مقایسه فعالیت آنزیم تلومراز در بیماران مبتلا به لوسمی حاد و مزمن قبل و بعد از شیمی درمانی

دکتر محسن رضائی* ؛ دکتر علی شهریاری احمدی** ؛ دکتر محمد تقی گودرزی* ؛ غلامرضا طاهری پاک*

چکیده

سابقه و هدف: *لوسمی‌ها اختلالات بدخیمی هستند که از پرولیفراسیون کلنی پیش‌سازهای نابالغ لنفوئید یا میلوئید بوجود می‌آیند. اخیراً نشان داده شده که تلومراز و تلومرها در کنترل پرولیفراسیون سلولی و تنظیم مرگ طبیعی سلولی در اکثریت سلول‌های لوسمیک دخالت دارند. مطالعات گذشته ، فعال‌بودن تلومراز را در اغلب تومورهای سخت(Solid) و بدخیمی‌های هماتولوژیک اثبات نموده است. با وجود این مطالعات اندکی به بررسی فعالیت تلومراز در خون محیطی (PB) و مغز استخوان (BM) افراد بزرگ‌سال مبتلا به لوسمی قبل و بعد از درمان پرداخته‌اند. در این تحقیق فعالیت تلومراز در افراد بزرگ‌سال مبتلا به لوسمی حاد و مزمن قبل و بعد از شیمی درمانی با استفاده از تکنیک PCR – ELISA مورد بررسی قرار گرفته است.*

مواد و روش‌ها: *نمونه‌های مغز استخوان (BM) و خون محیطی(PB) از ۲۵ بیمار که قبلاً تحت هیچ‌گونه درمان نبوده‌اند، تهیه گردید. از این تعداد ۱۷ نفر به لوسمی حاد (AML) و ۸ نفر به لوسمی مزمن (CML) مبتلابوده‌اند. ۵۰ نمونه خون محیطی و ۱۵ نمونه مغز استخوان از استخوان‌های دنده افراد مبتلا به بیماری‌های قلبی در حین عمل جراحی قلب به عنوان شاهد تهیه گردید. پس از جدانمودن سلول‌های تک‌هسته‌ای (MNC'S) نمونه‌های خون محیطی و مغز استخوان، با استفاده از محلول لیزات و سانتریفوژ دور بالا، عصاره سلولی تهیه گردید. برای انجام PCR براساس واکنش TRAP مقداری از عصاره سلولی به مخلوط اصلی واکنش (Master mix) اضافه گردید. در نهایت محصولات حاصل از واکنش PCR از طریق تکنیک الیزا و با استفاده از پروب‌های اختصاصی قطعات تلومری ارزیابی گردیدند. همچنین محصولات PCR با تکنیک native-PAGE و سپس رنگ آمیزی نیترات نقره بررسی شدند.*

یافته‌ها: *نتایج تجربیات مذکور نشان داد که فعالیت تلومراز در زمان تشخیص در تمامی بیماران مبتلا به لوسمی در مقایسه با افراد گروه شاهد افزایش یافته، به‌طوری‌که در سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی این فعالیت ۱۱/۴ برابر و در مغز استخوان حدوداً ۷ برابر نمونه‌های مشابه در افراد شاهد بوده است(P=۰/۰۰۱). میزان فعالیت آنزیم در سلول‌های MNC'S مغز استخوان افراد مبتلا به لوسمی نسبت به سلول‌های MNC'S خون محیطی همان افراد حدوداً ۳ تا ۴ برابر و نسبت به سلول‌های MNC'S خون محیطی افراد شاهد ۳۵ برابر افزایش نشان داد. بعد از انجام شیمی‌درمانی و پاسخ به درمان فعالیت تلومراز در اکثریت بیماران ۵ تا ۱۰ برابر کاهش یافت(P=۰/۰۰۱) .*

بحث: *با توجه به بالابودن چند برابر فعالیت آنزیم در نمونه‌های خون محیطی افراد مبتلا به لوسمی نسبت به افراد شاهد و همچنین آسان‌تربودن نمونه‌گیری خون محیطی اندازه‌گیری فعالیت تلومراز با روش استفاده‌شده در این مطالعه می‌تواند به عنوان یک تومور مارکر برای تشخیص اولیه لوسمی‌ها مورد استفاده قرار گیرد.*

کلیدواژه‌ها: *تلومراز، تلومر، سرطان خون، دارو درمانی، لوسمی حاد و مزمن* « دریافت:۸۴/۷/۲ پذیرش:۸۵/۴/۶ »

* گروه بیوشیمی و تغذیه، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان

** گروه انکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه

* **عهده دار مکاتبات: همدان، دانشگاه علوم پزشکی**، دانشکده پزشکی، گروه بیوشیمی و تغذیه، تلفن : ۸۲۷۶۲۸۵-۰۸۱۱،

فاکس :۸۲۷۶۲۹۹-۰۸۱۱ Email:drmrezaei@hotmail.com

مقدمه

یکی از ویژگی‌های مهم سلول‌های سرطانی در مقایسه با سلول‌های پیکری(غیرسرطانی)،قابلیت همانندسازی خیلی زیاد و نامحدود آن‌ها می‌باشد و مهم‌ترین کنترل‌کننده‌های همانندسازی سلولی بخشی از ساختار کروموزوم به‌نام تلومر (Telomer) می‌باشد. تلومرها توالی‌های کوتاه و تکراری غنی از G در DNA هستند که در اتصال با گروهی از پروتئین‌های هسته، قسمت انتهایی کروموزوم‌های یوکاریوتی را تشکیل می‌دهند (۱). تلومرها باعث تثبیت و محافظت انتهاهای کروموزومی دربرابر آسیب‌های اگزونوکلئازی، جوش‌خوردگی انتها به انتهای کروموزم‌ها و نوترکیبی‌های کنترل نشده می‌گردند. انتهاهای آزاد DNA غیرپایدار است و همانند DNA شکسته‌شده باعث تولید سیگنال‌های تخریب DNA و حمله اگزونوکلئازها شده که در نهایت منجر به اختلالات کروموزومی و توقف سیکل سلولی می‌گردد.

DNA پلیمرازها نمی‌توانند انتهاهای ′5 کروموزم‌های خطی را به‌طور کامل همانندسازی کنند و در هر تقسیم سلولی قسمتی (50-100bp) از انتهاهای ′5 از بین می‌رود (۲). این مسأله ، همانندسازی انتهای کروموزم‌های خطی نامیده شده است (The end-replication problem). ازدست‌رفتن تدریجی توالی‌های DNA به‌دلیل همانندسازی ناقص رشته پیرو (Lagging) در نهایت منجر به کوتاه‌شدن تلومر و ازدست‌رفتن توالی‌های ضروری کروموزومی می‌شود.

از آنجا که تلومرها نقش مهمی در کنترل سرعت تقسیم سلولی و فرایند پیری (Aging) ایفا می‌نمایند، هنگامی‌که فرایند کوتاه‌شدن تلومر به حد خطرناک (حذف توالی‌های کددهنده) برسد، باعث مرگ طبیعی سلول (Senscence) می‌گردد (۲و ۳). ثابت‌ماندن طول تلومر براثر فعالیت آنزیمی به‌نام تلومراز (Telomerase) صورت می‌پذیرد. این آنزیم یک ترانس‌کریپتاز معکوس (Reverse Transcriptase) می‌باشد که با اضافه‌کردن توالی‌های تکراری جداشده از انتهای ′5 کروموزوم‌ها، باعث جایگزین‌نمودن قطعات ازدست‌رفته DNA در طول هر تقسیم سلولی می‌گردد و بدین‌وسیله از کوتاه‌شدن تلومرها جلوگیری نموده، فرایند مرگ طبیعی سلولی را متوقف می‌سازد. تلومراز تقریباً در تمام سلول‌های سرطانی فعال است و تحقیقات نشان می‌دهد که سطح فعالیت تلومراز با مراحل پیشرفت سرطان ارتباط دارد (۴)؛ لذا اندازه‌گیری فعالیت تلومراز می‌تواند نشانگری مطمئن در تشخیص سرطان و تعیین مراحل پیشرفت آن باشد. علاوه بر سلول‌های توموری، سلول‌های طبیعی مشخصی مانند سلول‌های بنیادی (stem cells) و سلول‌های رده زاینده (Germ line cells) از قدرت پرولیفراسیون نامحدودی برخوردار می‌باشند که این مسأله به‌دلیل پایداری طول تلومرهای این سلول‌ها می‌باشد. تلومراز به طور جالب توجهی در طیف وسیعی از سلول‌های سرطانی دوباره فعال می‌شود(۵).

فعالیت تلومراز عمومی‌ترین نشانگر مولکولی برای شناسایی سرطان انسان است و در ۸۵ درصد کل تومورها قابل‌ردیابی می‌باشد، در حالی‌که اکثریت بافت‌های سالم سطوح پایینی از فعالیت تلومراز را از خود نشان می‌دهند یا فاقد فعالیت تلومراز می‌باشند. مطالعات مختلف نشان داده که اندازه‌گیری فعالیت تلومراز در تشخیص مراحل اولیه سرطان که قابل‌ردیابی با روش‌های دیگر نمی‌باشد،

مؤثر است؛ بنابراین تلومراز می‌تواند یک نشانگر اولیه و مستقل سرطان محسوب گردد (۶).

در بعضی موارد (به‌طور قابل‌توجه در مورد نروبلاستوما، تومورهای معده و پستان)، سطح بالای فعالیت تلومراز با پیش‌آگهی ضعیفی همراه می‌باشد که نشان‌دهنده این است که فعالیت تلومراز می‌تواند به‌عنوان یک نشانگر پیشگویی‌کننده مورد استفاده قرار بگیرد (۷ و ۸)؛ لذا به‌رغم اثبات بالابودن سطح فعالیت تلومراز در سلول‌های توموری با منشأهای مختلف و همچنین اندازه‌گیری سطح فعالیت این آنزیم در سرطان سلول‌های خونی که به‌طور پراکنده انجام گرفته (۹ و ۱۰)، تاکنون هیچ‌گونه مطالعه‌ای که دال بر تعیین سطح فعالیت این آنزیم در سلول‌های طبیعی(میرا) انسانی و سلول‌های سرطانی به‌خصوص سرطان خون باشد، در ایران مشاهده نگردیده؛ لذا این مطالعه به منظور تعیین سطح فعالیت آنزیم تلومراز در سلول‌های خون محیطی و مغز استخوان افراد گروه شاهد (غیرلوسمیک) و همچنین مقایسهٔ سطح فعالیت آنزیم در سلول‌های خون محیطی (PB) و مغز استخوان (BM) افراد مبتلا به لوسمی حاد و مزمن انجام گردید.

با توجه به اکثر گزارش‌های قبلی مبنی بر افزایش سطح فعالیت آنزیم تلومراز در بسیاری از انواع سرطان‌ها هدف دیگر این مطالعه پاسخ به این سؤال بود که آیا بین سطح فعالیت تلومراز در خون محیطی با سطح فعالیت تلومراز در نمونه‌های به‌دست‌آمده از مغز استخوان بیماران لوسمیک ارتباطی وجود دارد. تأثیر شیمی‌درمانی در فعالیت این آنزیم نیز مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

الف ـ نوع مطالعه و روش تعیین تعداد نمونه‌ها: این مطالعه به روش مورد ـ شاهدی انجام شد. تعداد نمونه‌های وارد در مطالعه براساس میانگین سطح فعالیت آنزیم تلومراز در افراد نرمال در مطالعاتی که قبلاً انجام شده بود و با استفاده از فرمول حجم نمونه در این‌گونه مطالعات برابر با ۲۵ نفر تعیین گردید.

ب ـ بیماران: به دلیل نیاز به مقایسه نمونه‌های بیماران قبل و بعد از شیمی‌درمانی، بیمارانی‌که برای اولین‌بار به بخش انکولوژی مراجعه نموده بودند (New case)، برای مطالعه انتخاب گردیدند. تعداد ۲۵ بیمار مورد مطالعه قرار گرفت که از این تعداد ۱۷ بیمار قبلاً به لوسمی حاد و ۸ بیمار قبلاً به لوسمی مزمن مبتلا بودند. از هر بیمار یک نمونه خون محیطی (BP) و یک نمونه مغز استخوان (BM) قبل و بعد از شیمی‌درمانی گرفته شده است. بیمارانی که نمونه‌های مغز استخوان و خون محیطی از آن‌ها گرفته شد، قبلاً تحت هیچ‌گونه درمانی قرار نگرفته بودند. محدوده سنی بیماران مبتلا به لوسمی بین ۲۵ تا ۶۴ سال و میانگین آن ۴۳ سال بوده است. از کلیه بیماران رضایت کتبی برای تهیه نمونه و انجام دادن آزمایش‌ها گرفته شد.

ج ـ تهیه نمونه: نمونه خون محیطی بیماران از محل ورید کوبیتال میانی (Median cubital vein) دست گرفته شد. برای تهیه نمونه مغز استخوان از دو ناحیه استخوان جناق (Strenum) و تاج خلفی ایلیاک (posterioriliac crest) استفاده گردید. این کار توسط پزشک متخصص انکولوژی هماتولوژی انجام شد. بدین صورت که برای نمونه‌گیری از جناق، بیمار به پشت خوابانده شد و محل اکران جناق ضدعفونی گردید و پس از خشک‌شدن محل

بااستفاده ازسوزن‌های مخصوص آسپیراسیون مغزاستخوان یا سوزن جمشیدی (Bonemarrow aspiration needle) از بیماران مقدار ۱ تا ۲ میلی‌لیتر نمونه گرفته شد و سپس به درون لوله‌های آغشته به هپارین منتقل گردید. برای تهیه نمونه از تاج خلفی ایلیاک، بیمار به روی شکم خوابانده می‌شد و پس از تعیین محل نمونه‌گیری با استفاده از سوزن مخصوص آسپیراسیون مغز استخوان توسط متخصص نمونه‌گیری به‌عمل می‌آمد و به درون لوله‌های آغشته به هپارین منتقل می‌گردید.

برای انجام دادن این مطالعه ۶۵ نفر به‌عنوان شاهد انتخاب گردیدند. از این تعداد از ۵۰ نفر نمونه خون محیطی و از ۱۵ نفر نمونه مغز استخوان گرفته‌شد. به‌منظور تهیه خون محیطی، از بیماران بستری در بخش‌های دیگر بیمارستان که مبتلا به هیچ‌گونه سرطان خون نبوده‌اند(با تأیید متخصص انکولوژی) طبق روش ذکرشده نمونه‌گیری به‌عمل آمد. ۱۵ نمونه مغز استخوان سالم از بیماران قلبی مراجعه‌کننده به بیمارستان قلب امام علی (ع) کرمانشاه با کسب رضایت‌نامه از آن‌ها و توسط پزشک جراح قلب گرفته شد. برای تهیه نمونه مغز استخوان از این بیماران، پس از بیهوشی و بازنمودن قفسه سینه با استفاده از سوزن‌های مخصوص آسپیراسیون مغز استخوان از سر استخوان‌های دنده نمونه‌گیری به‌عمل آمد.

با توجه به پایین‌بودن فعالیت تلومراز در سلول‌های گرانولوسیت، برای بررسی فعالیت آنزیم از سلول‌های تک‌هسته‌ای که شامل سلول‌های بلاست نیز است, استفاده شد. ابتدا ۲ میلی‌لیتر Ficoll-hypaque به لوله‌های استریل شیشه‌ای اضافه‌گردید. سپس حجم مساوی از نمونه به لوله‌های محتوی فایکول اضافه‌گردید برای هموژن‌نمودن نمونه‌های مغز استخوان از نرمال‌سالین ۰/۹ درصد استفاده شد. سپس نمونه‌ها به‌مدت ۱۵ دقیقه با ۲۵۰۰ دور در دقیقه و ۵ دقیقه با ۳۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند. پس از سانتریفوژ پنج لایه تشکیل شد که به‌ترتیب از پایین به بالا عبارت‌بودند از: گلبول‌های قرمز، گرانولوسیت‌ها و پلاکت‌ها، محلول فایکول، هاله نازک و ابرمانند سلول‌های تک‌هسته‌ای و سرم. سپس لایه مربوط به سلول‌های تک‌هسته‌ای هر نمونه به‌دقت جمع‌آوری گردید و به میکروتیوب ۱/۵ ml منتقل شد.

د ـ اندازه‌گیری فعالیت آنزیم تلومراز

برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم تلومراز از کیت Telomerase PCR-ELISA plus محصول کشور آلمان که براساس فن‌آوری Telomeric Repeat Amplification Protocol (TRAP) تهیه شده است، استفاده گردید. روش TRAP امکان اندازه‌گیری فعالیت تلومراز را با حساسیت بالا و همچنین بدون حضور مواد رادیواکتیو فراهم می‌نماید. این تکنیک دارای دو مرحله می‌باشد:

۱- مرحله طویل‌سازی تکثیر Elongation / amplification؛

۲- مرحله تعیین فعالیت آنزیم با ELISA.

در مرحله اول، تلومراز توالی‌های تکراری تلومری (TTAGGG) را به انتهای ′3 پرایمر سنتتیک PI-TS که متصل به بیوتین می‌باشد اضافه می‌نماید و محصولات حاصل از فعالیت طویل‌سازی آنزیم به همراه استاندارد داخلی IS (قطعات DNA حاوی ۲۷ جفت باز 216 bp) که در همان لوله واکنش قرار داده شده با استفاده از پرایمرهای PI – TS و پرایمر لنگری (anchor – Primer) توسط سیکلهای PCR تکثیر می‌شوند.

پروتکل ذیل برای واکنش‌های طویل‌سازی پرایمر و تکثیر در سیکل‌های PCR انتخاب گردید:

- گسترش یا طویل‌سازی پرایمر با درجه حرارت ۲۵ سانتی‌گراد به مدت ۲۵ دقیقه؛
- غیرفعال‌سازی تلومراز در درجه حرارت ۹۵ سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه؛
- دناتوره‌نمودن در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ثانیه؛
- اتصال پرایمر (Annealing) در ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه؛
- پلی‌ریزاسیون در ۷۲درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ ثانیه؛
- پلی‌مریزاسیون نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه؛
- دمای حفظ (Hold) ۴ درجه سانتی‌گراد؛
- تعداد سیکل‌ها نیز ۳۰ سیکل انتخاب گردید. برای انجام دادن عمل PCP از ترموسکایکر (eppenddorf) محصول کشور آلمان استفاده گردید.

در مرحله بعد محصولات به‌دست آمده از PCR (شامل قطعات اختصاصی ۶ نوکلئوتیدی ویژه تلومر و قطعاتbp ۲۱۶ مربوط به استاندارد داخلی)، ابتدا توسط هیدروکسیدسدیم ۰/۵ درصد دناتوره‌شده، سپس با جستجوگرهای (Probes) نشاندارشده توسط دیگوکسی ژنین (DIG) هیبرید می‌شوند. در این ارتباط P3-T پروب اختصاصی برای توالی‌های تلومری و P3-IS پروب اختصاصی استاندارد داخلی(IS) بودند. محصولات به‌دست‌آمده از طریق بیوتن چسبیده به پرایمر در داخل پلیت‌های میکروتیترالیزا که چاهک‌های آن با استرپت آویدین (Streptavidin) پوشیده‌شده فیکس شد و محصولات فیکس‌شده توسط یک آنتی‌بادی ضددیگوکسی ژنین (Anti-DIG-HPR) که با پراکسیداز ترب کوهی(HRP) کونژگه‌شده شناسایی گردیدند. قرائت مقادیر فعالیت آنزیم بااستفاده از الیزاریدر AWERNESS در طول موج ۴۵۰ نانومتر انجام گردید.

هـ _ روش‌های آماری

پس از محاسبه درصد فعالیت آنزیم در هر نمونه با استفاده از آزمون‌های آماری تی زوجی میانگین مقادیر مورد مطالعه محاسبه و بین گروه‌های مورد مطالعه مقایسه صورت پذیرفت. مقدار p<۰/۰۵ به عنوان سطح معنادار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

در بررسی فعالیت آنزیم تلومراز خون محیطی و مغز استخوان بیماران مبتلا به لوسمی و مقایسه آن با افراد سالم نتایج ذیل حاصل گردید: در جدول ۱ درصد فعالیت آنزیم تلومراز در سلول‌های MNC′S مغز استخوان (BM) و همچنین خون محیطی (PB) افراد مبتلا به لوسمی با افراد گروه شاهد مقایسه شده است. همان‌گونه که در جدول نشان داده شده، درصد فعالیت آنزیم در نمونه‌های به‌دست‌آمده از مغز استخوان افراد بیمار ۷/۵ برابر نسبت به درصد فعالیت آنزیم در افراد سالم و درصد فعالیت آنزیم در نمونه‌های به‌دست‌آمده از خون محیطی افراد بیمار حداقل ده برابر نسبت به میانگین درصد فعالیت آنزیم در افراد سالم افزایش نشان می‌دهد(در هر دو مورد P=۰/۰۰۱) که نشان‌دهنده معنادار بودن تفاوت بین دو گروه می‌باشد.

جدول ۲ نشان می‌دهد که در بیماران مبتلا به لوسمی حاد، درصد فعالیت آنزیم نسبت به افراد مبتلا به لوسمی نوع

مزمن چه در خون محیطی و چه درنمونه مغزاستخوان بالاتر است و این تفاوت بین دو گروه معنادار می‌باشد.

نتایج تأثیر شیمی‌درمانی در فعالیت تلومراز در جدول ۳ نشان داده شده است. این نتایج نشان می‌دهد میانگین

جدول ۱– مقایسه درصد فعالیت نسبی آنزیم تلومراز در سلول‌های تک‌هسته (MNC′S) مغز استخوان (BM) و خون محیطی (PB) افراد مبتلا به لوسمی با افراد شاهد.

متغیر	افراد مبتلا به لوسمی (n=۲۵)	گروه شاهد*	P-value
درصد فعالیت نسبی آنزیمی تلومراز در سلول‌های MNC′S مغز استخوان (BM)	۶۸/۸±۲۴/۲۴	۹/۷±۷/۰۷	۰/۰۰۱
درصد فعالیت نسبی آنزیمی تلومراز در سلول‌های MNC′S خون محیطی (PB)	۲۱/۶±۶/۵۰	۱/۸۳±۱/۳۴	۰/۰۰۱

*BM=۱۵ ،PB=۵۰

جدول ۲– مقایسه درصد فعالیت نسبی آنزیم تلومراز در سلول‌های تک‌هسته‌ای(MNC′S) خون‌محیطی(PB) و نمونه‌های مغز استخوان (BM) افراد مبتلا به لوسمی حاد یا مزمن قبل از شیمی‌درمانی

متغیر	افراد مبتلا به لوسمی حاد (n=۱۷)	افراد مبتلا به لوسمی مزمن (n=۱۸)	P-value
درصد فعالیت نسبی آنزیمی تلومراز در سلول‌های MNC′S خون محیطی (PB)	۲۴/۲۹ ± ۵/۹۳	۱۵/۸۷ ± ۳/۰۹	۰/۰۰۱
درصد فعالیت نسبی آنزیمی تلومراز در سلول‌های MNC′S مغز استخوان (BM)	۷۵/۷۶ ± ۲۵/۳۵	۵۴ ± ۱۳/۳۹	۰/۰۱

جدول ۳–مقایسه درصد فعالیت نسبی آنزیم تلومراز در سلول‌های تک‌هسته‌ای(MNC′S) خون محیطی(PB) و نمونه‌های مغزاستخوان (BM) افراد مبتلا به لوسمی حاد قبل و بعد از شیمی‌درمانی

متغیر	قبل از شیمی درمانی	بعد از شیمی درمانی	P-value
درصد فعالیت نسبی آنزیمی تلومراز در سلول‌های MNC′S خون محیطی (PB)	۲۱/۶۰ ± ۶/۵۰	۲/۴۶ ± ۲/۷۰	۰/۰۰۱
درصد فعالیت نسبی آنزیمی تلومراز در سلول‌های MNC′S مغز استخوان (BM)	۶۸/۸ ± ۲۴/۲۵	۱۲/۱۶ ± ۵/۳۲	۰/۰۰۱

درصد فعالیت آنزیم تلومراز بعد از انجام شیمی‌درمانی در سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی (PB) و نمونه‌های مغز استخوان (BM) به‌ترتیب حدود ۱۰ و ۵/۶ برابر کاهش یافته است (P=۰/۰۰۱)

بحث

تحلیل داده‌های به‌دست‌آمده از این مطالعه نشان داد که سطح فعالیت تلومراز در سلول‌های تک‌هسته‌ای (MNS′S) جداشده از خون محیطی و مغز استخوان افراد شاهد (غیرلوسمیک) پایین بوده، در حالی‌که در مقایسه با آن، سطح فعالیت آنزیم در سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی و مغز استخوان بیماران مبتلا به لوسمی حاد بسیار بالا بود (۳۵ برابر). در بیماران مبتلا به لوسمی حاد سطح فعالیت تلومراز بسیار بالاتر از سطح فعالیت تلومراز در افراد شاهد بود. این میزان به‌خصوص در نمونه‌های مغز استخوان در مقایسه با نمونه‌های خون محیطی به‌شدت افزایش نشان داد.

گرچه در تعدادی از گزارش‌های قبلی بیان گردیده بود که بین میزان بیان آنزیم تلومراز در لوسمی و عوامل بیولوژیکی رابطه بسیار ناچیزی وجود داشته است و یا اصلاً وجود ندارد (۱۱)، در این مطالعه دریافتیم که تلومراز نقش مهمی در پروسه چندمرحله‌ای ایجاد لوسمی دارد و اصولاً با پیشرفت بیماری همبستگی دارد، به‌طوری‌که هنگامی که بیماران لوسمیک به شرایط بهبود کامل (completer remission) برسند، میزان فعالیت تلومراز به مقادیری نزدیک به میزان طبیعی می‌رسد. این نتیجه با برخی مطالعات منتشرشده در قبل نیز تطابق دارد (۱۲ و ۱۳). در همین ارتباط، مقایسه‌نمودن سطح فعالیت تلومراز نمونه‌های به‌دست‌آمده از بیماران مبتلا به لوسمی در زمان تشخیص در مقایسه با نمونه‌های به‌دست‌آمده در طول درمان، به‌طور قابل‌قبولی حکایت از بالابودن فعالیت تلومراز در نمونه‌های به‌دست‌آمده در زمان تشخیص داشت. این مسأله هم در نمونه‌های AML و هم در نمونه‌های CML مشاهده گردید. با توجه به نتایج حاصل از این پژوهش مشخص شد که سطح فعالیت تلومراز پس از شیمی‌درمانی به‌طور محسوسی در بیماران کاهش یافته که این امر با از بین‌رفتن تعداد سلول‌های سرطانی در رسیدن به شرایط بهبودی کامل و جایگزینی سلول‌های طبیعی مطابقت داشت. نتایج حاصل با برخی مطالعات انجام‌شده قبلی در روی سایر سرطان‌ها مانند سرطان تخمدان تطابق دارد (۱۴).

به‌طور کلی مشاهده گردید که در بیمارانی که از نظر درمانی شرایط ثابتی پیدا می‌کنند، در مقایسه با بیمارانی که بیماری به‌صورت ناگهانی در آن‌ها شدت و حدت پیدا می‌کند، میزان فعالیت تلومراز به‌شدت کاهش پیدا می‌کند. برخلاف نتایج به‌دست‌آمده در گزارش‌های قبلی مبنی بر آنکه سطح فعالیت تلومراز در بیماران مبتلا به لوسمی مزمن در مقایسه با افراد سالم چندان افزایش نمی‌یابد و یا حتی در حدود مقادیر طبیعی خود باقی می‌ماند (۱۵)، نتایج این مطالعه نشان داد که میزان فعالیت تلومراز در بیماران مبتلا به لوسمی مزمن، حداقل چند برابر مقادیر طبیعی افزایش می‌یابد. این نتیجه به‌دست‌آمده می‌تواند دلایلی را که پزشکان قبلی برای عدم افزایش سطح فعالیت تلومراز در لوسمی مزمن ارایه نموده‌اند زیر سؤال برد که برای تأیید این نتیجه به مطالعات بیشتری نیاز است.

گرچه افزایش تقریباً ده‌برابری سطح فعالیت تلومراز در نمونه‌های به‌دست آمده از خون محیطی نسبت به مقادیر طبیعی افزایش کاملاً معناداری محسوب می‌گردد، اما با توجه به افزایش ۳۵ برابری سطح فعالیت تلومراز در نمونه‌های به‌دست آمده از مغز استخوان نسبت به مقادیر طبیعی، پیشنهاد می‌گردد برای تشخیص بیماری لوسمی از طریق اندازه‌گیری سطح فعالیت تلومراز می‌توان در مراحل اولیه تشخیص، به نمونه‌های خون محیطی بسنده نمود و سپس در صورت ضرورت و برای تأیید بیشتر از نمونه‌های مغز استخوان استفاده نمود؛ زیرا تهیه نمونه مغز استخوان در مقایسه با خون محیطی از پیچیدگی‌های خاصی برخوردار است. تعیین طول تلومرها نیز از عواملی است که می‌تواند پاسخ‌گوی سؤالات مهمی در مورد مکانیزم‌های پاتولوژیک بیماری باشد.

نتیجه‌گیری

به‌طور خلاصه، گرچه پاره‌ای از محققان در خصوص وجود همبستگی بین پارامترهای بیولوژیک و بالینی و بیان‌شدن تلومراز در بیماری لوسمی اعتقاد چندانی ندارند (۱۱)، اما نتایج به‌دست‌آمده از این مطالعه در تأیید گزارش‌های قبلی (۱۸-۱۵) پیشنهاد می‌نماید که آنزیم تلومراز نقش مهمی در پیشرفت تدریجی کلیه مراحل ایجاد لوسمی ایفا می‌کند، با پیشرفت بیماری همبستگی دارد و با انجام درمان و حصول بهبودی کامل در بیماران لوسمیک تا مرز حد نرمال کاهش می‌یابد.

پایین‌بودن چندبرابری فعالیت تلومراز در افراد سالم نسبت به بیماران نشان‌دهنده این واقعیت است که افزایش سطح فعالیت تلومراز تنها در بیمارانی که مبتلا به بیماری‌های سیستمیک هستند، مشاهده می‌شود.

Abstract:

Telomerase Activity in Acute and Chronic Leukemia Patients Undergoing Chemotherapy

---

Rezae, M.[1]; Shahriariahmadi, A.[2]; Godarzi, M. T.[1]; Taheripak, Gh.R.[1]

1.Biochemestry and Nutrition Department, Hamadan University of Medical Sciences.

2. Encology Department, Hamadan University of Medical Sciences.

Introduction: *Leukemia is a malignant disorder resulting from clonal proliferation of lymphoid or myeloid precursors with arrested maturation. It has been shown recently that telomers and telomerase activity are involved in the control of cell proliferation, regulation of cell senescence in the most somatic cells, and unlimited proliferation capacity of the malignant cells including leukemic cells. Previous studies determined the frequent expression of telomerase activity in most human solid tumors and hematological malignancies, however so far few studies have addressed telomerase activity in both Bone marrow (BM) and peripheral blood (PB) in adult acute and chronic leukemia patients at diagnosis and after chemotherapy.*

Materials & Methods: *Telomerase activity in adult chronic leukemia patients at diagnosis and after chemotherapy was determined using telomerase PCR-ELISA techniques.. BM and PB samples were obtained from 25 patients without any previous therapy, including 17 patients with acute and 8 patients with chronic leukemia. BM control samples obtained from the ribs of patients with heart diseases during operation. After separation of MNCs from PB and BM, cell extraction was prepared. TRAP-PCR was carried out on all prepared cell lysates and the PCR products were subjected to native PAGE and visualized by silver nitrate staining.*

Results*: High telomerase activity was detected in MNC'S from all leukemia patients at diagnosis. This activity in PB and BM of patients was respectively 11.4 and 7 fold higher than those of control group (p=0.001). Telomerase activity in BM MNC'S from leukemic patients was 3 to 4 fold higher than PB MNC'S and 35-fold higher than PB MIN'S activity in control donors. After chemotherapy and response to treatment, telomerase activity decreased 5 to 10 fold in most patients (p=0.001)*

Conclusion: *Considering the convenience of PB sampling and several fold increase in telomerase activity of PB samples from leukemia patients compared to control donors, telomerase activity measurement can be suggested as a primitive diagnostic tumor biomarker*

Key Words*: Telomere, Telomerase, Leukemia, Chemotherapy, Acute and Chronic leukemia*

منابع

1. Blachburn EH. Structure and function of telomerase. Nature 1997; 266:569-73
2. Makarov VL, Hirose Y, Longmar JP, Long G. Tails at both ends of human chromosomes suggest a C strand degradation mechanisms for telomere shortening cell. Cell 1997; 88:657-66
3. McElligott R, Wellinger RJ. The terminal DNA structure of mammalian chromosomes. EMBO 1997; 16:3705-14
4. Watson JD. End replication problem. Nature 1999; 239:197-201
5. Counter GM, Avilion AA, Lefeuvre CE, Stewat NG, Gereider GW, Harvley CB. Telomere shortening associated with chromosomes instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. EMBO 1992; 11:877-82
6. Allsopp RC, Vaziri H, Patterson C, Goldstein S, Younglai EV. Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblast. Proc Natl Acad Sci 1992; 89:10114-118
7. Malask AJ, Kumica Z, Brosky M, Faycus J. Telomerase as a diagnostic and predictive marker in colorectal carcinoma. Neoplasm 2004; 51(2):90-96
8. Kobayashi T, Kubota K, Takayama T, Macuuchi M. Telomerase activity as a predictive marker for recurrence of hepato-cellular carcinoma after hepatectomy. Am J surgery 2001; 18:984-8
9. Franco S, Ozkaynak MF, Sandoval C, Tugal O, Jayabose S, Engelhardt M, Moore MAS. Telomere dynamics in childhood leukemia and solid tumors: a follow-up study. Leukemia 2003; 17:401-410
10. Piatyszek MA, Kim NW, Weinrich SL, Hiyama E, Shay JW. Detection of telomerase activity in human myelogenous cells and tumors by a telomeric repeat amplification protocol (TRAP). Methods Cell Sci 1995; 17:1-15
11. Seol JG, Kim ES, Park WH, Jung CW, Kim BK, Lee YY. Telomerase activity in acute myelogenous leukemia: clinical and biological implications. Br J Haematol 1998; 100:156-65
12. Ohyashiki K, Ohyashiki JH, Iwama H, Hayashi S, Shay JW, Toyama K. Telomerase activity and cytogenetic changes in chronic myeloid leukemia with disease progression. Leakemia (Baltimore) 1997; 11:190-94
13. Engelhardt M, Ozkayanak MF, Drullinsky P, Sandoval C, Tugal O, Jayabose S, Moore M. Telomerase length in pediatric patients with malignancies undergoing chemotherapy. Leukemia (Baltimore) 1998; 12:13-24

14. Takahashi M, Kigawa J, Oishi T, Itamochi M, Shimada S, Terdkawal N. Alternation of telomerase activity in ovarian cancer after chemotherapy. Gynecol Obstet Investigation 2000; 49:204-8

15. Counter CM, Gupta J, Harly CB, Leber B, Bacchetti S. Malignancies. Blood 1995; 85:2315-20

16. Zhang W, Piatyszek MH, Kobayashi T, Andreeff M, Deisseroth AB, Wright WE, et al. Telomerase activity in human acute myelogenous leukemia: inhibition of telomerase activity by differentiation – inducing agents. Clin Cancer Res 1996; 2:799-803

17. Shay JW, Werbin H, Wright WE. Telomerase and telomere in human leukemias. Leukemia (Baltimore) 1996; 10:1255-61

18. Ohyashiki JH, Ohyashiki JH, Ohyashiki K, I wama H, Hayashi S, Toyama K, et al. Clinical implications of telomerase activity levels in acute leukemia. Clin Cancer Res 1997; 3:619-25