

ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΤΕΛΟΜΕΡΑΣΗΣ ΣΤΟ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΟ

Α.Τσίπης, Α.Μ. Αθανασιάδου, Π. Αθανασιάδου

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η τελομεράση είναι ριβονουκλεϊνικό πρωτεϊνικό ένζυμο που πολυμερίζει και συνεπώς αυξάνει τις επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες που βρίσκονται στα άκρα του γραμμικού χρωμοσώματος, οι οποίες είναι πλούσιες σε εξανουκλεοτίδιο (TTAGGG), με αποτέλεσμα να σταθεροποιεί τα τελομερίδια. Τα τελομερίδια συμμετέχουν στη διατήρηση του μήκους των χρωμοσωμάτων και συνεπώς στη σταθερότητά τους.

Η δραστηριότητα της τελομεράσης είναι φυσιολογικό φαινόμενο των κυττάρων της αρχέγονου σειράς, αλλά και των περισσότερων ιστών κατά τη διάρκεια της ανάπτυξής τους. Η τελομεράση εκφράζεται στα εμβρυϊκά κύτταρα, σε βλαστικές σειρές κυττάρων αρρένων και θηλέων, σε αναπαραγόμενα κύτταρα ιστών με αυξημένες αναγεννητικές δυνατότητες, όπως κύτταρα αιμοποιητικού, ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα, βασικά κύτταρα της επιδερμίδας και κύτταρα των εντερικών κρυπτών.

Η δραστηριότητα της τελομεράσης έχει παρατηρηθεί επίσης στο 66 - 97% των κακοήθων νεοπλασμάτων. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι το 90% των γυναικολογικών καρκίνων εκφράζουν θετικά την τελομεράση και πιο συγκεκριμένα η δραστηριότητά της ανιχνεύτηκε σε μεγάλο ποσοστό σε καρκίνους των ωοθηκών, του τραχήλου της μήτρας, του ενδομητρίου και του μαστού. Οι προνεοπλασματικές αλλοιώσεις και τα καλοήθη νεοπλάσματα παρουσιάζουν χαμηλή δραστηριότητα τελομεράσης.

Οι παραπάνω παρατηρήσεις οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι η ενεργοποίηση της τελομεράσης είναι κοινή στα κακοήθη νεοπλάσματα του γυναικολογικού συστήματος και παίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένειά τους. Η παρούσα ανασκόπηση έχει ως σκοπό την εκτενή αναφορά στη δραστηριότητα της τελομεράσης στο γυναικολογικό καρκίνο.

Όροι ευρετηρίου: Τελομεράση, τελομερίδια, γυναικολογικός καρκίνος.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η υπόθεση της γήρανσης που σχετίζεται με το σύμπλεγμα τελομερίδιο - τελομεράση αποτέλεσε τα τελευταία χρόνια σημαντικό πρότυπο για τη μελέτη της καρκινογένεσης. Η υπόθεση βασίζεται στις παρατηρήσεις, ότι τα περισσότερα φυσιολογικά ανθρώπινα σωματικά κύτταρα δεν παρουσιάζουν δραστηριότητα της τελομεράσης, σε αντίθεση με τα ανθρώπινα νεοπλασματικά κύτταρα που έχουν βραχύτερα τελομερίδια και εκφράζουν τη δραστηριότητα αυτή¹.

Η τελομεράση είναι ένζυμο που αυξάνει τις επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (TTAGGG), που βρίσκονται στα άκρα του γραμμικού χρωμοσώματος, με αποτέλεσμα να σταθεροποιεί τα τελομερίδια^{1,2}.

Τελομερίδια ονομάζονται οι αλληλουχίες που βρίσκονται στα άκρα του γραμμικού χρωμοσώματος και συμβάλλουν στη διατήρηση του μήκους των χρωμοσωμάτων και συνεπώς στη σταθερότητά τους^{1,2}.

Η δραστηριότητα της τελομεράσης είναι φυσιολογικό φαινόμενο των κυττάρων της αρχέγονου σειράς, αλλά και των περισσότερων ιστών κατά τη διάρκεια της ανάπτυξής τους. Ειδικότερα, το ένζυμο εκφράζεται στα εμβρυϊκά κύτταρα, σε βλαστικές σειρές κυττάρων αρρένων και θηλέων, σε αναπαραγόμενα κύτταρα ιστών με αυξημένες αναγεννητικές δυνατότητες, όπως κύτταρα αιμοποιητικού, ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα, βασικά κύτταρα της επιδερμίδας και κύτταρα των εντερικών κρυπτών².

Ο προσδιορισμός της δραστηριότητας της τελομεράσης είναι χρήσιμος για τη διάγνωση και την πρόγνωση του

Πίνακας 1. Δραστηριότητα της τελομεράσης σε κακοήθεις νεοπλασματικές νόσους

Κακοήθεις νεοπλασματικές νόσοι	Ποσοστό (%)
Καρκίνος του μαστού	93
Πρωτοπαθής καρκίνος του πνεύμονα	80
Καρκίνος του παχέος εντέρου	77-97
Ηπατοκυτταρικός καρκίνος	85
Γαστρικός καρκίνος	85
Καρκίνος του προστάτη	78-84
Καρκίνος του εγκεφάλου	66-97
Κακοήθεις νεοπλασματικές νόσοι του αιμοποιητικού	67-100
Καρκίνος του ενδομητρίου	95
Νευροβλάστωμα	94
Βασικοκυτταρικός καρκίνος	100
Καρκίνος του παγκρέατος	72
Καρκίνος θυρεοειδούς	63

πρωτοπαθούς καρκίνου. Η δραστηριότητα αυτή σύμφωνα με μελέτες έχει παρατηρηθεί στο 66 - 97% των κακοήθων νεοπλασμάτων³.

Στην παρούσα ανασκόπηση γίνεται εκτενής αναφορά σε ό,τι αφορά στη δραστηριότητα της τελομεράσης στο γυναικολογικό καρκίνο.

ΤΕΛΟΜΕΡΑΣΗ

Το 1985 οι Grieder και Blackburn έδειξαν ότι η επιμήκυνση των τελομεριδίων του πρωτόζωου *Tetrahymena*

επιτυγχάνεται ενζυμικώς με τη δράση μιας ανάστροφης μεταγραφικής υποομάδας (Htrt) την οποία ονόμασαν τελομεράση⁴.

Η τελομεράση είναι ένα ριβονουκλεϊνικό πρωτεϊνικό ένζυμο που πολυμερίζει και συνεπώς αυξάνει τις επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες που βρίσκονται στα άκρα του γραμμικού χρωμοσώματος, οι οποίες είναι πλούσιες σε εξανουκλεοτιδίο (TTAGGG) με αποτέλεσμα να σταθεροποιεί τα τελομερίδια.

Τελομερίδια ονομάζονται τα φυσικά άκρα των χρωμοσωμάτων. Η ονομασία τους προέρχεται από τις ελληνικές λέξεις «Τέλος» και «Μέρος». Για πρώτη φορά εμφανίζονται στη βιβλιογραφία το 1938 από τον πρωτοπόρο της γενετικής H.Muller⁵.

Τα τελομερίδια είναι εξειδικευμένες κατασκευές, το DNA των οποίων αποτελείται από εκατοντάδες επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες του εξανουκλεοτιδίου 5' - TTAGGG - 3'. Συμμετέχουν στη διατήρηση του μήκους των χρωμοσωμάτων και συνεπώς στη σταθερότητά τους, βρίσκονται στα άκρα των ευκαρυωτικών χρωμοσωμάτων, συνδεδεμένα με ειδικές πρωτεΐνες και προστατεύουν τα χρωμοσώματα από ανεπιθύμητους ανασυνδυασμούς και μεταλλάξεις του μορίου του DNA. Θεωρούνται το εγγενές βιολογικό ρολόι των σωματικών κυττάρων, που έχει τη δυνατότητα να ρυθμίζει τον αριθμό των κυτταρικών διαιρέσεων. Συμμετέχουν στην κυτταρική γήρανση και τέλος στη διεργασία του καρκίνου με την παρουσία του ειδικού ενζύμου, της τελομεράσης⁵.

Η τελομεράση είναι ριβονουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλεγμα αποτελούμενο από δύο υποομάδες: α) την ανάστροφη τρανσκριπτάση (TERT), η οποία χρησιμοποιεί το RNA του συμπλέγματος τελομεράσης (hTR) ως εκμαγείο για τη προσθήκη αλληλουχίας TTAGGG στην τελική περιοχή του χρωμοσώματος⁶ και β) το RNA ανθρώπινης τελομεράσης (hTR ή TERC) που αποτελείται από 451 νουκλεοτιδία και περιέχει σειρά από 11 νουκλεοτιδία (CUAACCCUAAAC) που λειτουργούν ως εκμαγείο για την κωδικοποίηση της τελομερικής αλληλουχίας (TTAGGG)n. Το υπεύθυνο γονίδιο εντοπίζεται στο μακρύ σκέλος του χρωμοσώματος 3⁷.

Η ανάστροφη τρανσκριπτάση της τελομεράσης είναι πολυπεπτιδίο 127 KDa και κωδικοποιείται από γονίδιο του χρωμοσώματος 5. Ανήκει στη γενικότερη κατηγορία των πολυμερασών DNA, τις ανάστροφες μεταγραφάσες, που περιγράφηκαν για πρώτη φορά στους καρκινικούς ιούς RNA (ρετροϊοί).

Έρευνες ανασύνθεσης της δραστηριότητας της τελομεράσης in vitro έδειξαν ότι η TERT και η hTR αποτελούν τις βασικές δομές της ενεργούς τελομεράσης⁸. Η συνδεδεμένη πρωτεΐνη της τελομεράσης (TEP1) είναι πρωτεΐνη 240 KDa και φέρει την περιοχή σύνδεσης του RNA. Η TEP1 φαίνεται ότι είναι υπεύθυνη για το συντονισμό της ολοενζυμικής μορφής της τελομεράσης και για τον έλεγχο του ενζύμου, συνδέοντας σοβαρούς ρυθμιστικούς παράγοντες⁷. Η έκφραση της ανάστροφης τρανσκριπτάσης είναι στενά συνδεδεμένη με την εμφάνιση ενεργούς τελομεράσης, σε αντίθεση με τη TEP 1 που παρατηρήθηκε ακόμη και σε ιστούς που δε παρουσίαζαν ενεργό τελομεράση⁹.

Διάφορες μελέτες έδειξαν ότι η εισαγωγή DNA, υπεύθυνου για την κωδικοποίηση ανάστροφης τρανσκριπτάσης σε κύτταρα που δεν εκφράζουν τελομεράση, είναι ικανή να τα μετατρέψει σε θετικά εκφραζόμενα κύτταρα για τη τελομεράση⁹.

Σύμφωνα με την τελομεριδιακή θεωρία της γήρανσης που διευτώθη το 1991 από τον Harley¹⁰, ύστερα από ένα αριθμό κυτταρικών διαιρέσεων, το κύτταρο χάνει μεγάλο μέρος της τελομεριδιακής του αλληλουχίας και τα άκρα των χρωμοσωμάτων παραμένουν ακάλυπτα. Όταν τα τελομερίδια φτάσουν σε ένα κρίσιμο μήκος βραχύνσεως, τα κύτταρα σταματούν να διαιρούνται και γηράσκουν, υφίστανται δηλαδή μαρασμό (senescence).

Με τον όρο «κυτταρικός μαρασμός» αναφέρεται η κατάσταση εκείνη, κατά την οποία τα κύτταρα όταν παύσουν

να διαιρούνται δεν πεθαίνουν, αλλά περνούν σε φάση ηρεμίας, όπου και συνεχίζουν να επιτελούν τις φυσιολογικές τους λειτουργίες μέχρι να πεθάνουν.^{10,11}

Φαίνεται ότι υπάρχουν δύο μηχανισμοί υπεύθυνοι για την απώλεια πολλαπλασιασμού των φυσιολογικών κυττάρων.

Ο πρώτος μηχανισμός [M1] (στάδιο 1 θνησιμότητας) ρυθμίζει την είσοδο των φυσιολογικών κυττάρων στη φάση του μαρασμού, κατά τη διάρκεια του οποίου τα φυσιολογικά ανθρώπινα διπλοειδή κύτταρα δεν μπορούν περαιτέρω να διαιρεθούν. Με τη μεσολάβηση, όμως, των ογκοκατασταλτικών γονιδίων p53 και pRb ή των πρωτεϊνών E6/E7, οι οποίες θεωρούνται υψηλού κινδύνου όσον αφορά στο κονδύλωμα, τα κύτταρα μπορεί να συνεχίσουν να διαιρούνται μέχρις ότου επηρεασθούν από το δεύτερο μηχανισμό [M2] (στάδιο 2 θνησιμότητας, «κρίση»). Ο μηχανισμός αυτός αντιπροσωπεύει το φυσιολογικό αποτέλεσμα βράχυνσης του τελομεριδίου, όταν τα κύτταρα δεν είναι πλέον ικανά να προστατεύουν επί μακρόν το τελικό τμήμα του χρωμοσώματος, με συνέπεια τη σταδιακή βράχυνση του τελομεριδίου, τη γονιδιακή αστάθεια και τον κυτταρικό θάνατο. Εκείνα τα κύτταρα που θα επιζήσουν αυτής της κρίσης θανάτου είναι ικανά για επ' αόριστον πολλαπλασιασμό (αθανασία), πιθανώς δια επαναδραστικοποίησης του ενζύμου τελομεράση^{1,12}.

Το 1994 η ζωτική δράση της τελομεράσης πιστοποιήθηκε και στον άνθρωπο. Ο Morrison και συν. μελέτησαν και περιέγραψαν τη δραστηριότητα της τελομεράσης σε φυσιολογικά σωματικά κύτταρα. Η δραστηριότητα της τελομεράσης είναι φυσιολογικό φαινόμενο των κυττάρων της αρχέγονου σειράς, αλλά και των αναπαραγόμενων κυττάρων με αυξημένες αναγεννητικές ικανότητες. Αντίθετα, η δραστηριότητα αυτή δεν παρατηρείται στα φυσιολογικά σωματικά κύτταρα, όπου τα τελομερίδια σταδιακά βραχύνονται, λόγω του προβλήματος της αντιγραφής του άκρου της αλυσίδας του DNA^{13,14}.

Στον άνθρωπο τα γαμετικά κύτταρα θεωρούνται ότι διαθέτουν το μέγιστο τελομεριδιακό μήκος. Κατά την ανάπτυξη του οργανισμού με τις αλληπάλληλες κυτταρικές διαιρέσεις, το κύτταρο χάνει μεγάλο μέρος της τελομεριδιακής του αλληλουχίας και τα άκρα των χρωμοσωμάτων παραμένουν ακάλυπτα. Αν τα κύτταρα ξεφύγουν από τους μηχανισμούς ελέγχου, τότε παρουσιάζουν παθολογική κυτταρική διαίρεση και συχνά εμφανίζουν τελομεριδιακές συνδέσεις και δικεντρικά χρωμοσώματα^{13,14}.

Διάφοροι παράγοντες, όπως τα ογκογονίδια των καρκινικών κυττάρων, παρατείνουν την κυτταρική ζωή, διότι έχουν την ικανότητα να παρακάμπτουν το σήμα της γήρανσης του κυττάρου. Το γεγονός αυτό επιτυγχάνεται και στα καρκινικά κύτταρα, τα οποία παρουσιάζουν ικανότητες συνεχούς πολλαπλασιασμού και στα οποία επιδρούν μηχανισμοί που διατηρούν το τελομεριδιακό μήκος σταθερό και συντηρούν την ικανότητα της κυτταρικής διαίρεσης¹⁵.

Στους μηχανισμούς αυτούς σημαντικό ρόλο παίζει η παρουσία της τελομεράσης. Από παρατηρήσεις έχει διαπιστωθεί ότι οι κυτταρικές σειρές που περιέχουν κύτταρα με βραχέα τελομερίδια υπόκεινται σε κρίση που οδηγεί πολλά από αυτά στο θάνατο. Ως εκ τούτου, τα κύτταρα που επιβιώνουν είναι εκείνα που έχουν ενεργοποιήσει την τελομεράση τους¹⁶.

Η τελομεράση λοιπόν, είναι σημαντική για την ευστάθεια και μακροχρόνια βιωσιμότητα, καθώς και την καθυστέρηση της γήρανσης των τελομεριδίων των σωματικών κυττάρων. Σε κύτταρα που απουσιάζει η τελομεράση, οι τελομεριδιακές επαναλήψεις χάνονται στις κυτταρικές διαιρέσεις και όταν ο αριθμός των επαναλήψεων μειωθεί σε ένα συγκεκριμένο ποσοστό αρχίζει το πρόγραμμα της κυτταρικής γήρανσης. Αντιθέτως, κύτταρα που ωθούνται στο να παράγουν τελομεράση διατηρούν το μήκος των τελομεριδίων τους και δεν εισέρχονται στη διαδικασία της κυτταρικής γήρανσης¹⁶.

Επιπλέον των όσων προηγουμένως αναφέρθησαν, η δραστηριότητα της τελομεράσης έχει καταδειχθεί σε in situ καρκινώματα του μαστού και του πνεύμονα, δυσπλαστικές αλλοιώσεις της κεφαλής και του τραχήλου, δυσπλαστικές αλλοιώσεις του δέρματος από επίδραση ακτινοβολίας και σε πρώιμα στάδια ηπατοκυτταρικού καρκινώματος, καρκίνου του παγκρέατος και του παχέος εντέρου^{2,17,18,19}.

Η δραστηριότητα της τελομεράσης έχει παρατηρηθεί επίσης στο 66 - 97% των κακόηθων νεοπλασμάτων (Πίνακας 1)^{3,20}.

Μελέτες που έγιναν σε δείγματα βρογχικού επιθηλίου που ελήφθησαν από εν ενεργεία ή παλαιούς καπνιστές με ή χωρίς καρκίνο, ανέδειξαν δραστηριότητα της τελομεράσης σε ποσοστό 15% στο φυσιολογικό επιθήλιο. Μεγάλο ποσοστό δειγμάτων με υπερπλαστική, μεταπλαστική και δυσπλαστική εξεργασία, παρουσίαζε επίσης ανιχνεύσιμη δραστηριότητα της τελομεράσης^{2,21}.

Ο ρόλος της τελομεράσης στη διάγνωση του καρκίνου

Η διάγνωση του καρκίνου με ανίχνευση ενεργούς τελομεράσης είναι σημαντική όταν συνδυάζεται με άλλες διαγνωστικές μεθόδους, όπως FNA, PAP-test σε ασαφείς και αδιευκρίνιστες περιπτώσεις⁷. Η μέθοδος προσδιορισμού της δραστηριότητας της τελομεράσης παρουσιάζει 85% διαγνωστική ευαισθησία και 91% διαγνωστική ακρίβεια²².

Πίνακας 2. Μέθοδοι αξιολόγησης της δραστηριότητας τελομεράσης

Methods	Source
Original TRAP assay	Kim et al. 1994
Fluorescent TRAP	Aldous et al. 1997
Stretch PCR	Tatematsu et al. 1996
Stretch PCR and PicoGreen	Gelmini et al. 1998
In situ TRAP	Ohyashiki et al. 1997
TMA/HPA	Hirose et al. 1998
RT-PCR	Kyo et al. 1999
Real-time PCR	Yajima et al. 1998
Telomerase in intact nuclei	Fletcher et al. 1999.
Telomere length measurement	Lin et al. 2005.
Microarrays	Heller et al. 1999.

Ωστόσο, η σημασία της διάγνωσης μέσω τελομεράσης φαίνεται από το γεγονός ότι μπορεί να ανιχνευθεί σε καλοήθεις και προνεοπλασματικές αλλοιώσεις, όπου είναι πιθανή η κακοήθης μετάλλαξη και κατ' αυτό το τρόπο να συμβάλει στην πρόωμη διάγνωση του καρκίνου²².

Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι είναι πιο ευαίσθητη, ακόμα και στις μικροδηθήςεις των καρκινικών κυττάρων. Τέλος, είναι λιγότερο παρεμβατική μέθοδος, αφού μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε σωματικά υγρά και εκπλύσεις, όπου η συλλογή υγρού είναι πιο εύκολη σε σχέση με τις βιοψίες. Μειονέκτημα της μεθόδου αποτελεί η ανεπαρκής και λανθασμένη συλλογή υλικού, καθώς και η διήθηση από λεμφοκύτταρα, όπου

σε περιπτώσεις καρκίνου των ωοθηκών και των όρχεων είναι δυνατό να δώσει εσφαλμένα θετικά αποτελέσματα⁷.

Δείγματα στα οποία είναι δυνατό να ανιχνευθεί η δραστηριότητα της τελομεράσης

Η ανίχνευση της δραστηριότητας της τελομεράσης είναι δυνατό να καταδειχθεί σε κυτταρικά δείγματα και τεμάχια βιοψίας. Πιο αναλυτικά είναι δυνατό να ανιχνευθεί σε:

A. Κυτταρολογικά δείγματα που περιέχουν αποφολιδούμενα κύτταρα μετά από αυτόματη ή μηχανική παρέμβαση και που ανευρίσκονται στο:

- ENY
- Ούρα
- Υγρά σωματικών κοιλότητων (πλευριτικά, ασπιτικά)
- Πτύελα
- Υλικά εκπλύσεως και ψήκτρας που λαμβάνονται κατά τη διάρκεια γαστροσκοπήσεως, βρογχοσκοπήσεως, κολonosκοπήσεως
- Υλικά από τον τράχηλο της μήτρας και το ενδομήτριο
- Υλικά αναρροφήσεως με λεπτή βελόνα (FNA) από μαστό, ήπαρ, προστάτη, πνεύμονα κ.λπ.

B. Ιστοτεμάχια βιοψίας, ειδικότερα από:

- Τομές ψυκτικού
- Τομές παραφίνης

Μέθοδοι ανίχνευσης της τελομεράσης

Τα τελευταία χρόνια ανεπτύχθησαν διάφορες διαγνωστικές μέθοδοι για την ανίχνευση της δραστηριότητας της τελομεράσης (πίνακας 2). Η χρήση της συμβατικής μεθόδου για την ανίχνευση της τελομεράσης απαιτεί μεγάλο αριθμό κυττάρων ή ιστών, με αποτέλεσμα να αντικατασταθεί από τη μέθοδο, πρωτόκολλο ενίσχυσης τελομεριδικών επαναλήψεων – TRAP (telomeric repeat amplification protocol), η οποία περιγράφεται από τον Kim και συν.²³

1. Η μέθοδος TRAP περιλαμβάνει την αντίδραση της τελομεράσης, που αποσπάται με κυτταρική λύση και την προσθήκη των εκκινητών και των δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs). Στην περίπτωση όπου η αποσπώμενη τελομεράση είναι ενεργός, επιχειρείται επιμήκυνση του προστιθέμενου εκκινητή και το προϊόν αντίδρασης (εκμαγείο) ενισχύεται με PCR. Η τεχνική αυτή παρουσιάζει υψηλή ευαισθησία, αλλά επιτυγχάνει μόνο ποιοτική ανάλυση ανίχνευσης της τελομεράσης (παρουσία - απουσία). Η ποσοτική ανάλυση επιτυγχάνεται με τη χρήση φωτογραφικού φιλμ και του προσδιορισμού των μεταβολών της πυκνότητας μέσω ηλεκτρονικού υπολογιστή. Ωστόσο, η ποσοτική ακτινογραφία με καταγραφή σε φωτογραφική πλάκα της ακτινοβολίας που εκπέμπεται από ραδιενεργό υλικό (αυτοραδιογραφία) έχει μειονεκτήματα, αφού δεν παρουσιάζει γραμμικότητα και εύκολη δυνατότητα αναπαραγωγής του αποτελέσματος^{24,25}.

α) Ο Aldous και συν. πρότειναν τη μέθοδο φθορισμού για την ανίχνευση της τελομεράσης (F-TRAP), με σκοπό να επιλύσουν τα προβλήματα της ενσωμάτωσης των ραδιενεργών νουκλεοτιδίων που αναδεικνύονται με την ακτινογραφία και του χρόνου που απαιτείται για να περατωθεί η μέθοδος²⁶.

β) Η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης της DNA πολυμεράσης (PCR) αποτελεί τροποποίηση της TRAP και αναπτύχθηκε για τη ποσοτική ανάλυση της δραστηριότητας της τελομεράσης. Η εισαγωγή βημάτων για την κάθαρση των προϊόντων της τελομεράσης, πριν την αντίδραση PCR και η χρήση ειδικών σχεδιασμένων εκκινητών, που περιέχουν

ανεξάρτητες εσωτερικές αλληλουχίες του εκμαγείου, συμβάλει σημαντικά στην ποσοτική ακρίβεια της μεθόδου²⁷. Η χρήση των εκκινητών (TAG-U, CTA-R) εκμηδενίζει την πιθανότητα εσφαλμένων αρνητικών αποτελεσμάτων που μπορούν να προκύψουν από τη παρουσία αναστολέων του PCR στο δείγμα²⁷.

γ) Ο Gelmini και συν. παρουσίασαν μια τροποποιημένη μέθοδο TRAP, η οποία προβλέπει την ποσοτική ανάλυση χωρίς τις χρονοβόρες μετά PCR διαδικασίες, όπως την ηλεκτροφόριση σε γέλη με ραδιενεργές ουσίες και την αυτοραδιογραφία. Η χρήση της φθορίζουσας χρωστικής PicoGreen δεσμεύει εκλεκτικά το δίκλωνο DNA που δημιουργείται από την αντίδραση της τελομεράσης και την ενίσχυση του PCR²⁸. Τροποποίηση της μεθόδου TRAP αποτελεί και η εξειδικευμένη μέθοδος in situ PCR για την ανίχνευση της τελομεράσης σε κυτταρικό επίπεδο²⁹.

2. Ο Hirose και συν. περιέγραψαν μια νέα ποσοτική μη - ραδιενεργό μέθοδο, την ενίσχυση μέσω μεταγραφής (TMA transcription mediated amplification) με το συνδυασμό της μεθόδου προστατευμένου υβριδισμού (HPA hybridization protection assay), για την ανίχνευση της τελομεράσης. Η μέθοδος TMA δε βασίζεται σε μεθοδολογία PCR, αλλά στη χρήση ενός συστήματος ισοθερμικής ενίσχυσης. Στο πρωτόκολλο TMA τα ενισχυμένα προϊόντα τελομεράσης είναι αλληλουχίες RNA και ανιχνεύονται με το μη - ισοτοπικό υβριδισμό HPA³⁰. Η μέθοδος TMA/HPA είναι ταχύτερη της TRAP, παρουσιάζει ανάλογη ευαισθησία διάγνωσης και επιπλέον επηρεάζεται ελάχιστα από τους αναστολείς TRAP³⁰.

3. Πρόσφατες μελέτες επικέντρωσαν το ενδιαφέρον τους στην ανάλυση των επιπέδων έκφρασης των συστατικών της τελομεράσης, μετά από κλωνοποίηση των υπεύθυνων γονιδίων: πρωτεΐνης με δραστηριότητα αντίστροφης μεταγραφάσης (hTERT), της συνδεδεμένης πρωτεΐνης τελομεράσης (TEP1) και του RNA συστατικού³¹. Η μέθοδος της αντίστροφης μεταγραφής PCR (RT - PCR) επιτρέπει την ανάλυση της έκφρασης mRNA. Η έκφραση του mRNA της hTERT (hTERT - mRNA) είναι στενά συνδεδεμένη με τη δραστηριότητα της τελομεράσης και αποτελεί εναλλακτικό τρόπο εκτίμησής της³¹.

Ο Yajima και συν. προσάρμοσαν το Taq Man φθορίζον σύστημα ανίχνευσης στην ποσοτική μέθοδο PCR (real time PCR) και εκμηδένισαν κατ' αυτό τον τρόπο το χρόνο διαδικασίας του PCR³².

4. Τέλος, το 1999 ο Fletcher και συν. χρησιμοποίησαν νέα μέθοδο, κατά την οποία η τελομεράση, σε άθικτους πυρήνες, καταλύει την επέκταση των εκκινητών, δίνοντας έτσι νέες πληροφορίες για τη λειτουργία της τελομεράσης και παρέχοντας σημαντικό σύστημα αξιολόγησης των αναστολέων τελομεράσης³³.

5. Εκτός από τη δραστηριότητα της τελομεράσης έχουν προσδιοριστεί: α) Το μήκος του τελομεριδίου (ως τελικά κλάσματα περιορισμού με Southern υβριδισμό ή in situ με FISH σε μεταφασικά χρωμοσώματα ή μεταφασικούς πυρήνες), β) Η έκφραση του RNA συστατικού της τελομεράσης (TR) ή της καταλυτικής υποομάδας με δραστηριότητα αντίστροφης μεταγραφάσης (TERT) με μεθόδους in situ υβριδισμού FISH ή CISH και με Real Time RT - PCR^{34,35,36}.

6. Τεχνολογία των μικροσυστοιχιών (microarray). Το πρωτόκολλο TRAP (telomeric repeat amplification protocol) βασιζόμενο στην τεχνολογία PCR, είναι ευαίσθητη μέθοδος ανίχνευσης της δραστηριότητας της τελομεράσης και βοήθησε σημαντικά στην κατανόηση του ρόλου της τελομεράσης στην διατήρηση των τελομερών, στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την ανάπτυξη του καρκίνου. Ωστόσο, ένα από τα μειονεκτήματά του, είναι η έλλειψη ποσοτικής ανάλυσης της δραστηριότητας της τελομεράσης³⁷.

Η τεχνολογία των μικροσυστοιχιών εφαρμόζεται, τόσο στη μελέτη της γενετικής έκφρασης, όσο και στην ανίχνευση μεταλλάξεων και πολυμορφισμών. Επιτρέπει ταυτόχρονα τη συγκριτική μελέτη των επιπέδων γενετικής έκφρασης ενός μεγάλου αριθμού γονιδίων μεταξύ παθολογικών και φυσιολογικών κυττάρων. Βασίζεται στον υβριδισμό του RNA σημασμένου με φθορίζουσες ουσίες, όπου τοποθετείται σε στερεή επιφάνεια. Λόγω της συμπληρωματικότητας, παρατηρείται εκλεκτική σύνδεση με το νουκλεϊκό οξύ του συγκεκριμένου υλικού μελέτης και σύμφωνα με την παρουσία του δείκτη, είναι δυνατό να υπολογισθεί η ποσοτική έκφραση του γονιδίου^{38,39}.

Αναστολείς της δραστηριότητας της τελομεράσης σε σχέση με τη θεραπευτική αντιμετώπιση των κακοήθων νεοπλασμάτων

Δεδομένου ότι η τελομεράση εκφράζεται στους περισσότερους προχωρημένους καρκίνους, στρατηγικός ερευνητικός στόχος είναι η αναχαίτιση της δραστηριότητας αυτής με την εκτροπή των αθάντων κυττάρων, ώστε ν' ακολουθήσουν τη φυσιολογική διαδικασία της γήρανσης και του θανάτου. Στα πλαίσια αυτά, μετά τη χρήση των συμβατικών θεραπευτικών σχημάτων, εάν χορηγηθούν αναστολείς της τελομεράσης είναι δυνατό να εμποδιστεί η υποτροπή της νόσου.

Διάφοροι ερευνητές υποστηρίζουν δε, ότι η θεραπευτική αυτή παρέμβαση πρέπει να είναι πολύ επιλεκτική και να επηρεάζει μόνο τα κύτταρα που έχουν ενεργοποιημένη τελομεράση, δηλ. τα νεοπλασματικά κύτταρα, τα κύτταρα αναπαραγωγής και τα αρχέγονα κύτταρα αναγεννημένου ιστού, όπως και τα κύτταρα που βρίσκονται στις κρύπτες του γαστρεντερικού συστήματος, τα βασικά κύτταρα της επιδερμίδας και τα κύτταρα του αιμοποιητικού συστήματος^{7,40}.

Οι αναστολείς της τελομεράσης είναι τροποποιημένα ολιγονουκλεοτίδια και πυρηνικά πεπτιδία νουκλεϊνικών οξέων, πιστεύεται δε ότι ο συνδυασμός τους με αντιαγγειογενετικούς παράγοντες θα φέρει καλύτερα αποτελέσματα.

Τα μικρά αυτά μόρια, δηλαδή τα τροποποιημένα ολιγονουκλεοτίδια, καθώς και τα πυρηνικά πεπτίδια, δρουν ενάντια στην τελομεράση του ανθρώπινου RNA.

Αναστολείς της τελομεράσης

Οι αναστολείς της τελομεράσης ανάλογα με τον τρόπο δράσης τους διακρίνονται σε δυο κατηγορίες: α) αναστολείς με επίδραση στην τελομεράση, β) αναστολείς με επίδραση στα τελομερίδια.⁷

A. Αναστολείς με επίδραση στην τελομεράση. 1. Αντιπληροφοριακά (antisense) ολιγονουκλεοτίδια: Πρόκειται για τροποποιημένα ολιγονουκλεοτίδια δεσοξυριβόζης (deoxyribose), τα οποία μιμούνται την αλληλουχία των τελομεριδίων και επιδρούν στην περιοχή του RNA (hTR) που λειτουργεί ως εκμαγείο^{7,41}. Αντιπροσωπευτικό μέλος της κατηγορίας αυτής είναι η φωσφοροθειοάτη (phosphorothioate). 2. Πεπτίδια νουκλεϊκών οξέων (PNAs): Αποτελούν τροποποιημένα ολιγονουκλεοτίδια, τα οποία περιέχουν μη ιονική αλυσίδα. Η δράση τους αφορά στην εμπλοκή της επεξεργασίας του RNA της τελομεράσης, στη κυτταροπλασματική μεταφορά και στη μετάφραση. Παρουσιάζουν μεγαλύτερη ικανότητα στο να παρεμποδίσουν τη τελομεράση και δρουν σε μικρότερες συγκεντρώσεις⁴¹. 3. Μόρια 2-O-Μεθύλ-RNA: Είναι ίσως οι πιο δυνατοί αναστολείς της τελομεράσης. Η χημική τους μορφή είναι παρόμοια του DNA με αποτέλεσμα να αναγνωρίζονται από τη τελομεράση⁷. 4. Αντιβιοτικά: Αμινογλυκοσίδες, όπως η νεομυκίνη και κινολόνες σε μεγάλες συγκεντρώσεις εμποδίζουν την ανάπτυξη και μειώνουν τη δράση της τελομεράσης σε κυτταρικές σειρές μεταβατικού τύπου καρκινώματος⁴¹. 5. Πρωτεΐνες: αρκετές πρωτεΐνες όπως HIV gp120, TGF-β1, pRb, καθώς και η προσταγλανδίνη A₁ έχει παρατηρηθεί ότι παρεμποδίζουν τη τελομεράση⁴⁰. 6. Ρυθμιστές γονιδίων: Κατά την εισαγωγή μεταλλαγμένου RNA στο εσωτερικό του κυττάρου είναι δυνατό να παρατηρηθεί αντιμαχία με το φυσιολογικό RNA για την αλληλοεπίδραση με τις πρωτεΐνες και τελικώς το σχηματισμό συμπλέγματος τελομεράσης. Οι τροποποιημένες τελομεράσες στη συνέχεια φέρουν λανθασμένα νουκλεοτίδια στα τελικά μέρη του χρωμοσώματος, με αποτέλεσμα να δημιουργούνται ασταθή τελομερίδια⁴⁰. Ανάλογη τεχνική είναι εκείνη η οποία χρησιμοποιεί επικρατές γονίδιο, το οποίο είναι υπεύθυνο για τη κωδικοποίηση της μεταλλαγμένης και ανενεργούς αναστροφής μεταγραφάσης⁴².

B. Επίδραση στα τελομερίδια. 1. Παράγοντες που επιδρούν στα G-guadruplex. Η τελομεράση για να δράσει στα τελομερίδια είναι απαραίτητο να υπάρξει αποσύνδεση των G-guadruplex. Διάφοροι παράγοντες είναι ικανοί να σταθεροποιήσουν τα G-guadruplex ή να συνδυαστούν μαζί τους, με αποτέλεσμα να μην είναι αναγνωρίσιμα από τη τελομεράση⁷. 2. Αναστολείς αναστροφής μεταγραφάσης: Πρόκειται για παράγοντες που επιδρούν στο ενεργό τμήμα της τελομεράσης, την πολυμεράση, είναι δε γνωστοί για την αποτελεσματικότητά τους έναντι του HIV. Διάφορες έρευνες που αφορούν στη δράση του AZT και του ddG σε μακράς διάρκειας καλλιέργειες κυττάρων B και T δείχνουν ότι και τα δύο προκάλεσαν εμπλοκή της τελομεράσης, αλλά δεν παρουσιάστηκε κανένα φαινόμενο γήρανσης, με αποτέλεσμα να δημιουργηθεί η υποψία ότι υπάρχει κάποιος ρυθμιστικός παράγοντας που προφυλάσσει από τη περαιτέρω απώλεια του DNA των τελομεριδίων^{7,41}.

Υπάρχουν δυνητικοί κίνδυνοι, κατά τη θεραπεία με τη χρήση των αναστολέων της τελομεράσης, ιδίως όσον αφορά στη δράση τους στα αρχέγονα κύτταρα. Ωστόσο, είναι πιθανό ότι αυτή η προσέγγιση στη θεραπεία του καρκίνου θα είναι λιγότερο τοξική από τη συμβατική χημειοθεραπευτική αγωγή με τις γνωστές βαριές παρενέργειές της, όπως θρομβοπενία, λευκοπενία, ναυτία, αλωπεκία, που οφείλονται στο θάνατο των κυττάρων. Οι αναστολείς της τελομεράσης μπορεί να χρησιμοποιηθούν σε συνδυασμό ή να έπονται των συμβατικών θεραπευτικών σχημάτων ή μπορεί να χρησιμοποιηθούν μόνο σε πρώιμα στάδια καρκίνου για ν' αποτρέψουν την μεταστατική δυναμική των καρκινικών κυττάρων.

ΤΕΛΟΜΕΡΑΣΗ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΟΣ ΚΑΡΚΙΝΟΣ

Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι το 88% των καρκίνων του γυναικολογικού συστήματος εκφράζουν θετικά την τελομεράση και πιο συγκεκριμένα, η δραστηριότητά της ανιχνεύτηκε σε μεγάλο ποσοστό σε καρκίνο των ωοθηκών, του τραχήλου της μήτρας και του ενδομητρίου⁴³. Οι προνεοπλασματικές αλλοιώσεις, όπως ενδοεπιθηλιακές νεοπλασίες του τραχήλου μήτρας, καθώς και τα καλοήθη νεοπλάσματα, παρουσιάζουν αμελητέα δραστηριότητα της τελομεράσης.

Οι παραπάνω παρατηρήσεις οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι η ενεργοποίηση της τελομεράσης είναι κοινή στα κακοήθη νεοπλάσματα του γυναικολογικού συστήματος και παίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένειά τους. Ωστόσο, σύμφωνα με μελέτες το 10% των κακοήθων νεοπλασμάτων αναπτύσσεται ανεξάρτητα της δραστηριότητας της τελομεράσης, γεγονός που υποδηλώνει ότι η τελομεράση δεν είναι ο μοναδικός παράγοντας που ελέγχει τη σταθερότητα των τελομεριδίων⁴⁴.

1. Καρκίνος ωοθηκών

Ο καρκίνος των ωοθηκών βρίσκεται στην έκτη θέση μεταξύ των καρκίνων που αφορούν στις γυναίκες και αποτελεί

το 5% όλων των μορφών καρκίνου⁴⁵. Στην Ευρώπη αναφέρονται 63.000 νέες περιπτώσεις καρκίνου των ωοθηκών ετησίως, ενώ υπολογίζονται περίπου 41.000 θάνατοι που συνδέονται με αυτή τη μορφή καρκίνου⁴⁶. Η πενταετής επιβίωση είναι περίπου 37%⁴⁷. Τα επιθηλιακά καρκινώματα αποτελούν το 80 - 90% των ωοθηκικών νεοπλασμάτων, ενώ το 10 - 20% αποτελείται κυρίως από όγκους των αρχέγονων γεννητικών κυττάρων.

Ο Counter και συν.⁴⁸ ήταν οι πρώτοι που παρατήρησαν τη δραστηριότητα της τελομεράσης στον καρκίνο των ωοθηκών χρησιμοποιώντας δείγματα ασπιτικού υγρού. Σύμφωνα με παρατηρήσεις τους, τα καρκινικά κύτταρα που απομονώθηκαν στο ασπιτικό υγρό, που ελήφθη κατά τη διάρκεια διαγνωστικής λαπαροτομίας ή μετά από παρακέντηση της περιτοναϊκής κοιλότητας, παρουσίασαν δραστηριότητα τελομεράσης, σε αντίθεση με τα φυσιολογικά επιθηλιακά κύτταρα που ελήφθησαν από την επιφάνεια των ωοθηκών⁴⁸. Σε μελέτες που ακολούθησαν, η τελομεράση ανιχνεύτηκε στο 86% - 93% των καρκινωμάτων των ωοθηκών, ενώ δεν εντοπίστηκε σε δείγματα φυσιολογικού ιστού^{43,49}.

Περιπτώσεις καλοήθων νεοπλασμάτων, όπως βλεννώδες κυσταδένωμα και δερμοειδής κύστη, παρουσίασαν χαμηλή δραστηριότητα τελομεράσης, γεγονός που μπορεί να εξηγηθεί λόγω της παρουσίας αρχέγονων κυττάρων στις ωοθήκες, τα οποία εκφράζουν τη τελομεράση⁴³. Επιπλέον, η έκφραση της τελομεράσης σε καλοήθη νεοπλάσματα είναι πιθανό να παίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση και εξέλιξη αυτών των αλλοιώσεων. Οι όγκοι οριακής κακοήθειας εμφάνισαν χαμηλή δραστηριότητα της τελομεράσης, η οποία μπορεί να οφείλεται στην ύπαρξη αθάνατων κυτταρικών πληθυσμών, οι οποίοι είναι ικανοί στη συνέχεια να εκτραπούν προς κακοήθη νεοπλάσματα.⁴³

Σε καρκινώματα του μαστού διαπιστώθηκε συσχετισμός μεταξύ σταδίου της νόσου και δραστηριότητας της τελομεράσης⁵⁰. Σύμφωνα με τους Kyo και συν. ανάλογος συσχετισμός παρατηρήθηκε και στο καρκίνο των ωοθηκών⁴³. Σύμφωνα με μελέτες, κακοήθη νεοπλάσματα σταδίου Ia παρουσίασαν χαμηλή δραστηριότητα τελομεράσης σε αντίθεση με αντίστοιχα προχωρημένου σταδίου, δημιουργώντας έτσι την υπόθεση συσχετισμού μεταξύ έκφρασης της τελομεράσης και του βαθμού διήθησης⁴³.

Όσον αφορά στην υποψία καρκίνου των ωοθηκών, θα ήταν μεγάλο πλεονέκτημα εάν μπορούσε να διαγνωσθεί μέσω εξέτασης ασπιτικού υγρού, του οποίου η λήψη γίνεται με παρακέντηση και απαιτεί ελάχιστη παρεμβατικότητα⁴⁹. Ωστόσο, διάφορες έρευνες σε ασπιτικό υγρό έδειξαν ότι δεν υπάρχει ικανοποιητικός συσχετισμός μεταξύ της παρουσίας καρκινικών κυττάρων και αύξησης της δραστηριότητας της τελομεράσης. Η δραστηριότητα της τελομεράσης των περιεχομένων στο ασπιτικό υγρό καρκινικών κυττάρων μπορεί να επικαλυφθεί από την παρουσία άφθονων μη νεοπλασματικών μεσοθηλιακών κυττάρων⁴⁹.

Η δραστηριότητα της τελομεράσης και η έκφραση του γονιδίου της (hTERT) μπορούν να χρησιμοποιηθούν και ως δείκτες στην ανταπόκριση σε χημειοθεραπευτική αγωγή ασθενών με καρκίνο των ωοθηκών⁵¹. Έχει παρατηρηθεί μείωση της έκφρασης αυτών των δεικτών μετά από θεραπεία με cisplatin, η οποία είναι δόσο-εξαρτώμενη και χρόνο-εξαρτώμενη της αγωγής⁵¹.

2. Καρκίνος του τραχήλου της μήτρας

Ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας είναι ο δεύτερος σε συχνότητα καρκίνος στο γυναικείο πληθυσμό παγκοσμίως. Στην Ευρώπη καταγράφονται 60.000 νέες περιπτώσεις και περίπου 30.000 θάνατοι κάθε χρόνο⁴⁶. Ο συχνός έλεγχος με το τεστ Παπανικολάου έχει οδηγήσει στην αύξηση του ποσοστού διάγνωσης των προκαρκινικών αλλοιώσεων, με αποτέλεσμα ο δείκτης θνησιμότητας να μειωθεί σημαντικά. Σύμφωνα με μελέτες, η δραστηριότητα της τελομεράσης ανιχνεύθηκε στο 96% των καρκίνων του τραχήλου, ενώ η δραστηριότητα αυτή απουσίαζε σε υλικό φυσιολογικού ιστού⁵². Ωστόσο, ο ρόλος της τελομεράσης στις προνεοπλασματικές αλλοιώσεις (CIN) και στην εξέλιξη της νόσου παραμένει αδιευκρίνιστος.

Ο Wisman και συν. συνέκριναν τη δραστηριότητα της τελομεράσης σε υλικό απόξεσης τραχήλου και ψυκτικών τομών που ελήφθη από την ίδια ασθενή. Στο υλικό απόξεσης η τελομεράση ανιχνεύτηκε με βάση το πρωτόκολλο TRAP, όπου η δραστηριότητά της παρουσίασε χαμηλή ευαισθησία διάγνωσης για ενδοεπιθηλιακές αλλοιώσεις CIN II, CIN III και διηθητικό καρκίνο του τραχήλου, με αποτέλεσμα να μη θεωρείται αξιόπιστος δείκτης για πρόωμη διάγνωση. Σε τομές ψυκτικού όμως, η δραστηριότητα της τελομεράσης ήταν ανάλογη του βαθμού της ενδοεπιθηλιακής αλλοίωσης (CIN) και της διήθησης του καρκίνου, γεγονός που ενισχύει την άποψη ότι μπορεί να αποτελέσει πιθανό δείκτη εξέλιξης της νόσου⁵³.

Σύμφωνα με άλλες μελέτες που χρησιμοποίησαν τη μέθοδο TRAP σε υλικό απόξεσης, είναι πιθανή η εμφάνιση ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων εξαιτίας της παρουσίας μη δυσπλαστικών κυττάρων, θετικών στη τελομεράση, όπως κύτταρα με πλακώδη μετάπλαση και φλεγμονώδη κύτταρα⁵⁴. Ο Bravaccini και συν. με τη μέθοδο TRAP δεν παρατήρησαν διαφορές της έκφρασης της τελομεράσης μεταξύ των διάφορων βαθμών δυσπλαστικών αλλοιώσεων⁵⁴. Η χρήση νέων μονοκλωνικών αντισωμάτων με την εφαρμογή ανοσοϊστοχημικών μεθόδων για την ανίχνευση της τελομεράσης, ανέδειξε υψηλότερο ποσοστό έκφρασης της τελομεράσης σε αλλοιώσεις CIN II και CIN III σε σχέση με CIN I και επιπλέον η έκφραση της τελομεράσης δεν ήταν μόνο πυρηνική αλλά και κυτταροπλασματική⁵⁴.

Στην παθογένεια της ενδοεπιθηλιακής νεοπλασίας και του διηθητικού καρκίνου εμπλέκεται η λοίμωξη με HPV και κυρίως οι τύποι 16, 18, 31, 33, 35 του ιού. Ο Jarboe και συν. μελέτησαν το ρόλο του DNA του ιού HPV 16/18 σε σχέση με τη δραστηριότητα της τελομεράσης ως δείκτες ενδοεπιθηλιακών αλλοιώσεων σε κυτταρολογικά επιχρίσματα. Η κατάδειξη της δραστηριότητας της τελομεράσης παρουσίασε διαγνωστική ευαισθησία 29,9% και διαγνωστική ακρίβεια 94% στις ενδοεπιθηλιακές νεοπλασίες CIN II/III, οι οποίες και επιβεβαιώθηκαν με βιοψία. Οι υψηλού κινδύνου HPV 16/18 ανιχνεύθηκαν στο 70,1% των περιπτώσεων CIN II/III και παρουσίασαν διαγνωστική ακρίβεια 62,5%⁵⁵.

Σε ανάλογη έρευνα ο προσδιορισμός της δραστηριότητας της τελομεράσης παρουσίασε διαγνωστική ακρίβεια 95,8% σε ιστολογικές τομές και 79,1% σε υλικό απόξεσης, σε αλλοιώσεις καρκίνου του τραχήλου⁵⁶. Σε ιστολογικές τομές η ανίχνευση του HPV 16/18 παρουσίασε διαγνωστική ακρίβεια 89,5% και 70,5% σε υλικό απόξεσης. Σύμφωνα με την ίδια μελέτη, υπήρξε συμφωνία 71% μεταξύ της δραστηριότητας της τελομεράσης και της λοίμωξης HPV 16/18. Η απουσία έκφρασης της τελομεράσης σε υλικό απόξεσης υγιών γυναικών ενισχύει την άποψη ότι μπορεί να αποτελέσει πιθανό δείκτη πρόωμης διάγνωσης του καρκίνου του τραχήλου⁵⁶.

3. Καρκίνος του ενδομητρίου

Ο καρκίνος του ενδομητρίου είναι τέταρτος σε σειρά συχνότητας μετά τον καρκίνο του μαστού, του πνεύμονα και του παχέος εντέρου⁴⁶. Το 2002 αναφέρθηκαν περίπου 170.000 νέες περιπτώσεις καρκίνου του ενδομητρίου παγκοσμίως⁴⁶. Αποτελεί το συχνότερο καρκίνο του γεννητικού συστήματος των γυναικών και το 6% όλων των καρκίνων στο γυναικείο πληθυσμό. Τα τελευταία χρόνια η αναλογία μεταξύ καρκίνου του τραχήλου και του ενδομητρίου είναι 1/1⁴⁶.

Το ενδομήτριο, κατά τη διάρκεια του εμμηνορρυσιακού κύκλου, περνάει από την παραγωγική στην εκκριτική φάση και τέλος εισέρχεται στην εμμηνορρυσιακή φάση. Μετά την εμμηνόπαυση ο αριθμός των αδένων ελαττώνεται, με αποτέλεσμα το ατροφικό ενδομήτριο. Ο Yokoyama και συν. ανίχνευσαν δραστηριότητα τελομεράσης στο 88% των παρασκευασμάτων ενδομητρίου παραγωγικής φάσης και μόνο στο 19% σε ενδομήτριο εκκριτικής φάσης. Σε ενδομήτριο μετά την εμμηνόπαυση δεν παρατηρήθηκε δραστηριότητα της τελομεράσης⁵⁷.

Κατά την παραγωγική φάση το ενδομήτριο βρίσκεται υπό την επίδραση των οιστρογόνων. Τα οιστρογόνα επιδρούν σε πυρηνικούς υποδοχείς, είναι ικανά να προκαλέσουν την έκφραση ορισμένων γονιδίων και να οδηγήσουν στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων - στόχων. Η τελομεράση φαίνεται ότι συσχετίζεται με τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων και βρίσκεται υπό οιστρογονικό έλεγχο⁵⁷. Αντίθετα, το 90% των καρκινικών κυττάρων εμφανίζει δραστηριότητα τελομεράσης με αποτέλεσμα να δημιουργηθεί η υπόθεση ότι η έκθεση για μεγάλο χρονικό διάστημα σε οιστρογόνα παίζει σημαντικό ρόλο στην καρκινογένεση, όχι μόνο προκαλώντας τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, αλλά ενεργοποιώντας και την τελομεράση⁵⁷.

Ο Kyo και συν. παρατήρησαν υψηλά επίπεδα τελομεράσης στο τέλος της παραγωγικής φάσης και σημαντική μείωση κατά τη διάρκεια της εκκριτικής φάσης⁵⁸. Ωστόσο, σε μελέτη του Lehner και συν. η δραστηριότητα της τελομεράσης σε αδενοκαρκίνωμα ενδομητρίου ήταν υψηλότερη εκείνης που παρατηρήθηκε στο τέλος της παραγωγικής φάσης⁵⁹. Η ποσοτική ανάλυση της δραστηριότητας της τελομεράσης και του hTERT mRNA μπορεί να βοηθήσει στη διάγνωση και πρόγνωση του καρκίνου του ενδομητρίου, τόσο κατά τη διάρκεια του εμμηνορρυσιακού κύκλου, όσο και κατά την εμμηνόπαυση⁵⁹. Επιπλέον, δείγματα ενδομητρίου από ασθενείς με ενδομητρίωση παρουσίασαν υψηλά επίπεδα τελομεράσης και hTERT mRNA⁶⁰. Τα ευρήματα αυτά οδηγούν στην υπόθεση ότι ο πολλαπλασιασμός των ενδομητριακών κυττάρων μπορεί να σχετίζεται με την παθογένεια της ενδομητρίωσης⁶⁰.

4. Καρκίνος του μαστού

Ο καρκίνος του μαστού αποτελεί την πρώτη αιτία θανάτου στις γυναίκες ηλικίας έως 55 ετών, ενώ για μεγαλύτερες ηλικίες αποτελεί τη δεύτερη αιτία θανάτου, δεδομένου ότι προηγούνται οι καρδιαγγειακές παθήσεις. Ευθύνεται για το 31% νέων περιπτώσεων καρκίνου στις Η.Π.Α το 2002 και χαρακτηρίζεται ως η κύρια αιτία θανάτου στις ηλικίες από 15 έως 55 ετών⁶¹. Στην Ευρώπη καταγράφονται 360.000 νέες περιπτώσεις και περίπου 129.000 θάνατοι ετησίως⁴⁶.

Έρευνες έδειξαν ότι το 88% των καρκίνων του μαστού είναι θετικοί στο πρωτόκολλο TRAP ανίχνευσης τελομεράσης, ενώ λεπτομερείς μελέτες των αρνητικών δειγμάτων για τελομεράση έδειξαν ότι το ποσοστό μπορεί να αγγίξει ακόμα και το 95% των περιπτώσεων⁶². Σύμφωνα με τους Shay και Bacchetti το 75% των καρκινωμάτων in situ (μη διηθητικό καρκίνωμα), το 88% των πορογενών και λοβιακών καρκινωμάτων και το 5% των παράπλευρων ιστών ανέδειξαν θετική δραστηριότητα της τελομεράσης με τη μέθοδο TRAP, ενώ οι φυσιολογικοί ιστοί δεν παρουσίασαν θετική δραστηριότητα⁶³.

Ο Yashima και συν. παρατήρησαν προοδευτική αύξηση της έκφρασης της τελομεράσης ανάλογα με τη βαρύτητα των ιστοπαθολογικών αλλοιώσεων⁶⁴. Το 14% των καλοήθων όγκων, το 92% των καρκινωμάτων in situ και το 94% των διηθητικών καρκίνων του μαστού ανέδειξε θετική έκφραση για την τελομεράση⁶⁴. Επιπλέον, μελέτες σε κυττα-

ρολογικό υλικό FNA από καρκίνο του μαστού, έδειξαν θετική έκφραση για τελομεράση στο 92% των περιπτώσεων και αρνητική έκφραση στο 94% των καλοήθων αλλοιώσεων⁶⁵. Όλες οι περιπτώσεις επιχρισμάτων FNA που ανέδειξαν χαρακτηρισές ατυπίας και θετική δραστηριότητα τελομεράσης, μετά από χειρουργική εξαίρεση της αλλοίωσης και ιστολογική εξέταση διαπιστώθηκε ότι επρόκειτο για καρκινώματα, ενώ 6/7 περιπτώσεις με αρνητική έκφραση τελομεράσης διαγνώστηκαν ως καλοήθειες⁶⁶.

Σύμφωνα με τον Hoos και συν. υπάρχει σημαντική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης της τελομεράσης και του μεγέθους του καρκινώματος, της διήθησης των λεμφαδένων, το στάδιο της νόσου, ενώ θεωρεί την τελομεράση σαν ισχυρό προγνωστικό δείκτη⁶⁷. Υψηλή δραστηριότητα της τελομεράσης στον καρκίνο του μαστού συνδέθηκε και με γενετικές μεταλλάξεις στα γονίδια hTR (3q), c-myc (8q), p53(17p), τα οποία εμπλέκονται στην καρκινογένεση και συμμετέχουν επιπλέον, στον έλεγχο της τελομεράσης⁶⁸.

Το επιστημονικό ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια έχει επικεντρωθεί στους αναστολείς της τελομεράσης. Η παρεμπόδιση της τελομεράσης in vitro επιφέρει προοδευτική βράχυνση των τελομεριδίων, με αποτέλεσμα την εμπλοκή της κυτταρικής ανάπτυξης ή τον κυτταρικό θάνατο, επειδή τα βραχέα τελομερίδια δημιουργούν βλάβες στο DNA⁶². Καρκινικά κύτταρα του μαστού με υψηλό ρυθμό κυτταρικής διαίρεσης και ήδη βραχέα τελομερίδια είναι πιο επιρρεπή στους αναστολείς της τελομεράσης, ενώ τα φυσιολογικά κύτταρα με μακρύτερα τελομερίδια είναι πιο ανθεκτικά. Το αποτέλεσμα των αναστολέων της τελομεράσης εξαρτάται από το αρχικό μήκος των τελομεριδίων, το ρυθμό της κυτταρικής διαίρεσης και μπορεί να μεσολαβήσουν εβδομάδες και μήνες για να φανούν αλλαγές στο μέγεθος του καρκίνου⁶². Η θεραπεία με αναστολείς της τελομεράσης είναι πιθανό να μην έχει τοξικότητα ανάλογη των υπολοίπων χημειοθεραπευτικών σκευασμάτων, λόγω της έλλειψης τελομεράσης στα περισσότερα σωματικά κύτταρα.

Τα φυσιολογικά αρχέγονα κύτταρα, τα οποία είναι θετικά στην τελομεράση, περιέχουν τελομερίδια με ικανοποιητικό μήκος και προστατεύονται με αυτό τον τρόπο από βλάβες στο DNA και εμπλοκή της κυτταρικής αύξησης. Επιπλέον, τα περισσότερα αρχέγονα κύτταρα βρίσκονται σε κατάσταση ηρεμίας και η βράχυνση των τελομεριδίων επέρχεται μόνο με τη κυτταρική διαίρεση⁶². Ο συνδυασμός αναστολέων της τελομεράσης με τις παρούσες θεραπείες μπορεί να αποτελέσει ικανοποιητικό τρόπο αντιμετώπισης του καρκίνου του μαστού.

SUMMARY

Telomeres are specialized structures present at the distal end of chromosomes which have a function in chromosome protection, positioning and replication. The DNA component of telomeres is generally characterized by a G - rich strand composed of a simple tandemly repeated sequence (TTAGGG). Telomerase is a ribonucleoprotein enzyme that uses an internal RNA template to specifically direct telomere synthesis.

Telomerase plays an essential role in the dynamic process of telomere length regulation in vivo by restoring telomeric sequences that are lost during semiconservative DNA replication. The enzyme is expressed in embryonic cells and in adult male germline cells, but is undetectable in normal somatic cells, except for proliferative cells of renewal tissues (hematopoietic stem cells, activated lymphocytes, basal cells of the epidermis, intestinal crypt cells). In normal somatic cells, progressive telomere shortening is observed, eventually leading to greatly shortened telomeres and to a limited replicative capacity. It has been proposed that telomere shortening may be a molecular clock that counts the number of times a cell has divided and determines when cellular senescence occurs.

Telomerase activity is also demonstrable in the vast majority of human cancer (66% - 97%). The progressive telomere shortening is halted in cancer cells by the presence of the enzyme telomerase, which maintains and stabilizes the telomeres, allowing cells to divide indefinitely. Recent studies suggest that about 90% of gynecological tumors, including cervical cancers, endometrial cancers, ovarian cancers and breast cancers, were positive for telomerase activity, whereas telomerase expression was weak and less common in premalignant and benign lesions.

This review describes the telomerase activity in human gynecological malignancies and evaluate whether increased telomerase activity can be clinically useful for detecting malignant cells in a variety of gynecological specimens.

Key words: telomere, telomerase, ovarian cancer, cervical cancer, endometrial cancer, breast cancer.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Shay J, Wright W. Hallmarks in ageing research. *J Pathol* 2007; 211(2):114-23.
2. Shay J, Wright W. Telomeres, telomerase and tumors. *Educational Book, 33th ASCO, Denver 1997; 49-56.*
3. Newbold RF. The significance of telomerase activation and cellular immortalization in human cancer. *Mutagenesis* 2002; 17(6):539-50.
4. Greider CW, Blackburn EH. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts. *Cell* 1985; 43:405-413.
5. Blackburn E. Telomeres and telomerase in health and disease. *Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences. Heineken Lecture 2004; 1-33.*

6. Herbert BS, Wright WE, Shay JW. Telomerase and breast cancer. *Breast Cancer Res* 2001; 3(3):146-9.
7. Chatziantoniou VD. Telomerase: Biological function and potential role in cancer management. *Pathol Oncol Res* 2001; 7(3):161-170.
8. Beattie TL, Zhou W, Robinson MO et al. Polymerization defects within human telomerase are distinct from telomerase RNA and TEP1 binding. *Mol Biol Cell* 2000; 11(10):3329-40.
9. Pollard T, Earnshaw WC. *Cell biology*. Elsevier, Philadelphia. 2004; 191-192.
10. Harley CB. Telomere loss: mitotic clock or genetic time bomb? *Mutat Res* 1991; 256(2-6):271-82.
11. Oshimura M, Barrett JC. Multiple pathways to cellular senescence: role of telomerase repressors. *Eur J Cancer* 1997; 33(5):710-5.
12. Counter CM. The role of telomeres and telomerase in cell life span. *Mutat Res* 1996; 366(1):45-63.
13. Allsop RC, Morin GB, Horner JW et al. Telomerase is required to slow telomere shortening and extend replicative lifespan of HSCs during serial transplantation. *Blood* 2003; 102(2):517-20.
14. Morrison SJ, Prowse KR, Ho P, Weissman IL. Telomerase activity in hematopoietic cells is associated with self-renewal potential. *Immunity* 1996; 5:207-216.
15. Shay JW, Peirera-Smith O, Wright WE. A role for both Rb and p53 in the regulation of cellular senescence. *Exp Cell Res* 1991; 196:33-39.
16. Counter CM, Avilion AA, LeFeuvre CE et al. Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *EMBO J* 1992; 11:1921-1929.
17. Hiyama E, Hiyama K, Tatsumoto N et al. Telomerase activity in human intestine. *Int J Oncol* 1996; 9:453-458.
18. Taylor RS, Ramirez RD, Ogoshi M et al. Telomerase activity in malignant and non malignant skin conditions. *J Invest Dermatol* 1996; 106:759-765.
19. Piatyszek MA, Kim NW, Weinrich SL et al. Detection of telomerase activity in human cells and tumors. *Methods Cell Sci* 1995; 17:1-15.
20. Shay JW, Bacchetti S. A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer* 1997; 33(5):789-91.
21. Yim HW, Slebos RJ, Randall SH et al. Smoking is associated with increased telomerase activity in short-term cultures of human bronchial epithelial cells. *Cancer Lett* 2007; 246(1-2):24-33.
22. Shay JW, Wright WE. Telomerase activity in human cancer. *Curr Opin Oncol* 1996; 8:66-71.
23. Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PLC, Coviello GM, Wright WE, Weinrich SL, Shay JW. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 1994; 266:2011-15.
24. Durusoy M, Ozturk K. Methods used in evaluating telomerase activity. *Turk J Med Sci* 2001; 31:381-4.
25. Hirose M, Hashimoto JA, Ogura K, Tahara H, Ide T, Yoshimura T. A rapid useful and quantitative method to measure telomerase activity by hybridization protection assay connected with a telomeric repeat amplification protocol. *J Cancer Res Clin Oncol* 1997; 123:337-44.
26. Aldous WK, Grabill NR. A fluorescent method for detection of telomerase activity. *Diagnostic Molecular Pathology* 1997; 6(2):102-10.
27. Tatematsu K, Nakayama J, Danbara M, Shionoya S, Sato H, Omine M, Ishikawa F. A novel quantitative stretch PCR assay that detect a dramatic increase in telomerase activity during the progression of myeloid leukaemia. *Oncogene* 1996; 13:2265-74.
28. Gelmini S, Caldini A, Becherini L, Capaccioli S, Pazzagli M, Orlando C. Rapid, quantitative non-isotopic assay for telomerase activity in human tumors. *Clinical Chemistry* 1998; 44(10):2133-8.
29. Ohyashiki K, Ohyashiki JH, Nishimaki J, Toyama K, Elbihara Y, Kato H, Wright WE, Shay JW. Cytological detection of telomerase activity using an in situ telomeric repeat amplification protocol assay. *Cancer Res* 1997; 57:2100-3.
30. Hirose M, Hashimoto JA, Tahara H, Ide T, Yoshimura T. New method to measure telomerase activity by transcription-mediated amplification and hybridization protection assay. *Clinical Chemistry* 1998; 44(12):2446-52.
31. Kyo S, Kanaya T, Takakura M, Tanaka M, Inoue M. Human telomerase reverse transcriptase as a critical determinant of telomerase activity in normal and malignant endometrial tissues. *Int J Cancer* 1999; 80:60-3.
32. Yajima T, Yagihashi A, Kameshima H, Kobayashi D, Furuya D, Hirata K, Watanabe N. Quantitative reverse transcription-PCR assay of the RNA component of human telomerase using the TaqMan fluorogenic detection system. *Clinical Chemistry* 1998; 44(12):2441-5.
33. Fletcher TM, Trevino A, Woynarowski JM. Enzymatic activity of endogenous telomerase associated with intact nuclei from human leukaemia CEM cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 265(1):51-6.
34. Uhlmann V, Prasad M, Silva I et al. Improved in situ detection method for telomeric tandem repeats in metaphase spreads and interphase nuclei. *Mol Pathol* 2000; 53(1):48-50.
35. Chen XQ, Bonnefoi H, Pelté MF, Lyautey J, Lederrey C, Movarekhi S, Schaeffer P, Mulcahy HE, Meyer P, Stroun M, Anker P. Telomerase RNA as a detection marker in the serum of breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2000; 6(10):3823-6.
36. Lin KW, Yan J. The telomere length dynamic and methods of its assessment. *J Cell Mol Med* 2005; 9(4):977-89. Review.
37. Fajkus J. Detection of telomerase activity by the TRAP assay and its variants and alternatives. *Clin Chim Acta* 2006; 371(1-2):25-31.
38. Heller-Uszynska K, Kilian A. Microarray TRAP – a high throughput assay to quantitate telomerase activity. *Biochem Biophys Res Commun* 2004 Oct 15; 323(2):465-72.
39. Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 1995; 270(5235):467-470.
40. Lichtsteiner SP, Lebkowski JS, Vasserot AP. Telomerase: A target for anticancer therapy. *Ann NY Acad Sci* 1999; 886:1-11.
41. Davis AJ, Siu LL. Telomerase: therapeutic potential in cancer. *Cancer Invest* 2000; 18:269-77.
42. Hahn WC, Stewart W, Brooks MW et al. Inhibition of telomerase limits the growth of human cancer cells. *Nature Med* 1999; 5:1164-70.
43. Kyo S, Kanaya T, Ishikawa H, Ueno H, Inoue M. Telomerase activity in gynecological tumors. *Clin Cancer Res* 1996; 2(12):2023-8.
44. Bryan TM, Englezou A, Gupta J, Bacchetti S, Reddel RR. Telomere elongation in immortal human cells without detectable telomerase activity. *EMBO J* 1995; 14(17):4240-8.
45. Ferlay J, Bray F, Sankila R, Parkin DM. *EUCAN: Cancer incidence, mortality and prevalence in the European Union 1995, version 2.0*. IARC CancerBase No. 4. Lyon, IARC Press, 1999.
46. IARC. *GLOBOCAN 2002. Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide (2002 estimates) 2004*.
47. Berrino F, Capocaccia R, Coleman MP, Esteve J, Gatta G, Hakulinen T, et al. *Survival of cancer patients in Europe: the EUROCARE-3*

- study. *Ann Oncol* 2003; 14 Suppl 5.
48. Counter CM, Hirte HW, Bacchetti S, Harley CB. Telomerase activity in human ovarian carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:2900-4.
 49. Gorham H, Yoshida K, Sugino T, Manek S, Charnock M, Tarin D, Goodison S. Telomerase activity in human gynaecological malignancies. *J Clin Pathol* 1997; 50:501-4.
 50. Hiyama E, Gollahon L, Kataoka T, Kuroi K, Yokoyama T, Gazdar AF, Hiyama K, Piatyszek MA. Telomerase activity in human breast tumors. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88(2):116-22.
 51. Sun PM, Wei LH, Luo MY, Liu G, Wang JL, Mustea A, Konsgen D, Lichtenegger W, Sehouli J. The telomerase activity and expression of hTERT gene can serve as indicators in the anti-cancer treatment of human ovarian cancer. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2007; 130(2):249-57.
 52. Reddy VG, Khanna N, Jain SK, Das BC, Singh N. Telomerase. A molecular marker for cervical cancer screening. *Int J Gynecol Cancer* 2001; 11(2):100-6.
 53. Wisman GB, Hollema H, de Jong S, ter Scheggest J, Tjong-A-Hung SP, Ruiters MH, Krans M, de Vries EG, van der Zee AG. Telomerase activity as a biomarker for (pre)neoplastic cervical disease in scrapings and frozen sections from patients with abnormal cervical smear. *J Clin Oncol* 1998; 16(6):2238-45.
 54. Bravaccini S, Sanchini MA, Amadori A, Medri L, Saragoni L, Calistri D, Monti F, Volpi A, Amadori D. Potential of telomerase expression and activity in cervical specimens as a diagnostic tool. *J Clin Pathol* 2005; 58(9):911-4.
 55. Jarboe EA, Thompson LC, Heinz D, McGregor JA, Shroyer KR. Telomerase and human papillomavirus as diagnostic adjuncts for cervical dysplasia and carcinoma. *Hum Pathol* 2004; 35(4):393-5.
 56. Reddy VG, Khanna N, Jain SK, Das BC, Singh N. Telomerase - A molecular marker for cervical cancer screening. *Int J Gynecol Cancer* 2001; 11(2):100-6.
 57. Yokoyama Y, Takahashi Y, Morishita S, Hashimoto M, Niwa K, Tamaya T. Telomerase activity in the human endometrium throughout the menstrual cycle. *Mol Hum Reprod* 1998; 4(2):173-7.
 58. Kyo S, Takakura M, Kohana T, Inoue M. Telomerase activity in human endometrium. *Cancer Res* 1997; 57(4):610-4.
 59. Lehner R, Enomoto T, McGregor JA, Shroyer AL, Haugen BR, Pugazhenti U, Shroyer KR. Quantitative analysis of telomerase hTERT mRNA and telomerase activity in endometroid adenocarcinoma and in normal endometrium. *Gynecol Oncol* 2002; 84(1):120-5.
 60. Kim CM, Oh YZ, Cho SH, Chung DJ, Hwang JY, Park KH, Cho DJ, Choi YM, Lee BS. Increased telomerase activity and human telomerase reverse transcriptase mRNA expression in the endometrium of patients with endometriosis. *Hum Reprod* 2006 Oct 31; [Epub ahead of print].
 61. Jemal A, Thomas A, Murray T, Thun M. Cancer Statics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2002; 52(1):23-47.
 62. Herbert BS, Wright WE, Shay JW. Telomerase and breast cancer. *Breast Cancer Res* 2001; 3(3):146-9.
 63. Shay JW, Bacchetti S. A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer* 1997; 33:787-91.
 64. Yashima K, Milchgrub S, Gollahon LS, Maitra A, Saboorian MH, Shay JW, Gazdar AF. Telomerase enzyme activity and RNA expression during the multistage pathogenesis of breast carcinoma. *Clin Cancer Res* 1998; 4:229-34.
 65. Poremba C, Shroyer KR, Frost M, Diallo R, Fogt F, Schafer KL, Burger H, Shroyer AL, Dockhom-Dwomiczak B, Boecker W. Telomerase is a highly sensitive and specific molecular marker in fine-needle aspirates of breast lesions. *J Clin Oncol* 1999; 17:2020-6.
 66. Hiyama E, Saeki T, Hiyama K, Takashima S, Shay JW, Matsuura Y, Yokoyama T. Telomerase activity as a marker of breast carcinoma in fine-needle aspirated samples. *Cancer Cytopathol* 2000; 90:235-8.
 67. Hoos A, Hepp HH, Kaul S, Ahlert T, Bastert G, Wallweiner D. Telomerase activity correlates with tumor aggressiveness and reflects therapy effect in breast cancer. *Int J Cancer* 1998; 79:8-12.
 68. Loveday RL, Greenman J, Drew PJ, Monson JRT, Kerin MJ. Genetic changes associated with telomerase activity in breast cancer. *Int J Cancer* 1999; 84:516-20.