

ORİJİNAL YAZI

Akut Lösemili Hastalarda Kantitatif İn Situ Hibridizasyon Yapılarak Akım Sitometri ile Telomer Uzunluğu Ölçümü ve Prognozla İlişkisi*

Vildan ÖZKOCAMAN**, Fahir ÖZKALEMKAŞ**, Ferah BUDAK***,
Gülderen YANIKKAYA DEMİREL****, Rıdvan ALİ**, H.Barbaros ORAL***,
Tülay ÖZÇELİK**, Ülkü OZAN**, Ahmet TUNALI**

** Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Hematoloji Bilim Dalı, Bursa.

*** Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, İmmünoloji Laboratuvarı, Bursa.

**** İstanbul Pakize İ. Tarzi Laboratuvarı, İstanbul.

ÖZET

Akut lösemili hastalarda telomer uzunluğunu inceleyerek, tanı ve remisyon periyodunda rölaf telomer uzunluklarını karşılaştırarak prognostik bir değeri olup olmadığını araştırdık. Bu çalışma 13'ü kadın 8'i erkek, ortanca yaşı 37 ve yaş aralığı 17-66 ve 15'i ALL 6'sı ALL olan 21 akut lösemili hastayı içerdi. Rölaf telomer uzunluğu düzeyi flow-floresan in situ hibridizasyon (FISH) metodu ile kemik iliği kan mononükleer hücrelerinde saptandı. Tanı anında 3 hastada kısa telomer 18 hastada uzun telomer boyu gözleendi. Remisyonunda ise 11 hastada kısa 10 hastada uzun telomer boyu gözleendi. Telomer uzunluğu ile laboratuvar parametreleri arasında istatistiksel anlamlı ilişki bulunamadı. Yaşam süresi ve remisyon süresi bakıldığında uzamış ve kısalımış rölaf telomer uzunluklu gruplar arasında istatistiksel anlamlı farklılık bulunmadı. Sonuç olarak bulgularımız rölaf telomer uzunluğu parametresinin analizi hakkında bizim popülasyonumuzun heterojen olduğunu düşündürdü. Bu nedenlerden dolayı akut lösemili hastalarda telomeraz aktivitesi ve telomer uzunluğunun birlikte değerdendirilmesinin kritik önemi vardır.

Anahtar Kelimeler: Akut lösemi. Telomer uzunluğu. Akım sitometri. Prognoz.

Measurement of Telomere Length in Patients with Acute Leukaemia Using Quantitative In situ Hybridization and Flow Cytometry and It's Relationship with Prognosis

ABSTRACT

We examined and compared the telomere length at the initial diagnosis and during the remission periods in patients with acute leukaemia and evaluated whether it has a prognostic value or not. This study included 21 patients (13 being female and 8 being male) with acute leukaemia. Their median age was 37 years (range 17-66) and 15 patients had AML and 6 patients had ALL. Relative telomere length (RTL) level was determined in bone marrow blood mononuclear cells by flow-FISH method. At the initial diagnosis short telomere length was observed in 3 patients, long telomere length in 18 patients. During the remission period short telomere length was observed in 11 patients, long telomere length in 10 patients. No statistically significant relation could be found between telomere length and laboratory parameters. When survival and remission times were concerned, no statistically significant difference was observed between the groups of lengthened and shortened relative telomere length. In conclusion, our findings on the analysis of relative telomer length parameters suggest that our population is heterogeneous. For this reason it is critical to evaluate both telomerase activity and telomer length in acute leukaemia patients

Key Words: Acute leukaemia. Telomere length. Flow cytometry. Prognosis.

Geliř Tarihi: 08.10.2004

Kabul Tarihi: 19.11.2004

* Çalışma, 29. Ulusal Hematoloji Kongresinde 25-28 Ekim 2002 tarihinde Kemer-Antalya'da sözlü poster olarak sunulmuřtur.

Dr. Vildan ÖZKOCAMAN
Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi,
İç Hastalıkları ABD, Hematoloji BD
Görükle, Bursa
Tel: 0 224 442 84 00 /1087
Faks: 0 224 442 80 60
Mobil Tel: 0 532 678 92 09
e-mail: vildanoz@uludag.edu.tr

Telomerik bölgede bulunan DNA molekülü normal DNA polimeraz enzimi tarafından değil, telomeraz adı verilen ribonükleoprotein yapısındaki özel bir revers transkriptaz enzimi tarafından sentezlenir. Her hücre bölünmesi ile telomerin boyunda baz kayıpları meydana gelmektedir. Telomeraz enzimi oluşan bu baz kayıplarını yerine koymak üzere görev yaparak, tekrarlayıcı bir şekilde telomere TTAGGG baz yapılarını ilave etmektedir¹⁻⁷. Her bir bölünmede kaybolan telomer baz yapıları telomerik DNA sentezi ile

yerine konmaktadır. Somatik hücrelerin çoğunda telomeraz enzimi bulunmamaktadır. Hücrenin her bölünmesinde kromozomların telomerik bölgelerinde yaklaşık 50-200 baz çifti (base-pair) kadar DNA baz kayıpları meydana gelmektedir. Telomer yaklaşık 2.5 kilo baz (kb) bir uzunluğa indiğinde somatik hücrelerde proliferasyon durur. Telomer kısalması periferik kan hücrelerinde yılda 40 bp, kültür hücrelerinde yılda 40-60 bp olarak saptanmıştır³. Somatik hücrelerin telomer bölgesindeki kayıplar belli bir uzunluğa eriştiğinde (yaklaşık olarak 8-10 kbp boyutuna ulaştığında) hücre bölünmesi geri dönüşsüz bir şekilde durmakta ve yaşlılık dönemi başlamaktadır^{2,8}. Telomerik kayıplar 12-13 kbp'e ulaştığında ise genetik kararsızlık çok artar ve bu aşamada ancak telomeraz enzim aktivitesi kazanabilen hücreler sonsuz çoğalma yeteneğine kavuşurlar. Bu duruma "immortalizasyon" yani ölümsüzleşme denmektedir¹⁻³. Bu nedenle kanser hücrelerinin ölümsüzlük kazanmaları ile telomerlerin ve telomer tamir işlemlerinin ilişkisi olduğu düşünülmektedir.

Bu çalışmada akut lösemili hastalarda tanı ve remisyonda hücrelerin kromozomlarının ortalama telomer uzunluğu kantitatif in situ hibridizasyon yapılarak akım sitometrisi ile ölçülmüştür; böylece literatürde yanıtını bulamadığımız akut lösemilerde akım sitometri yöntemi ile tanıda telomer uzunluğunun ölçülmesinin ve bu değerlerin bunun remisyondaki ölçüm değeri ile karşılaştırılmasının prognostik bir önemi bulunup bulunmadığı sorusuna yanıt arandı.

Gereç ve Yöntem

Çalışmaya, Hematoloji Bilim Dalı polikliniğine başvuran, Akut lösemi tanısı alıp, kliniğe yatırılarak izlenecek olan, FAB subtip ve immünofenotipik olarak tanısı doğrulanmış ilk tanı, relaps yada progresif hastalığı olan 21 hasta alındı. Hastalardan tanıda, nüks durumunda ya da progresif hastalıkta kemik iliği aspirasyonunda kan mononükleer hücrelerinde telomer uzunluğu ölçülerek, aynı hastaların remisyondaki periferik kan mononükleer hücrelerinin telomer uzunluğu ölçümü değeri ile karşılaştırıldı. Kemik iliği kan örneği heparinli tüpe 5cc alındı. Kan örneğinin 3 katı Amonyum klorür 0.22µ filtrelerden geçirilerek lize edilerek, 15 dakika, karanlıkta oda ısısında inkübe edildi Bir kez yıkandı (500µl isoton II ile) 500 g de 5 dakika santrifüjlenip, supernatant atılıp, pellet alınarak üzerine 1000µl/lt isoton II ilavesiyle dilüe edilip, tekrar santrifüjlenerek pelletten tomo lamında, kristal viole ile hücre sayımı yapıldı. Eppendorf tüplerde 190µl kristal viole +10µl örnekten eklenip (1/20 dilüsyonla), ışık mikroskobu ile sayım yapıldı. 2×10^6 hücreye konsantrasyon ayarlandı. Telomer uzunluğu ölçümü telomer PNA kiti kullanılarak 3 günlük bir çalışma ile akım sitometrik olarak tayin edildi. Akım sitometrik analiz İmmüno-

loji laboratuvarında gerçekleştirildi. Önce mononükleer hücreler ayrılıp uygun konsantrasyona getirildikten sonra Telomer uzunluğunun ölçümü için ticari bir firmadan sağlanan Telomere PNA kiti kullanıldı (Telomer PNA kit /FITC-DAKO, code no:K 5327). Lösemik hücreler FITC işaretli PNA telomer probu içeren ve içermeyen hibridizasyon solüsyonu kullanılarak denatüre edildi. Hibridizasyon için bir gece oda ısısında bekletildikten sonra DNA boyası (Propidium iodide) ile boyanarak akım sitometri ile analiz yapıldı⁹.

Rölatif telomer uzunluğu =RTL, analizde elde edilen floresans değerlerinden aşağıda bildirilen formülle hesaplandı. $RTU: ((FITC \text{ işaretli hasta hücrelerinin ortalama floresansı} - \text{ işaretli olmayan hasta hücrelerinin ortalama floresansı}) \times \text{kontrol hücrelerinin DNA indeksi} \times 100) / ((FITC \text{ işaretli kontrol hücrelerinin ortalama floresansı} - \text{ işaretli olmayan kontrol hücrelerinin ortalama floresansı}) \times \text{hasta hücrelerinin DNA indeksi})$

İndüksiyon kemoterapisi (antrasiklin, sitozinarabinozid içeren) sonrası remisyondaki hastalarda işlem bu kez de kemik iliği kan mononükleer hücreleri ile tekrarlandı. Çalışma 8 ay sürdürüldü ve hastalar rutin kontrolleri ile takip edildi. Remisyonda kaldıkları süre ve toplam sürvileri saptanarak ve bu parametrelerin telomer uzunluğu ile ilişkisi irdelendi. Sağlıklı bireyden kontrol olarak alınan kemik iliği kan mononükleer hücrelerinden aynı işlemler tekrarlandı. Rölatif telomer uzunluğu %'si 10.4 bulundu (Sağlıklı kontrol).

İstatistiksel analiz; gruplar arası karşılaştırmada Mann-Whitney testi kullanıldı. Yaşam süresini etkileyebilecek risk faktörlerinin incelenmesinde Cox-Regression analizi kullanıldı. Yaşam süreleri ve remisyonda kalma süreleri için Kaplan-Meier analizi yapıldı ve yaşam sürelerinin karşılaştırılmasında Log rank testi kullanıldı. İstatistiksel betimleyici değerler aritmetik ortalama + standart hata olarak verildi. $P < 0.05$ 'in altındaki değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Bulgular

Hastaların yaşları 17-66 arasında değişmekte olup, yaş ortalamaları 36.7 ± 16.1 idi. Hastaların 15'i Akut Miyeloblastik Lösemi, 6'sı Akut Lenfoblastik Lösemi tanısı almıştı. FAB subgruplarına göre dağılımları ise Akut non-Lenfoblastik Lösemi gruplarında AML-M1: 1, AML-M2: 2, AML-M3: 2, AML-M4: 8, AML-M5: 1, AML-M7: 1 idi. Akut Lenfoblastik Lösemi grubunun tamamı ALL-L2 alt grubunda idi (Tablo-I).

Hastalar çalışmaya alındıklarında 18'inde ilk tanı, 3'ünde nüks hastalık olarak hastalık durumları saptandı. Hastaların tanı anındaki mm^3 'teki lökosit sayıları minimum 700, maximum 423.000 (median

Akut Lösemide Telomer Uzunluğu Ölçümü

37.700), Hb değerleri (%gr/dl) minimum 2.9-maximum 14.3 (median 8.6), trombosit sayımları (/mm³) minimum, 7.460-maximum 255.000 (median 55.000), biyokimyasal parametrelerden LDH (UI/L) minimum 302 – maximum 1679 (median 830 (Tablo I). Kemik iliği blast yüzdesi (%) minimum 30-maximum 100 (median 71), İmmüfenotiplemede CD34 ekspresyon değerleri minimum 0.9 – maximum 96.1 (median 24.3), performans skorları (karnofsky'e göre), sitogenetik olarak anormal karyotip Ph pozitifliği 1 olguda saptandı. Diğer 20 hastada normal karyotip izlendi. Remisyonda kalma süreleri ve toplam yaşam süreleri gün olarak belirtildi (Tablo-II).

Tablo I- Akut lösemili hastaların yaş, cins, hastalık alt grubu ve laboratuvar parametreleri

Hasta No	İsim	Cins K/E	Yaş	Hastalık alt grup	Hastalık durumu: İlk tanı (T) / Nüks (N)	Lökosit sayı-sı(/mm ³)	Hb (gr/dl)	Trombosit sayı-sı(/mm ³)	LDH gr/dl
1	DA	K	60	AML-M4	T	244 000	8.0	65 800	303
2	ÇB	E	61	AML-M4	N	123 000	14.3	29.000	450
3	Gİ	K	22	ALL-L2	T	1570	7.3	105 000	460
4	MK	E	55	AML-M1	T	10 600	9	102 000	903
5	EÇ	E	27	AML-M7	T	700	5.7	30 000	522
6	HŞ	K	41	AML-M2	T	1310	9.8	63 600	304
7	GÖ	K	37	AML-M4	T	21 100	7.5	71 000	875
8	MA	E	22	ALL-L2	T	366 000	2.9	7460	303
9	HÖ	E	21	AML-M5a	N	274 000	4.6	76 500	303
10	MG	K	63	AML-M4	T	4230	7.4	255 000	304
11	KT	E	19	AML-M4	T	36 400	7.1	21 300	666
12	NA	K	42	AML-M3v	T	154 000	8.3	46 000	303
13	DK	K	21	AML-M4	T	3270	6.8	23 400	1005
14	NM	K	37	ALL-L2	N	96 200	12.9	219 000	1322
15	GK	K	37	ALL-L2	T	98 000	8.6	34 800	830
16	AÇ	E	20	AML-M4	T	3000	10.8	29 000	1156
17	YS	K	17	ALL-L2	T	37 700	9.5	24 000	799
18	SA	E	66	AML-M3	T	1000	12.5	57 300	386
19	AP	K	44	AML-M2	T	2910	9	136 000	302
20	HA	K	26	AML-M4	T	69 000	10.2	55 000	1679
21	BY	K	34	ALL-L2	T	200 000	10.1	18 000	1056

21 hastanın 15'i yaşamakta idi, 6'sı kaybedildi (Tablo-III). Kaybedilen hastaların 4'ünde enfeksiyon nedeniyle ölüm gözlemlendi. 2 hasta da ise 1'inde intrakranial hemoraji, 1'inde ani kardiyopulmoner arrest sonucu ölüm saptandı.

Tanı anında rölaf telomer uzunluğu ölçümü (%) değeri minimum:2.82 – maximum 1144 (median:83) bulundu. Remisyon elde edildiğinde rölaf telomer uzunluğu ölçümü (%) değeri minimum:2.5 – maximum 455 (median:43.9) saptandı. Tanı ve remisyonadaki değerlerin kendi içinde % değişimi minimum:-0.98 – maximum:18.28 (median:-0.28) bulundu. Tanıda, sağlıklı kontrollerin rölaf telomer uzunluğu (%):10.4 ile karşılaştırıldığında 3 hastada kısa telomer boyu, 18 hastada uzun telomer boyu gözlemlendi. Tanıdan remisyon ayni olgudaki rölaf telomer uzunluğu değişimi uzama ve kısalma olarak

ifade edildiğinde 11 olguda rölaf telomer uzunluğunda kısalma, 10 olguda ise rölaf telomer uzunluğunda da uzama saptandı (Tablo-III).

Tablo II- Akut lösemili hastaların kemik iliği blast oranı, CD34+'likleri, sitogenetik özellikleri, performans durumları, remisyon ve yaşam süreleri

Hasta No	Kemik iliği blast %	CD34+ % ¹	Sitogenetik: Normal karyotip (NK)/Anormal karyotip (AK)	Performans ^{2/} Komorbit hastalık ³	Remisyonunda kalma süresi (gün)	Sürvi (gün) ⁴
1	95	37.7	NK	70/+	8	38
2	71	0.9	NK	80/+	150	300
3	100	96.1	NK	80/-	10	40
4	66	37.3	NK	80/+	270+	270+
5	85	95.2	NK	70/-	210+	210+
6	74	7.8	NK	70/-	210+	210+
7	61	2.0	NK	80/-	210+	210+
8	100	80.4	NK	80/-	60	60
9	57	34.9	NK	60/-	210	360+
10	59	65.4	NK	90/+	210+	210+
11	57	1.1	NK	80/-	180+	180+
12	83	10.6	NK	70/-	150+	150+
13	56	6.4	NK	70/+	120+	120+
14	92	13.7	AK	80/-	450	480
15	98	93.2	NK	80/-	120+	120+
16	30	7.3	NK	70/-	120+	120+
17	100	8.7	NK	60/-	120+	120+
18	30	5.3	NK	70/+	150+	150+
19	49	45.7	NK	90/-	90+	90+
20	62	9.4	NK	70/-	75+	75+
21	90	94.4	NK	80/-	6	33

¹ CD34 %10'nun altında ise (-)

² Karnofsky performans skoru

³ Komorbit hastalıklar: Hipertansiyon, diabetes mellitus, serobrovasküler olay, koroner arter hastalığı

⁴ Tanı konduktan sonra geçen yaşam süresi

Tablo III- Akut lösemili hastaların son durumları ile tanı ve remisyonadaki rölaf telomer uzunluğu (RTL) (%) değişimleri

Hasta No	Son durum: yaşıyor (Y) / Eksitus (E)	Tanı RTL (%)	Remisyon RTL (%)	Tanıdan remisyon a değişim: Uzama (+) / Kısalma(-)	% Değişim
1	E	1144.0	272.0	-	-0.76
2	E	166.0	366.0	+	1.20
3	E	1120.0	32.8	-	-0.97
4	Y	4.7	90.6	+	18.28
5	Y	98.0	455.0	+	3.64
6	Y	442.0	7.1	-	-0.98
7	Y	76.0	14.4	-	-0.81
8	E	15.9	41.0	+	1.58
9	Y	89.3	64.0	-	-0.28
10	Y	37.5	2.5	-	-0.93
11	Y	2.8	43.0	+	14.20
12	Y	6.0	77.1	+	11.8
13	Y	83.0	107.0	+	0.20
14	E	26.4	47.8	+	0.80
15	Y	88.0	9.6	-	-0.89
16	Y	200.0	144.0	-	-0.28
17	Y	71.0	35.7	-	-0.50
18	Y	358.0	43.9	-	-0.88
19	Y	11.9.	20.0	+	0.68
20	Y	161.0	56.0	-	-0.65
21	E	11.6	25.0	+	1.16

Yaşam süresini etkileyen risk faktörlerini belirlemek amacıyla hastalar yaş (60 yaşın üzeri ve altındakiler), lökosit sayısı (10000'in altı, 10000-50000 arası, 50000'in üzerindeki), hemoglobin düzeyi (12 gr/dl'nin altı ve üzeri), trombosit sayısı (150000'in altı ve üzeri), LDH değeri (380 üzeri ve altı), kemik iliği blast yüzdesi (%80 üzeri ve altı), CD34 ekspresyonu (+) pozitifliği (%10'un üzeri (+) ve altı (-) negatif), performans skoru (80'in üzeri ve altı) değerlerine göre kategorize edilerek rölatif telomer uzunluğu değişimlerini diğer değişkenlerle karşılaştıran korelasyon analizi sonucunda değişkenler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamadı ($P>0.05$). Rölatif telomer uzunluğu ise uzama ve kısalma olarak değişkenler incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir risk faktörü bulunamamıştır. Fakat incelenen değişkenler içinde anlamlılığa en yakın etkisi olduğu düşünülen $p:0.065$ olan çalışmanın temelini oluşturan değişken, rölatif telomer uzunluğu değeri çıkmıştır.

AML ve ALL olgularında yaşam süresi bakımından karşılaştırma yapıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamamıştır ($P>0.05$). AML'li olguların ortalama yaşam süresi 310.53 ± 27.31 , ALL'li olguların ortalama yaşam süresi 262.17 ± 102.76 bulunmuştur.

AML ve ALL olgularının remisyonda kalma süreleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($P>0.05$). AML'li olguların ortalama remisyonda kalma süresi: 222.90 ± 21.01 , ALL'li olguların ortalama remisyonda kalma süresi 237.67 ± 100.43 bulunmuştur.

AML ve ALL olguları arasında rölatif telomer uzunluğu başlangıç tanı değeri ile remisyondaki değerin tanı değerine göre % değişimleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($P>0.05$).

Rölatif telomer uzunluklarında kısalma olanlarla, uzama olanlar gruplandırılarak remisyonda kalma süreleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamamıştır ($P>0.05$). Rölatif telomer uzunluklarında kısalma olanlarda 164.25 ± 27.35 ($P>0.05$), Rölatif telomer uzunluklarında uzama olanlarda 326.60 ± 68.34 ($P>0.05$) saptanmıştır Rölatif telomer uzunluklarında kısalma olanlarla, uzama olanlar gruplandırılarak yaşam süreleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamamıştır. ($P>0.05$). Rölatif telomer uzunluğunda kısalma olanlarda 301.64 ± 37.3 ($P>0.05$), Rölatif telomer uzunluklarında uzama olanlarda 321.30 ± 77.3 saptanmıştır ($P>0.05$). Aynı değişkenler incelendiğinde yine çalışmanın temelini oluşturan değişken istatistiksel olarak anlamlılığa en yakın çıkan parametre olmuştur ($P=0.059$).

Tartışma

Çalışmamızda akut lösemili hastalarda tanı ve remisyonda kemik iliği mononükleer hücrelerinin kromozomlarının rölatif telomer uzunluğu kantitatif in

situ hibridizasyon yapılarak akım sitometrisi ile ölçülmüştür. Bu değer tanıda ve remisyondaki ölçüm değeri ile karşılaştırılmasının prognostik önemi bulunup bulunmadığı sorusuna yanıt aranmıştır. Prognostik faktörlerin belirlenmesi optimal tedavi stratejilerinin saptanmasına yarayacak ve tedavi sonuçlarının tahmin edilmesini sağlayacaktır. Tanı anındaki yaş, lökosit sayısı, lösemik hücre karyotipi, de novo ya da sekonder lösemi oluşu, tedavi kararını etkileyen faktörlerdir. Uygun prognostik faktörleri olan hastalar konvansiyonel kemoterapi alacakken, uygunsuz prognostik grupta yer alanlarda daha yoğun tedavi gereksinimi ortaya çıkacaktır¹⁰.

Akut lösemili hasta grupları ile yapılan araştırmaların çoğunda telomeraz aktivitesinin ölçüldüğü gözlenmektedir. Telomer uzunluğu ölçülerek elde edilmiş verilerin olduğu çalışmalar çok az sayıda ve kısıtlı hasta sayısı ile yapılmıştır. Ohyashiki ve arkadaşlarının 78 akut lösemi hastasını içeren çalışmasında 55 AML olgusunun 45'inde (%81.8), 23 ALL olgusunun 16'sında (%69.6) telomeraz aktivitesi yüksek saptanmıştır. Araştırmacılar telomeraz aktivitesi yüksek olanların yüksek lökosit sayısı, sitogenetik anomali ve daha sık ekstra medüller nüks gösteren hastalar olduğunu belirtmişlerdir¹¹. Dawei ve arkadaşları ise 66 AML olgusundan oluşan çalışmalarında 95 lösemi örneğinden 82'sinde (%86) tanıda ve relaps sırasında yüksek telomeraz aktiviteleri bildirmişlerdir¹². Telomeraz aktivitesinin ölçüldüğü 27 AML olgusu içeren başka bir araştırmada ise hastalar telomeraz aktivite düzeyleri bakımından heterojen bulunmuştur. Bu çalışmada tüm AML hastalarında telomeraz aktivitesi saptanmasına rağmen düzeylerin heterojen olduğu ve umulmadık bir şekilde yüksek telomeraz aktivitesi olanlarda komplet remisyondan yüksek oranda olduğu gözlenmiştir¹³. Akut lösemili hastaların çoğunda komplet remisyonda telomeraz aktivitesi düşük bulunmuştur, yüksek aktivite 2 hastada erken nüks gözlenmiştir. Buna dayanılarak telomeraz aktivitesinin hastalığın izlenmesinde önemli bir parametreye olabileceği öne sürülmüştür. Çoğu akut lösemi olgusunda telomer uzunluğu kısalmış bulunmuştur. Bu, hücrelerin hızlı proliferasyonu sonucu olabilir. Tanı sırasında telomerler kısa bulunurken komplet remisyonda elde edildiğinde normal boyuna dönmüştür³.

Akut lösemili hastaların bir diğer grubunda telomer uzunluğu telomeraz aktivitesi nedeni ile normal bulunabilmektedir. Bazı akut lösemili hastalarda ise telomeraz aktivitesindeki artışların kompanse edemeyeceği oranda telomerler kısalmıştır. Bu nedenlerden dolayı bu grup hastalarda hem telomeraz aktivitesi hem de telomer uzunluğunun değerlendirilmesi önemlidir. Akut lösemili hastaların tanı anında %70'inde artmış telomeraz aktivitesi, çoğunluk hastada da telomer uzunluğunda kısalma vardır^{3,14}. AML'de telomer uzunluğu değişiklikleri ve telomeraz aktivitesi arasında yakın ilişki olduğu saptanmıştır¹⁴.

Akut Lösemide Telomer Uzunluğu Ölçümü

Yamada ve arkadaşları normal ve lösemik kan hücrelerinde telomerik DNA uzunluğunu ölçerek sağlıklı bireylerde 8.5-9 kb, 7 AML ve 7 ALL olgusunda ise 2.7-6.4 kb arasında değişkenlikte kısalma bulmuşlardır¹⁵. İn vivo hematopoetik kök hücrelerde telomer uzunluğu analizi southern blot yöntemi ile incelenmiş ve yaklaşık 7 kb kısalma saptanmıştır. Bu bulgu, telomer kısalmasının hematopoetik hücrelerin bölünme kapasitesini sınırlayabileceği hipotezine uygun düşmektedir¹⁶.

MDS'lu 16 hastadaki bir çalışmada kemik iliği örneklerinde farklı telomer boyları gözlenmiş; hastalar uzun ya da kısa telomerli olarak gruplandırılmıştır. Hastalık progresyonu ile telomer uzunluğunun korunmadığı ve hastalık progresyonu ile telomerlerin kısaldığı gözlenmiştir. Bu kısa telomerli hastalar genetik mutasyon ve lösemik transformasyona geçiş göstermişlerdir. Telomeraz aktiviteleri de bu hastalarda iki kat yüksek bulunmuştur. Sonuçta MDS'de telomer kısalması kötü bir prognostik işaret olarak değerlendirilmiştir³. MDS'li hastalarda lösemik transformasyondan önce ve sonra telomer aktivitesi ölçülmüş; belirgin bir değişiklik olmadan da prelösemik fazda bile telomer aktivitesi yüksekliği saptanmıştır¹⁷.

Bizim çalışmamızda ise hastalarda genel olarak tanı anında rölatif telomer uzunluğu normal sağlıklı bireye göre uzamış bulundu (18 hastada uzama 3 hastada kısalma). Remisyon elde edildikten sonra ise ilk tanıdaki kendi değerleri ile karşılaştırıldığında 11 hastada kısalma 10 hastada uzama bulunmuştur. Literatür verileri ile karşılaştırıldığında hastaların telomer uzunlukları bakımından heterojen olduğu gözlenmiştir. Taniya göre telomer uzaması gösteren gruptaki hastaların (toplam 10 hastanın) yaşam süreleri, telomerleri kısa olan gruba göre daha uzun bulunmuştur; ancak istatistiksel anlamlı farklılık saptanmamıştır.

Sitogenetik ile korele edildiğinde telomeraz aktiviteleri heterojen olarak saptanmaktadır. Elli bir akut lösemili hasta üzerinde yapılan başka bir çalışmada kromozomal aberasyon gösteren 22 hastada (kompleks karyotip, trizomi, 7q-, 7q+, 11q-) telomeraz aktivitesi daha yüksek bulunmuştur¹². Takauchi ve arkadaşları 42 AML olgusunun 15'inde 8;21 translokasyonu, 8'inde 15;17 translokasyonu, 19'unda normal karyotip saptamışlar ve sitogenetik anomali saptanan grupta telomer uzunluğunun önemli ölçüde kısalmış olduğunu bildirmişlerdir¹⁸. Bizim çalışmamızda bir olguda sitogenetik anomali (ALL L2 olgusunda Ph+'liği) saptanmış olup 20 olguda normal karyotip gözlenmiştir. Bu olgumuzda da kemoterapi sonrası remisyonunda iken telomer uzunluğunda artış gözlenmiş, sitogenetik uygunsuz grupta yer almasına rağmen geç nüks saptanmıştır. Tek bir olgu söz konusu olduğundan bu konuda bir yorum yapmak zordur.

Çeşitli deneysel bulgular, telomer uzunluğu ölçümünün in vitro ve in vivo kök hücre turnover'nın bir

belirleyicisi olarak kullanılabileceğini desteklemektedir. Brummendorf ve arkadaşları farklı etyolojilere bağlı kemik iliği yetersizliği sendromlarında kök hücre dinamiklerini inceleyerek aplastik anemili hastalarda sağlıklı bireylerle karşılaştırılınca telomer uzunluğunda azalma buldular; şaşırtıcı olarak da tedavi sonrası hematolojik iyileşme gösterenlerle aktif hastalık arasında telomer uzunluklarında fark saptamadılar¹⁹. Erken projenitör hücre markırı olan CD34+'liği taşıyan akut lösemili hastalarda yüksek telomeraz aktiviteleri bulunurken CD34- hücrelerde telomeraz aktivitesi düşük kalmıştır. Primitif hemopoetik hücreler sitokinlerle uyarıldığında telomerlerde kısalmanın olduğu gözlenmiştir. Bunun nedeni kültür hücrelerinde telomer uzunluğunun sürdürülmesinde telomeraz aktivite düzeylerinin yetersiz kalmasıdır²⁰. Çalışmamızda ise CD34 ekspresyonu %10'un üzerinde pozitif olarak kabul edilen hastalarda remisyonunda telomer uzunluğu kısa ve uzun grup karşılaştırıldığında anlamlı bir korelasyon saptanmamıştır. Olgu sayısının sınırlı olması ve eş zamanlı olarak telomeraz aktivitesine bakılmamış olması bu konuda yorum yapmayı güçleştirmektedir.

Aynı yaştaki normal bireyler arasında telomer uzunluğu bakımından belirgin farklılıklar da bildirilmektedir¹⁹. Bu farklılık sağlıklı bireylerde hematopozdeki artmış heterojenite ve farklı bireyler arasında da daha doğumda telomer uzunluklarının farklı olması (4.5-14 kb) ile açıklanmaya çalışılmaktadır²¹. Iwame ve arkadaşları yaşları 4 ile 95 arasında değişen 124 sağlıklı kişiden elde edilen periferik kan mononükleer hücrelerinde Southern blot analizi ile telomer uzunluğunu ve semikantitatif floresans TRAP ile telomeraz aktivitesini ölçmüşlerdir. Bu çalışmada telomer uzunluğu ölçülen 80 bireyde yaşla ilgili progresif bir azalma gözlenmiştir. Yaşları 4-39 arasındakilerde yaklaşık 84 bp/yıl azalma olurken 40 yaş ve üzerindekielerde azalma 41 bp/yıl hızına düşmekteydi. Telomeraz aktivitesi yaşla bifazik patern gösteriyordu: 4-39 yaşlarında telomeraz aktivitesi progresif düşme gösteriyorken 40 yaşın üzerindekielerin %65'inde rölatif olarak stabil ancak çok düşük telomeraz aktivitesi saptanırken, geri kalan %35'inde ise telomeraz aktivitesi saptanmamıştır. Normal bireylerden elde edilen bu veriler gelecekte lösemili hastaların tedavilerinde ve risk belirlenmesinde yardımcı olabilir²²⁻²³. Bizim hasta grubumuzda telomer uzunluklarının çok heterojen bulunması hasta grubunun AML ve ALL olarak ve ayrıca FAB alt grupları bakımından da heterojen oluşu ile hasta sayısının kısıtlılığı nedeni ile olabilir. Bu tür farklı sonuçlar, Seol ve arkadaşlarının 27 AML olgusunda bildirdikleri heterojen telomeraz aktivitesi sonuçlarında da dikkat çekmektedir¹³. Ayrıca aynı çalışmada genel literatür bulgularına ters bir şekilde yüksek telomeraz aktivitesi olan hastaların tam remisyon girme oranlarının da yüksek olması şeklinde bir sonuç bildirilmiştir¹³.

Bizim çalışmamız rutin pratik açısından çok daha kolay uygulanabilir özelliktedir. Ancak muhtemelen sadece telomer uzunluklarının rölatif olarak verilmesi düşük hasta sayısı ile birlikte kesin yargıya varmamızı güçleştirmiştir. Sonuç olarak çalışmamızda akut lösemili hastalarda prognostik önemi bilinen tanı anındaki yüksek lökosit sayısı, LDH yüksekliği, immünofenotipik olarak CD34+ hücre ekspresyonu, kötü performans, kemik iliği blast yüzdesi gibi parametrelerle remisyonunda rölatif telomer uzunluğu yüzdesi uzun ve kısa olan grup arasında anlamlı bir korelasyon saptanmamıştır. Akut lösemili hastalarda tanıdaki telomer uzunluğu ile remisyonundaki telomer uzunluğu değerleri arasında anlamlı bir korelasyon saptanmamıştır. Telomer uzunluğunda remisyonla girildiğinde tanıya göre uzama olan olgularla tanıya göre kısalma olanlar arasında remisyonunda kalma süreleri ve yaşam süreleri karşılaştırıldığında da anlamlı bir fark bulunamamıştır. AML ve ALL olgularını kendi aralarında gruplandırıldığında yaşam süresi, remisyonunda kalma süreleri ile rölatif telomer uzunluğunun tanıdan remisyonla yüzde değişim değeri karşılaştırıldığında da anlamlı bir fark bulunamamıştır.

Mevcut bilgiler ışığında bazı tümörlerde telomeraz aktivitesini arttıran mekanizmaların yetersiz kalabildiği çıkarımı yapılabilir. Ayrıca bazı tümörlerde görülen spontan remisyonlar telomeraz aktivitesinin düşüklüğü nedeni ile ortaya çıkıyor olabilir. Telomeraz aktivitesi prognostik bir markör olarak bazı hasta gruplarında kullanılabilir. Telomer uzunluğunun yaşla progresif olarak kısalıyor olması ve akut lösemili hastaların bir grubunda da telomer uzunluğu, telomeraz aktivitesi nedeni ile tamir mekanizmalarının sürdürülmesi ile normal bulunuyor olabilir. Bu nedenlerden dolayı bu grup hastalarda hem telomeraz aktivitesi hem de telomer uzunluğunun ölçülmesi daha doğru bilgi verecektir. Akut lösemili hastaların küçük ve heterojen bir grubunu sınırlı sayıda olguda değerlendirmemiz heterojen sonuçlar vermiştir. Bu nedenle telomer uzunluğu ölçümünün prognostik değerini belirlemede ve progresif hastalığı tayinde homojen AML alt tiplerini ve daha büyük olgu sayısı içeren incelemelerin gerekli olduğu düşünülebilir. Lösemilerde telomer dinamiği değişikliklerinin daha iyi ortaya konması ile telomer uzunluklarındaki bu heterojenite giderilebilecektir.

Kaynaklar

1. John FB, Marciniak RA, Guarente L. Telomeres, The nucleolus and aging. *Curr Opin Cell Biol* 1998;10: 332-8.
2. Özdemir F, Aydın F, Ovalı E, Uçar F. Telomeraz ve Kanser. *Türk Hematoloji Onkoloji Dergisi* 1999; 9: 242-8.
3. Beksaç M, Önür ND. Telomerase Activity in Hematologic Malignancies and Predisposing Diseases. *Turk J Haematol* 2001; 18: 5-17.
4. Artandi SE, A DePinho R. A critical role for telomeres in suppressing and facilitating carcinogenesis. *Curr Opin Genet Dev* 2000; 10: 39-46.
5. Ohyashiki K, Ohyashiki JH. Telomere dynamics and cytogenetic changes in human hematologic neoplasias: a working hypothesis. *Cancer Genet Cytogenet* 1997;94: 67-72.
6. Glubev AG. The natural history telomeres *Adv Gerontol* 2001; 7: 95-104.
7. Blackburn EH. Switching and signaling at the telomere. *Cell* 2001; 106: 661-73.
8. Blackburn EH. Telomere states and cell fates. *Nature* 2000; 408: 53-6.
9. Hultdin M, Gronlund E, Norrback K, Eriksson Lindstrom E, Just T, Roos G. Telomere analysis by fluorescence in situ hybridization and flow cytometry. *Nucleic Acids Res* 1998; 26: 3651-6.
10. Cripe LD. Adult acute leukemia. *Curr Probl Cancer* 1997; 21: 1-64.
11. Ohyashiki JH, Ohyashiki K, Iwama H, Hayashi S, Toyama K, Shay JW. Clinical implications of telomerase activity levels in acute leukemia. *Clin Cancer Res* 1997; 3: 619-25.
12. XU D, Gruber A, Peterson C, Pisa P. Telomerase activity and the expression of telomerase components in acute myelogenous leukaemia. *Br Journal Haematol* 1998; 102: 1367-75.
13. Seol JG, Kim ES, Park WH, Jung CW, Kim BK, Lee YY. Telomerase activity in acute myelogenous leukaemia clinical and biological implications. *Br J Haematol* 1998; 100: 156-65.
14. Liu L, Sun B, Liang Y. Analysis of telomerase activity and telomere length in acute myelogenous leukemia. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi* 2001; 22: 592-4.
15. Yamada O, Oshimi K, Motoji T, Mizoguchi H. Telomeric DNA in normal and leukemic blood cells. *J Clin Invest* 1995; 3: 1117-23.
16. Allsopp RC, Cheshier S, Weissman IL. Telomere shortening accompanies increased cell cycle activity during serial transplantation of hematopoietic stem cells. *J. Exp Med* 2001; 193: 917-24.
17. Ohyashiki K, Iwama H, Yohata N, Tauchi T, Kawakubo K, Shimamoto T, Ohyashiki JH. Telomere dynamics in myelodysplastic syndromes and acute leukemic transformation. *Leuk Lymphoma* 2001; 42: 291-9.
18. Takouchi K, Toshiro S, Ohtaki M, Komada N. Telomere reduction of specific chromosome translocation in acute myelocytic leukemia *J Cancer Res* 1994; 85: 127-30.
19. Brümendorf TH, Maciejewski JP, Mak J, Young NS, Lansdorp PM. Telomere length in leukocyte subpopulations of patients with aplastic anemia. *Blood* 2001; 97: 4.
20. Chiu CP, Dragowska W, Kim NW, Vaziri H, Yui J, Thomas TE, Harley CB, Lansdorp PM. Differential expression of telomerase activity in hematopoietic progenitors from adult human bone marrow. *Stem Cells* 1996; 14: 239-48.
21. Engelhardt M, Finke J. Does telomere shortening count? *Blood* 2001; 98: 888-9.
22. Iwama H, Ohyashiki K, Ohyashiki JH, Hayashi S, Yahota N, Ando K, Toyama K, Hoshika A, Takasaki M, Mori M, Shay JW. Telomeric length and telomerase activity vary with age in peripheral blood cells obtained from normal individuals. *Hum Genet* 1998; 102: 397-402.
23. Sieglöva Z, Ziloveova S, Cermah J, Rihova H, Brezinova D, Dvorakova R, Markova M, Maalonfova J, Sajdova J, Brezinova J, Zemanova Z, Michalova K. Dynamics of telomere erosion and its association with genome instability in myelodysplastic syndromes (MDS) and acute myelogenous leukemia arising from MDS: a marker of disease prognosis? *Leukemia Res* 2004; 28: 1013-21.