

8. ZÁVĚRY

1. V patogeneze MDS dochází k porušení fyziologické rovnováhy teloméro-telomerázového komplexu krvetvorných buněk již velmi brzy, v čase kdy klinický příznak leukemogeneze, jež jsou blastické buňky v kostní dřeni, ještě není přítomen. K signifikantnímu nárůstu telomerázové aktivity oproti zdravým dárcům dochází již u téměř poloviny pacientů s časnými formami MDS (RA a RARS; $P = 0.0006$).
2. Další nárůst telomerázové aktivity pokračuje, i když ne signifikantně, v progresi onemocnění a při leukemické transformaci, společně s počtem blastů v kostní dřeni, tedy směrem k pokročilým formám MDS (RAEB a RAEB) a k sAML z MDS, kdy se podíl pacientů s pozitivními hodnotami zvýšil na 77%. Pro prognostický význam zvýšené telomerázové aktivity pro progresi MDS a leukemizační proces svědčí signifikantní korelace se zkrácenými teloméry i skutečnost, že u pacientů s MDS jsou nízké hladiny aktivity spojené spíše s delším přežitím: ve skupině pacientů s nízkou hladinou TA přežívá více než 5 let 75% pacientů, kdežto ve skupině s vysokou TA pouze přibližně 30% z nich. Za lepší prognostický faktor MDS je však považována délka telomér, a to z důvodu časové posloupnosti jednotlivých změn (kromě jiných i Sieglóvá et al., 2004).
3. Telomerázová pozitivita se signifikantně vyššími hladinami aktivity než u MDS je charakteristickým znakem krvetvorných buněk většiny pacientů s akutní leukémií před zahájením léčby (80% AML; 86% ALL). Její hladina průkazně souvisí s počtem blastů v analyzované tkáni a má klesající tendenci v průběhu léčby, avšak nemá vliv na délku přežití. Protože telomerázová aktivita nezávisí na prekurzorové řadě z níž se akutní leukémie vyvinula, může být jejím univerzálním markérem pro sledování úspěšnosti léčby a prognózu relapsu, a to zejména u pacientů, kteří nemají specifický markér leukemických buněk.
4. Skutečnost, že k porušení rovnováhy teloméro-telomerázového komplexu patří mezi brzké změny genomu v patogeneze MDS se projevuje i zvýšenou relativní expresí většiny studovaných genů pozorované u podílu pacientů s časnými formami MDS (*hTERT* 38%, *c-Myc* 26%, *POT1* 38%, *TEPI* 19%, *TNKS* 26%, *TRF1* 38%). Hodnoty exprese genů *hTERT* a *c-Myc* byly ve vzájemné pozitivní korelaci a vykazovaly největší nárůst oproti zdravým dárcům a byly vysoce variabilní, což by mohlo představovat výhodu při sledování jejich dynamiky. Vysoké hodnoty exprese byly charakteristické spíše pro buňky kostní dřene pacientů s pokročilými formami

MDS. Přestože vysoká exprese genu *hTERT* nekorelovala s telomerázovou aktivitou, byla většinou doprovázena pozitivní hladinou TA a zkrácenými teloméry a byla významněji spojena s expresí genů *POT1* a *TNKS* a počtem blastů v analyzované tkáni. Exprese genu *c-Myc* byla též spojena se expresí pozitivních regulátorů telomerázové aktivity kódovaných geny *POT1* a *TNKS*.

5. Pozitivní hodnoty exprese studovaných genů jsou též charakteristické vždy pro více než polovinu pacientů s primární AML před zahájením léčby (*hTERT* 59%, *c-Myc* 81%, *POT1* 78%, *TEP1* 83%, *TNKS* 85%, *TRF1* 52%).
6. Co se týče regulace telomerázové aktivity i délky telomér, naše výsledky naznačují, že se jedná o komplexnější proces než se dosud předpokládalo a v určitých fázích může být i potlačována role pozitivních regulátorů *hTERT* a *TNKS*. Hladina telomerázové aktivity totiž neodráží expresi *hTERT* genu, považovaného za její hlavní pozitivní regulátor. U pacientů s MDS telomerázová aktivita významně korelovala s expresí genu *POT1*, jehož produkt v konečném důsledku umožňuje vazbu telomerázy na teloméry a „ochraňuje“ je tak před erozí. Nejnižší nárůsty exprese studovaných genů byly zaznamenány u *TEP1* a *TRF1*, které jsou spíše důležité v uspořádání telomerázové ribonukleoproteinové partikule, resp. mají úlohu v negativní regulaci délky telomér a aktivity telomerázy. Zvýšená exprese *TRF1* a její signifikantní negativní korelace s délkou telomér naznačuje, úlohu TRF1 proteinu v obranném mechanismu buňky prostřednictvím znemožnění vazby telomerázy na teloméry.

Z výše uvedené rekapitulace hlavních výsledků vyplývá, že nadějnými prognostickými faktory MDS se jeví především expresní profily genu *hTERT*, kódující katalytickou subjednotku telomerázy, a genu kódujícího transkripční faktor *c-Myc*. Určení konkrétnějších závěrů o jejich prognostické významnosti však vyžaduje rozšíření souboru a delší sledování pacientů v průběhu onemocnění, což v současnosti probíhá v rámci výzkumného projektu č. 0002373601 Ministerstva zdravotnictví

Zvýšení exprese genu *hTERT* tedy považujeme za lepší prognostický faktor a nespecifický molekulární markér než je zvýšená aktivita telomerázy, protože kromě jiného ji časově předchází. Přesto je, zejména vzhledem k výše uvedenému předpokladu větší komplexnosti regulace telomerázy, důležité i sledování její aktivity, protože právě na ní závisí stabilizace telomér leukemických buněk umožňující jejich neomezenou proliferaci. Navíc, citlivá metoda kvantifikace telomerázové aktivity modifikovanou

metodou TRAP má přednost pro rutinní klinickou praxi, spočívající v potřebě malého množství vstupního materiálu v porovnání s ostatními metodikami použitými v této práci.

Znalosti telomerázové aktivity a délky telomér spolu s precizním určením expresních profilů genů *hTERT* a *c-Myc*, prostřednictvím RT PCR v reálném čase, jsou důležité zejména u pacientů s časnými formami MDS, aby mohlo být upřesněno jejich individuální riziko a uplatněná optimální léčba i s perspektivou jejího zacílení na snížení telomerázové aktivity. Pro některé z těchto metodik budou vypracovány standardní operační postupy pro rutinní akreditované vyšetření v Národní referenční laboratoři pro DNA diagnostiku.