

DNA komórek wielu nowotworów (w tym białaczek) charakteryzuje się globalną hipometylacją DNA. Sugeruje to, że hipometylacja DNA odpowiedzialna jest za niestabilność genomu i transformację nowotworową. Pomimo wielu doniesień o udziale aktywnej demetylacji DNA w rozwoju ostrych białaczek do tej pory nie znalazły one zastosowania w praktyce klinicznej. Z tego powodu postanowiliśmy odpowiedzieć na pytania:

- Czy produkty procesów epigenetycznych, takich jak aktywna demetylacja i deaminacja DNA, mierzone w DNA komórek krwi obwodowej, osoczu lub moczu mogą w przyszłości stać się biomarkerami rozwoju ostrych białaczek, które pozwolą na przewidywanie i monitorowanie przebiegu leczenia tych chorób?
- Czy u osób cierpiących na ostre białaczki i u takich, które przeszły chemioterapię można śledzić zaburzenia w funkcjonowaniu szlaków metabolicznych, zaangażowanych w procesy epigenetyczne?
- Czy leczenie czynnikami hipometylującymi skutkuje zmianami molekularnymi w szlakach metabolicznych zaangażowanych w powyższe procesy epigenetyczne?
- I ostatecznie, czy mutacje w obrębie genów kodujących poszczególne elementy badanych szlaków metabolicznych, przekładają się na zmiany w stężeniu ich produktów?

Aby odpowiedzieć na powyższe wątpliwości zamierzamy zmierzyć i porównać stężenia produktów szlaków metabolicznych zaangażowanych w procesy epigenetyczne, takie jak deaminacja i aktywna demetylacja, u pacjentów cierpiących na ostrą białaczkę limfoblastyczną (ALL), ostrą białaczkę szpikową (AML), a także u pacjentów z zespołem mielodysplastycznym (MDS), u pacjentów z AML rozwijającą się na bazie MDS, jak również w grupie kontrolnej. Pomiarów tych dokonamy w dwóch punktach czasowych, przed rozpoczęciem leczenia i w okresie remisji choroby. Uzyskane pomiary zestawimy z wynikami analizy ekspresji genów zaangażowanych w badane procesy, jak również ze statusem ich mutacji.

U pacjentów, w których krwi obwodowej będzie obecny znaczny odsetek komórek klonu białaczkowego, podejmiemy próbę ich wysortowania, a następnie oznaczenia w ich materiale genetycznym demetylowanych i deaminowanych zasad azotowych. Co więcej, przy użyciu metod skoringowych i drzew klasyfikacyjnych podejmiemy próbę wytypowania biomarkera, lub też kombinacji biomarkerów, która będzie cechować się jak najwyższą wartością diagnostyczną i predykcyjną, a w przyszłości pozwoli na skonstruowanie prostego testu diagnostycznego, który na stałe wszedłby do rutynowej praktyki klinicznej.

W celu oznaczenia wyżej wymienionych modyfikacji w DNA i w moczu posłużymy się wysoce zaawansowaną techniką badawczą: dwuwymiarową ultrasprawną chromatografią cieczą z tandemową spektrometrią mas (2D-UPLC/MS/MS), natomiast w przypadku oznaczeń wykonywanych w osoczu posłużymy się ultrasprawną chromatografią cieczą z detekcją UV i tandemową spektrometrią mas. W przypadku analizy ekspresji genów zaangażowanych w procesy epigenetyczne, zamierzamy posłużyć się techniką qRT-PCR przy użyciu LightCycler 480 - jednego z najbardziej zaawansowanych urządzeń tego typu dostępnych na rynku. Przy jego pomocy dokonamy również oceny obecności mutacji punktowych, wykorzystując nowatorską technikę HRM-PCR.

Proponowane badania pozwolą na pełniejsze i bardziej kompleksowe zrozumienie procesów epigenetycznych, zwłaszcza niedawno poznanych procesów aktywnej demetylacji DNA. Jest to szczególnie ważne w kontekście patogenezy ostrych białaczek i ich leczenia, gdyż zaburzenia w epigenetycznej regulacji aktywności genów warunkujących proliferację i różnicowanie komórek leżą u podstaw rozwoju tych jednostek chorobowych. Liczymy na to, iż uzyskane przez nas wyniki potwierdzą hipotezę, że globalne oznaczanie modyfikacji epigenetycznych może stanowić użyteczne narzędzie diagnostyczne, które pozwoliłoby prognozować i monitorować przebieg procesu leczenia choroby, jak również oszacować ryzyko wystąpienia jej nawrotu. Wyniki te mogą także stanowić podstawy do opracowania tanich, prostych testów diagnostycznych, badających stężenia wytypowanych w toku badań biomarkerów o najwyższej wartości prognostycznej, które docelowo mogłyby mieć zastosowanie w rutynowej praktyce klinicznej. Co więcej, niniejsze badania mogą stanowić przyczynek do wprowadzenia ściśle spersonalizowanych strategii terapeutycznych, które opierałyby się na zastosowaniu chemioterapeutyków najskuteczniejszych w leczeniu danego pacjenta.