

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ УЗБЕКИСТАН**

ТАШКЕНТСКАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ

На правах рукописи
УДК 616.155.392-036.11:616-006.441-06-07

ХУЖАХМЕДОВ Жамолиддин Джололович

**МОЛЕКУЛЯРНЫЙ АНАЛИЗ ХИМЕРНОГО ОНКОГЕНА
BCR/ABL ПРИ ОСТРОМ ЛИМФОБЛАСТНОМ ЛЕЙКОЗЕ В
УЗБЕКИСТАНЕ**

14.00.29 – Гематология и переливание крови

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата медицинских наук

Ташкент – 2012

Работа выполнена в Научно-исследовательском институте Гематологии и переливания крови Министерства здравоохранения Республики Узбекистан.

Научный руководитель:

Заслуженный деятель науки РУз,
доктор медицинских наук, профессор
КАРИМОВ Хамид Якубович

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук
**СУЛЕЙМАНОВА Дилора
Нагаловна**

доктор биологических наук,
профессор
ХАЛИКОВ Пулат Хужамкулович

Ведущая организация:

Андижанский Государственный
медицинский институт

Защита состоится «___» _____ 2012 г. в ___ час. на заседании
Объединенного Специализированного совета Д.087.09.02 при Ташкентской
медицинской академии по адресу: 100109, г. Ташкент, ул. Фароби, 2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Ташкентской
медицинской академии.

Автореферат разослан «___» _____ 2012 г.

Ученый секретарь Объединенного
специализированного совета, доктор
биологических наук, профессор

Н.М. ЮЛДАШЕВ

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДИССЕРТАЦИИ

Актуальность работы. Острые лейкозы занимают ведущее место в структуре заболеваемости гемобластозами. На долю острых лимфобластных лейкозов у взрослых приходится 20-25% (Воробьев А.И., 2002; Савченко В.Г. с соавт., 2004; Абдулкадыров К.М., 2006; Burmeister T. et al., 2007), тогда как у детей данная нозология встречается намного чаще – в 75-80% случаев всех острых лейкозов (Румянцев А.Г. с соавт., 2004). Несмотря на успехи современной полихимиотерапии и возможность достижения полной ремиссии у 80-85% больных острым лимфобластным лейкозом, длительная безрецидивная выживаемость больных не превышает 30-40%. По данным немецких и российских авторов, на эффективность терапии влияет множество прогностических факторов (Савченко В.Г. с соавт., 2002, Hoelzer D. et al., 2002). Наиболее важными из них являются возраст больного, число лейкоцитов в дебюте заболевания, иммунологический вариант острого лимфобластного лейкоза, цитогенетические и молекулярно-биологические аномалии. В зарубежной литературе описано, что наиболее значимыми факторами прогноза лейкоза является наличие цитогенетических аномалий. Так, к наиболее оцениваемым прогностическим факторам острого лимфобластного лейкоза относятся транслокации t(9;22) и t(4;11).

Транслокация t (9;22) определяется у 5-10% детей и 25-30% взрослых больных острым лимфобластным лейкозом, а t (4;11) определяется у детей в 2%, у взрослых – в 5-6% случаев. Филадельфийская хромосома (Ph), или транслокация между хромосомами 9 и 22, до недавнего времени было цитогенетическим изменением, характерным для хронического миелолейкоза (Абдулкадыров К.М., 2006). При стандартном цитогенетическом анализе транслокация между 9-м и 22-м хромосомами при остром лимфобластном лейкозе неотличима от таковой при хроническом миелолейкозе. На молекулярном уровне примерно в половине случаев у взрослых и у 20% детей изменения такие же, как при хроническом миелолейкозе. У остальных пациентов разрыв в хромосоме 22 (ген BCR) расположен ближе к центромере.

Транслокация (4;11) наиболее характерна для детей младше одного года. Лейкозы с данной транслокацией характеризуются высоким лейкоцитозом и крайне неблагоприятным прогнозом. Обнаружение указанных транслокаций всегда считается крайне неблагоприятным прогностическим признаком независимо от того, имеются ли другие факторы риска или нет (Богданов А.Н. с соавт., 2008; Воробьев А.И., 2002; Wetzler M. et al., 2004).

Степень изученности проблемы. Несмотря на давность изучения этого заболевания, многие вопросы до сих пор окончательно не изучены, особенно в диагностическом плане. Диагностика Ph-позитивного острого лимфобластного лейкоза осуществляется на основе обнаружения t (9;22) стандартным цитогенетическим методом - *in situ* флюоресцентной гибридизацией (FISH), а также с помощью полимеразной цепной реакцией (ПЦР) с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР), которая выявляет экспрессию

химерного гена BCR/ABL. При стандартном цитогенетическом анализе исследуются хромосомы, зафиксированные на стадии метафазы митоза. Анализу подвергаются минимум 20 метафаз. Анализ требует более длительное время. Необходимо отметить, что отсутствие клеток с изменением кариотипа не может быть решающим критерием для того, чтобы отвергнуть предполагаемый диагноз при подозрении на острый лейкоз. Существует множество генетических изменений, которые происходят на субмикроскопическом уровне и могут быть выявлены методами FISH и ПЦР (Ребриков Д.В., 2009; Mejstrikova E. et al., 2010). Следует отметить, что хромосомные aberrации являются «идеальными мишенями» для молекулярного мониторинга минимальной резидуальной болезни (Radich J.P., 2002; Specchia G. et al., 2004).

Наиболее чувствительным методом диагностики транслокаций на сегодняшний день является ОТ-ПЦР (Elia L. et al., 2003). ПЦР - метод синтеза нуклеиновых кислот *in vitro*, в ходе которого происходит многократная амплификация определенного участка дезоксирибонуклеиновой кислоты. Чувствительность двухраундовой ОТ-ПЦР очень высока: метод позволяет выявлять минимальное число опухолевых клеток, содержащих уникальную нуклеотидную последовательность: одна или несколько копий аномальных последовательностей на 10^6 - 10^7 нормальных клеток. Химерный транскрипт можно обнаружить как в костном мозге, так и в периферической крови (Burmeister T. et al., 2007). Анализ можно провести в течение одного дня. Однако вследствие очень высокой чувствительности метода выявляются единичные опухолевые клетки, содержащие молекулярную поломку, которые, возможно, не играют принципиальной роли в течение заболевания. Также, вследствие контаминации, возможны и ложноположительные результаты ОТ-ПЦР. По данным B.Gleisser с соавт. (2001), при проверке результатов двухраундовой ОТ-ПЦР (642 BCR/ABL+ и 176 BCR/ABL-образца) методом однораундовой ОТ-ПЦР выявлено 23,8% ложноположительных и 1,1% ложноотрицательных результатов. Поэтому, результат ОТ-ПЦР можно считать достоверным только тогда, когда он подтвержден в динамике, как минимум дважды и/или методом FISH.

Результаты лечения Ph-позитивного острого лимфобластного лейкоза крайне неудовлетворительны. Ремиссия по данным морфологического исследования костного мозга у таких больных достигается в 70% случаев, однако молекулярная ремиссия констатируется лишь у 4-18% больных. Общая выживаемость больных с Ph-позитивным острым лимфобластным лейкозом не превышает 20% в течение 3 лет (Cimino G. et al., 2006; Gleisser V. et al., 2001). Этим пациентам в программе терапии большинства исследований предусмотрено выполнение аллогенной трансплантации стволовых гемопоэтических клеток, что позволяет увеличить выживаемость до 30-35%. Использование ингибитора Abl-тирозинкиназы (STI571, Гливек) существенно изменило ситуацию: полная ремиссия достигается у 90%

больных, молекулярная ремиссия – у 60%, 2-летняя выживаемость составляет 80% (Моисеев С.И. с соавт., 2001; Fielding A.K., 2010).

В настоящее время во всех развитых странах мира ни одно клиническое исследование, направленное на улучшение результатов терапии острого лимфобластного лейкоза не проводится без определения генетических маркёров опухолевых клеток. Особенности выявления химерного онкогена BCR/ABL при остром лимфобластном лейкозе позволяет пересмотреть терапевтическую тактику, тем самым увеличивая длительность ремиссии и продолжительность жизни больных. Однако в Узбекистане до настоящего времени эта проблема не была изучена, что послужило поводом для проведения данного исследования.

Связь диссертации с тематическими планами НИР. Работа выполнена на основе прикладного гранта ИТСС 14-7 «Разработка и внедрение новых молекулярно-биологических способов детекции и оценка экспрессии химерного онкогена BCR/ABL при остром лимфобластном лейкозе и хроническом миелолейкозе», 2009-2011 гг. НИИ Гематологии и переливания крови МЗ РУз.

Цель работы. Изучить генетические варианты и частоту встречаемости химерного онкогена BCR/ABL и внедрить дифференцированный протокол диагностики и лечения Rh-положительного острого лимфобластного лейкоза в Узбекистане.

Задачи исследования:

1. Ретроспективный анализ эффективности стандартных протоколов химиотерапии, применяемых для лечения острого лимфобластного лейкоза.
2. Оптимизация и внедрение в клиническую практику нового молекулярного ПЦР-метода детекции клонального генетического маркера BCR/ABL у больных острым лимфобластным лейкозом.
3. Оценка частоты встречаемости онкогена BCR/ABL p190 среди больных острым лимфобластным лейкозом и разработка алгоритма выявления больных Rh-положительным острым лимфобластным лейкозом.
4. Оценка эффективности лечения Rh-положительного острого лимфобластного лейкоза.

Объект и предмет исследования. В настоящей работе представлены результаты ретроспективного анализа 286 больных с острыми лейкозами, а также клинико-морфологические и молекулярно-генетические обследования 134 больных с острым лимфобластным лейкозом, находившихся на лечении в гематологических отделениях НИИГ и ПК МЗ РУз.

Методы исследования: клинико-морфологические, молекулярно-генетические, статистические.

Положения, выносимые на защиту:

1. Выявлен низкий процент достижения ремиссии и высокий процент первично-резистентного течения и рецидива у больных острым лимфобластным лейкозом, особенно в группе высокого риска.

2. Усовершенствована диагностика острого лимфобластного лейкоза в результате внедрения молекулярного метода детекции химерного онкогена BCR/ABL, что позволило на ранних этапах полностью пересмотреть подход к дифференциальной диагностике и лечению больных Ph – позитивным острым лимфобластным лейкозом.

3. Частота встречаемости BCR/ABL p190 - положительного опухолевого клона среди больных острым лимфобластным лейкозом составляет 34% от общего числа больных острыми лимфобластными лейкозами.

4. Применение дифференцированного протокола полихимиотерапии в комбинации с Гливеком для лечения Ph-позитивного острого лимфобластного лейкоза приводит к увеличению длительности полной ремиссии и продолжительности жизни больных.

Научная новизна исследования. Впервые в Узбекистане установлена частота встречаемости варианта генетического маркера BCR/ABL p190, которая составила 34%, при этом вариант p210 обнаружен не был.

Ретроспективный анализ стандартных протоколов лечения острого лимфобластного лейкоза показал высокий процент рецидивов у больных из группы высокого риска по сравнению со стандартным риском.

У больных BCR/ABL-положительным острым лимфобластным лейкозом, получавшим одновременно с химиотерапией Гливек, ремиссия достигается в более чем 8 раза чаще относительно больных, не получавших данный препарат ($\chi^2=7,2$; $p=0,003$; OR=8,25).

Практическая значимость работы. Оптимизирован и внедрён молекулярный метод детекции химерного онкогена BCR/ABL p190, что позволит на ранних этапах проводить дифференциальную диагностику острого лимфобластного лейкоза, оценивать молекулярный ответ на проводимое лечение, а также контролировать развитие молекулярного рецидива и резистентного течения заболевания.

Реализация результатов исследования. Основные положения диссертационной работы используются в клинической практике гематологических отделений НИИГ и ПК МЗ РУз у больных Ph-позитивным острым лимфобластным лейкозом.

Апробация работы. Материалы диссертации доложены на конференциях: «Актуальные проблемы гематологии и трансфузиологии» (Ташкент, 2009, 2011), «Современные методы диагностики, лечения заболеваний системы крови и проблемы трансфузиологии» (Ташкент, 2010), Ученом совете НИИ Гематологии и переливания крови МЗ РУз (Ташкент, 2012), на научном семинаре при Объединённом специализированном совете Д. 087.09.02. Ташкентской медицинской академии (Ташкент, 2012).

Опубликованность результатов. По теме диссертации опубликовано 10 работ, из них: 4 журнальных статей, 5 тезисов и 1 методическая рекомендация.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 104 страницах компьютерного текста, состоит из введения, обзора литературы,

материала и методов исследования, результатов собственных исследований, обсуждения и выводов. Библиографический указатель содержит 115 работ, из которых 30 русскоязычных и 85 англоязычных источников. Работа иллюстрирована 9 рисунками и 12 таблицами.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

В обзоре литературы дана общая характеристика острого лимфобластного лейкоза, коротко описана его распространенность и клиническая картина. Подробно описаны современные методы диагностики острого лимфобластного лейкоза, включающие в себя полное описание молекулярно-генетической характеристики химерного онкогена BCR/ABL. Рассмотрены современные возможности лечения Ph-позитивного острого лимфобластного лейкоза.

Во второй главе описываются материалы и методы исследования. Исследования были проведены в два этапа, где было проанализировано 420 больных. На первом этапе у 286 больных острыми лейкозами была изучена частота встречаемости острого лимфобластного лейкоза и эффективность стандартных протоколов полихимиотерапии. Острый лимфобластный лейкоз был диагностирован у 63 больных. Возраст больных варьировал от 14 до 58 лет (медиана возраста 36 лет), из них мужчин было 44 (70%), женщин – 19 (30%). Диагноз острый лимфобластный лейкоз был установлен на основании общего анализа крови, миелограммы и цитохимического исследования бластных клеток (гликоген положительный, миелопероксидаза отрицательная). Молекулярно-генетическая диагностика не проводилась. Больные с острым лимфобластным лейкозом были разделены на 2 группы – группа стандартного и группа высокого риска. Критерием групп риска было количество лейкоцитов периферической крови в дебюте заболевания и наличие экстрамедуллярных очагов (нейролейкоз). К стандартной группе риска относились больные с количеством лейкоцитов менее $50 \times 10^9/\text{л}$ и отсутствием признаков нейролейкоза ($n=45$), к высокой группе риска относились больные с количеством лейкоцитов более $50 \times 10^9/\text{л}$ и/или признаками нейролейкоза ($n=13$).

На втором этапе у 134 больных с острым лимфобластным лейкозом проводился анализ встречаемости химерного онкогена BCR/ABL p190 методом ОТ-ПЦР и оценка эффективности лечения больных Ph-позитивным острым лимфобластным лейкозом. Возраст больных варьировал от 15 до 65 лет (медиана возраста 33,3 года), из них мужчин было 93 (69%), женщин – 41 (31%). Основными критериями постановки диагноза острого лимфобластного лейкоза, как и на первом этапе исследования, были общий анализ крови, данные миелограммы и цитохимическое исследование бластных клеток. Больные были разделены на 3 основные группы: первичные больные (с впервые установленным острым лимфобластным лейкозом) – I группа; больные с рецидивом острого лимфобластного лейкоза – II группа; больные с первично-резистентным течением острого лимфобластного лейкоза – III группа.

ПЦР исследование осуществлялось в четыре стадии. В первой стадии были получены ядродержащие клетки крови и костного мозга и выделены из них РНК. На второй стадии проводилась реакция обратной транскрипции. Оценку результата реакции обратной транскрипции выполняли с помощью контрольной ПЦР (третья стадия). На четвертой стадии проводился анализ продуктов ПЦР. Анализ полученных фрагментов после проведения двухраундовой ПЦР выполняли методом электрофореза в 6% полиакриламидном геле.

Всем больным проводили следующие исследования: общий анализ крови (уровень гемоглобина, количество эритроцитов, лейкоцитов, тромбоцитов, бластов, развёрнутой лейкоцитарной формулы и скорость оседания эритроцитов), биохимический анализ крови (общий белок, билирубин и его фракции, аланинаминотрансфераза, аспартатаминотрансфераза, мочевины, креатинин, глюкоза), коагулограмма (фибриноген, протромбиновый индекс, активированное частичное тромбопластиновое время, тромбоцитарные тесты), цитологическое и цитохимические исследования костного мозга.

Статистический анализ результатов проведен с использованием пакета статистических программ «Microsoft Excel 2003» и «OpenEpi 2009, version 2.3». Полученные данные представлены в виде среднеарифметической величины «М» и средней ошибки «m»: $M \pm m$. Рассчитывалось количество изучаемых признаков в группах («n»). Достоверность различий сопоставляемых совокупностей осуществлялось с использованием t-критерия Стьюдента и показателя соответствия « χ^2 »; критический уровень достоверности нулевой статистической гипотезы (об отсутствии различий и влияний) принимали равным 0,05.

Третья глава посвящена описанию результатов собственных исследований и их обсуждению. Для выявления поставленных задач был проведён анализ заболеваемости и лечения острого лимфобластного лейкоза в Узбекистане. Результаты показали, что встречаемость острого лимфобластного лейкоза в Узбекистане составила 22% всех случаев острых лейкозов (рис. 1). Полученные нами данные не отличались от данных российских и зарубежных исследователей. Такие же результаты получены у В.Г.Савченко с соавт. (2004), G.Cimino et al. (2006), H.Kantarjian et al. (2006).

Ремиссия после проведения индукционного курса полихимиотерапии была констатирована в 53,4% случаев. Развитие первичной резистентности наблюдалось в 34,5% случаев, а в 12,1% случаев наступил летальный исход. Ранний рецидив заболевания был зарегистрирован в 16% случаев. При сравнительном анализе результатов лечения по группам выявлено, что в группе высокого риска в 2 раза чаще встречался ранний рецидив заболевания в отличие от группы стандартного риска. В остальных показателях существенных различий не наблюдались.

Аналогичные данные получены итальянскими учёными, которые установили, что в 57% случаев острого лимфобластного лейкоза у взрослых

наблюдается первично-резистентная форма, у 55% больных была достигнута ремиссия, у 55% больных был установлен ранний рецидив заболевания и 12% больных погибли во время проведения высокодозной химиотерапии. При цитогенетическом исследовании Ph-хромосома была обнаружена у 16% больных, а также в единичных случаях были обнаружены другие транслокации - t (4;11), t (1;19), t (8;34) (Camera A. et al., 2004).

Таким образом, анализ полученных данных свидетельствуют о низком проценте достижения ремиссии и о высоком проценте первично-резистентного течения и раннего рецидива острого лимфобластного лейкоза у взрослых, особенно в группе высокого риска. Возможно, такие результаты связаны с недооцениванием прогностических факторов болезни и отсутствием полной молекулярно-генетической диагностики в условиях нашего региона.

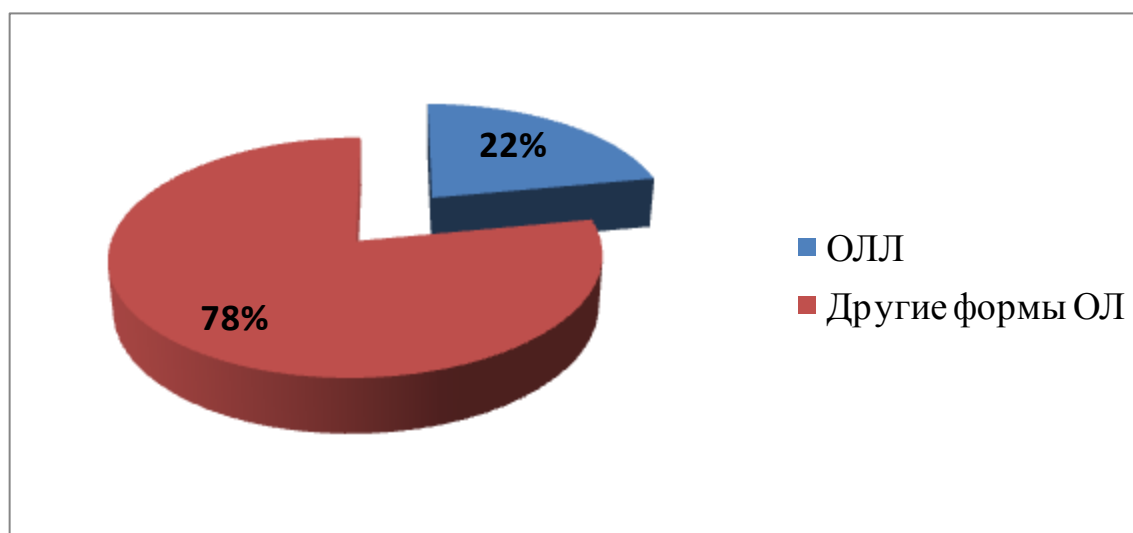


Рис. 1. Распространённость острого лимфобластного лейкоза у взрослых (ОЛЛ - острый лимфобластный лейкоз, ОЛ - острый лейкоз)

На втором этапе исследования был оптимизирован и внедрен ПЦР-метод детекции химерного онкогена BCR/ABL p190 у больных с острым лимфобластным лейкозом. Выбранный нами метод обладал специфичностью, высокой чувствительностью и его можно было относительно быстро осуществлять.

Проведенная нами молекулярно-генетическая диагностика (ПЦР), позволила выявить патологический транскрипт и его влияние на течение заболевания, а также на эффективность лечения. Ген BCR/ABL p190 был выявлен у 34% больных с острым лимфобластным лейкозом (табл. 1). В первой группе больных с впервые установленным диагнозом острый лимфобластный лейкоз у 31% был обнаружен химерный ген BCR/ABL p190.

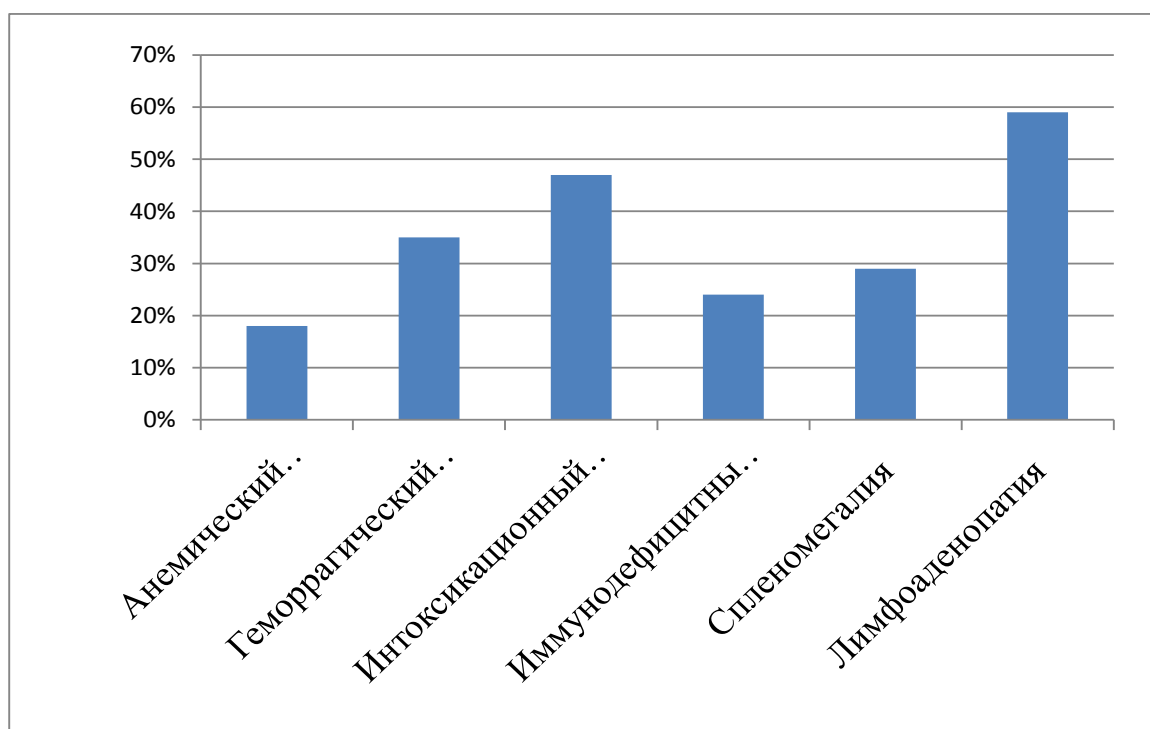
При тщательном сборе анамнеза и объективном обследовании больных BCR/ABL-положительным острым лимфобластным лейкозом были

выявлены: лимфоаденопатия – 59% случаев, интоксикационный синдром – 47%, геморрагический синдром – 35%, спленомегалия – 29%, иммунодефицитный синдром – 24%, анемический синдром – 18% (рис. 2).

Таблица 1

**Встречаемость BCR/ABL p190 у больных
с острым лимфобластным лейкозом**

Обследованные группы	BCR/ABL p190 +	BCR/ABL p190 -
I группа (n=102)	31 (30%)	71 (70%)
II группа (n=16)	10 (63%)	6 (37%)
III группа (n=16)	4 (25%)	12 (75%)
Всего (n=134)	45 (34%)	89 (66%)



**Рис. 2. Частота встречаемости синдромов у первичных больных Rh-
позитивным острым лимфобластным лейкозом**

В дебюте заболевания у больных BCR/ABL-положительным острым лимфобластным лейкозом в общем анализе крови чаще регистрировался гиперлейкоцитоз, выраженная тромбоцитопения, сдвиг лейкоцитарной формулы влево.

Таким образом, в нашем исследовании было выявлено, что BCR/ABL - положительный острый лимфобластный лейкоз чаще дебютирует с гиперлейкоцитоза, выраженной тромбоцитопении, сдвига лейкоцитарной формулы влево, лимфаденопатии и геморрагического синдрома.

Во второй группе больных с рецидивом острого лимфобластного лейкоза в 63% случаев был выявлен химерный ген BCR/ABL p190. Картина крови у больных BCR/ABL-положительным острым лимфобластным лейкозом в данной группе была примерно такая же, как и в первой группе, чаще выявлялся лейкоцитоз и тромбоцитопения, а продолжительность ремиссии была ниже, чем у больных с острым лимфобластным лейкозом без детекции гена BCR/ABL p190.

В третьей группе больных с первично-резистентным течением острого лимфобластного лейкоза химерный транскрипт был выявлен в 25% случаев. В этой группе больным до включения в анализ уже проводилась химиотерапия, поэтому лабораторные характеристики на момент исследования не имеют принципиального значения.

В качестве контроля в нашем исследовании были использованы 13 образцов периферической крови от здоровых доноров. Химерный транскрипт BCR/ABL p190 методом ОТ-ПЦР не был обнаружен. При исследовании периферической крови, все показатели контрольной группы соответствовали норме.

Таким образом, при сравнении больных BCR/ABL-положительным острым лимфобластным лейкозом с контрольной группой было обнаружено, что показатели крови больных BCR/ABL-положительным острым лимфобластным лейкозом характеризовались анемией средней степени тяжести, тромбоцитопенией и гиперлейкоцитозом, сдвигом лейкоцитарной формулы влево и незначительным увеличением скорости оседания эритроцитов.

В четвертой главе приводится оценка эффективности терапии BCR/ABL-положительного острого лимфобластного лейкоза в сравнительном анализе с включением в протокол лечения Гливек и без него. Анализируя полученные данные можно констатировать, что после проведения предфазы преднизолоном количество бластных клеток в двух подгруппах увеличилось примерно одинаково. После проведения первой фазы индукции ремиссии у больных, получавших Гливек, среднее количество бластных клеток достоверно снизилось в 36,8 раз (до $2,1 \pm 0,9\%$) ($p < 0,05$) и была констатирована клинико-гематологическая ремиссия (рис. 3). У больных, не получавших одновременно с полихимиотерапией Гливек, среднее количество бластных клеток после проведения первой фазы

индукции было в 10 раз выше и составило $21,5 \pm 1,6\%$, что свидетельствует об отсутствии клинико-морфологической ремиссии.

Результаты лечения BCR/ABL-положительного острым лимфобластным лейкозом с одновременным применением Гливек и полихимиотерапии показали, что клинико-гематологическую и молекулярную ремиссию удалось добиться у 75% больных. Продолжительность молекулярной ремиссии составила $10,4 \pm 0,24$ месяцев. В подгруппе без Гливек полную ремиссию удалось добиться лишь в 27% случаев, продолжительность которой составила $3,8 \pm 0,27$ месяцев. Развитие первичной резистентности наблюдалось в 2,6 раза чаще у больных, не получавших Гливек ($p < 0,05$). Смерть в индукции ремиссии наблюдалась в 3,2 раза чаще у больных, не получавших Гливек ($p < 0,05$). Молекулярный рецидив в двух подгруппах наступил в 100% случаев, разница была только в сроках наступления рецидива.

У больных, получавших одновременно с полихимиотерапией Гливек, рецидив наступил через $10,4 \pm 0,24$ месяца, у больных без Гливек – через $3,8 \pm 0,27$ месяца. Следовательно, продолжительность молекулярной ремиссии на фоне приёма Гливек увеличивается в 2,7 раз ($p < 0,001$).

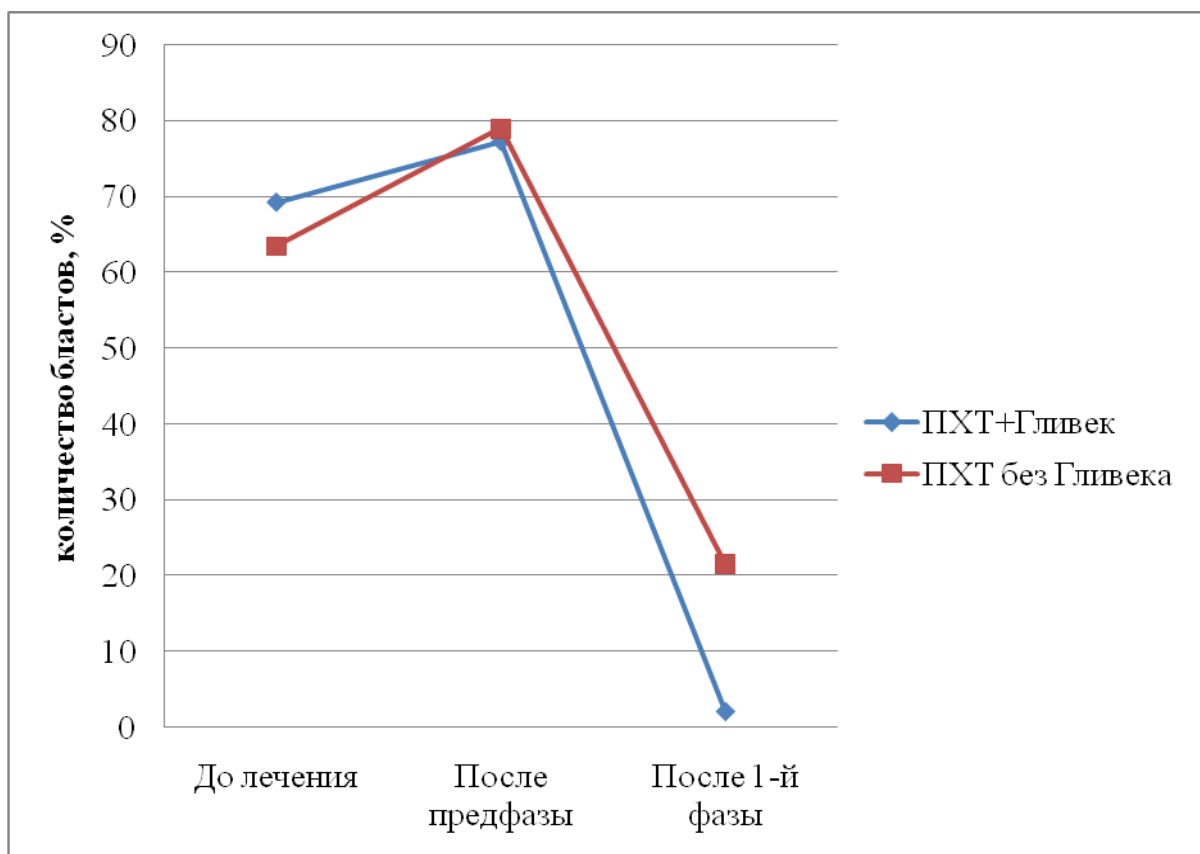


Рис. 3. Количество бластных клеток в костном мозге у больных Ph-положительным острым лимфобластным лейкозом (ПХТ - полихимиотерапия).

Таким образом, в проведенном исследовании доказано, что детекция онкогена BCR/ABL p190 у больных с острым лимфобластным лейкозом является крайне неблагоприятным фактором прогноза, как в плане достижения полной ремиссии, так и в её продолжительности.

Анализируя полученные данные можно констатировать, что BCR/ABL-положительный острый лимфобластный лейкоз в Узбекистане встречается в 34% случаев острого лимфобластного лейкоза, что совпадает с данными, полученными американской (30%) и японской (32%) исследовательскими группами и отличается от данных французских учёных (21%) (табл. 2). Медиана возраста больных составила 33,4 года, что полностью совпадает с данными американских и японских учёных. Процент достижения полной ремиссии у больных в Узбекистане составил 75%, что совпадает с данными французских, американских и японских учёных. Продолжительность полной ремиссии в Узбекистане составила $10,4 \pm 0,24$ месяца, что подтверждается данными, полученными американскими учёными.

Таблица 2

Сравнительная оценка результатов лечения Rh-положительного острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ)

Страна, число больных в исследовании	Процент Rh-положительных ОЛЛ	Возраст больных с Rh-положительным ОЛЛ, годы	Число лейкоцитов, $\times 10^9/\text{л}$	Полная ремиссия, %	Продолжительность полной ремиссии, месяцы	Продолжительность жизни, месяцы
Узбекистан, (n=134)	34	33,4	84,4	75	10,4	15,1
США, (n=56)	30	39	26,3	71	10	11,2
Франция, (n=58)	21	51	57	75	8,5	14,6
Япония, (n=105)	32	34,6	65	70	12	18
Итого	29,3*	39,5*	58,2*	72,8*	10,2*	14,7*

Примечание: * - указаны медианы от представленных в таблице показателей.

Средняя продолжительность жизни у больных BCR/ABL-положительным острым лимфобластным лейкозом в Узбекистане составила $15,1 \pm 0,73$ месяцев, что незначительно отличалось от данных французских учёных.

Таким образом, в исследование доказано, что наличие химерного транскрипта BCR/ABL p190 у больных с острым лимфобластным лейкозом является крайне неблагоприятным фактором прогноза как в плане достижения полной ремиссии, так и в её продолжительности. Данный вариант острого лимфобластного лейкоза характеризуется высокой агрессивностью опухолевого процесса, о чём свидетельствуют показатели периферической крови и костного мозга.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты проведенного исследования по изучению биологических особенностей острого лимфобластного лейкоза с детекцией онкогена BCR/ABL p190 позволило выявить ряд закономерностей молекулярно-генетической диагностики, по выбору терапевтической тактики и оценке ее результатов, что в совокупности легло в основу программы лечения BCR/ABL-положительного острого лимфобластного лейкоза.

Выводы:

1. У больных острым лимфобластным лейкозом в группе высокого риска на стандартных протоколах химиотерапии в 2 раза чаще встречается ранний рецидив, относительно группы стандартного риска ($p=0,3$; $\chi^2=0,2$).
2. Осуществлён подбор и оптимизирована работа системы олигопраймеров для эффективной детекции молекулярного маркера BCR/ABL p190 и внедрён в клиническую практику.
3. Выявлена сравнительно низкая частота генетического маркера BCR/ABL p190, которая составила 34% среди больных острым лимфобластным лейкозом. Генетический вариант маркера BCR/ABL p210 обнаружен не был.
4. В результате применения дифференцированного протокола полихимиотерапии на фоне приёма Гливека, средняя продолжительность молекулярной ремиссии увеличивается достоверно в 2,7 раз, а продолжительность жизни достигает 15,1 мес.

Практические рекомендации:

1. Всем первичным больным с диагнозом острый лимфобластный лейкоз, особенно из группы высокого риска, при поступлении в стационар необходимо проводить молекулярный анализ для выявления детекции химерного онкогена BCR/ABL p190.

2. При выявлении у больных острым лимфобластным лейкозом онкогена BCR/ABL p190 необходимо немедленно начинать прием Гливека параллельно с химиотерапией.

3. Молекулярный мониторинг химерного онкогена BCR/ABL p190 у больных Ph-позитивным острым лимфобластным лейкозом необходимо проводить каждые три месяца, даже после его отсутствия.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Хужахмедов Ж.Д. Оценка заболеваемости острым лимфобластным лейкозом в Узбекистане // Актуальные вопросы гематологии и трансфузиологии: Сб. науч. трудов. – Ташкент, 2009. – С.75-76.

2. Каримов Х.Я., Хужахмедов Ж.Д. Результаты лечения острого лимфобластного лейкоза в Узбекистане //Здравоохранение Таджикистана. – Душанбе, 2009. – №3. – С.133-135.

3. Каримов Х.Я., Хужахмедов Ж.Д. Анализ заболеваемости и лечение острого лимфобластного лейкоза в Узбекистане //Журнал теоретической и практической медицины. – Ташкент, 2009. – №4. – С.38-40.

4. Хужахмедов Ж.Д., Плаксина Е.А., Бобоев К.Т. Оценка роли химерного онкогена BCR/ABL в дифференциальной диагностике хронического миелолейкоза и острого лимфобластного лейкоза // Современные методы диагностики, лечения заболеваний системы крови и проблемы трансфузиологии: Сб. науч. трудов. – Ташкент, 2010. – С.85-86.

5. Хужахмедов Ж.Д., Бобоев К.Т. Распространенность Ph-позитивного острого лимфобластного лейкоза в Узбекистане // Здравоохранение Таджикистана. – Душанбе, 2011. – №4. – С.134-135.

6. Хужахмедов Ж.Д. Частота встречаемости экспрессии гена BCR/ABL p190 у больных острыми лимфобластными лейкозами в Узбекистане //Здравоохранение Таджикистана. – Душанбе, 2011. – №4. – С.131.

7. Каримов Х.Я., Хужахмедов Ж.Д., Бобоев К.Т. Анализ встречаемости экспрессии гена BCR/ABL p190 у больных острыми лимфобластными лейкозами в Узбекистане //Актуальные вопросы гематологии и трансфузиологии: Сб. науч.трудов. – Ташкент, 2011. – С.30-31.

8. Бобоев К.Т., Хужахмедов Ж.Д., Ибрагимов З.З., Алланазарова Б.Р. Сурункали миелолейкозли беморларни цитогенетик ва молекуляр генетик усуллари ёрдамида текшириш //Актуальные вопросы гематологии и трансфузиологии: Сб. науч.трудов. – Ташкент, 2011. – С.22-23.

9. Хужахмедов Ж.Д. Анализ встречаемости острого лимфобластного лейкоза с транслокацией t (9;22) в Узбекистане //Врач-аспирант. – Воронеж (Россия), 2012. – № 2.1 (51) – С.145-149.

10. Каримов Х.Я., Бобоев К.Т., Хужахмедов Ж.Д. Молекулярная диагностика Ph-позитивного острого лимфобластного лейкоза в Узбекистане: Методические рекомендации. – Ташкент, 2012. – 17 с.

Тиббиёт фанлари номзоди илмий даражасига талабгор Хужахмедов Жамолиддин Джололовичнинг 14.00.29 – Гематология ва қон қуйиш ихтисослиги бўйича «Ўзбекистонда ўткир лимфобласт лейкозда BCR/ABL химер онкогенининг молекуляр таҳлили» мавзусидаги диссертациясининг

Р Е З Ю М Е С И

Таянч (энг муҳим) сўзлар: ўткир лимфобласт лейкози, t (9;22) транслокацияси, BCR/ABL p190 онкогени, ОТ-ПЦР, Гливек.

Тадқиқот объектлари: ўткир лимфобласт лейкозли 420 бемор.

Ишнинг мақсади: BCR/ABL химер онкогенининг учраш частотаси ва генетик вариантларини ўрганиш, ҳамда Ўзбекистонда Ph-ижобий ўткир лимфобласт лейкозини ташхиси ва даволашни дифференциацияланган протоколининг татбиқ этиш.

Тадқиқот методлари: клиник-морфологик, молекуляр-генетик, статистик.

Олинган натижалар ва уларнинг янгилиги: Илк маротаба Ўзбекистонда BCR/ABL p190 генетик маркери вариантнинг учраш частотаси аниқландики, у 34% ни ташкил қилди, бунда p210 варианты топилмади. Ўткир лимфобласт лейкозларни даволашни стандарт протоколларининг ретроспектив таҳлили юқори ҳавф гуруҳи беморларида, стандарт ҳавфга нисбатан, рецидивларнинг юқори фоизини кўрсатди. BCR/ABL-ижобий ўткир лимфобласт лейкозли, химиотерапия билан биргаликда Гливек қабул қилган беморларда, Гливек қабул қилмаган беморларга нисбатан ремиссияга ишончли равишда 8 мартадан кўпроқ ҳолларда эришилди ($\chi^2=7,2$; $p=0,003$; OR=8,25).

Амалий аҳамияти: BCR/ABL p190 химер онкогени детекциясининг молекуляр усули оптималлаштирилиб, амалиётга татбиқ этилдики, бу ўткир лимфобласт лейкозини эрта этапларида дифференциал ташхис ўтказиш, ўтказилаётган даволашга бўлаётган молекуляр жавобни баҳолаш, ҳамда касалликни резистент кечиши ва молекуляр рецидиви ривожланишини назорат қилиш имкониятини беради.

Татбиқ этиш даражаси ва иқтисодий самарадорлиги: тадқиқот натижалари Гематология ва қон қуйиш ИТИ клиник амалиётига татбиқ этилган, иш материаллари ТТАсининг гематология кафедраси ўқув жараёнида қўлланилади.

Қўлланиш (фойдаланиш) соҳаси: гематология.

РЕЗЮМЕ

диссертации Хужахмедова Жамолиддина Джололовича на тему:
«Молекулярный анализ химерного онкогена BCR/ABL при остром лимфобластном лейкозе в Узбекистане» на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.00.29 – Гематология и переливание крови

Ключевые слова: острый лимфобластный лейкоз, транслокация t (9;22), онкоген BCR/ABL p190, ОТ-ПЦР, Гливек.

Объекты исследования: 420 больных с острыми лимфобластными лейкозами.

Цель работы: изучить генетические варианты и частоту встречаемости химерного онкогена BCR/ABL и внедрить дифференцированный протокол диагностики и лечения Ph-позитивного острого лимфобластного лейкоза в Узбекистане.

Методы исследования: клинико-морфологические, молекулярно-генетические, статистические.

Полученные результаты и их новизна: Впервые в Узбекистане установлена частота встречаемости варианта генетического маркера BCR/ABL p190, которая составила 34%, при этом вариант p210 обнаружен не был. Ретроспективный анализ стандартных протоколов лечения острого лимфобластного лейкоза показал высокий процент рецидивов у больных из группы высокого риска по сравнению со стандартным риском. У больных BCR/ABL-положительным острым лимфобластным лейкозом, получавшим одновременно с химиотерапией Гливек, ремиссия достигается в более чем 8 раз достоверно чаще относительно больных не получавших Гливек ($\chi^2=7,2$; $p=0,003$; OR=8,25).

Практическая значимость: Оптимизирован и внедрён молекулярный метод детекции химерного онкогена BCR/ABL p190, что позволит на ранних этапах проводить дифференциальную диагностику острого лимфобластного лейкоза, оценивать молекулярный ответ на проводимое лечение, а также контролировать развитие молекулярного рецидива и резистентного течения заболевания.

Степень внедрения и экономическая эффективность: результаты исследований внедрены в клиническую практику НИИ Гематологии и переливания крови, материалы используются на кафедре гематологии ТМА в учебном процессе.

Область применения: гематология.

RESUME

Thesis of Hujaahmedov Jamoliddin Jololovich on the scientific degree competition of the doctor of the philosophy in medicine on specialty 14.00.29 – hematology and blood transfusion, subject: "Molecular analysis of a chimeric oncogene BCR/ABL in acute lymphoblastic leukemia in Uzbekistan"

Key words: acute lymphoblastic leukemia, translocation t(9;22), oncogene BCR/ABL p190, RT-PCR, Glivec.

Subject of research: 420 patients with acute leukemia.

Purpose of work: to study genetic variants and the frequency of chimeric oncogene BCR/ABL and implement a differentiated protocol of diagnosis and treatment of Ph-positive acute lymphoblastic leukemia in Uzbekistan.

Methods of research: Clinical, morphological, molecular genetics, statistics.

The results obtained and their novelty: Genetic marker's BCR/ABL p190 level rate has been presented first in Uzbekistan and it's level is presented 34%; p210 variant has not been presented. High percent level of relapses in acute lymphoblastic leukemia patients was determined in high risk group compared standard in retrospective analysis of standard schemas. Remission is achieved more than 8 times reliable frequently in BCR/ABL-positive acute lymphoblastic leukemia patients, who had been treated Glivec with chemotherapy simultaneously comparing patients without Glivec treatment ($\chi^2=7,2$; $p=0,003$; $OR=8,25$).

Practical value: molecular detection method of chimera oncogen BCR/ABL p190 has been optimized and introduced. This created possibility to present differential diagnostic of acute ALL, estimate molecular response for treatment and control molecular relapse development and resistance flow of disease

Degree of embed and economic effectively: the results of this study were introduced into the clinic practice Institute of Hematology and blood transfusion, materials used in the learning process in the Hematology Department of the Medical Academy of advanced studies.

Field of application: Hematology.