

# STANOVENÍ AKTIVITY TELOMERÁZY U MNOHOČETNÉHO MYELOMU

## TELOMERASE ACTIVITY IN MULTIPLE MYELOMA

HÁJEK R.<sup>1,2</sup>, KUNICKÁ Z.<sup>3</sup>, SKLENIČKOVÁ M.<sup>4</sup>, DVOŘÁČKOVÁ M.<sup>3,4</sup>, FAJKUS J.<sup>3,4</sup>, SMEJKALOVÁ J.<sup>2</sup>, KREJČÍ M.<sup>1</sup>, POUR L.<sup>1</sup>, OČADLÍKOVÁ D.<sup>2</sup>, WEISSOVÁ D.<sup>5</sup>, VIGÁŠOVÁ J.<sup>2</sup>, KOVÁŘOVÁ L.<sup>2</sup>, DUDOVÁ S.<sup>2</sup>, HEINIGOVÁ J.<sup>2</sup>, VIDLÁKOVÁ P.<sup>2</sup>, ADAM Z.<sup>1</sup>, PENKA M.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> INTERNÍ HEMATOONKOLOGICKÁ KLINIKA, FN BRNO

<sup>2</sup> LABORATOŘ EXPERIMENTÁLNÍ HEMATOLOGIE A BUNĚČNÉ IMUNOTERAPIE, ODDĚLENÍ KLINICKÉ HEMATOLOGIE, FN BRNO

<sup>3</sup> LABORATOŘ FUNKČNÍ GENOMIKY A PROTEOMIKY, MU BRNO

<sup>4</sup> BIOFYZIKÁLNÍ ÚSTAV AV ČR

<sup>5</sup> CENTRUM BIostatistiky A ANALÝZ, LF MU BRNO

**Souhrn: Východisko:** Zvýšení aktivity telomerázy je pozorováno u řady zhoubných nádorů. Cílem práce bylo vyhodnotit aktivitu u nemocných s mnohočetným myelomem včetně zhodnocení prognostického významu stanovení telomerázové aktivity. **Typ studie a soubor:** Zkoumali jsme prognostický význam telomerázové aktivity u mnohočetného myelomu. **Metody a výsledky:** Pro analýzu byly připraveny CD138+ myelomové buňky izolované celkem od 130 nemocných s mnohočetným myelomem. Deset vzorků kostní dřeni od nemocných s monoklonální gamapatií nejasného významu tvořily kontrolní soubor reprezentující málo aktivní onemocnění. Aktivita telomerázy byla analyzována u souboru 34 nemocných s mnohočetným myelomem s vysokou čistotou CD 138+ populace buněk (medián 95,5 %; rozptyl 50,0-100,0 %). Pozorovali jsme výraznou heterogenitu v telomerázové aktivitě. Index pro aktivitu telomerázy v souboru pacientů s mnohočetným myelomem byl 0,80; pro pozitivní frakci 0,92 a negativní frakci 0,68. U pacientů s novou diagnózou byl index telomerázy v pozitivní frakci 1,18 a v negativní frakci 0,81. V kontrolním souboru pacientů s monoklonální gamapatií nejasného významu byla minimální telomerázová aktivita pozorována jen v 20,0% (2 z 10) případů. Index aktivity telomerázy (0,20) byl výrazně nižší než u nemocných s mnohočetným myelomem s hraniční statistickou významností i u tak malého souboru nemocných (p=0,054). Nepozorovali jsme korelaci mezi aktivitou telomerázy a standardními prognostickými parametry u mnohočetného myelomu. Podobně tomu bylo u korelace s parametry dlouhodobého přežití. **Závěr:** Výsledky ukázaly, že aktivita telomerázy v kostní dřeni pacientů s mnohočetným myelomem není specifická pro frakci CD138+. Tato skutečnost snižuje možnost využití tohoto parametru pro prognostické účely.

**Klíčová slova:** mnohočetný myelom, prognóza, telomera, telomerázová aktivita

**Summary: Background:** Telomerase activity is associated with most malignant tumors. The aim of this trial was to evaluate telomerase activity in multiple myeloma including prognostic potential of this marker. **Design and subject:** We have investigated the prognostic significance of telomerase activity in multiple myeloma. CD138+ myeloma cells were isolated from bone marrow of 130 patients with active multiple myeloma. Ten patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance represent control group with low activity of disease. The analyses of telomerase activity were undertaken only on 34 samples with high purity of CD 138+ myeloma cells with median 95,5% (range 50,0-100,0%). There was heterogeneity in telomerase activity. Index for telomerase activity in multiple myeloma patients was 0.92 for CD138+ MM cells and 0.68 for CD138- cells (p=0,238). The corresponding indexes for newly diagnosed multiple myeloma and relapse only were 1.18 (CD138+) and 0.81 (CD138-). In control group of monoclonal gammopathy of undetermined significance, the telomerase activity index (0.20) was markedly lower in comparison with the multiple myeloma patients (p=0,054), with very low activity of telomerase activity detectable in 2 of 10 patients only. No significant correlations with standard prognostic factors were observed. Similar was true for parameters of survival. **Conclusion:** The results have shown that telomerase activity has a trend to correlate with activity of multiple myeloma. Unfortunately telomerase activity in marrow of multiple myeloma patients is not specific for CD138+ myeloma cells. This fact limits usefulness of telomerase activity for prognostic purpose in this diagnosis.

**Key words:** multiple myeloma, prognosis, telomerase, telomerase activity

### Úvod

Mnohočetný myelom (MM) je onemocnění charakterizované neoplastickou klonální proliferací plazmatických buněk a jejich akumulací v kostní dřeni (1). Přestože jsou nemocní léčeni zpravidla podle univerzálních standardních protokolů, je MM heterogenním onemocněním, které se vyznačuje individuálními rozdíly z hlediska klinických projevů, léčebné odezvy a prognózy (2). Je zjevné, že u části nemocných se objevuje nová aktivita onemocnění časně a byli by proto vhodnými kandidáty pro časně použití agresivnější léčebné metody zahrnující dvojistou autologní transplantaci (3,4) či následnou konsolidační léčbu využívající cytostatika, nověji inhibitory angiogeneze nebo jinou experimentální léčbu po provedení standardní transplantace (6). Nejrozšířenějším prognostickým kritériem je v současnosti klinické stádium choroby podle Durie-Salmona z roku 1975, založené na kombinaci klinických parametrů, které korelují s velikostí nádorové masy. Význam některých z nich je však sporný. Obecně se hledají silné, na ostatních faktorech nezávislé pro-

gnostické faktory (PF), jejichž kombinace by postihovala velikost nádorové masy, stupeň agresivity nemoci a vnitřní biologické vlastnosti myelomových buněk. Mezi všeobecně uznávaná standardní prognostická kritéria patří: beta2mikroglobulin, C reaktivní protein, laktát dehydrogenáza, počet trombocytů, albumin, labeling index, stádium I-III dle Salmon-Durie (1,2) a nejnověji International Staging System (ISS), který jsme poprvé aplikovali u našich nemocných v roce 2004 (7). V poslední době je u nemocných s MM, zvláště jsou-li léčeni vysokodávkovou chemoterapií, často považován za rozhodující prognostický faktor jejich úvodní cytogenetický nálezn (8). Zcela nejnověji bylo americkými týmy navrženo vstupní rozdělení onemocnění na 4 různé typy lišící se zásadně prognózou. Jde dělení dle přítomnosti chromozomálních aberací a přítomnosti cyklinů (9) a jiné dělení na základě microarray profilu prezentované týmem z Little Rocku (10). Je zkoumána řada dalších potenciálních prognostických faktorů. Mezi ně patří i stanovení aktivity telomerázy (11).

Telomeráza je ribonukleoproteinový komplex, který zajišťuje doplňování 3'-konců chromozomální DNA, které při replikaci DNA zůstávají nezkopirovány. Při nečinnosti telomerázy je každý cyklus replikace DNA spojen se zkrácením chromozómů, které může nakonec vést až ke ztrátě schopnosti telomer maskovat konce chromozómů a odlišit je od neopravených zlomů. To má za následek aktivaci odpovědi na poškození DNA, která způsobí zastavení buněčného cyklu (12). Aktivita telomerázy je reprimována v naprosté většině normálních diferencovaných lidských buněk, a v důsledku toho je replikační kapacita těchto buněk omezena. Naproti tomu zárodečné tkáň, nediferencované buňky (např. hematopoietické buňky kostní dřeně) a nádorové buňky jsou pozitivní na aktivitu telomerázy, čímž se tyto buňky stávají nesmrtnými. Velmi silná korelace mezi přítomností aktivity telomerázy a malignitou činí tento enzym jedním z nejobecnějších tumorových markerů (13). Podle sumarizovaných údajů byla aktivita telomerázy delegována přibližně v 90,0% všech typů lidských rakovinných onemocnění. U MM bylo publikováno jen několik sdělení věnujících se stanovení a prognostickému významu telomerázy, respektive její aktivity a délky telomer (11,14,15,16), přičemž jen jediná práce ze čtyř citovaných poskytuje jistou informaci ve vztahu k prognóze (11).

Cílem této práce je shrnutí našich poznatků o telomerázové aktivitě, jejím stanovení u nemocných s MM a potenciálním přínosu pro stanovení prognózy.

### Soubor nemocných

Indikací k provedení vyšetření bylo zařazení nemocného s MM do transplantčního programu, respektive do studie 4W nebo studie navazující. Jako kontrolní soubor byl použitý soubor sledovaných jedinců s monoklonální gamapatií nejasného významu (MGUS). Všichni pacienti podepsali informovaný souhlas. Odběry pro laboratorní vyšetření a pro stanovení aktivity telomerázy byly provedeny v jeden den. Soubor 44 nemocných byl tvořen 19 muži a 25 ženami s diagnózou MM (34x) a MGUS (10x). Průměrný věk byl 56 let. Celkem bylo hodnoceno 48 vzorků: 28 od nově diagnostikovaných MM, 5 od nemocných v relapsu onemocnění (1 x stejný nemocný jako při vstupu), 5 pacientů vykazovalo maximální léčebnou odpověď (2x u nemocného se vstupním vzorkem, 1x opakovaně). U 10 pacientů byla diagnostikována (MGUS). Klinická stádia byla stanovena podle Durie and Salmon (D-S) a dle International Staging System (ISS). Charakteristika pacientů je uvedena v tabulce 1.

### Materiál a metody

Imunomagnetická separace buněk se získáním CD138+ frakce: 40 – 80 ml kostní dřeně s IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium, Sigma), Heparinem a DNase from bovine pancreat (Roche) je po 30 minutách jemného třepání centrifugována na Histopaque (Sigma). Separované mononukleární buňky jsou promyty v PBS + 0,1M EDTA, pH 7,2 a značeny podle povrchového antigenu monoklonální protilátkou B – B4 (CD 138 MicroBeads, 20 µl /10<sup>7</sup> buněk, inkubace 15 min., 6–12 °C). Značená buněčná suspenze je aplikována do kolony umístěné v magnetickém poli separátoru, pozitivní buňky jsou

**Tabulka č. 1. Charakteristika celého souboru. IgA, IgG, IgM, IgD, nespecifický Ig – typy monoklonálního paraproteinu, stádium D-S – stádium dle Durie-Salmon, stádium ISS – stádium dle International Staging System.**

Počet pacientů	44
Ženy	25
Muži	19
IgA	17
IgG	22
IgM	1
IgD	1
nespecifický Ig	1
nezařazeno	2
Stádium D-S	
I	2
II	5
III	27
MGUS	10
Stádium ISS	
I	12
II	12
III	7
MGUS	10
nezařazeno	3
Věk průměr 56,6	rozptyl 9,8

zachyceny v koloně. Frakce buněk CD138+ je získána po odstranění kolony z magnetického pole. Při kontrole čistoty frakcí (procento myelomových buněk) se zjišťuje procento plazmatických buněk určeného z cytospinového preparátu (17). Příprava vzorku pro stanovení aktivity telomerázy: odebrané množství 0.01x10<sup>6</sup> – 0.1x10<sup>6</sup> buněk pozitivní frakce, 0.1x10<sup>6</sup> buněk negativní frakce a 0.1x10<sup>6</sup> – 1x10<sup>6</sup> buněk vstupního vzorku se centrifuguje 1600 ot. 10 min., supernatant se slijí. Sediment se zamrazí šokem v tekutém dusíku v Dewarově nádobě. Stanovení aktivity telomerázy se provádí pomocí metody TRAP (*Telomeric Repeat Amplification Protocol*), která byla vyvinuta pro stanovení aktivity telomerázy v lidských buňkách (18). Metoda TRAP zahrnuje dva kroky: první fáze - extenze, probíhá 30 minut při 26 °C. Reakční mix obsahuje 18,5 µl TRAP pufru, 5 pmol substrátového oligonukleotidu, 5 pmol reverzního oligonukleotidu, 2 oligonukleotidy vytvářející vnitřní kontrolu reakce (všechny složky jsou součástí kitu TRAPeze Telomerase Detection kit, Chemicon), 1 jednotku termostabilní DNA polymerázy [např. Dynazyme II DNA polymerase (Finnzymes)] a buněčný extrakt. Po skončení fáze extenze jsou amplifikovány produkty reakce v 35 cyklech: 94 °C/30s, 56 °C/30s, 72 °C/30s. Separace produktů probíhá pomocí polyakrylamidové gelové elektroforózy na 12,5% polyakrylamidovém gelu. Produkty jsou obarveny pomocí SybrGreen (Molecular Probes) a následně skenovány přístrojem STORM PhosphoFluorImager (Amersham Biosciences).

Statistické zpracování: Výsledky byly zpracovány programem Statistika 7.0. Aktivita telomerázy má tři kategorie (pozitivní, opačná, stejná). Pro zjištění zda existuje závislost mezi aktivitou telomerázy a ostatními parametry byl pro spojitě parametry (věk, laboratoř, délka přežití, follow-up) použit Kruskal-Wallis ANOVA test popř. Mann-Whitney test, pro kategoriální parametry (pohlaví, řetězec, ...) byl použit Fischer test a test maximální věrohodnosti. Spojité parametry jsou popsány průměrem, směrodatnou odchylkou, mediánem, min, max a percentily. Pro kategoriální veličiny jsou vytvořeny frekvenční tabulky. Protože data nemají normální rozložení, byly pro testování použity metody neparametrické statistiky.

### Výsledky

Hodnocení bylo provedeno semikvantitativně s označením aktivity 1,0-33,0% hodnocením 1, aktivity 33,0%-66,0% hodnocením 2 a aktivity vyšší než 66,0% hodnocením 3. Index pro aktivitu telomerázy v souboru pacientů s MM (28x nová dg.; 5x relaps, 5x max. léčebná odpověď) byl 0,80; pro pozitivní frakci 0,92 a negativní frakci 0,68. U pacientů s novou diagnózou a relapsem byl index telomerázy 1,00; v pozitivní frakci 1,18 a v negativní frakci 0,81. V kontrastu s tím níže uvádíme výsledky získané u 10 nemocných s MGUS, respektive index pro aktivitu telomerázy 0,20. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 2.

Výsledky ukázaly, že aktivita telomerázy v kostní dřeni pacientů s mnohočetným myelomem není specifická pro frakci CD138+. Ze 38 vzorků od nemocných s MM (28x nová dg.; 5x relaps, 5x max. léčebná odpověď) byla u 25 vzorků (66,0%) aktivita telomerázy pozitivní ve kterékoliv frakci (CD138+ i CD138-). Ve 12 případech byla zvýšená aktivita telomerázy v CD138+ frakci (32,0%), 19 vzorků dřeně mělo podobnou aktivitu v obou frakcích (50,0%) a u zbývajících 7 vzorků byla aktivita v CD138- frakci vyšší než ve frakci CD138+ (18,0%). Při odclonění výsledků u pacientů po dosažení maximální odpovědi (5x) byla relevantní čísla pro jednotlivé frakce následující: 12x zvýšená aktivita telomerázy v CD138+ frakci (12/33 – 36,0%); 16 x podobná aktivita (16/33- 48,0%); 5 x aktivita v CD138- frakci vyšší než ve frakci CD138+ (5/33 – 15,0%) (graf č. 1 a 2).

Po dosažení maximální léčebné odpovědi byla telomerázová aktivita pozitivní ve kterékoli frakci u 2 z 5 vzorků (40,0%), přičemž CD138+ frakce vykazovaly aktivitu vždy nižší než odpovídající CD138- frakce (s hodnocením 1 vs 2, resp. 1 vs 3). To je výrazný rozdíl oproti dokladované pozitivitě aktivity

**Tabulka č. 2. Přehled výsledků telomerázové aktivity u 48 hodnocených nemocných s mnohočetným myelomem a monoklonální gamapatií nejasného původu.**

čís.	čistota T-	čistota T+	dg.	A (TV)	A (T+)	A (T-)	hodnocení
1	0%	80.8%	nová dg		1	0	p
2	3%	81%	nová dg		0	0	s
3	3%	96%	nová dg		1	0	p
4	29%	94%	nová dg		3	3	s
5	39%	99%	nová dg		1	1	s
6	11%	100%	nová dg		1	1	s
7	0.4%	96.4%	nová dg		0	2	o
8	11%	100%	nová dg		2	2	s
9	22%	92%	relaps		0	2	o
10	0%	100%	nová dg		3	1	p
11	3%	100%	nová dg		3	1	p
12	0%	100%	max. o		0	0	s
13	0%	100%	nová dg		0	0	s
14	27%	100%	nová dg		0	0	s
15	21%	100%	nová dg		0	0	s
16	7%	91%	max. o		0	0	s
17	5%	92%	nová dg		2	0	p
18	2%	100%	nová dg		0	1	o
19	2%	100%	nová dg		0	0	s
20	0%	58%	nová dg		2	0	p
21	0%	70%	relaps		2	0	p
22	2%	9%	max. o		0	0	s
23	45%	81%	relaps		1	1	s
24	10%	89%	nová dg		1	1	s
25	nezhod	18%	max. o		1	3	o
26	60%	90%	relaps		3	2	p
27	3%	79%	max. o		1	2	o
28	0%	50%	relaps		0	1	o
29	16%	100%	nová dg		1	0	p
30	8%	63%	nová dg		0	0	s
31	nezhod	99%	nová dg		1	0	p
32	37%	72%	nová dg		0	0	s
33	4,00%	97%	nová dg	1	0	2	o
34	9,00%	100%	nová dg	3	3	0	p
35	5,00%	100%	nová dg	0	2	0	p
36	0,00%	62%	nová dg	0	0	0	s
37	3,00%	100%	nová dg	0	0	0	s
38	0%,40bb	100%	nová dg	3	0	0	s
39	x	x	MGUS	0	x	x	
40	x	x	MGUS	0	x	x	
41	x	x	MGUS	0	x	x	
42	x	x	MGUS	0	x	x	
43	x	x	MGUS	0	x	x	
44	x	x	MGUS	0	x	x	
45	x	x	MGUS	1	x	x	
46	x	x	MGUS	1	x	x	
47	x	x	MGUS	0	x	x	
48	5%	40%	MGUS	0	0	0	s

čistotaT+ - procento myelomových buněk v pozitivní frakci  
 čistotaT- - procento myelomových buněk v negativní frakci  
 A (TV) - aktivita telomerázy ve vstupním vzorku  
 A (T+) - aktivita telomerázy v pozitivní frakci buněk  
 A (T-) - aktivita telomerázy v negativní frakci buněk  
 hodnocení - hodnocení aktivity telomerázy  
 p - pozitivní výsledek, aktivita v A(T+) je větší než v A(T-)  
 o - opačný výsledek, aktivita v A(T+) je menší než v A(T-)  
 s - stejný výsledek, aktivita v A(T+) je stejná než v A(T-)  
 nová dg - nová diagnóza  
 MGUS - monoklonální gamapatie nejasného původu  
 max. o. - maximální léčebná odpověď  
 čís. - pořadové číslo pacienta

telomerázy u 23 z 33 vzorků (70,0%) u nemocných v aktivní fázi onemocnění (před léčbou nově dg. nebo při relapsu onemocnění). Jen ve dvou případech šlo posoudit vývoj onemocnění u jednotlivých pacientů porovnáním aktivity vzorků vstupních a vzorků po dosažení maximální léčebné odpovědi; vzorky č. 1. (vstupní) a 27. (maximální léč. odpověď); vzorky č. 5. a 22. V prvním případě došlo k úplnému vymizení telomerázové aktivity (hodnocení 0 v obou frakcích při původní aktivitě 1). Ve druhém případě (č. vzorku 1) bylo při vstupním stanovení v CD138+ frakci hodnocení 1 a v CD138- frakci hodnocení 0. Po dosažení maximální léč. odpovědi zůstala v CD138+ frakci aktivita stupně 1, zatímco v CD138- frakci dosáhla hodnocení 2.

Podobně jako u maximální léčebné odpovědi byly nulové hodnoty naměřeny u většiny nemocných s MGUS (celkem 10 vyšetřených vzorků). Vzhledem k očekávané negativitě nebyly již měřeny frakce, ale byla vyšetřena plná dřev. Osm z 10 vzorků bylo negativních, ve dvou případech byla zaznamenána slabá aktivita s hodnocením 1.

Výsledky nekorelovaly s žádnými standardně měřenými prognostickými parametry kromě hladiny LDH v souboru pacientů s MGUS (p=0,042).

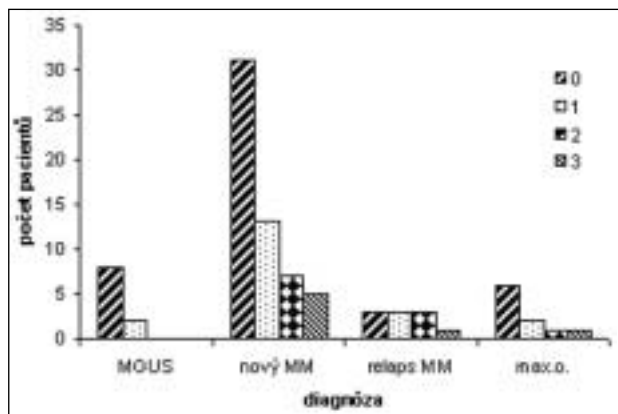
### Diskuse

Pozorované výsledky naznačují, že by mohla existovat předpokládaná korelace aktivity telomerázy se stupněm proliferace buněk a tedy i aktivitou onemocnění podobně jako u změn aktivity telomerázy, k nimž dochází u jiných nádorových onemocnění. Dokladem toho je 80,0% negativních vyšetření u prekancerózy MGUS a orientačně nízká nebo nulová aktivita telomerázy u nemocných s MM po dosažení maximální léčebné odpovědi (60,0% negativních). Tato data jsou ve shodě s pilotní prací z roku 2001 (16). Limitací je malý počet nemocných vyšetřených po dosažení remise onemocnění. Technické potíže (nízký vstupní počet buněk, ztráty buněk při selekci a nemožnost kvalitně separovat buňky) a další objektivní příčiny (závažné komplikace s přerušením léčby a případně časným relapsem či úmrtím bez možnosti odběru vzorku pozorované až ve 30,0% případech v průběhu klinických studií) vedly k vyšetření malého počtu pacientů ve stadiu maximální léčebné odpovědi. Tato data budou doplněna s postupem času nad rámec grantu na nejméně 10 srovnání, neboť jde o jedinečné údaje, které se obtížně získávají a doposud ve světě takové porovnání nebylo publikováno.

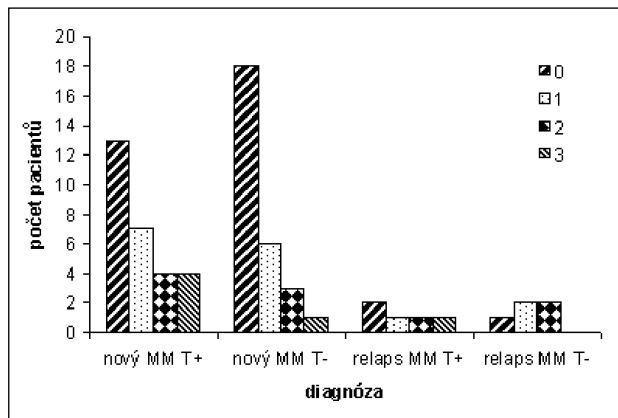
Ve stadiu relapsu a při stanovení diagnózy bylo rozmezí zjištěných aktivit velmi široké (hodnota 0-3), což může souviset s poměrně častou aktivací alternativního (na telomeráze nezávislého) prodlužování telomer (*alternative telomere lengthening; ALT*) v této fázi onemocnění. Tomu nasvědčují i pozorování heterogenity a ztráty telomer pomoci in situ technik v buňkách kostní dřeně MM pacientů.

Podobně jako v jediné dosud publikované velké práci na světě s reprezentativním počtem vyhodnocených nemocných s MM (11) a totožnou metodikou přípravy buněk pro vyšetření (selektce CD138+ buněk) jsme zjistili pozitivitu telomerázové aktivity i v CD138- frakci buněk. Účinnost frakcionace buněk pro toto vyšetření nedosahovala při použití manuální metody MACS hodnot dosažených kolektivem Wu et al (11) při použití automatického přístroje AutoMACS (>95,0% plazmocytů v CD138+ frakci hodnoceno cytospinem). Omezení souboru na vstupní vzorky o vhodné čistotě (viz výše) však vedlo k dosažení hodnoty 89,7% (50,0-100,0% plazmocytů v CD138+ frakci hodnoceno cytospi-

**Graf č.1: Hodnocení aktivity telomerázy v celém souboru. 0,1,2,3 – stupeň aktivity telomerázy.**



**Graf č. 2: Hodnocení aktivity telomerázy u pacientů s novou diagnózou a relapsem. 0,1,2,3 – stupeň aktivity telomerázy.**



nem) ve vzorcích u nově diagnostikovaných nebo relabovaných nemocných. U těchto vzorků byly získány obdobné výsledky s častou pozitivitou telomerázové aktivity i v CD138-frakci (14 z 33 nemocných; 42,0%). Toto zjištění částečně komplikuje hodnocení a nabízí se řada úvah o přítomnosti prekursorů myelomových buněk ve formě jistého stádia B lymfocytů bez přítomnosti znaku CD138+ nebo i příspěvek CD138+ buněk uniklých do negativní frakce (čistota frakce od 0,0 do 60,0%, ale vždy nejméně o polovinu nižší zastoupení CD138+ buněk oproti CD138+ frakci). Druhé vysvětlení je možné, ale

nepravděpodobné, neboť výběr nemocných s jednoznačně zvýšeným podílem CD138+ buněk v pozitivní frakci oproti negativní frakci tuto úvahu nepodporuje. Pravděpodobnějším vysvětlením tohoto jevu může být nízká aktivita telomerázy v myelomových buňkách na pozadí telomerázové aktivity krevtvořných buněk, přítomnost jiného aktivního klonu v negativní frakci, či dokonce aktivace telomerázy v buňkách tvořících mikroprostředí kostní dřevě, o němž je známo, že v patofyziologii progresu MM hraje pravděpodobně významnou roli (5, 11).

V původní práci z roku 2002 byl na souboru 25 nemocných s MM dokladován význam stanovení telomerázové aktivity pro prognózu. Pacienti s vysokou aktivitou měli signifikantně ( $p=0,035$ ) kratší přežití (15). Wu a spol. v jediné práci s reprezentativním souborem nemocných prokázali jistý význam stanovení telomerázové aktivity pro prognózu onemocnění. Vysoká telomerázová aktivita korelovala s celkově horší prognózou u 183 nemocných (52,0% versus 81,0%;  $p<0,001$ ). Nicméně při analýze souboru byly tyto výsledky potvrzeny pro nemocné v relapsu onemocnění, ale ne pro nemocné nově diagnostikované, kde byl pozorován jen trend ke zhoršení prognózy ( $p=0,080$ ) (11). Naše vlastní výsledky sledování aktivity telomerázy neprokázaly významné korelace se standardními prognostickými faktory na limitovaném souboru nemocných. Rovněž při sledování nemocných s dobou sledování s mediánem 28 měsíců a mediánem přežití 25 měsíců (14 - 94 měsíce) nebyl pozorován prognostický význam stanovení telomerázové aktivity u nově diagnostikovaných jedinců.

## Závěr

Výsledky, získané u pacientů s MM, zvláště pak v porovnání s výsledky získanými u nemocných MGUS, potvrzují, že aktivita telomerázy může korelovat s dynamikou onemocnění. Její rutinní použití v diagnostice (vzhledem k tomu, že aktivita není specifická pro CD138+ frakci, resp. není v mnoha případech v této frakci výrazně vyšší než ve zbytku kostní dřevě) je však problematickejší než u jiných typů nádorů, například kolorektálního karcinomu (19). Naše výsledky potvrzují výsledky jediné práce na toto téma (publikované na konci roku 2003), ve které byly zjištěny heterogenní hodnoty aktivity telomerázy (od 0,0 do 427,0% aktivity kontrolní neuroblastomové linie) [11]. Na limitovaném počtu nemocných nebyly nalezeny žádné prognostické korelace související s telomerázovou aktivitou. Obtížnost stanovení i pozadí telomerázové aktivity v kostní dřevě je výraznou limitací pro využití tohoto parametru pro jiné než výzkumné účely.

## Poděkování

Práce je podporována grantem IGA MZ ČR NC 7043 – 3/02.

## Literatura

- Adam Z., Hájek R., Ščudla V. et al.: Multiple myeloma and other monoclonal gammopathies Press: Opuscula Haematologica, Masaryk University Brno, 1999; 1-260
- Ščudla V., Ordeltová M., Špidlová A. et al.: Importance of determining the propidium-iodide index of plasmacytes in multiple myeloma. I. Relation to selected laboratory indicators of the disease. Vnitř Lek. 1999 Jun;45(6):331-5
- Barlogie B., Jagannath S., Vesole D. et al: Autologous and allogeneic transplants for multiple myeloma. Semin. Hematol., 1995; 32:31-44
- Hájek R., Adam Z., Vášová I. et al: Evolution of myeloma treatment from melphalan monotherapy to bone marrow transplantation. Acta Medica Austriaca, 1996;23(3): 85-91
- Anderson KC: Multiple Myeloma Research Foundation. Novel immunomodulatory therapies in the treatment of multiple myeloma. Oncology (Huntingt). 2004 Jul;18(8):988-90
- Krivanova A, Hájek R, Krejci M, et al , Czech Myeloma Group: Second autologous transplantation for multiple myeloma patients relapsing after the first autograft - a pilot study for the evaluation of experimental maintenance therapies. Report of the prospective non-randomized pilot study of the Czech Myeloma Group. Onkologie. 2004 Jun;27(3):275-9.
- Krejci M, Buchler T, Hájek R., et al.: Prognostic factors for survival after autologous transplantation: a single centre experience in 133 multiple myeloma patients. Bone Marrow Transplant. 2004.
- Smadja NV, Bastard C, Brigaudeau C, et al.: Groupe Francais de Cytogenetique Hematologique (2001) Hypodiploidy is a major prognostic factor in multiple myeloma. Blood 1998(7):2229-38.

- Fonseca R, Blood E, Rue M, et al.: Clinical and biologic implications of recurrent genomic aberrations in myeloma. Blood 2003, 1;101(11): 4569-75
- Shaughnessy in : Harousseau JL, Shaughnessy Jr J, Richardson P: Multiple myeloma.Hematology (Am Soc Hematol Educ Program).2004 237-256.
- Wu, K.-D., Orme, L.M., Shaughnessy Jr J., et al.,: Telomerase and telomere length in multiple myeloma: correlations with disease heterogeneity, cytogenetic status, and overall survival. Blood 2003; 101, 4982-4989.
- Fajkus, J., Borský, M., Kunická, Z., et al.: Changes in Telomerase Activity, Expression and Splicing in Response to Differentiation of Normal and Carcinoma Colon Cells. Anticancer Res. 2003, 23, 1605-1612.
- Shay JW, Bacchetti S: A survey of telomerase activity in human cancer. Eur J Cancer. 1997 Apr;33(5):787-91.
- Kosugi H, Saito H.: Analysis for telomerase activity in various hematologic disorders. Nippon Rinsho. 1998 May;56(5):1316-21.
- Shiratsuchi M, Muta K, Abe Y, et al.: Clinical significance of telomerase activity in multiple myeloma. Cancer. 2002 Apr 15;94(8):2232-8.
- Xu D, Zheng C, Bergenbrant S, et al.: Telomerase activity in plasma cell dyscrasias. Br J Cancer. 2001 Mar 2;84(5):621-5.
- Fiserova A, Hájek R, Holubova V, et al.: Detection of 13q abnormalities in multiple myeloma using immunomagnetically selected plasma cells. Neoplasma 2002;49(5):300-306
- Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, et al.: Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. Science 1994 Dec 23;266(5193):2011-5.
- Maláska J, Kunická Z., Borský M., et al.: Telomerase as a diagnostic and predictive marker in colorectal carcinoma Neoplasma 2004; 51: 90-96 (2004).