

Περιεχόμενα

- HSP70: A POTENTIAL THERAPEUTIC BIOMARKER FOR PSORIASIS
- ΕΠΙΠΕΔΑ ΜΑΛΟΝΙΚΗΣ ΔΙΑΛΔΕΥΔΗΣ ΣΤΟΝ ΟΡΟ ΑΙΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΣΤΟ ΕΓΚΕΦΑΛΟΝΩΤΙΑΙΟ ΥΓΡΟ: ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΑΝΑΛΟΓΑ ΜΕ ΤΟ ΦΥΛΟ ΣΕ ΑΤΟΜΑ ΜΕ ΗΠΙΑ ΝΟΗΤΙΚΗ ΔΙΑΤΑΡΑΧΗ
- ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗ ΚΑΙ ΚΛΙΝΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ m6A RNA ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΩΝ ΩΟΘΗΚΩΝ

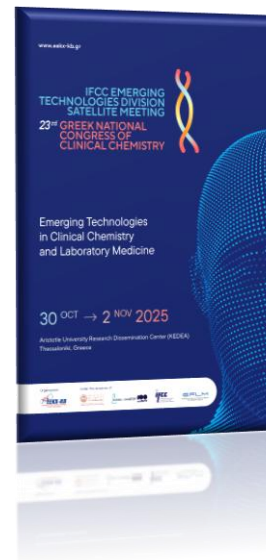
Συντακτική Επιτροπή

ΑΝΔΡ. ΓΡΗΓΟΡΑΤΟΥ

ΕΥΗ ΚΩΝΣΤΑ

ΑΓΓΕΛ. ΜΕΛΠΙΔΟΥ

ΜΑΡΙΛ. ΣΤΑΜΟΥΛΗ



ΕΝΗΜΕΡΩΤΙΚΟ ΔΕΛΤΙΟ 54 – ΙΟΥΝΙΟΣ 2025

Αγαπητοί συνάδελφοι,

Μέσα σε ένα συνεχώς μεταβαλλόμενο και τεχνολογικά εξελισσόμενο επιστημονικό πεδίο, όπως αυτό της Κλινικής Χημείας-Κλινικής Βιοχημείας, αναδύεται επιτακτικά η ανάγκη της συνεχούς ενημέρωσης σχετικά με την έρευνα και τις επιστημονικές εξελίξεις. Σε αυτό το τεύχος του Ενημερωτικού Δελτίου παρουσιάζονται αξιόλογες ερευνητικές εργασίες που αφορούν στην ανεπάρκεια της Hsp70 στην ψωρίαση, τα επίπεδα της μαλονικής διαλδεΰδης σε ασθενείς με Ήπια Νοητική Διαταραχή και την m6A RNA μεθυλίωση στον καρκίνο των ωοθηκών.

Το Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Κλινικής Χημείας-Κλινικής Βιοχημείας θα διεξαχθεί στη Θεσσαλονίκη από τις 30 Οκτωβρίου ως τις 2 Νοεμβρίου 2025, υπό την αιγίδα της IFCC, της EFLM, της Ιατρικής Σχολής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης και του Τμήματος Χημείας του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης. Περιμένουμε τις εργασίες σας, τις οποίες μπορείτε να υποβάλετε ηλεκτρονικά μέχρι τις 15 Σεπτεμβρίου.

Τέλος, θα ήθελα να ευχηθώ σε όλους καλό καλοκαίρι, με ξεκούραση, ανανέωση και δημιουργικές στιγμές κατά τη διάρκεια των διακοπών.

Εκ μέρους της Συντακτικής Επιτροπής

Μαριλένα Σταμούλη

HSP70: A POTENTIAL THERAPEUTIC BIOMARKER FOR PSORIASIS

ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ ΚΑΛΑΝΤΙΔΟΥ, ΜΑΡΙΑ ΚΩΣΤΑΚΟΥ, ΜΙΧΑΗΛ ΔΕΙΚΤΑΚΗΣ, ΜΑΡΙΑ ΒΕΝΥΧΑΚΗ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ, ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ, ΗΡΑΚΛΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

Εισαγωγή

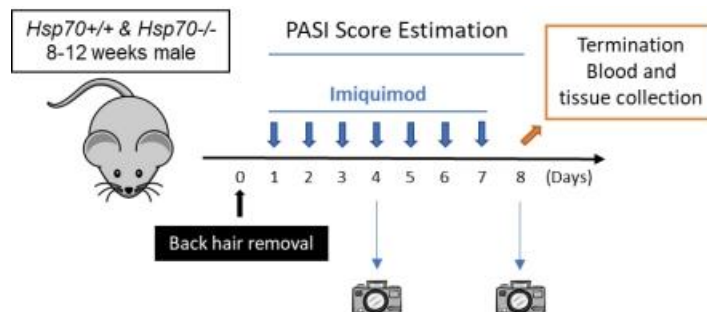
Η ψωρίαση είναι μια χρόνια συστηματική και σύνθετη ασθένεια που επηρεάζει περίπου το 1-2% του Καυκάσιου πληθυσμού [1,2,3]. Ιστολογικές διαφορές, όπως η πάχυνση της επιδερμίδας, η υπερκεράτωση και η ακάνθωση, καθώς και η διήθηση από κύτταρα του ανοσοποιητικού παρατηρούνται συχνά στο ψωριασικό δέρμα [3]. Υπάρχουν διάφορα είδη ψωρίασης: η ψωρίαση τύπου κατά πλάκας, που είναι η πιο συχνή μορφή της, η σταγονοειδής, η αντίστροφη ψωρίαση, η φλυκταινώδης και η ερυθροδερμική [1]. Βασικοί κυτταρικοί τύποι που εμπλέκονται στην ψωρίαση αποτελούν τα κερατινοκύτταρα, τα T κύτταρα, τα δενδριτικά κύτταρα, τα ουδετερόφιλα, τα μονοκύτταρα, τα μαστοκύτταρα, τα μακροφάγα, τα λεμφοκύτταρα και τα κύτταρα φυσικοί φονείς [4, 5]. Παράγοντες που παίζουν κύριο ρόλο στην επικοινωνία των κερατινοκυττάρων με τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος είναι οι κυτοκίνες, όπως οι IL-23 και IL-17A, οι οποίες είναι από τις πιο σημαντικές, καθώς και οι TNF-α, IL-6, IL-22, IFN-γ [2, 3]. Παρά την συχνότητα της, τα ακριβή αίτια της ασθένειας παραμένουν άγνωστα [3]. Οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ (HSPs) παίζουν σημαντικό ρόλο στην σωστή λειτουργία του κυττάρου, τόσο σε φυσιολογικές συνθήκες όσο και σε ανοσολογικές απαντήσεις και στην φλεγμονή [6]. Η ταξινόμηση τους γίνεται με βάση το μοριακό τους βάρος και διακρίνονται σε 7 κατηγορίες: HSP110, HSP90, HSP70, HSP60, HSP40 και στις μικρές HSPs, μοριακού βάρους 13-15 kDa [6]. Οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ 70 kD, έχουν ισχυρές ανοσοτροποποιητικές δράσεις, ενισχύοντας ή καταστέλλοντας την ανοσολογική απάντηση σύμφωνα με την κατάσταση στην οποία βρίσκονται τα κύτταρα [7]. Υπάρχουν πολλές μελέτες που ερευνούν τον ρόλο τους σε διάφορες παθήσεις, συμπεριλαμβανομένης και της ψωρίασης [8]. Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να διερευνήσουμε τη σημασία της ανεπάρκειας Hsp70 σε σχέση με την ψωρίαση, μελετώντας ένα *in vivo* μοντέλο ψωρίασης.

Υλικά και μέθοδοι

1.Εργαστηριακά Ζώα: Για την παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν αρσενικοί μύες γενετικού υποβάθρου C57BL6x129Sv (αγρίου τύπου, *HSP70+/+*) και μύες με γενετική απαλοιφή των γονιδίων *HSP70.1* και *HSP70.3* (*HSP70-/-*) ηλικίας 8-12 εβδομάδων. Τηρήθηκαν πρωτόκολλα 12ωρου κύκλου

εναλλαγής φωτός-σκοταδιού και θερμοκρασίας $22\pm 2^{\circ}\text{C}$. Όλες οι πειραματικές διεργασίες που απαιτούσαν χειρισμό των πειραματοζώων, έγιναν σύμφωνα με το Ζωικό Πειραματικό Πρωτόκολλο του Πανεπιστημίου Κρήτης, εγκεκριμένο και από το αρμόδιο τμήμα της Κτηνιατρικής Υπηρεσίας της Περιφέρειας Κρήτης.

2.Επαγωγή Ψωρίασης: Η επαγωγή της ψωρίασης στους μύες πραγματοποιήθηκε με την χρήση της κρέμας Quimodia 5% w/w, η οποία χρησιμοποιείται για την θεραπεία των κονδυλωμάτων και της ακτινικής υπερκεράτωσης στους ανθρώπους. Ωστόσο, ψωριασικού τύπου πλάκες εμφανίζονται κατά την διάρκεια της χρήσης της κρέμας, οι οποίες όμως εξαφανίζονται με την διακοπή της θεραπείας. Φυσιολογικά, οι μύες δεν εμφανίζουν ψωρίαση καθώς πρόκειται για μια ανθρώπινη ασθένεια. Σκοπός της χορήγησης της κρέμας είναι η παροδική επαγωγή ψωρίασης, το οποίο χρησιμοποιείται ως πειραματικό μοντέλο ψωρίασης σε μύες [9]. Για την επαγωγή της ψωρίασης, έγινε επάλειψη 62,5 mg κρέμας, ποσότητας ίσης με 3,125 mg ενεργού συστατικού (Ιμικιμόδης) για 7 συνεχόμενες μέρες ανά 24 ώρες στην ράχη και στο δεξί αυτί. Ταυτόχρονα, αξιολογήθηκε καθημερινά η ερυθρότητα και η απολέπιση αυτών των περιοχών με την χρήση του συστήματος Psoriasis Area and Severity Index (PASI Score) [10]. Φωτογραφίες των περιοχών λήφθηκαν κατά την 4^η πειραματική μέρα και την 8^η τελευταία μέρα του πειράματος.



3.Ιστολογική Μελέτη: Οι μύες θανατώθηκαν και το ψωριασικό δέρμα και αυτί συλλέχθηκαν και μονιμοποιήθηκαν με φορμαλδεΰδη. Οι ιστοί τεμαχίστηκαν με την χρήση της κρυοτόμου και έπειτα ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο Αιματοξυλίνης-Εωσίνης. Εν συνεχεία λήφθηκαν φωτογραφίες οι οποίες αξιολογήθηκαν από ανεπηρέαστο αναλυτή.

4.Ποσοτικοποίηση κυτοκινών: Το ψωριασικό δέρμα ομογενοποιήθηκε σε διάλυμα PBS 1X που περιείχε protease inhibitors (Roche, Munich, Germany). Η ποσοτικοποίηση της ολικής πρωτεΐνης των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με την χρήση του πρωτοκόλλου Bradford και η ποσοτικοποίηση των επιπέδων TNF-α, IL-6, IL-17A και IFN-γ του ψωριασικού δέρματος με την χρήση mouse ELISA kits (Biolegend for TNF-α, IL-6, IL-17A and IFN-γ) καθώς και των επιπέδων της IL-6 στον ορό, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

5.Ποσοτικοποίηση επιπέδων mRNA-Quantitative Real-Time PCR: Το ολικό RNA από το ψωριασικό δέρμα και τους σπλήνες απομονώθηκε με την χρήση Trizol reagent (Invitrogen, Waltham, MA, USA) και η σύνθεση του cDNAs πραγματοποιήθηκε με την χρήση TAKARA PrimeScript 1st strand cDNA synthesis kit (Takara Bio, Saint-Germain-en-Laye, France). Για την ανίχνευση της έκφρασης των γονιδίων της συγκεκριμένης εργασίας χρησιμοποιήθηκε SYBR Green master mix (Kapa Biosystems, Wilmington, MA, USA) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η ποσότητα του mRNA της β-actin χρησιμοποιήθηκε ως control. Τα δεδομένα αναλύθηκαν με $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Η αλληλουχίες των primers που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στον Πίνακα 1.

Πίνακας 1

Gene	Forward (5' to 3')	Reverse (5' to 3')
Beta-actin	TCAGAAGGACTCCTATGTG	TCTCTTTGATGTCACGCAC
IL-6	TTCCATCCAGTTGCCTTCTT	CAGAATTGCCATTGCACAAC
IL-17A	GGACTCTCCACCGCAATG	TGAAAGTGAAGGGGCAGC
IL-23A	CTCAAGGACAACAGCCAGTTC	CCTCTGGCTGGAGGAGTTG
TNF-α	ATGAGCACAGAAAGCATG	TACAGGCTTGTCACTCGA

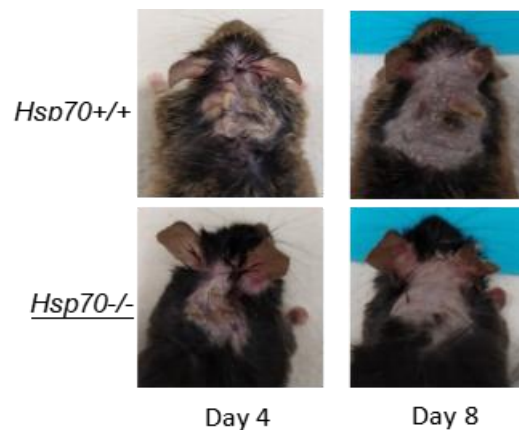
6.Ποσοτικοποίηση επιπέδων πρωτεϊνών-Western Blot: Το εκχύλισμα της ολικής πρωτεΐνης του ψωριασικού δέρματος λύθηκε με την χρήση RIPA lysis buffer (0.1% SDS, 1% sodium deoxycholate, 10 mM Tris-HCl, pH 8, 140 mM NaCl, 10mM EDTA, 1% Triton X-100) που περιείχε protease inhibitors (Complete, Mini, EDTA-free, Roche). Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης μετρήθηκε με την χρήση bicinchoninic acid (BCA) protein assay kit (Sigma-Aldrich), και 20 mg πρωτεΐνης φορτώθηκαν από κάθε δείγμα σε SDS-page γέλη 8%. Οι πρωτεΐνες μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροσελουλόζης και έγινε μπλοκ με 5% BSA για 1 ώρα στους 4°C. Οι μεμβράνες πλύθηκαν με TBS-T και επώαστηκαν για 16-18 ώρες στους 4°C με τα αντισώματα HSP90 (1:1000; cat#4874S, Rabbit, Cell Signaling), HSP70 W27 (1:500; cat # sc-24, mouse monoclonal IgG2a, Santa Cruz Biotechnology) και HSP60 N-20, (1:200, cat # sc1052, goat polyclonal IgG, Santa Cruz Biotechnology). Για την ανίχνευση των μεγεθών των πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε ένα Benchmark Pre-Stained Protein Standard (Invitrogen cat # 10748-010). Η κανονικοποίηση έγινε με την χρήση β-actin (1:5000, mouse; Abcam cat# ab6276). Η ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών έγινε με την βοήθεια του προγράμματος Image-J [11].

7. Στατιστική Ανάλυση: Όλα τα πειράματα διεξήχθησαν ανεξάρτητα τουλάχιστον 3 φορές και κάθε πείραμα συμπεριλάμβανε τουλάχιστον 3 ποντίκια ανά ομάδα. Για την ανάλυση των διαφορών μεταξύ των ομάδων χρησιμοποιήθηκε t-Test και Two-way ANOVA ανάλυση με διόρθωση Bonferroni. Όλα τα αποτελέσματα εκφράζονται ως mean $\pm$ SEM.

Αποτελέσματα

1. Φαινοτυπική εκτίμηση πειραματόζων

Κατά την 4^η και 8^η μέρα του πειράματος ελήφθησαν φωτογραφίες από την ράχη και το αυτί των μυών.

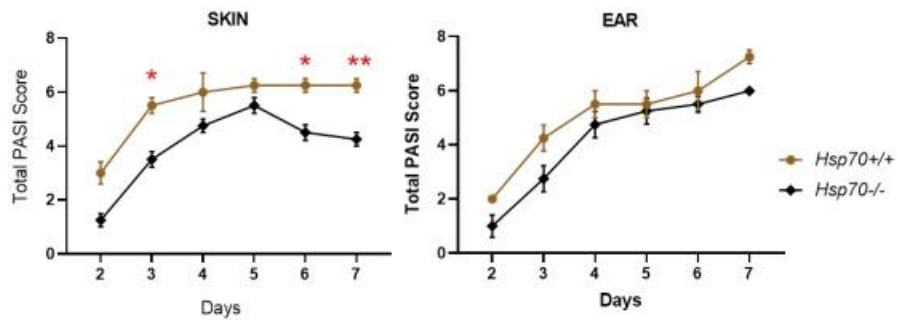


Εικόνα 1. Φαινοτυπική εκτίμηση της ψωρίασης

Σύμφωνα με τις παραπάνω φωτογραφίες και την εκτίμηση ενός ερευνητή που δεν γνώριζε τον φαινότυπο των ζώων, βρέθηκε ότι ο γονότυπος HSP70^{-/-} παρουσιάζει καλύτερη κατάσταση δέρματος καθώς έχει μικρότερη έκταση βλάβης και λιγότερες πλάκες.

2. Ολικό PASI Score

Κατά την διάρκεια του πειράματος πραγματοποιήθηκε καθημερινή αξιολόγηση της κατάστασης των ζώων από εξωτερικό παρατηρητή με την χρήση της κλίμακας Psoriasis Area and Severity Index. Αξιολογήθηκε η ερυθρότητα και η απολέπιση των βλαβών σε δέρμα και αυτί.

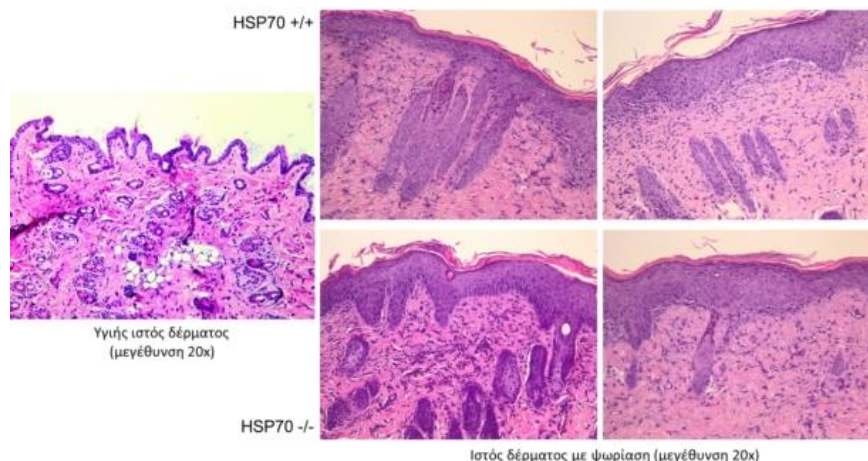


Διάγραμμα 1 & 2. Ολικό PASI Score του δέρματος και του αυτιού των μυών
(HSP70+/+, n=4, Δέρμα: 3^η ημέρα p=0,0163, 6^η ημέρα p=0,0237, 7^η ημέρα p=0,0079,
*: p < 0,05 και **: p < 0,01)

Σύμφωνα με τα παραπάνω διαγράμματα, στο δέρμα των HSP-/- ζώων παρατηρήθηκαν χαμηλότερες τιμές PASI Score συγκριτικά με του αγρίου τύπου κατά την 3^η, 6^η και 7^η μέρα ενώ δεν βρέθηκαν διαφορές μεταξύ των δύο γονοτύπων στις τιμές του PASI Score στο αυτί, κάτι που έχει παρατηρηθεί και σε παρόμοιες μελέτες [12].

3. Ιστολογική εκτίμηση ψωριασικού δέρματος (με χρώση αιματοξυλίνης-εωσίνης)

Παρακάτω παρουσιάζονται οι εικόνες που ελήφθησαν από τις τομές του ψωριασικού και υγιούς δέρματος των δύο γονοτύπων.

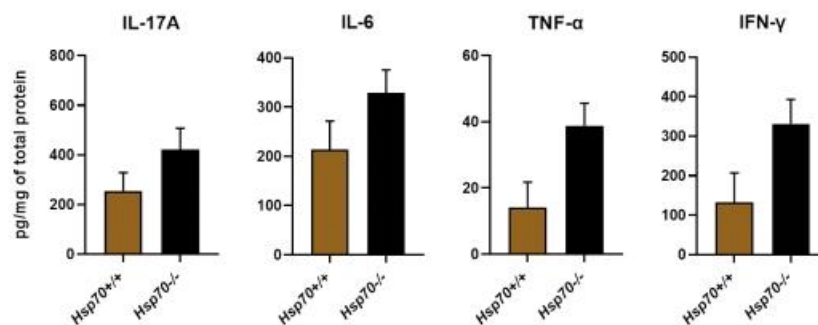


Εικόνα 2. Ιστολογικές τομές δέρματος HSP70+/+ & HSP70-/- μυών
Μεγέθυνση (20x)

Σύμφωνα με τις παραπάνω εικόνες παρατηρείται πιο έντονη υπερκεράτωση, ακάνθωση και συγκέντρωση φλεγμονωδών στοιχείων στο δέρμα των HSP70+/+ ζώων.

4. Εκτίμηση των επιπέδων των κυτοκινών στο ψωριασικό δέρμα και στον ορό των μυών των δυο γονοτύπων

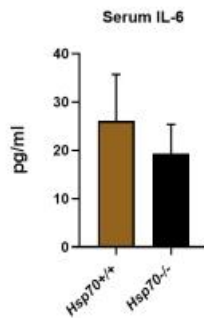
Στην συγκεκριμένη εργασία μελετήθηκαν οι παρακάτω κυτοκίνες IL-17A, IL-6, TNF- α , IFN- γ . Η IL-17A παράγεται από τα CD4⁺ Th17 κύτταρα παρουσία της IL-23 α και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση ψωριασικών πλακών, καθώς στοχεύει στα κερατινοκύτταρα, τα οποία υπερπολλαπλασιάζονται [13]. Η IL-6 είναι μια προφλεγμονώδης κυτοκίνη και παράγεται από μονοκύτταρα, φαγοκύτταρα, ινοβλάστες και κερατινοκύτταρα [14]. Όσον αφορά τον TNF- α είναι μια προφλεγμονώδης κυτοκίνη και δρα στον άξονα IL-23/IL17 με αποτέλεσμα να παράγονται περισσότερα CD4⁺ κύτταρα και πολλοί προφλεγμονώδεις παράγοντες [14, 15]. Η ιντερφερόνη- γ συμμετέχει σε φλεγμονώδεις καταστάσεις διαδραματίζοντας προστατευτικό ρόλο και παράγεται κυρίως από CD4⁺ και CD8⁺ κύτταρα [14].



Γράφημα 3,4,5,6: Πρωτεϊνικά επίπεδα IL-17A, IL-6, TNF- α , IFN- γ στο ψωριασικό δέρμα μυών (HSP70+/+ n=4, HSP-/- n=4, p > 0,05)

Όπως φαίνεται και από τα παραπάνω διαγράμματα οι ποσότητες όλων των κυτοκινών που αναφέρθηκαν φαίνονται αυξημένες στο ψωριασικό δέρμα των μυών με γονότυπο HSP70-/-, χωρίς ωστόσο να εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά, γεγονός που έρχεται σε αντίθεση με άλλες μελέτες που δείχνουν ότι η έλλειψη της HSP70 πρωτεΐνης οδηγεί σε μειωμένη έκκριση προφλεγμονωδών κυτοκινών [16].

Ως δείκτης ανοσολογικής απόκρισης χρησιμοποιήθηκε και η μέτρηση της ποσότητας της IL-6 στον ορό των μυών. Ωστόσο, καμία σημαντική διαφορά δεν παρατηρήθηκε μεταξύ των δυο γονοτύπων.

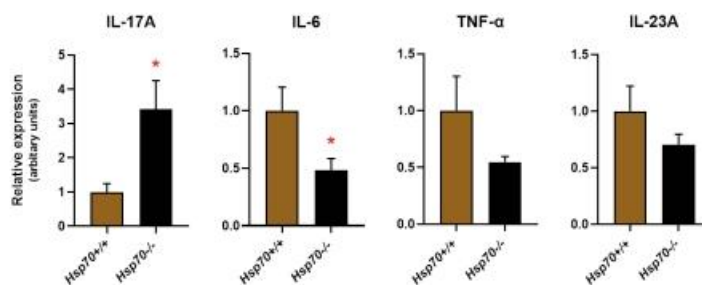


Γράφημα 7. Πρωτεϊνικά επίπεδα της IL-6 στον ορό των μυών.

(HSP70^{+/+} n=4, HSP70^{-/-} n=4, $p > 0,05$)

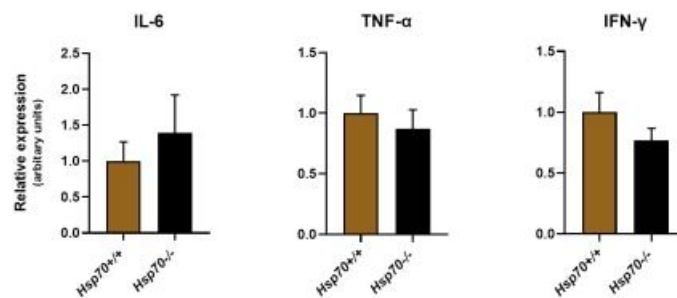
5. Εκτίμηση της έκφρασης των mRNA κυτοκινών στο ψωριασικό δέρμα και στους σπλήνες των μυών των δυο γονοτύπων

Εκτιμήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης των mRNA της IL-17A, IL-6, TNF- α και IL-23A στο ψωριασικό δέρμα μυών, και όπως φαίνεται στα παρακάτω διαγράμματα υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά της IL-17A με αύξηση στο δέρμα των μυών του γονοτύπου HSP70^{-/-} ενώ στους ίδιους μύες παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση της IL-6. Τα επίπεδα του TNF- α και IL-23A είχαν μια πτωτική τάση στους HSP70^{-/-} μύες αλλά δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με τους HSP70^{+/+} μύες.



Γράφημα 8, 9, 10, 11: Επίπεδα έκφρασης mRNA IL-17A, IL-6, TNF- α , IL-23A σε ψωριασικό δέρμα μυών (HSP70^{+/+} n=4, HSP70^{-/-} n=4, IL-17A $p=0,0326$, IL-6 $p=0,0409$, TNF- α & IL-23A $p > 0,05$)

Όσον αφορά τα επίπεδα έκφρασης των mRNA των κυτοκινών του σπλήνα, μελετήθηκαν τα επίπεδα της IL-6, του TNF- α και της IFN- γ . Όπως φαίνεται και στα παρακάτω γραφήματα δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των 2 γονοτύπων.

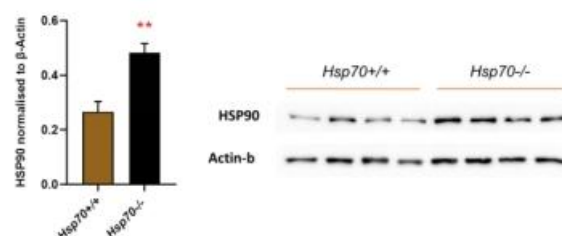


Γράφημα 12, 13, 14: Επίπεδα έκφρασης mRNA IL-6, TNF-α, IFN-γ στον σπλήνα μυών (HSP70^{+/+} n=4, HSP70^{-/-} n=4, IL-6, TNF-α, IFN-γ p > 0,05)

Τα υψηλά επίπεδα mRNA της IL-17A μπορεί να οφείλονται σε αυξημένα ποσοστά ουδετεροφίλων, καθώς αυτά διεισδύουν στην επιδερμίδα στο σημείο της φλεγμονής και αποτελούν την κύρια πηγή της IL-17A στην ψωρίαση [17]. Τα χαμηλότερα επίπεδα mRNA της IL-6 μπορεί να οφείλεται σε πιθανή μειωμένη μεταγραφή συγκεκριμένων γονιδίων την στιγμή που λήφθηκαν οι ιστοί καθώς και στο ότι μπορεί να υπήρξε προηγούμενη υψηλή παραγωγή.

6. Εκτίμηση επιπέδων της πρωτεΐνης Heat Shock Protein 90 στο ψωριασικό δέρμα μυών

Για την περαιτέρω μελέτη του μηχανισμού με τον οποίο οι HSP70^{-/-} μύες εμφανίζουν καλύτερη εικόνα σε σχέση με τους HSP70^{+/+} μύες, μετρήθηκαν τα επίπεδα της HSP90 πρωτεΐνης στο ψωριασικό δέρμα των μυών. Τα αποτελέσματα έδειξαν στατιστικά σημαντική αύξηση της HSP90 στον HSP70^{-/-} γονότυπο. Οι πρωτεΐνες θερμικού στρες λειτουργούν συνεργατικά, επομένως πιθανότατα η HSP90 να δρα αντιρροπιστικά στην έλλειψη της HSP70 και να συμβάλλει στην ρύθμιση της των κυτοκινών στο δέρμα.



Γράφημα 15: Επίπεδα της πρωτεΐνης HSP90 σε ψωριασικό δέρμα μυών (HSP70^{+/+} n=4, HSP70^{-/-} n=4, p=0,0048)

Συμπερασματικά, η HSP70 πρωτεΐνη αποτελεί έναν πιθανό θεραπευτικό βιοδείκτη για την ψωρίαση. Περαιτέρω μελέτη είναι σε εξέλιξη ώστε να επιβεβαιωθεί ο μηχανισμός μέσω του οποίου επιτελείται η δράση της HSP70.

Βιβλιογραφία

- [1] Boehncke WH, Schön MP. Psoriasis. *Lancet*. 2015 Sep 5;386(9997):983-94. doi: 10.1016/S0140-6736(14)61909-7. Epub 2015 May 27. PMID: 26025581.
- [2] Rendon A, Schäkel K. Psoriasis Pathogenesis and Treatment. *Int J Mol Sci*. 2019 Mar 23;20(6):1475. doi: 10.3390/ijms20061475. PMID: 30909615; PMCID: PMC6471628.
- [3] Griffiths CEM, Armstrong AW, Gudjonsson JE, Barker JNWN. Psoriasis. *Lancet*. 2021 Apr 3;397(10281):1301-1315. doi: 10.1016/S0140-6736(20)32549-6. PMID: 33812489.
- [4] Grän F, Kerstan A, Serfling E, Goebeler M, Muhammad K. Current Developments in the Immunology of Psoriasis. *Yale J Biol Med*. 2020 Mar 27;93(1):97-110. PMID: 32226340; PMCID: PMC7087066.
- [5] Chiricozzi A, Romanelli P, Volpe E, Borsellino G, Romanelli M. Scanning the Immunopathogenesis of Psoriasis. *Int J Mol Sci*. 2018 Jan 8;19(1):179. doi: 10.3390/ijms19010179. PMID: 29316717; PMCID: PMC5796128.
- [6] Zininga T, Ramatsui L, Shonhai A. Heat Shock Proteins as Immunomodulants. *Molecules*. 2018 Nov 1;23(11):2846. doi: 10.3390/molecules23112846. PMID: 30388847; PMCID: PMC6278532
- [7] Seifarth FG, Lax JE, Harvey J, DiCorleto PE, Husni ME, Chandrasekharan UM, Tytell M. Topical heat shock protein 70 prevents imiquimod-induced psoriasis-like inflammation in mice. *Cell Stress Chaperones*. 2018 Sep;23(5):1129-1135. doi: 10.1007/s12192-018-0895-0. Epub 2018 Apr 3. PMID: 29616455; PMCID: PMC6111098
- [8] Tukaj S, Sitko K. Heat Shock Protein 90 (Hsp90) and Hsp70 as Potential Therapeutic Targets in Autoimmune Skin Diseases. *Biomolecules*. 2022 Aug 20;12(8):1153. doi: 10.3390/biom12081153. PMID: 36009046; PMCID: PMC9405624.
- [9] Jabeen M, Boisgard AS, Danoy A, El Kholti N, Salvi JP, Boulieu R, Fromy B, Verrier B, Lamrayah M. Advanced Characterization of Imiquimod-Induced Psoriasis-Like Mouse Model. *Pharmaceutics*. 2020 Aug 20;12(9):789. doi: 10.3390/pharmaceutics12090789. PMID: 32825447; PMCID: PMC7558091
- [10] V. Oji, T.A. Luger, The skin in psoriasis: assessment and challenges, *Clin. Exp. Rheumatol*. 33 (2015) S14–S19 (5 Suppl 93).

- [11] Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979 Sep;76(9):4350-4. doi: 10.1073/pnas.76.9.4350. PMID: 388439; PMCID: PMC411572.
- [12] Tukaj S, Mantej J, Sobala M, Potrykus K, Tukaj Z, Zillikens D, Ludwig RJ, Bieber K, Kasperkiewicz M. Therapeutic Implications of Targeting Heat Shock Protein 70 by Immunization or Antibodies in Experimental Skin Inflammation. *Front Immunol*. 2021 Feb 23;12:614320. doi: 10.3389/fimmu.2021.614320. PMID: 33708208; PMCID: PMC7940535.
- [13] Berry SPD, Dossou C, Kashif A, Sharifinejad N, Azizi G, Hamedifar H, Sabzvari A, Zian Z. The role of IL-17 and anti-IL-17 agents in the immunopathogenesis and management of autoimmune and inflammatory diseases. *Int Immunopharmacol*. 2022 Jan;102:108402. doi: 10.1016/j.intimp.2021.108402. Epub 2021 Dec 1. PMID: 34863654.
- [14] Grän F, Kerstan A, Serfling E, Goebeler M, Muhammad K. Current Developments in the Immunology of Psoriasis. *Yale J Biol Med*. 2020 Mar 27;93(1):97-110. PMID: 32226340; PMCID: PMC7087066
- [15] Sabat R, Philipp S, Höflich C, Kreutzer S, Wallace E, Asadullah K, Volk HD, Sterry W, Wolk K. Immunopathogenesis of psoriasis. *Exp Dermatol*. 2007 Oct;16(10):779-98. doi: 10.1111/j.1600-0625.2007.00629.x. PMID: 17845210
- [16] Ioanna Plati, Olga Rassouli, Eirini Dermitzaki, Eleftheria Ieronymaki, George Briassoulis, Maria Venihaki, Evaluation of HSP70 deficiency in the inflammatory response in vivo and in vitro: The impact of HSP90 expression, glucocorticoid release, and glutamine administration. *JBRT*. Vol29 2022
- [17] Katayama H. Development of psoriasis by continuous neutrophil infiltration into the epidermis. *Exp Dermatol*. 2018 Oct;27(10):1084-1091. doi: 10.1111/exd.13746. Epub 2018 Aug 14. PMID: 30019426.

**ΕΠΙΠΕΔΑ ΜΑΛΟΝΙΚΗΣ ΔΙΑΛΔΕΥΔΗΣ ΣΤΟΝ ΟΡΟ ΑΙΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΣΤΟ ΕΓΚΕΦΑΛΟΝΩΤΙΑΙΟ ΥΓΡΟ:
ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΑΝΑΛΟΓΑ ΜΕ ΤΟ ΦΥΛΟ ΣΕ ΑΤΟΜΑ ΜΕ ΗΠΙΑ ΝΟΗΤΙΚΗ ΔΙΑΤΑΡΑΧΗ**

ΣΤΑΥΡΟΥΛΑ ΙΩΑΝΝΙΔΟΥ¹, ΚΑΛΗ ΜΑΚΕΔΟΥ², ΜΑΓΔΑ ΤΣΟΛΑΚΗ^{3,4}, ΕΥΓΕΝΙΑ ΛΥΜΠΕΡΑΚΗ¹

¹ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ, ΔΙΕΘΝΕΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΕΛΛΑΔΟΣ, 57400 ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ, ΕΛΛΑΔΑ.

²ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΟ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΑΧΕΠΑ, ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ, ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ, 54636 ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ, ΕΛΛΑΔΑ.

³ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΕΤΑΙΡΕΙΑ ΝΟΣΟΥ ALZHEIMER ΚΑΙ ΣΥΓΓΕΝΩΝ ΔΙΑΤΑΡΑΧΩΝ, 54248 ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ, ΕΛΛΑΔΑ.

⁴ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΝΕΥΡΟΕΚΦΥΛΙΣΤΙΚΩΝ ΝΟΣΗΜΑΤΩΝ, ΚΕΝΤΡΟ ΔΙΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΗΣ ΈΡΕΥΝΑΣ ΚΑΙ ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑΣ
(ΚΕΔΕΚ), ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ, 54124 ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ, ΕΛΛΑΔΑ.

Περίληψη: Η ήπια νοητική διαταραχή (ΗΝΔ) θεωρείται ως πρόδρομο στάδιο της άνοιας, που μπορεί να οφείλεται είτε στη φυσιολογική γήρανση είτε σε άλλους παράγοντες, όπως η νόσος Alzheimer (ΝΑ). Το οξειδωτικό στρες συμμετέχει και σχετίζεται με τη παθοφυσιολογία διαφόρων νευροεκφυλιστικών νοσημάτων. Σκοπός της μελέτης ήταν η διερεύνηση των επιπέδων της μαλονικής διαλδεΰδης (MDA) στον ορό και το εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ΕΝΥ) σε ασθενείς με ΗΝΔ, ανάλογα με το φύλο. Όλοι οι συμμετέχοντες κατηγοριοποιήθηκαν σε τρεις ομάδες, με βάση τους καθιερωμένους βιοδείκτες ΕΝΥ και τις κλινικές νευροψυχολογικές αξιολογήσεις. Η ομάδα Α αποτελούνταν από 30 άτομα με ΗΝΔ (Α+) με παθολογικά επίπεδα β-αμυλοειδούς (Αβ) στο ΕΝΥ. Η ομάδα Β αποτελούνταν από 30 άτομα με ΗΝΔ (Α-) με φυσιολογικά επίπεδα Αβ στο ΕΝΥ. Η ομάδα Γ αποτελούνταν από 30 υγιή άτομα (Α-) με φυσιολογικά επίπεδα Αβ στο ΕΝΥ. Η μέτρηση των καθιερωμένων βιοδεικτών ΕΝΥ πραγματοποιήθηκε μέσω αυτοματοποιημένης ανοσοχημικής τεχνικής (αναλυτής Fuji Rebio Lumi pulse® G1200) και τα επίπεδα της MDA μετρήθηκαν μέσω μιας ανταγωνιστικής ανασταλτικής ανοσοενζυμικής μεθόδου (ELK Biotechnology). Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά των επιπέδων της MDA στον ορό του αίματος και στο ΕΝΥ κατά την εξέλιξη της νόσου ανάμεσα στις τρεις ομάδες του ανδρικού πληθυσμού, ενώ στον γυναικείο πληθυσμό δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά. Παράλληλα, στην ομάδα των ΗΝΔ (Α+) υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά των επιπέδων της MDA ανάμεσα στα δύο φύλα. Συμπερασματικά, παρατηρήθηκε αυξημένη λιπιδική υπεροξείδωση στα δυο βιολογικά υλικά, στους άνδρες που έπασχαν από ΗΝΔ και ήταν σε κίνδυνο να αναπτύξουν ΝΑ. Αντίθετα,

στις γυναίκες παρατηρήθηκε αυξημένη λιπιδική υπεροξείδωση στο ENY, μόνο σε αυτές που έπασχαν με ΗΝΔ και δεν ήταν σε κίνδυνο να αναπτύξουν ΝΑ. Στις δυο κατηγορίες των ατόμων με ΗΝΔ, οι άνδρες εμφάνισαν αυξημένη λιπιδική υπεροξείδωση έναντι των γυναικών.

Λέξεις κλειδιά: Λιπιδική υπεροξείδωση, μαλονική διαλδεΰδη, οξειδωτικό στρες, ήπια νοητική διαταραχή, άνδρες, γυναίκες.

Εισαγωγή

Οι νευροεκφυλιστικές διαταραχές περιλαμβάνουν παθολογικές καταστάσεις, στις οποίες παρατηρείται σταδιακή εκφύλιση ειδικών ομάδων νευρώνων ή περιοχών του εγκεφάλου, οδηγώντας στην ανάπτυξη χαρακτηριστικών κλινικών συνδρόμων. Η νόσος Alzheimer (ΝΑ) αποτελεί τη συχνότερη μορφή νευροεκφυλιστικής διαταραχής και την πιο κοινή μορφή άνοιας σε άτομα προχωρημένης ηλικίας [1,2]. Η νόσος χαρακτηρίζεται από προοδευτική απώλεια της νοητικής λειτουργίας, όπως είναι η πρόσφατη μνήμη, ο αφαιρετικός συλλογισμός, η συγκέντρωση, ο λόγος και ο προσανατολισμός στο χώρο. Συχνά συνοδεύεται με μεταβολές στη διάθεση και στη συμπεριφορά. Η νόσος συνδέεται αρχικά με εκφυλιστικές αλλοιώσεις των νευρώνων σε συγκεκριμένες περιοχές του εγκεφαλικού φλοιού και του ιππόκαμπου, λόγω της εξωκυτταρικής εναπόθεσης του β-αμυλοειδούς (Αβ), γνωστές ως γεροντικές πλάκες, και ενδοκυτταρικής υπερφωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης τ (τ) στα νευρικά κύτταρα [1,3,4]. Στα επόμενα στάδια οι εναποθέσεις αυτές προχωρούν και σε άλλες περιοχές του εγκεφάλου και στα τελικά στάδια πάσχει ολόκληρος ο εγκέφαλος.

Στα επόμενα χρόνια, η ΝΑ θα αποτελέσει μείζον θέμα δημόσιας υγείας λόγω αύξησης του προσδόκιμου ζωής. Συγκεκριμένα, αναμένεται σημαντική αύξηση του αριθμού των ατόμων που ζουν με τη νόσο ή με άλλη μορφή άνοιας, λόγω του αυξημένου κινδύνου εμφάνισής της στα άτομα προχωρημένης ηλικίας. Η έλλειψη αποτελεσματικής θεραπείας μέχρι σήμερα που να αναστρέφει ή να εμποδίζει τις βιολογικές μεταβολές στον εγκέφαλο των ασθενών επιβαρύνει την κατάσταση. Παράλληλα, σοβαρές διαστάσεις πρόκειται να λάβουν οι κοινωνικοοικονομικές επιπτώσεις, τόσο στα άτομα με ΝΑ, όσο και στις οικογένειές τους [5,6]. Κρίνεται, λοιπόν, απαραίτητη η έγκαιρη διάγνωση της νόσου στα αρχικά και πρόδρομα στάδια, ώστε να προληφθεί η επιδείνωση της υγείας των ατόμων αυτών. Τα άτομα με κλινική εικόνα ήπιας νοητικής διαταραχής (ΗΝΔ), η οποία αποτελεί πρόδρομο στάδιο της άνοιας, χαρακτηρίζονται από νοητική έκπτωση που ξεπερνά την αναμενόμενη για την αντίστοιχη ηλικία και το

αντίστοιχο επίπεδο εκπαίδευσης ενός ατόμου. Στους εγκεκριμένους διαγνωστικούς βιοδείκτες που υποστηρίζουν την κλινική διάγνωση της ΝΑ ανήκουν οι επικυρωμένοι δείκτες β-αμυλοειδούς (κυρίως το Αβ42), η ολική τ και η φωσφορυλιωμένη τ στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ΕΝΥ) [7,8]. Νέα ερευνητικά σχήματα στοχεύουν στην εύρεση άμεσων, φθηνότερων και λιγότερο επεμβατικών διαγνωστικών βιοδεικτών σε άλλα βιολογικά υλικά [9–12].

Η έγκαιρη διάγνωση της νόσου στα αρχικά της στάδια είναι ζωτικής σημασίας. Ερευνητικές μελέτες υποστηρίζουν και προτείνουν τη συμμετοχή των δεικτών οξειδωτικού στρες στην παθογένεση της νόσου. Η υπόθεση του οξειδωτικού στρες έχει βασικό ρόλο, καθώς συνδέεται με άλλες παθολογικές διεργασίες, συμμετέχοντας στην ανάπτυξη της ΝΑ [13–16]. Η υπερπαραγωγή των δραστικών μορφών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) στην περίπτωση της νόσου ΝΑ μπορεί να οφείλεται στη συσσώρευση των διαφόρων ολιγομερών Αβ στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων, διαταράσσοντας την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, αυξάνοντας τελικά την παραγωγή των ROS [17], γεγονός που οδηγεί στη βλάβη του DNA, οξείδωση των πρωτεϊνών και υπεροξείδωση των λιπιδίων. Η λιπιδική υπεροξείδωση μπορεί να οδηγήσει στην υπερφωσφορυλίωση της τ μέσω των κινασών, διαταράσσοντας την ομοιόσταση του ασβεστίου, προκαλώντας τελικά την απόπτωση των νευρικών κυττάρων [17–19]. Η μελέτη των δεικτών του οξειδωτικού στρες παράλληλα με άλλους εμπλεκόμενους μηχανισμούς μπορεί να προσφέρει μια πιο αποτελεσματική στρατηγική για τη διαχείριση της διάγνωσης της ΝΑ στα αρχικά στάδια της νοητικής διαταραχής, καθώς και στην εύρεση θεραπείας στηριζόμενης στους μηχανισμούς παθογένειας και απαρίθμησης των σηματοδοτικών μονοπατιών.

Ένας βιοδείκτης που εκφράζει τη λιπιδική υπεροξείδωση του οργανισμού είναι η μαλονική διαλδεΰδη (Malondialdehyde, MDA). Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει τη σύνδεση της λιπιδικής υπεροξείδωσης σε άτομα με ΗΝΔ, καθώς παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της MDA στα αρχικά στάδια της νόσου [20,21]. Νέες ερευνητικές μελέτες προσδιορίζουν κι άλλα προϊόντα οξειδωτικής βλάβης για την εκτίμηση της οξειδωτικής και αντιοξειδωτικής κατάστασης του οργανισμού, σε άτομα με ΗΝΔ [22,23].

Ο σκοπός της μελέτης ήταν η διερεύνηση των διαφορών στα επίπεδα της MDA στον ορό και το ΕΝΥ σε ασθενείς με ΗΝΔ, ανάλογα με το φύλο, προκειμένου να ελεγχθεί η παρουσία της λιπιδικής υπεροξείδωσης και η διαφορά στους άνδρες και στις γυναίκες με ΗΝΔ.

Υλικό και Μέθοδοι

Η παρούσα μελέτη παρατήρησης διεξήχθη σε συνεργασία με την Ελληνική Εταιρεία νόσου Alzheimer και Συγγενών Διαταραχών, το Οικοτροφείο ασθενών με άνοια τελικού σταδίου «Παναγία η Γλυκοφιλούσα», το Εργαστήριο Βιοχημείας Π.Γ.Ν.Θ. ΑΧΕΠΑ του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης και το Εργαστήριο Κλινικής Χημείας του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών του Διεθνούς Πανεπιστημίου Ελλάδος.

Πληθυσμός της μελέτης

Ο συνολικός αριθμός των ατόμων της μελέτης ήταν 90, ηλικίας 55-90 ετών, εκ των οποίων 42 άτομα ήταν άνδρες και 48 άτομα ήταν γυναίκες. Τα άτομα της μελέτης διακρίνονται σε τρεις ομάδες:

- Ομάδα Α: 30 άτομα με ΗΝΔ και παθολογικά επίπεδα Αβ στο ΕΝΥ, ΗΝΔ (Α+)
- Ομάδα Β: 30 άτομα με ΗΝΔ και φυσιολογικά επίπεδα Αβ στο ΕΝΥ, ΗΝΔ (Α-)
- Ομάδα Γ: 30 άτομα με φυσιολογική νοητική λειτουργία και φυσιολογικά επίπεδα Αβ στο ΕΝΥ, (Α-). Αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου της μελέτης και δεν λάμβαναν φαρμακευτική αγωγή.

Τα χαρακτηριστικά των ατόμων της μελέτης ως προς το φύλο, την ηλικία, το ύψος, το βάρος, το επίπεδο εκπαίδευσης και το οικογενειακό ιστορικό παρουσιάζονται στον Πίνακα 1. Επιλέγοντας τον συγκεκριμένο πληθυσμό ατόμων, στοχεύουμε να αναζητήσουμε πιθανούς βιοδείκτες για την πρόωμη και την έγκαιρη διάγνωση της νόσου, πριν την εμφάνιση των κλινικών συμπτωμάτων της άνοιας, τύπου Alzheimer (ΝΑ).

Πίνακας 1. Χαρακτηριστικά των ομάδων της μελέτης.

	Ομάδα Α	Ομάδα Β	Ομάδα Γ
	ΗΝΔ (Α+)	ΗΝΔ (Α-)	Ομάδα ελέγχου
Φύλο (%)			
Άνδρες	53,33	46,67	40,00
Γυναίκες	46,67	53,33	60,00
Ηλικία (ΜΟ ± SD)	73 ± 7	75 ± 6	61 ± 10
Ύψος (ΜΟ ± SD)	167 ± 8	167 ± 10	170 ± 8
Βάρος (ΜΟ ± SD)	77 ± 14	74 ± 20	81 ± 14

Επίπεδο εκπαίδευσης (%)

Πρωτοβάθμια	26,67	20,00	13,33
Δευτεροβάθμια	36,67	40,00	26,67
Τριτοβάθμια	36,67	40,00	60,00

Οικογενειακό ιστορικό (%)

Ναι	70,00	46,67	43,33
Όχι	30,00	53,33	56,67

Συντομογραφίες: ΜΟ: μέσος όρος, SD: τυπική απόκλιση.

Δειγματοληψία και χειρισμός των δειγμάτων

Όλα τα δείγματα συλλέχθηκαν από την τράπεζα που διατηρεί η Ελληνική Εταιρεία νόσου Alzheimer. Ο συνολικός αριθμός των δειγμάτων ήταν 180, εκ των οποίων τα 90 δείγματα ήταν οροί αίματος και τα υπόλοιπα 90 δείγματα ήταν ΕΝΥ. Όλα τα δείγματα παρέμειναν αποθηκευμένα στους -80°C . Πριν από το πείραμα, τα δείγματα, επώαστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου.

Προσδιορισμός των βιοδεικτών του ΕΝΥ

Πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός των επιπέδων καθιερωμένων βιοδεικτών Αβ40, Αβ42 και των τ πρωτεϊνών στο ΕΝΥ, με μια αυτοματοποιημένη ανοσοχημική μέθοδο χρησιμοποιώντας τον αυτόματο αναλυτή Lumipulse G1200 (Fujirebio Inc. Europe).

Προσδιορισμός μαλονικής διαλδεϋδης

Ο προσδιορισμός της MDA στα δείγματα έγινε με τη χρήση μιας ανταγωνιστικής ανασταλτικής ανοσοενζυμικής μεθόδου (ELK Biotechnology Co., Ltd., Denver, CO, USA). Χρησιμοποιήθηκαν εμπορικά διαθέσιμες πλάκες μικροτιτλοποίησης των 96 βοθρίων, επικαλυμμένων με ειδικό αντίσωμα για την ανθρώπινη MDA, συζευγμένο με βιοτίνη. Τα πρότυπα και τα δείγματα προστέθηκαν στα επικαλυμμένα βοθρία της πλάκας μικροτιτλοποίησης. Στη συνέχεια, με την προσθήκη συζευγμένης στρεπταβιδίνης με υπεροξειδάση και διαλύματος TMB πραγματοποιήθηκε αντίδραση, το αποτέλεσμα της οποίας αναγνώστηκε σε φωτόμετρο στα 450nm. Η συγκέντρωση της MDA στο δείγμα υπολογίστηκε με βάση τη πρότυπη καμπύλη.

Στατιστική επεξεργασία

Η στατιστική επεξεργασία πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του στατιστικού πακέτου SPSS for Windows, v. 28.0 (IBM Corp., 2021- IBM Statistical Package for Social Sciences, Armonk, NY, USA). Τα δεδομένα του δείγματος ελέγχθηκαν ως προς την κανονικότητα με το τεστ Shapiro-Wilk και επιλέχθηκαν οι κατάλληλες στατιστικές μέθοδοι ανάλυσης.

Βιοηθική

Η μελέτη πραγματοποιήθηκε με σεβασμό στις αρχές της βιοηθικής σύμφωνα με τις κατευθυντήριες γραμμές ορθής κλινικής πρακτικής και τη Διακήρυξη του «Helsinki». Η μελέτη έλαβε έγκριση από την επιτροπή βιοηθικής της Ελληνικής Εταιρείας Νόσου Alzheimer και Συγγενών Διαταραχών, στις 4 Ιουλίου 2024 με αριθμό πρωτοκόλλου 175/2024. Όλοι οι συμμετέχοντες υπέγραψαν ενημερωμένη συγκατάθεση σχετικά με τη χρήση των δειγμάτων τους στην έρευνα.

Αποτελέσματα

Στον Πίνακα 2 αναφέρονται οι μέσοι όροι και οι τυπικές αποκλίσεις της MDA στα δύο βιολογικά υλικά, ορού αίματος και ENY, των ομάδων της μελέτης ανάμεσα στα δυο φύλα.

Πίνακας 2. Μέσοι όροι και τυπικές αποκλίσεις των επιπέδων της μαλονικής διαλδεΰδης στον ορό και το ENY στις ομάδες της μελέτης ανάμεσα στα δύο φύλα.

Μέσοι όροι ± τυπικές αποκλίσεις			
Ομάδες μελέτης		Μαλονική διαλδεΰδη (ng/mL)	
		Ορός αίματος	ENY
Ομάδα Α	Άνδρες	242,33* ± 119,68	174,57** ± 125,38
	Γυναίκες	179,71* ± 115,85	89,04** ± 63,89
Ομάδα Β	Άνδρες	195,90 ± 205,11	142,51 ± 115,71
	Γυναίκες	135,19 ± 175,06	141,54 ± 125,86

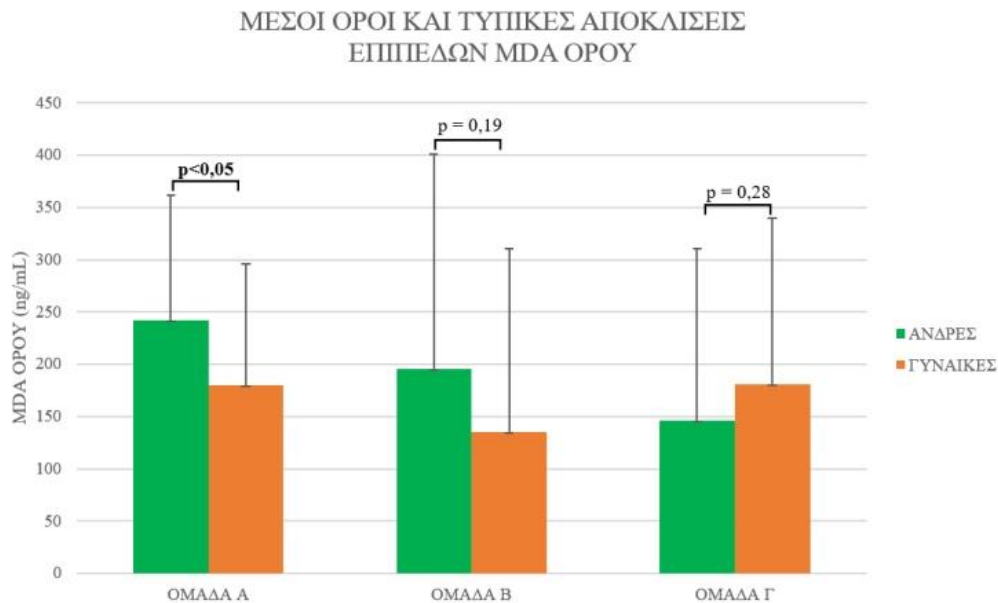
Ομάδα Γ	Άνδρες	145,96 ± 164,34	77,50 ± 76,93
Ομάδα ελέγχου	Γυναίκες	180,58 ± 158,99	86,35 ± 67,16

Σημείωση: * *p-value* 0,05, ** *p-value* 0,01

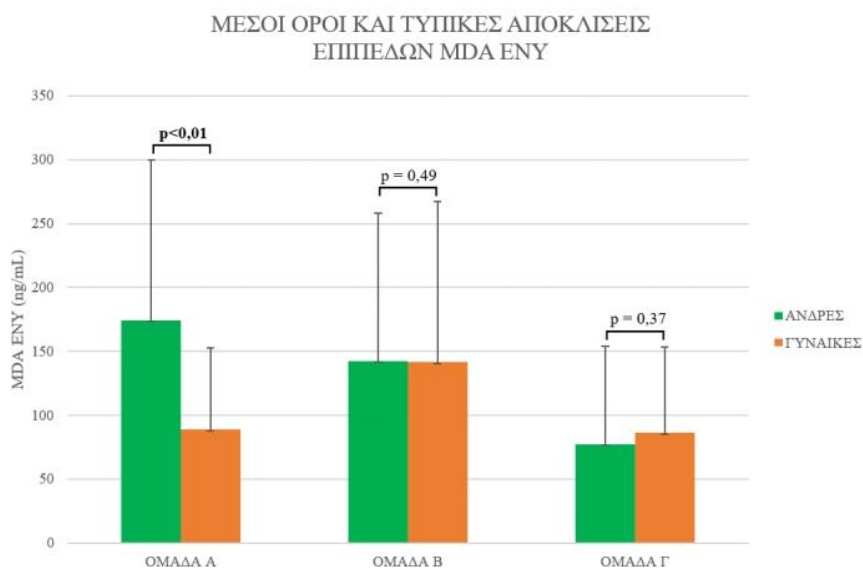
Παρατηρήθηκε σημαντική στατιστική διαφορά των μέσων όρων της MDA του ορού αίματος μεταξύ των ανδρών και των γυναικών στην ομάδα A (242,33 ng/mL έναντι 179,71 ng/mL, $p < 0,05$). Παρόμοια και στατιστικά σημαντική μεταβολή παρουσίασαν οι μέσοι όροι της MDA του ΕΝΥ μεταξύ των ανδρών και των γυναικών στην ομάδα A (174,57 ng/mL έναντι 89,04 ng/mL, $p < 0,01$). Στις υπόλοιπες ομάδες της μελέτης δεν παρατηρήθηκε κάποια στατιστικά σημαντική μεταβολή των μέσων όρων της MDA στα δύο φύλα και στα δυο βιολογικά υλικά.

Παράλληλα, στον ανδρικό πληθυσμό παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα της MDA στον ορό του αίματος, στην ομάδα των ατόμων με ΗΝΔ (Α+) και στην ομάδα των ατόμων ΗΝΔ (Α-), σε σχέση με τα υγιή άτομα (242,33 ng/mL και 195,90 ng/mL, έναντι 145,96 ng/mL, $p = 0,242$) χωρίς η διαφορά αυτή να είναι στατιστικά σημαντική. Επίσης, παρόμοια συμπεριφορά παρατηρήθηκε στα επίπεδα της MDA στο ΕΝΥ. Τα επίπεδα της MDA στο ΕΝΥ ήταν αυξημένα στην ομάδα των ανδρών με ΗΝΔ (Α+) και στην ομάδα των ατόμων ΗΝΔ (Α-), σε σχέση με τα υγιή άτομα (174,57 ng/mL και 142,51 ng/mL, έναντι 77,50 ng/mL, $p = 0,232$) χωρίς η διαφορά αυτή να είναι στατιστικά σημαντική. Αντίθετα, στον γυναικείο πληθυσμό δεν παρουσιάστηκε ανάλογη διαφορά μεταξύ των ομάδων. Τα επίπεδα της MDA στον ορό του αίματος ήταν μειωμένα στην ομάδα των ΗΝΔ (Α-) έναντι της ομάδας ΗΝΔ (Α+) και υγιών (135,19 ng/mL έναντι 179,71 ng/mL και 180,58 ng/mL, $p = 0,338$). Τα επίπεδα της MDA στο ΕΝΥ ήταν αυξημένα στην ομάδα των ΗΝΔ (Α-) έναντι της ομάδας ΗΝΔ (Α+) και υγιών (141,54 ng/mL έναντι 89,04 ng/mL και 86,35 ng/mL, $p = 0,345$).

Τα παρακάτω γραφήματα παρουσιάζονται συνοπτικά οι μέσοι όροι και οι τυπικές αποκλίσεις της MDA στον ορό του αίματος (Γράφημα 1) και στο ΕΝΥ (Γράφημα 2).



Γράφημα 1. Μέσοι όροι και τυπικές αποκλίσεις της μαλονικής διαλδεΐδης σε ng/mL στον ορό αίματος ανάμεσα στα δύο φύλα.



Γράφημα 2. Μέσοι όροι και τυπικές αποκλίσεις της μαλονικής διαλδεΐδης σε ng/mL στο ΕΝΥ ανάμεσα στα δύο φύλα.

Συζήτηση- Συμπεράσματα

Η ΗΝΔ θεωρείται ως ένα πρόδρομο στάδιο μεταξύ της φυσιολογικής γήρανσης και της άνοιας, με την ΝΑ να αποτελεί την συχνότερη αιτία εξέλιξής της. Οι καθιερωμένοι και εγκεκριμένοι βιοδείκτες της ΝΑ

περιλαμβάνουν κυρίως τους βιοδείκτες των Αβ και τ πρωτεϊνών στο ENY, οι οποίοι σχετίζονται με τη νευροεκφύλιση και τη συσσώρευση των Αβ και τ πρωτεϊνών στον εγκέφαλο. Παράλληλα, οι βιοδείκτες οξειδωτικού στρες, όπως η MDA που εκφράζει τη λιπιδική υπεροξείδωση του οργανισμού, έχουν αναγνωριστεί ως σημαντικοί παράγοντες στην παθογένεση της ΝΑ. Μελέτες έχουν δείξει διαφοροποιήσεις ανάμεσα στα δυο φύλα έναντι του οξειδωτικού στρες, με τους άνδρες να παρουσιάζουν συχνά αυξημένο οξειδωτικό στρες, όπως υποδηλώνουν τα υψηλότερα επίπεδα MDA [24,25]. Τα μέχρι τώρα δεδομένα είναι περιορισμένα για τη σχέση των ατόμων ΗΝΔ με τα επίπεδα της MDA, ανάμεσα στα δύο φύλα.

Οι άνδρες στην ομάδα των ΗΝΔ (Α+) εμφάνισαν υψηλότερα επίπεδα της MDA στον ορό του αίματος συγκριτικά με τις γυναίκες στην αντίστοιχη ομάδα μελέτης. Το εύρημα αυτό στηρίζεται στη συμμετοχή ποικίλων παραγόντων που μπορεί να παίζουν σημαντικό ρόλο στην αύξηση της λιπιδικής υπεροξείδωσης, πιθανώς που είναι συνδεδεμένοι με τον τρόπο ζωής, τη γενετική προδιάθεση ή/και τους κοινωνικοοικονομικούς παράγοντες της εκάστοτε περιοχής [26]. Σύμφωνα με την Ελληνική Στατιστική Αρχή (ΕΛΣΤΑΤ) ορισμένες συνήθειες που συχνά εμφανίζει σε υψηλότερα ποσοστά ο ανδρικός πληθυσμός, όπως είναι το κάπνισμα, η κατανάλωση αλκοόλ και η ανθυγιεινή διατροφή [27], σχετίζονται με διαταραγμένο μεταβολισμό των λιπιδίων και κατά συνέπεια την αύξηση της λιπιδικής υπεροξείδωσης [25,28].

Οι άνδρες στην ομάδα των ΗΝΔ (Α+) εμφάνισαν υψηλότερα επίπεδα της MDA στο ENY συγκριτικά με τις γυναίκες στην αντίστοιχη ομάδα μελέτης. Σε προηγούμενες μελέτες, οι άνδρες με ΗΝΔ, χωρίς να διακρίνονται σε Α+ ή Α-, βρέθηκαν να έχουν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα MDA σε σύγκριση με μάρτυρες αντίστοιχης ηλικίας, υποδηλώνοντας την παρουσία του οξειδωτικού στρες που μπορεί να συμβάλει στη νοητική έκπτωση [23,29]. Αντίθετα, τα στοιχεία στις γυναίκες σχετικά με τα επίπεδα MDA στην ΗΝΔ είναι λιγότερο σαφή, με τη μελέτη των Wang και συν. να παρουσιάζει απουσία σημαντικών διαφορών [30]. Στη μελέτη αυτή συμμετείχαν άτομα που δεν είχαν βιοδείκτες στο ENY έτσι ώστε να αποτελούν ξεχωριστές ομάδες ΗΝΔ (Α+).

Η συμμετοχή της νευροφλεγμονής αποτελεί έναν κρίσιμο και σπουδαίο παράγοντα στην εξέλιξη της νόσου. Έχουν συσχετιστεί αυξημένα επίπεδα φλεγμονωδών δεικτών σε άτομα με νοητική έκπτωση. Πρόσφατη σχετικά μελέτη έδειξε ότι το ανδρικό φύλο μπορεί να εμφανίσει αυξημένη φλεγμονώδη

απόκριση στα νευροεκφυλιστικά νοσήματα [31]. Η αυξημένη φλεγμονή θα μπορούσε να επιδεινώσει το οξειδωτικό στρες, οδηγώντας σε αυξημένα MDA επίπεδα στους άνδρες με ΗΝΔ, ενώ οι γυναίκες μπορεί να έχουν μια πιο αποτελεσματική απόκριση και στη φλεγμονή και σε στρεσογόνους παράγοντες.

Η διαφορετική συμπεριφορά του γυναικείου φύλου έναντι διαφόρων στρεσογόνων παραγόντων μπορεί να οφείλεται και να σχετίζεται με την δράση των φυλετικών ορμονών [32–35]. Μελέτη έδειξε ότι σε ένα περιβάλλον χαμηλού οξειδωτικού στρες, η τεστοστερόνη συσχετίστηκε θετικά με το επίπεδο του αντιοξειδωτικού GST, ενώ δεν παρατηρήθηκαν επιβλαβείς επιδράσεις στη γνωστική λειτουργία. Αντίθετα, σε συνθήκες υψηλού οξειδωτικού στρες (επίπεδα ομοκυστεΐνης $>12 \mu\text{mol/L}$), η τεστοστερόνη και η ωχρινότροπος ορμόνη συσχετίστηκαν με γνωστική εξασθένηση [35]. Σύμφωνα με τον Rocca Walter, η φυλετική ορμόνη που παρουσιάζει σημαντική μεταβολή των επιπέδων της σε άτομα προχωρημένης ηλικίας άνω των 50 ετών είναι τα επίπεδα της τεστοστερόνης. Πέραν, όμως, των φυλετικών ορμονών κι άλλοι παράγοντες εμπλέκονται και σχετίζονται στη διαφορετική συμπεριφορά ανδρών και γυναικών στον κίνδυνο εμφάνισης άνοιας ή ΝΑ, όπως το γενετικό υπόβαθρο, το επίπεδο εκπαίδευσης, η αμφοτερόπλευρη ωθηκεκτομή στις γυναίκες, η κοινωνική και η πνευματική έκφραση του φύλου με βάση τις συνθήκες της εκάστοτε περιοχής και χρονικής περιόδου [36,37].

Οι διαφορές στα επίπεδα της MDA στα δυο φύλα δεν έχουν μελετηθεί εκτενώς, για τον λόγο αυτό περαιτέρω ερευνητικές μελέτες είναι απαραίτητο να γίνουν, ώστε να μελετηθούν κι άλλοι βιοδείκτες οξειδωτικού στρες σε συνδυασμό με τους ήδη εγκεκριμένους και με άλλους πιθανούς εμπλεκόμενους παράγοντες, σε μεγαλύτερο αριθμό ατόμων ανάμεσα στους άνδρες και στις γυναίκες.

Συμπερασματικά, παρατηρήθηκε αυξημένη λιπιδική υπεροξείδωση στα δυο βιολογικά υλικά, στους άνδρες που έπασχαν από ΗΝΔ και ήταν σε κίνδυνο να αναπτύξουν ΝΑ. Αντίθετα, στις γυναίκες παρατηρήθηκε αυξημένη λιπιδική υπεροξείδωση στο ΕΝΥ, μόνο σε αυτές που έπασχαν με ΗΝΔ και δεν ήταν σε κίνδυνο να αναπτύξουν ΝΑ. Στις δυο κατηγορίες των ατόμων με ΗΝΔ, οι άνδρες εμφάνισαν αυξημένη λιπιδική υπεροξείδωση έναντι των γυναικών, σε υψηλότερα επίπεδα στους άνδρες με ΗΝΔ (Α+), πιθανώς λόγω της επίδρασης των φυλετικών ορμονών κι άλλων γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων. Τα ευρήματά μας αναδεικνύουν τη σημασία της εξατομικευμένης προσέγγισης λαμβάνοντας υπόψιν το φύλο και τον έλεγχο της λιπιδικής υπεροξείδωσης για την πρόληψη και την καλύτερη διαχείριση των ατόμων στα αρχικά στάδια της ΝΑ.

Βιβλιογραφία

- [1] Scheltens P, Blennow K, Breteler MMB, de Strooper B, Frisoni GB, Salloway S, et al. Alzheimer's disease. *Lancet* 2016;388:505–17. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)01124-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)01124-1).
- [2] Plascencia-Villa G, Perry G. Preventive and Therapeutic Strategies in Alzheimer's Disease: Focus on Oxidative Stress, Redox Metals, and Ferroptosis. *Antioxid Redox Signal* 2021;34:591. <https://doi.org/10.1089/ARS.2020.8134>.
- [3] Tahami Monfared AA, Phan NTN, Pearson I, Mauskopf J, Cho M, Zhang Q, et al. A Systematic Review of Clinical Practice Guidelines for Alzheimer's Disease and Strategies for Future Advancements. *Neurol Ther* 2023;12:1257–84. <https://doi.org/10.1007/S40120-023-00504-6>.
- [4] Varesi A, Carrara A, Pires VG, Floris V, Pierella E, Savioli G, et al. Blood-Based Biomarkers for Alzheimer's Disease Diagnosis and Progression: An Overview. *Cells* 2022;11:1367. <https://doi.org/10.3390/CELLS11081367>.
- [5] Wittenberg R, Hu B, Jagger C, Kingston A, Knapp M, Comas-Herrera A, et al. Projections of care for older people with dementia in England: 2015 to 2040. *Age Ageing* 2020;49:264–9. <https://doi.org/10.1093/AGEING/AFZ154>.
- [6] Maresova P, Mohelska H, Dolejs J, Kuca K. Socio-economic Aspects of Alzheimer's Disease. *Curr Alzheimer Res* 2015;12:903–11. <https://doi.org/10.2174/156720501209151019111448>.
- [7] Lloret A, Esteve D, Lloret MA, Cervera-Ferri A, Lopez B, Nepomuceno M, et al. When Does Alzheimer's Disease Really Start? The Role of Biomarkers. *Int J Mol Sci* 2019;20:5536. <https://doi.org/10.3390/IJMS20225536>.
- [8] Mahaman YAR, Embaye KS, Huang F, Li L, Zhu F, Wang JZ, et al. Biomarkers used in Alzheimer's disease diagnosis, treatment, and prevention. *Ageing Res Rev* 2022;74:101544. <https://doi.org/10.1016/J.ARR.2021.101544>.
- [9] Varesi A, Pierella E, Romeo M, Piccini GB, Alfano C, Bjørklund G, et al. The Potential Role of Gut Microbiota in Alzheimer's Disease: From Diagnosis to Treatment. *Nutrients* 2022, Vol 14, Page 668 2022;14:668. <https://doi.org/10.3390/NU14030668>.
- [10] Erickson P, Simrén J, Brum WS, Ennis GE, Kollmorgen G, Suridjan I, et al. Prevalence and Clinical Implications of a β -Amyloid-Negative, Tau-Positive Cerebrospinal Fluid Biomarker Profile in Alzheimer Disease. *JAMA Neurol* 2023;80:969–79. <https://doi.org/10.1001/JAMANEUROL.2023.2338>.
- [11] Simrén J, Leuzy A, Karikari TK, Hye A, Benedet AL, Lantero-Rodriguez J, et al. The diagnostic and prognostic capabilities of plasma biomarkers in Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 2021;17:1145–56. <https://doi.org/10.1002/ALZ.12283>.

- [12] Tao QQ, Cai X, Xue YY, Ge W, Yue L, Li XY, et al. Alzheimer's disease early diagnostic and staging biomarkers revealed by large-scale cerebrospinal fluid and serum proteomic profiling. *Innovation* (Cambridge (Mass)) 2024;5:100544. <https://doi.org/10.1016/J.XINN.2023.100544>.
- [13] Tiwari S, Atluri V, Kaushik A, Yndart A, Nair M. Alzheimer's disease: pathogenesis, diagnostics, and therapeutics. *Int J Nanomedicine* 2019;14:5541–54. <https://doi.org/10.2147/IJN.S200490>.
- [14] Rostagno AA. Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci* 2023;24:107. <https://doi.org/10.3390/IJMS24010107>.
- [15] Yang Y, Qiu L. Research Progress on the Pathogenesis, Diagnosis, and Drug Therapy of Alzheimer's Disease. *Brain Sciences* 2024, Vol 14, Page 590 2024;14:590. <https://doi.org/10.3390/BRAINS14060590>.
- [16] Ogbodo JO, Agbo CP, Njoku UO, Ogugofor MO, Egba SI, Ihim SA, et al. Alzheimer's Disease: Pathogenesis and Therapeutic Interventions. *Curr Aging Sci* 2022;15:2–25. <https://doi.org/10.2174/1874609814666210302085232>.
- [17] Twarowski B, Herbet M. Inflammatory Processes in Alzheimer's Disease—Pathomechanism, Diagnosis and Treatment: A Review. *Int J Mol Sci* 2023;24:6518. <https://doi.org/10.3390/IJMS24076518>.
- [18] Monteiro AR, Barbosa DJ, Remião F, Silva R. Alzheimer's disease: Insights and new prospects in disease pathophysiology, biomarkers and disease-modifying drugs. *Biochem Pharmacol* 2023;211:115522. <https://doi.org/10.1016/J.BCP.2023.115522>.
- [19] Ekundayo BE, Obafemi TO, Adewale OB, Obafemi BA, Oyinloye BE, Ekundayo SK. Oxidative Stress, Endoplasmic Reticulum Stress and Apoptosis in the Pathology of Alzheimer's Disease. *Cell Biochem Biophys* 2024;82:457–77. <https://doi.org/10.1007/S12013-024-01248-2>.
- [20] Arslan J, Jamshed H, Qureshi H. Early Detection and Prevention of Alzheimer's Disease: Role of Oxidative Markers and Natural Antioxidants. *Front Aging Neurosci* 2020;12:231. <https://doi.org/10.3389/FNAGI.2020.00231>.
- [21] Skoumalová A, Hort J. Blood markers of oxidative stress in Alzheimer's disease. *J Cell Mol Med* 2012;16:2291. <https://doi.org/10.1111/J.1582-4934.2012.01585.X>.
- [22] Guven A, Dalginli KY, Culhaoglu H, Huseyinoglu N, Alp SI. Investigation of the Levels of Blood MDA, GSH and Nitric Oxide Levels in Patients with Probable Alzheimer's Disease. *Kafkas Journal of Medical Sciences* 2020;10:188. <https://doi.org/10.5505/KJMS.2020.89801>.
- [23] Liu Z, Liu Y, Tu X, Shen H, Qiu H, Chen H, et al. High Serum Levels of Malondialdehyde and 8-OHdG are both Associated with Early Cognitive Impairment in Patients with Acute Ischaemic Stroke. *Sci Rep* 2017;7:9493. <https://doi.org/10.1038/S41598-017-09988-3>.

- [24] Kander MC, Cui Y, Liu Z. Gender difference in oxidative stress: a new look at the mechanisms for cardiovascular diseases. *J Cell Mol Med* 2016;21:1024. <https://doi.org/10.1111/JCMM.13038>.
- [25] Yu S, Qian L, Ma J. The influence of gender and wealth inequality on Alzheimer's disease among the elderly: A global study. *Heliyon* 2023;9:e14677. <https://doi.org/10.1016/J.HELİYON.2023.E14677>.
- [26] Deciphering the Interplay of Age, Gender, Education, and Heart Rate in Dementia among the Elderly Population of Wakiso, Uganda n.d. https://figshare.com/articles/dataset/_b_Deciphering_the_Interplay_of_Age_Gender_Education_and_Heart_Rate_in_Dementia_among_the_Elderly_Population_of_Wakiso_Uganda_b_/25205219?file=44508656 (accessed January 5, 2025).
- [27] 3.1 Διατροφικές συνήθειες και άθληση n.d. https://www.statistics.gr/infograph/womenmen/bloc-3a.html?utm_source=chatgpt.com (accessed January 25, 2025).
- [28] Miller ER, Appel LJ, Jiang L, Risby TH. Association between cigarette smoking and lipid peroxidation in a controlled feeding study. *Circulation* 1997;96:1097–101. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.96.4.1097>.
- [29] Liu J, Sun S, Chen Y. Superoxide Dismutase Modified the Association of Serum Malondialdehyde Levels with Cognitive Decline Among Older Adults: Findings from the Chinese Longitudinal Healthy Longevity Survey. *J Alzheimers Dis* 2024;99:657–65. <https://doi.org/10.3233/JAD-231278>.
- [30] Wang L, Tian T, Initiative ADN. Gender Differences in Elderly With Subjective Cognitive Decline. *Front Aging Neurosci* 2018;10:166. <https://doi.org/10.3389/FNAGI.2018.00166>.
- [31] Krebs SJ, Slike BM, Sithinamsuwan P, Allen IE, Chalermchai T, Tipsuk S, et al. Sex differences in soluble markers vary before and after the initiation of antiretroviral therapy in chronically HIV-infected individuals. *AIDS* 2016;30:1533–42. <https://doi.org/10.1097/QAD.0000000000001096>.
- [32] Palmisano BT, Zhu L, Stafford JM. Estrogens in the Regulation of Liver Lipid Metabolism. *Adv Exp Med Biol* 2017;1043:227. https://doi.org/10.1007/978-3-319-70178-3_12.
- [33] Xu L, Yuan Y, Che Z, Tan X, Wu B, Wang C, et al. The Hepatoprotective and Hepatotoxic Roles of Sex and Sex-Related Hormones. *Front Immunol* 2022;13:939631. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2022.939631>.
- [34] Grimm A, Lim YA, Mensah-Nyagan AG, Götz J, Eckert A. Alzheimer's Disease, Oestrogen and Mitochondria: an Ambiguous Relationship. *Mol Neurobiol* 2012;46:151. <https://doi.org/10.1007/S12035-012-8281-X>.

- [35] Cunningham RL, Singh M, O'Bryant SE, Hall JR, Barber RC. Oxidative stress, testosterone, and cognition among Caucasian and Mexican-American men with and without Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2014;40:563–73. <https://doi.org/10.3233/JAD-131994>.
- [36] Rocca WA. Time, Sex, Gender, History, and Dementia. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 2017;31:76–9. <https://doi.org/10.1097/WAD.0000000000000187>.
- [37] Rocca WA, Mielke MM, Vemuri P, Miller VM. Sex and gender differences in the causes of dementia: a narrative review. *Maturitas* 2014;79:196–201. <https://doi.org/10.1016/J.MATURITAS.2014.05.008>.

ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗ ΚΑΙ ΚΛΙΝΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ m6A RNA ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΩΝ ΩΟΘΗΚΩΝ

Ελένη-Φωτεινή Πασιαλχί^{1, #}, Κωνσταντίνα Πανουτσοπούλου^{1, 2, #}, Eva Obermayr³, Sven Mahner⁴, Toon van Gorp⁵, Ioana Braicu⁶, Robert Zeillinger³, Ανδρέας Σκορίλας^{1, *}, Μαργαρίτης Αυγέρης^{1, 2, *}

¹ Τομέας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα, Ελλάδα

² Εργαστήριο Κλινικής Βιοχημείας - Μοριακής Διαγνωστικής, Β' Παιδιατρική Κλινική, Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Νοσοκομείο Παιδών «Π. & Α. Κυριακού», Αθήνα, Ελλάδα

³ Molecular Oncology Group, Department of Obstetrics and Gynecology, Comprehensive Cancer Center-Gynecologic Cancer Unit, Medical University of Vienna, Vienna, Austria

⁴ Department of Gynecology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany, AGO; current address: Department of Obstetrics and Gynecology, University Hospital, Ludwig-Maximilians-University Munich, Munich, Germany

⁵ Department of Obstetrics and Gynaecology, Division of Gynecologic Oncology, University Hospital Leuven, Leuven Cancer Institute, Leuven, Belgium

⁶ Department of Gynecology, Charité University Medicine, Campus Virchow, Berlin, Germany

Ίση συνεισφορά ως πρώτοι συγγραφείς

* e-mail: margaritis.avgeris@gmail.com; mavgeris@med.uoa.gr

Εισαγωγή

Ο καρκίνος των ωοθηκών (Ovarian Cancer, OC) είναι ο δεύτερος πιο συχνά διαγνωσμένος και ο πλέον θανατηφόρος γυναικολογικός καρκίνος στις ανεπτυγμένες χώρες, αντιπροσωπεύοντας περίπου το 5% των θανάτων γυναικών από καρκίνο παγκοσμίως [1, 2]. Στην Ελλάδα, ο καρκίνος των ωοθηκών είναι η πέμπτη πιο συχνή αιτία θανάτου από καρκίνο στις γυναίκες [3]. Ο καρκίνος των ωοθηκών περιλαμβάνει μια ετερογενή ομάδα κακοηθειών που διαφέρουν ως προς την αιτιολογία, τη μοριακή βιολογία, την

πρόγνωση και την ανταπόκριση στην (χημειο)θεραπεία των ασθενών. Το 90% των όγκων των ωοθηκών είναι επιθηλιακού τύπου και περιλαμβάνει τους εξής υποτύπους: τον ορώδη, τον ενδομητριοειδή, το διαυγοκυτταρικό και το βλεννώδη. Ο πιο συχνά διαγνωσμένος υπότυπος είναι το υψηλού βαθμού κακοήθειας ορώδες καρκίνωμα (High Grade Serous Ovarian Cancer, HGSOC) [4]. Παρόλο που η πρόωγη διάγνωση (FIGO I/II) οδηγεί σε 5ετή επιβίωση >90%, οι περισσότερες ασθενείς (~75%) διαγιγνώσκονται σε προχωρημένα στάδια της νόσου (FIGO III/IV) με αποτέλεσμα φτωχή ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία, βραχυπρόθεσμη εξέλιξη της νόσου και 5ετή επιβίωση <25%, τη δυσμενέστερη μεταξύ όλων των γυναικολογικών κακοηθειών [5]. Η αξιόπιστη και έγκαιρη διάγνωση της νόσου θα μπορούσε να αυξήσει σημαντικά τα ποσοστά επιβίωσης των ασθενών. Δυστυχώς, αυτή αποδεικνύεται δύσκολη, όπως ανέδειξε η 20ετής έρευνα UKCTOCS (UK Collaborative Trial of Ovarian Cancer Screening), η μεγαλύτερη δοκιμή προ-συμπτωματικού ελέγχου για τον καρκίνο των ωοθηκών μέχρι σήμερα. Παράλληλα, η αξιοσημείωτη πρόοδος που έχει σημειωθεί στις χειρουργικές τεχνικές και τις στοχευμένες θεραπείες δεν έχει βελτιώσει σημαντικά το σχετικά υψηλό ποσοστό θανάτου των ασθενών με προχωρημένη νόσο [5, 6]. Στο πλαίσιο αυτό, η ανακάλυψη και αξιοποίηση νέων μοριακών δεικτών κρίνεται απαραίτητη για τη βελτίωση της εξατομικευμένης πρόγνωσης και την ενίσχυση της ιατρικής ακριβείας, καθιστώντας την κρίσιμη για την εξέλιξη της σύγχρονης κλινικής πρακτικής.

Οι μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις του RNA έχει αποδειχθεί ότι ελέγχουν πολλαπλές πτυχές του μεταβολισμού και του κύκλου ζωής του, συμπεριλαμβανομένων της επεξεργασίας, της έναρξης της μετάφρασης και της αποικοδόμησής του, ελέγχοντας τη γονιδιακή έκφραση και δημιουργώντας ένα αναδυόμενο πεδίο στη βιολογία του RNA, γνωστό ως «*επιμεταγράψωμα*» ή «*επιγενετική του RNA*» [7]. Η N6-μεθυλαδενοσίνη (m6A) είναι μια δυναμική, διαδεδομένη και αναστρέψιμη τροποποίηση του RNA που ρυθμίζει τη γονιδιακή έκφραση επηρεάζοντας πολλαπλές πτυχές του μεταβολισμού του RNA. Αποτελεί την πιο άφθονη τροποποίηση mRNA στα θηλαστικά, αντιπροσωπεύοντας το ~50% των συνολικών μεθυλιωμένων ριβονουκλεοτιδίων [8, 9] και εμφανίζεται εντός συντηρημένων μοτίβων DRACH (D = G/A/U, R = G/A, A = m6A, H = A/U/C). Έχει αποδειχθεί ότι ρυθμίζει τη σταθερότητα, το μάτισμα, τη μετάφραση και τη δομή του RNA. Ο δυναμικός χαρακτήρας m6A μεθυλίωσης καταλύεται από εξελικτικά συντηρημένα σύμπλοκα που αποτελούνται από «*m6A writers*» (m6A μεθυλοτρανσφεράσες) και «*m6A erasers*» (m6A απομεθυλάσες), ενώ η επίδραση του m6A εντυπώματος αποκωδικοποιείται από «*m6A readers*» (πρωτεΐνες που δεσμεύονται στο RNA και αναγνωρίζουν το m6A) [9]. Αποτελεί βασικό ρυθμιστικό παράγοντα της μετα-μεταγραφικής δραστηριότητας σε

διάφορους τύπους RNA, όπως mRNAs, tRNAs, rRNAs, miRNAs, lncRNAs και circRNAs [10]. Η m6A μεθυλίωση είναι κρίσιμη για την ανάπτυξη διαφόρων συστημάτων στους οργανισμούς και η διαταραχή της σχετίζεται με τον καρκίνο, επηρεάζοντας τη γονιδιακή έκφραση ως ογκογόνος ή ογκοκατασταλτικός παράγοντας [10, 11].

Η πρώτη m6A απομεθυλάση, FTO (FTO alpha-ketoglutarate dependent dioxygenase) ανακαλύφθηκε το 2011. Η FTO εκφράζεται σε ένα ευρύ φάσμα ιστών ενηλίκων και εμβρύων, με τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης να παρατηρούνται στον εγκέφαλο [12]. Η έκφρασή της ποικίλλει σε διάφορους τύπους καρκίνου, επηρεάζοντας τόσο την πρόγνωση όσο και την ανταπόκριση στη θεραπεία, ενώ έχει επίσης συσχετιστεί με την αντίσταση στη χημειοθεραπεία. Δεδομένου του ρόλου της στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης και της εξέλιξης του καρκίνου, αναδεικνύεται σε πολλά υποσχόμενο καρκινικό βιοδείκτη για διάφορες ανθρώπινες κακοήθειες [13-15].

Σκοπός, της παρούσας μελέτης αποτελεί η διερεύνηση του ρόλου της m6A μεθυλίωσης του RNA και της m6A απομεθυλάσης FTO στην παθογένεια και την πρόγνωση του επιθηλιακού καρκίνου των ωοθηκών.

Υλικά-Μέθοδοι

Βιολογικό υλικό – Ομάδα ελέγχου

Το βιολογικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε για τους σκοπούς της συγκεκριμένης μελέτης αποτελείται από δείγματα ιστοτεμαχίων μιας ομοιογενούς ομάδας 100 ασθενών με ορώδη καρκίνο ωοθηκών προχωρημένου σταδίου (FIGO III/IV) από την OVCAD ευρωπαϊκή πολυκεντρική μελέτη [16]. Οι ασθενείς έλαβαν χημειοθεραπεία πρώτης γραμμής με βάση την πλατίνα, και νεοεπικουρική θεραπεία σύμφωνα με τις συστάσεις των θεραπόντων ιατρών. Οι ασθενείς αξιολογήθηκαν για την ανταπόκρισή τους στη θεραπεία και την εξέλιξη της νόσου σύμφωνα με τα κριτήρια RECIST ή την μέτρηση του CA125 (κριτήρια GCIg) [17, 18]. Η μελέτη διεξήχθη σύμφωνα με τα δεοντολογικά πρότυπα της Διακήρυξης του Ελσίνκι του 1975, όπως αναθεωρήθηκε το 2008. Το πρωτόκολλο μελέτης εγκρίθηκε από τις τοπικές επιτροπές δεοντολογίας των συμμετεχόντων εταίρων OVCAD. Ελήφθη γραπτή ενημερωμένη συγκατάθεση από όλους τους συμμετέχοντες ασθενείς.

Ομάδα Επικύρωσης

Για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων, χρησιμοποιήθηκαν τα RNAseq δεδομένα της TCGA-OV ομάδας επικύρωσης, τα οποία αναλύθηκαν μέσω του Xena Browser (<https://xenabrowser.net/>). Η ομάδα επικύρωσης TCGA-OV αποτελείται από 307 ασθενείς με ορώδες καρκίνωμα των ωοθηκών.

Ομογενοποίηση ιστών - Απομόνωση RNA

Έπειτα από ομογενοποίηση των ιστοτεμαχίων των ωοθηκών με υγρό άζωτο πραγματοποιήθηκε η απομόνωση ολικού RNA βάσει της μέθοδου Chomczynski με τη χρήση του αντιδραστηρίου TRI[®]zol Reagent (Molecular Research Center, Inc., Cincinnati, OH, USA). Το ολικό RNA διαλυτοποιήθηκε σε RNA Storage Solution (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) και ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης και της καθαρότητας πραγματοποιήθηκε φασματοφωτομετρικά.

Αντίστροφη μεταγραφή

1 µg ολικού RNA υποβλήθηκε σε αντίστροφη μεταγραφή, χρησιμοποιώντας oligo(dT) σε τελικό όγκο αντίδρασης 20 µL, που περιείχε 50 U M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen), 40 U RNaseOUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor (Invitrogen), 500 µM dNTPs mix και 2.5 µM oligo(dT). Τέλος, η αντίδραση έλαβε χώρα στους 37 °C για 60 min, για να ακολουθήσει θερμική απενεργοποίηση του ενζύμου στους 70 °C για 15 min.

Ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (Real-Time qPCR)

Για την ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης του *FTO* αναπτύχθηκαν και βελτιστοποιήθηκαν πρωτόκολλα qPCR, με χρήση της φθορίζουσας χρωστικής SYBR Green I. Στο πλαίσιο αυτό, σχεδιαστήκαν ειδικοί πρόσθιοι και ανάστροφοι εκκινητές για το *FTO* και το γονίδιο αναφοράς *HPRT1* βάσει των δημοσιευμένων αλληλουχιών τους (NCBI Reference Sequence: NM_001080432.3 για το *FTO* και

NM_000194.3 για το *HPRT1*). Ο ειδικός πρόσθιος εκκινητής F: 5'-ATCTCAATGCCACCCACCACCAA-3' και ο ανάστροφος R: 5'-AATGCAAGGTTCTGTGAGCA-3' χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση ενός ειδικού για το *FTO* προϊόντος μεγέθους 99 bp. Ο πρόσθιος για το *HPRT1* F: 5'-TGGAAGGGTGTATTTCCTCAT-3' και ο ανάστροφος R: 5'-ATGTAATCCCCAGCAGGTCAGCAA-3' για την ενίσχυση ενός ειδικού προϊόντος μεγέθους 151 bp. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν στο QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System, περιλαμβάνοντας Kapa SYBR® Fast Universal 2X qPCR Master Mix (Kapa Biosystems, Inc., Woburn, MA, USA), 200 nM πρόσθιου και ανάστροφου εκκινητή και 0.2 ng cDNA υποστρώματος σε τελικό όγκο 10 µL. Η ανάλυση έκφρασης του *FTO* διεξήχθη με τη μέθοδο της σχετικής ποσοτικοποίησης $2^{-\Delta\Delta CT}$. Ως γονίδιο αναφοράς για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το *HPRT1*.

Ποσοτικοποίηση m6A RNA

Για την ποσοτικοποίηση της m6A τροποποίησης του RNA των όγκων των ωοθηκών, χρησιμοποιήθηκε το EpiQuik™ m6A RNA Methylation Quantification Kit (Colorimetric) (Epigentek Group Inc., Farmingdale, NY, USA), το οποίο βασίζεται σε χρωματομετρική ELISA-like μέθοδο, σύμφωνα με τις οδηγίες του παρασκευαστή.

Διαμόλυνση κυττάρων

Για την αποσίωση της έκφρασης του *FTO* δημιουργήθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν δύο small interfering RNAs (siRNAs) που στοχεύουν διαφορετικά εξώνια. $0,4 \times 10^5$ SK-OV-3 κύτταρα τοποθετήθηκαν σε μικροπλάκα καλλιέργειας 24-θέσεων και καλλιεργήθηκαν χωρίς προσθήκη αντιβιοτικών σε θρεπτικό μέσο (McCoy's 5A Medium, 10% FBS) για 24 h. SK-OV-3 κύτταρα σε πυκνότητα 70-80% διαμολύνθηκαν με 0,1 nM, 1 nM ή 10 nM siRNAs με χρήση Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen), σύμφωνα με τις οδηγίες του παρασκευαστή. Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα Mock, χωρίς προσθήκη siRNAs. 48 ώρες αργότερα, συλλέχθηκαν κύτταρα, εκχυλίστηκε το ολικό RNA και μετρήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης του *FTO* με RT-qPCR για να διαπιστωθεί η αποτελεσματικότητα της διαμόλυνσης.

Μέτρηση ρυθμού κυτταρικού πολλαπλασιασμού

Η αξιολόγηση της επίδρασης του FTO στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των SK-OV-3 διεξήχθη με Cell Counting Kit 8 (CCK-8; Abcam). 12 ώρες μετά τη διαμόλυνση, τα κύτταρα συλλέγονται με επίδραση θρυψίνης και επιστρώνονται σε μικροπλάκα καλλιέργειας 96-θέσεων, με αρχική πυκνότητα 4×10^3 κύτταρα/well σε πλήρες θρεπτικό υλικό (McCoy's 5A Medium, 10% FBS, 1% Pen-Strep). 0, 24, 48, 72 και 96 ώρες μετά ακολούθησε η προσθήκη 10 μ L του CCK-8 αντιδραστηρίου και η απορρόφηση του κάθε δείγματος μετρήθηκε χρησιμοποιώντας συσκευή ανάγνωσης μικροπλακών (HumaReader HS) στα 450nm.

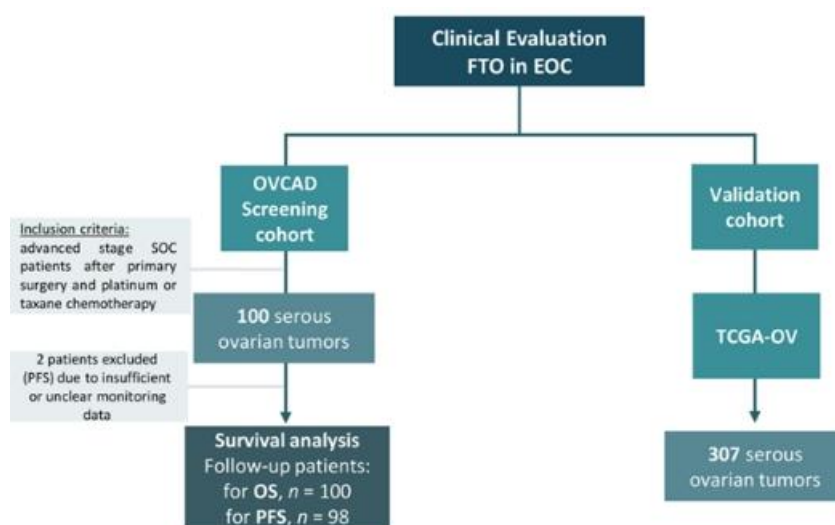
Βιοστατιστική ανάλυση

Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του λογισμικού IBM SPSS Statistics 20 (IBM Corp., Armonk, NY, USA). Η TCGA-OV (n=307) χρησιμοποιήθηκε ως ομάδα επικύρωσης. Η ανάλυση επιβίωσης απεικονίστηκε με καμπύλες Kaplan-Meier, χρησιμοποιώντας log-rank test, ενώ ο συντελεστής σχετικού κινδύνου (Hazard Ratio, HR) υπολογίστηκε με ανάλυση παλινδρόμησης κατά Cox (Cox proportional-hazard regression analysis). Αναλυτικότερα, μελετήθηκε η ολική επιβίωση (overall survival - OS) και η επιβίωση χωρίς εξέλιξη της νόσου (progression-free survival – PFS). Η PFS υπολογίστηκε ως ο χρόνος ανάμεσα στη χειρουργική κυτταρομειωτική επέμβαση και την εξέλιξη των ασθενών (end-point cases) ή τον πιο πρόσφατο κλινικό έλεγχο των ασθενών που δεν ανέπτυξαν εξέλιξη, μέχρι την ολοκλήρωση της μελέτης (censored cases). Η OS υπολογίστηκε ως χρόνος από την χειρουργική κυτταρομειωτική επέμβαση και τον θάνατο αυτών (end-point cases) ή την ολοκλήρωση της μελέτης και της παρακολούθησης (follow-up) για τους ασθενείς εν ζωή (censored cases). Ο αλγόριθμος X-tile [19] χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της βέλτιστης τιμής λήψης απόφασης (cut-off) των επιπέδων έκφρασης του FTO στους όγκους ωοθήκης, και η μέθοδος Bootstrap χρησιμοποιήθηκε για εσωτερική επικύρωση. Για την ανάλυση της σχέσης μεταξύ των επιπέδων έκφρασης του FTO και του m6A εφαρμόστηκε ο συντελεστής συσχέτισης Spearman. Η στατιστική σημαντικότητα των διαφορών στον ρυθμό ανάπτυξης των κυττάρων εξετάστηκε με το Student's t-test, συγκρίνοντας τις πειραματικές ομάδες με τα κύτταρα mock.

Αποτελέσματα

Κλινική αξιολόγηση των επιπέδων FTO στον επιθηλιακό καρκίνο των ωοθηκών

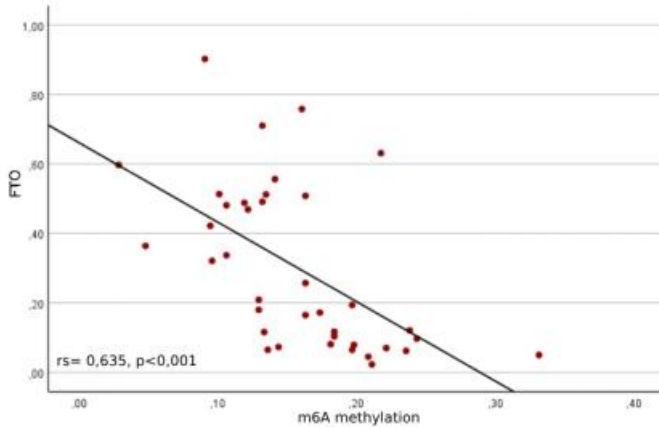
Η μελέτη περιελάμβανε 100 ασθενείς από την ευρωπαϊκή πολυκεντρική ομάδα OVCAD καθώς και 307 ασθενείς από την TCGA-OV ομάδα επικύρωσης με ορώδη καρκίνο ωοθηκών (Εικ. 1).



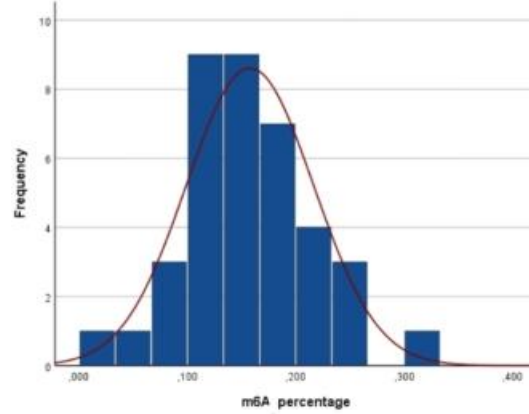
Εικόνα 1 Διάγραμμα Ροής Μελέτης

Αρχικά πραγματοποιήθηκε ποσοτικοποίηση της m6A μεθυλίωσης στο ολικό RNA των δειγμάτων και το ποσοστό της κυμάνθηκε μεταξύ 0.03-0.33% του συνόλου των αδενινών (A) (Εικ.2). Στη συνέχεια, η υπερέκφραση του *FTO* συσχετίστηκε με σημαντικά χαμηλότερη m6A μεθυλίωση του RNA (Εικ. 3) ($rs=0,635$, $p<0,001$) και υψηλότερο κίνδυνο πρώιμης εξέλιξης ($\log$ -rank $p=0.012$; $HR=1.726$, $p=0.016$) και κακής ολικής επιβίωσης ($\log$ -rank $p<0.001$; $HR=2.943$, $p<0.001$) (Εικ.4) μετά από χημειοθεραπεία πρώτης γραμμής με βάση την πλατίνα, όπως έδειξαν οι αναλύσεις Kaplan-Meier και μονομεταβλητής ανάλυσης παλινδρόμησης κατά Cox. Τα πολυμεταβλητά μοντέλα παλινδρόμησης κατά Cox, προσαρμοσμένα για το στάδιο FIGO, τον βαθμό διαφοροποίησης του όγκου (grade), το μέγεθος του υπολειπόμενου όγκου και την ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία, επιβεβαίωσαν ότι η αρνητική προγνωστική επίδραση των αυξημένων επιπέδων FTO είναι ανεξάρτητη από τους καθιερωμένους κλινικούς δείκτες της νόσου ($HR=3.497$, $p=0.003$ για το OS; $HR=1.744$, $p=0.014$ για το PFS) (Εικ. 4). Επιπλέον, η ανάλυση του συνόλου

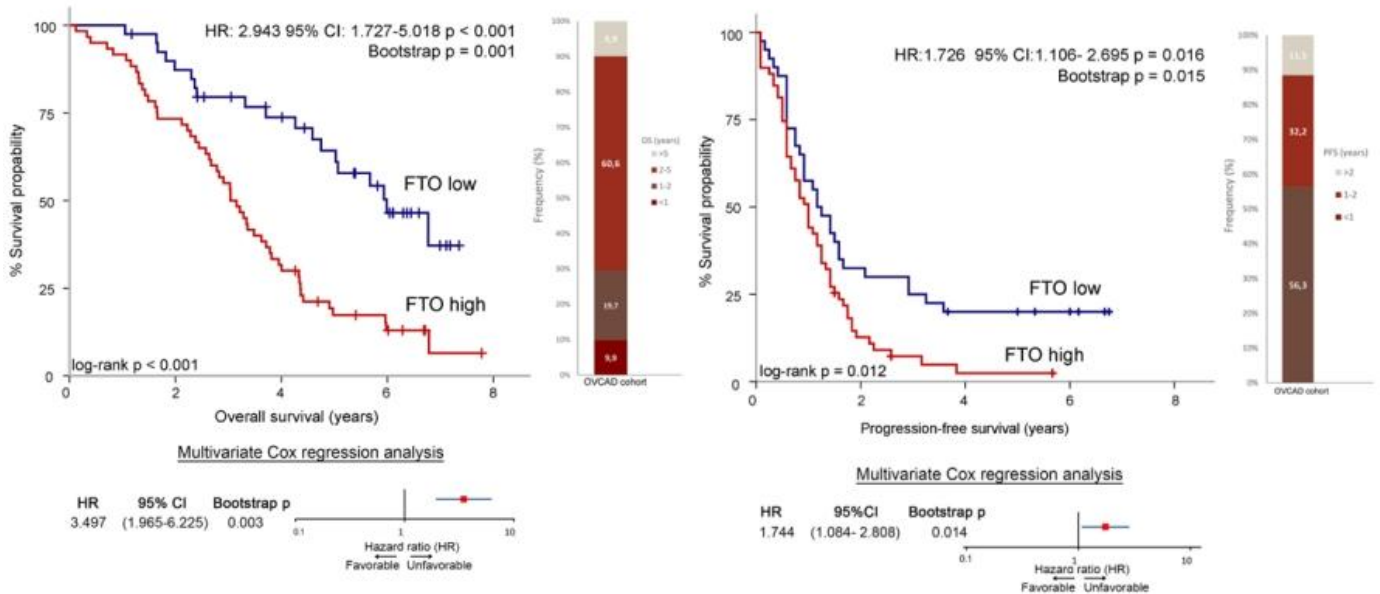
δεδομένων TCGA-OV επικύρωσε τη συσχέτιση μεταξύ υψηλής έκφρασης *FTO* και δυσμενούς ολικής επιβίωσης ($p=0.032$) (Εικ. 5).



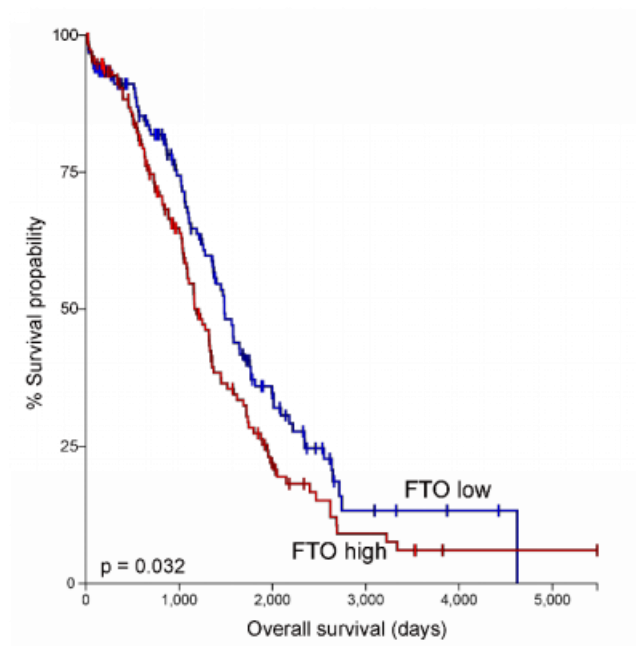
Εικόνα 2. Ιστογράμμο %m6A RNA μεθυλίωσης



Εικόνα 3. Διάγραμμα συσχέτισης Spearman των επιπέδων έκφρασης του *FTO* και της %m6A μεθυλίωσης



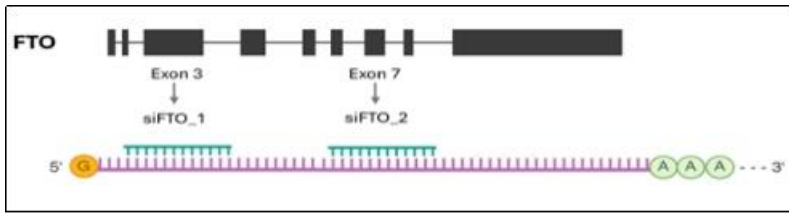
Εικόνα 4. (Α) Καμπύλες επιβίωσης Kaplan-Meier και μονομεταβλητή ανάλυση παλινδρόμησης Cox για την ολική επιβίωση (OS) ανάλογα με τα επίπεδα *FTO*. Forest plot της πολυμεταβλητής ανάλυσης παλινδρόμησης κατά Cox. (Β) Καμπύλες επιβίωσης Kaplan-Meier και μονομεταβλητή ανάλυση παλινδρόμησης κατά Cox για την επιβίωση χωρίς εξέλιξη (PFS) ανάλογα με τα



Εικόνα 5. Καμπύλη Kaplan-Meier ολικής επιβίωσης (OS) της ομάδας επικύρωσης TCGA-OV με βάση τα επίπεδα έκφρασης του *FTO*.

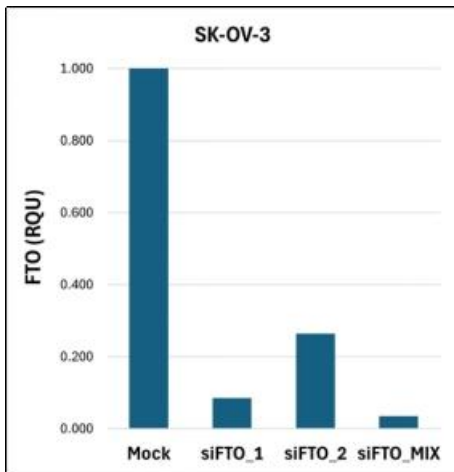
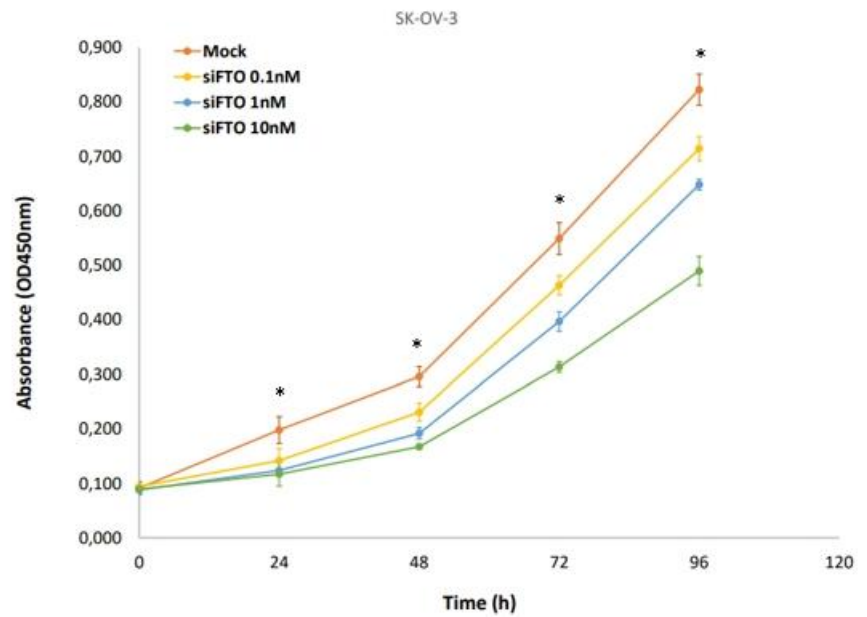
Η υποέκφραση του *FTO* μειώνει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό *in vitro*

Για την *in vitro* μελέτη σχεδιάστηκαν δυο siRNAs που στοχεύουν το *FTO* (Εικ. 6) και χρησιμοποιήθηκε η καρκινική κυτταρική σειρά SK-OV-3. Μετά από διαμόλυνση των κυττάρων με κάθε ένα από τα siRNAs (siFTO_1, siFTO_2) καθώς και των δυο μαζί (siFTO_MIX) σε αναλογία 1:1, παρατηρήθηκε μειωμένη έκφραση του *FTO*, με τη μεγαλύτερη μείωση να καταγράφεται στα κύτταρα που είχαν διαμολυνθεί και με τα δυο (Εικ. 7), συνεπώς και επιλέχθηκε το siFTO_MIX για τα επόμενα πειράματα. Η μείωση της έκφρασης του *FTO*, μέσω της αύξησης της συγκέντρωσης των siRNAs, οδήγησε σε δοσοεξαρτώμενη μείωση της ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων, με στατιστικώς σημαντική μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού να παρατηρείται ήδη μόλις 24 ώρες μετά τη διαμόλυνση, και να ενισχύεται περαιτέρω μετά από 48, 72 και 96 ώρες (Εικ. 8).



Εικόνα 6. Οι διαφορετικές θέσεις πρόσδεσης των siRNAs (siFTO_1 και siFTO_2) στο FTO mRNA (στόχος).

Εικόνα 7. Επίπεδα έκφρασης του *FTO* μετά τη διαμόλυνση των SK-OV-3 κυττάρων με τις διαφορετικές συγκεντρώσεις των siRNAs (siFTO_1 και siFTO_2) και την ταυτόχρονη διαμόλυνση (siFTO_mix).



Εικόνα 8. Διάγραμμα CCK8 έπειτα από ταυτόχρονη διαμόλυνση (siFTO_mix) των SK-OV-3 σε συγκεντρώσεις 0.1, 1.0 και 10.0 nM.

Συμπεράσματα

Στην παρούσα εργασία διερευνήσαμε το λειτουργικό και κλινικό ρόλο της m6A μεθυλίωσης του RNA και της m6A απομεθυλάσης FTO, στον επιθηλιακό καρκίνο των ωοθηκών. Η μελέτη ανέδειξε ότι η υπερέκφραση του *FTO* σχετίζεται με χαμηλότερη m6A μεθυλίωση του RNA, αυξημένο κίνδυνο πρόωμης εξέλιξης και δυσμενή ολική επιβίωση μετά από χημειοθεραπεία πρώτης γραμμής με βάση την πλατίνα. Η πολυμεταβλητή ανάλυση παλινδρόμησης κατά Cox ανέδειξε τη συσχέτιση των αυξημένων επιπέδων έκφρασης του *FTO* και της κακής πρόγνωσης, ανεξάρτητα από το στάδιο FIGO, τον βαθμό διαφοροποίησης του όγκου, τον υπολειπόμενο όγκο μετά από χειρουργική επέμβαση και την απόκριση των ασθενών στη χημειοθεραπεία. Η εσωτερική επικύρωση χρησιμοποιώντας μοντέλο παλινδρόμησης Bootstrap επιβεβαίωσε την ισχυρή και ανεξάρτητη δυσμενή φύση των αυξημένων επιπέδων του *FTO*. Επιπλέον, η αποσιώπηση του *FTO* με χρήση siRNAs σε κυτταρική σειρά ωοθηκών SK-OV-3 οδήγησε στην δοσοεξαρτώμενη μείωση του ρυθμού πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων. Τα ευρήματα αυτά αναδεικνύουν την m6A απομεθυλάση FTO ως κρίσιμο ρυθμιστή της κυτταρικής ανάπτυξης και σημαντικό προγνωστικό δείκτη στον καρκίνο των ωοθηκών.

Βιβλιογραφία

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2021;71(3):209-49.
2. Siegel RL, Miller KD, Wagle NS, Jemal A. Cancer statistics, 2023. *CA Cancer J Clin*. 2023;73(1):17-48.
3. Organization WH. Global Cancer Observatory [Available from: <https://gco.iarc.fr/>].
4. Matulonis UA, Sood AK, Fallowfield L, Howitt BE, Sehouli J, Karlan BY. Ovarian cancer. *Nat Rev Dis Primers*. 2016;2:16061.
5. Jayson GC, Kohn EC, Kitchener HC, Ledermann JA. Ovarian cancer. *Lancet*. 2014;384(9951):1376-88.
6. Menon U, Gentry-Maharaj A, Burnell M, Singh N, Ryan A, Karpinskyj C, Carlino G, Taylor J, Massingham SK, Raikou M, Kalsi JK, Woolas R, Manchanda R, Arora R, Casey L, Dawnay A, Dobbs S, Leeson S, Mould T, Seif MW, Sharma A, Williamson K, Liu Y, Fallowfield L, McGuire AJ, Campbell S, Skates SJ,

Jacobs IJ, Parmar M. Ovarian cancer population screening and mortality after long-term follow-up in the UK Collaborative Trial of Ovarian Cancer Screening (UKCTOCS): a randomised controlled trial. *Lancet*. 2021;397(10290):2182-93.

7. Harcourt EM, Kietrys AM, Kool ET. Chemical and structural effects of base modifications in messenger RNA. *Nature*. 2017;541(7637):339-46.

8. Han X, Guo J, Fan Z. Interactions between m6A modification and miRNAs in malignant tumors. *Cell Death Dis*. 2021;12(6):598.

9. Huang H, Weng H, Chen J. m(6)A Modification in Coding and Non-coding RNAs: Roles and Therapeutic Implications in Cancer. *Cancer Cell*. 2020;37(3):270-88.

10. Jiang X, Liu B, Nie Z, Duan L, Xiong Q, Jin Z, Yang C, Chen Y. The role of m6A modification in the biological functions and diseases. *Signal Transduct Target Ther*. 2021;6(1):74.

11. Gu C, Shi X, Dai C, Shen F, Rocco G, Chen J, Huang Z, Chen C, He C, Huang T, Chen C. RNA m(6)A Modification in Cancers: Molecular Mechanisms and Potential Clinical Applications. *Innovation (Camb)*. 2020;1(3):100066.

12. Yang Y, Hsu PJ, Chen YS, Yang YG. Dynamic transcriptomic m(6)A decoration: writers, erasers, readers and functions in RNA metabolism. *Cell Res*. 2018;28(6):616-24.

13. Li Z, Weng H, Su R, Weng X, Zuo Z, Li C, Huang H, Nachtergaele S, Dong L, Hu C, Qin X, Tang L, Wang Y, Hong GM, Huang H, Wang X, Chen P, Gurbuxani S, Arnovitz S, Li Y, Li S, Strong J, Neilly MB, Larson RA, Jiang X, Zhang P, Jin J, He C, Chen J. FTO Plays an Oncogenic Role in Acute Myeloid Leukemia as a N(6)-Methyladenosine RNA Demethylase. *Cancer Cell*. 2017;31(1):127-41.

14. Su R, Dong L, Li Y, Gao M, Han L, Wunderlich M, Deng X, Li H, Huang Y, Gao L, Li C, Zhao Z, Robinson S, Tan B, Qing Y, Qin X, Prince E, Xie J, Qin H, Li W, Shen C, Sun J, Kulkarni P, Weng H, Huang H, Chen Z, Zhang B, Wu X, Olsen MJ, Muschen M, Marcucci G, Salgia R, Li L, Fathi AT, Li Z, Mulloy JC, Wei M, Horne D, Chen J. Targeting FTO Suppresses Cancer Stem Cell Maintenance and Immune Evasion. *Cancer Cell*. 2020;38(1):79-96 e11.

15. Zhang G, Cheng C, Wang X, Wang S. N6-Methyladenosine methylation modification in breast cancer: current insights. *J Transl Med*. 2024;22(1):971.

16. Chakerov R, Braicu I, Castillo-Tong DC, Richter R, Cadron I, Mahner S, Woelber L, Marth C, Van Gorp T, Speiser P, Zeillinger R, Vergote I, Sehouli J. Outcome and clinical management of 275 patients with advanced ovarian cancer International Federation of Obstetrics and Gynecology II to IV inside the European Ovarian Cancer Translational Research Consortium-OVCAD. *Int J Gynecol Cancer*. 2013;23(2):268-75.

17. Rustin GJ, Vergote I, Eisenhauer E, Pujade-Lauraine E, Quinn M, Thigpen T, du Bois A, Kristensen G, Jakobsen A, Sagae S, Greven K, Parmar M, Friedlander M, Cervantes A, Vermorken J, Gynecological Cancer I. Definitions for response and progression in ovarian cancer clinical trials incorporating RECIST

1.1 and CA 125 agreed by the Gynecological Cancer Intergroup (GCIg). Int J Gynecol Cancer. 2011;21(2):419-23.

18. Therasse P, Arbuck SG, Eisenhauer EA, Wanders J, Kaplan RS, Rubinstein L, Verweij J, Van Glabbeke M, van Oosterom AT, Christian MC, Gwyther SG. New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada. J Natl Cancer Inst. 2000;92(3):205-16.

19. Camp RL, Dolled-Filhart M, Rimm DL. X-tile: a new bio-informatics tool for biomarker assessment and outcome-based cut-point optimization. Clin Cancer Res. 2004;10(21):7252-9.

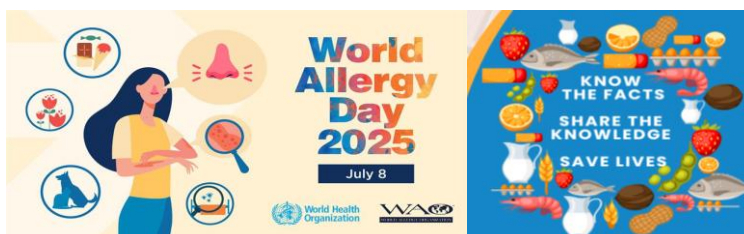
ΠΑΓΚΟΣΜΙΑ ΗΜΕΡΑ ΑΛΛΕΡΓΙΑΣ – 8 ΙΟΥΛΙΟΥ

Κάθε χρόνο, η Παγκόσμια Ημέρα Αλλεργίας τιμάται στις 8 Ιουλίου, με στόχο την ευαισθητοποίηση του κοινού σχετικά με τις αλλεργίες και τις συνέπειες που μπορεί να έχουν στην ποιότητα ζωής εκατομμυρίων ανθρώπων σε όλο τον κόσμο. Η ημέρα αυτή αποτελεί πρωτοβουλία της Παγκόσμιας Οργάνωσης Αλλεργίας (World Allergy Organization - WAO) και αποσκοπεί στην ενίσχυση της ενημέρωσης και της πρόληψης για τις αλλεργικές παθήσεις.

Ο όρος «αλλεργία» αναφέρεται για πρώτη φορά το 1906, σε μια πραγματεία του Clemens von Pirquet, ενός παιδίατρου από τη Βιέννη, ο οποίος την ορίζει ως «ειδικά τροποποιημένη αντιδραστικότητα του οργανισμού». Με τον όρο «αλλεργία» εννοείται η παθολογική κατάσταση κατά την οποία ο οργανισμός αντιδρά απέναντι σε αβλαβείς περιβαλλοντικές ουσίες, που ονομάζονται αλλεργιογόνα. Στα αλλεργιογόνα περιλαμβάνονται διάφορες ουσίες όπως γύρη, σκόνη, τρόφιμα, φάρμακα, καλλυντικά, δηλητήρια εντόμων, τρίχες και φτερά ζώων, ακάρεα και χημικά προϊόντα.

Η αύξηση των αλλεργιών τις τελευταίες δεκαετίες είναι ραγδαία σε παγκόσμιο επίπεδο και σε αυτό συμβάλουν η κλιματική αλλαγή, η ατμοσφαιρική ρύπανση, οι διατροφικές συνήθειες, καθώς και οι συνήθειες του σύγχρονου τρόπου ζωής. Σύμφωνα με στοιχεία της WAO, περισσότερο από το 40% του παγκόσμιου πληθυσμού πάσχει από κάποια μορφή αλλεργίας. Όσον αφορά στον ελληνικό πληθυσμό, ο επιπολασμός των αλλεργιών ανέρχεται σε 30%. Οι συνηθέστερες μορφές αλλεργιών είναι το άσθμα, η ατοπική δερματίτιδα, η κνίδωση, οι τροφικές αλλεργίες και η εποχική ρινίτιδα. Οι αλλεργικές αντιδράσεις ποικίλλουν σε ένταση και μορφή, από ήπια συμπτώματα όπως φτέρνισμα και κνησμός, έως σοβαρές και απειλητικές για τη ζωή καταστάσεις όπως η αναφυλακτική αντίδραση.

Η πρόληψη, η έγκαιρη διάγνωση και η αντιμετώπιση των αλλεργιών είναι καθοριστικής σημασίας για την αποφυγή επιπλοκών. Οι επιπτώσεις των αλλεργιών αφορούν τόσο τη σωματική υγεία, όσο και την ψυχολογική κατάσταση των πασχόντων, επειδή συνοδεύονται από περιορισμούς στις καθημερινές δραστηριότητες και στη διατροφή. Η θεραπευτική προσέγγιση περιλαμβάνει την αποφυγή του αλλεργιογόνου, τη φαρμακευτική αγωγή και σε ορισμένες περιπτώσεις την ανοσοθεραπεία.



Πηγές:

www.ppel.gov.gr/wp-content/uploads/2022/

www.worldallergy.org

www.eeaka.gr

Στην Ελλάδα η ομορφιά δεν μαθαίνεται ποτέ, είναι αυθόρμητη, αυτόχθονη όπως τ' άσπρα κεντίδια των κυμάτων πάνω στην άμμο, όπως η μελετημένη συμμετρία των κυπαρισσιών σε όλο το μήκος των δρόμων, σαν μία πανδαισία χρωμάτων σε πόρτες και παράθυρα, ή σαν το πολύχρωμο έμβλημα των ελληνικών ενδυμάτων και κοσμημάτων. Διότι η ομορφιά είναι μία μάχη, είναι η νίκη του φωτός πάνω στη σκιά.....

«Ελληνικό καλοκαίρι, Jacques Lacarrière



«Γαλαξίδι», Σπύρος Βασιλείου (1903-1985)