment, który doprowadził do tych przełomowych w kontekście glikozylazy TDG wniosków (dotychczas mechanizm TET-TDG-BER rozpatrywany był wyłącznie w kontekście naprawy DNA, a nie jej uszkodzenia) prowadzony był na komórkach nerwowych, jednakże biorąc pod uwagę występowanie procesu TET-TDG-BER-aktywnej demetylacji powszechnie w całym organizmie należy przyjąć, że fenomen ten występuje również w komórkach innych narządów. W kontekście wniosków płynących z tej publikacji, a także wyników badań przedstawionych w niniejszej pracy otwarte pozostaje pytanie: Czy bardzo wysoka ekspresja mRNA *TDG* w grupie pacjentów z AML jest wyrazem aktywnej naprawy głęboko zaburzonego, poddanego znacznej metylacji epigenomu, czy wręcz przeciwnie, defekt DNA prowadzący do nowotworzenia jest efektem zwiększonej aktywności TDG?

Ryzyko transformacji MDS do AML

W pracy prześledzono losy pacjentów z zespołami mielodysplastycznymi i szukano ewentualnego wpływu wyjściowych poziomów produktów demetylacji oraz mutacji genetycznych na ryzyko transformacji do ostrej białaczki szpikowej. Spośród czterdziestu dwóch pacjentów z MDS dla których uzyskano pełne dane u siedmiu doszło do transformacji w ostrą białaczkę szpikową. Wykazano, że poziom leukocytarnej 5-mdC w momencie diagnozy

był istotnie statystycznie niższy w grupie pacjentów, u których doszło do transformacji (**ryc. 21, tab. 23**). Dodatkowo dla wartości 5-mdC w leukocytach wykonano krzywą ROC, której analiza potwierdziła, że pochodna ta poprawnie klasyfikuje grupę pacjentów z MDS na pacjentów o wysokim i niskim ryzyku transformacji do AML (**ryc. 22**). Dla wszystkich pozostałych produktów aktywnej demetylacji oraz mutacji genetycznych nie znaleziono różnic istotnych statystycznie. Należy jednak wyraźnie zaznaczyć, że pacjenci włączeni do tej analizy mieli różne stadia R-IPSS oraz byli leczeni w różny sposób, co najpewniej również miało wpływ na ryzyko transformacji. Wykonanie wielomianowej regresji logistycznej, która udowodniłaby, że poziom 5-mdC w DNA jest niezależnym czynnikiem ryzyka transformacji MDS do AML jest niemożliwe z powodu zbyt małej grupy pacjentów, u których doszło do transformacji (n=7) i wymaga powtórzenia badania na większej liczbie pacjentów. Dalsze poszukiwanie związku pomiędzy zaburzeniami epigenetycznymi oraz transformacją MDS do AML wydaje się być uzasadnione. Jednymi z najczęściej zmutowanych genów w obu jednostkach chorobowych są bowiem te, odpowiedzialne za modyfikacje epigenetyczne [154]. Mutacja jednego z nich – *DNMT3A*, związana jest ze zwiększonym ryzykiem transformacji MDS do AML [83]. Aktualnie zaburzenia epigenetyczne nie znalazły miejsca w modelach prognostycznych dla zespołów mielodysplastycznych, a podstawowym narzędziem do oceny ryzyka ich transformacji do ostrej białaczki szpikowej pozostaje opracowana w 2012 roku skala R-IPSS [46].

Odpowiedź na leczenie oraz długość przeżycia całkowitego

Poza wcześniej cytowaną publikacją w czasopiśmie *Blood*, w której udowodniono korelację pomiędzy wysokim globalnym poziomem 5-hmCyt w DNA i krótszym przeżyciem całkowitym pacjentów z AML, prac poświęconych związkom pomiędzy poziomami produktów aktywnej demetylacji a odsetkami remisji, długością przeżycia lub przeżycia wolnego od progresji jest bardzo niewiele [103]. W jednej z nich wykazano brak związku pomiędzy poziomem 5-hmCyt w DNA, a odsetkiem odpowiedzi oraz długością przeżycia całkowitego w grupie pacjentów z AML [133]. Korelacji pomiędzy poziomem innych niż 5-hmCyt produktów demetylacji w DNA, a omawianymi parametrami nie wykonywano dotychczas wcale. Nie badano również dotąd ewentualnego związku pomiędzy stężeniem produktów demetylacji w moczu, a odsetkami odpowiedzi na leczenie oraz długością przeżycia całkowitego w AML. Tym bardziej uznano za zasadne wykonanie takich analiz. Ze względu na różnice w stosowanej terapii w niniejszej pracy analizie tej poddano wyłącznie grupę pacjentów z AML leczonych chemioterapią

intensywną według schematu „3+7”, omówionego we wstępie do pracy. Podobnie jak w ostatnio cytowanej publikacji, nie wykazano żadnego wpływu wyjściowych poziomów produktów demetylacji w DNA oraz w moczu na odsetek remisji całkowitych (CR, *ang. complete remission*), **tab. 24**. Wykazano jednak z wysoką znamiennością statystyczną, że pacjenci z wysokim wyjściowym stężeniem 5-mdC w moczu mają znacznie krótszą medianę przeżycia całkowitego (mOS), **ryc. 24**. Jest to wniosek o tyle zaskakujący, gdyż jednocześnie nie wykazano by parametr ten (5-mdC) miał wpływ na uzyskanie całkowitej remisji. Należy zaznaczyć więc, że analiza ta jest obciążona ograniczeniem: uwzględnienie w wieloczynnikowej analizie wariancji wyjściowego kariotypu oraz statusu transplantacji komórek macierzystych nie było możliwe ze względu na niską liczbę grup. Dlatego w pracy wykonano szczegółową analizę grupy pacjentów z AML leczonych chemioterapią intensywną dla których dostępny był pomiar 5-mdC (**tab. 25** i **tab. 26**). Wykorzystując model regresji Coxa wykazano, że w grupie tej przeszczep allogeniczny komórek macierzystych znacznie zwiększał prawdopodobieństwo przeżycia przynajmniej 12-miesięcznego (**tab. 26**). W związku z tym mimo udowodnienia w analizie jednoczynnikowej znaczenia wartości 5-mdC w moczu dla długości przeżycia całkowitego, być może czynnik ten straciłby znaczenie w dużej analizie wieloczynnikowej. Interesujące zatem byłoby powtórzenie badania na większej grupie pacjentów.

W odniesieniu zaś do wpływu czynników epigenetycznych na długość przeżycia pacjentów z zespołami mielodysplastycznymi z danych literaturowych wykazano natomiast, że zwiększona metylacja DNA jest związana z krótszym przeżyciem całkowitym [155]. W pracy tej, opublikowanej na łamach *Journal of Clinical Oncology* udowodniono, że parametr ten był niezależny prognostycznie od wieku, płci oraz kategorii IPSS. W niniejszej pracy ze względu na znaczną heterogenność grupy pacjentów z MDS włączonej do badania oraz różnicami w zastosowanym leczeniu, i w związku z tym braku odpowiedniej mocy statystycznej, podobnych analiz nie wykonywano.

Mutacje genowe zaangażowane w procesy epigenetyczne

W niniejszej pracy u 3,23% pacjentów z AML zidentyfikowano mutację heterozygotyczną R132 genu *IDH1*. Odsetek ten jest podobny do znanego z literatury, gdzie mutacje *IDH1* opisuje się u 6,6-7,6% pacjentów z AML i niemal wyłącznie dotyczą one właśnie kodonu 132 [156-158]. Mutacja ta powoduje zamianę guaniny na adeninę w pozycji 395. nukleotydu, co skutkuje

podmianą argininy na histydynę i w efekcie doprowadza do powstania onkometabolitu 2-hydroksyglutaranu (2-HG), w miejsce alfa-ketoglutaranu. Powstający onkometabolit blokuje dioksygenazę TET2 uniemożliwiając aktywną demetylację 5-mCyt. Znaczenie mutacji *IDH1* jako modyfikatora epigenetycznego zostało szeroko omówione w rozdziale „**Wstęp**”. Jak jednak wykazano w cytowanych wyżej publikacjach, mutacje w genie *IDH1* nie mają znaczenia prognostycznego u pacjentów z AML. Tym bardziej interesujące jest więc doniesienie o wpływie wysokiego stężenia 2-hydroksyglutaranu w osoczu krwi na krótsze przeżycie całkowite i przeżycie wolne od zdarzeń (ang. *event-free survival*) wykazane na dużej grupie chińskich pacjentów z AML bez zaburzeń cytogenetycznych [159].

W pracy zidentyfikowano również mutacje w obrębie genu *IDH2* (R140 oraz R172) i dotyczyły one 4,8% pacjentów z AML. Podobnie jak w przypadku *IDH1*, odsetek ten był zbliżony z danymi literaturowymi, zgodnie z którymi mutacje *IDH2* występują u 3,8-12,1% pacjentów z AML [160]. Produkt genu *IDH2* (*dehydrogenaza izocytrynianowa mitochondrialna*) wykazuje identyczną aktywność enzymatyczną jak produkt *IDH1*, jednak jest zlokalizowany w matriks mitochondrialnym, a mutacje R140 i R172 w jego obrębie zostały opisane u pacjentów po raz pierwszy stosunkowo niedawno, bo w 2010 roku [99, 161]. Podobnie jak w przypadku mutacji *IDH1*, mutacje w *IDH2* nie mają znaczenia prognostycznego w grupie pacjentów z AML [160]. Dość częste występowanie mutacji *IDH1* i *IDH2* u pacjentów z AML i jednocześnie brak znaczenia prognostycznego tych mutacji może sugerować, że ich efekt onkogenny zostaje zniesiony przez stosowaną terapię AML.

Odnotowany w pracy odsetek pacjentów z mutacjami w genie *TET2* był mniejszy niż w dostępnych danych literaturowych (**por. tab. 6, roz. „Wstęp”**). Warto jednak odnotować, że mutacje *IDH1* oraz *IDH2* występowały wyłącznie u pacjentów pozbawionych mutacji w genie *TET2* (**ryc. 16**). Ten fenomen był opisywany już wcześniej i ma swoje biochemiczne uzasadnienie [101]. Mutacja w genie *IDH1/2* poprzez produkcję onkometabolitu – 2-hydroksyglutaranu, blokuje aktywność dioksygenazy TET2 i przez to hamuje aktywną demetylację 5-mCyt do 5-hmCyt, zaś mutacja w genie *TET2* blokuje oksydację 5-mCyt do 5-hmCyt w sposób bezpośredni, poprzez defekt genetyczny prowadzący do braku wytworzenia niezbędnego enzymu – dioksygenazy TET2 [102]. Każda z tych mutacji wywołuje zatem dokładnie ten sam efekt końcowy, jest wobec siebie konkurencyjna i w związku z tym nie występuje jednocześnie.

W odniesieniu do wpływu mutacji *TET2*, *IDH1* i *IDH2* na długość życia pacjentów z zespołami mielodysplastycznymi występują w literaturze liczne rozbieżności. Większość publikacji raportuje brak związku pomiędzy mutacjami w genie *TET2* a długością przeżycia całkowitego pacjentów z MDS [42, 162, 163]. Część publikacji wskazuje również na brak znaczenia prognostycznego mutacji w genach *IDH1* oraz *IDH2* [42, 162]. Jednocześnie duża analiza wpływu mutacji epigenetycznych na przeżycie pacjentów z MDS opublikowana w czasopiśmie *Leukemia* wykazała, że mutacja *IDH1*, ale nie *IDH2*, jest silnym, niezależnym czynnikiem prognostycznym krótszego przeżycia [164]. Do podobnych wniosków doszła grupa badaczy niemieckich, którzy wskazali na krótsze przeżycie oraz zwiększone ryzyko transformacji do AML wśród pacjentów z MDS obarczonych mutacją *IDH1* [165]. Niekorzystny wpływ mutacji *IDH1*, ale nie *IDH2* na długość przeżycia pacjentów z MDS został potwierdzony w dużej metaanalizie uwzględniającej 1782 pacjentów [166].

Dodatkowo wykazano, że pacjenci z MDS obarczeni mutacjami w genie *TET2* mają wyższe ryzyko transformacji do ostrej białaczki szpikowej [162]. W niniejszej pracy u żadnego z pięciu pacjentów z MDS obarczonych mutacją *TET2* nie doszło do transformacji w AML.

Aktualnie żaden z trzech omawianych genów nie znalazł miejsca ani w klasyfikacji ryzyka cytogenetyczno-molekularnego ELN 2022 dla AML (**tab. 2**), ani w indeksie prognostycznym R-IPSS dla MDS (**tab. 3**).

Wiedza dotycząca hipermetylacji DNA w ostrej białaczce szpikowej i zespołach mielodysplastycznych doprowadziła do powszechnego wykorzystania w tych chorobach leków demetylujących: azacytydyny i decytabiny (por. „*Wstęp*”). Jak wiadomo, leki te powodują hipometylację globalną DNA (działają niespecyficznie w obrębie całego genomu) i w ten sposób niecelowanie naprawiają uszkodzone (zmetylowane) fragmenty DNA, zapobiegając leukemogenezie. Badania dotyczące zaburzeń epigenetycznych w nowotworach wykazały jednak, że choć globalna hipermetylacja jest ich cechą charakterystyczną, to stopień metylacji poszczególnych genów w obrębie genomu jest bardzo zróżnicowany i także inny w zależności od konkretnego nowotworu. Każdy nowotwór ma zatem inny profil metylacji poszczególnych genów, a więc cechuje się swoim unikatowym epigenomem, a leki demetylujące nie działają celowanie na zmetylowane geny, a jedynie nieselektywnie wyhamowują proces metylacji w obrębie całego genomu. W tabeli 28. zamieszczono przykłady zidentyfikowanych w ostatnich latach unikatowych cech epigenetycznych dla wybranych nowotworów.

tab. 28. Przykłady zidentyfikowanych unikatowych cech epigenetycznych wybranych nowotworów

Nowotwór	Unikatowe cechy metylomu	Badanie
Rak płuca	Deplecja 5-hmC w genie <i>SOD3</i>	<i>Kamiya T</i> i wsp. <i>Free Radic. Res.</i> 2017, 51, 329–336.
Rak piersi	Deplecja 5-hmC w genie <i>LZTS1</i> Deplecja 5-hmC w regionie promotorowym miR200 Deplecja 5-hmC w genie <i>HOXA</i> Wzrost 5-hmC w genie <i>TNFA</i>	<i>Matthias W</i> i wsp. <i>Transl. Oncol.</i> 2013, 6, 715–721. <i>Song S</i> i wsp. <i>Cell</i> 2013, 154, 311–324. <i>Sun M</i> i wsp. <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> 2013, 110, 9920–9925. <i>Wu M-Z</i> i wsp. <i>Cancer Res.</i> 2015, 75, 3912–3924.
Rak jelita grubego	Deplecja 5-hmC w genach <i>CA2</i> , <i>FMN2</i> , <i>PDCD4</i> , <i>PKIB</i> i <i>SLC26A2</i> Wzrost 5-hmC w genach <i>BMP7</i> , <i>NKD2</i> , <i>TESC</i> i <i>TGFBI</i>	<i>Chapman CG</i> i wsp. <i>Sci. Rep.</i> 2015, 5. <i>Kang KA</i> i wsp. <i>Cell Death Dis.</i> 2014, 5.
AML	Wzrost 5-hmC w genach <i>CEBPA</i> , <i>NFKB1</i> , <i>RARA</i> , <i>SPI1</i> , <i>FLT3</i> , <i>KIT</i> , <i>KITLG</i> , <i>PI3K</i> , <i>CCNA1</i>	<i>Shao J</i> i wsp. <i>Sci Rep.</i> 2022 20;12:12410.

Wiadomo więc, że globalny spadek 5-hmC (świadczący o hipermetylacji) jest charakterystyczny dla nowotworów, ale celem ich różnicowania konieczna jest identyfikacja

specyficznych różnic w poziomie 5-hmCyt poszczególnych genów (ang. „*locus-specific epigenetic markers*”). W zależności od nowotworu poziom 5-hmCyt może bowiem w konkretny sposób promować lub wyciszać geny odpowiedzialne za jego rozwój. W związku z tym celem precyzyjnego odróżniania poszczególnych nowotworów na podstawie zaburzeń epigenetycznych w ostatnich kilku latach opracowano techniki mapowania profili metylacji wysp CpG całego genomu (tzw. metylomu, ang. *methylome*) charakterystycznych dla poszczególnych typów nowotworów. Mapowanie metylomów umożliwiają narzędzia oparte o metodę enzymatyczną, przeciwciała anty-metylocytozyna oraz oparte na wodorosiarczynie, przy czym najczęściej wykorzystywana jest ta ostatnia [167, 168]. Dzięki tym narzędziom od kilku lat publikowane są doniesienia dotyczące charakterystycznych dla konkretnych nowotworów metylomów. W 2020 roku opublikowano pracę, w której ustalono metylomy całych genomów z próbek krwi pacjentów z AML (n=194), ALL (n=136) i zdrowych (n=754) [169]. W pracy zidentyfikowano 4 wyspy CpG o unikatowym dla AML profilu metylacji oraz 7 wysp CpG o profilu metylacji unikatowym dla ALL. Na podstawie tych cech możliwe było trafne postawienie diagnozy w grupie nowych pacjentów z bardzo wysoką czułością i specyficznością (AUC=0.9998 dla AML versus zdrowych kontroli oraz AUC=0.9995 dla ALL versus zdrowych kontroli). Wcześniej podobnej metody użyto do rozpoznawania raka wątrobowokomórkowego tylko na podstawie metylomu krążącego DNA (cf-DNA, cell-free DNA) [170]. W tej wysoko cytowanej publikacji udowodniono, że metylom DNA wyizolowanego z hepatocytów raka wątrobowokomórkowego jest zbieżny z metylomem uzyskanym z krążącego DNA i unikatowy dla tej choroby. Pozwoliło to zatem stworzyć małoinwazyjną metodę rozpoznawania raka wątrobowokomórkowego z krwi obwodowej. Ustalenie diagnozy na podstawie wyłącznie metylomu udało się eksperymentalnie udowodnić także dla raka jelita grubego bez przerzutów do wątroby oraz dla raka płuc [171-173].

W lipcu 2022 roku wykorzystano natomiast DNA krążący do zmapowania metylomów 103 pacjentów z AML, a jako kontrolę wykorzystano materiał pobrany od 81 zdrowych osób [174]. Znalezione na tyle duże różnice w profilach metylacji pomiędzy badanymi grupami, że stworzono model różnicujący AML od zdrowych osób, cechujący się wysoką czułością i specyficznością. Udowodniono, że w grupie pacjentów z AML bogate w 5-hmCyt były regiony niekodujące genu, tj. sekwencje promotorowe, rejony 5' niepodlegające translacji (5' UTR, ang. *5' untranslated regions*), rejony flankujące TSS (ang. *transcription start sites*) oraz

wzmacniacze transkrypcji (ang. *gene enhancers*). Ponadto wykazano szczególnie wysokie poziomy 5-hmCyt w obrębie genów odpowiedzialnych za regulację cyklu komórkowego, proliferacji, apoptozy oraz hematopoezy (**tab. 28.**). Autorzy badania przewidują, że pomiar 5-hmCyt z DNA krążącego będzie narzędziem pomocnym w diagnostyce AML.

Badanie całego metylomu, choć technicznie możliwe, jest jednak obecnie bardzo czasochłonne i wymaga dużych nakładów finansowych, dlatego nie jest jeszcze wykorzystywane rutynowo w praktyce klinicznej. Biorąc pod uwagę, że metoda ta jest minimalnie inwazyjna i, jak udowodniono w wyżej cytowanych publikacjach, z wysoką czułością i specyficznością pozwala na rozpoznanie wybranych nowotworów, narzędzie to daje nadzieję na małoinwazyjną diagnostykę nowotworów w przyszłości. Ze względu na płynną, ustaloną arbitralnie granicę diagnostyczną pomiędzy zespołami mielodysplastycznymi i ostrą białaczką szpikową, w przypadku tych chorób takie pomocnicze narzędzie potwierdzające diagnozę byłoby szczególnie cenne. Diagnozowanie tych chorób za pomocą aspiracji szpiku kostnego oraz trepanobiopsji jak aktualnie nie zawsze daje prawidłowe rozpoznanie [175].

Identyfikacja specyficznych dla konkretnych nowotworów metylomów będzie miała prawdopodobnie również konsekwencję w poszukiwaniu leków działających poprzez mechanizmy epigenetyczne. Leki demetylujące nieselektywnie (jak wspomniane azacytydina oraz decytabina) powinny zostać wyparte przez terapie umożliwiające demetylację celowaną poszczególnych zmetylowanych locus zidentyfikowanych jako prowadzące do leukemogenezy.

Podsumowanie

Prawidłowy rozwój każdej komórki organizmu uwarunkowany jest nie tylko poprzez kod genetyczny wpływający na jej fenotyp, dostarczanie jej wymaganych substratów do budulca oraz odpowiednie warunki fizykochemiczne, ale również poprzez konkretne wzorce metylacji DNA, które modulują funkcję genów regulując ich ekspresję. Jak wspomniano w niniejszej pracy wielokrotnie, powszechnym u eukariontów i podstawowym modyfikatorem epigenetycznym jest proces metylacji wysp CpG, bez którego różnicowanie komórek jest niemożliwe. Nadmierna metylacja wysp CpG jest zaś zaburzeniem typowym dla procesów nowotworowych, w tym, jak wykazano w niniejszej pracy – również ostrej białaczki szpikowej i zespołów mielodysplastycznych. Jak udowodniono i również szeroko opisano we wstępie do

pracy, hipermetylacja będąca konsekwencją zaburzeń epigenetycznych prowadzi do leukemogenezy. Organizm wytworzył jednak zaawansowany system naprawczy, którego zadaniem jest wycinanie z DNA zmetylowanych cząsteczek cytozyny poprzez jej uprzednią oksydację. System ten określono mianem TET-TDG-BER-zależnej aktywnej demetylacji DNA. Ponieważ zidentyfikowano dotąd szereg czynników odpowiedzialnych za hipermetylację uznano za zasadne wykonanie ich analiz, a także elementów systemu naprawczego i zależności pomiędzy nimi. Wykazano, że jednym z czynników prowadzących do hipermetylacji mogą być mutacje genów *TET2*, *IDH1* oraz *IDH2*, które upośledzają proces TET-TDG-BER-zależnej aktywnej demetylacji DNA poprzez defekt enzymu przeprowadzającego reakcję oksydacji 5-mdC do 5-hmdC lub poprzez wytworzenie błędnego substratu dla przeprowadzanej reakcji. Określono częstość występowania mutacji wymienionych genów u pacjentów z AML oraz MDS. Wykazano głęboką deplecję ekspresji mRNA genu *TET2* w grupie pacjentów z AML oraz znaleziono dowód potwierdzający mechanizm kompensujący zaburzenie ekspresji mRNA *TET2* (poprzez nadekspresję *TET1* i *TET3*). Poprzez wykazanie znacznie wyższych mian produktów aktywnej demetylacji DNA w moczu w grupie pacjentów z AML i MDS w stosunku do grupy kontrolnej udowodniono, że zaburzenia epigenetyczne są znacznie bardziej nasilone w AML oraz MDS niż w grupie kontrolnej. Analiza ekspresji mRNA genu *TDG* odpowiedzialnego za aktywne usuwanie 5-fCyt i 5-caCyt z DNA potwierdziła, że proces aktywnej naprawy DNA jest najbardziej aktywny u pacjentów z ostrą białaczką szpikową. Łącznie wyniki przedstawione w pracy dostarczyły dowodów wspierających hipotezę, że zaburzenia epigenetyczne są podwaliną dla procesu leukemogenezy.

6. Wnioski

1. Wykazano obniżenie poziomu 5-hmdC w DNA leukocytarnym pacjentów z AML względem grupy kontrolnej oraz pacjentów z MDS względem grupy kontrolnej.
2. Stwierdzono różnice w stężeniach produktów aktywnej demetylacji w moczu: najwyższe stężenia u pacjentów z AML, pośrednie u pacjentów z MDS oraz najniższe w grupie kontrolnej. Wykazano przez to różnice w nasileniu zaburzeń epigenomu w tych grupach: największe wśród pacjentów z AML, pośrednie wśród pacjentów z MDS oraz najniższe w grupie osób zdrowych.
3. Wykazano zwiększoną ekspresję mRNA *TET1* oraz *TET3* w grupie pacjentów z AML względem grupy kontrolnej, co przy stwierdzonym jednocześnie spadku ekspresji *TET2* wspiera hipotezę zakładającą kompensacyjną funkcję genów *TET1* oraz *TET3* w odpowiedzi na deplecję *TET2*. Dodatkowo w grupie pacjentów z AML wykazano znacznie wyższą ekspresję mRNA genu *TDG* w stosunku do osób zdrowych, co odzwierciedla znaczne nasilenie procesów naprawczych zaburzeń metylacji przez TET-TDG-BER-zależną aktywną demetylację DNA w grupie chorych na AML.
4. Określono częstość występowania mutacji w genach *TET2*, *IDH1* oraz *IDH2* w populacji pacjentów z AML oraz MDS, zbieżną z danymi literaturowymi.
5. Wykazano, że poziomy produktów aktywnej demetylacji w DNA leukocytarnym oraz stężenia tych produktów w moczu pacjentów z AML nie mają wpływu na odpowiedź na leczenie chemioterapią intensywną. Pacjenci z MDS, u których doszło do transformacji do AML mieli niższy wyjściowy poziom 5-mdC w DNA leukocytarnym niż pacjenci, u których nie doszło do transformacji. Wykazano, że pacjenci z AML z niskim wyjściowym stężeniem 5-mdC w moczu mieli dłuższe przeżycie całkowite, niż pacjenci z wysokim stężeniem 5-mdC.

7. Streszczenie

WSTĘP

Za rozwój ostrej białaczki szpikowej i zespołów mielodysplastycznych odpowiedzialne jest nabywanie przez komórki somatycznych mutacji genetycznych, które zaburzają procesy dojrzewania i apoptozy hematopoetycznych komórek macierzystych. W leukemogenezie kluczowe znaczenie mają również czynniki epigenetyczne, a jednym z podstawowych jest zaburzenie metylacji wysp CpG. Mechanizmem naprawczym dla zaburzonego procesu metylacji jest TET-TDG-BER-zależna demetylacja DNA, której aktywność prowadzi do usuwania z DNA i wydalania do moczu zdemetylowanych pochodnych 5-metylocytozyny, w czym kluczową rolę odgrywa dioksygenaza TET2 oraz glikozylaza TDG.

CELE BADANIA

Celem badania jest ocena procesów epigenetycznych u pacjentów dorosłych z AML oraz MDS, w tym analiza poziomów produktów aktywnej demetylacji w DNA leukocytarnym oraz stężeń tych produktów w moczu w porównaniu do grupy kontrolnej, analiza ekspresji mRNA genów zaangażowanych w procesy epigenetyczne i ich wpływ na szlak TET-TDG-BER-aktywnej demetylacji DNA oraz ocena częstości występowania mutacji genów epigenetycznych. Zaplanowano również ocenę wpływu wyjściowych poziomów produktów demetylacji w DNA leukocytarnym oraz stężeń tych produktów w moczu na dane kliniczne: ryzyko transformacji MDS do AML, odpowiedź na chemioterapię indukującą oraz długość życia pacjentów z AML.

MATERIAŁY I METODY

Do badania włączono 62 pacjentów z nieleczonym AML oraz 42 pacjentów z nieleczonym MDS. U wszystkich pacjentów oznaczano wartości produktów aktywnej demetylacji w DNA leukocytarnym oraz w moczu, a do analiz wykorzystano dedykowaną metodologię opartą o dwuwymiarową ultrasprawną chromatografię cieczową z tandemową spektrometrią mas (2D UPLC-MS/MS). Wykonano także pomiary ekspresji mRNA genów *TET1*, *TET2*, *TET3*, *TDG*, *IDH1* oraz *IDH2*. Uzyskane wyniki porównywano do grupy kontrolnej (n=52). U wszystkich pacjentów oznaczono również status mutacji genów *TET2*, *IDH1* oraz *IDH2*.

WYNIKI

Wykazano obniżenie poziomu 5-hmdC w DNA leukocytarnym pacjentów z AML względem

grupy kontrolnej oraz pacjentów z MDS względem grupy kontrolnej. Najwyższe stężenia produktów aktywnej demetylacji w moczu odnotowano u pacjentów z AML, pośrednie u pacjentów z MDS, a najniższe w grupie kontrolnej. W grupie pacjentów z AML wykazano niższą niż w grupie kontrolnej ekspresję mRNA *TET2* i jednocześnie wyższą ekspresję mRNA *TET1*, *TET3*, *TDG* oraz *IDH1/2*. Stwierdzono obecność mutacji genetycznych u pacjentów z AML i MDS: *IDH1* odpowiednio u 3,23% i 2,4% pacjentów, *TET2* odpowiednio u 6,5% i 11,9% pacjentów oraz *IDH2* u 4,8% pacjentów z AML. Nie wykazano związku pomiędzy wartościami produktów demetylacji a odsetkiem odpowiedzi na chemioterapię intensywną u pacjentów z AML. Pacjenci z MDS, u których doszło do transformacji do AML mieli niższy wyjściowy poziom 5-mdC w DNA leukocytarnym niż pacjenci, u których nie doszło do transformacji. Pacjenci z AML z niskim wyjściowym stężeniem 5-mdC w moczu mieli dłuższe przeżycie całkowite, niż pacjenci z wysokim stężeniem 5-mdC.

WNIOSKI

Wykazano, że hipermetylacja wyrażona poprzez deplecję 5-hmdC jest cechą charakterystyczną AML oraz MDS. Dostarczono dowodów na to, że jedną z jej przyczyn może być obniżenie ekspresji mRNA genu *TET2*. Poprzez analizę stężeń produktów demetylacji trafiających do moczu wykazano różnice w nasileniu zaburzeń epigenomu w badanych grupach: największe wśród pacjentów z AML, pośrednie wśród pacjentów z MDS oraz najniższe w grupie osób zdrowych. Poprzez wykazanie zwiększonej ekspresji mRNA *TDG* w grupie chorych na AML potwierdzono znaczne nasilenie procesów naprawczych zaburzeń metylacji przez TET-TDG-BER-zależną aktywną demetylację DNA. Dodatkowo dostarczono dowodów wspierających hipotezę zakładającą kompensacyjną funkcję genów *TET1* oraz *TET3* w odpowiedzi na deplecję *TET2* oraz ustalono częstość występowania mutacji epigenetycznych w populacji pacjentów z AML i MDS. Wyjściowa wartość produktów aktywnej demetylacji w DNA i w moczu nie miała wpływu na powodzenie chemioterapii indukującej u pacjentów z AML. Wyjściowy poziom 5-mdC w DNA leukocytarnym u pacjentów z MDS może mieć wartość prognostyczną w ocenie ryzyka transformacji do AML, a stężenie 5-mdC w moczu może wpływać na długość przeżycia całkowitego pacjentów z AML, jednak wnioski te powinny zostać potwierdzone na większej grupie pacjentów w analizie wieloczynnikowej.

8. Summary

INTRODUCTION

Development of acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes is mediated by the somatic mutations that disrupt the processes of maturation and apoptosis of hematopoietic stem cells. Epigenetic factors are also crucial in leukemogenesis, and disruption of CpG island methylation is one of the most important ones. The repair mechanism for the impaired methylation process is TET-TDG-BER-dependent DNA demethylation, the activity of which leads to the removal of demethylated 5-methylcytosine derivatives from DNA and their elimination with urine, in which TET2 dioxygenase and TDG glycosylase play a key role.

OBJECTIVES OF THE STUDY

The aim of the study is to evaluate epigenetic processes in adult patients with AML and MDS, including analysis of levels of active demethylation products in leukocyte DNA and concentrations of these products in urine compared to the control group, analysis of mRNA expression of genes involved in epigenetic processes and their impact on the TET-TDG-BER-active DNA demethylation pathway, and assessment of the prevalence of epigenetic gene mutations. Assessment of the impact of baseline levels of demethylation products in leukocyte DNA and concentrations of these products in urine on clinical data: the risk of transformation of MDS to AML, response to induction chemotherapy and overall survival of AML patients, were also planned.

MATERIALS AND METHODS

62 patients with untreated AML and 42 patients with untreated MDS were included in the study. Values of active demethylation products in leukocyte DNA and urine were determined in all patients, and dedicated methodology based on two-dimensional ultraperformance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (2D UPLC-MS/MS) was used for analysis. The mRNA expression of *TET1*, *TET2*, *TET3*, *TDG*, *IDH1* and *IDH2* genes was also measured. Results were compared to the control group (n=52). The mutation status of the *TET2*, *IDH1* and *IDH2* genes was also determined in all patients.

RESULTS

There was a reduction in the level of 5-hmdC in the leukocyte DNA of AML patients relative to

the control group, and of MDS patients relative to the control group. The highest levels of active demethylation products in urine were observed in AML patients, intermediate levels in MDS patients, and the lowest levels in the control group. AML patients showed lower expression of *TET2* mRNA than in the control group, and at the same time a higher expression of *TET1*, *TET3*, *TDG* and *IDH1/2* mRNA. Genetic mutations were found in AML and MDS patients: *IDH1* in 3.23% and 2.4% of patients, respectively, *TET2* in 6.5% and 11.9% of patients, respectively, and *IDH2* in 4.8% of AML patients. There was no correlation between the values of demethylation products and the response rate to intensive chemotherapy in patients with AML. Patients with MDS who transformed to AML had lower baseline 5-mdC levels in leukocyte DNA than patients who did not transform. AML patients with low baseline urinary 5-mdC levels had longer overall survival than patients with high 5-mdC levels.

CONCLUSIONS

Hypermethylation expressed by 5-hmdC depletion has been shown to be a hallmark of AML and MDS. Evidence was provided that one of its causes may be a decrease in mRNA expression of the *TET2* gene. By analyzing concentrations of demethylation products entering urine, differences in the severity of epigenome disruption in the study groups were demonstrated: the highest among AML patients, intermediate among MDS patients, and the lowest among healthy subjects. By demonstrating increased *TDG* mRNA expression in the AML patient group, a significant enhancement of methylation disorder repair processes by TET-TDG-BER-dependent active DNA demethylation was confirmed. In addition, evidence was provided to support the hypothesis assuming a compensatory function of *TET1* and *TET3* genes in response to *TET2* depletion, and the frequency of epigenetic mutations in the AML and MDS patient population was measured. The baseline value of active demethylation products in DNA and urine had no effect on the success of induction chemotherapy in AML patients. The baseline level of 5-mdC in leukocyte DNA in MDS patients may have prognostic value in assessing the risk of transformation to AML, and urinary levels of 5-mdC may affect the length of overall survival of AML patients, but these conclusions should be confirmed on a larger group of patients in a multivariate analysis.

9. Bibliografia

1. Wierzbowska, A., *Ostra Białaczka Szpikowa*, in *Hematologia*, T. Robak, Warzocha, K, Editor. 2016, Via Medica: Gdańsk. p. 759-779.
2. Roman, E., et al., *Myeloid malignancies in the real-world: Occurrence, progression and survival in the UK's population-based Haematological Malignancy Research Network 2004-15*. *Cancer Epidemiol*, 2016. **42**: p. 186-98.
3. Arber, D.A., et al., *International Consensus Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemias: integrating morphologic, clinical, and genomic data*. *Blood*, 2022. **140**(11): p. 1200-1228.
4. Dohner, H., et al., *Diagnosis and management of AML in adults: 2022 recommendations from an international expert panel on behalf of the ELN*. *Blood*, 2022. **140**(12): p. 1345-1377.
5. S.H., S., *WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues*. Revised 4th ed ed. 2017, Lyon: International Agency for Research on Cancer.
6. Papaemmanuil, E., et al., *Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia*. *N Engl J Med*, 2016. **374**(23): p. 2209-2221.
7. Medeiros, B.C., et al., *Big data analysis of treatment patterns and outcomes among elderly acute myeloid leukemia patients in the United States*. *Ann Hematol*, 2015. **94**(7): p. 1127-38.
8. Yates, J.W., et al., *Cytosine arabinoside (NSC-63878) and daunorubicin (NSC-83142) therapy in acute nonlymphocytic leukemia*. *Cancer Chemother Rep*, 1973. **57**(4): p. 485-8.
9. Krogh-Madsen, M., et al., *Population pharmacokinetics of cytarabine, etoposide, and daunorubicin in the treatment for acute myeloid leukemia*. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2012. **69**(5): p. 1155-63.
10. Belloc, F., et al., *Intercalation of anthracyclines into living cell DNA analyzed by flow cytometry*. *Cytometry*, 1992. **13**(8): p. 880-5.
11. Capranico, G., et al., *Sequence-selective topoisomerase II inhibition by anthracycline derivatives in SV40 DNA: relationship with DNA binding affinity and cytotoxicity*. *Biochemistry*, 1990. **29**(2): p. 562-9.

12. Lowenberg, B., et al., *High-dose daunorubicin in older patients with acute myeloid leukemia*. N Engl J Med, 2009. **361**(13): p. 1235-48.
13. Lee, J.H., et al., *A randomized trial comparing standard versus high-dose daunorubicin induction in patients with acute myeloid leukemia*. Blood, 2011. **118**(14): p. 3832-41.
14. Luskin, M.R., et al., *Benefit of high-dose daunorubicin in AML induction extends across cytogenetic and molecular groups*. Blood, 2016. **127**(12): p. 1551-8.
15. Fernandez, H.F., et al., *Anthracycline dose intensification in acute myeloid leukemia*. N Engl J Med, 2009. **361**(13): p. 1249-59.
16. Othus, M., et al., *Improved outcomes with "7+3" induction chemotherapy for acute myeloid leukemia over the past four decades: analysis of SWOG trial data*. Haematologica, 2023. **108**(1): p. 42-47.
17. Burnett, A.K., et al., *A randomized comparison of daunorubicin 90 mg/m² vs 60 mg/m² in AML induction: results from the UK NCRI AML17 trial in 1206 patients*. Blood, 2015. **125**(25): p. 3878-85.
18. Lowenberg, B., et al., *Cytarabine dose for acute myeloid leukemia*. N Engl J Med, 2011. **364**(11): p. 1027-36.
19. Burnett, A.K., et al., *Optimization of chemotherapy for younger patients with acute myeloid leukemia: results of the medical research council AML15 trial*. J Clin Oncol, 2013. **31**(27): p. 3360-8.
20. Holowiecki, J., et al., *Cladribine, but not fludarabine, added to daunorubicin and cytarabine during induction prolongs survival of patients with acute myeloid leukemia: a multicenter, randomized phase III study*. J Clin Oncol, 2012. **30**(20): p. 2441-8.
21. Lancet, J.E., et al., *CPX-351 (cytarabine and daunorubicin) Liposome for Injection Versus Conventional Cytarabine Plus Daunorubicin in Older Patients With Newly Diagnosed Secondary Acute Myeloid Leukemia*. J Clin Oncol, 2018. **36**(26): p. 2684-2692.
22. Budziszewska, B.K., et al., *Cladribine Combined with Low-Dose Cytarabine as Frontline Treatment for Unfit Elderly Acute Myeloid Leukemia Patients: Results from a Prospective Multicenter Study of Polish Adult Leukemia Group (PALG)*. Cancers (Basel), 2021. **13**(16).

23. Jones, P.A. and S.M. Taylor, *Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation*. Cell, 1980. **20**(1): p. 85-93.
24. Kantarjian, H.M., et al., *Multicenter, randomized, open-label, phase III trial of decitabine versus patient choice, with physician advice, of either supportive care or low-dose cytarabine for the treatment of older patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia*. J Clin Oncol, 2012. **30**(21): p. 2670-7.
25. Dombret, H., et al., *International phase 3 study of azacitidine vs conventional care regimens in older patients with newly diagnosed AML with >30% blasts*. Blood, 2015. **126**(3): p. 291-9.
26. Fenaux, P., et al., *Azacitidine prolongs overall survival compared with conventional care regimens in elderly patients with low bone marrow blast count acute myeloid leukemia*. J Clin Oncol, 2010. **28**(4): p. 562-9.
27. Pan, R., et al., *Selective BCL-2 inhibition by ABT-199 causes on-target cell death in acute myeloid leukemia*. Cancer Discov, 2014. **4**(3): p. 362-75.
28. DiNardo, C.D., et al., *Azacitidine and Venetoclax in Previously Untreated Acute Myeloid Leukemia*. N Engl J Med, 2020. **383**(7): p. 617-629.
29. Frohling, S., et al., *Prognostic significance of activating FLT3 mutations in younger adults (16 to 60 years) with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: a study of the AML Study Group Ulm*. Blood, 2002. **100**(13): p. 4372-80.
30. Stone, R.M., et al., *Midostaurin plus Chemotherapy for Acute Myeloid Leukemia with a FLT3 Mutation*. N Engl J Med, 2017. **377**(5): p. 454-464.
31. Perl, A.E., et al., *Gilteritinib or Chemotherapy for Relapsed or Refractory FLT3-Mutated AML*. N Engl J Med, 2019. **381**(18): p. 1728-1740.
32. Lambert, J., et al., *Gemtuzumab ozogamicin for de novo acute myeloid leukemia: final efficacy and safety updates from the open-label, phase III ALFA-0701 trial*. Haematologica, 2019. **104**(1): p. 113-119.
33. Montesinos, P., et al., *Ivosidenib and Azacitidine in IDH1-Mutated Acute Myeloid Leukemia*. N Engl J Med, 2022. **386**(16): p. 1519-1531.
34. Herold, T., et al., *Validation and refinement of the revised 2017 European LeukemiaNet genetic risk stratification of acute myeloid leukemia*. Leukemia, 2020. **34**(12): p. 3161-3172.

35. Dwilewicz-Trojaczek, J., *Zespoły mielodysplastyczne*, in *Hematologia*, T. Robak, Warzocha, K., Editor. 2016, Via Medica: Gdańsk. p. 744-758.
36. Fenaux, P., et al., *Myelodysplastic syndromes: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up(dagger)*. *Ann Oncol*, 2021. **32**(2): p. 142-156.
37. Rollison, D.E., et al., *Epidemiology of myelodysplastic syndromes and chronic myeloproliferative disorders in the United States, 2001-2004, using data from the NAACCR and SEER programs*. *Blood*, 2008. **112**(1): p. 45-52.
38. Raza, A., et al., *Apoptosis in bone marrow biopsy samples involving stromal and hematopoietic cells in 50 patients with myelodysplastic syndromes*. *Blood*, 1995. **86**(1): p. 268-76.
39. Kristinsson, S.Y., et al., *Chronic immune stimulation might act as a trigger for the development of acute myeloid leukemia or myelodysplastic syndromes*. *J Clin Oncol*, 2011. **29**(21): p. 2897-903.
40. Anderson, L.A., et al., *Risks of myeloid malignancies in patients with autoimmune conditions*. *Br J Cancer*, 2009. **100**(5): p. 822-8.
41. de Hollanda, A., et al., *Systemic and immune manifestations in myelodysplasia: a multicenter retrospective study*. *Arthritis Care Res (Hoboken)*, 2011. **63**(8): p. 1188-94.
42. Bejar, R., et al., *Clinical effect of point mutations in myelodysplastic syndromes*. *N Engl J Med*, 2011. **364**(26): p. 2496-506.
43. Thol, F., et al., *Frequency and prognostic impact of mutations in SRSF2, U2AF1, and ZRSR2 in patients with myelodysplastic syndromes*. *Blood*, 2012. **119**(15): p. 3578-84.
44. Malcovati, L., et al., *Clinical significance of SF3B1 mutations in myelodysplastic syndromes and myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms*. *Blood*, 2011. **118**(24): p. 6239-46.
45. Papaemmanuil, E., et al., *Somatic SF3B1 mutation in myelodysplasia with ring sideroblasts*. *N Engl J Med*, 2011. **365**(15): p. 1384-95.
46. Greenberg, P.L., et al., *Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes*. *Blood*, 2012. **120**(12): p. 2454-65.
47. Khoury, J.D., et al., *The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms*. *Leukemia*, 2022. **36**(7): p. 1703-1719.

48. Platzbecker, U., et al., *A phase 3 randomized placebo-controlled trial of darbepoetin alfa in patients with anemia and lower-risk myelodysplastic syndromes*. *Leukemia*, 2017. **31**(9): p. 1944-1950.
49. Jadersten, M., et al., *Erythropoietin and granulocyte-colony stimulating factor treatment associated with improved survival in myelodysplastic syndrome*. *J Clin Oncol*, 2008. **26**(21): p. 3607-13.
50. Fenaux, P., et al., *A randomized phase 3 study of lenalidomide versus placebo in RBC transfusion-dependent patients with Low-/Intermediate-1-risk myelodysplastic syndromes with del5q*. *Blood*, 2011. **118**(14): p. 3765-76.
51. Angelucci, E., et al., *Iron Chelation in Transfusion-Dependent Patients With Low- to Intermediate-1-Risk Myelodysplastic Syndromes: A Randomized Trial*. *Ann Intern Med*, 2020. **172**(8): p. 513-522.
52. Fenaux, P., et al., *Luspatercept in Patients with Lower-Risk Myelodysplastic Syndromes*. *N Engl J Med*, 2020. **382**(2): p. 140-151.
53. Fenaux, P., 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. **10**(3): p. 223-32.
54. Jabbour, E., et al., *Randomized phase 2 study of low-dose decitabine vs low-dose azacitidine in lower-risk MDS and MDS/MPN*. *Blood*, 2017. **130**(13): p. 1514-1522.
55. Vaughn, J.E., B.L. Scott, and H.J. Deeg, *Transplantation for myelodysplastic syndromes 2013*. *Curr Opin Hematol*, 2013. **20**(6): p. 494-500.
56. Estey, E., R.P. Hasserjian, and H. Dohner, *Distinguishing AML from MDS: a fixed blast percentage may no longer be optimal*. *Blood*, 2022. **139**(3): p. 323-332.
57. Suzuki, M.M. and A. Bird, *DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics*. *Nat Rev Genet*, 2008. **9**(6): p. 465-76.
58. Shih, A.H., et al., *The role of mutations in epigenetic regulators in myeloid malignancies*. *Nat Rev Cancer*, 2012. **12**(9): p. 599-612.
59. Takahashi, S., *Current findings for recurring mutations in acute myeloid leukemia*. *J Hematol Oncol*, 2011. **4**: p. 36.
60. Borgel, J., et al., *Targets and dynamics of promoter DNA methylation during early mouse development*. *Nat Genet*, 2010. **42**(12): p. 1093-100.

61. Oki, Y. and J.P. Issa, *Epigenetic mechanisms in AML - a target for therapy*. Cancer Treat Res, 2010. **145**: p. 19-40.
62. Subramaniam, D., et al., *DNA methyltransferases: a novel target for prevention and therapy*. Front Oncol, 2014. **4**: p. 80.
63. Tahiliani, M., et al., *Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1*. Science, 2009. **324**(5929): p. 930-5.
64. Ko, M., et al., *Impaired hydroxylation of 5-methylcytosine in myeloid cancers with mutant TET2*. Nature, 2010. **468**(7325): p. 839-43.
65. Ito, S., et al., *Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine*. Science, 2011. **333**(6047): p. 1300-3.
66. Song, C.X. and C. He, *Potential functional roles of DNA demethylation intermediates*. Trends Biochem Sci, 2013. **38**(10): p. 480-4.
67. Kohli, R.M. and Y. Zhang, *TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation*. Nature, 2013. **502**(7472): p. 472-9.
68. Bhutani, N., D.M. Burns, and H.M. Blau, *DNA demethylation dynamics*. Cell, 2011. **146**(6): p. 866-72.
69. Maiti, A. and A.C. Drohat, *Thymine DNA glycosylase can rapidly excise 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine: potential implications for active demethylation of CpG sites*. J Biol Chem, 2011. **286**(41): p. 35334-35338.
70. He, Y.F., et al., *Tet-mediated formation of 5-carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA*. Science, 2011. **333**(6047): p. 1303-7.
71. Weber, A.R., et al., *Biochemical reconstitution of TET1-TDG-BER-dependent active DNA demethylation reveals a highly coordinated mechanism*. Nat Commun, 2016. **7**: p. 10806.
72. Petersen-Mahrt, S.K., R.S. Harris, and M.S. Neuberger, *AID mutates E. coli suggesting a DNA deamination mechanism for antibody diversification*. Nature, 2002. **418**(6893): p. 99-103.
73. Ko, M., et al., *Ten-Eleven-Translocation 2 (TET2) negatively regulates homeostasis and differentiation of hematopoietic stem cells in mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(35): p. 14566-71.

74. Akalin, A., et al., *Base-pair resolution DNA methylation sequencing reveals profoundly divergent epigenetic landscapes in acute myeloid leukemia*. PLoS Genet, 2012. **8**(6): p. e1002781.
75. Figueroa, M.E., et al., *DNA methylation signatures identify biologically distinct subtypes in acute myeloid leukemia*. Cancer Cell, 2010. **17**(1): p. 13-27.
76. Bullinger, L., et al., *Quantitative DNA methylation predicts survival in adult acute myeloid leukemia*. Blood, 2010. **115**(3): p. 636-42.
77. Patel, J.P., et al., *Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia*. N Engl J Med, 2012. **366**(12): p. 1079-89.
78. Yan, X.J., et al., *Exome sequencing identifies somatic mutations of DNA methyltransferase gene DNMT3A in acute monocytic leukemia*. Nat Genet, 2011. **43**(4): p. 309-15.
79. Ley, T.J., et al., *DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia*. N Engl J Med, 2010. **363**(25): p. 2424-33.
80. Challen, G.A., et al., *Dnmt3a is essential for hematopoietic stem cell differentiation*. Nat Genet, 2011. **44**(1): p. 23-31.
81. Spencer, D.H., et al., *CpG Island Hypermethylation Mediated by DNMT3A Is a Consequence of AML Progression*. Cell, 2017. **168**(5): p. 801-816 e13.
82. O'Brien, E.C., J. Brewin, and T. Chevassut, *DNMT3A: the DioNysian MonsTer of acute myeloid leukaemia*. Ther Adv Hematol, 2014. **5**(6): p. 187-96.
83. Walter, M.J., et al., *Recurrent DNMT3A mutations in patients with myelodysplastic syndromes*. Leukemia, 2011. **25**(7): p. 1153-8.
84. Kronke, J., et al., *Clonal evolution in relapsed NPM1-mutated acute myeloid leukemia*. Blood, 2013. **122**(1): p. 100-8.
85. Corces-Zimmerman, M.R., et al., *Preleukemic mutations in human acute myeloid leukemia affect epigenetic regulators and persist in remission*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(7): p. 2548-53.
86. Delhommeau, F., et al., *Mutation in TET2 in myeloid cancers*. N Engl J Med, 2009. **360**(22): p. 2289-301.
87. Metzeler, K.H., et al., *TET2 mutations improve the new European LeukemiaNet risk classification of acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study*. J Clin Oncol, 2011. **29**(10): p. 1373-81.

88. Schaub, F.X., et al., *Clonal analysis of TET2 and JAK2 mutations suggests that TET2 can be a late event in the progression of myeloproliferative neoplasms*. *Blood*, 2010. **115**(10): p. 2003-7.
89. Quivoron, C., et al., *TET2 inactivation results in pleiotropic hematopoietic abnormalities in mouse and is a recurrent event during human lymphomagenesis*. *Cancer Cell*, 2011. **20**(1): p. 25-38.
90. Moran-Crusio, K., et al., *Tet2 loss leads to increased hematopoietic stem cell self-renewal and myeloid transformation*. *Cancer Cell*, 2011. **20**(1): p. 11-24.
91. Abdel-Wahab, O., et al., *Genetic characterization of TET1, TET2, and TET3 alterations in myeloid malignancies*. *Blood*, 2009. **114**(1): p. 144-7.
92. Tefferi, A., et al., *TET2 mutations and their clinical correlates in polycythemia vera, essential thrombocythemia and myelofibrosis*. *Leukemia*, 2009. **23**(5): p. 905-11.
93. Tefferi, A., et al., *Frequent TET2 mutations in systemic mastocytosis: clinical, KITD816V and FIP1L1-PDGFR α correlates*. *Leukemia*, 2009. **23**(5): p. 900-4.
94. Jankowska, A.M., et al., *Loss of heterozygosity 4q24 and TET2 mutations associated with myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms*. *Blood*, 2009. **113**(25): p. 6403-10.
95. Gurnari, C., et al., *TET2 mutations as a part of DNA dioxygenase deficiency in myelodysplastic syndromes*. *Blood Adv*, 2022. **6**(1): p. 100-107.
96. Couronne, L., et al., *Analyses of TET2 mutations in post-myeloproliferative neoplasm acute myeloid leukemias*. *Leukemia*, 2010. **24**(1): p. 201-3.
97. Abdel-Wahab, O., et al., *Genetic analysis of transforming events that convert chronic myeloproliferative neoplasms to leukemias*. *Cancer Res*, 2010. **70**(2): p. 447-52.
98. Dang, L., et al., *Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate*. *Nature*, 2009. **462**(7274): p. 739-44.
99. Ward, P.S., et al., *The common feature of leukemia-associated IDH1 and IDH2 mutations is a neomorphic enzyme activity converting alpha-ketoglutarate to 2-hydroxyglutarate*. *Cancer Cell*, 2010. **17**(3): p. 225-34.
100. Mardis, E.R., et al., *Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome*. *N Engl J Med*, 2009. **361**(11): p. 1058-66.

101. Figueroa, M.E., et al., *Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation*. *Cancer Cell*, 2010. **18**(6): p. 553-67.
102. Xu, W., et al., *Oncometabolite 2-hydroxyglutarate is a competitive inhibitor of alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenases*. *Cancer Cell*, 2011. **19**(1): p. 17-30.
103. Kroeze, L.I., et al., *Characterization of acute myeloid leukemia based on levels of global hydroxymethylation*. *Blood*, 2014. **124**(7): p. 1110-8.
104. Gackowski, D., et al., *Accurate, Direct, and High-Throughput Analyses of a Broad Spectrum of Endogenously Generated DNA Base Modifications with Isotope-Dilution Two-Dimensional Ultraperformance Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry: Possible Clinical Implication*. *Anal Chem*, 2016. **88**(24): p. 12128-12136.
105. Dziaman, T., et al., *Characteristic profiles of DNA epigenetic modifications in colon cancer and its predisposing conditions-benign adenomas and inflammatory bowel disease*. *Clin Epigenetics*, 2018. **10**: p. 72.
106. Mizuta, S., et al., *Investigation of screening method for DNMT3A mutations by high-resolution melting analysis in acute myeloid leukemia*. *Int J Lab Hematol*, 2019. **41**(5): p. 593-600.
107. Zhang, H., et al., *Comparison of high-resolution melting analysis, Sanger sequencing and ARMS for KRAS mutation detection in metastatic colorectal cancer*. *Clin Lab*, 2015. **61**(3-4): p. 435-9.
108. Jiang, M., et al., *High-resolution melting analysis for rapid and sensitive MYD88 screening in chronic lymphocytic leukemia*. *Oncol Lett*, 2019. **18**(1): p. 814-821.
109. Globisch, D., et al., *Tissue distribution of 5-hydroxymethylcytosine and search for active demethylation intermediates*. *PLoS One*, 2010. **5**(12): p. e15367.
110. Bachman, M., et al., *5-Hydroxymethylcytosine is a predominantly stable DNA modification*. *Nat Chem*, 2014. **6**(12): p. 1049-55.
111. Kinney, S.M., et al., *Tissue-specific distribution and dynamic changes of 5-hydroxymethylcytosine in mammalian genomes*. *J Biol Chem*, 2011. **286**(28): p. 24685-93.
112. Li, W. and M. Liu, *Distribution of 5-hydroxymethylcytosine in different human tissues*. *J Nucleic Acids*, 2011. **2011**: p. 870726.

113. Pfeifer, G.P., et al., *The role of 5-hydroxymethylcytosine in human cancer*. Cell Tissue Res, 2014. **356**(3): p. 631-41.
114. Kroeze, L.I., B.A. van der Reijden, and J.H. Jansen, *5-Hydroxymethylcytosine: An epigenetic mark frequently deregulated in cancer*. Biochim Biophys Acta, 2015. **1855**(2): p. 144-54.
115. Ye, C. and L. Li, *5-hydroxymethylcytosine: a new insight into epigenetics in cancer*. Cancer Biol Ther, 2014. **15**(1): p. 10-5.
116. Mariani, C.J., et al., *Alterations of 5-hydroxymethylcytosine in human cancers*. Cancers (Basel), 2013. **5**(3): p. 786-814.
117. Du, C., et al., *Robust quantitative assessments of cytosine modifications and changes in the expressions of related enzymes in gastric cancer*. Gastric Cancer, 2015. **18**(3): p. 516-25.
118. Jin, S.G., et al., *5-Hydroxymethylcytosine is strongly depleted in human cancers but its levels do not correlate with IDH1 mutations*. Cancer Res, 2011. **71**(24): p. 7360-5.
119. Lian, C.G., et al., *Loss of 5-hydroxymethylcytosine is an epigenetic hallmark of melanoma*. Cell, 2012. **150**(6): p. 1135-46.
120. Zhang, F., et al., *5-hydroxymethylcytosine loss is associated with poor prognosis for patients with WHO grade II diffuse astrocytomas*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 20882.
121. Zhang, Y., et al., *Decreased 5-Hydroxymethylcytosine (5-hmC) predicts poor prognosis in early-stage laryngeal squamous cell carcinoma*. Am J Cancer Res, 2016. **6**(5): p. 1089-98.
122. Tsai, K.W., et al., *Reduction of global 5-hydroxymethylcytosine is a poor prognostic factor in breast cancer patients, especially for an ER/PR-negative subtype*. Breast Cancer Res Treat, 2015. **153**(1): p. 219-34.
123. Liu, C., et al., *Decrease of 5-hydroxymethylcytosine is associated with progression of hepatocellular carcinoma through downregulation of TET1*. PLoS One, 2013. **8**(5): p. e62828.
124. Yang, Q., et al., *Decreased 5-hydroxymethylcytosine (5-hmC) is an independent poor prognostic factor in gastric cancer patients*. J Biomed Nanotechnol, 2013. **9**(9): p. 1607-16.

125. Shi, X., et al., *Loss of 5-Hydroxymethylcytosine Is an Independent Unfavorable Prognostic Factor for Esophageal Squamous Cell Carcinoma*. PLoS One, 2016. **11**(4): p. e0153100.
126. Chen, K., et al., *Loss of 5-hydroxymethylcytosine is linked to gene body hypermethylation in kidney cancer*. Cell Res, 2016. **26**(1): p. 103-18.
127. Rozalski, R., et al., *The urinary excretion of epigenetically modified DNA as a marker of pediatric ALL status and chemotherapy response*. Sci Rep, 2021. **11**(1): p. 21345.
128. Rozalski, R., et al., *Urinary Measurement of Epigenetic DNA Modifications: A Non-Invasive Assessment of the Whole-Body Epigenetic Status in Healthy Subjects and Colorectal Cancer Patients*. ChemistryOpen, 2016. **5**(6): p. 550-553.
129. Liu, S., et al., *Quantitative assessment of Tet-induced oxidation products of 5-methylcytosine in cellular and tissue DNA*. Nucleic Acids Res, 2013. **41**(13): p. 6421-9.
130. Liu, X., et al., *Decreased 5-hydroxymethylcytosine levels are associated with TET2 mutation and unfavorable overall survival in myelodysplastic syndromes*. Leuk Lymphoma, 2013. **54**(11): p. 2466-73.
131. Magotra, M., et al., *Immunohistochemical loss of 5-hydroxymethylcytosine expression in acute myeloid leukaemia: relationship to somatic gene mutations affecting epigenetic pathways*. Histopathology, 2016. **69**(6): p. 1055-1065.
132. Konstandin, N., et al., *Genomic 5-hydroxymethylcytosine levels correlate with TET2 mutations and a distinct global gene expression pattern in secondary acute myeloid leukemia*. Leukemia, 2011. **25**(10): p. 1649-52.
133. Ahn, J.S., et al., *5-Hydroxymethylcytosine correlates with epigenetic regulatory mutations, but may not have prognostic value in predicting survival in normal karyotype acute myeloid leukemia*. Oncotarget, 2017. **8**(5): p. 8305-8314.
134. Scopim-Ribeiro, R., et al., *Ten-eleven-translocation 2 (TET2) is downregulated in myelodysplastic syndromes*. Eur J Haematol, 2015. **94**(5): p. 413-8.
135. Scopim-Ribeiro, R., et al., *Low Ten-eleven-translocation 2 (TET2) transcript level is independent of TET2 mutation in patients with myeloid neoplasms*. Diagn Pathol, 2016. **11**: p. 28.
136. Zhang, T.J., et al., *TET2 expression is a potential prognostic and predictive biomarker in cytogenetically normal acute myeloid leukemia*. J Cell Physiol, 2018. **233**(8): p. 5838-5846.

137. Huang, F., et al., *HDAC4 inhibition disrupts TET2 function in high-risk MDS and AML*. Aging (Albany NY), 2020. **12**(17): p. 16759-16774.
138. Dostalova Merkerova, M., et al., *Distinctive microRNA expression profiles in CD34+ bone marrow cells from patients with myelodysplastic syndrome*. Eur J Hum Genet, 2011. **19**(3): p. 313-9.
139. Song, S.J., et al., *The oncogenic microRNA miR-22 targets the TET2 tumor suppressor to promote hematopoietic stem cell self-renewal and transformation*. Cell Stem Cell, 2013. **13**(1): p. 87-101.
140. Cheng, J., et al., *An extensive network of TET2-targeting MicroRNAs regulates malignant hematopoiesis*. Cell Rep, 2013. **5**(2): p. 471-81.
141. Szwagierczak, A., et al., *Sensitive enzymatic quantification of 5-hydroxymethylcytosine in genomic DNA*. Nucleic Acids Res, 2010. **38**(19): p. e181.
142. Pfaffeneder, T., et al., *Tet oxidizes thymine to 5-hydroxymethyluracil in mouse embryonic stem cell DNA*. Nat Chem Biol, 2014. **10**(7): p. 574-81.
143. Loenarz, C. and C.J. Schofield, *Expanding chemical biology of 2-oxoglutarate oxygenases*. Nat Chem Biol, 2008. **4**(3): p. 152-6.
144. Iyer, L.M., et al., *Prediction of novel families of enzymes involved in oxidative and other complex modifications of bases in nucleic acids*. Cell Cycle, 2009. **8**(11): p. 1698-710.
145. Dawlaty, M.M., et al., *Loss of Tet enzymes compromises proper differentiation of embryonic stem cells*. Dev Cell, 2014. **29**(1): p. 102-11.
146. Li, Z., et al., *Deletion of Tet2 in mice leads to dysregulated hematopoietic stem cells and subsequent development of myeloid malignancies*. Blood, 2011. **118**(17): p. 4509-18.
147. Dawlaty, M.M., et al., *Combined deficiency of Tet1 and Tet2 causes epigenetic abnormalities but is compatible with postnatal development*. Dev Cell, 2013. **24**(3): p. 310-23.
148. Kang, J., et al., *Simultaneous deletion of the methylcytosine oxidases Tet1 and Tet3 increases transcriptome variability in early embryogenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015. **112**(31): p. E4236-45.
149. Cooke, M.S., et al., *DNA repair is responsible for the presence of oxidatively damaged DNA lesions in urine*. Mutat Res, 2005. **574**(1-2): p. 58-66.

150. Hu, C.W., et al., *Direct analysis of 5-methylcytosine and 5-methyl-2'-deoxycytidine in human urine by isotope dilution LC-MS/MS: correlations with N-methylated purines and oxidized DNA lesions*. Chem Res Toxicol, 2012. **25**(2): p. 462-70.
151. Xu, X., et al., *Thymine DNA glycosylase is a positive regulator of Wnt signaling in colorectal cancer*. J Biol Chem, 2014. **289**(13): p. 8881-90.
152. Mancuso, P., et al., *Thymine DNA glycosylase as a novel target for melanoma*. Oncogene, 2019. **38**(19): p. 3710-3728.
153. Wang, D., et al., *Active DNA demethylation promotes cell fate specification and the DNA damage response*. Science, 2022. **378**(6623): p. 983-989.
154. Haferlach, T., et al., *Landscape of genetic lesions in 944 patients with myelodysplastic syndromes*. Leukemia, 2014. **28**(2): p. 241-7.
155. Shen, L., et al., *DNA methylation predicts survival and response to therapy in patients with myelodysplastic syndromes*. J Clin Oncol, 2010. **28**(4): p. 605-13.
156. Schnittger, S., et al., *IDH1 mutations are detected in 6.6% of 1414 AML patients and are associated with intermediate risk karyotype and unfavorable prognosis in adults younger than 60 years and unmutated NPM1 status*. Blood, 2010. **116**(25): p. 5486-96.
157. Paschka, P., et al., *IDH1 and IDH2 mutations are frequent genetic alterations in acute myeloid leukemia and confer adverse prognosis in cytogenetically normal acute myeloid leukemia with NPM1 mutation without FLT3 internal tandem duplication*. J Clin Oncol, 2010. **28**(22): p. 3636-43.
158. Falini, B., et al., *IDH1-R132 changes vary according to NPM1 and other mutations status in AML*. Leukemia, 2019. **33**(4): p. 1043-1047.
159. Wang, J.H., et al., *Prognostic significance of 2-hydroxyglutarate levels in acute myeloid leukemia in China*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(42): p. 17017-22.
160. Thol, F., et al., *Prognostic impact of IDH2 mutations in cytogenetically normal acute myeloid leukemia*. Blood, 2010. **116**(4): p. 614-6.
161. Gross, S., et al., *Cancer-associated metabolite 2-hydroxyglutarate accumulates in acute myelogenous leukemia with isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations*. J Exp Med, 2010. **207**(2): p. 339-44.
162. Lin, T.L., et al., *Clonal leukemic evolution in myelodysplastic syndromes with TET2 and IDH1/2 mutations*. Haematologica, 2014. **99**(1): p. 28-36.

163. Smith, A.E., et al., *Next-generation sequencing of the TET2 gene in 355 MDS and CMML patients reveals low-abundance mutant clones with early origins, but indicates no definite prognostic value.* Blood, 2010. **116**(19): p. 3923-32.
164. Patnaik, M.M., et al., *Differential prognostic effect of IDH1 versus IDH2 mutations in myelodysplastic syndromes: a Mayo Clinic study of 277 patients.* Leukemia, 2012. **26**(1): p. 101-5.
165. Thol, F., et al., *IDH1 mutations in patients with myelodysplastic syndromes are associated with an unfavorable prognosis.* Haematologica, 2010. **95**(10): p. 1668-74.
166. Jin, J., et al., *Prognostic value of isocitrate dehydrogenase mutations in myelodysplastic syndromes: a retrospective cohort study and meta-analysis.* PLoS One, 2014. **9**(6): p. e100206.
167. Lee, E.J., et al., *Analyzing the cancer methylome through targeted bisulfite sequencing.* Cancer Lett, 2013. **340**(2): p. 171-8.
168. Han, D., et al., *A Highly Sensitive and Robust Method for Genome-wide 5hmC Profiling of Rare Cell Populations.* Mol Cell, 2016. **63**(4): p. 711-719.
169. Jiang, H., et al., *DNA methylation markers in the diagnosis and prognosis of common leukemias.* Signal Transduct Target Ther, 2020. **5**(1): p. 3.
170. Xu, R.H., et al., *Circulating tumour DNA methylation markers for diagnosis and prognosis of hepatocellular carcinoma.* Nat Mater, 2017. **16**(11): p. 1155-1161.
171. Diaz-Lagares, A., et al., *A Novel Epigenetic Signature for Early Diagnosis in Lung Cancer.* Clin Cancer Res, 2016. **22**(13): p. 3361-71.
172. Sandoval, J., et al., *A prognostic DNA methylation signature for stage I non-small-cell lung cancer.* J Clin Oncol, 2013. **31**(32): p. 4140-7.
173. Gai, W., et al., *Liver- and Colon-Specific DNA Methylation Markers in Plasma for Investigation of Colorectal Cancers with or without Liver Metastases.* Clin Chem, 2018. **64**(8): p. 1239-1249.
174. Shao, J., et al., *Cell-free DNA 5-hydroxymethylcytosine is an emerging marker of acute myeloid leukemia.* Sci Rep, 2022. **12**(1): p. 12410.
175. Wilkins, B.S., *Pitfalls in bone marrow pathology: avoiding errors in bone marrow trephine biopsy diagnosis.* J Clin Pathol, 2011. **64**(5): p. 380-6.

10. Załączniki

10.1 Wykaz stosowanych skrótów

2D-UPLC-MS/MS - ultrasprawną chromatografię cieczową z tandemową detekcją mas

2HG - 2-hydroksyglutaran

2OG - 2-oksyglutaran, alfa-ketoglutaran

3+7 - chemioterapia skojarzona daunorubicyna + cytarabina

5' UTR - rejony 5' niepodlegające translacji, *ang. 5' untranslated regions*

5-azaC - 5-azacytydyna

5-caC/5-caCyt - 5-karboksycytozyna

5-cadC/5-cadCyt - 5-karboksydeoksycytozyna

5-fC/5-fCyt - 5-formylocytozyna

5-fdC/5-fdCyt - 5-formylodeoksycytozyna

5-hmC/5-hmCyt - 5-hydroksymetylocytozyna

5-hmdC/5-hmdCyt - 5-hydroksymetylodeoksycytozyna

5-hmdU/5-hmdUra - 5-hydroksymetylodeoksyuracyl

5-hmUra/5-hmU - 5-hydroksymetylouracyl

5-mC/5-mCyt - 5-metylocytozyna

5-mdC/5-mdCyt - 5-metylodeoksycytozyna

AID - gen kodujący deaminazę cytozyny

ALL - ostra białaczka limfoblastyczna, *ang. acute lymphoblastic leukemia*

alloHSCT - przeszczep allogeniczny komórek macierzystych, *ang. allogeneic hematopoietic stem cell transplant*

AML – ostra białaczka szpikowa, *ang. acute myeloid leukemia*

AML-MRC – ostra białaczka szpikowa ze zmianami zależnymi od mielodysplazji, *ang. myelodysplasia related changes AML*

APL - ostra białaczka promielocytowa, *ang. acute promyelocytic leukemia*

APOBEC - rodzina białek odpowiedzialnych za deaminację cytydyny

Ara-C - arabinozyd cytozyny, cytarabina

Ara-CTP - trójfosforan arabinozydu cytozyny

ASXL1 – gen kodujący białko *ASXL1*, *ang. additional sex comb like 1*

AUC - obszar pod krzywą, *ang. area under curve*

autoHSCT - przeszczep autologiczny komórek macierzystych, *ang. autologous hematopoietic stem cell transplant*

BAX - białko proapoptotyczne BAX

bcl2 - grupa białek antyapoptotycznych

BCOR – gen kodujący korepresor białka BCL6 *ang. BCL6 Corepressor*

BCR::ABL1 – Gen fuzyjny powstały w wyniku translokacji t(9;22) i kodujący kinazę tyrozynową

BER - naprawa przez wycinanie zasady, *ang. Base Excision Repair*

BIM - białko proapoptotyczne BIM

BSC - najlepsza terapia wspomagająca, *ang. Best Supportive Care*

CBFB::MYH11 – gen fuzyjny powstały w wyniku inwersji chromosomu 16.

cDNA - komplementarny DNA, *ang. complementary DNA*

cf-DNA - DNA krążący, *ang. cell-free DNA*

CMML - przewlekła białaczka mielomonocytoza, *ang. chronic myelomonocytic leukemia*

CN-AML - AML z prawidłowym kariotypem, *ang. cytogenetically-normal AML*

CpG - dinukleotyd cytozyna-guanina

CPX-351 - liposomalny koniugat daunorubicyny z cytarabiną

CR - remisja całkowita, *ang. complete remission*

DDX41 – gen kodujący enzym – helikazę RNA DDX41

DEK::NUP214 – gen fuzyjny powstały w wyniku translokacji t(6;9)

DNA - kwas deoksyrybonukleinowy, *ang. deoxyribonucleic acid*

DNMT3A – gen kodujący metylotransferazę DNMT3A

EFS - czas wolny od zdarzeń, *ang. event-free survival*

ELN - Europejska Sieć Białaczek, *ang. European LeukemiaNET*

EMA - Europejska Agencja Leków, *ang. European Medicines Agency*

EPO - erytropoetyna, *ang. erythropoietin*

ESMO - Europejskie Towarzystwo Onkologii Klinicznej, *ang. European Society for Medical Oncology*

EZH2 – gen kodujący metylotransferazę histonową, *ang. enhancer of zeste homolog 2*

FDA - Agencja Żywności i Leków, *ang. Food and Drug Administration*

FISH – fluorescencyjna hydrydyzacja in situ, *ang. fluorescence in situ hybridization*

FLT3 – gen kodujący kinazę tyrozynową FLT3, *ang. fms-like tyrosine kinase 3*

GATA2 – czynnik transkrypcyjny odpowiedzialny za regulację genów

G-CSF - czynnik wzrostu kolonii granulocytarnej, *ang. granulocyte colony stimulating factor*

HDAC - deacetylaza histonowa, *ang. histone deacetylase*

HeLa - linia komórkowa wywodząca się z komórek raka szyjki macicy (od nazwiska Henrietty Lacks)

HiDAC - wysokodawkowana cytarabina, *ang. high dose Ara-C*

HSC - komórka hematopoetyczna pnia, *ang. hematopoietic stem cell*

IARC – Międzynarodowa Agencja Badań nad Rakiem, *ang. International Agency for Research on Cancer*

ICC – klasyfikacja nowotworów ICC, *ang. International Consensus Classification*

IDH1 – gen kodujący dehydrogenazę izocytrynianową 1.

IDH2 - gen kodujący dehydrogenazę izocytrynianową 2. (mitochondrialną)

IPSS-R - zrewidowany międzynarodowy system prognostyczny, *ang. Revised International Prognostic Scoring System*

KAT6A::CREBBP – gen fuzyjny wywołany translokacją t(8;16)

KMT2A – gen kodujący metylotransferazę histonową

KON - grupa kontrolna

LD-AraC - niskodawkowa cytarabina, *ang. Low Dose Ara-C*

LOH - utrata heterozygotyczności, *ang. loss of heterozygosity*

LSK - wczesne formy krwiotwórczych komórek macierzystych w modelach mysich

MBD4 - białko wiążące się z zmetylowanym dinukleotydem CpG, *ang. methyl-CpG-binding domain protein 4*

MDS – zespół mielodysplastyczny, *ang. myelodysplastic syndrome*

MDS RA - MDS z oporną niedokrwistością, *ang. MDS refractory anemia*

MDS RARS - MDS z niedokrwistością z obrączkowanymi syderoblastami, *ang. MDS ringed sideroblasts*

MDS RCMD - MDS z oporną cytopenią z wieloliniową dysplazją, *ang. MDS refractory cytopenia with multilineage dysplasia*

MDS-EB - zespół mielodysplastyczny z nadmiarem blastów, *ang. MDS - Excess Blasts*

MDS-IB - zespół mielodysplastyczny ze zwiększonym odsetkiem blastów, *ang. MDS Increased Blasts*

MDS-U - MDS niesklasyfikowany, *ang. MDS unclassified*

MECOM(EVI1) – gen kodujący białko MECOM, *ang. MDS1 and EVI1 complex locus protein*
EVI1

miRNA - mikroRNA

MLLT3::KMT2A – gen fuzyjny powstały w wyniku translokacji t(9;11)

mOS - mediana czasu całkowitego przeżycia, *ang. median overall survival*

MPN – zespół mieloproliferacyjny, *ang. myeloproliferative neoplasm*

MRD - mierzalna choroba resztkowa, *ang. measurable residual disease*

mRNA - matrycowy RNA, *ang. messenger RNA*

mut*TET2* - forma zmutowana genu *TET2*

NGS – sekwencjonowanie następnej generacji, *ang. next generation sequencing*

NOS - inaczej niesklasyfikowany, *ang. not otherwise specified*

NPM1 – gen kodujący nukleofosminę 1.

OS - przeżycie całkowite, *ang. overall survival*

p – znamienność statystyczna

PCR – reakcja łańcuchowa polimerazy, *ang. polymerase chain reaction*

PML::RARA – gen fuzyjny powstały w wyniku translokacji t(15;17)

RNA - kwas rybonukleinowy, *ang. ribonucleic acid*

RT-qPCR - reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym, *ang. real-time quantitative polymerase chain reaction*

RUNX1 – gen kodujący czynnik transkrypcyjny regulujący różnicowanie komórki macierzystej, *ang. Runt-related transcription factor 1*

RUNX1::RUNX1T1 – gen fuzyjny powstały w wyniku translokacji t(8;21)

sAML - AML wtórny do zespołów mieloproliferacyjnych, *ang. secondary AML*

SF3B1 – gen kodujący białko SF3B1, *ang. Splicing factor 3B subunit 1*

shRNA - RNA o krótkiej spince do włosów, *ang. small-hairpin RNA*

SMUG1 - glikozylaza usuwająca uracyl z pojedynczej nici DNA, *ang. single-strand selective monofunctional uracil DNA glycosylase*

SRSF2 – gen kodujący białko odpowiedzialne za splicing, *ang. Splicing factor, arginine/serine-rich 2*

STAG2 – gen kodujący białko STAG2, *ang. Cohesin subunit SA-2*

tAML – AML zależny od terapii, *ang. therapy related AML*

TBE - bufor składający się z tris, kwasu borowego i EDTA

TDG – gen kodujący enzym glikozylazę TDG, *ang. Thymine-DNA Glycosylase*

TET1 – gen kodujący białko TET1, *ang. ten eleven translocation protein 1*

TET2 – gen kodujący białko TET2, *ang. ten eleven translocation protein 2*

TET3 – gen kodujący białko TET3, *ang. ten eleven translocation protein 3*

TP53 – gen kodujący białko p53 – czynnik transkrypcyjny pełniący funkcję supresora

TSS - rejony flankujące, *ang. transcription start sites*

U2AF1 – gen kodujący białko odpowiedzialne za splicing, *ang. Splicing factor U2AF 35 kDa subunit*

UMK - Uniwersytet Mikołaja Kopernika

UNG - glikozylaza uracyl-DNA

VAF - częstość alleli, *ang. Variant Allele Frequency*

WHO – Światowa Organizacja Zdrowia, *ang. World Health Organization*

Wnt - szlak sygnalizacyjny Wnt, *ang. Wnt signaling pathway*

wt*TET2* - forma *wild-type* genu *TET2*

ZRSR2 – gen kodujący białko odpowiedzialne za splicing, *ang. U2 small nuclear ribonucleoprotein auxiliary factor 35 kDa subunit-related protein 2*

10.2 Zgoda Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Mikołaja Kopernika przy Collegium Medicum w Bydgoszczy

Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
Collegium Medicum im L. Rydygiera w Bydgoszczy

KOMISJA BIOETYCZNA

Ul. M. Skłodowskiej-Curie 9, 85-094 Bydgoszcz, tel.(052) 585-35-63, fax.(052) 585-38-11

KB 404/2016

Bydgoszcz, 24.05.2016r.

Działając na podstawie art.29 Ustawy z dnia 5 grudnia 1996 roku o zawodzie lekarza (Dz.U. z 1997 r. Nr 28 poz. 152 (wraz z późniejszymi zmianami), zarządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999 r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych (Dz.U.Nr 47 poz.480) oraz Zarządzeniem Nr 21 Rektora UMK z dnia 4 marca 2009 r. z późn. zm. w sprawie powołania oraz zasad działania Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu przy Collegium Medicum im Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy oraz zgodnie z zasadami zawartymi w ICH – GCP

Komisja Bioetyczna przy UMK w Toruniu, Collegium Medicum w Bydgoszczy

(skład podano w załączeniu), na posiedzeniu w dniu **24.05.2016r.** przeanalizowała wniosek, który złożyli kierownicy badania:

dr hab. n. med. Daniel Gackowski

Katedra Biochemii Klinicznej

Pracownia Metabolomiki i Markerów Nowotworowych

Collegium Medicum w Bydgoszczy

prof. dr hab. med. Jan Styczyński

Pracownia Onkologii Klinicznej i Eksperymentalnej

Klinika Pediatrii, Hematologii i Onkologii

Szpital Uniwersytecki nr 1 im. dr. Antoniego Jurasza

dr hab. n. med. Jarosław Czyż

Klinika Hematologii

Szpital Uniwersytecki nr 2 im. dr Jana Bizuela

dr n. med. Grzegorz Charliński

Oddział Hematologii

Specjalistyczny Szpital Miejski

im. M. Kopernika w Toruniu

z zespołem w składzie:

- prof. dr hab. Ryszard Oliński, prof. dr hab. Jan Styczyński, dr hab. n. med. Daniel Gackowski, dr hab. n. med. Jarosław Czyż, dr hab. Sylwia Kołtan, dr hab. n. med. Marek Foksiński, dr hab. n. med. Rafał Różalski, dr hab. n. med. Agnieszka Siomek, dr n. med. Grzegorz Charliński, dr n. med. Krzysztof Czyżewski, dr n. med. Robert Dębski, dr n. med. Elżbieta Grześk, dr n. med. Aldona Katarzyna Jankowska, dr n. med. Anna Krenska, dr n. med. Monika Pogorzała, Agnieszka Jateczak-Gaca, dr n. med. Monika Richert-Przygońska, dr n. med. Andrzej Kołtan, dr n. med. Barbara Tejza, lek. Natalia Bartoszewicz, lek. Anna Dąbrowska, lek. Ewa Demidowicz, dr n.med. Grażyna Gadomska, dr n. med. Lidia Gackowska, dr n.med. Izabela Kubiszewska, dr n. med. Jolanta Guz, dr n. med. Tomasz Dziaman, dr n. med. Anna Szpila, dr n. med. Ewelina Zarakowska, dr n. med. Grażyna Gadomska, dr n. med. Anna Jachalska, lek. Marcin Kruszewski, lek. Marcin Ksieniewicz, lek. Martyna Sysakiewicz, lek Justyna Kalisz, lek. Aleksandra Kostyra,

lek. Dominik Chraniuk, lek. Justyna Gajkowska Kulik, lek. Maria Czyżewska, lek. Marcin Rymko, lek. Weronika Piszczek, lek. Magdalena Szczepańska, lek. Dominika Wiśniewska-Organek, lek. Elżbieta Wyrowińska, mgr Beata Sikorska, mgr Martyna Modrzejewska, mgr Marta Starczak, mgr Kinga Gutowska, mgr Maciej Gawroński, uczestnicy studiów doktoranckich, magistranci, stypendyści projektu,

w sprawie badania:

„Produkty szlaków demetylacji i deaminacji DNA jako nowe biomarkery rozwoju i predyktory efektów leczenia ostrych białaczek.”

Po zapoznaniu się ze złożonym wnioskiem i w wyniku przeprowadzonej dyskusji oraz głosowania Komisja podjęła

Uchwałę o pozytywnym zaopiniowaniu wniosku

w sprawie przeprowadzenia badań, w zakresie określonym we wniosku pod warunkiem:

- poinformowania uczestników badania w tym również uczestników stanowiących grupę kontrolną, o celu oraz zakresie badań i uzyskania od nich, lub w przypadku osób małoletnich, ich rodziców/opiekunów prawnych osobnej, pisemnej, świadomej zgody na udział w badaniu, zgodnie z obowiązującymi przepisami, datowanej najpóźniej na moment rozpoczęcia badania a nie wcześniej niż data uzyskania z Komisji Bioetycznej zgody na takie badanie;
- UWAGA! W przypadku małoletnich, którzy ukończyli 16 lat życia oraz młodszych małoletnich, którzy są w stanie z rozeznaniem wypowiedzieć się, co do swojego udziału w badaniu obowiązuje również konieczność uzyskania zgody od tych małoletnich;
- zapewnienia, że osoby uczestniczące w eksperymencie badawczym nie są ubezwłasnowolnione, nie są żołnierzami służby zasadniczej, nie są osobami pozbawionymi wolności, nie pozostają w zależności służbowej, dydaktycznej lub innej z prowadzącym badanie;
- UWAGA! Uczestnicy badania stanowiący grupę kontrolną nie mogą być rekrutowani spośród studentów lub pracowników Collegium Medicum w Bydgoszczy.
- zachowania tajemnicy wszystkich danych, w tym danych osobowych pacjentów, umożliwiających ich identyfikację w ewentualnych publikacjach;
- sugerujemy uzyskanie podpisu uczestnika badania pod informacją o badaniu, lub sporządzenie formularza informacji i świadomej zgody na udział w badaniu na jednej kartce.

Jednocześnie informujemy, iż „Zgoda na udział w badaniu” winna zawierać m.in.: imię i nazwisko badanej osoby; Nr historii choroby pacjenta (L.ks.gł. Oddziału/Poradni) oraz datę i podpis badanej osoby, a także klauzule, że uczestnik badania wyraża zgodę na przetwarzanie danych osobowych dotyczących realizacji tematu badawczego, z wyjątkiem publikacji danych osobowych.

Kierownik badania zobowiązany jest do przechowywania wszystkich dokumentów dotyczących badania przez okres dwudziestu lat.

Zgoda obowiązuje od daty posiedzenia (24.05.2016 r.) do końca 2021 r.

Wydana opinia dotyczy tylko rozpatrywanego wniosku z uwzględnieniem przedstawionego projektu; każda zmiana i modyfikacja wymaga uzyskania odrębnej opinii. Wnioskodawca zobowiązany jest do informowania o wszelkich poprawkach, które mogłyby mieć wpływ na opinię Komisji oraz poinformowania o zakończeniu badania.

Od niniejszej uchwały podmiot zamierzający przeprowadzić eksperyment medyczny, kierownik zakładu opieki zdrowotnej, w której eksperyment medyczny ma być przeprowadzony, mogą wnieść odwołanie do

Odwoławczej Komisji Bioetycznej przy Ministrze Zdrowia, za pośrednictwem Komisji Bioetycznej przy Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy, w terminie 14 dni od daty otrzymania niniejszej Uchwały.

Prof. dr hab. med. Karol Śliwka

Przewodniczący Komisji Bioetycznej

Otrzymują:

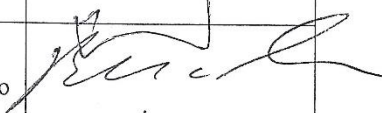
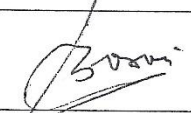

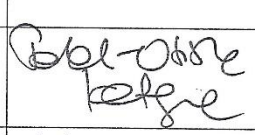
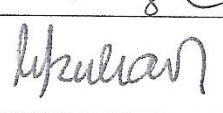
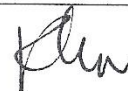
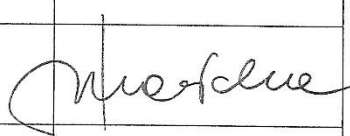
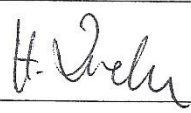
~~dr hab. n. med. Daniel Gackowski
Katedra Biochemii Klinicznej
Pracownia Metaboliki i Markerów Nowotworowych
Collegium Medicum w Bydgoszczy~~

~~prof. dr hab. med. Jan Styczyński
Pracownia Onkologii Klinicznej i Eksperymentalnej
Klinika Pediatrii, Hematologii i Onkologii
Szpital Uniwersytecki nr 1 im. dr. Antoniego Jurasza~~

~~dr hab. n. med. Jarosław Czyż
Klinika Hematologii
Szpital Uniwersytecki nr 2 im. dr. Jana Biziela~~

~~dr n. med. Grzegorz Charliński
Oddział Hematologii
Specjalistyczny Szpital Miejski
im. M. Kopernika w Toruniu
87-100 Toruń, ul. Batorego 17/19~~

Lista obecności
na posiedzeniu Komisji Bioetycznej
w dniu 24.05.2016 r.

Lp.	Imię i nazwisko	Funkcja	Podpis
1.	Prof. dr hab. med. Karol Śliwka	przewodniczący	
2.	Prof. dr hab. Adam Buciński	z-ca przewodniczącego	
3.	Prof. dr hab. med. Anna Balcar-Boroń		
4.	Prof. dr hab. med. Mieczysława Czerwionka-Szaflarska		
5.	Prof. dr hab. med. Marek Grabiec		
6.	Prof. dr hab. med. Zbigniew Włodarczyk		
7.	Dr hab. n. med. Katarzyna Pawlak-Osińska, prof. UMK		
8.	Ks. dr hab. Wojciech Szukalski, prof. UAM		
9.	Dr n. med. Radosława Staszak-Kowalska		
10.	Dr hab. n med. Maria Kłopocka		
11.	Mgr prawa Patrycja Brzezicka		
12.	Mgr prawa Joanna Połetek-Żygas		
13.	Mgr piel. Hanna Ziemniarska		

Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
Collegium Medicum im L. Rydygiera w Bydgoszczy

KOMISJA BIOETYCZNA

Ul. M. Skłodowskiej-Curie 9, 85-094 Bydgoszcz, tel.(052) 585-35-63, fax.(052) 585-38-11

KB 404/2016

Bydgoszcz, 26.02.2019 r.

Działając na podstawie art.29 Ustawy z dnia 5 grudnia 1996 roku o zawodzie lekarza (Dz. U. z 1997 r. Nr 28 poz. 152 (wraz z późniejszymi zmianami), zarządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999 r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych (Dz. U. Nr 47 poz.480) oraz Zarządzeniem Nr 21 Rektora UMK z dnia 4 marca 2009 r. z późn. zm. w sprawie powołania oraz zasad działania Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu przy Collegium Medicum im Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy oraz zgodnie z zasadami zawartymi w ICH – GCP

Komisja Bioetyczna przy UMK w Toruniu, Collegium Medicum w Bydgoszczy

(której skład podano w załączeniu) na posiedzeniu w dniu **26.02.2019 r.** przeanalizowała prośbę o wyrażenie zgody na:

- rozszerzenie zespołu badawczego o nast. osoby:
mgr inż. Justyna Szpotan, mgr Anna Łabejszo, mgr Aleksandra Skalska, Joanna Wandtke, Aleksandra Wasilów, lek. Adriana Czyż, lek. Łukasz Szukalski,

którą złożył:

dr hab. n. med. Daniel Gackowski
Katedra Biochemii Klinicznej
Pracownia Metabolomiki i Markerów Nowotworowych
Collegium Medicum w Bydgoszczy

w sprawie badania:

„Produkty szlaków demetylacji i deaminacji DNA jako nowe biomarkery rozwoju i predyktory efektów leczenia ostrych białaczek.”

Po zapoznaniu się ze złożonym dokumentem i w wyniku przeprowadzonej dyskusji oraz głosowania jawnego Komisja przyjęła do wiadomości podane informacje i wyraża zgodę na powyższe pod warunkami określonymi w uchwale Komisji podjętej w dniu 24.05.2016 r.

Zgoda na kontynuowanie przedmiotowego badania obowiązuje do końca 2021 roku.

Prof. dr hab. med. Karol Śliwka

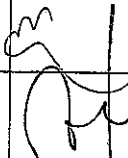
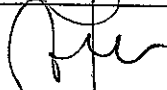

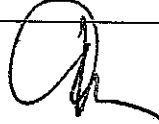


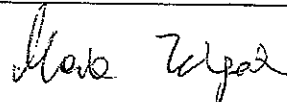


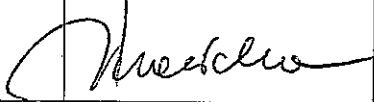
Przewodniczący Komisji Bioetycznej



Otrzymuje:

dr hab. n. med. Daniel Gackowski
Katedra Biochemii Klinicznej
Pracownia Metabolomiki i Markerów Nowotworowych
Collegium Medicum w Bydgoszczy

Lista obecności
na posiedzeniu Komisji Bioetycznej
w dniu 26.02.2019 r.

Lp.	Imię i nazwisko	Funkcja	Podpis
1.	Prof. dr hab. med. Karol Śliwka	Przewodniczący	
2.	Mgr prawa Joanna Połetek-Żygas	Z-ca przewodniczącego	
3.	Prof. dr hab. med. Mieczysława Czerwionka-Szaflarska		
4.	Prof. dr hab. med. Anna Balcar-Boroń		
5.	Prof. dr hab. med. Marek Grabiec		
6.	Prof. dr hab. med. Zbigniew Włodarczyk		
7.	Dr hab. n. med. Katarzyna Pawlak-Osińska, prof. UMK		
8.	Dr hab. n. med. Maria Kłopotcka		
9.	Ks. dr hab. Wojciech Szukalski, prof. UAM		
10.	Dr n. med. Radosława Staszak-Kowalska		
11.	Mgr prawa Patrycja Brzezicka		
12.	Mgr farm. Aleksandra Adamczyk		
13.	Mgr Lidia Iwińska-Tarczykowska		