

**T.C ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KADIN  
HASTALIKLARI ve DOĞUM ANABİLİM DALI**

**OVER KANSERİ SECOND-LOOK CERRAHİDE  
TELOMERAZ AKTİVİTESİNİN REKÜRRENS ve  
RELAPSIN  
SAPTANMASINDAKİ YERİ**

**UZMANLIK TEZİ**

**123868**

**HAZIRLAYAN:**

**Dr. Batuhan ÖZMEN**

**123868**

**TEZ DANIŞMANI:**

**Prof. Dr. Fırat ORTAÇ**

**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM BAKANLIĞI  
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

**ARALIK-2002**

**ANKARA**

<b>İÇİNDEKİLER:</b>	<b>Sayfa no</b>
<b>A/ ÇALIŞMANIN AMACI:</b>	<b>1</b>
<b>B/ GİRİŞ:</b>	
I.    Telomer ve Telomeraz Sitolojisi	<b>3</b>
II.   Hücre Yaşlanması	<b>7</b>
III.  Telomeraz Uzunluğu ve Son Replikasyon Problemi	<b>8</b>
IV.  Telomeraz Aktivitesi Regülasyonu	<b>8</b>
V.    Telomeraz Tayin Methodları	<b>11</b>
VI.  Anti-Kanser Terapisinde Telomerazın Hedef Alınması ve İnhibitörleri	<b>13</b>
VII.  Telomeraz Tayinin Kanser Tanısı ve Prognozundaki Önemi	<b>17</b>
VIII. Over Kanseri ve Telomeraz	<b>21</b>
IX.  Second-look Cerrahi ve Over Kanseri	<b>29</b>
<b>C/ MATERYAL ve METHODLAR:</b>	<b>33</b>
<b>D/ BULGULAR:</b>	<b>37</b>
<b>E/ TARTIŞMA:</b>	<b>46</b>
<b>F/ SONUÇLAR:</b>	<b>61</b>
<b>G/ ÖZETLER:</b>	
I.    Çalışmanın Türkçe Özeti	<b>62</b>
II.   Çalışmanın İngilizce Özeti	<b>63</b>
<b>H/ REFERANSLAR:</b>	<b>64</b>

*Tezimin gerçekleşmesinde bütün içtenliğini, sevgi ve yardımlarını esirgemeyen, ellerindeki tüm olanakları zorlayarak, büyük özveriler gösteren başta tez danışmanım sayın Prof. Dr. Fırat Orta olmak üzere Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim dalı değerli öğretim üyelerine, mesai arkadaşlarıma ve sonsuz destek gösteren tüm çalışanlarına; tez örneklerinin çalışılmasını gerçekleştiren ve tüm sevgisi ile tezimi kendi çalışmaları gibi yürüten Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim dalı öğretim üyelerinden değerli Prof. Dr. Ajlan Tkn ve biolog sayın Gvem Gümüş'e; tez çalışmasının kitlerine sponsor olarak bana ve kliniğime duydukları güven ve desteğini sakınmayan, Türk tıbbının gelişmesini ve daima uygar toplumların düzeyini aşmasını amaçlayan Bristol-Myers ve Glaxo Smith Kline ilaç firmaları ve çalışanlarına sonsuz teşekkürlerimi sunarım.*

*Dr. Batuhan ÖZMEN*

## KISALTMALAR DİZİNİ:

A	: Adenin
AFP	: Alfa-Feto protein
BEP	: Bleomisin-Etoposid-Sisplatin
C	: Stidin
CA 125	: Kanser Antijen 125
CDDP	: Sisplatin
CYC	: Siklofosfamid
dATP	: Deoksi adenin trifostat
dCTP	: Deoksi stidin trifostat
dGTP	: Deoksi guanozin trifostat
dTTP	: Deoksi timin trifostat
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EDTA	: Etilendiaminetetra asetik asit
ELİPA	: Enzimatik luminometrik PP(i) inceleme
ETO	: Etoposid
G	: Guanin
GOG	: Amerikan Jinekoloji ve Onkoloji Grubu
hTERT	: İnsan telomeraz reverse transkriptaz
hTR	: İnsan telomeraz ribonükleik asit
IFO	: İfosfamid
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
PNA	: Peptit nükleik asit
Rb	: Retinoblastom
RNA	: Ribonükleik asit
RNAaz	: Ribonükleik asitaz
RT-PCR	: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
SLL	: Second-look laparotomi
T	: Timin
TER1	: Telomerazın RNA geni
TPG	: Total işlenen ürün (telomeraz enzim ünitesi)
TPI	: Telomeraz-bağımlı proteinler
TRAP	: Telomerik tekrar amfilikasyon protokolü
TRF	: Terminal sınır fragmanı
U	: Üridin
VAC	: Vinkristin-Daktinomisin-Siklofosfamid

## A/ ÇALIŞMANIN AMACI :

Telomer yapıları kromozomal integriteyi sağlamada gereklidir. Omurgalılarda telomer kaybını önleyen ana mekanizma telomerazdır. Telomeraz aktivitesinin inhibisyonu kritik telomer kısalması sonucunda kromozomal instabilite ve hücre ölümüne yol açar. Somatik hücrelerin çoğunda ölçülebilir telomeraz aktivitesi yoktur. Telomeraz aktivitesi, diferansiasyonun erken evresi ve hücre immortalitesi ile yakından ilişkilidir ancak tek başına hücre çoğalma hızı ile ilişkili değildir. İstirahatte olan hücreler telomeraz aktivitesini kısıtlarken, hızlı çoğalan iyi diferansiye hücreler ise hassas methodlarla bile ölçülebilir olmayan telomeraz aktivitesi göstermektedir. Bu bulgular telomeraz inhibisyonun teorik olarak, klasik kanser kemoterapötiklerinin tersine malign hücrelere daha spesifik olacağını telkin eder.

Hassas TRAP assay yönteminin gelişmesi ile günümüzde bir çok olguda çok düşük dokularda ve bir çok kanser spesimeninde bile telomeraz aktivitesi gösterilebilmektedir. Bu sayede telomeraz günümüzde bilinen en geniş ve en spesifik tümör markırıdır. TRAP assay methodu telomeraz aktivitesini 1- 10 hücrede bile gösterecek kadar spesifik bir yöntemdir.

TRAP assay ile jinekolojik malignitelerin % 95'inde telomeraz aktivitesini gösterilmiştir. Over kanserinde ise pozitif telomeraz aktivitesi % 88-100 arasında değişen oranlarda bildirilmiştir. Bir çalışmada 10 milyon telomeraz negatif fibroblast ile karışmış 1-50 tümör hücresinde dahi telomeraz aktivitesinin gösterilebileceği belirtilmiştir. Bu veriler kemoterapötik tedavilere yanıtı değerlendirmede, minimal residü hastalık veya erken rekürrenslerin hassas tespitinde telomeraz aktivitesinin potansiyel değerini göstermektedir.

Over kanseri bilindiği gibi hızlı büyüyen ve geç semptom veren bir tümördür, bu yüzden erken rekürrens tespitinde oldukça önemlidir. Over karsinomlu olgularda primer sitoredüksiyon cerrahisi sonrasında paklitaksel ve platinum içeren kemoterapötik rejimlere cevap oranı ise % 75-80 dir. Ancak erken rekürrens oranlarının 1-10 yıl içerisinde % 40-50 gibi yüksek değerlerde olması sağkalımı olumsuz etkilemektedir ve takip protokolleri erken rekürrenslerin tespitinde ön plana çıkmaktadır.

Günümüzde kliniğimiz ve bir çok merkezde second-look cerrahi prosedürler (1) Lokalize hastalığın tespiti, restageleme ve optimal stagelemenin yapılması (2) Uygulanan kemoterapi protokolünün etkinliğinin tespiti (3) Klinik olarak kür kabul edilip kemoterapinin kesileceği popülasyonun araştırılması için rutin olarak uygulanmaktadır. Bu invaziv takip protokollerinin tüm ve semptomsuz sağkalıma, yada yaşam kalitesine etkisi konusunda elde yeterli data bulunmamakla beraber rekürrenslerin erken tespiti sonrasında uygulanan efektif salvage kemoterapi sayesinde artmış sağkalım sonuçları bildirilmiştir.

Sitolojinin (% 40-60) ve görüntüleme yöntemlerinin (% 20) düşük sensitiviteyi göz önüne alınırsa second-look operasyonlarında rekürrensin belirlenmesi için farklı tanı yöntemleri gerekmektedir. Bu sayede gözden kaçan mikroskopik hastalık yada yüksek riskli negatif second-look vakaları saptanarak gerekli tedavi rejimleri ile yüksek sağkalımlar elde edilebilecektir. Bu belkide kemoterapiye adjuvan telomeraz inhibitörlerinin kullanılmasında olanak sağlayacaktır.

Son yıllarda ön plana çıkan ve yüksek tümör spesifikliğı gösteren telomerazın jinekolojik onkolojideki yeri oldukça yenidir ve halen araştırılmaktadır. Cerrahi prosedürler ve diğer dotalar ışığında telomeraz sonuçlarının korelasyonu over kanserli olgularda erken rekürrens tespitinde olası rolü umutlandırıcıdır. Bu sayede erken nüks ve rekürrensler sitolojiye ek olarak batın yıkama veya asit mayi ile telomeraz aktivitesi ile yüksek sensitivite ve spesifitede saptanabilecektir.

Primer cerrahi ve planlanmış kemoterapi sonrası, klinik ve laboratuvar bulgularında remisyonda olduğu bilinen evre 3 ve 4 over kanseri olgularında second-look laparotomi esnasında asit ve batın yıkama sıvısında tümör varlığını saptama açısından patolojik inceleme, sitolojik değerlendirme ile telomeraz aktivitesinin karşılaştırılması, rekürrens ve rezidüel hastalıkta telomeraz aktivitesinin yerinin belirlenmesi çalışmanın ana amacı olacaktır.

## **B/ GİRİŞ:**

### **B.I. Telomer ve Telomeraz Sitolojisi:**

Kromozomların doğal son uçlarının özel bir yapıda olduğu gözlemi ilk olarak 1930'lu yıllarda yapılmıştır. Drosophila üzerine yapılan ışık mikroskopi çalışmaları sırasında telomer varlığına ait ipuçlar elde edilmiştir.(1) Bu çalışmada X-ışını radyoterapisi ile interstisyel delesyon ve inversiyonlar gözlenirken, terminal bölgelerde delesyon veya inversiyon gözlenmediği anlaşılmıştır. Bu bulgular ışığında kromozomların doğal son uçlarının özel bir yapıda olduğu, bu serbest sonların kromozomu sınırladığı kabul edilmiş ve bu hipotetik yapıya telomer adı verilmiştir. Takip eden yıllarda vahşi-tip drosophila üzerine yapılan klasik çalışmalarda da bu görüş desteklenmiştir.(2)

Telomer yapısına bağlı olarak neden terminal delesyonların olmadığı görüşü kırık kromozom parçalarının işleyişi üzerine yapılan çalışmalarda ortaya konmuştur.(3) Özellikle disentrik kromozomların ayrılışı ve her iki karşı kutba kromozomların çekilmesi işlemi kırık kromozom parçalarına mitoz içciklerinin uyguladığı kuvvetle olmaktadır. Bu kromozom parçalarının son uçlarının son derece reaktif oldukları ve uygun olmayan rekombinasyonlara ve füzyon reaksiyonlarına neden olabileceği gözlenmiştir. Bu işlem sonrasında yeni disentrik kromozomlar ortaya çıkabilecek ve bu yeni kromozomlarda yeni parçalanmaya yada rekombinasyona neden olabilecektir. Doğal kromozomların bu tip parçalanmış kromozomlardan telomer sayesinde farklı davrandıkları, telomerlerin ciddi karyotip değişikliklerine giden kırılma-füzyon-köprü sikluslarına neden olmadıkları ve kromozom stabilitesinden sorumlu oldukları gözlenmiştir. Özellikle Paramecium telomer sekanslarının klonlandığı moleküler çalışmalarda telomerlerin bir görevlerinin bu füzyonu engellemek olduğu gösterilmiştir.

Maya hücreleri üzerinde yapılan birçok çalışmada bu kırılma-füzyon-köprü sikluslarının sayesinde hücrede sadece karyotip değişikliği olmamakta aynı zamanda hücrelerde bu hasara bağlı olarak hücre siklusunda arrest meydana geldiği ispatlanmıştır.(4) Diğer çalışmalarda bu siklus arresti sonrasında hücrelerde anormal morfolojiler, plasmid kaybı ve değişik hücre sikluslarında ölü hücre grupları tarif edilmiştir. Kromozom terminal bölümlerinde meydana gelen kırılma sadece bu bölümde

bir değişiklik meydana getirmekle kalmamakta ayrıca kopan plazmid bir sentromer içerebileceği için diğer kromozomlar ile füzyon sağlayarak kırılma-füzyon-köprü siklusuna yol açmakta ve hücre ölümünü meydana getirebilmektedir. Bu çalışmalar ayrıca kırık kromozomların diğer hücre fonksiyonları üzerinde de hasara yol açabileceklerini göstermektedir.

Bu devamlı tekrar eden DNA sekansları tipik olarak ribonükleoprotein enzim telomeraz sayesinde belirlenebilmektedir. Telomeraz bu telomerik tekrarların tek sarmal yapısını kendi intrinsik RNA'sı ile kopyalamaktadır. Yakın çalışmalar telomer homeostasisinde günümüzde bir konsept oluşturmuştur. Bu ana telomeraz RNA sekanslarında yapılan mutasyonlar değişik fenotipler yaratmıştır. (1) Tetrahymena ve birkaç maya tipinde özel bölgelerde yapılan mutasyonlar bu alanların telomeraz işleminde kritik öneme haiz olduğunu ispatlamıştır. (2) Telomerik sekanslardaki belirli mutasyonlar daha önce rapor edilmemiş bir fenotip oluşturmuş ve Tetrahymena nükleolusunda güçlü anafaz bloğu oluşturmuştur. (3) Bir maya hücresi Klucyveromyces laktis'in telomeraz RNA geninde yapılan belirli bir bölge mutasyonunda regüle olmayan telomer elongasyonu izlenmiş, bununla K.laktis'in Rap1p bölgesine direkt bağlanmayı engellediği gösterilmiştir. Bu sayede telomer uzunluğunu homeostasisi konusunda bir model oluşturulmuş ve telomeri ilgilendiren DNA protein kompleksinin anahtar role sahip olduğu, bu yolla telomeraz hareket sıklığını sağladığı ortaya konulmuştur.

İncelenmiş birçok ökaryotta telomerik DNA bölgelerinin basit devamlı tekrar eden sekanslar şeklinde kromozom son uçlarında uzandığı gözlenmiştir. Bu telomerik tekrarlar gerçek DNA sekansları için kromozom stabilitesinde ve komplet replikasyonda gereklidir. Genellikle bu kısa yapılar, G bazı zengin tekrar eden sekanslar sarmalın 5 ucundan 3'ucuna doğru kromozomun distal sonunda yer almaktadır.(5) Bir ribonükleoprotein kompleksi olan telomeraz özel bir sellüler reverse transkriptaz olup, kromozomal DNA sonunda kromozomal devamlılığın sağlanması telomerik tekrarların eklenmesi görevini yapmakta, bu sayede inkomplet replikasyonu engellemektedir. Ökaryotların ekstraktlarında telomeraz aktivitesi saptanabilmiş ve ökaryotlarda geniş bir yelpazede farklılıklar gösterdiği ortaya konulmuştur.(6)

Telomerik DNA'sında mutasyonlar genellikle telomerazın RNA geninde (TER1) yapılan mutasyonlar ile yaratılabilmiştir. Bu mutasyonlar telomerik DNA'yı etkilediği



gibi telomeraz aktivitesinde dramatik olarak etkileyebilmektedir. Direkt veya indirekt birçok ipucuna göre hücreler bölünme geçirdikçe sabit olan DNA telomerik bölgeleri sürekli olarak hem terminal bölgelerde kaybolmakta hemde telomeraz yenilenmesinden mahrum kalmaktadır. Açıkça bu ekleme ve çıkartma işlemindeki denge telomerik olabilirliğinde ciddi öneme sahiptir. Yetersiz telomerik bölge uzunluğu DNA kromozom sonlarına yıkıcı olabilmektedir.(7) Ciddi olarak kısalmış telomerik bölge veya telomerik DNA yokluğunda kromozom son uçları kırık kromozom bölgeleri gibi davranmakta veya bir başka deyişle DNA hasarına yol açmaktadır.(4,8) Bu çok kısalmış telomerik DNA bölgeleriyle hücre siklusunda arrest oluşmakta ve rekombinasyon mekanizmaları rol almakta, kimi zaman başarılı olarak bu kırık bölge onarılabilmektedir.(8,9) Bu sayede ekstra telomerik DNA sekansları kromozom son uçlarında oluşmakta ve telomer kurtarılmaktadır. Kluyveromyces laktiste telomer bu şekilde kurtarılabilmekte, bunun için RAD52 genine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu işlem muhtemelen birçok ökaryotta oluşmakta fakat genellikle bu düzeye izin verilmemektedir. Telomer uzunluğunun kontrolünde ayrıca Rap1p ile beraber Sir2p, 3p ve 4p telomerik DNA protein kompleksleri bir aks içerisinde görev yapmaktadır.

Bilindiği gibi telomeraz ekspresyonu tüm somatik hücrelerin erken gelişme dönemlerinde gözlenirken diferansiasyon ile giderek baskılanmaktadır. Bu RNA ekspresyonu ve aktivitesi hemen hemen tüm malign transformasyonlarda ve geç evre kanserde upregülasyon göstermektedir. Telomer yaşlanma ve immortalizasyon hipotezinde ortaya atıldığı gibi bir veya daha fazla kromozomda normal somatik hücrelerdeki yeterli telomer kaybı belirli bir noktada hücre ölümüne yol açmakta ve immortalizasyon için telomeraz reaktivasyonu gerekli olmaktadır. Telomer uzunluğu ve telomeraz aktivitesi üzerine kanserde ve normal veya yaşlanmanın arttığı cilt, hematopoetik hücrelerde, iskelet kası, vasküler, SSS dokularında yapılan çalışmalar örnek teşkil etmektedir. Hücre yaşlanması ve transformasyon modelleride günümüz tanımlarında telomeraz dinamiğine ışık tutmaktadır. Uzun dönem yaşam gösteren somatik hücrelerdeki antagonist pleotropik modellerde hücre ölümü tümör supresyon mekanizması gibi görev yaparak telomerazın sınırlı ekspresyonu erken evrede kanser gelişme olasılığını azaltmaktadır. Ancak bu mekanizmadaki bozulmaların kansere yol açabileceği düşünülmekte ve yaşlanma etkisi ise yaş bağımlı hastalıklara bir geç yatkınlık

oluşturmaktadır. Telomerazların bu etki ile kanser gibi yaş bağımlı hastalıklarda santral bir rol oynadığı günümüzde çok kabul gören bir görüştür.

Birçok türde terminal tekrarlar sekanslar düzeyinde benzerdir ve bir tür için olan tekrar sekansları diğer türler ile özellikle düşürülmüş kuvvet durumunda kros-hibridizasyon göstermektedir. Bu tip tekrar içeren proplar büyük olasılıkla metafaz kromozom sonlarında in situ hibridizasyon veya BAL31 sensitif sinyaller vasıtası ile Southern Blot testinde saptanabilmektedir. Örnek olarak tüm omurgalılarda telomerin (TTAGGG)<sub>n</sub> zincirlerinden oluştuğuna inanılmaktadır. Bir tekrar sekansı tüm türlere göre değişkenlik göstermek ile birlikte büyük tandem tekrar zincirleri içeren monomer ünitelerinden oluşan 400-1200 baz çifti uzunluğa sahip yapılardır. Tüm türlerin monomerleri kendine has yapıda 211 veya 212 baz çifti içeren sekanslardan oluşmakta ve türler arasındaki farklar belirlenebilmektedir. Bu değişken bölgelerin % 35-50'si TTAGGG tekrarlarını içermektedir.

Telomer bağlayıcı proteinlerin kromozom son uçlarında uç uca füzyonlarından, nükleaz ataklarından korunmasında ve hücre siklus aktivasyonunda işaret noktası olarak görev yaptığı sanılmak ve telomer bölgelerinde atipik kromatin konformasyonunu engellediği düşünülmektedir. Fakat halen net bir rolü ortaya konmamıştır. En iyi karakterize edilen maya telomer bağlayıcı protein RAP1'in non telomerik bölgelerde transkripsiyon regülatörü olarak görev yaptığı tanımlanmıştır.

Çift-sarmal kırıkları birkaç yolla oluşabilmekte; programlı kırılma işlemi gerçekleşebilmekte veya hücre içinde lineer DNA molekülü tanımlanması ile ortaya çıkabilmektedir. Kromozom tamiri DNA son ucunda telomer davranışına bağlı olarak ve genellikle sekansların eklenmesi ile yeterli telomer fonksiyonu gerçekleştirecek terminal sekansların sağlanması ile oluşmaktadır.

Telomeraz(TE-LÓM-ER-ACE) bir RNA yapı taşı ve katalitik enzim subunitinden oluşan bir ribonükleoprotein yapıda enzim kompleksidir. Telomeraz ilk biyokimyasal olarak Greider ve Blackburn tarafından 1985 yılında Tetrahymena ekstratları kullanılarak tanımlanmıştır. Terminal tekrar sekanslarının telomeraz adında özel bir DNA polimeraz ile sentez edildiği üç silyat ve iki memelide de gösterilmiştir.(10) Telomeraz bu telomerik tekrarların tek sarmal yapısını kendi intrinsik RNA'sını (telomerik tek zincire komplemanter) yapı taşı olarak kullanarak kopyalamakta ve telomerik sekansları

(TTAGGG)<sub>n</sub> kromozom son ucuna eklemektedir. Her ne kadar biokimyasal olarak bu enzimler derinine incelense de bu enzimlerin protein yapıdaki homojen bileşikleri elde edilememiş ve bu yıllarda kodlayan gen ortaya çıkarılamamıştır. Telomeraz telomer polimerizasyonu (elongasyon) ve translokasyon aşamasında enzim kompleksinin DNA ile ilişkili olduğu prosesif siklusta görev yapmaktadır.

Memeli telomeraz aktivitesi ilk olarak insan HeLa hücrelerinin ekstraktında tanımlanmıştır.(11) Rölatif olarak telomer sayısından beklenebileceği gibi Tetrahymenaya göre insan hücrelerinde bu aktivite daha az tanımlanmıştır. İnsan telomerazı in-vitro olarak TTAGGG tekrarlarını sentez edebilmekte ve oligonükleotide altmıştan fazla sayıda tekrar ekleyebilmektedir. Bu oligonükleotit dışında başka oligonükleotitleri de insan telomerazı ekleyebilmektedir. Bunlar Oxytricha, Tetrahymena, Dictyostelium ve Arabidopsis G zengin oligonükleotitleri ile kros reaksiyon veren oligonükleotitleri içermektedir.

Non telomerik yada C zengin nükleotitler primer olarak görev yapmazlar. Silyatlardaki telomeraz davranışına benzer olarak 3'ucundaki TTAGGG oligonükleotitleri fark edilir ve tekrar için uygun olan baz eklenir. Bir şablon RNA yapısı tanımlanmamış olmakla beraber telomeraz aktivitesi RNase tedavisine sensitiftir. Bu gerekli bir RNA komponentinin varlığını göstermektedir. Telomeraz aktivitesi kültürdeki primer hücrelerde tespit edilemezken hücrelerin immortal oluşuyla tespit edilebilmektedir.

### **B.II. Hücre Yaşlanması:**

İlk olarak kırk yıl önce insan fibroblastlarında hücre kültüründe bölünmeyi takiben yaşlanmaya ait değişiklikler tarif edilmiştir. En iyi fibroblastlarda tanımlansada başka birçok somatik hücrede de bu olaylar tanımlanmıştır. Bu yaşlanmış hücrelerin apoptoza girmeden veya diğer ölüm şekillerini göstermeden önce uzun süreler metabolik olarak aktif kaldığı gösterilmiştir. Ancak takip eden yıllarda bu hücrelerin yalnızca büyüme stimuluslarına cevap veremedikleri ve bölünmenin gerçekleşmediği ayrıca aberran genetik patternleride eksprese ettikleri ispatlanmıştır.(12) Bu yaşlanma bulguları belirli bir zamana yada metabolik geçmişe bağlı olmaksızın karakteristik sayıdaki hücre bölünmesinden (Hayflick limit) sonra oluşmaktadır. Ayrıca hücre yaşlanma iyonize radyasyon, oksidatif stres veya büyüme sinyalleri bozukluklarında da prematür olarak

tetiklenebilmektedir. Hücresel yaşlanmayı neyin başlattığı bilinmemekle beraber telomer kaybının bu olayada hem bir mitotik saat hemde tetikleyici olarak görev yaptığı görüşü her gün kabul görmektedir.

### **B.III. Telomer Uzunluğu ve Son Replikasyon Problemi:**

Birçok insan somatik hücresinde telomeraz aktivitesi saptanamamıştır, bu telomer kaybı ile hücre yaşlanması ve yaş-bağımlı hastalıklar arasındaki ilişkiyi göstermektedir. En geniş olarak kullanılan ve telomer uzunluğunu saptanmaya yarayan sistem Southern Blot analizinde terminal sınır fragmanlarının (TRF) tespiti ile bu ölçüm yapılmaktadır. Ancak TRF'ler uç noktalarında uniform telomerik sekanslara nazaran DNA'yı ve ayrıca dejenere veya non TTAGGG sekansları ile kesintiye uğramış TTAGGG bloklarında içermektedir. Bu dinamik çevre içinde TRF uzunluğu ve yaşlanma hakkında detaylı bilgi elde edilememektedir.

Bunların sonunda in-vitro ve in-vivo olarak bölünen hücrelerde yaş ile beraber lineer telomerik DNA kaybı olmakta, değişik insan somatik hücrelerinde benzer ortalama TRF uzunlukları gözlenmektedir.(13) Ancak telomer kaybı her dokuda aynı değildir. Bir çalışmada kardiovasküler hücrelerde bu kayıp en fazla oranda gözlenmiş ve kronik stres ve hasara bağlanmıştır.(13) Buna göre hücresel yaşlanma patolojik bölgelere bağımlıdır. Progenitör hücrelerde telomeraz aktivitesi gözlenmeside bu hücrelere daha uzun bir hücresel yaşam sağlamak amacıyla olduğu görüşü sıklıkla kabul görmektedir.

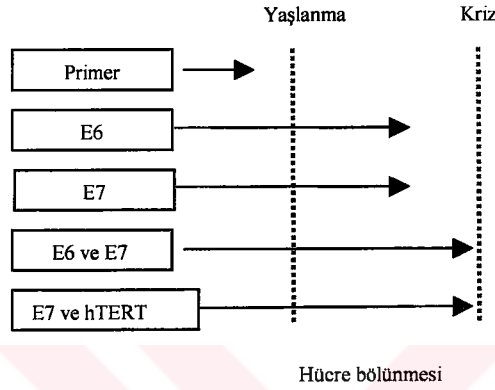
Lineer DNA sarmalı geleneksel DNA polimeraz ile tamamen replike edilemez. Birçok ökaryot türünde bu problem telomerazın telomerik DNA bölümlerini tamiri ile çözülmektedir, bu işlem terminal delesyonları engellemekten ziyade tamamlama ile olmaktadır.(14) Bu yüzden telomeraz inaktivasyonu yada diğer telomeraz bozuklukları telomer olabilirliğinin kaybına neden olarak immortal hücrelere veya belirli hücre bölünmesinden önce hücre ölümüne yada siklus arrestine neden olmaktadır (15).

### **B.IV. Telomeraz aktivitesinin regülasyonu:**

Geçen birkaç yıllık bulgular ışığında doku kültürlerinde telomeraz aktivitesinin tümörlerde hangi yollar ile regüle edildiği hakkında in-vivo olarak yeterli bir bilgi yoktur. Tümöral oluşumun formasyonu multi basamaklı hücresel değişiklikleri ve in-vitro hücresel immortalizasyonu içeren bir işlem olduğu için telomeraz aktivitesinde birden

çok basamaklı olması olağandır. Telomer uzunluklarının genellikle tümör evresi ile ilişkili olmadığı ispatlanmıştır ve çoğunlukla telomeraz aktivasyonu telomer kısalması olmadanda gerçekleşebilmektedir. Farelerde yapılan çalışmalarda telomer kısalmasının kritik düzeylere gelmesinden daha önce telomeraz aktivitesinin 30-40 hücre bölünmesinde başladığı gösterilmiştir.(16)

Şekil I Telomeraz Aktivitesi Faktörleri



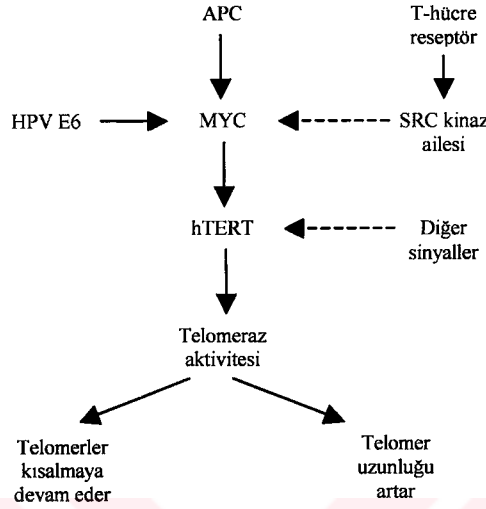
Telomeraz aktivitesinin direkt olarak aktive edildiği bir yol bugün için aydınlatılmıştır. Servikal kanser oluşumunda bir onkogen olarak görev yapan E6 ve E7 onkogenleri telomeraz aktivitesinde birlikte çalışarak up-regülasyon yaratmaktadır. Birkaç yıl önce Klingelutz E6 onkogeninin direkt olarak telomeraz aktive ettiğini ispatlamıştır.(17) E6'nın onkogen olarak görev yaptığı ve p53 tümör supresör genini direkt olarak degradasyona maruz bıraktığı ve ayrıca E6'nın sellüler immortalizasyonda da ek rolleri olduğu düşünülmektedir.(18,19) Yakın çalışmalarda ise MYC onkogen aktivasyonunda en az bir noktada görev yaptığı gösterilmiştir.(20),(Şekil I)

Telomeraz aktivitesi negatif olan primer insan epitelyal hücrelerinin telomeraz aktivitesi göstermesine MYC ekspresyonu imkan vermektedir.(20),(Şekil II) Bunun aksine E7, MDM2, RAS, cyclinD1, CDC25C ve CDC25A gibi bazı diğer sellüler ve viral onkogenlerin telomerazı aktive etmemektedir. MYC ekspresyonu telomeraz aktivasyonu katalitik subünit olan hTERT'in up-regülasyonu sayesinde olmaktadır.

Bazı çalışmalarda da MYC ekspresyonu ile telomeraz aktivitesinin yükseldiği gösterilmiştir. İmmortal lösemi ve HL60 hücrelerinde MYC ekspresyonun antisense inhibisyonu ile telomeraz aktivitesinin inhibe edildiği bildirilmiştir.(21) MYC ekspresyon

seviyeleri ile telomeraz aktivitesi ile RNA komponentinin korale olduğu ve telomeraz aktivasyonu için MYC'in sürekli ekspresyonun gerekli olduğu tanımlanmıştır.(22)

Şekil II Telomeraz Aktivasyon Yolları



Bazı erken dönem hematopoetik hücrelerde, ayrıca matür ve tamamen diferansiye T ve B hücrelerde antijen reseptör stimülasyonu ile telomeraz aktivitesinin oluşturulduğu ispatlanmıştır. T hücrelerinde MYC up-regülasyonunun SRC YES ve FYN yolları ile gerçekleştiği de bildirilmiştir. Bu direkt bir yol ile antijen stimülasyonu ve MYC ekspresyonunun ile hTERT promoter bölgesine etkisi ile gerçekleşebileceğini bildirmektedir. Telomerazın ektopik ekspresyonu ile sellüler immortalizasyona ve hücre yaşamının artırılmasına hTERT ekspresyonu ve telomer uzunluğunun artırılması ile oluştuğu ilk olarak 1998'de gösterilmiştir.(23) Bugün ise hTERT ekspresyonunun E7 onkogeni ile beraber çalıştığı ispatlanmıştır. Bu yol ile hem E6 hemde hTERT ekspresyonu ile görev yapan E7 telomeraz aktivitesinde görev yapmaktadır. Telomer bağlayıcı proteinler TRF1, TRF2, hnPNP A1 ve DNA tamiri için gerekli olan proteinler veya maya hücrelerinde EST1, EST3 ve CDC13 (EST4) gibi bazı faktörlerinde yine indirekt olarak telomeraz aktivitesinde rol sahibi olduğu tanımlanmaktadır. Bunu yanında p23 ve Hsp90 telomeraz subünitine bağlanmakta ve telomeraz aktivitesi için gerekmektedir.

### **B.V. Telomeraz Aktivitesi Tayin Methodları:**

Günümüzde telomeraz enzim aktivitesini ya da telomeraz enzim kompleksinin altbileşenlerini saptayan 5 yöntem söz konusudur.

- 1 – TRAPase Method (PCR)
- 2 – In situ hibridizasyon
- 3 – RT – PCR (Gerçek zamanlı PCR)
- 4 – Immunohistokimya
- 5 – Bioluminesans

Telomeraz enziminin aktivitesinin belirlenmesi ilk olarak günümüzde altın standart olarak kabul edilen Telomerase Repeat Amplification Protocol (TRAP) olarak bilinen yöntemle sağlanabilmiştir. Bu yöntem semikantitatif tayin yapabilmekte ve PCR aracılığıyla az sayıdaki hücrede bile son derece sensitif olarak pozitif telomeraz aktivitesini saptayabilmektedir. Ancak taze dokuda çalışılması zorunluluğu ve doku degradasyonunu gerektirdiği için telomeraz aktivitesine sahip hücre kökenlerini ayırt etmekte yetersizliği dezavantajlarını oluşturmaktadır. Fakat çalışılan dokudaki genel telomeraz aktivitesini değerlendirebilir. Bu yöntemle parafinli dokularda çalışma imkanı bulunmamaktadır. Bu metodla enzim aktivitesi 10 immortal kanser hücresi barındıran doku örneklerinde bile saptanabilir. TRAP assay PCR bazlı bir yöntemdir. Bu yöntemde elde edilen doku ekstraktının polimeraz zincir reaksiyonlar ile amplifiye edilmiş telomeraz RNA primerleri değişen oranlarda dilue edilir. Daha sonra bu dilusyonaların sinyal yoğunluğu kromatografik yöntemlerle “pozitif kontrollü internal standart” yoğunluğuyla karşılaştırılır.

In situ hibridizasyon yöntemi ile telomeraz enziminin RNA komponenti olan hTR ve hTERT mRNA’sı doku bütünlüğü bozulmadan çalışılabilmektedir. Ancak bu yöntemde klinikte uygulama imkanı sınırlı ve zahmetli bir deneysel yöntemdir.

RT-PCR yöntemi ise telomeraz enziminin katalitik altünitesi olan hTERT mRNA’yı saptayan hassas ve hızlı aynı zamanda klasik polimeraz zincir reaksiyonundan daha pratik bir yöntemdir. Bu methodda hTERT mRNA’nın ayırımı sırasında pek çok variant oluştuğu ve oluşan bu mRNA’ların pek çoğunun inaktif olduğu bilinmelidir. Bu varyantların bir kısmı telomeraz aktivitesi olmayan hücrelerce eksprese edilmektedir. Bu nedenle bu yöntemde hTERT mRNA’nın aktif formlarını belirleyecek primerler

kullanılmalıdır. Ayrıca RT-PCR yönteminin bu hTERT mRNA varyantlarından aktif olanı saptayıp saptamadığı ve inaktif hTERT mRNA'nın in vivo dağılım ve önemi tam olarak belirlenmemiştir.

İmmünohistokimyasal yöntemde ise telomeraz enziminin tek katalitik subuniti olan hTERT RNA'sına karşı farelerde oluşturulan monoklonal antikolar kullanılmaktadır. Bu antikolar ile immünohistokimyasal olarak telomeraz enzim aktivitesinin belirleyici komponenti olan katalitik subunit belirlenebilir. Bu yöntem, parafinli dokularda çalışmaya olanak tanımakta ve doku bütünlüğü olan spesmenlerle çalışıldığından hTERT aktivitesinin dokudaki dağılımı ile hücre içindeki lokalizasyonu belirlenebilmektedir. Tümör dokularındaki telomeraz aktivite seviyesi telomeraz pozitif hücrelerin, telomeraz negative hücrelere oranına bağlı olarak değişmektedir.

TRAP (telomeraz repeat amplification protocol) ile telomeraz aktivitesinin over ve testisteki germ hücreler dışında normal hücrelerde bulunmadığı rapor edilmiştir. Wada ve ark. TRAP incelemede digoksinin işaretli prob kullanarak en az telomeraz pozitif 10 hücre ile telomeraz aktivitesini saptamışlar ve non-radyoizotopik bu testin güvenli olduğunu vurgulamışlardır(24). Ancak takip eden yıllarda binlerce tümör örneğinde telomeraz aktivitesi rapor edilmiş ve solid tümör örneklerinde % 85 oranında ekspresyonu gösterilmiştir. Birkaç insan karsinom hücresinde ve 293 hücrede telomeraz TRAP-ELİSA ve non-radyoizotopik gümüş boyama ile telomerik tekrar amplifikasyonu yapılmıştır(25). Yüksek sensitiviteli PCR tabanlı TRAP inceleme ile karaciğer, meme, tiroid ince iğne aspirasyonu, servikal smear, oral yıkama ve idrar gibi minimal dokularda dahi telomeraz aktivitesi tanımlanmıştır(26). Bazı testlerde ise altın standart sitoloji ile telomeraz aktivitesinin sensitivite ve spesifitesi karşılaştırılmıştır. Bronşial yıkama sıvısında yirmi iki kanserli hastadan onsekiz tanesinde telomeraz aktivitesi belirlenirken yalnız bir vakada kanser olmayan hastada tanımlanmıştır. Sitoloji ise yirmi iki hastanın ondördünü saptamış fakat kanser olmayan vakaların hiçbirini göstermemiştir.(27) Bu çalışmada da diğer çalışmalar gibi telomeraz aktivitesinin sensitivitesi TRAP inceleme ile sitolojiden üstündür.

Ancak telomeraz aktivitesinin kanser tanısında kullanılabilmesi için her tümör için tanımlanması gerekmektedir. Bazı çalışmalarda ise telomeraz aktivitesinin yanlış- pozitiflik oranları araştırılmış ve en yüksek oranda % 34 olarak muhtemelen sistite bağlı



elde edilmiştir. Ancak ovaryen kanserde yanlış pozitiflik oranları % 6.5 civarındadır. Sitolojide ise bu oran % 4.9 olarak bildirilmiştir.

Telomeraz aktivitesi ile tümör hücrelerinde özel olarak up-regüle edilen hTERT iyi korelasyon gösterir iken hTR ve telomeraz bağımlı proteinler birçok telomeraz negatif dokuda da eksprese olabilmektedir.(28) Wataru ve ark. gastrik karsinomlarda hTERT ekspresyonunu gösterebilmek için immünohistokimyasal bir inceleme tanımlamışlardır. (28) Çalışmalar non-neoplastik dokularda zayıf olan hTERT ekspresyonunun karsinomların tümör nükleuslarında kuvvetli olduğunu göstermiştir. Yüksek telomeraz aktivitesi olan nöroblastomlu vakalarda bu ekspresyon gösterilmiştir. Poreboma ve ark.(29) immünohistokimyasal olarak anti-hTERT antikoları ile hTERT tanımlanmasının tümör hücrelerinde telomeraz aktivitesinin bir göstergesi olduğunu vurgulamıştır.

Semi-kantitatif ölçüm yapan günümüz TRAP floresans incelemeleri 1998'de tanımlanmıştır. Günümüzde kullanılan telomeraz kitleri non-izotopik PCR tüpleri ile ELİSA veya floresans kantitatif tayin ile telomeraz aktivitesini ölçebilmektedir.

Xu ve ark. enzimatik luminometrik PP(i) inceleme (ELİPA) olarak adlandırdıkları sulfürlaz ile ATP'ye dönüştürülen lusiferaz bioluminesans sistem ile telomeraz aktivitesinin belirlendiği yeni bir method tanımlamışlardır. Bu yöntem ile 5 hücre alt sınırında tanı sağlandığını ve TRAP-ELİSA ile karşılaştırıldığında sensitivitesinin ELİPA'da % 83 ve % 96, TRAP-ELİSA'da % 71 ve % 96 olduğunu bildirmişlerdir. Bu testinde basit ve sensitif olarak telomeraz aktivitesini belirlediğini saptamışlardır(30).

Bu sistemlerde ELISA sisteminin kullanıldığı methodlarda ise hızlı ve non-izotopik telomeraz aktivitesi tayini hücre veya doku ekstratlarında saptanabilir. Bu method bir basamak PCR tabanlı TRAP inceleme ile ELISA ile TRAP incelemenin kromojenik tanımlanması esasına dayanmaktadır. Ne yazık ki bu sistem ile kantitatif tayin yapılamamaktadır. Çalışma prensibi ise aktif telomeraz biotinlenmiş oligonükleotit substartına telomerik tekrarların PCR ile amplifikasyonuna dayanmaktadır.

#### **B.VI. Anti-Kanser Terapisinde Telomerazın Hedef Alınması ve İnhibitörleri:**

Telomeraz aktivitesi, sellüler immortalizasyon ve onkogenez arasında kuvvetli bir ilişki gösterildiğinden beri selektif olarak normal hücreler korunurken kanser

hücrelerinin telomeraz inhibitörleri ile öldürülebileceği ve bu ajanların olası olarak tedavide kullanılabileceği düşüncesi mevcuttur. Bu ajanlar ile hedeflenen etki telomer uzunluklarının kritik seviyeye kadara kısaltılarak replikatif özelliklerinin yitirilmesi ve kromozom hasarına bağlı olarak hücre ölümünün sağlanmasıdır. Tümöral oluaşumların büyük bir çoğunluğunda telomerler daha kısa bulunmakta ve yüksek proliferasyon oranları normal replikatif hücrelere göre görülmektedir.(31) Bu yüzden telomeraz aktivitesinin inhibisyonu birkaç sellür bölünme ile kanser hücrelerinde telomerin lethal erozyonuna imkan vermektedir. Bunun aksine daha önce değinildiği gibi kök ve germ hücrelerinde telomer uzunlukları daha fazla olmakta ve terapi esnasında protektif özelliklerinin korunacağı düşünülmektedir. Normal hücrelerin korunması ile trombositopeni, bulantı, alopesi, lekopeni gibi standart kemoterapinin bazı yan etkilerini görünmeyeceği açıktır.(32) Telomeraz inhibitörlerinin geleneksel kemoterapi rekimleri ile veya sonrasında kullanımının olacağı sanılmaktadır. Böylece tümör boyutlarında artmanın ve metastazların önlenebileceği ve yüksek riskli hasta grubu olan ailesel geçişli kanser olgularında telomeraz-ekspresyonu gösteren hücreler üzerindeki etkisi ile korunmanın sağlanabileceği düşünülmektedir.(chemoprevention)

Anti-sense teknolojisi ile çoğunlukla RNA yapıda ve tek-sarmallı hedef bölgelere tamamlayıcı olan tek-sarmallı DNA'lar ve RNA'lar saptanabilmektedir. Feng ve ark. insan telomeraz RNA'sını belirlemek için anti-sense nükleotitlerinin klonlanmasını ve sekanslanmasını bildirmiştir. HeLa hücrelerine hTR'sının ilk 185 nükleotitlerinin anti-sense oligonükleotitlerinin tanımlanması ile 41 anti-sense RNA ekspresyonu gösteren klonlarda 23-26. bölünme sırasında kriz meydana gelmiştir. Takiben ilginç bir anti-sense ajanı olan peptit nükleik asit (PNA) tanımlanmıştır. Bu tüm deoksiriboz fosfodiester iskeletinin yerini N-(2-aminoetil)glisin birimlerinin aldığı bir DNA hasarı meydana getirmektedir. Peptit nükleik asit tek-sarmallı DNA veya RNA yapılar ile çift helikal kompleksler oluşturma yeteneğine sahiptir ve proteaz ve nükleazlara yüksek direnç oluşturmaktadır. Norton primer meme kanseri hücre çizgisinde insan telomeraz RNA yapı taşına anti-sense olan değişik uzunluklardaki PNA oligomerlerinin etkilerini incelemiş ve en etkin oligomerlerin 13 mer 48-60 nükleotitlerine tamamlayıcı olarak bulmuştur (Yapı taşı bölgesi 48-56).(33) Kondo ve ark. malign glioma hücrelerinde 2, 5-oligoadenilat bağlı insan telomeraz RNA'sına karşı anti-sense 19-mer

oligonükleotitlerini çalışmıştır.(34) Bu alışılmamış oligonükleotit endoribonükleaz ve RNAaz L'yi aktive etmektedir. Bu spesifik anti-sense oligonükleotitlerinin kullanılması ile subkutan prostat kanser hücrelerinin fare deneylerinde 6 gün içinde büyümelerinde baskılanma ve apoptoz indüksiyonu gözlenmiştir.

Ribozim teknolojisi anti-sense teknolojisinin bir modifikasyonu ve açılımıdır. Çekiç başlı ribozimler RNA sekansındaki hedeflerine bağlanıp, spesifik kimyasal yıkım reaksiyonu yapabilmektedir. Yokoyan insan telomeraz RNA'sı 44-46 GUC sekansını yıkıma uğratabilen bir çekiç başlı ribozim tanımlamıştır.(35) Endometrial kanser hücrelerine bu ribozim transfekte edildiğinde bazı klonlarda telomeraz aktivitesi inhibe olmuştur. Bu klonlarda telomeraz RNA'sında en fazla azalmanın gösterildiği klonlarda telomer kısalması meydana gelmiştir.

Bazı anti-kanser kemoterapi ajanları telomeraz aktivitesini inhibe edebilmektedir. Burger ve ark testis kanser hücrelerinin sisplatin kültürlerinde telomeraz aktivitesinin inhibe olduğunu göstermiştir.(36) Burada olası mekanizma sisplatinin guaninler arasında DNA karşı-bağlanmasının olduğu düşünülmektedir. DNA topoizomeraz inhibitörlerinde pankreas kanser hücrelerinde telomeraz aktivitesini bloke ettiği gösterilmiş, bu etkiyi tirozin protein kinaz inhibisyonu yoluyla yaptığı düşünülmüştür.(37) Melanom ve over kanserinde yapılan bir çalışmada telomeraz aktivitesi ve Doxorubisin, sisplatin ve multinükler plaitn içeriği BBR 3464 gibi DNA hasarı yapan ajanlara sellüler sensitivite arasında hiçbir ilişki saptanamamıştır. Ancak uzun telomerlere sahip hücrelerin ilaçlara rezistans geliştirdiği gözlenmiştir.

Ovaryen kanserde kemoterapi sonrasında cevap veren ve vermeyen olgularda telomer uzunluğu arasında bir fark yok iken ve telomeraz aktivitesi cevapsız olguların % 58.6'sında artış göstermiştir. Sisplatine rezistans gösteren ovaryen kanser hücrelerinde telomeraz aktivitesinde sisplatin maruziyeti ile down-regülasyon gösterilmesede tedaviye adriamisin eklenmesi ile telomeraz aktivitesinde azalma bildirilmiştir. Ovaryen kanserde hücre kültürlerinde yapılan bir çalışmada hTR ile sisplatin (24 saatlik maruziyet), Etoposid (72 saatlik maruziyet), siklofosamid/Ifosfamid (24-72 saatlik maruziyet) arasında pozitif bir korelasyon gösterilmiştir. Sisplatin için TRF ile bu korelasyon yine gösterilebilmektedir. Buna göre telomer ve hTR ekspresyonunu azaltmak yoluyla telomer

uzunluğunu değiştirmek için topoizomeraz inhibitörleri (ETO,vb) ve alkileyici ajanların (CDDP, CYC ve IFO) olası etkisi gösterilmiştir.(38)

Ku ve ark. insan nazofaringeal kanser hücrelerinde protein kinaz C inhibitörlerinin telomeraz aktivitesini azalttığını ispatlamışlardır.(39) Protein kinaz C inhibitörleri arasında H-7 ve bisindolyamid en aktif olanalarıdır. Sharma ve ark. Burkitt lenfoması hücrelerinde dimetil sulfoksidin proliferasyonu engellemek için kullanıldığında telomeraz aktivitesinin inhibe edildiğini bildirmiştir.(40)

Bazı araştırmacılar rekombinant adenoviral vektör ile vahşi-tip p53 ve Rb geninin kanser hücrelerinin transfekte edildiğinde telomeraz aktivitesinin baskılandığını ve hücre büyümesinin apoptoza yol açacak tarzda arrest olduğunu tanımlamıştır. Kanaya p53 ile telomeraz aktivitesinin inhibisyonunu hTERT promoter üzerindeki etkisi ve olası olarak bağlanma bölgesindeki transkripsiyon faktör Sp1 ile olduğunu bildirmiştir.(41)

İnsan telomeraz reverse transkriptaz inhibitörleri (azidotimidin, vb) ve telomerler tarafından oluşturulan dört-sarmallı yapılar ile ilişkiye giren ve stabilizasyonunu sağlayan G-quadruplexler de tanımlanmıştır. G-quadruplexler sub-mikromolar konsantrasyonlarda telomerazı inhibe edebilmektedir.(42) Yakın çalışmalarada G-quadruplexlerin interaktif olarak c-MYC gibi genlerin promoter bölgelerinde etki ederek insan reverse transkriptazını ve dolayısı ile telomerazı inhibe ettikleri bildirmiştir.(43)

Malignitelere telomerazın hedef alınmasındaki major sınırlamalardan biri hücredeki replikatif özelliğın yitilmesi için telomer kısalmanın gerekli olmasıdır. Bu oluşum için birçok hücre jenerasyon gereklidir. Telomeraz reverse transkriptaz hTERT parsiyel peptitlerinin sitotoksik T-lenfositler için uyarıcı oldukları ve hTERT pozitif tümör hücrelerinde lizis oluşturdıkları gösterilmiştir.(44) Ancak in vivo olarak bu mekanizma ispatlanmamıştır ve antijenli normal telomeraz pozitif hücreler üzerindeki etkileri halen bilinmemektedir.

Bu sonuçlar son derece ilgi çekici kanser tedavisinde telomeraz inhibitörlerinin kullanılabilmesi olasılığını desteklemektedir. Bu tedavi rejimleri için bazı noktaların ise hatırlanması gereklidir. İlk olarak % 10-15 oranında kanserlerde telomeraz aktivitesi gösterilememekte ve bu tümör hücrelerinde muhtemelen başka olası mekanizmalar ile kansere sebebiyet vermektedir. Bu tümörler için telomeraz inhibitörlerinin düşünülmesi yanlıştır. Bir diğer nokta ise telomeraz inhibitörlerinin telomerlerin en kısa olduğu hücre

kültürlerinde etkisinin gösterilmesidir. Oysa halen birçok primer tümörde telomer uzunluğu bilinmemektedir. Son nokta ise efektif telomeraz inhibisyonunun düşük telomeraz aktivitesi gösteren normal hücrelerdeki etkisidir. Halen telomeraz inhibitörlerinin potansiyeli araştırılması gereken bir konudur.

#### **B. VII. Telomeraz Tayininin Kanser Tanı ve Prognozundaki Önemi:**

İnsan hücresinin proliferasyonundaki belirsiz erken evre olaylarını tespit etmek için bir in-vitro çalışma modeli oluşturulmuştur: bunun için normal insan fibroblastları ve meme epitel hücreleri SV40 T-antijeni ile transfekte edilmiştir. Bu hücrelerde normal planlanmış hücre ölümü için gerekli zamanın aşılması ile aşırı hücre proliferasyonunun önlenmesi için p53 ve Rb adlı iki tümör supressör genin T antijenine bağlandığı gösterilmiştir. Bu bloğu aşan veya mortalite 1.evre (M1) hücreleri kriz olarak bilinen ikinci bloğa kadar bölünmeye devam ederler yada mortalitenin 2. evresine geçerler. Çok az sayıdaki hücre mortalitenin 2. (M2) evresine geçerek immortal bir kloni oluşturabilir.(45) Bir nükleoprotein enzim olan telomerazı aktivasyonu veya up-regülasyonu bu veya hemen M2 sonrası dönemde meydana gelmektedir. Bu aktivasyonun telomeraz represyon yolundaki spesifik bir gen kaybına bağlı olduğu düşünülmektedir.(45) Progresif olarak çoğalan hücrelerin telomerlerindeki kısalmanın hücre yaşlanmaya veya programlanmış hücre ölümüne yol açtığına inanılmaktadır.(46) Ancak birçok kanserde ve elde edilmiş hücre kümesinde progresif bölünmeye karşı telomeraz up-regülasyonu veya aktivasyonu telomer kaybı ile yarışarak telomerlerin stabilizasyonunu ve devamlı hücre büyümesini sağlamaya çalışmaktadır.(46)

Hücrelerin belirsiz, oran-limitsiz ve kanser progresyonu gösteren büyümesi bir bozukluk olarak düşünüldükten sonra telomeraz aktivitesi normal hücrelerin, immortal hücrelerin ve bazı tümör hücrelerinin olduğu panellerde telomeraz aktivitesi farklı belirlenmiştir.(47) Bu açıklanabilir olarak telomeraz aktivitesi tespiti için primer telomer sekanslarını içeren oligonükleotitlerin tanınması ve eşzamanlı PCR telomeraz ile ilgili ürünlerin artmasını ve telomeraz aktivitesinin tespitini baz alan basit, kısmen hızlı incelemelerin gelişmesine olanak tanımıştır. Bu bulguları ışığında telomeraz ve birçok kanser tipi arasındaki ilişkiyi incelemek için yakın zamanda ticari kitlerin tanımlanması ile birçok bilim adamı enzimin güvenilir tespitinde geniş yelpazedeki tümörlerde değişik

evrede bağımsız bir tümör markırı ve tanı testi olarak telomerazın yerini çalışmıştır. Daha yakın zamanda tümör biopsileri yanında sedimente idrar, oral yıkama, fırçalama, kan, ince iğne aspirasyon mayi ve frozen section gibi minimal invaziv yada non-invaziv yöntemler ile telomeraz incelemeleri uygulanmıştır (48).

Erken embryo, kemik iliğinde hematopoetik progenitör hücreler, dolaşımdaki B ve T hücrelerinde, lenfoid organlardaki hücreler gibi gibi bölünme gösteren normal hücrelerde ve insan primer kanser hücresinde telomeraz aktivitesi gösterilmiştir. Kanser hücreleri ile karşılaştırıldığında yenilenen dokuların proliferatif kök hücrelerinde daha düşük gösterilen telomeraz telomer kaybındaki oranı düşürüyor gibi görünmekte ancak tam olarak engelleyememektedir.(49,50)

Aralık 1996'ya kadar incelenmiş kanser vakalarında telomeraz aktivitesi sonuçları Tablo I'de sunulmaktadır.(51) Bu sonuçlar baş / boyun, akciğer, gastrointestinal trakt, pankreas, karaciğer, meme, erkek ve dişi genital trakt, böbrek ve üriner trakt ile kan ve cilt esaslı hücrelerdeki incelemeler ile elde edilmiştir. İncelenen hücreler normal, preinvaziv, malign ve malign spesimenlere bitişik normal hücreleri içermektedir. Bu çalışmada 2000'e yakın primer tümör incelenmiş; bunların 1734 (% 85)'inde pozitif sonuç elde edilirken, 196 normal hücreden sadece bir tanesinde pozitif sonuç gözlenmiştir. Dörtüzon preinvaziv tümörün % 30'unda pozitif sonuç var iken, 690 malign spesimene bitişik sahadan alınan normal hücreden % 11'inde pozitif sonuç mevcuttur.(Tablo I) Bu datalar birçok tümörün telomeraz aktivitesi up-regülasyonunu ve reaktivasyonunu sağlaması konusunda çok az kuşku bırakmaktadır.

Telomeraz incelemeleri değişik dokulardaki farklı primer ve malign tümör tiplerinin tanısında ek bir method olarak kullanılabilineceği düşünülmektedir. Neden %15 vakada telomeraz aktivitesinin tespit edilemediği konusunda değişik açıklamalar yapılmıştır. Birçok tümörün heterojen olması ve bütün alınan örnekler yeterli hücre içermediğinden dolayı telomeraz aktivitesi yetersiz belirlenebilmektedir. Bazı tümörlerde ise maya hücrelerinde ve özet olarak insan fibroblastlarında(47) olduğu gibi telomerler olabilirliği telomeraz dışındaki mekanizmalar sayesinde korunmaktadır. Ayrıca örneklenen bazı hücreler immortal olmadan daha önce mortal safhada alınmış olabilirler. Bunlara ek olarak telomerik tekrarlayan ampfilikasyon protokol incelemesi (TRAP assay) oligonükleotitlerin primerinin elongasyonu ve ürünlerin tespit edildiği iki aşamadan

oluşmaktadır. Bu doku ekstarktlarının aşamadan bağımsız olarak inhibitörleri içerebileceği gösterilmiştir(47,50) ve bu neden bazı küçük primer insan tümörlerinde telomeraz aktivitesinin tespit edilemediğini açıklayabilir.

Telomerazın erken tanı ve tümör tespitindeki başarısı tablo I'de gösterildiği gibidir ve preinvaziv kanser hastalarının % 30'unda pozitif telomeraz aktivitesi tespit edilmiştir.(48) Bu lezyonlar baş / boyun, akciğer, kolorektal, meme karsinomu insitu ve yüksek grade prostatik intraepitelyal kanserleri içermektedir.(48,51) Kanserlerle karşılaştırıldığında 10 kat daha az olarak sigara içenlerde metaplazi, displazi ve karsinoma insitu gibi birçok pre-neoplazik gelişimlerde telomeraz aktivitesi gösterilmiştir.(48) Adenom gibi benign tümörler dışında pankreatik kanserlerin %95'inde telomeraz aktivitesi saptanmıştır.(52) Nöroblastomların yaklaşık % 94'ünde de telomeraz aktivitesi mevcut iken benign gangliomalarda saptanmamıştır.(49) Ayrıca akut myeloid ve lenfoid lösemi ve myelodisplastik sendrom gibi diğer hematolojik hastalıklarda da telomeraz aktivitesi tarif edilmiştir.(53) Bu yüzden yukarıda sayılan ve diğer birçok preinvaziv kanserde erken tanı için çeşitli dokularda telomeraz ciddi bir sensitiviteye sahiptir.

Tablo I Telomeraz aktivitesi

<i>Patoloji</i>	<i>Pozitif test sayısı</i>	<i>Pozitiflik oranı %</i>
<i>Normal</i>	1/196	0.5
<i>Preinvaziv</i>	123/410	30
<i>Malign</i>	1734/2031	85
<i>Malign doku bitişiği</i>	77/690	11

Telomerazın kanser prognozunda bir önemi varmıdır? Meninjiomlarda, özellikle rölatif benign olgularla karşılaştırıldığında telomeraz aktivitesi ve rekürrens arasında yüksek oranda korelasyon gözlenmiştir.(54) Bu çalışmada meninjiom vakalarından rekürrens gösteren beş olguda telomeraz aktivitesi saptanırken, rekürrens göstermeyen 25 olgudan hiçbirinde telomeraz aktivitesi gösterilememiştir. Ayrıca nöroblastomla(49), akut myeloid lösemiyle(55), meme kanseri(50) ve gastrointestinal kanser(56) ile ilgili çalışmalarda yüksek telomeraz aktivitelerinin kötü prognozla ilgili olduğu ispatlanmıştır. Yine benzer olarak evre IV nöroblastomlu birkaç vakada telomeraz aktivitesi zayıf olarak saptanmış ve bu olgular spontan regresyon göstermiştir, bu telomer olabilirliğinin

sağlanmasındaki yetersizlik olarak değerlendirilmiş ve istenen sonuçlar bu sayede elde edilmiştir.(49)

Telomeraz aktivitesinin hemen hemen tüm primer tümörlerde(51) ve kanser hücre kültürlerinde tespiti, telomeraz reaktivasyonu yada up-regülasyonu için hücrelerin limitli proliferatif potansiyelden limitsiz proliferatif bölünme potansiyelli hücreler dönüşmeleri gerekliliğini düşündürmüştür.(45,57) Bu fikri destekleyen bir bulgu olarak bitişiklerindeki normal hücrelerdeki uzun telomer uzunluğu ile karşılaştırılınca genellikle kısa ancak sabit bir telomer uzunluğu birçok tümör hücresinde tespit edilmiştir.

Somatik hücrelerde enzim aktivitesinin tespitini imkansız kılan telomerazın depresyonuna nazaran dolaşımdaki telomeraz aktivitesini zaten gösteren kök hücrelerde değişik genetik ve epigenetik olaylar ile telomeraz up-regülasyonu sayesinde daha yüksek bir aktivite tespit edilebileceği bir olasılıktır. Ayrıca bazı telomeraz yeteneği olan primer tümörler yavaş sıkluslara sahip oldukları veya indifferansiye hale geldikleri ve sessiz oldukları için telomeraz aktivitesi göstermiyor olabilirler. Hücre kültürlerinde telomeraz ekspresyonu yapan tümörlere differansiye edici ajanlar veya serumların uygulanması ile telomeraz down-regülasyonu yaratmıştır.(55)

Telomeraz aktivitesi daha önce bahsedildiği gibi tümör bitişikindeki dokularda da tespit edilmiştir.(47,49,51,52,56) Bu telomeraz aktivitesinin tümöral dokular çıkartıldıktan sonra bile onkojenik potansiyeli gösterdiğini düşündürmektedir. Rezidüel bir telomeraz aktivitesi bize küçük bir odağı gösterebilir ve relapsın saptanmasında yardımcı olabilir. Ayrıca bu inceleme bize kemoterapi kürleri veya anti-telomeraz terapisi gibi diğer kanser terapileri takibinde faydalı olabileceği ispatlanarak kanser sınırlandırılmasında ve rekürrenste yardımcı olabilecektir. Bu aktivite tespiti ile ayrıca diğer hücrelerden malign hücreler ayrılabilir (kanserli hastalarda lenfoid dokulardaki inflamasyon hücreleri). Yakın çalışmalarda ikinci germinal merkezlerdeki lenfositlerden kaynaklı olarak histolojik olarak negatif lenf nodlarında dahi telomeraz aktivitesi gösterilmiştir. Ancak 26 malign lenf nodu incelendiğinde bu düzeyden yaklaşık 6 kat fazla telomeraz aktivitesi tespit edilmiştir.(58) Telomerazın RNA yapı taşının klonlanması ile parafinde malign ve benign lenf nodu hibridizasyonu başarılmıştır.(58) Metastaz olan lenf nodlarında insan telomeraz RNA'sı tümör hücrelerinde yüksek oranda ve germinal merkezlerde düşük olarak tespit edilmiş ancak sadece nadir veya zayıf olarak



parafoliküler, medüller veya sinuzoidal bölgelerde saptanmamıştır. Metastatik tümörü olan beş hastada insan telomeraz RNA'sı düşük oranda germinal bölgelerde gösterilmiştir. Bu bulgular mikrometastazın gösterilmesinde de insan telomerazın rolü ispatlayabilir.

#### **B.VIII. Ovaryen Kanser ve Telomeraz:**

Günümüzde telomeraza ait bilgilerin bulunduğu tümör ve normal doku örneklerinin sayısı giderek artmaktadır. Telomerazın spesifik aktivitesi ilk olarak 1994 yılında over kanserli olgularda gösterilmiştir.(59) Bu çalışmada non-PCR temelli sıradan telomeraz ölçüm yöntemleri ile 10 over kanserli olguda asit sıvısında telomeraz aktivitesi gösterilmiştir. Tümör hücrelerinin normal hücrelerden ayrımının yapılması ile telomeraz aktivitesinin tümöral kompartmana ait olduğu ve bu hücrelerin normal hücrelere göre kısa ve stabil telomer uzunluklarına sahip oldukları tanımlanmışlardır.

Shay ve Wright telomeraz aktivitesini 2000 üzerinde primer tümör ile yaptıkları çalışmalarda % 85 oranında tespit etmiştir.(51) Spesifik olarak telomeraz aktivitesi jinekolojik malignitelerin yaklaşık % 95'inde ve ovaryen kanserlerin % 88'inde gözlenmiştir.(60)

İngilterede 1997'de Gorham ve ark tarafından yapılan çalışmada özellikle solid örneklerde telomeraz aktivitesi tespit edilirken servikovajinal smearde bu aktivite gösterilememiş ve testin enzimatik sisteminde gelişmeler olduğunda daha yararlı olabileceği düşünülmüştür.(61) Datar telomeraz aktivitesini normal over, kistadenom, düşük potansiyelli over malignitelerinde ve karsinomlarda araştırmıştır. Çalışmada 81 over karsinomlu, 12 düşük potansiyelli over kanserli, 13 kistadenomlu ve 6 normal over dokusunda frozen doku örneklerinde telomeraz aktivitesi değerlendirilmiş, telomeraz aktivitesi TRAPEze PCR yöntemi ile negatif, orta (< veya = 99 bp) ve yüksek (>100 bp) olarak raporlanmıştır. Çalışmada tanı anındaki yaş, histolojik grade, FIGO evresi, tanı anında metastaz mevcudiyeti ve rezidüel hastalık varlığı gibi klinik ve patolojik bulgular tüm karsinom vakaları için incelenmiştir. Orta şiddetteki telomeraz aktivitesi normal over dokusu / kistadenomlar (% 32) nazaran düşük potansiyelli tümörlerde (% 67) veya invaziv karsinomda (% 57) olarak bulunmuş, bu bulgularda telomeraz aktivitesinin ovaryen karsinogeneziste muhtemel rolünü vurgulamıştır. Ayrıca telomeraz pozitif düşük

potansiyelli tümörlerde olası invaziv karsinom gelişme riski bu olgularda düşünülmüştür. Benign veya düşük potansiyelli tümörlerin hiçbirinde yüksek telomeraz aktivitesi tespit edilmemiştir ancak ovaryen invaziv karsinomların yaklaşık % 18'inde yüksek % 57'sinde ise orta düzeyde telomeraz aktivitesi gözlenmiştir (toplam % 75) ve normal dokular ve kistadenom ile invaziv over kanserli olgular arasında telomeraz aktivitesi açısından istatistiksel bir fark vardır (P =0.001, chi(2)).(62),(Tablo II)

Tablo II Over Kanserinde Telomeraz aktivitesi

<b>Araştırmacı, Araştırma yılı</b>	<b>Telomeraz aktivitesi yüzdesi</b>
<i>Gorham, 1997</i>	%75
<i>Duggan, 1998</i>	%88
<i>Park, 1999</i>	%81.25
<i>Wang, 2002</i>	%73.3

Benzer bir çalışmada Park ve ark. TRAPeze PCR işlemi ile 13/16 ovaryen karsinomda, 9/10 borderline tümörde ve 3/11 kistadenom/fibroidde telomeraz aktivitesini tanımlamışlardır. Bu çalışmada telomerazın bir sub-uniti geni olan MRNA ekspresyonu ise (hTERT) RT-PCR ile 14/15 ovaryen karsinomda, 8/10 borderline tümörde ve 4/11 kistadenom/fibroidde tespit edilmiştir. İn situ hibridizasyon ile telomeraz-RNA (hRT) ekspresyonu için parafin-yataklı tümör kesitlerinde incelenmiş ve değişik ekspresyonlar tarif edilmiştir. En yüksek hRT ekspresyonları predominant ve değişken olarak en yüksek telomeraz aktiviteleri ovaryen karsinomlarda gözlenmiştir. Bu iki değişkenin hTERT mRNA ve hRT ekspresyonları telomeraz aktivitesinin up-regülasyon ve re-aktivasyonu ile ilişkili olduğu daha önce vurgulanmıştır. Bu bulgularda hTERT mRNA ve hRT ekspresyonlarının telomeraz aktivitesinde önemli göreve sahip olduklarını ve malignite ile ilişkili olduğunu göstermekte ve telomeraz aktivitesinin diagnostik olarak değeri olduğunu malignite gelişiminde görev üstlendiğini vurgulamaktadır.(63)

Kyo ve ark. ovaryen malignite (35 hasta), borderline (5 hasta) ve benign tümörlerde (23 hasta) telomerazın subuniti olan insan telomeraz RNAsı (hRT), telomeraz-bağımlı proteinler (TPI) ve insan telomeraz katalitik subunitini (hTERT) incelemiştir. İnsan telomeraz RNAsı (hRT) ve telomeraz-bağımlı proteinlerin (TPI) ovaryen kanser, borderline ve benign tümörlerin % 80'den fazlasında RT-PCR ile ekspresyonu gözlenmiştir. Ancak insan telomeraz katalitik subunitinin (hTERT) ekspresyonu sadece

ovaryen kanser olgularında görülmektedir. Telomeraz aktivitesi ile hTERT arasında istatistiksel bir korelasyon tanımlanmış ancak diğer subunitlerle bir korelasyon gözlenmemiştir. Bu yüzden hTERT ekspresyonu kanser lezyonlarına spesifik olarak değerlendirilmiş ve insan telomerazında oran-sınırlayıcı olarak enzimatik aktivitede bir belirleyici olarak kabul edilmiştir. Ovaryen kanserlerin gelişiminde hTERT up-regülasyonu kritik bir role sahip olabilir.(64)

Sakamoto ve ark. TRAPeze kullanarak PCR bazlı bir çalışmada 118 jinekolojik tümörde telomeraz aktivitesini değerlendirmiştir. Telomeraz aktivitesi özellikle kanser vakalarında daha yüksek bulunmuştur. Telomeraz aktivitesi artan düzeylerde uterin serviks, servikal displazi, servikal kanser vakalarında, lenf nodu metastazı bulunan olgularda primer bölgede daha yüksek olmak koşulu ile endometrial kanserde ve over kanserli olgularda tespit edilmiştir. Ancak ilginç bir not olarak telomeraz aktivitesi histolojik olarak subtiplerde karşılaştırıldığında berrak hücreli (clearcell) karsinomda özellikle endometriod adenokarsinoma göre telomeraz aktivitesi düşük bulunmuştur. Tüm kanser olgularında telomeraz aktivitesi ve tanı anındaki veya menapoz yaşı arasında bir korelasyon bulunamamıştır. Tüm vakalarda 100 IU veya fazla telomeraz aktivitesi kanser ile ilgili tespit edilmiş, sensitivite ise % 39 servikal kanserde, % 41 endometrial kanserde ve % 21 ovaryen kanserde tanımlanmıştır. Evreye göre ovaryen kanserde telomeraz aktivitesi bir artış gösterme eğiliminde olarak tarif edilmiştir.(65)

Jinekolojik tümörlerde telomeraz aktivitesi araştırılan diğer bir çalışmada da tüm vakaların % 84'ünde ve ovaryen kanserlerin % 73.3'ünde telomeraz aktivitesi saptanmıştır. Endometrial kanserde bu oran % 81.8'lere yükselirken servikal kanserlerde % 100'lere ulaşmıştır. Yine aynı çalışmada ovaryen kanserlerin % 60'ında telomer uzunluğunda değişimler gösterilmiştir.(66) Ne yazık ki telomer uzunluğunun bir markır olarak ovaryen kanserde kullanılamayacağına belirtildiği raporlar vardır.(67) Ancak nöroblastoma, prostat kanseri ve bazı hematolojik kanserlerde telomer uzunluğunun klinik önemi ispatlanmıştır. Bu iki çalışmada da meme kanserli veya mesane kanserli olgulardakine benzer olarak ovaryen kanserdeki evre ile telomeraz aktivitesinin korele olduğu gösterilmiştir.

Villa ve ark. melanom ve ovaryen kanser hücre kültürlerinde telomeraz aktivitesini ve uzunluğunu incelemiş ve DNA hasarı yaratan ajanlara sensitivitesini

karşılaştırmıştır. Telomeraz aktivitesi her iki grupta eşit ortamlarda tespit edilmiş (0.80 ve 0.90), melanom hücrelerinde telomer uzunluğu (TRF) ortalama olarak iki kat daha uzun bulunmuştur (7.74 ve 3.82 kb). İki telomer-bağımlı parametrelerde ve hücre popülasyonunun doubling zamanında, DNA indeksi veya TP53 gen durumunda bir korelasyon iki grupta saptanmamıştır. Ayrıca telomeraz aktivitesi ve doxorubisin, sisplatin ve multinükleer paltin bileşiği BBR 3464 sensitiviteyi açısından bir ilişki her iki grupta gözlenmemiştir. Ancak uzun telomer boyutları sadece sisplatinde istatistiksel bir anlam saptansa da ilaç rezistansı ile ilişkili değerlendirilmiştir. Bu sensitivite/rezistans durumu telomer uzunluğuna bağlı olarak değişmektedir.(68)

Ailesel over/meme kanseri hikayesi olan hastalarda telomerik instabilite ve azalmış proliferatif potansiyeli ovaryen yüzey epitelyal hücrelerinde inceleyen Kruk ve ark. bu hipotezleri için normal ve ailesel hikayesi olan hastaların hücrelerini SV-40 büyük T-antijen ile transfekte etmişler ve bu hücrelerde telomerik instabilite ile proliferatif potansiyeli değerlendirmişlerdir. Ailesel hikayesi olan hastaların ovaryen hücrelerinde ve normal ovaryen hücrelerde telomeraz aktivitesi saptanmamış ancak Ailesel hikayesi olan hastaların ovaryen hücrelerinde telomeraz uzunluğu 1 kb daha kısa bulunmuştur. Ayrıca bu hastalarda telomerik kayıp normal hastalara göre üç kat daha fazla tarif edilmiştir. Bu bulgular ışığında ailesel hikayesi olan hastalarda artmış telomerik instabilite ve azalmış büyüme potansiyelinin ovaryen yüzey epitel hücrelerinde replikatif özelliğin azalmasına yol açtığı ispatlanmıştır. Buna bağlı olarak genetik anormallikler eşliğinde hızlanmış yaşlanma bu hastalarda malign transformasyona ve herediter over kanserinin erken ortaya çıkmasına yol açıyor olabilir.(69)

Yukarıda bahsedilen çalışmaların birçoğunda telomeraz aktivitesi evre ile artış göstermiş ve kötü prognozla ilişkili olarak yorumlanmıştır. Özellikle bu prognoz ilişkisi seks-kord stromal tümörlerde gösterilmiş ve bu olguların yüksek rekürrens riski ispatlanmıştır. İncelenen 45 seks kord stromal tümörlerin RT-PCR, TRAP incelemelerinde tüm tümöral dokularda ve bazı benign kontrol gruplarında hTR ekspresyonu saptanırken vakaların sadece % 40'ında hTERT gösterilmiştir. Çalışmada TRAP inceleme ile % 47 vakada telomeraz aktivitesi saptanmıştır ve hTERT ile telomeraz aktivitesi arasında % 91 oranında korelasyon izlenmiştir. Telomeraz pozitif hastaların % 45'inde hastalıktan dolayı ölüm ve rekürrens gözlenirken telomeraz negatif

olguların yalnız % 25'inde izlenmiştir. Bu çalışmada diğer çalışmalara benzer olarak telomeraz aktivitesinin rekürrens artırarak ve prognoz kötüleştirdiğini gözler önüne sermektedir. Ne yazık ki düşük sensitivitesi sebebi ile seks kord stromal tümörlerde tanısal amaçlı olarak telomeraz aktivitesi prognoz ve rekürrens dışında yararlı olarak değerlendirilemez.(70)

Sitolojik inceleme ile TRAP assay telomeraz aktivitesi değerlendirilmesinin ovaryen kanserli hastalarda karşılaştırıldığı bir araştırmada Roman ve ark. 1998 yılında 42 over kanserli ve 29 benign ovaryen hastalıklı, 29 karaciğer hastalıklı hastada asit mayinde incelemeler yapmıştır. Ovaryen kanserli hastaların 37'sinde (% 88) telomeraz aktivitesi saptanmış, sitolojik incelemede ise 27 hastada (% 64) malign hücre gözlenmiştir. Bu iki test arasında malign kriterleri yakalama açısından sensitifitede % 24 oranında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gösterilmiştir(P = .002).

Ayrıca telomeraz aktivitesi işlem yapılmamış örneklerde oda sıcaklığında 5 güne kadar saptanmakta ve örnekler bu süre sonunda çok az bir oranda kanser hücresi içerirken 2000-10000 kat oranda normal hücre içermektedir. Bu çalışmaya göre telomeraz çalışılması sitolojik incelemeye oranla daha sensitif olarak kanser tanısına imkan sağlamaktadır.

Asit mayinde yapılan sitolojik incelemelerin gösterdikleri diagnostik spesitifitenin yanında malignite ile ilişkili asitlerin belirlenmesindeki sensitivite % 40-60 oranında çeşitli yayınlarda bildirilmiştir. Bu düşük sensitivite % 40-60 oranında neoplastik ve atipik inflamatuvar hücreler arasındaki morfolojik sitolojideki tanı zorluklarından kaynaklandığı bildirilmektedir. Bu yüzden daha sensitif ve spesifite gösteren alternatif prosedürlerin tanımlanması gerekliliği düşünülmektedir.(71,72)

Tayvanda yapılan bir çalışmada Tseng ve ark. peritoneal asit ve yıkama mayinve telomeraz aktivitesini çalışmış ve ovaryen kanserin erken tespitinde yararlı olup olmadığını incelemiştir. Bu çalışmada 47 ovaryen maligniteli ve 50 benign leiomyomalı hastada TRAPEze ile telomeraz aktivitesi karşılaştırılmıştır. Sitolojik olarak pozitif olan 26 vakanın hepsinde telomeraz aktivitesi gözlenirken, sitolojik olarak negatif olan vakaların 3/21'inde telomeraz aktivitesi tespit edilmiştir. Bu üç vaka yeniden incelendiğinde malign asit mevcudiyeti saptanmıştır. Tüm telomeraz negatif olan vakalar aynı zamanda sitolojik olarak negatiftir. Peritoneal sitoloji ve telomeraz aktivitesi

sensitivite, spesifitesi sırası ile % 96 (26/27), % 100 (20/20) ve % 100 (27/27), % 90 (18/20) tir. Peritoneal sitolojinin % 4.7 gibi bir yanlış negatiflik oranı yanında telomeraz aktivitesinin % 6.9 (2/29)'luk bir yanlış pozitiflik oranı mevcuttur. Bu bulgular ışığında telomeraz aktivitesi sıradan sitolojik incelemeye ek olarak hem negatif hemde pozitif sitolojik vakalarda yüksek sensitivite ve spesifite ile kullanılabilir ve özellikle rezidüel hastalığın değerlendirildiği second-look laparotomide ciddi faydalar sağlayabilir. Bilindiği gibi second-look operasyonu sırasında % 15-30 vakada rezidüel hastalık tespit edilmemektedir. Bu negatif second-look operasyonların sonrasında ise % 50 oranında rekürrens saptanmaktadır. Sitolojinin sensitivitesinin düşük olduğu bu durumda telomeraz aktivitesinin değerlendirilmesi uygun olacağı günümüzde giderek kabul görmektedir. Bu sayede peritoneal sıvılarda TRAP incelemesi ile sensitivitenin artırıldığı günümüzde geleneksel sitolojik inceleme ile birlikte tanılmal ve takip amaçlı olarak telomeraz aktivitesinin değerlendirilmesi second-look operasyonu sırasında rekürrenslerin tespitinde yanlış-negatiflikleri engelleyerek malign hücrelerin belirlenmesinde yararlı olacaktır.(73)

Birçok araştırmacı telomeraz aktivitesi gösteren bu hücrelerin daha az invaziv yöntemler ile elde edilebileceğini düşünmüş ve bu nedenle dolaşımda bu hücreleri tespit etmek için çalışmalar yapmıştır. Bu yılın başında Sapi ve ark. epitelyal veya lökosit-spesifik antikolar ile yıkanmış serumlarda epitelyal hücreleri izole etmeyi ve telomeraz aktivitesini ölçmeyi başarmıştır. Bu yöntemler ovaryen tumor hücrelerini periferik kanda izole etmede son derece yüksek sensitivite ve spesifite göstermektedir. Ayrıca asit mayinden izole edilen dissemine yayılım gösteren ovaryen tumor hücrelerinde de telomeraz aktivitesi tanımlanmıştır. Kontrol grubu ile karşılaştırılan çalışmada telomeraz aktivitesi tüm evre IV hastalarda (% 100) ve % 35 evre III hastada gösterilmiş ancak hiçbir sağlıklı bireyde görülmemiştir. Ovaryen kanserin diagnostic markırı olan CA 125 telomeraz pozitif hastalarda anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Sonuçta tanımlanan bu non-invaziv kan testi ovaryen epitelyal hücreleri saptamada sensitif ve spesifik bulunmuş ayrıca dolaşımdaki ovaryen tümör hücrelerinin tanınmasında telomeraz potansiyel bir markır olduğu ispatlanmıştır.(74)

Fonksiyonel holoenzim telomeraz; telomerik DNA için yapı taşı olarak görev yapan hTR ve katalitik protein subünit olan hTERT tarafından oluşturulmaktadır. Katalitik subünit hTERT (insan telomerazı reverse transkriptaz) ilk olarak 1998 yılında Nakayama

tarafından purifiye edilmiştir. Telomeraz aktivitesinde hTERT bir regülatör olarak görev yapmaktadır. Telomeraz aktivitesinin ve hTR, hTERT geninin ekspresyon regülasyonu için günümüzdeki bilgiler halen sınırlıdır. İnsan telomeraz RNA subünit kompleksinin (hTR) hem normal somatik dokularda hemde tümöral dokularda ekspresyonu gösterilsede katalitik subüniti olan hTERT ekspresyonu telomeraz aktivitesi ile sellüler diferansiasyon ve neoplastik transformasyon aşamasında korelasyon göstermektedir. Ciddi bir korelasyon servikal kanseride içeren epitelyal kanserlerde ve meme, kolon, renal ile ovaryen kanserde gösterilmiştir. Bu katalitik subünitin (hTERT) promoter bölgesinin klonlanması ile bu regülasyon aşaması hakkında bilgi edinebilme şansı gerçekleşmiştir. Maksimum promoter aktivitesi için hTERT promoter bölgesinde delesyon içeren telomeraz pozitif hücrelerin geçici olarak transfeksiyon incelemeleri ile bir kodlama bölgesinin varlığı ortaya çıkartılmıştır. Bu bölge Sp1, c-Myc, AP-2, AP-4 ve NF-1 gibi çeşitli transkripsiyon faktörleri için potansiyel bağlanma sahaları olan bağlanma elementleri içermektedir.

Telomerazın muhtemel regülatör mekanizmalarını araştırmak için Ulaner insan telomeraz RNA (hTR) ve insan telomeraz reverse transkriptaz (hTERT) mRNA'sını normal ve neoplastik overde incelemiştir. Ancak hTR ve hTERT mRNA normal ve neoplastik birçok dokuda gösterilsede telomeraz aktivitesini göstermek açısından yeterli bulunmamıştır. Sadece hTERT komplet A ve B RT motiflerinin olduğu dokularda telomeraz aktivitesi gösterilmiştir. Ovaryen ve myometrial malignitelerde ise bu motif tanımlanmıştır. Bu bulgular telomeraz aktivitesinin komplet motiflerin izlenmediği normal dokularda gözlenmemesi ile telomeraz regülasyonunda hTERT mRNA'nın telomeraz down-regülasyonu daha ileri mekanizmalarla görev yaptığını ancak bunun malignitelerde kaybolduğunu düşündürmektedir.(75)

Saretzki'nin yaptığı bir çalışmada adenovirus vasıtası ile T motif insan telomerazı katalitik subüniti hTERT'e karşı duyarlandırılan ovaryen kanser hücrelerinde telomeraz aktivitesinin düştüğü ve masif hücre ölümü kültürlede gözlenmiştir. Ancak hücre ölümü gözlenen hücrelerde apoptoz öncesinde telomere kaybı ve uzunluk azalması gösterilmemiştir. Bu hızlı gelişen apoptozle telomerazın kanser hücresi büyümesini bozan ve hücre ölümü yaratan bir mekanizmanın varlığını düşündürmektedir. Bu fenomen kanser hücresinde telomerlerin DNA son ucunda "cap" fonksiyonunda bozukluk

yaratması ile olabilmektedir. Bu fonksiyon kaybı ovaryen kanser tedavisinde yeni umutlar yaratabilir.(76)

Telomeraz aktivitesi ve p53-bağımlı apoptozun ovaryen kanser hücrelerinde incelendiği bir çalışmada p53 geni için homozigot olan SK-OV-3 ovaryen adenokarsinom hücreleri yabancı-tip p53 geni (AxCAP53) ile transfekte edilmiştir. Ardından sisplatin IC(50) dozunda uygulanmış p53 transfekte olan hücrelerde apoptotik indeks ve sisplatin bağlı apoptoz daha yüksek bulunmuştur. Sisplatin uygulanması her iki grupta telomeraz aktivitesini ve hTERT ekspresyonunu etkilememiştir. Akeshima ve ark. bu bulgulara göre p53 genin telomeraz aktivitesi ile ilgili olabileceğini ancak p53bağımlı apoptozun aktiviteyi ovaryen kanserde etkilemediğini savunmuştur.(77)

Ovaryen tümörlerde hTERT ve telomeraz aktivitesi arasında % 80'den fazla korelasyon görülmektedir. Tzukerman ve ark. hTERT geni promoter bölgesi olarak 5.8-kb bir genomic fragmanı isole ve analiz etmiştir. Bu bölgenin telomeraz negatif ovaryen hücrelerde inaktif olarak gözleendiği ispatlanmıştır. Ayrıca inhibitor elementlerin görev aldığı düşünödüren 283 bp up-regölasyonun olduğu bir transkripsiyon başlangıç bölgesi tarif edilmiştir. Bu gölgelere jel analizlerinde ovaryen kanser telomeraz pozitif hücrelerinde spesifik transkripsiyon faktörlerinin bağlandığı tanımlanmıştır. Braunstein ve ark. bağlanan bu elementler yanında bir takım diferansiasyona neden olan iki E-kutucuğu (CACGTG) ve bir adet yazıcı (MT-box) element tanımlamıştır. Ayıca bu bölgelerdeki oluşturulan mutasyonların hTERT promoter bölgesinde hücre tipi bağımlı olarak transkripsiyonal aktiviteyi etkilediğini, over kanserindeki hTERT ekspresyonunda ve telomeraz aktivitesinde bu iki bölgeye bağlanan transkripsiyon faktörlerinin major bir rol oynadığını savunmuşlardır. Daha ileri yaptıkları çalışmalarda bir eşik düzeydeki telomeraz aktivitesinin değışik tip over kanserinde telomere integritesini koruyabildiği ve immortal duruma olanak sağladığını bildirmişlerdir.(78)

Takahashi ve ark. kemoterapi öncesi ve sonrasında telomeraz akitivitesi ve telomer uzunluklarını (TRF) epitelyal over kanserinde değerlendirmişler ve kemoterapiye cevap veren olgularda telomeraz aktivitesi artışı saptanmaz iken cevapsız olguların (%58.7) 7'sinde telomeraz aktivitesi artışı tespit etmişlerdir. Ancak her iki grupta telomer uzunluğu arasında bir fark gözlemediklerini telomeraz aktivitesinin kemosenitivite ile ilişkisi olabileceğini belirtmişlerdir.(79) Japonyada sisplatin uygulanan ovaryen hücre



kültürlerinde hem sisplatin rezistan hemde rezistan olamayan hücrelerde telomeraz aktivitesinde azalma tespit edilmiş ayrıca rezistan olmayan hücrelerde down-regülasyonu gösterilmiştir. Eldeki sonuçlarla anti-kanser ilaçlar ile down-regülasyon arasında olası bir ilişki gösterilmiştir.(80)

Telomeraz mutant katalitik subunitlerinin telomeraz aktivitesinin komplet inhibisyonu ile sonuçlandığını gösterilmiş ve tümör hücresinde telomer uzunluğunun azaldığını ve ölümün gerçekleştiğini bildirilmiştir. Bu sayede mutant telomerazın ekspresyonunun in vivo olarak tümörögenesiteyi engellediğini ve insan reverse transkriptazının anti-neoplastik terapilerin gelişiminde hedef olarak ön plana çıktığını vurgulamışlardır.(81)

### **B.IX. Second-Look Cerrahi ve Over Kanseri:**

Second-look operasyonu ilk olarak Owen Wangenstein tarafından tüm tümörün çıkartıldığı ancak rekürrens şansı yüksek olan kolon kanserli olgularda 1940'ların sonlarında tanımlanmıştır. Sekonder rezeksiyonun önerildiği tarihlerde Owen bu hastaları altı aylık intervallerle rekürrensin erken tespiti için opere etmiştir. Bu tarihten sonra second-look cerrahiler birçok hastalıkta kullanılmıştır. Günümüzde kliniğimizde ve birçok merkezde second-look cerrahi prosedürler (1) Lokalize hastalığına sahip ve evrelemenin tam yapılmadığı hastalarda yeniden optimal evrelemenin yapılması (2) Uygulanan kemoterapi protokolünün etkinliğinin tespiti için (3) Klinik olarak kür kabul edilip kemoterapinin kesilebileceği popülasyonun araştırılması için rutin olarak uygulanmaktadır. Son endikasyon günümüzde geniş olarak kullanım görmektedir(Tablo III). Bu invaziv takip protokollerinin tüm ve semptomsuz sağkalıma, yada yaşam kalitesine etkisi konusunda elde yeterli bilgi bulunmamakla beraber rekürrensin erken tespiti sonrasında uygulanan efektif salvage kemoterapi sayesinde artmış sağkalım sonuçları bildirilmiştir.

Geçen yıl yapılan bir çalışmada seond-look yapılan ve bu işlemi red eden vakalarda sağkalım karşılaştırılmıştır ve sağkalıma etki eden faktörler tanımlanmaya çalışılmıştır.

Tablo III Second-look ve Evre Arasındaki İlişki

Evre	% hastalık bulgusu olmayan
I	60-79
II	45-68
III	16-48
IV	33-45

• Smirz, Cain, Copeland, Gershenson ve Roberts'in serilerine göre

Linasmith ve ark. bu çalışmada 50 hasta incelemiş ve bunların 16'sına SLL uygulamışlardır. Second-look yapılan hastaların % 43.8'inde SLL pozitif bulunmuş, 35 aylık ortalama izlem süresi sonrasında 12 hasta hastalığa bağlı olarak ölmüştür. Ortalama sağkalım süresi second-look olan vakalar için 60 ay olarak tanımlanmıştır. Bu süre diğer literatürler ile benzerlik göstermektedir. Beş yıllık sağkalım oranları SLL olan grupta %37 iken SLL yapılmayan vakalarda % 88 olarak tanımlanmıştır. Beş yıllık sağkalım negatif SLL'ye sahip hastalarda % 28 iken SLL yapılmayan grupta % 54'tür. Ancak istatistiksel bir fark negatif SLL ve SLL yapılmayan vakalar arasında tanımlanmamıştır. Relaps için geçen süre SLL yapılan grupta 25 ay olarak hesaplanmıştır. Sağkalımda prognostik faktör olarak sadece tümörün grade anlamlı bulunmuştur. Bu çalışma sonucunda SLL'nin tüm ve hastalısız sağkalıma katkısı olmadığı vurgulanmıştır.(82)

Günümüzde second-look cerrahiler geniş yayımlı bir hastalığın tespiti için laparoskopi ile başlamaktadır. Eğer bu işlemde klinik olarak tanımlanmamış diffüz miliyer bir yayılım mevcut ise laparotomi gereksizdir. Bu hastaların terapiye devam etmesi gereklidir ve ayrıca bunlar sekonder sitoredüksiyon için iyi bir aday değildirler. Diğer yanda negatif laparoskopik inceleme yeterli bir tanıya olanak tanımamakta ve laparotomi uygulanmasını gerekli kılmaktadır. Laparotomi esnasında başlangıç evreleme cerrahisi gibi tüm batın detaylı olarak incelenmeli ve gerekli işlemler yapılmalıdır. Rezidüel fokal hastalıkta lezyon rezekte edilmeli ve olası bir radyoterapi için metal bir klipsle bu alan işaretlenmelidir. Dikkatli olarak tüm abdominal kavite incelenmeli bu inceleme diafragma, tüm viseral ve parietal peritoneal yüzeyler ve mezenter köklerini içermelidir. Gerekli ve şüpheli sahalardan biopsiler alınmalıdır.

Creasman kemoterapi ve kombine immünoterapi alan dört hastada second-look sırasında intraabdominal rezidüel bir hastalık gözlenmeden retroperitoneal hastalığın olabileceğini sunmuştur. Over kanseri pelvik ve para-aortik lenf nodlarına metaztas yapabilmektedir, bu yüzden yeterli inceleme ve örnekleme bu sahalardan yapılmalıdır.

Detaylı bir second-look sonrasında rölatif olarak düşük bir rekürrens oranı beklenmesi doğaldır. Erken yayınlanan raporlarda tek alkilleyici ajan içeren kemoterapiler ile tedavi edilmiş hastalarda negatif second-look sonrası gözlenen rekürrens oranı % 10-20 olarak tanımlanmıştır. Roberts ve ark. tedavi edilen hasta sayısı artıkça evre I ve II hastalarda hastalısız sağkalım ve negatif second-look arasında

yüksek bir korelasyon olduğunu ancak % 50'ye yakın hastada ise rekürrens geliştiğini tarif etmiştir. Bu oranlar Evre III ve IV içinde ispatlanmıştır. Bu kötü sonuçlar; (1) İyi bir eksplorasyon yapılsada birçok hastada mikroskopik hastalık ekarte edilememektedir. (2) Bu hastalarda intraperitoneal immünoterapi ve radyoaktif kolloidler içeren başka tedavi modaliteleri düşünülmelidir. fikirlerini önermektedir. Bu kombine ve tek-ajan içeren kemoterapiler arasındaki farkın gerçekçi olmadığı ve kombine kemoterapi ile regresyon olan ancak klinik olarak tanımlanmayan rezidüel hastalık düzeyinde artış sağladığına inanılmaktadır. Fakat halen bu konu tartışmalı olup kür kabul edilen düzeye kadar hastalar tedavi edilsede bazı ek yöntemlere ihtiyaç olduğu vurgulanmaktadır.

Over karsinomunda negatif SLL'de bile rekürrens oranları yüksektir. Günümüzde peritoneal sitolojinin sensitivitesi ve spesifitesi tartışılmaktadır. Ohwada 2001 yılında hem peritoneal sitolojinin tanısal oranını hemde pozitif SLL oranlarını 101 hastada incelemiştir. Hastaların % 23'ünde SLL pozitif olarak bulunmuştur. Bu hastaların peritoneal sitolojide malign hücre görülme oranı % 26 iken % 74 vakada yanlış-negatif sonuç elde edilmiştir. Peritoneal sitolojinin negatif bulunduğu pozitif SLL hastaların %53'ünde ve tüm bu vakaların % 88'inde tümör dokusunun bağ dokusu tarafından tamamıyla kapsüle olduğu izlenmiştir. Aksi olarak negatif SLL olan vakaların ikisinde de pozitif sitolojik bulgular gözlenmiştir. Bu sonuçlarında gösterdiği gibi peritoneal sitoloji SLL'de yüksek yanlış-negatiflik ile beraberdir. Günümüzde bunun bir nedeni olarak kemoterapinin neden olduğu tarif edilen kapsülasyon gösterilmektedir.(83)

Bilindiği gibi negatif second-look'a sahip hastaların % 40-50'sinde rekürrens 1-10 yıl içerisinde oluşmaktadır. Ancak bu işlem sayesinde prognoz, kemoterapi etkinliği ve olası sağkalım belirlenebilmektedir. Birçok hasta bu bilgiyi istemektedir. Bu alanda intraperitoneal kemoterapi ve biyolojik cevap modifikasyonu ajanlar için hasta grupları belirlenebilmekte, bu sayede salvage terapi tipinin tanımlanması ile sağkalıma katkıda bulunmaktadır. Böylece second-look salvage terapi seçiminde klinisyene büyük katkı sağlamaktadır. Pozitif bir sağkalım oranı net olarak tanımlanmasada doğru salvage terapi rejimi ile önümüzdeki 10 yıllık süre içinde yararları tartışılmazdır ve hastalara bu şansın verilmesi gerekliliği kabul edilmektedir. Degramont pozitif second-look vakalarında <2 cm ve >2 cm tümör rezidüelsü olan ancak cerrahi olarak rezekte edilmiş hastalarda >2 cm tümör rezidüelsü bulunan ama cerrahi olarak rezekte edilmeyen hastalara nazaran klinik

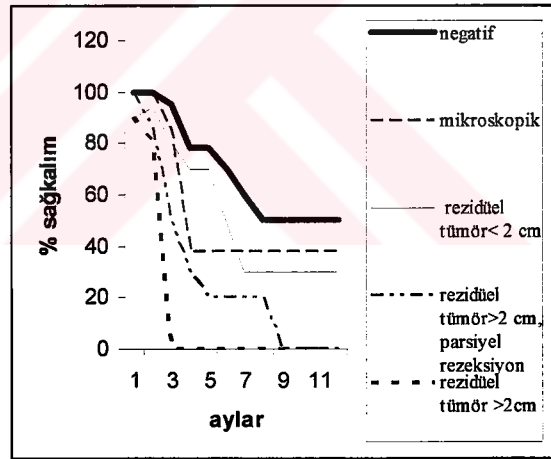
olarak prognozun daha iyi olduğunu tespit etmiştir. Salvage terapinin seçimi ile %80'e yakın hasta popülasyonunda efektif tedavi gerçekleştirilebilmektedir. Ayrıca %20 oranında gözlenen (negatif second-look olguları) ve mikroskopik hastalığa sahip bu vakalar konsolidasyon tedavisinden fayda görmektedir. Pozitif second-look vakalarında ise sekonder sitoreduksiyon şansının elde edilmesi sağkalıma katkı sağlayacak bir başka yaklaşımdır.

Second-look laparotomi evre I ve II de tartışmalıdır ve Walton ve ark. yaptığı bir çalışmada (GOG) 95 klinik olarak semptomu olmayan ve daha önce cerrahi evrelemeye girmiş hastanın sadece 5 tanesinde persistan hastalık second-look'ta tespit edilmiştir. Acak evre III ve IV'te hastaların neredeyse 2/3'ü persistan hastalık göstermektedir. Eğer persiste eden hastalık en büyük çapında 5 mm geçmiyor ise yüksek doz intraperitoneal sisplatin ve diğer intraperitoneal ilaçlar sağkalımı artırmaktadır. Piver ve ark. bu hastaları 5 mm-2 cm arasında tümör rezidüelsü olan grupla karşılaştırmış ve daha iyi sağkalımlar; % 78, % 38 tarif etmiştir.(Şekil III)

### Şekil III Second-look

sonrası sağkalım oranları.

(Degramont A, Drolet Y, Varette C.  
Survival after second look laparotomy in  
advanced ovarian epithelial cancer. Eur  
J Cancer Clin Oncol 1989; 25: 451)



## **C/ MATERYEL ve METHODLAR:**

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum anabilim dalına 1999-2002 yılları arasında başvuran over kanserli ve kontrol grubu olarak diğer benign jinekolojik hastalık tanısına sahip hastalar çalışmaya dahil edilmiştir. Çalışma primer sitoredüksiyon tedavisi almış ve takiben 6 kür platin içerikli kemoterapi uygulanmış klinik ve laboratuvar bulgularında remisyonda olduğu bilinen 15 adet evre 3 ve 4 over kanseri olgusu ve benign jinekolojik tanıya sahip 25 adet hastayı kapsamaktadır. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi dekanlığı tarafından çalışma için etik kurul kararı 11.03.2002 tarihinde 15-2002/259 sayı numarası ile alınmıştır. Tıbbi açıdan herhangi bir kontrendikasyonu olmayan vakalar çalışma kapsamı içerisine alınmıştır. Çalışmaya katılan hastalara gerekli tüm bilgiler verildikten sonra izinleri alınıp, onay formu okutulmuş ve imzalatılmıştır. Çalışma tek merkezli kontrollü prospektif bir çalışma olarak gerçekleştirilmiştir. Çalışmaya dahil edilen gönüllülerin özellikleri aşağıda belirtilmiştir.

Çalışmaya dahil edilecek gönüllülerin özelliği;

### **Over kanserli hastalar için;**

- A.Ü.T.F. Kadın Hastalıkları ve Doğum Bölümüne başvurmak,
- Daha önceden over kanseri tanısı alıp, primer sitoredüktif cerrahi geçirmiş olmak,
- Takiben 6 kür planlanmış kemoterapi almış olmak,
- Second-look için kontrendikasyona sahip olmamak ve operasyonunu kabul etmek.

### **Kontrol grubu için;**

- Benign jinekolojik tanıya sahip olmak,
- A.Ü.T.F. Kadın Hastalıkları ve Doğum Bölümüne başvurmak,
- Operasyon için kontrendikasyonu olmamak

Jinekolojik Onkoloji bölümünde over karsinomu tanısı ile evreleme cerrahisi, primer sitoredüktif debulking cerrahisi ve planlanmış kemoterapisi (Paklitaksel-Sisplatin /Karboplatin) yapılmış olan hastalar çalışmaya alınmıştır. Bu hastalar uygulanan radyolojik tanı yöntemleriyle residü yada rekürren kitle varlığı göstermeyen ve CA 125 değerleri <35 u/ml olan evre 3, 4 epitelyal over kanseri olgularını oluşturmaktadır. Tıbbi

açından herhangi bir kontrendikasyonu olmayanlara second-look laparotomi rezidüel hastalığın tanısı, uygulanan kemoterapinin etkinliğinin değerlendirilmesi ve Sekonder sitoredüksiyonun uygulanabilmesi için teklif edilmiş, kabul eden hastalara yapılan çalışmaya dahil edilmiştir.

Çalışmaya dahil edilen kontrol grubunu oluşturan vakalar benign jinekolojik tanıya sahip hastalardan seçilmiş ve tıbbi açıdan kontrendikasyonu olmayan vakalar çalışmaya katılmıştır. Hastaların hepsine çalışma hakkında bilgi objektif olarak verilmiş ve onay formu imzalatılmıştır. Kontrol grubundaki vakalar myoma uteri, tüp ligasyon istemi, ovaryen kist, primer infertilite ve dermoid kist gibi benign tanıları içermektedir. Bu tanıları sonucunda laparoskopik veya laparotomik myomektomi, ooferektomi, diagnostik laparoskopi, laparoskopik veya laparotomik tüp ligasyonu ve salpingo-oferektomi operasyonları uygulanmıştır.

Over kanserli olgularda makroskopik tutulumu olmayan vakalardan alınan 100cc asit sıvısı veya asit sıvısı olmayan vakalarda serum fizyolojik batın yıkama sıvısının 50 cc batın yıkama veya asit mayi örneği, 50cc %20'lik alkol ile dilue edilip sitolojik incelemeye ayrılmıştır. Takiben diğer 50cc sıvı örneği ise -80 derecede saklanıp; TRAP assay yöntemiyle telomeraz aktivitesinin değerlendirilmesi için kullanılmıştır. Telomeraz aktivitesi Ankara Üniversitesi Genetik AD moleküler genetik PCR laboratuvarlarında Prof. Dr. Ajlan Tükin ve Biyolog Güvem Gümüş gözetiminde, sitoloji ve patoloji incelemeleri için alınan örnekler ise Ankara Üniversitesi Sitoloji AD ve Patoloji AD'da incelenmiştir. Telomeraz aktivitesi ve sitolojik inceleme için alınan batın yıkama sıvıları en fazla 2 saat içinde genetik PCR laboratuvarına ulaştırılmıştır. Sitolojik ve patolojik inceleme sonuçları ile telomeraz enzim aktivitesi second look hastalarında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunda ise serum fizyolojik batın yıkama sıvısının 50 cc batın yıkama örneği -80 derecede saklanıp; TRAP assay yöntemiyle telomeraz aktivitesinin değerlendirilmesi için kullanılmıştır. Bu örnekler hem kantitatif tayin için kontrol örneklerini oluşturmuş hemde over kanseri hastaları ile karşılaştırılmıştır.

Primer cerrahi ve planlanmış kemoterapi sonrası, klinik ve laboratuvar bulgularında remisyonda olduğu bilinen evre 3 ve 4 over kanseri olgularında second-look laparotomi esnasında asit ve batın yıkama sıvısında tümör varlığını predikt etme açısından patolojik

inceleme, sitolojik değerlendirme ile telomeraz aktivitesinin karşılaştırılması ve rekürrens veya residü hastalıkta telomeraz aktivitesinin yerinin belirlenmesi çalışmanın ana amacı olmuştur.

Çalışma ve kontrol grubunda hücrelerin elde edilmesi için öncelikle asit veya batına yıkama mayi 50 ml steril falkon tüplerine aktarıldı. Ardından +4 °C'de, 900 rpm'de 10 dakika santifüj edilerek süpernatant uzaklaştırılıp pelet 50 ml eritrosit lizis tamponu (155 mM NH<sub>4</sub>Cl, 10 mM KHCO<sub>3</sub>, 0,1 mM EDTA) ile vorteksenerek homojenize edildi. Tüp 5 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra +4 °C'de, 900 rpm'de 10 dakika tekrar santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırılarak pelet 1 ml PBS ile homojenize edilip steril mikrofüj tüpüne aktarıldı. Thoma lamında hücre sayısı belirlenip 900 rpm'de 10 dakika bir kez daha santrifüj edildikten sonra yine süpernatant uzaklaştırılıp pelet -80 °C'de protein ekstraksiyonu için çalışılincaya kadar saklandı.

Bu örneklerde protein ekstraksiyonu ve kantitasyon için ise 200 µl 1 X CHAPS lizis tamponu / 10<sup>5</sup> – 10<sup>6</sup> hücre olacak şekilde uygun miktardaki 1 x CHAPS lizis tamponu pelet üzerine ilave edildi. Toplam 30 dakika buz üzerinde inkübe edilen örnekler +4 °C'de, 12000 g'de 20 dakika santifüj edilerek süpernatant steril mikrofüj tüpüne aktarıldı. Protein konsantrasyonu Bradford Assay ile tayin edilerek protein ekstraktları TRAP için kullanılıncaya kadar -80 °C'de saklandı.

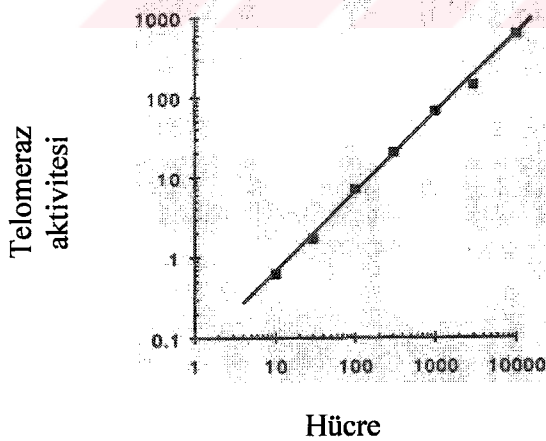
Telomeraz aktivitesi günümüzde gold standart olan TRAP assay ile çalışıldı. Bu inceleme için TRAPeze Telomerase Detection Kit (Intergene Company, USA) kullanıldı. Reaksiyon tüplerine 5 µl 10XTRAP reaction buffer, 1 µl 50XdNTP mix, 1 µl TS Primer, 1 µl Primer mix, uygun miktarda µl hücre ekstraktı (10-750 ng/µl için 2 µl) ve 0,4 µl Taq polimeraz (5U/µl) konularak ve toplam hacim 50 µl olacak şekilde üzerine PCR-Grade water ilave edildi. Her örnek için sıcaklıkla inaktive edilmiş (heat-inactivated) örnekler negatif kontrol olarak kullanıldı. Sıcaklıkla inaktivasyon için 5 µl protein ekstraktı steril mikrofüj tüpüne aktarılarak 83 °C'de 10 dakika inkübe edildikten sonra hücre konsantrasyonuna göre uygun miktardaki örnek TRAP assay için kullanıldı. Ayrıca her deneyde her birisi örnek yerine 1 µl telomeraz pozitif hücre ekstraktı, 2 µl 1 X CHAPS lizis buffer ve 1 µl TSR8 (control template) içeren 3 ayrı reaksiyon sırasıyla pozitif kontrol, primer dimer kontrolü ve standart olarak hazırlandı. Bu örnekler 20 °C'de 1 saat inkübasyondan sonra aşağıda belirtilen kondisyonda PCR gerçekleştirildi.

94 °C	90 saniye	} 35 siklus
94 °C	30 saniye	
50 °C	30 saniye	
72 °C	90 saniye	

PCR ürünlerini görüntülemek için çalışmada örneklere %12,5'lük poliakrilamid jelde 400 V'da 1,5 saat elektroforez uygulanıp bantları görünür hale getirilmek için jel 1/10000 SYBR Green ile 30 dakika boyanarak takiben UV altında incelendi.

Tüm örneklerin telomeraz aktivitesi için UV ile incelenmesi sonrasında tüm bu görüntüler Diana paket programı(görüntüleme sistemi) ile dijital ortama aktarıldı. Bu datalar Aida paket bilgisayar programı(görüntü analiz programı) kullanılarak her örnek için; ısı ile müdahale edilen ve edilmeyen örnekler, 1x CHAPS lizis buffer sadece kontrol(primer-dimer/PCR kontaminasyon kontrol)( $r_0$ ) ve TSR8 kantitasyon kontrol( $r$ ) TRAP ürün merdiveni bantlarına karşılık gelen jel çizgi bölgelerinin sinyalleri ölçüldü. Takiben internal standartın(S-IC) ısı ile müdahale edilmeyen ve TSR8 kantitasyon kontrol( $c_R$ ) sinyalleri ölçüldü. Telomeraz ürün miktarı her örnek için tanımlanan formül ile kantite edildi.(Şekil IV)

$$\text{TPG(unite)} = \frac{(x-x_0) / c}{(r-r_0) / c_R} \times 100$$



Şekil IV Telomeraz aktivitesi kantitasyon eğrisi

Tanımlanan her ünite bir TPG'ye (Total işlenen ürün) eşittir. Bir TPG ise 10 dakika içerisinde 30° inkübasyonda en az 4 telomerik tekrarın telomeraz tarafından

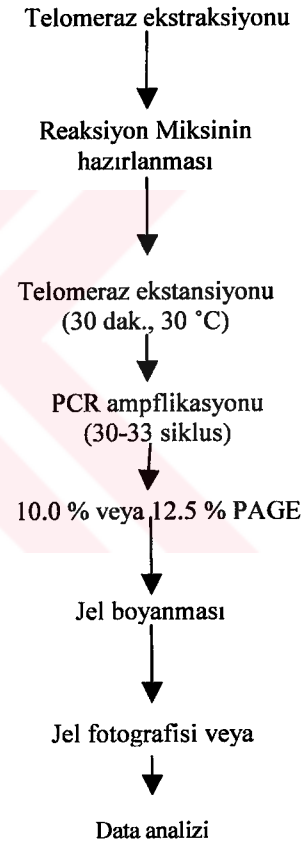


eklenmesi şeklinde TS primerlerinin sayısını ifade etmektedir. İncelemede yaklaşık 30-10,000 kontrol hücrenin telomeraz aktivitesine karşılık gelen 1-300 TPG'de lineer bir ranj mevcuttur.(Şekil V)

Eldeki dotalar Windows Excell programı ile bilgisayara girilmiştir. Çalışmanın istatistiksel incelemeleri SPSS (SPSS for Windows, USA) programı ile yapılmıştır. İstatistiksel incelemede telomeraz dağılımı incelenmiş ve Mann-Whitney, Kruskal-Wallis ve çoklu karşılaştırım testleri(85) kullanılmıştır.

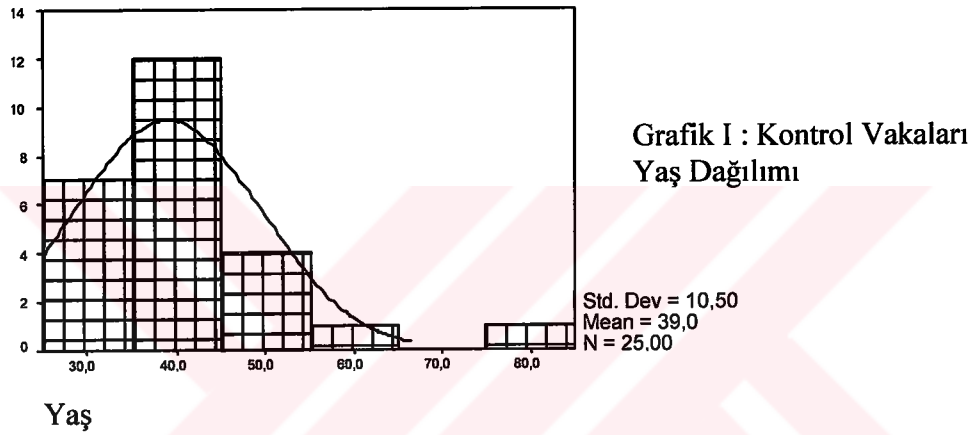
<u>Kit İçeriği:</u>	<u>Saklama Durumu</u>
-1x CHAPS lizis Buffer (8200 µl) 10 mM Tris-HCL, pH 7.5 1 mM MgCl <sub>2</sub> 1 mM EGTA 0.1 mM Benzamidin 5 mM β-mercaptoethanol 0.5% CHAPS 10% Glycerol	-25 ila +8°C
-10x TRAP Reaksiyon Buffer (560 µl) 200 mM Tris-HCL, pH 8.3 15 mM MgCl <sub>2</sub> 630 mM KCL 0.5% Tween 20 10 mM EGTA	-15 ila -25°C
-50x dNTP Mix (112 µl) 2.5 mM herbiri dATP, dTTP, dGTP ve dCTP	-15 ila -25°C
-TS Primer (112 µl)	-15 ila -25°C
-Primer Mix (112 µl) RP primer K1 primer TSK1 Template	-15 ila -25°C
-PCR-Grade Water-proteaz, DNAaz ve RNAaz-free; deionize (8200 µl)	-25 ila +8°C
-TSR8* (control Template) (32 µl) 0.1 amole/ µl TSR8 template	-15 ila -25°C
-Kontrol hücre pelleti Telomeraz pozitif hücreler (10 <sup>6</sup> hücre)	-75 ila -85°C

Şekil V Non-İzotopik Tarama



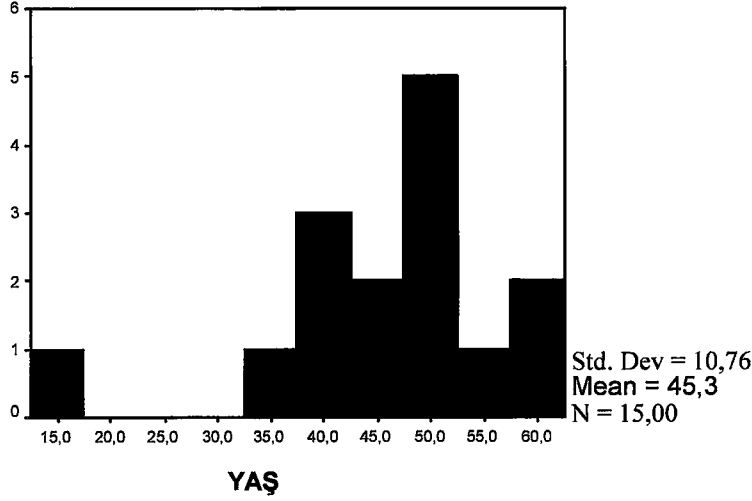
#### D/ BULGULAR:

Çalışma 2000-2002 yılları arasında toplam 40 hasta içermektedir. Hastalardan 15'i second-look cerrahi yapılan over kanseri ve 25'i benign jinekolojik hastalığı olan kontrol hastalarından oluşmaktadır. Kontrol grubunda 25 hasta incelenmiştir. Bu hastaların ortalama yaşı  $39.04 \pm 10.50$  (Ranj 25-75) olarak hesaplanmıştır. Over kanserli (15 hasta) olguların yaş ortalaması  $45.33 \pm 10.76$  olarak hesaplanmıştır. Her iki grup tanımlayıcı karakterler açısından incelendiğinde yaş over kanserli olgularda istatistiksel anlamlı olarak daha yüksek bulunmuş, bu over kanser olgularındaki beklenen insidans yaş ranjının daha yüksek olmasına bağlanmıştır.(Grafik I, II)



Kontrol olgularında yatış tanıları incelendiğinde % 40'ında (10 hasta) Myoma Uteri, % 16'sında tüp ligasyon istemi (4 hasta), olguların birinde benign dermoid kist olmak üzere % 12'sinde (3 hasta) ovaryen kist, % 8'inde (2 hasta) endometriozis, % 8'inde (2 hasta) sekonder infertilite, % 4'ünde (1 hasta) primer infertilite, % 4'ünde (1 hasta) tedaviye dirençli disfonksiyonel uterin kanama, % 4'ünde (1 hasta) atipik endometrial hiperplazi, % 4'ünde (1 hasta) adneksiyel kitle tanıları gözlenmiştir. Kontrol grubu hastalarının ortalama gebelik sayıları  $2.68 \pm 2.47$ , parite sayısı  $1.80 \pm 2.08$ , abortus sayısı  $0.20 \pm 0.81$  ve dilatasyon-küretaj sayıları  $0.56 \pm 0.96$  olarak obstetrik anamnezlerinden hesaplanmıştır. Bu grupta ortalama yaşayan çocuk sayısı  $1.84 \pm 2.09$  olarak tespit edilmiş, bazı hastalar nullipar iken maksimum 10 parite bir hastada gözlenmiştir.(Tablo IV)

Grafik II Over Kanserli olguların yaş dağılımı



Kontrol grubundaki vakalardan telomeraz için inceleme örnekleri laparotomi ve laparoskopji esnasında alınmıştır. Bu vakalar daha önce bahsedildiği gibi benign jinekolojik tanılar nedeniyle opere olan hastalardan seçilmiştir. Hastaların detaylı anamnezleri esnasındaki bilgiler incelenmiştir. Bu hastalara uygulanan operasyonların % 56'sı (14 hasta) endoskopik (laparoskopik) olarak , % 44'ü (11 hasta) ise laparotomik olarak uygulanmıştır.(Şekil VI) İncelenen hastaların anamnezinde sistemik hastalık sorgulanmış ve hastaların % 32'sinde (8 hasta) değişik etyolojideki sistemik hastalık varlığı tespit edilmiştir. Sistemik hastalıklar incelendiğinde kontrol grubunda 1 hastada (% 4) gastrik ülser, 1 hastada (% 4) hipertroidi, 1 hastada (% 4) inguinal herni, 1 hastada (% 12) hipertansiyon, 1 hastada (% 4) koloesitiazis ve hipertansiyon ve 1 hastada (% 4) mitral yetmezlik tespit edilmiştir. Ancak tespit edilen hiçbir sistemik hastalık telomeraz tayininde bir karışıklığa neden olabilecek etyoloji içermemektedir. Sistemik hastalık varlığı kontrol grubunda yaş bağımlı olduğu için yaş ile karşılaştırılmıştır.(Şekil 3) Jinekolojik anamnezde ise hastaların % 76'sında (19 hasta) düzenli menstrüel sikluslar varken vakaların % 16'sında (4 hasta) çoğunluğunu menometrorajinin oluşturduğu düzensiz menstrüel patternler ve % 8'inde (2 hasta) ise menapoz hali mevcuttu.

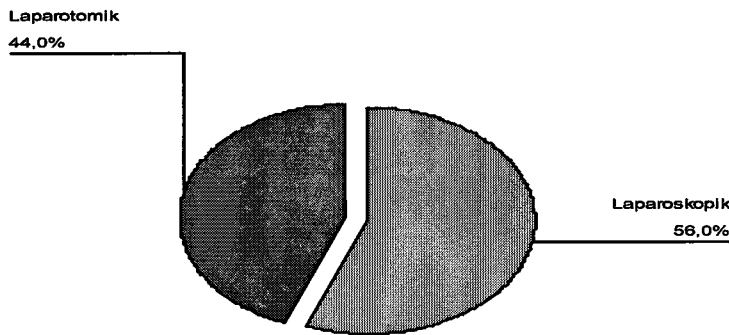
Vakalarda ailesel kanser hikayesi incelenmiş ve kontrol grubunda % 28 (7 hasta) vakada hikayede tespit edilmiştir. Ailesel kanser hikayesi kontrol grubunda incelendiğinde yaş ile ilişkisi Şekil 4'de tanımlanmıştır. Bu iki grafiğe bağlı olarak incelenen vakalarda ailesel kanser hikayesinde ve sistemik hastalık insidansında olağan olarak yaş ile bir artış görülmektedir.(Grafik III) Vakaların 3'ünde babada sırası ile

larinks, mide ve akciğer karsinomu, bir vakada annede rektum karsinomu, bir vakada teyzede meme karsinomu, bir vakada babannede koledok karsinomu ve bir vakada dedede osteokarsinom ve halada meme karsinomu anamnezde sorgulanmıştır. Bu sayede kontrol vakalarında ailesel kanser sendromuları incelenmiştir.(Grafik IV)

Tablo IV: Kontrol Grubu Tanımlama Tablosu

	N	Minimum	Maksimum	Ortalama	Standart Sapma
<b>YAŞ</b>	25	25,00	75,00	39,0400	10,5019
<b>GEBELİK</b>	25	,00	10,00	2,6800	2,4786
<b>PARİTE</b>	25	,00	10,00	1,8000	2,0817
<b>ABORTUS</b>	25	,00	4,00	,2000	,8165
<b>YAŞAYAN</b>	25	,00	10,00	1,8400	2,0952
<b>D&amp;K</b>	25	,00	4,00	,5600	,9609
Toplam Hasta	25				

Over kanserli hastaların sırası ile gebelik, parite, abortus, yaşayan çocuk ve küretaj sayıları ortalamaları  $3.33 \pm 1.9$ ,  $2.66 \pm 1.79$ ,  $0.26 \pm 0.59$ ,  $2.20 \pm 1.42$  ve  $0.80 \pm 1.26$  olarak saptanmıştır.(Tablo V) Vakaların %20'sinde (3 hasta) laparoskopik yaklaşım kullanılmıştır. Dahil edilen over kanserli hastaların % 86'sında (13 hasta) histolojik tanı biri yüksek grade ve bir vaka borderline olmak üzere seröz papiller adeno karsinom, %6.6'sında (1 hasta) endodermal sinüs tümörü ve %6.6'sında (1 hasta) adenokarsinom (krukenberg tümör) olarak gözlenmiştir. Tanı anında vakaların %86'sı(13 hasta) evre IIIC'de, bir vaka (%6.6) evre IIIA'da ve bir vaka (%6.6) evre IVA'da bulunmaktaydı. Hastaların %53.3'ünde(8 hasta) first-line kemoterapide Paklitaksel-Sisplatin,



Şekil VI: Kontrol Grubundaki İşlem Şekli Yüzdeleri

%33.3'ünde(5 hasta) Paklitaksel-Karboplatin, %6.6'sında(1 hasta) Paklitaksel-Karboplatin-Epirubisin ve %6.6'sında (1 hasta) Vinkristin -Daktinomisin-Siklofosfamid protokolleri kullanılmıştır. Paklitaksel ve platin içerikli protokolleri alan epitelyal over

kanserli vakaların hepsi 6 kür first-line kemoterapi kürlerini ve endodermal sinüs tümörü olan bir vaka 4 kür VAC kemoterapi protokolünü tamamlamıştır. Second-look cerrahi öncesi kanser vakalarının ortalama CA 125 değerleri  $10.67 \pm 14.74$  (ranj 1,72-57.74) olarak hesaplanmıştır. Postoperatif olarak vakaların serum CA 125 değerlerinin ortalaması  $49.57 \pm 110.70$  (ranj 0.89-357) olarak hesaplanmıştır.

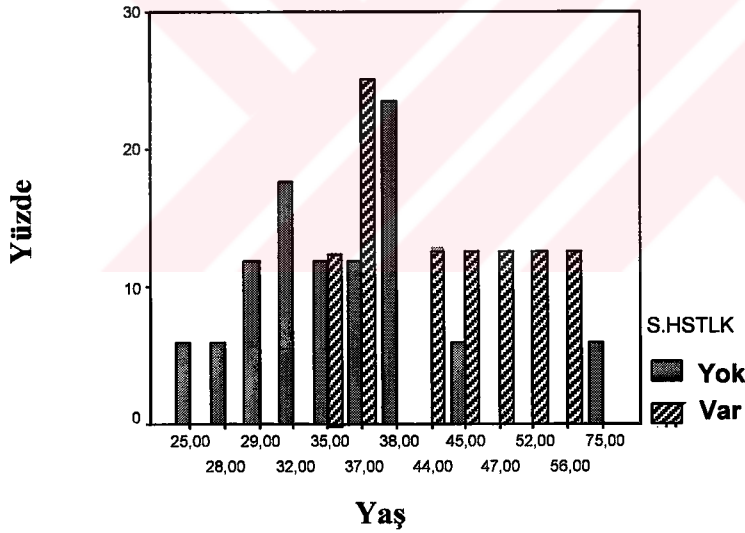
Tablo V: Over kanseri Grubu Tanımlama Tablosu

	N	Minimum	Maksimum	Ortalama	Standart Sapma
YAŞ	15	15,00	59,00	45,3333	10,7615
GEBELİK	15	,00	6,00	2,6667	1,7995
PARİTE	15	,00	2,00	,2667	,5936
ABORTUS	15	,00	5,00	2,2000	1,4243
YAŞAYAN	15	,00	4,00	,8000	1,2649
D&K	15	,00	7,00	3,3333	1,9881
<b>Toplam Hasta</b>	15				

Kanser hastalarının % 46.6'sında (7 hasta) second-look cerrahi pozitif olarak bulunmuştur. Bu pozitif second-look cerrahiye sahip 7 vakanın operasyon öncesi %57.14'ünde tomografide şüpheli lezyon tariflenmekte ancak net olarak rekürrens tanısı görülmemektedir. Ancak second-look pozitif olan % 42.85 (3 hasta) vakada tomografide hiçbir lezyon gözlenmemiş ve negatif sekond-look'a (8 hasta) sahip bir vakada yanlış pozitiflik (% 12.5) saptanmıştır. Ultrasonografi ise pozitif second-look vakalarından sadece bir tanesinde şüpheli bir lezyon tariflemekte ve %14.28'lik bir sensitivite göstermektedir. Second-look cerrahi sırasında alınan patolojik ve sitolojik örneklerde second-look pozitif olan vakaların % 71.42'sinde (5 hasta) patolojik ve % 42.85'inde (3 hasta) sitolojik örnekte rekürrens saptanmıştır. Ancak pozitif second-look vakalarının %28.57'sinde (2 hasta) patolojik ve % 57.14'ünde (4 hasta) sitolojik incelemede tümör gözlenmemiştir. Second-look negatif olan ve rekürrens olmayan olguların % 14.28'inde (1 hasta) patolojik incelemede yanlış pozitiflik mevcuttur.

Second-look sonrası negatif SLL'ye sahip 4 vaka (% 50) konsolidasyon tedavisi almıştır. Konsolidasyon tedavisi alan vakalardan 2'sinde Paklitaksel-Sispaltin (3 kür), birinde oral etoposid ve bir vakada ise hormonal terapi (Megace) kullanılmıştır. Pozitif second-look saptanan vakanın % 57.14'ünde (4 hasta) salgave terapi uygulanmış, %42.85'inde (3 hasta) ise uygulanmamıştır. Salgave terapi alan vakalardan 4 hastanın 3'ünde Topotekan (Hycamptin) ve germ hücre orijinli olan birinde ise Bleomisin-

Etoposid-Sisplatin (BEP) protokolleri uygulanmıştır. Tüm over kanserli vakalar değerlendirildiğinde çalışma sonunda 5 vakada (% 33.3) rekürrens saptanmıştır. Pozitif second-look vakalarının % 57.14'ünde (4 hasta) konsolidasyon ve salvage terapi sonrasında rekürrens varken, % 42.85'inde (3 hasta) gözlenmemiştir. Negatif second-look'a sahip bir hastada (% 14.28) ise rekürrens saptanmıştır. Salvage terapi almayan hastalardan ikisinde böbrek yetmezliğinden dolayı kemoterapi verilmemiştir. Salvage terapi uygulanmayan bu 3 vakadan hepsinde CA 125 değerleri 35 IU/ml altında iken sadece bir vaka rekürrens ile uyumlu kabul edilmiştir. Çalışma sonunda rekürrens ile uyumlu kabul edilen vakaların patolojik inceleme hepsini saptar iken patolojinin pozitif olduğu 1 vakada (% 16.6) rekürrens izlenmemiştir. Sitolojik inceleme ise bu vakaların %40'ını (2 hasta) saptayabilmiş ve sitolojinini pozitif olduğu 3 vakanın birinde ise rekürrens görülmemiştir. Tomografi bulguları incelendiğinde rekürrens olan vakaların sadece 3'ünde(% 60) şüpheli bulgular görülmüş, şüpheli lezyon tariflenen 5 vakanın 2'sinde (% 40) ise sonuçta rekürrens gözlenmemiştir.



Grafik III Yaş ile Sistemik Hastalık Varlığı İlişkisi

Second-look öncesi yapılan ultrasonografi ise bu vakaların sadece 1'ini saptamıştır. Sistemik hastalık ve kemoterapi yan etkileri % 33.3 vakada tanımlanmıştır. Bu vakarın % 40'ında kemoterapi sonrasında karaciğer enzim yüksekliği, % 40'ında kemoterapi sonrasında renal yetmezlik ve bir vakada (% 20) nöropati saptanmıştır. Rekürrens gösteren olguların 2'sinde (% 40) postoperatif ve salvage terapi sonrasında

tomografide lezyon saptanmıştır. Çalışmaya dahil edilen olguların tanı anından çalışma sonuna kadar geçen süre ortalamaları  $12.53 \pm 2.77$  ay olarak hesaplanmış, bu süre sonunda 5 olguda (% 33.3) rekürrens tarif edilmiştir. Rekürrenslili olguların tanı anından rekürrense kadar geçen süre ortalamaları  $13.2 \pm 2.94$  ay olarak hesaplanmış ve çalışma sonunda en erken rekürrens gösteren olgu tanı anından 9 ay sonra saptanmıştır. Bu olgu değerlendirildiğinde pozitif second-look, tomografide şüpheli lezyonlar gözlenmiş ve first-line sonrası 3 kür topotekan aldığı saptanmıştır. Çalışmanın tek germ hücreli hastasında SLL öncesi 56 olan AFP düzeyleri, pozitif SLL sonrasında uygulanan 4 kür BEP protokolü sonrasında 1.72 olarak gözlenmiştir.

Telomeraz aktiviteleri değerlendirildiğinde telomeraz aktivitelerinin dağılımlarının homojen olmadığı gözlenmiştir. Over kanserli olguların ve kontrol vakalarının ortalama, ortanca telomeraz aktiviteleri sırası ile  $54.65 \pm 69.05$ , 20.49 (ranj 0-212.14) ve  $27.65 \pm 32.49$ , 22.15 (ranj 0-135.15) olarak hesaplanmıştır.(Grafik V) Bu iki grup arasında anlamlı bir istatistiksel fark gözlenmemiştir.( $p > 0.05$ ) Rekürrens olgularının telomeraz aktiviteleri over kanserli olguların aktiviteleri ile karşılaştırıldığında yine homojen bir dağılım gözlenmemiş, telomeraz aktivitelerinin ortalama, ortanca değerleri incelendiğinde rekürrens ve over kanserli hastaliksız olgularda  $13.05 \pm 5.08$ , 8.43 (ranj 8.43-20.49) ve  $75.46 \pm 77.22$ , 57.08 (ranj 0-212.14) değerleri hesaplanmıştır. Rekürrens olguları ile hastaliksız over kanserli olgular yada kontrol grubu arasında telomeraz aktiviteleri açısından bir fark bulunamamıştır.( $p > 0.05$ )

Tablo VI Hastaliksız Over kanserli Olgular ile Diğer grupların Telomeraz Aktivitelerinin Karşılaştırılması

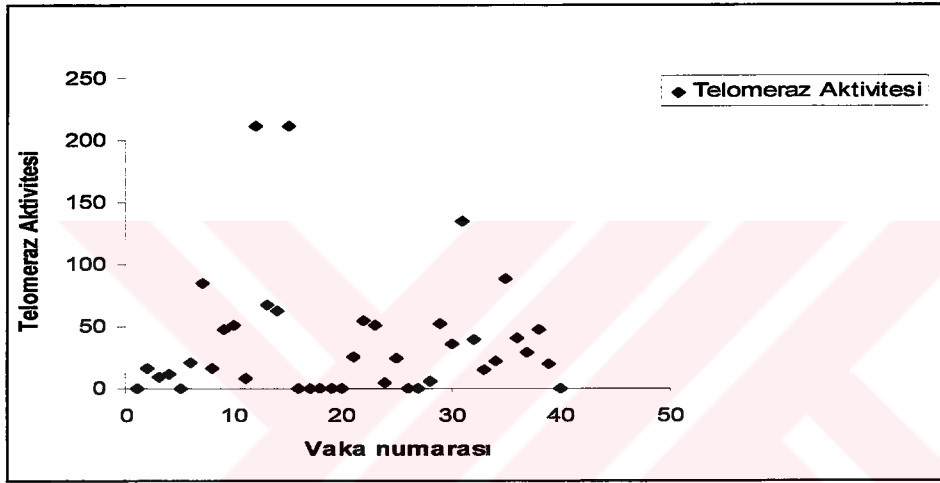
X Hastaliksız over kanseri olguları	Telomeraz Aktiviteleri			
	Ortalama	Ortanca	Ranj	P
Rekürrens olguları	$13.05 \pm 5.08$ U	8.43 U	8.43-20.49 U	$P > 0.05$
Kontrol grubu	$27.65 \pm 32.49$ U	22.15 U	0-135.15 U	$p = 0.022$

Telomeraz aktivitesi ile tomografi, ultrasonografi ve SLL sonuçları incelendiğinde yine bir ilişki tarif edilememiştir.( $p > 0.05$ ) Ancak telomeraz aktivitesi ile patolojik ve sitolojik incelemeler arasında anlamlı doğru bir korelasyon mevcuttur.( $p < 0.05$ ) Over kanserli olgularda second-look tarihleri ile telomeraz aktivitesi çalışılma tarihleri

arasındaki ilişki araştırılmış ancak istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. ( $r=0.273$ ), ( $p>0.05$ ), (Grafik VI)

Kontrol grubunda ailesel kanser hikayesi ile telomeraz aktivitesi karşılaştırıldığında aile öyküsü olan ve olmayan vakalarda telomeraz aktivitesinin ortalama, ortanca değerleri sırası ile  $31.89\pm 32.49$ ,  $19.28$  (ranj 0-88.64) ve  $26.01\pm 33.28$ ,  $23.09$  (ranj 0-135.15) hesaplanmıştır. Ailesel kanser olguları ile hikayesi olmayan grup arasında telomeraz aktiviteleri açısından istatistiksel anlamlı bir fark mevcut değildir. ( $p>0.05$ )

Grafik V Vakalara göre Telomeraz aktivitesi



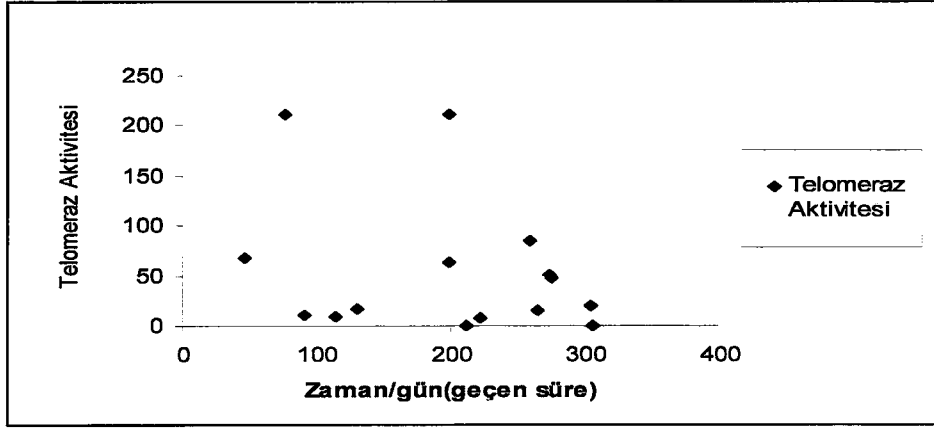
Not: İlk 15 vaka over kanserli olgulardır.

Telomeraz aktiviteleri rekürrens olan ve hastalısız over kanser olgularda, kontrol grubunda çoklu değişken ile incelendiğinde sırasıyla telomeraz aktivitelerinin ortalama, ortanca değerleri  $13.05\pm 5.08$ ,  $8.43$  (ranj 8.43-20.49) ve  $75.46\pm 77.22$ ,  $57.08$  (ranj 0-212.14),  $27.65\pm 32.49$ ,  $22.15$  (ranj 0-135.15) gözlenmiştir. (Tablo VI) Bu gruplara arasında bir değerlendirme yapıldığında yine telomeraz aktivitesinin homojen bir dağılım göstermemesinden dolayı anlamlı bir istatistiksel ilişki bulunamamış ancak hastalısız over kanserleri ile kontrol grubunda sınırda bir fark gözlenmiştir. ( $p=0.056$ ) Homojen bir telomeraz dağılımı için kontrol grubunda (2 hasta, vaka 24 ve 29) olgular arasında yüksek telomeraz aktivitesi gösteren vakalar çalışma dışında bırakıldığında Kruskal-Wallis ANOVA ve çoklu karşılaştırım testi ile hastalısız over kanserli ve kontrol grupları arasında istatistiksel anlamlı bir fark hastalısız over kanserli grupta daha yüksek telomeraz aktiviteleri olmak koşulu ile gözlenmiştir. ( $p=0.022$ ) Ancak rekürrens olguları ile kontrol



vakaları( $p=0.066$ ) ve hastaliksız over kanserli grup arasında( $p=0.792$ ) anlamlı bir istatistiksel fark yoktur.

Grafik VI Örnekleme Zamanı ve Telomeraz Aktivitesi



Telomeraz aktivitesi ile örneklemin yapıldığı operasyon şekli (L/T yada L/S) arasındaki ilişki incelendiğinde hem kontrol grubunda ve hemde over kanserli olgularda anlamlı bir fark gözlenmemiştir.( $p>0.05$ ) Ortalama ile ortanca telomeraz aktivitesi laparotomi ve laparoskopik işlem yapılan vakalarda sırasıyla; kontrol grubunda  $26.21\pm 27.65$ ,  $25.02$  (ranj 0-88.64) ve  $29.49\pm 39.16$ ,  $19.28$  (ranj 0-135.15); over kanserli olgularda  $91.79\pm 108.91$ ,  $63.25$  (ranj 0-212.14) ve  $45.37\pm 58.67$ ,  $18.63$  (ranj 0-211.37) olarak hesaplanmıştır.

Over kanserli olgularda yüzey epitel hücre kökenli kanser vakalarında Paklitaksel-Sisplatin ve Paklitaksel-Karboplatin first-line kemoterapi rejimleri karşılaştırıldığında ortalama ve ortanca telomeraz aktiviteleri sırasıyla bu iki grupta  $51.98\pm 68.74$ ,  $18.63$  (ranj 8.43-212.14) ve  $79.00\pm 79.97$ ,  $50.91$  (ranj 0-211.37) olarak hesaplanmıştır. Telomeraz aktivitesi ile bu kemoterapi rejimleri arasında olası bir istatistiksel ilişki incelenmiş ancak her iki grup arasında herhangi bir fark gösterilememiştir.( $p>0.05$ )

## **E/ TARTIŞMA:**

Over kanseri kadınlarda gözlenen tüm kanserlerin % 5'i ve tüm dişi genital trakt kanserlerinin % 25'ini oluşturmakta, olguların yaklaşık % 75'i tanı anında evre III ve IV'te bulunmakta ve günümüzde kadınlarda genital kanserlere bağlı görülen ölümlerin yaklaşık % 50'si gibi yüksek bir oranını oluşturmaktadır. Multiajan-sisplatin bazlı kemoterapilerin ve yeni tedavi modalitelerinin (salvage terapi, intraperitoneal kemoterapi) keşfine rağmen halen yüz güldürücü sonuçlar elde edilememiş ve halen beş yıllık sağkalım oranları tüm hastalarda yaklaşık % 40 oranlarında gözlenmektedir. Olguların çok az bir kısmında kür oranlarına ulaşmakta ve yalnız % 12'si beş yıllık hastalısız sağkalım göstermektedir. Böyle düşük sağkalım oranlarından dolayı over kanserinde günümüzdeki hedef erken rekürrenslerin veya relapsların tespiti ve buna yönelik tedavi protokolleri olmalıdır. Günümüzde erken rekürrensin tespiti için fizik muayene, CA 125 tayini, transvajinal ultrasonografi, bilgisayarlı tomografi gibi sofistike görüntüleme yöntemleri ve second-look operasyonu uygulanmaktadır.

Ancak rekürrens varlığının tespiti fizik muayenede çok zordur ve halen bir over kanserinin erken tespiti için 10000 fizik muayene gerekmektedir. Sonografinin erken tanıdaki yararlığını tespit etmek için yapılan populasyon bazlı çalışmalarda 14 evre I over kanseri vakası için 1050 operasyon gerekmiştir. Ailesel kanser hikayesi olan vakalarda da durum pek farklı değildir. Günümüzde erken tanıdaki yeri bile sınırlı olan ultrasonografinin erken rekürrens veya relapsın tespitindeki yeri ise çok sınırlıdır.

Ca 125 cerrahi olarak gösterilmiş over kanserli olguların % 82'sinde saptanmaktadır. Ancak daha öncede bahsedildiği gibi yüksek değerler over kanseri dışında birçok durumda da gözlenmektedir.(Tablo VII) Birkaç santimetrelik implantlar abdominal kavitenin herhangi, bir yerine implante olabilmekte ve fiziksel incelemede gözden kaçabilmektedir.

Bilgisayarlı tomografi gibi sofistike tekniklerin over kanserinde kullanılması ile de elde edilen sonuçlar da halen sınırlıdır (% 20). Pozitif emisyon tomografisi ile primer kemoterapi sonrasında komplet klinik cevabı olan ileri evre ovaryen kanserli hastalarda SLL öncesinde incelemeleri yapılmıştır. Normal CA 125 değerleri olan hastalarda yapılan incelemelerde ileri teknikler kullanılmasıyla hastaların % 59'unda persistan hastalık tespit edilmiş, testin sensitivitesi % 10 ve spesifitesi % 42 olarak hesaplanmıştır.

Bu sonuçlara göre teknik imkanların zorlanmasına rağmen SLL olmaksızın sofistike görüntüleme yöntemleri halen küçük boyutlu persistan hastalık tespiti son derece zordur ve ek tanı yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır(84).

Tablo VII CA 125 yüksekliği gözlenen durumlar:

- Sağlıklı hastalar %1
- Endometriozis ve kistleri
- Pelvik inflamatuvar hastalık
- Leiomyomalar
- Adenomyozis
- Ektopik gebelik
- Ovaryen kistadenomlar
- Karaciğer hastalıkları
- Pankreatit
- Peritonit
- Renal yetmezlik
- Gebelik, Luteal faz

Epitelyal over kanseri olgularında CA 125 artış ve azalmaları hastalığın progresyonu veya regresyonu ile % 90 oranında korelasyon göstermektedir. CA 125 yükseklikliği gösteren olguların % 85'inde hastalığın rekürrensi gösterilmiş ve 1-14 ay içinde rekürrens saptanmıştır. CA 125 düzeyleri 35 IU/ml düzeyi altına inen olgularda negatif second-look ile yüksek korelasyon tarif edilmiş ve hastaların hemen hepsinde tümör nodülü 1 cm altında gözlenmiştir. Persiste eden CA 125 yükseklikleri hastalığın persistansı ile ilgili bulunmuştur.

Ancak anormal değerler dışında normal CA 125 düzeyleri second-look öncesi sınırlı öneme sahiptir. Normal CA 125 ve normal fizik muayene bulguları olan % 50 hastada persistan hastalık mevcuttur. Rezidüel hastalığın <2 cm olan vakaların nadir bir kısmında CA 125 yüksekliği tespit edilmiştir. Her ne kadar CA 125 yüksekliği cerrahi öncesinde tümör varlığını gösterebilir rezidüel hastalığın büyüklüğünü belirtmemektedir. Bu sonuçlara göre özellikle vakaların neredeyse yarısını oluşturan mikroskopik hastalık ve negatif second-look olgularından yüksek rekürrens riski olan grupta CA 125'in değeri son derece sınırlıdır.

Günümüzde kliniğimizde ve bir çok merkezde second-look cerrahi prosedürler (1) Lokalize hastalığına sahip ve evrelemenin tam yapılmadığı hastalarda yeniden optimal evrelemenin yapılması (2) Uygulanan kemoterapi protokolünün etkinliğinin tespiti için (3) Klinik olarak kür kabul edilip kemoterapinin kesilebileceği popülasyonun araştırılması için rutin olarak uygulanmaktadır. Son endikasyon günümüzde geniş olarak kullanım görmektedir.(Tablo II) Bu invaziv takip protokollerinin tüm ve semptomsuz sağkalıma yada yaşam kalitesine etkisi konusunda elde yeterli bilgi bulunmamakla

beraber rekürrenslerin erken tespiti sonrasında uygulanan efektif salvage kemoterapi sayesinde % 80 olguda artmış sağkalım sonuçları bildirilmiştir. Sağkalımda prognostik faktör olarak sadece tümörün grade anlamlı bulunmuş ve SLL'nin tüm ve hastaliksız sağkalıma katkısı olmadığı vurgulanmıştır.(82) Over kanserli hastalarda hastaliksız sağkalım ve negatif second-look arasında yüksek bir korelasyon mevcuttur. Ancak negatif SLL sonrasında bile % 50'ye yakın hastada rekürrens geliştiği tarif edilmiştir.

Bilindiği gibi negatif second-look'a sahip hastaların % 40-50'sinde rekürrens 1-10 yıl içerisinde oluşmaktadır. Bu oranlara yakın oranlar çalışmamızda elde edilmiş ve second-look sonrası rekürrens riskini doğrulamıştır. Ancak çalışma izlem süresi yeterli olmadığından sağkalım oranları belirlenememiştir. Bu işlem sayesinde prognoz, kemoterapi etkinliği ve olası sağkalım belirlenebilmek ve çoğu hasta bu bilgiyi istemektedir. Bu alanda intraperitoneal kemoterapi ve biyolojik cevap modifikasyonu ajanlar için hasta grupları belirlenebilmekte, bu sayede salvage terapi tipinin tanımlanması ile sağkalıma katkıda bulunmaktadır. Böylece second-look salvage terapi seçiminde klinisyene büyük katkı sağlamaktadır.

Pozitif bir sağkalım oranı net olarak tanımlanmasada doğru salvage terapi rejimi seçiminin önümüzdeki 10 yıllık süre içinde yararları tartışılmazdır ayrıca birçok otör hastalara bu şansın verilmesi gerekliliği kabul etmektedir. Ayrıca pozitif second-look vakalarında <2 cm ve >2 cm tümör rezidüelsü olan ancak cerrahi olarak rezekte edilmiş hastalarda prognoz daha iyi olduğunu tespit etmiştir. Salvage terapinin seçimi ile %80'e yakın hasta popülasyonunda efektif tedavi gerçekleştirilebilmektedir. Ayrıca % 20 oranında gözlenen (negatif second-look olguları) ve mikroskopik hastalığa sahip bu vakalarda konsolidasyon tedavisinden oldukça fayda görmektedir.

Ökaryotlarda telomerik DNA bölgeleri basit devamlı tekrar eden sekanslar şeklinde kromozom son uçlarında uzanmaktadır. Bu telomerik tekrarlar gerçek DNA sekansları için kromozom satabilitesinde ve komplet replikasyonda gereklidir. Genellikle bu kısa yapılar, G bazı zengin tekrar eden sekanslar sarmalın 5'ucundan 3'ucuna doğru kromozomun distal sonunda yer almaktadır.(5) Bir ribonükleoprotein kompleksi olan telomeraz özel bir sellüler reverse transkriptaz olup, kromozomal DNA sonunda kromozomal devamlılığın sağlayarak telomerik tekrarları eklenmekte ve inkomplet

replikasyonu engellemektedir. Ökaryotların hücre ekstraktlarında telomeraz aktivitelerinin geniş bir yelpazede farklılıklar gösterdiği ortaya konulmuştur.(5,6)

Telomeraz ekspresyonu tüm somatik hücrelerin erken gelişme dönemlerinde gözlenirken giderek baskılanmaktadır. Bu enzimin ekspresyonu ve aktivitesi hemen hemen tüm malign transformasyonlarda ve geç evre kanser hücresinde upregülasyon göstermektedir. Lineer DNA sarmalı geleneksel DNA polimeraz ile tamamen replike edilemez. Birçok ökaryot türünde son uç replikasyon problemi olarak adlandırılan bu problem telomerazın telomerik DNA bölümlerini tamiri ile çözülmektedir, bu işlem terminal delesyonları engellemekten ziyade tamamlama ile olmaktadır.(14) Bu yüzden telomeraz inaktivasyonu yada diğer telomeraz bozuklukları telomer olabilirliğinin kaybına neden olarak immortal hücrelere veya belirli hücre bölünmesinden önce hücre ölümüne yada siklus arrestine neden olmaktadır.(15) Uzun dönem yaşam gösteren somatik hücrelerdeki antagonist pleotropik modellerde hücre ölümü tümör supresyon mekanizması gibi görev yaparak telomerazın sınırlı ekspresyonu erken evrede kanser gelişme olasılığını azaltmaktadır.

Birçok kanserde ve elde edilmiş hücre dizisinde progresif bölünmeye karşı telomeraz up-regülasyonu veya aktivasyonu telomer kaybı ile yarışarak telomerlerin stabilizasyonunu ve devamlı hücre büyümesini sağlamaya çalışmaktadır.(46) Hücrelerin belirsiz, oran-limitsiz ve kanser progresyonu gösteren büyümesi bir bozukluk olarak düşünüldükten sonra telomeraz aktivitesi normal hücrelerin, immortal hücrelerin ve bazı tümör hücrelerinin olduğu panellerde telomeraz aktivitesi farklı belirlenmiştir.(47) Bu bulgular ışığında telomeraz ve birçok kanser tipi arasındaki ilişkiyi incelemek için ve yakın zamanda ticari kitlerin tanımlanması ile birçok bilim adamı enzimin güvenilir tespitinde geniş yelpazedeki tümörlerde değişik evrede bağımsız bir tümör markırı ve tanı testi olarak telomerazın yeri için çalışmıştır.(48) Yakın zamanda tümör biopsileri yanında sedimente idrar, oral yıkama, fırçalama, kan, ince iğne aspirasyon mayi ve frozen section gibi minimal invaziv yada non-invaziv yöntemler ile telomeraz incelemeleri uygulanmıştır (49).

Shay 2000'e yakın insan primer tümöründe % 85'inde pozitif sonuç elde etmiş ve 196 normal hücreden sadece bir tanesinde pozitif sonuç gözlenmiştir. Preinvaziv tümörlerin % 30'unda ve malign spesimene bitişik sahadan alınan normal hücrelerin

%11'inde pozitif sonuç saptanmıştır(Tablo I),(51). Bu bilgiler birçok tümörün telomeraz aktivitesi up-regülasyonunu ve reaktivasyonunu sağlaması konusunda çok az kuşku bırakmaktadır. Telomerazın spesifik aktivitesi ilk olarak 1994 yılında over kanserli olgularda gösterilmiştir.(59) Spesifik olarak telomeraz aktivitesi jinekolojik malignitelerin yaklaşık % 95'inde ve ovaryan kanserlerin % 73.3-88'inde gösterilmiştir.(60) Bu sonuçlar gastrik kanser (% 85), meme kanseri (% 93), prostat kanseri (% 84), hepatosellüler kanser (% 80-85) ve akciğer kanseri (% 80) ile karşılaştırılabilir oranlardadır.

Birçok tümörün heterojen olması ve bütün alınan örnekler yeterli hücre içermeyişinden dolayı telomeraz aktivitesi yetersiz belirlenebilmektedir. Bazı tümörlerde ise maya hücrelerinde ve özet olarak insan fibroblastlarında(47) olduğu gibi telomerler olabilirliği telomeraz dışındaki mekanizmalar sayesinde de korunmaktadır. Bazı hücreler ise immortal safhadan önceki mortal safhada alınmış olabilirler. Ayrıca telomerik tekrarlayan ampfilikasyon protokol incelemesi (TRAP assay) oligonükleotitlerin primerinin elongasyonu ve ürünlerin tespit edildiği iki aşamadan herhangi birinde bir patoloji oluşabilir. Bu doku ekstraktlarının aşamadan bağımsız olarak inhibitörleri içerebileceği de gösterilmiştir.(47,50) Bu sayılan nedenlerden dolayı bazı küçük primer insan tümörlerinde telomeraz aktivitesi tespit edilemiyor olabilir. Ayrıca bazı telomeraz yeteneği olan primer tümörler yavaş siklusa sahip oldukları veya indifferansiye hale geldikleri ve sessiz oldukları için telomeraz aktivitesi göstermiyor olabilirler. Sonuçta büyük bir orandaki tümörlerde telomeraz aktivitesi (%88-100) tespit edilmektedir. Çalışmamızda da bazı kanser olgularındaki telomeraz aktivitesinin düşük bulunmasında yeterli hücre ekstrakte edilememesi, telomeraz dışı mekanizmaların rol oynaması, immortal hücre gruplarının örneklenmesi yada inhibitör varlıkları rol oynayabileceği düşünülmüştür.

Nöroblastomla(49), meminjio(54), akut myeloid lösemiyle(55), meme kanseri(50), gastrointestinal kanser(56) ve ovaryen kanser(70) ile ilgili çalışmalarda yüksek telomeraz aktivitelerinin kötü prognozla ilgili olduğu ispatlanmıştır. Benzer olarak evre IV nöroblastomlu birkaç vakada telomeraz aktivitesi zayıf olarak saptanmış ve bu olgular spontan regresyon göstermiştir.(49) Ovaryen kanserde prognoz ile telomeraz ilişkisinin belirlenmesi için çalışmamızdaki sınırlı izlem süresi yeterli değildir.

Sağkalım ve prognoz ilişkisinin belirlenebilmesi için izlem süresinin daha uzun olduğu çalışmalar gereklidir.

Birçok çalışmada telomeraz aktivitesi tümör bitişindeki dokularda da tespit edilmiştir.(47,49,51,52,56) Bu telomeraz aktivitesinin tümöral dokular çıkartıldıktan sonra bile onkojenik potansiyeli gösterdiğini düşündürmektedir. Rezidüel bir telomeraz aktivitesi bize küçük bir odağı gösterebilir ve relapsın saptanmasında yardımcı olabileceği ortaya atılmıştır. Ayrıca bu inceleme bize kemoterapi kürleri veya anti-telomeraz terapisi gibi diğer kanser terapileri takibinde faydalı olabileceği ispatlanarak kanser sınırlandırılmasında ve rekürrenste yardımcı olabilecektir. Bu aktivite tespiti ile ayrıca diğer hücrelerden malign hücreler ayrılabilir(kanserli hastalarda lenfoid dokulardaki inflamasyon hücreleri).

Bu çalışmada rekürrens gösteren olgularda telomeraz aktivitesi diğer gruplardan istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır, çalışmanın kısıtlı sayıdaki hasta grubundan dolayı rekürrens olgularında telomerazın yetersiz olduğu söylenemez ancak elbetteki bu çalışma bu konudaki yegane yürütülen çalışma olduğundan günümüzde second-look olgularındaki telomeraz aktivitesinin rekürrens veya relaps belirlemedeki yeri sınırlı görünmektedir. Sonuçlara rağmen telomeraz aktivitesinin yüksek görüldüğü hastaliksız over kanseri olgularında telomeraz inhibitörlerinin kemoterapötik rejimlere adjuvan yada alternatif olarak sunumu bir olasılıktır. Birçok primer insan tümöründe telomeraz inhibitörleri üzerine çalışmalar devam etmektedir. Ayrıca yüksek telomeraz aktivitesine sahip rekürrens olgularında diğer çalışmalar ışığında ilaç rezistansından da bahsedilebilir.

Yakın çalışmalarda ikinci germinal merkezlerdeki lenfositlerden kaynaklanan histolojik olarak negatif lenf nodlarında dahi telomeraz aktivitesi gösterilsede, malign lenf nodları incelendiğinde bu düzeyden yaklaşık 6 kat fazla telomeraz aktivitesi tespit edilmiştir.(73) Telomerazın RNA yapı taşının klonlanması ile parafinde malign ve benign lenf nodu hibridizasyonu başarılmıştır.(58) Metastaz olan lenf nodlarında insan telomeraz RNA'sı tümör hücrelerinde yüksek oranda ve germinal merkezlerde düşük olarak tespit edilmiş ancak sadece nadir veya zayıf olarak parafoliküler, medüller veya sinuzoidal bölgelerde saptanmıştır. Bu bulgular mikrometastazın gösterilmesinde de insan telomerazın rolü ispatlayabilir. Çalışmamızda relapsların belirlenememesinden dolayı

günümüzde second-look cerrahide telomerazın yeri sınırlı olsada primer debulking cerrahide mikrometastazların araştırılmasında patolojiyle telomeraz aktivitesinin sinerjik bir sensitivite artışına neden olabileceği olasılığı kuvvetlidir.

Jinekolojik kanserlerde preinvaziv lezyonlara nazaran telomeraz aktivitesi özellikle kanser vakalarında daha yüksek bulunmuştur.(65) Yapılan bir çok çalışmada ovaryen karsinomda telomeraz aktivitesi % 73.3-88 arasında gösterilmiştir.(Tablo II),(59-63,66) Bu bulgularda telomeraz aktivitesinin ovaryen karsinogeneziste muhtemel rolünü vurgulamıştır. İlginç bir not olarak telomeraz aktivitesi histolojik olarak subtiplerde karşılaştırıldığında berrak hücreli (clearcell) karsinomda özellikle endometriod adenokarsinoma göre telomeraz aktivitesi düşük bulunmuştur.(65) Halen over kanserinde subtiplerin telomeraz aktivitesi konusunda elde yeterli bilgi bulunmamaktadır, biz bu bilgilerin over kanserinin tedavisi, tanısı ve prognozu hakkında oldukça güncel olanaklar sağlayacağını düşünmekteyiz. Bu sayede kemoterapötiklere subtiplerin cevapları incelenerek belli histolojik tanılarda farklı ve güncel tedavi rejimleri ortaya çıkabilecektir.

Telomeraz pozitif düşük potansiyelli tümörlerde olası invaziv karsinom gelişme riski bu olgularda düşünülmüştür. Benign veya düşük potansiyelli tümörlerin hiçbirinde yüksek telomeraz aktivitesi tespit edilmemiştir ancak ovaryen invaziv karsinomların yaklaşık % 18'inde yüksek % 57'sinde ise orta düzeyde telomeraz aktivitesi gözlenmiştir (toplam % 75) ve normal dokular ve kistadenom ile invaziv over kanserli olgular arasında telomeraz aktivitesi açısından istatistiksel bir fark vardır ( $P = 0.001$ ,  $\chi^2(2)$ ).(62) Bu çalışmaların sonuçları ile bizim çalışmamız arasında kontrol grubundaki benign olguların telomeraz aktivitesi sonuçlarında bir korelasyon görülmektedir. Bu sonuçta benign jinekolojik hastalıklarda da telomeraz aktivitesinin birçok soruyu cevaplayacağını göstermektedir. Özellikle mitoz oranının yüksek olduğu dermoid kist, endometriosis, myoma uteri gibi benign tümöral oluşumlarda orta ve yüksek düzeydeki telomeraz aktiviteleri bu konuda daha ne kadar başlangıçta olduğumuzu göstermektedir.

Telomeraz aktivitesi açısından rekürrens olguları, hastalısız kanser vakaları ve kontrol grubu arasında herhangi bir fark gözlenmesede diğer çalışmaları doğrular nitelikte kontrol grubu ve hastalısız kanser olguları arasında telomeraz yüksekliği gösteren 2 kontrol vakası çalışma çıkarıldığında istatistiksel olarak kanser vakalarının telomeraz aktivitesi yüksekliği açısından bir fark çalışmamızda da görülmektedir. Bu iki



kontrol olgusundan ilki overyan kist nedeniyle laparoskopik kist ekstripsasyonu yapılan 25 yaşında, 1 parite ve çocuğa sahip sistemik hastalığı yada ailesel kanser hikayesi olmayan bir vakadır. Patolojik inceleme sonunda bu vakada endometrioma tanısı konulmuştur. İkinci vaka ise myoma uteri ön tanısı ile laparotomik histerektomi ve bilateral ooferektomi yapılan 47 yaşında, 2 gravida, 2 parite ve 3 yaşayan çocuğu bulunan bir myoma uteri vakasıdır. Bu olgunun hipertansiyonu ve kolelithiazisi bulunmakta, ailesinde ise babada larinks karsinomu anamnezde alınmaktadır. İlk ve ikinci vakada telomeraz aktivitesi sırası ile 135.15 U ve 88.64 U olarak tayin edilmiştir. İkinci vakanın ailesel kanser ve sistemik hastalık hikayesinin bulunması bu vakanın gözlem altında tutulmasını düşündürmektedir. Telomerazın erken bir malignite markırı olduğu bilinmektedir ve biz ilk olgununda ileri tetkik ve gözleminden yanayız. Bu sayede belkide overyan kanser premalign lezyonları hakkında da bilgi sahibi olabiliriz.

Nöroblastoma, prostat kanseri ve bazı hematolojik kanserlerde telomer uzunluğunun klinik önemi ispatlanmıştır. Ovaryen kanserlerin % 60'ında telomer uzunluğunda değişimler gösterilmiştir.(66) Fakat telomer uzunluğunun bir markır olarak ovaryen kanserde kullanılamayacağına belirtildiği raporlar da vardır.(67) Özellikle 100 IU veya fazla telomeraz aktivitesi kanser ile ilgili tespit edilmiş, sensitivite ise % 21 olarak ovaryen kanserde tanımlanmıştır. Evreye göre ovaryen kanserde telomeraz aktivitesi bir artış gösterme eğiliminde olduğu yine tarif edilmiştir.(65) Çalışmamızda telomer uzunluğu incelenmemiştir, fakat biz bu konuda farklı çalışmalar yapılması ve telomeraz inhibitörlerini hedef alan yeni tedavi modalitelerinin incelenmesi gerekliliğine inanmaktayız.

Yukarıda bahsedilen çalışmaların birçoğunda telomeraz aktivitesi evre ile artış göstermiş ve kötü prognozla ilişkili olarak yorumlanmıştır. Özellikle bu prognoz ilişkisi seks-kord stromal tümörlerde gösterilmiş ve bu olguların yüksek rekürrens riski ispatlanmıştır. Seks-kord stromal tümörlerde TRAP inceleme ile % 47 vakada telomeraz aktivitesi saptanmıştır ve hTERT ile telomeraz aktivitesi arasında % 91 oranında korelasyon izlenmiştir. Telomeraz pozitif hastaların % 45'inde hastalıktan dolayı ölüm ve rekürrens gözlenirken telomeraz negatif olguların yalnız % 25'inde izlenmiştir. Bu çalışma ve diğer çalışmalar benzer olarak telomeraz aktivitesinin rekürrensi artırarak ve prognoz kötüleştirdiğini gözler önüne sermektedir.(68) Bizim çalışmamızda evre III ve

IV olgularında telomeraz aktivitesi değerlendirildiği için prognoz ve evre ilişkisi değerlendirilememiştir. Ancak rekürrens ve hastalısız olgular arasında istatistiksel bir fark gözlenmediğinden dolayı çalışma süresinin uzatılması ve sağkalımların belirlenmesinin gerekli olduğunu düşünmekteyiz. Bu sayede prognoz hakkında ve belkide 10 yıllık izlemler ile telomeraz aktivitesi ile rekürrens riski arasında sağlam bir ilişki tariflenebilir.

Ailesel kanser hikayesi olan hastaların ovaryen hücrelerinde ve normal ovaryen hücrelerde telomeraz aktivitesi saptanmamış ancak telomeraz uzunluğu 1 kb daha kısa bulunmuş ve bu hastalarda telomerik kayıp normal hastalara göre üç kat daha fazla olarak tarif edilmiştir. Artmış telomerik instabilite ve azalmış büyüme potansiyelinin ovaryen yüzey epitel hücrelerinde replikatif özelliğin azalmasına yol açtığı ispatlanmış ve genetik anormallikler eşliğinde hızlanmış yaşlanma bu hastalarda malign transformasyona veya herediter over kanserinin erken ortaya çıkmasına yol açıyor olması görüşü ortaya atılmıştır.(69) Ancak çalışmamızda da kontrol grubunda yapılan ailesel kanser hikayesi olan olgularında telomeraz aktivitesinde bir fark gözlenmemiş ve istatistiksel olarak diğer vakalardan farklı değerlendirilmemiştir. Halen artmış telomerik instabilitenin bu hastalarda overyan kanser etyolojisinde rol oynaması olasıdır.

Bazı çalışmalarda hHERT mRNA ve hRT ekspresyonlarının telomeraz aktivitesinde önemli göreve sahip olduklarını ve malignite ile ilişkili olduğunu göstermekte ve telomeraz aktivitesinin diagnostik olarak değeri olduğunu malignite gelişiminde görev üstlendiğini vurgulamaktadır.(63) İnsan telomeraz katalitik subunitinin (hTERT) ekspresyonu ovaryen lezyonlardan sadece ovaryen kanser olgularında görülmektedir. Telomeraz aktivitesi ile hTERT arasında istatistiksel bir korelasyon tanımlanmış ancak diğer subunitlerle bir korelasyon gözlenmemiştir. Bu yüzden insan telomerazında oran-sınırlayıcı olarak enzimatik aktivitede bir belirleyici olarak kabul edilmiştir.(64) Biz bu bilgiler ışığında minimal doku haricinde second-look ve primer debulking cerrahi sırasında alınan patolojik örneklerde hTERT incelemesinin faydalı olacağından ve hücre düzeyinde telomeraz aktivitesinin yüksek olduğu bölgelerin gösterilerek over kanseri yada rekürrens riski etyolojisinde bilgi sahibi olunabileceğini düşünmekteyiz.

Asit mayinde yapılan sitolojik incelemelerin gösterdikleri diagnostik spesitifitenin yanında malignite ile ilişkili asitlerin belirlenmesindeki sensitivite % 40-60 oranında

çeşitli yayınlarda bildirilmiştir. Bu düşük sensitivite ve atipik inflamatuvar hücreler arasındaki morfolojik sitolojideki tanı zorluklarından kaynaklandığı bildirilmektedir. Bu yüzden daha sensitif ve spesifite gösteren alternatif prosedürlerin tanımlanması gerekliliği düşünülmektedir.(71,72)

Sitolojik inceleme ile TRAP assay telomeraz aktivitesi değerlendirilmesinin ovaryen kanserli hastalarda karşılaştırılmış ve ovaryen kanserli hastaların % 88'inde telomeraz aktivitesi saptanmış, sitolojik incelemede ise hastaların sadece % 64'ünde malign hücre gözlenmiştir. Bu iki test arasında malign kriterleri yakalama açısından sensitifitede % 24 oranında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gösterilmiştir (P = .002). Ayrıca telomeraz aktivitesi işlem yapılmamış örneklerde oda sıcaklığında 5 güne kadar saptanmakta ve örnekler bu süre sonunda çok az bir oranda kanser hücresi içerirken 2000-10000 kat oranda normal hücre içermektedir. Bu ve birçok çalışmaya göre telomeraz çalışılması sitolojik incelemeye oranla daha sensitif olarak kanser tanısına imkan sağlamaktadır.(72)

Ayrıca özellikle bir çok vakada second-look sırasında alınan sitolojinin sensitivitesi oldukça düşüktür. SLL pozitif olan vakalarda peritoneal sitolojide malign hücre görülme oranı % 26-40 iken % 74 vakada yanlış-negatif sonuç elde edilmektedir. Bu sonuçlarında gösterdiği gibi peritoneal sitoloji SLL'de yüksek yanlış-negatiflik ile beraberdir. Günümüzde bunun bir nedeni olarak kemoterapinin neden olduğu tarif edilen kapsülasyon gösterilmektedir.(83) Bizim çalışmamızda da sitolojik inceleme (% 14.28) için belirtilen sensitivite ve spesifite değerleri benzerken görüntüleme yöntemleri (%57.14) için tarif edilen değerler yüksek bulunmuştur. Ancak çalışmamızda tüm şüpheli lezyonlar değerlendirilmiş ve bu oranın daha düşük olacağı tahmin edilmiştir. Biz rekürrens olgularında çalışmamızda telomeraz aktivitelerinin 30 U'den daha düşük belirlenmesinin bir nedeni olarak sitolojik inceleminde sensitivitesini düşüren bu kapsülasyon oluşumunun sorumlu olduğunu düşünmekteyiz.

Tseng ve ark. peritoneal asit ve yıkama mayinde telomeraz aktivitesinin ovaryen kanserin erken tespitinde çalıştığı çalışmada peritoneal sitoloji ve telomeraz aktivitesi sensitivite, spesifitesi sırası ile % 96 (26/27), % 100 (20/20) ve % 100 (27/27), % 90 (18/20) tir. Peritoneal sitolojinin % 4.7 gibi bir yanlış negatiflik oranı yanında telomeraz aktivitesinin % 6.9 (2/29)'luk bir yanlış pozitiflik oranı tespit edilmiştir.

Bu bulgular ışığında telomeraz aktivitesi sıradan sitolojik incelemeye ek olarak hem negatif hemde pozitif sitolojik vakalarda yüksek sensitivite ve spesifite ile kullanılabilir ve özellikle rezidüel hastalığın değerlendirildiği second-look laparotomide ciddi faydalar sağlayabilir görüşü ortaya atılmıştır. Bu sayede günümüzdeki geleneksel sitolojik incelemeye ek olarak telomeraz aktivitesinin değerlendirilmesi ile birlikte tanısal ve takip amaçlı olarak telomeraz aktivitesinin değerlendirilmesi second-look operasyonu sırasında rekürrenslerin tespitinde yanlış-negatiflikleri engelleyerek malign hücrelerin belirlenmesinde yararlı olacağı düşünülmüştür.(73) Ancak çalışmamızda rekürrens olgularının belirlenmesinde telomeraz aktivitesi sitolojiden çok fazla üstün bulunmamıştır. Elbetteki sitolojiye ek bir yöntem olarak kullanımını bizde savunmaktayız.

Epitelyal veya lökosit-spesifik antikorlar ile yıkanmış serumlarda epitelyal hücrelerin izole etmesi ve telomeraz aktivitesinin ölçülmesi ile ovaryen tümör hücreleri periferik kanda izole etmede son derece yüksek sensitivite ve spesifite ile yapılabilmektedir. Ayrıca asit mayinden izole edilen disemine yayılım gösteren ovaryen tümör hücrelerinde de telomeraz aktivitesi tanımlanmıştır. Non-invaziv kan testi ovaryen epitelyal hücreleri saptamada sensitif ve spesifik bulunmuş ayrıca dolaşımdaki ovaryen tümör hücrelerinin tanınmasında telomerazın potansiyel bir markır olduğu ispatlanmıştır.(74) Bu çalışma ile daha az invaziv bir yolla bu hücrelerin elde edilebildiği ispatlanmıştır. İleride yapılacak çalışmalarda belkide second-look cerrahi öncesinde rekürrens ve relapslar yada riski yüksek olan olgular bu şekilde görüntüleme yöntemleri ve diğer tanı yöntemleri ile korale edilerek yüksek sensitivite ve spesifitede belirlenebilir.

Ovaryen kanser hücre kültürlerinde telomeraz aktivitesini ve uzunluğunu incelenmiş ve DNA hasarı yaratan ajanlara sensitivitelerini karşılaştırılmıştır. Uzun telomer boyutları sadece sisplatinde istatikselsel bir anlam saptansa da ilaç rezistansı ile ilişkili değerlendirilmiştir. Bu sensitivite/rezistans durumu telomer uzunluğuna bağlı olarak değişmektedir. Ovaryen kanserde kemoterapi sonrasında cevap veren ve vermeyen olgularda telomer uzunluğu arasında bir fark yok iken ve telomeraz aktivitesi cevapsız olguların % 58.6'sında artış göstermiştir.(68,80)

Çalışmamızda belirlenen rekürrens olguları kemoterapiye rezistan olgulardır ve bu olgularda telomeraz aktivitesi çalışmamızda diğer kanser vakalarıyla karşılaştırıldığında

istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Ancak hastaliksız kanser vakalarının ikisinde telomeraz aktivitesi ciddi derecede yüksek bulunmuştur, biz bu olgularında first-line kemoterapötiklere rezistan olduğu görüşündeyiz. Bu olgulardan birincisi 52 yaşında 2 parite, 1 abortus, 1 yaşayan, 3 D&C'ye ve second-look öncesi 3.10 U/ml CA 125 düzeylerine sahip evre IIIa seröz papiller adenokarsinom vakasıdır. Hasta 6 kür Paklitaksel-Sisplatin rejimi sonrasında negatif SLL bulguları ile 3 kür Paklitaksel-Sisplatin konsolidasyon tedavisi almıştır. İkinci vaka ise 58 yaşında 5 parite ve yaşayana ve second-look öncesi 5.46 U/ml CA 125 düzeylerine sahip seröz papiller adenokarsinom vakasıdır. Bu olguda 6 kür Paklitaksel-Karboplatin rejimi sonrasında negatif SLL olarak değerlendirilmiş ve oral etaposid tedavisi verilmiştir. Her iki olgunun second-look sonrası CA 125 değerleri 35 U/ml'nin altındadır. Ancak daha öncede belirtildiği gibi CA 125'in normal düzeylerde olması rekürrensi yada relapsı ekarte etmemektedir. Biz bu olgularında yakın takibi ile rekürrens ve prognoz hakkında değerli bilgilere ulaşılacağını savunmaktayız. Bu olgulardaki kemoterapi rezistansından dolayı telomeraz inhibitörlerinin farklı bir alternatif olarak yada adjuvan tedavi olacağını düşünmekteyiz. Bu sayede second-lookta telomeraz aktivitesinin rekürrens olgularının belirlenmesinde yeri olmasada tedavi protokollerini değiştirmesinde bir rol oynayacağı olasıdır.

Second-look cerrahi prosedür şeklinin farklılık yaratacağı görüşü ile laparoskopik ve laparotomik işlemlerde telomeraz aktivitelerinin karşılaştırılması sonucunda istatistiksel anlamlı bir fark tarif edilememiştir. Bu yüzden günümüzde second-look prosedürler arasındaki laparotomi lehindeki tartışmalarda telomeraz aktivitesini bir rolü olacağını düşünmemekteyiz. Laparoskopik yaklaşım hem laparotomi insidansını düşürmekte hemde sitolojik ve telomeraz aktivitesi incelemelerini etkilemektedir. Biz bu sonuçlara göre second-look operasyonunun her iki prosedürlede yapılabileceğini düşünmekteyiz.

Telomeraz aktivitesi first-line kemoterapötik rejimlere bağlı olarak etkilenmiyor gibi gözükmemektedir. Ancak çalışmamızda hasta grubunda kontrol grubuna göre kemoterapiye rağmen daha yüksek telomeraz aktiviteleri tanımlanmıştır. Bu sonuçlara göre günümüzde first-line kemoterapiye % 75-80 cevap oranları tariflense de, biz over kanserinde halen bazal bir telomeraz aktivitesine bağlı olarak bu hastaların kür kabul edilemeyeceğini yada malign oluşumun devamının ettiğini, yüksek rekürrens riskinin

buna bağı olarak yüksek olduğunu ve yeni tedavi modalitelerinin tanımlanması gerekliliğine inanmaktayız.

Ayrıca rekürrens olgularında telomeraz aktivitesinin hastalısız olgulardan daha düşük düzeylerde ve tüm rekürrens olgularında 30 U altında saptanmış olmasından dolayı, biz over kanserinde rekürrens veya relaps vakalarında telomer olabilirliğinin telomeraz dışı mekanizmalarla sağlandığını düşünmekteyiz. Bu sayede tümör hücreleri telomeraz dışında bir mekanizma ile replikasyon yeteneklerini sürdürebilmekte ve telomeraz aktivitesi bu nedenle saptanamıyor olabilir. Bu olasılığın oldukça kuvvetli olduğunu düşünmekteyiz. Bu sonuçta tümör biolojisinde halen sınırlı bilgilere sahip olduğumuzu göstermektedir.

Sonuçta second-look operasyonunda rekürrensin belirlenmesinde telomeraz aktivitesinin yeri sınırlı olarak değerlendirilmiştir. Ancak çalışmamızın sınırlı vakayı ve izlem süresine sahip olmasından dolayı bu ilişkinin geniş çalışma grupları ve izlem süresi ile yinelenmesi önemlidir. Çalışmamız bu konuda bir ön rapor olarak değerlendirilebilir. Günümüzde second-look'ta rekürrens saptanmasında sensitivite artışlarına ihtiyaç duyulmaktadır. Fakat bu konuda telomerazın yeri bu çalışmayla bir soru işareti olarak kalmaktadır. Ayrıca bu çalışma ile günümüzde halen over kanser etyolojisi ve tedavisi konusunda yetersiz bir yaklaşımda olduğu görülmektedir. Telomeraz inhibitörleri overyan kanser tedavisinde bir olasılık gibi görülmekte ve belkide rekürrens ilişkisinin daha yeterli anlaşılmasına olanak sağlayacaktır. Primer sitoredüktif cerrahide telomerazın incelenmesi gerekliliğini düşünmekteyiz. Bu inceleme ile elbette çalışmamızda sunulan minimal dokular haricindeki doku örneklerinde içermelidir. Biz bu sayede over kanser etyolojisi ve prognozunda farklı histolojik tiplerde ve evrelerde değerli bilgilere erişilebileceğini düşünmekteyiz.

Telomeraz aktivitesinin % 80'den fazla kanser hücresinde gözlenmesi ile telomerazı hedef alan tedaviler ile potansiyel tümör büyümesinin engellenmesi tümör dışında çok az bir sitotoksik etki ile olabilir.(31) Bu ajanlar ile hedeflenen etki telomer uzunluklarının kritik seviyeye kadar kısaltılarak replikatif özelliklerinin yitirilmesi ve kromozom hasarına bağı olarak hücre ölümünün sağlanmasıdır. Tümöral oluşumların büyük bir çoğunluğunda telomerler daha kısa bulunmakta ve yüksek proliferasyon oranları normal replikatif hücrelere göre görülmektedir.(32) Bu yüzden telomeraz

aktivitesinin inhibisyonu birkaç sellür bölünme ile kanser hücrelerinde telomerin lethal erozyonuna imkan vermektedir. Bunun aksine daha önce değinildiği gibi kök ve germ hücrelerinde telomer uzunlukları daha fazla olmakta ve terapi esnasında protektif özelliklerinin korunacağı düşünülmektedir. Normal hücrelerin korunması ile trombositopeni, bulantı, alopesi, lökopeni gibi standart kemoterapinin bazı yan etkilerini görünmeyeceği açıktır. Telomeraz inhibitörlerinin geleneksel kemoterapi rejimleri ile veya sonrasında kullanımının olacağı sanılmaktadır. Böylece tümör boyutlarında artmanın ve metastazların önlenebileceği ve yüksek riskli hasta grubu olan ailesel geçişli kanser olgularında telomeraz-ekspresyonu gösteren hücreler üzerindeki etkisi ile korunmanın sağlanabileceği düşünülmektedir.(chemoprevention)

Yeni gelişmeler ile oligonükleotitleri ters tanımlayan ve mRNA veya telomeraz RNA yapı taşıını hedef alan ribozimler ile telomeraz inhibisyonunun olabildiği gösterilmiştir.(76,33-35) Ayrıca bazı küçük moleküller telomerazın potent katalitik inhibitörleridir.(38,39) Ancak günümüzde bu tedavi seçeneklerinin geç etki yaratmalarından dolayı klinik uygulamalara katılmaları olası görülmemektedir. Telomerlere direkt olarak bağlanan ve ikincil DNA yapılanmasının stabilize eden G-quadruplexlerde ayrı bir potent telomeraz inhibitörleridir.(42,43) Bu interaktif ilaçlar alışılmış kemoterapik sitotoksik ilaçlarla eş zamanlı uygulandıklarında sinerjik etki göstermekte ve daha az telomer uzunluğuna bağımlı olarak kanser hücrelerinde daha hızlı cevaba neden olmaktadır. Bu G-quadruplexlerin olası kullanımı ile genlerin (c-MYC gibi) promoter bölgelerinde G-quadruplexlerin hedef alınarak insan telomeraz reverse transkriptaz proteini üretimini repress edebilir.(42) Telomeraz reverse transkriptaz hTERT parsiyel peptitlerinin sitotoksik T-lenfositler için uyarıcı oldukları ve hTERT pozitif tümör hücrelerinde lizis oluşturdıkları gösterilmiştir.(44) Saretzki'nin yaptığı bir çalışmada adenovirus vasıtası ile T motif insan telomerazı katalitik subuniti hTERT'e karşı duyarlandırılan ovaryen kanser hücrelerinde telomeraz aktivitesinin düştüğü ve masif hücre ölümü kültürlede gözlenmiştir.(76)

Bu sonuçlar son derece ilgi çekici kanser tedavisinde telomeraz inhibitörlerinin kullanılabilmesi olasılığını desteklemektedir. Bu tedavi rejimleri için bazı noktaların ise hatırlanması gereklidir. İlk olarak % 10-15 oranında kanserlerde telomeraz aktivitesi gösterilememekte ve bu tümör hücrelerinde muhtemelen başka olası mekanizmalar ile

kansere sebebiyet vermektedir. Bu tümörler için telomeraz inhibitörlerinin tabiki düşünülmesi yanlıştır. Bir diğer nokta ise telomeraz inhibitörlerinin telomerlerin en kısa olduğu hücre kültürlerinde etkisinin gösterilmesidir. Oysa halen birçok primer tümörde telomer uzunluğu bilinmemektedir. Son nokta ise efektif telomeraz inhibisyonunun düşük telomeraz aktivitesi gösteren normal hücrelerdeki etkisidir. Halen telomeraz inhibitörlerinin potansiyeli araştırılması gereken bir konudur.





## F/ SONUÇLAR:

Telomeraz bilinen en geniş ve erken malignite markırı olarak günümüzde kabul görmektedir. Telomeraz aktivitesinin primer insan kanserlerinde ve over kanserinde (%73-88) yüksek düzeylerde gösterilmesi ve over kanserinde second-look sonrasında yüksek rekürrens riski (%40-50) nedeniyle second-look operasyonlarında rekürrensin belirlenmesinde telomeraz aktivitesinin yeri araştırılmıştır. Çalışmaya 15 evre III ve IV over kanserlerinden ve benign jinekolojik hastalığa sahip 25 kontrol grubundan oluşan vakalar dahil edilmiştir.

Çalışmada rekürrens ve telomeraz aktivitesi arasında istatistiksel bir ilişki tariflenememiş ve telomeraz aktivitesinin rekürrensi belirlemedeki yeri sınırlı olarak nitelendirilmiştir. Hastalısız over kanseri vakaları ile kontrol grubu arasında yayınlanan çalışmalara korale olarak over kanserli olgularda daha yüksek telomeraz aktivitesi gözlenmiştir. Second-look sırasındaki alınan sitolojik incelemelerde tariflenen düşük sensitivite oranlarının (%40-60) bağlandığı kemoterapi sonrasındaki kapsülasyon nedeni ile telomeraz aktivitesinde alınan minimal doku örneklerinde (asit ve batın yıkama sıvısı) düşük bir sensitiviteye sahip olduğu düşünölmüştür. Ayrıca relaps ve rekürrenste telomeraz dışı bir yol ile telomer uzunlukları korunmakta olduğu ve hücre replikasyon hızının sürdüröldüğu sanılmaktadır. Yüksek telomeraz aktivitesinin hastalısız olgularda ilaç rezistansı ile ilişkili olacağı düşünölmüştür. Ancak çalışmamızın hem vaka sayısı hemde izlem süresinin sınırlı olmasından dolayı rekürrens, prognoz ve ilaç rezistansı ile telomeraz aktivitesi ilişkileri sınırlı olarak değerlendirilmiştir. İlaç rezistansı düşünölen iki olgu dışında rekürrens ve hastalısız over kanserli olguların telomeraz aktiviteleri arasında bir fark yoktur. Bu sonuçlara göre halen rekürrensin belirlenmesi günceliğini korumakta ve yeni çalışmalara ihtiyaç göstermektedir.

Çalışmada ortaya çıkan diğer sonuçlara göre uygulanan second-look cerrahi yaklaşımın şekli telomeraz aktivitesini değiştirmemektedir. Ayrıca first-line kemoterapi sonrasında da telomeraz aktivitesi belirli bir bazal seviyede kontrol grubundan yüksek olarak devam etmektedir. Buda bize halen first-line kemoterapinin cevap oranlarının tahmin edildiği kadar başarılı olmadığını ve yeni tedavi modalitelerinin klinik uygulamalara dahil olması gerekliliğini düşünörmektedir. Telomeraz inhibitörleri halen araştırılmakta ve halen ileride over kanseri tedavisinde olası yerini korumaktadır.

## **G/ ÖZETLER:**

### **G. I. Çalışmanın Türkçe Özeti:**

Omurgalılarda telomeraz kromozomal integriteyi ve stabiliteyi sağlayarak telomer yapıları uzunluğundaki kısaltmaları, kromozomal instabiliteyi ve hücre ölümünü önler. Somatik hücrelerin çoğunda ölçülebilir telomeraz aktivitesi yoktur. Günümüzde hassas TRAP assay yöntemi ile çok düşük dokularda ve bir çok kanser spesimeninde telomeraz aktivitesi gösterilmiş, bilinen en geniş ve spesifik tümör markırı olarak kabul edilmiştir. TRAP assay ile over kanserinde minimal hücre akstratlarında %88-100 arasında değişen oranlarda telomeraz aktivitesini göstermiştir.

Bu çalışmada evre III ve IV over kanserli olguların yüksek rekürrens ve relaps oranlarının second-look operasyonları sırasında saptanabilmesi amaçlanmıştır. Bu sayede kemoterapötik tedavilere yanıtın değerlendirilmesinde, minimal residü hastalık veya erken rekürrenslerin hassas tespitinde telomeraz aktivitesinin potansiyel değeri gösterilmeye çalışılmıştır.

Çalışmada primer sitoredüksiyonu yapılmış, first-line kemoterapileri tamamlanmış ve second-look cerrahi yapılan 15 evre III ve IV over kanser olgusu ile benign jinekolojik hastalığı olan 25 kontrol hastasında telomeraz aktivitesi değerlendirilmiştir. Telomeraz aktivitesi batın yıkama mayi yada asit sıvısından second-look operasyonu sırasında veya benign jinekolojik tanı nedeni ile yapılan operasyon sırasında alınan batın yıkama mayilerinde telomeraz aktivitesi çalışılmıştır. Ayrıca over kanserli olguların second-look operasyon sırasındaki sitolojik, patolojik ve operasyon bulguları ile telomeraz aktivitesinin korelasyonu incelenmiştir.

Rekürrense sahip hastalar ile kontrol grubu ve hastalısız over kanserli olgulara arasında istatistiksel bir fark telomeraz aktivitesinde görülmemiştir. Rekürrensi olmayan vakalar ile kontrol grubu arasında telomeraz aktivitesi over kanserli olgularda daha yüksek bulunmuştur. Telomeraz aktivitesi ile second-look sitolojik ve patolojik incelemeler korelasyon göstermektedir. Ancak telomeraz aktivitesi tüm over kanser vakalarında rekürrensi değerdirmede yeterli bulunmamıştır. Second-look cerrahi yaklaşımları ve uygulanan kemoterapi rejimleri arasında telomeraz aktivitesi açısından bir fark gözlenmemiştir.

## **G. II. Çalışmanın İngilizce Özeti: (SUMMARY :)**

Telomerase prevents the chromosomal instability and cell death by maintaining telomere length with obtaining the stability and integrity of chromosomes. Many of somatic cells have not any detectable telomerase activity. Nowadays in many primary human cancer and minimal cancer tissue telomerase activity was demonstrated and, agreed as the most specific tumour marker with widest range. In minimal cell extracts of ovarian cancer telomerase activity was showed variable between %88-100 rates with the gold standard measurement method TRAP (Telomeric Repeat Amplification Procedure) assay.

The aim of the study was to determine the efficacy success of telomerase activity on detecting the recurrence and relapse rates during second-look procedure in stage III and IV ovarian cancer patients. The potential value of telomerase activity in examining of chemotherapeutic response, and specific detection of minimal residual disease or early relapse was experimented.

In the study 15 second-look patient with stage III and IV ovarian cancer who had complete primary cytoreduction surgery and first-line chemotherapy and 25 control patients with benign gynaecologic disease were enrolled. Telomerase activity was studied in ascite or washing fluids taken during second-look procedure or benign gynaecological operations. Also the comparison and correlation of cytology, pathology and second-look procedure findings with telomerase activity was examined.

There were not any statically differences found between recurrent cases and control or disease free ovarian cancer patients. Telomerase activity was observed higher in disease free cases than control group. The telomerase activity was correlated with cytological and pathologic examinations of second-look operations. However telomerase activity was found to be inefficient in detecting recurrence of ovarian cancer at second-look operation. There were also no differences observed in telomerase activities according to second-look surgery procedures and chemotherapy regimens.

## **H/ REFERANSLAR:**

1. Muller HJ. The remaking of chromosomes. *Collect. Net.* 1938; 8: 182-195.
2. Roberts PA. A cytogenetic analysis of X-ray induced visible mutations at the yellow locus of *Drosophila Megaloblaster*. *Mutat. Res.* 1974; 22: 139-144.
3. Mc Clintock B. The stability of broken ends of chromosomes in *Zea mays*. *Genet* 1941; 26: 234-82.
4. Sandell LL, Zakian VA. Loss of a yeast telomere: Arrest, recovery and chromosome loss. *Cell* 1993; 75: 729-39.
5. Blackburn EH. Telomeres: no end in sight. *Cell* 1994; 77: 621-623.
6. Cohn M, Blackburn EH. Telomerase in yeast. *Science* 1995; 269: 396-400.
7. Mc Eachern MJ, Blackburn EH. Runaway telomere elongation caused by telomerase RNA mutations. *Nature* 1995; 376: 403-406.
8. Mc Eachern MJ, Blackburn EH. Cap-prevented recombination between terminal telomeric repeat arrays (telomere CPR) maintains telomeres in *Kluyveromyces lactis* lacking telomerase. *Genes Dev* 1996; 10: 1822-1834.
9. Lundblad V, Blackburn EH. An alternate pathway for yeast telomere maintenance rescues *est1* senescence. *Cell* 1993; 73: 347-360.
10. Greider CW. Telomeres, telomerase and senescence. *Bioessays* 1990; 12: 363-9.
11. Morin GB. The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats. *Cell* 1989; 59: 521-9.
12. Campisi J. Replicative senescence: an old lives tale? *Cell* 1996; 84: 497-500.
13. Chang E, Harley CB. Telomere length and replicative aging human vascular tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 11190-11194.
14. Cech TR, Linger J. Telomerase and the chromosome end replication problem: in telomeres and telomerase (CIBA found symp 211) 1997; Wiley, Chichester, p20-34.
15. Lendvay T, Morris D, Sah J, Balasubramanian B, Lundblad V. Senescence mutants of *Saccharomyces cerevisiae* with a defect in telomere replication identify three additional *est* genes. *Genetics* 1996; 144: 1399-1412.
16. Bednarek A. Increased telomerase activity in mouse skin premalignant progression. *Cancer Res* 1995; 55: 4566-4569.

17. Klingelhutz AJ. Telomerase activation by the E6 gene product of human papilloma virus type 16. *Nature* 1996; 380: 79-82.
18. Huibregste JM, Beaudenon SL. Mechanism of HPV E6 proteins in cellular transformation. *Semin Cancer Biol* 1996; 7: 317-326.
19. Etscheid BG. The E6 protein of human papillomavirus type 16 function as a transcriptional repressor in a mechanism independent of the tumor suppressor protein, p53. *Virology* 1994; 205: 583-585.
20. Wang J. Myc activates telomerase. *Genes Dev* 1998; 12: 1769-1774.
21. Fujimoto K, Takahashi M. Telomerase activity in human leukemic cell lines is inhibited by antisense pentadecadeoxynucleotides targeted against MYC mRNA. *Biochem Res Commun* 1997; 241: 775-781.
22. Reed JC. Regulation of myc mRNA levels in human lymphocytes by modulators of cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 4221-4224.
23. Bodnar AG. Extension of lifespan by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 1998; 279: 34-352.
24. Wada Y, Yagihashi A, Kameshima H, Matsuura A, Sato N, Kikuchi K, Yajima T, Sasaki K, Uehara N, Watanabe N, Hirata K. Nonradioisotopic telomeric repeat amplification protocol (TRAP) using digoxigenin labeled probe. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 1997 Nov; 19(4): 451-7.
25. Wei Lixin, Guo Yajun, Wu Mengchao, et al. Detection of telomerase activity in human cells with telomeric repeat amplification protocol by silver staining. *Med Cell PLA* 1998; 13(2): 140-2.
26. Kavalier E, Landman J, Chang Y, et al. Detection human bladder carcinoma cells in voided urine samples by assaying for the presence of telomerase activity. *Cancer* 1998; 82: 708-14.
27. Ramakumar S, Bhuiyan J, Besse JA, et al. Comparison of screening methods in the detection of bladder cancer. *J Urol* 1999; 161: 394.
28. Wataru Yasui, Hidetoshi Tahara, Eiji Tahara, et al. Expression of telomerase catalytic component, telomerase reverse transcriptase, in human gastric carcinomas. *Jpn J Cancer Res* 1998; 89: 1099-103.

29. Poreboma C, Scheel C, Hero B et al. Telomerase activity and telomerase subunit gene expression patterns in neuroblastoma: a molecular and immunohistochemical study establishing prognostic tools for fresh-frozen and paraffin-embedded tissues. *J of Clin Oncol* 2000; 18(13): 2582-92.
30. Xu SQ, He M, Yu HP, Wang XY, Tan XL, Lu B, Sun X, Zhou YK, Yao QF, Xu YJ, Zhang ZR. Bioluminescent method for detecting telomerase activity. *Clin Chem* 2002 Jul; 48(7): 1016-20.
31. Bacchetti S. Telomere maintenance in tumour cells. *Cancer Surv* 1996; 28:197-216.
32. Neidle S, Parkinson G. Telomere maintenance as a target for anticancer drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 2002 May; 1(5):383-93.
33. Norton JC, Piatyszek MA, Wright WE, Shay JW, Corey DR. Inhibition of human telomerase activity by peptide nucleic acids. *Nature Biotechnol* 1996; 14:615-9.
34. Kondo S, Kondo S, Tanaka Y, et al. Targeted therapy of human malignant glioma in a mouse model by 2, 5-A antisense directed against telomerase RNA. *Oncogene* 1998; 16:3323-30.
35. Yokoyama Y, Takahashi Y, Shinohara A, et al. Attenuation of telomerase activity by a hammerhead ribozyme targeting the template region of telomerase RNA in endometrial carcinoma cells. *Cancer Res* 1998; 58:5406-10.
36. Burger AM, Double JA, Newell DR. Inhibition of telomerase activity by cisplatin in human testicular cancer cells. *Europ J Cancer* 1997; 33:638-44.
37. Sato N, Mizumoto K, Kusumoto M, Niiyama H, Maehara N, Ogawa T, Tanaka M. 9-Hydroxyellipticine inhibits telomerase activity in human pancreatic cancer cells 1998 *FEBS letters*, 441,318.
38. Kiyozuka Y, Yamamoto D, Yang J, Uemura Y, Senzaki H, Adachi S, Tsubura A. Correlation of chemosensitivity to anticancer drugs and telomere length, telomerase activity and telomerase RNA expression in human ovarian cancer cells. *Anticancer Res* 2000 Jan-Feb; 20(1A):203-12.
39. Ku WC, Cheng AJ, Wang TCV. Inhibition of telomerase activity by PIC inhibitors in human nasopharyngeal cancer cells in culture. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 241:730-6.

40. Sharma S, Raymond E, Soda H, Izbicka E, et al. DMSO causes a reversible inhibition of telomerase activity in a Burkitt lymphoma cell line. *Leukemia Res* 1998; 22:663-70.
41. Kanaya T, Kyo S, Hamada K, et al. Adenoviral expression of p53 represses telomerase activity through down-regulation of human telomerase reverse transcriptase transcription. *Clin Cancer Res* 2000; 6:1239-47.
42. Rezler EM, Bearss DJ, Hurley LH. Telomeres and telomerases as drug targets. *Curr Opin Pharmacol* 2002 Aug;2(4):415-23.
43. Kelland LR. Telomerase inhibitors: targeting the vulnerable end of cancer? *Anticancer Drugs* 2000 Aug;11(7):503-13.
44. Vonderheide RH, Hahn WC, Schultze JL, et al. The telomerase catalytic subunit is a widely expressed tumor-associated antigen recognized by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity* 1999; 10:673-9.
45. Shay JW, Wright WE, Webrin H. Loss of telomeric DNA during aging may predispose cells to cancer. *Int J Oncol* 1993; 3: 559-563.
46. Harley CB, Vaziri H, Counter MC, Allsop RC. The telomere hypothesis of cellular aging. *Exp Gerontol* 1992; 27: 375-382.
47. Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 1994; 266: 2011-15.
48. Shay JW, Gadzar AF. Telomerase in early detection of cancer. *J Clin Pathol* 1997; 50: 106-9.
49. Hiyama K, Hiyama E, Yokoyama T, Matsuura Y, Piatyszek MA, Shay JW. Correlating telomerase activity levels with human neuroblastoma outcomes. *Nat Med* 1995; 1: 249-255.
50. Hiyama E, Gollahon L, Kataoka T. Telomeric activity in breast tumors. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88: 116-122.
51. Shay JW, Bacchetti S. A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer* 1997; 33: 787-91.
52. Hiyama E, Kodama T, Shinbara K. Telomerase activity is detected in pancreatic cancer but not in benign tumors. *Cancer Res* 1997; 57: 326-331.

53. Shay JW, Werbin H, Wright WE. Telomeres and telomerase in human leukemias. *Leukemia* 1996; 10: 1255-61.
54. Langford LA, Piatyszek MA, Xu R, Schold SC, Wright WE, Shay JW. Telomerase activity in ordinary meningiomas predicts poor outcome. *Human Pathol* 1997; 28: 416-420.
55. Zhang W, Piatyszek MA, Kobayashi T. Telomerase activity in human acute myelogenous leukemia: inhibition of telomerase activity by differentiation-inducing agents. *Clin Cancer Res* 1996; 2: 799-803.
56. Hiyama E, Hiyama K, Tatsumoto N, Shay JW, Yokoyama T. Telomerase activity in human intestine. *Int J Oncol* 1996; 9: 453-458.
57. Harley CB, Villeponteau B. Telomeres and telomerase in aging and cancer. *Curr Opin Genet Dev* 1995; 5: 249-255.
58. Yashima K, Piatyszek MA, Saboorian HM. Telomerase activity and in situ telomerase RNA expression in malignant and non-malignant lymph nodes. *J Clin Pathol* 1997; 50: 110-117.
59. Counter CM, Hirte HW, Bacchetti S, Harley CB. Telomerase activity in human ovarian carcinoma. *Proceedings of national academy of sciences of the USA* 1994; 91: 2900-2904.
60. Zheng PS, Iwasaka T, Yamasaki F, Ouchida M, Yokoyama M, Nakao Y, Fukuda K, Matsuyama T, Sugimori H. Telomerase activity in gynecologic tumors. *Gynecol Oncol* 1997; 64: 1715.
61. Gorham H, Yoshida K, Sugino T, et al. Telomerase activity in human gynaecological malignancies. *J Clin Pathol* 1997; 50: 501-4.
62. Datar RH, Naritoku WY, Li P, Tsao-Wei D, Groshen S, Taylor CR, Imam SA. Analysis of telomerase activity in ovarian cystadenomas, low-malignant-potential tumors, and invasive carcinomas. *Gynecol Oncol* 1999 Sep;74(3):338-45.
63. Park TW, Riethdorf S, Riethdorf L, Loning T, Janicke F. Differential telomerase activity, expression of the telomerase catalytic sub-unit and telomerase-RNA in ovarian tumors. *Int J Cancer* 1999 Aug 20;84(4):426-31.



64. Kyo S, Kanaya T, Takakura M, Tanaka M, Yamashita A, Inoue H, Inoue M. Expression of human telomerase subunits in ovarian malignant, borderline and benign tumors. *Int J Cancer* 1999 Mar 15;80(6):804-9.
65. Sakamoto M, Toyozumi T, Kikuchi Y, Okamoto A, Nakayama H, Aoki D, Yamamoto K, Hata H, Sugishita T, Tenjin Y. Telomerase activity in gynecological tumors. *Oncol Rep* 2000 Sep-Oct;7(5):1003-9 .
66. Shi-Jun Wang, Sakamoto T, Yasuda S, Fukasawa I, Ota Y, Hayashi M, Okura T, Zheng JH, Inaba N. The relationship between telomere length and telomerase activity in gynecologic tumors. *Gynecol Oncol* 2002; 84: 81-84.
67. Makurami J, Nagai N Ohama K. Telomerase activity and telomere length as diagnostic marker for ovarian tumor. *Jpn J Clin Med* 1998; 56: 1310-15.
68. Villa R, Folini M, Perego P, Supino R, Setti E, Daidone MG, Zunino F, Zaffaroni. Telomerase activity and telomere length in human ovarian cancer and melanoma cell lines: correlation with sensitivity to DNA damaging agents. *Int J Oncol* 2000 May;16(5):995-1002.
69. Kruk PA, Godwin AK, Hamilton TC, Auersperg N. Telomeric instability and reduced proliferative potential in ovarian surface epithelial cells from women with a family history of ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 1999 May;73(2):229-36.
70. Dowdy S, O’Kane D, Keeney GL, Boyd J, Podratz KC. Telomerase activity in sex cord stromal tumors of the ovary. *Gynecol Oncol* 2001; 82: 257-260.
71. Cardozo PL. A critical evaluation of 3000 cytologic analysis of pleural fluid, ascitic fluid and pericardial fluid. *Acta Cytol* 1996; 10: 455-460.
72. Dekker A, Bupp PA, Cytology of serous effusions: An investigation into the usefulness of cells blocks versus smear. *Am J Clin Pathol* 1978; 70: 855-60.
73. Tseng CJ, Jain S, Hou HC, Liu W, Pao CC, Lin CT, Horng SG, Soong YK, Hsueh S. Applications of the telomerase assay in peritoneal washing fluids. *Gynecol Oncol* 2001 Jun;81(3):420-3.
74. Sapi E, Okpokwasili NI, Rutherford T. Detection of telomerase-positive circulating epithelial cells in ovarian cancer patients. *Cancer Detect Prev* 2002;26(2):158-67.

75. Ulaner GA, Hu JF, Vu TH, Oruganti H, Giudice LC, Hoffman AR. Regulation of telomerase by alternate splicing of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) in normal and neoplastic ovary, endometrium and myometrium. *Int J Cancer* 2000 Feb 1;85(3):330-5.
76. Saretzki G, Ludwig A, von Zglinicki T, Runnebaum IB. Ribozyme-mediated telomerase inhibition induces immediate cell loss but not telomere shortening in ovarian cancer cells. *Cancer Gene Ther* 2001 Oct;8(10):827-34.
77. Akeshima R, Kigawa J, Takahashi M, Oishi T, Kanamori Y, Itamochi H, Shimada M, Kamazawa S, Sato S, Terakawa N. Telomerase activity and p53-dependent apoptosis in ovarian cancer cells. *Br J Cancer* 2001 Jun 1;84(11):1551-5.
78. Braunstein I, Cohen-Barak O, Shachaf C, Ravel Y, Yalon-Hacohen M, Mills GB, Tzukerman M, Skorecki KL. Bruce Rappaport Human telomerase reverse transcriptase promoter regulation in normal and malignant human ovarian epithelial cells. *Cancer Res* 2001 Jul 15;61(14):5529-36.
79. Takahashi M, Kigawa J, Oishi T, Itamochi H, Shimada M, Sato S, Kamazawa S, Akeshima R, Terakawa N. Alteration of telomerase activity in ovarian cancer after chemotherapy. *Gynecol Obstet Invest* 2000;49(3):204-8.
80. Kunifuji Y, Gotoh S, Abe T, Miura M, Karasaki Y. Down-regulation of telomerase activity by anticancer drugs in human ovarian cancer cells. *Anticancer Drugs* 2002 Jul;13(6):595-598.
81. Hahn WC, Stewart SA, Brooks MW, York SG, Eaton E, Kurachi A, Beijersbergen RL, Knoll JH, Meyerson M, Weinberg RA. Inhibition of telomerase limits the growth of human cancer cells. *Nat Med* 1999 Oct;5(10):1164-70 Comment in: *Nat Med*. 1999 Oct;5(10):1129-30.
82. Linasmita V, Wilailak S, Thakkinstian A, Srisupundit S, Tangtrakul S, Israngura N, Bullangpoti S. Advanced epithelial ovarian carcinoma in Thai women: should we continue to offer second-look laparotomy? *J Med Assoc Thai* 2001 Jul; 84(7): 958-65.
83. Ohwada M, Suzuki M, Suzuki T, Hiratsuka M, Kawai T, Saito K, Sato I. Problems with peritoneal cytology in second-look laparotomy performed in patients with epithelial ovarian carcinoma. *Cancer* 2001 Dec 25; 93(6): 376-80.

84. Rose PG, Faulhaber P, Miraldi F, Abdul-Karim FW. Positive emission tomography for evaluating a complete clinical response in patients with ovarian or peritoneal carcinoma: correlation with second-look laparotomy. *Gynecol Oncol* 2001 Jul; 82(1): 17-21.
85. W J Conover. Multiple Comparison Test, *Practical Nonparametric Statistics* 2<sup>nd</sup> Ed., 1980 Chapter 5; section 5.2; 229-239.(John Wiley&Sons)

