

**«АКАДЕМИК В.ВОҲИДОВ НОМИДАГИ РЕСПУБЛИКА  
ИХТИСОСЛАШТИРИЛГАН ХИРУРГИЯ МАРКАЗИ» АЖ  
ва ТОШКЕНТ ТИББИЁТ АКАДЕМИЯСИ ҲУЗУРИДАГИ  
ФАН ДОКТОРИ ИЛМИЙ ДАРАЖАСИНИ БЕРУВЧИ  
16.07.2013.Тib.20.01 РАҚАМЛИ ИЛМИЙ КЕНГАШ**

---

**РЕСПУБЛИКА ОНКОЛОГИЯ ИЛМИЙ МАРКАЗИ**

**ПОЛАТОВА ДЖАМИЛА ШАГАЙРАТОВНА**

**ОСТЕОГЕН САРКОМАЛИ БЕМОРЛАРНИНГ ДИАГНОСТИКАСИ  
ВА ДАВОЛАШДА МОЛЕКУЛЯР-БИОЛОГИК ВА ГЕНЕТИК  
МАРКЕРЛАРНИНГ АҲАМИЯТИ**

**14.00.14 - Онкология  
(тиббийёт фанлари)**

**ДОКТОРЛИК ДИССЕРТАЦИЯСИ АВТОРЕФЕРАТИ**

**Тошкент шаҳри – 2016 йил**

**Докторлик диссертацияси автореферати мундарижаси**  
**Оглавление автореферата докторской диссертации**  
**Content of the abstract of doctoral dissertation**

Полатова Джамила Шогайратовна Остеоген саркомали беморларнинг диагностикаси ва даволашда молекуляр-биологик ва генетик маркерларнинг аҳамияти .....	5
Полатова Джамила Шогайратовна Молекулярно-биологические и генетические маркеры, их значение в диагностике и лечении больных с остеогенной саркомой.....	30
Polatova Djamila Shagayratovna Molecular-biologic and genetic markers, their significance in diagnostics and cure of patients with osteogenous sarcoma .....	54
Эълон қилинган ишлар рўйхати Список опубликованных работ List of published works .....	73

**«АКАДЕМИК В.ВОҲИДОВ НОМИДАГИ РЕСПУБЛИКА  
ИХТИСОСЛАШТИРИЛГАН ХИРУРГИЯ МАРКАЗИ» АЖ  
ва ТОШКЕНТ ТИББИЁТ АКАДЕМИЯСИ ҲУЗУРИДАГИ  
ФАН ДОКТОРИ ИЛМИЙ ДАРАЖАСИНИ БЕРУВЧИ  
16.07.2013.Тib.20.01 РАҚАМЛИ ИЛМИЙ КЕНГАШ**

---

**РЕСПУБЛИКА ОНКОЛОГИЯ ИЛМИЙ МАРКАЗИ**

**ПОЛАТОВА ДЖАМИЛА ШАГАЙРАТОВНА**

**ОСТЕОГЕН САРКОМАЛИ БЕМОРЛАРНИНГ ДИАГНОСТИКАСИ  
ВА ДАВОЛАШДА МОЛЕКУЛЯР-БИОЛОГИК ВА ГЕНЕТИК  
МАРКЕРЛАРНИНГ АҲАМИЯТИ**

**14.00.14 - Онкология  
(тиббийёт фанлари)**

**ДОКТОРЛИК ДИССЕРТАЦИЯСИ АВТОРЕФЕРАТИ**

**Тошкент шаҳри – 2016 йил**

Докторлик диссертацияси мавзуси Ўзбекистон Республикаси Вазирлар Маҳкамаси ҳузуридаги Олий аттестация комиссиясида №30.09.2014/Б2014.5.Тib427 рақами билан рўйхатга олинган.

Докторлик диссертацияси Ўзбекистон Республикаси Соғлиқни Сақлаш Вазирлиги Республика Онкология илмий марказида бажарилган.

Диссертация автореферати уч тилда (ўзбек, рус, инглиз) Илмий кенгаш веб-саҳифаси ([www.med.uz/surgery](http://www.med.uz/surgery)) ва «Ziyonet» таълим ахборот тармоғида ([www.ziyonet.uz](http://www.ziyonet.uz)) жойлаштирилган.

**Илмий  
маслаҳатчи:**

**Наврузов Саримбек Наврузович**

тиббиёт фанлари доктори, профессор

**Расмий  
оппонентлар:**

**Алиев Мамед Джавадович**

тиббиёт фанлари доктори, профессор

**Арипова Тамара Уктамовна**

тиббиёт фанлари доктори, профессор

**Ходжаев Абдувахид Валиевич**

тиббиёт фанлари доктори, профессор

**Етакчи  
ташкilot:**

Н.Н.Александров номидаги онкология ва тиббиёт радиология Республика илмий-текшириш маркази, Минск, Беларусь

Диссертация ҳимояси «Академик В.Воҳидов номидаги Республика ихтисослаштирилган хирургия маркази» АЖ ва Тошкент тиббиёт академияси ҳузуридаги 16.07.2013.Тib.20.01 рақамли илмий кенгашнинг 2016 йил «\_\_\_» \_\_\_\_\_ соат \_\_\_\_\_даги мажлисида бўлиб ўтади. (Манзил: 100115, Тошкент, Кичик халқа йўли, 10. Тел.: (99871) 277-69-10; факс: (99871) 277-26-42; e-mail: cs.75@mail.ru).

Докторлик диссертацияси билан «Академик В.Воҳидов номидаги Республика ихтисослаштирилган хирургия марказининг» АЖ ахборот-ресурс марказида танишиш мумкин (06 рақами билан рўйхатга олинган). (Манзил: 100115, Тошкент, Кичик халқа йўли, 10. Тел.: (99871) 277-69-10; факс: (99871) 277-26-42).

Диссертация автореферати 2016 йил «\_\_\_» \_\_\_\_\_куни тарқатилди.  
(2016 йил \_\_\_\_\_ даги \_\_\_\_\_ рақамли реестр баённомаси).

**Ф.Г. Назиров**

Фан доктори илмий даражасини берувчи  
илмий кенгаш раиси, т.ф.д., профессор

**А.Х. Бабаджанов**

Фан доктори илмий даражасини берувчи  
илмий кенгаш илмий котиби, т.ф.д.

**А.В. Девятов**

Фан доктори илмий даражасини берувчи  
илмий кенгаш ҳузуридаги илмий семинар раиси,  
т.ф.д., профессор

## КИРИШ (Докторлик диссертацияси аннотацияси)

**Диссертация мавзусининг долзарблиги ва зарурати.** Ўсма касалликларининг замонавий ташхиси ва даво муолажаларининг юксалишига қарамасдан, жуда хавфли ҳисобланган остеосаркомали касаллар келажагини башоратлаш тахликалигича қолмоқда. Ҳозирги вазият беморларни эрта ташхислаш, мониторинги ва даволаш учун бошқача янги технологияларни излаш ва яратишни тақазо этмоқда. Фундаментал иммунология, молекуляр биология, биотехнология ва генетиканинг бугунги кундаги ютуқлари, хавфли ўсмалар келиб чиқишини башорат қилишга, ташхис қўйиш ва даволашга ёрдам берувчи замонавий биологик муҳим кўрсаткичларни пайдо бўлишига олиб келди.

Маълумки, остеосаркома – ўта агрессив хавфли ўсма бўлиб, тезкор гематоген метастазлашишга мойилдир. Адабиётларда, суяк тўқимаси метаболизмининг меъёри ва илк ўсма ўсишида ўзига хос хусусиятларини, молекуляр-биологик маркерларининг яширин имкониятларини аниқлашга йўналтирилган тадқиқодлар сони етарлича келтирилган. Кўпгина тадқиқодчилар, ўсма ўсишидаги асосий сабабларидан бири, айнан ушбу омиллар экспрессиясининг дисбаланси деб тахмин қилишмоқда. Бирок, улар турли хил, шунингдек мунозаралидир. Айнан ушбу омиллар ўсма хужайраларининг метастазлашувуви, инвазияси, чексиз пролиферацияси, неоангиогенез жараёнларининг фаоллашувуви, апоптозга чидамлилиқ қобилияти, шунингдек, экзоген ва эндоген бошқарувларга нисбатан таъсирчанлиги сингари фундаментал хусусиятларини аниқлаб беради деб ҳисобланади. Шу билан бирга ушбу жараёнларда цитокинлар муҳим ўрни кўрсатилган бўлиб, улар ўсма пролиферацияси ва неоангиогенезини фаоллаштирувчи ролида иштирок этиб касалликнинг ноҳуш оқибатлари ва метастазлашувини коррегирлаб турадилар.

Ўсма ривожланишининг маълум босқичлари асосини чуқурроқ билиш мақсадида, хусусан суяклар саркомасида, хавфли ўсиш фаоллигини ташхислашда молекуляр маркерларнинг ролини тадқиқ этиш муҳим омил ҳисобланади. Шу билан бирга, ўсмалар ривожланиш механизмларини тадқиқ этиш тиббиётнинг долзарб вазифаси бўлиб қолмоқда ва онкологиянинг ҳам назарий ҳам амалий муаммоларини ечишда замонавий тадқиқот ва даволаш усулларини қўллашни талаб қилади, асосий мақсад эса, эрта ташхислаш ва даволашнинг самарали патогенетик усулларини ишлаб чиқишдир. Шунингдек, поликимётерапия фонида ўсма хужайраларининг резистентлигини енгиб ўтиш орқали даволаб яхши натижаларга эришиш муҳим вазифа ҳисобланади.

Ўзбекистон Республикаси Президентининг 2011 йил 28 ноябрдаги ПҚ-1652-сон қарори билан тасдиқланган «Соғлиқни сақлаш тизимини чуқур мукамаллаштириш ҳақида» ва 2012 йил 29 мартдаги (V бўлим, 15 пункт) Ўзбекистон Республикаси Вазирлар Маҳкамаси қарори билан тасдиқланган «Тиббиёт муассасаларини ташкиллаштириш ва материал-техник базасини

мустахамлаш» ҳақида Давлат дастурлари билан белгиланган вазифаларни муайян даражада ҳал этишга мазкур диссертация тадқиқоти хизмат қилади.

Шу тариқа, юқорида келтирилган маълумотларнинг барчаси мазкур тадқиқотнинг долзарблигини белгилаб, уни заруратини асослайди

**Тадқиқотнинг республика фан ва технологиялари ривожланишининг устувор йўналишларига боғлиқлиги.** Мазкур тадқиқот республика фан ва технологиялар тараққиётининг ДИТД-11 «Юқори самарали илмий технологиялар, замонавий усуллар ва тиббий воситаларни қайта ишлаш, аҳоли саломатлигини сақлашнинг самарадорлигини назорат қилиш ва экологик хавфсизликни таъминлаш» дастурига мос равишда бажарилган.

**Диссертация мавзуси бўйича хорижий илмий-тадқиқотлар шарҳи.** Остеосаркоманинг молекуляр-биологик ва генетик маркерлари ҳақидаги замонавий тақдимотларини ҳисобга олган ҳолда унинг биологик ҳулқ атворини ўрганиш, ташхиси ва даволашнинг самарали усулларини ишлаб чиқиш бўйича қуйидаги йирик халқаро тиббий илмий марказларда илмий-тадқиқотлар олиб борилмоқда: The national cancer Institute in Milan (Italy); Munster multidisciplinary cancer center, Germany; West German cancer center; Cancer center Anderson (USA); German Cancer Research Center (Heidelberg, Germany); Center for Musculoskeletal Surgery, Charité-University Medicine (Berlin, Germany); Department of Paediatric Laboratory Medicine, Hospital for Sick Children, (Toronto, ON, Canada); Department of Pathology and Molecular Medicine, Queen's University (Kingston, ON, Canada); University of Alabama at Birmingham and the Birmingham Veterans Affairs Medical Center (Birmingham, Alabama); Н.Н.Александров номидаги Республика онкология ва тиббий радиология ИАМ (Минск, Беларусь); РТФА Н.Н.Блохин номидаги РОИМ (Москва, Россия); Н.Н.Петров номидаги онкология ИТИ (СПб, Россия); Тарас Шевченко номидаги Киев миллий университети (Украина).

Суякдаги саркома ташхиси самарасини ва даволаш сифатини ошириш ҳамда касалликни даволаш ва башоратлашнинг ўта янги самарали усулларини ушбу етакчи онкологик ташкилотларда тадбиқ этилмоқда. Алаба штатидаги Бирменгемнинг (США) Патология, радиология, хужайра биологияси университетиде олимлар В.Д. Ragland, G. Siegal ва бошқалар суяк саркомаларининг цитогенетик ва молекуляр-биологик маркерлари устида тадқиқот олиб бормоқдалар. Цюрих (Швейцария) университетидан Dr. Bruno Fuchs остеосаркома метастазларини даволаш ва уни башоратлашда генетик маркерларнинг ўрни - янги стратегияси устида иш олиб бормоқда. РТФА Н.Н.Блохин номидаги РОИМ (Москва) аҳамиятли илмий натижалар олинмоқда, у ерда охириги йигирма йилдаги дунёнинг энг катта остеосаркомали касалларнинг клиник материалларидан бири тўпланган; Н.Н.Петров номидаги онкология ИТИ нинг «Ўсма ўсишининг биологияси» бўлимида ирсий ўсма синдромларининг ДНК-ташхиси, ҳамда онкопатологиянинг ирсий ва спорадик шаклларида, шу жумладан онкосаркомада, онкомаркерлар ва генлар полиморфизми тадқиқ қилинмоқда.

Хозирги вақтда нафақат дунёнинг тиббий ташкилотлари базаларида, балки, бизнинг Республикамизда ҳам молекуляр генетиканинг ўта янги усулларни қўллаб генетик тадқиқотлар ўтказилмоқда. Жумладан Республика скрининг-марказида ирсий генетик патологияларини аниқлаш амалга оширилмоқда, бу эса шундай касаллик билан бола туғилишини олдини олади. Тиббиётда молекуляр и хужайравий технология усуллари онкологик касалликлар ташхиси ва мониторингини олиб боришга ёрдам беради. Ўсмаларнинг, жумладан остеосаркоманинг, молекуляр-биологик хусусиятларини ўрганиш асосида аниқ молекулага ва жараёнларга таъсир килувчи янги даво стратегияси, яъни таргет даво тизими яратилмоқда.

**Муаммонинг ўрганилганлик даражаси.** Остеосаркоманинг этиологияси, генетик, патоген омиллари ва молекуляр механизмлари ҳали хануз тўлиқ ўрганилмаган (Имянитов, Хансон, 2004; Friedrich et al., 2008). Хужайраларнинг хавфли трансформацияси ва ўсма ривожланиши жараёни, клиникада атрофдаги тўқималарга инвазив таъсир кўрсатиши кўринишида кечиши ва шу билан бирга маҳаллий ва тарқалган метастазлари геномнинг (Egger et al., 2004; Sprague et al., 2007; Копнин, 2007; Заридзе, 2008; Блохин, 2009) меъёрий фаолиятининг бузилиши билан боғлиқдир. Остеосаркоманинг молекуляр патогенези бошқа қўллаб онкологик касалликлар сингари асосида ўсмалар трансформацияси бўлган онкогенларнинг фаоллашуви ва ўсма суппрессиясига хос генлар фаолиятининг сусайишига сабаб бўлувчи бир қатор генетик ва эпигенетик ходисаларни ўз ичига олади (Ляхович ва ҳаммуаллифлар, 2004; Payne, Kemp, 2005; Croce, 2008; Залетаев, 2008; Лихтенштейн, 2009). Маълумки, TP53 гени ўсма ривожланишида муҳим ген-суппрессорлардан бири ҳисобланади (Phillips, 1999; Чумаков и др., 2007; Vousden, Lane, 2007; Копнин, 2008). Мутациялар “функционал аҳамияти” нинг хилма-хиллиги уларнинг ўсма ривожланиш жараёни билан боғлиқлиги ҳақидаги аниқ натижаларни олишга ҳалақит беради (Feki, Irminger-Finger, 2004; Petitjean et al., 2007; Brosh, Rotter, 2009). Адабиётларда, шунингдек, остеосаркомада TP53 генининг метиллашувининг p53 оксили фаолияти сусайишига ва ўсма жараёни инвазивлиги билан ассоциациясига альтернатив механизм сифатида иштироки борасида унча кўп бўлмаган кўрсатмалар бор (Kang et al., 2001). Ушбу муаллифлардан олинган маълумотларнинг ноаниқлиги тадқиқотни давом эттириш заруратини кўрсатади.

Ўзбекистонда остеосаркоманинг клиник хусусиятларини ўрганиш бўйича санокли тадқиқотлар қилинган. Узун найсимон суякларида остеоген саркома бор касалларни комбинирланган ва модификацияли комбинирланган даво қўлланганда унинг самарадорлиги ўрганилган (Урунбаев С.Д., Гафур-Ахунов М.А., 2009; 2010). Аввал Ўзбекистонда ўтказилган тадқиқотлар касалликни башоратига хар-хил даволаш вариантларининг таъсирини ўрганиш билан чекланар эди (Гафур-Ахунов М.А., Урунбаев Ж.Д., Нуриддинов К.Р. и др. 2000; Гафур-Ахунов М.А., Урунбаев С.Д., Корень Л.П. и др. 2010). Шу қаторда органни сақлаб қолиш ва сақлаб қолмаслик операцияларидан кейин хаёт тарзи ва метазтазсиз яшаш давомийлиги тадқиқ қилинган (Гафур-Ахунов М.А., Абдикаримов Х.Г.,

Урунбаев С.Д., 2008). Юқоридагиларни ҳисобга олган ҳолда, остеосаркома кечишида молекуляр ва хужайравий маркерлар ролини тадқиқ қилиш фундаментал йўналиш бўлиб, у касалликни эрта ташхислаш, даволаш ва башоратлаш учун ёрдам беради.

**Диссертация мавзусининг диссертация бажарилаётган илмий-тадқиқот муассасининг илмий-тадқиқот ишлари билан боғлиқлиги.** Диссертация тадқиқоти Республика онкология илмий маркази илмий-тадқиқот ишлари режасига мувофиқ, қуйидаги давлат гранти мавзулари: А-9-050 «Патогенетик даво ишлаб чиқиш учун остеоген саркомали беморларда цитогенетик ва молекуляр-биологик тадқиқотлар» (2006-2008 йй.), ITD-1109-11.3-10849 «Турли жойлашган хавфли ўсмаларда кўплаб дорига чидамлилиқ шаклланишини ўрганиш ва уларни бартараф этишда янги технологияларни ишлаб чиқиш» (2008-2011 йй.) ва Ф-4.3.7. «Онкологик беморлар иммунитетининг молекуляр омилларини ўрганиш» (2009–2014 йй.) асосида бажарилган.

**Тадқиқотнинг мақсади:** остеосаркома ўсмасининг ривожланиш механизмини тавсифловчи молекуляр-биологик ва генетик маркерлар ўзгаришини аниқлаш, шунингдек айти патологияни ташхислаш ва даволашдаги уларнинг ролини асослаш

Белгиланган мақсадга эришиш учун қуйидаги **тадқиқот вазифалари** қўйилган:

остеосаркомали беморларнинг қон зардобиди ва ўсмада пролиферация, апоптоз ва ангиогенезнинг молекуляр-биологик маркерларини аниқлаш;

остеосаркомани ташхислаш ва даволашда беморларнинг периферик қони лимфоцитларида цитогенетик ўзгаршлар ролини тадқиқ этиш;

остеосаркома клиник кечиши хусусиятларини ўсмадаги молекуляр-биологик омилларга боғлиқ ҳолда аниқлаш;

остеосаркома клиник хусусиятларидан келиб чиққан ҳолда беморлар иммун тизими (хужайравий ва гуморал) ҳолатини баҳолаш;

остеосаркома клиник хусусиятларидан келиб чиққан ҳолда беморлар иммун тизими цитокинлари (яллиғланишга хос ва қарши) фаолиятини аниқлаш;

суяк остеосаркомасида клиник-морфологик ва молекуляр-генетик башорат омилларини тахлилини ўтказиш;

остеосаркомали беморларни даволашда молекуляр-генетик маркерларнинг башоратли ролини асослаш.

**Тадқиқотнинг объекти:** остеосаркома аниқланган 221 нафар беморлар ва 48 нафар ёш ва жинси бир хил бўлган соғлом шахслар олинди.

**Тадқиқотнинг предмети** – вена қони ва қон зардоби молекуляр-генетик, цитогенетик ва иммунологик маркерларини аниқлаш учун, гистологик материал иммуногистокимё онкомаркерларини аниқлаш учун ишлатилди.

**Тадқиқотнинг усуллари.** Клиник, рентгенологик, морфологик, иммунологик, иммуногистокимёвий, молекуляр-генетик, цитогенетик ва статистик тадқиқот усулларида фойдаланилди

**Тадқиқотнинг илмий янгилиги** қуйидагилардан иборат:

остеосаркома (ОС) кечишига таъсир этувчи, ўсма ва организмнинг хусусиятларини тавсифловчи, башорати бўйича салбий омил сифатида дискриминациядан (5%) юқори бўлган хромосоманинг ностабиллик даражаси каби бир қатор ишончли омиллар келтирилган;

юқори хромосомавий ностабиллик қуйидагилар билан боғлиқ бўлганида, яъни ўсма ривожланишининг прогрессивлашуви; ўсма дифференциациясининг ва патомарфозининг қуйи даражаси; ўсма ҳажмининг катталашуви ва хондробластик гистологик вариант билан; шунингдек, хромосома ностабиллигининг қуйи даражасида бўлган беморларга нисбатан, ОС беморлар умрининг 1,6 баробар қисқариши кўрсатилган;

ўсмалар ирсий синдромлар (синдром Ли-Фрумени) доирасида ривожланса, клиник-биологик хулқи, тасодифий фенокопияларидан фарқ қилиши мумкинлиги аниқланган;

иммуногистохимик тадқиқотлар асосида, неодъювант кимётерапия (НКТ) ўтказилган 13% беморларда бутунлай морфологик регрессга эришилганлиги, улардан 70,6% беморларда p53 мутант генининг экспрессияси ва Ki-67 генининг экспрессияси мавжуд эмаслиги, 80,0% беморларда bcl2 генининг экспрессияси борлиги; УМАИМК схемаси қўлланилгандан кейин 15,7% беморларда ҳам тўлиқ морфологик регресс кузатилиши, улардан 87,5% да p53 мутант гени йўқлиги, 90,0% шу беморларда bcl2 генининг экспрессияси жуда юқорилиги, 80,0% беморларда эса, Ki-67 ген экспрессияси сустлиги аниқланган;

остеосаркомали беморларда экспрессиялар профили (молекуляр-генетик фенотип), яъни хромосома ностабиллиги (периферик кон лимфоцитларида хромосомалар абберациясининг кўпайиши 5% дан юқори), апоптоз ва пролиферация биомаркерлар экспрессиясининг даражаси (mtp53<sup>+</sup>, bcl-2<sup>-</sup>, Ki 67<sup>+</sup>) эрта метастазлашув ва эрта рецидивлар пайдо бўлишининг нохуш омиллари эканлиги (6 дан 9 ойгача), патоморфознинг қуйи даражаси (1 ва 2), беморлар умри давомийлиги (3 йилгача), (G<sub>3</sub>) дифференциалашувининг қуйи даражаси, ўсма ҳажмининг катталашуви, остеосаркоманинг хондробластик варианты билан боғлиқлиги аниқланган;

иммунитетнинг чуқур Т – ҳужайравий етишмовчилиги ва гуморал бўғинининг фаоллашуви билан кечадиган иммунтанқислик ҳолати остеосаркомали беморларда хавфли ўсма жараёнини жадаллашувини эрта ташхислаш имкониятини бериши аниқланган;

илк маротаба, остеосаркомали беморларда цитокинлар ҳолати ўрганилган, иммун тизимидаги асосий цитокинлар дисбаланси ўсманинг шаклланиши, ривожланиши ва жадаллашувидаги муҳим роли кўрсатилган;

остеоген саркомада – иммунопролиферация синдромида яллиғланишга хос ва қарши цитокинларнинг жавоб қайтариш хусусиятлари ўрганилди, IL-6 миқдорининг кўпайиши остеосаркомада ўсма ривожланиш жараёнини жадаллашувини ташхислаш учун асос эканлиги аниқланган;

илк маротаба ангиогенез ривожланишига боғлиқ бўлмаган ҳолда остеоген саркоманинг жадаллашув хусусиятлари ўрганиди, бирламчи

остеосаркомаларда VEGF-A экспрессияси, ўсма тўқимасида маҳаллий томирлар қалинлашуви, ўпкада метастаз ривожланиши ва нохуш оқибатли башорат билан коррегирлашуви аниқланган;

илк маротаба остеосаркомали беморларда даволашдан олдин эндостатин, ФРФ-1, -2 нинг таркиби касаллик клиник тавсифига ва башоратлашга нақадар боғлиқлигини аниқлаш учун ўрганилди, ФРФ-1 ва эндостатин экспрессияси суякда ўсма ўсиши билан боғлиқ патогенетик ўзгаришларга алоқадорлиги аниқланган.

**Тадқиқотнинг амалий натижаси** қуйидагилардан иборат:

остеосаркомали беморлар аниқланган молекуляр-генетик фенотиплар, хромосомали ностабиллик, апоптоз ва пролиферация ( $mtP53^+$ ,  $vcl-2^-$ ,  $Ki-67^+$ ) биомаркерларининг юқори даражадаги экспрессияси, эрта метастазлашув ва эрта рецидивлар пайдо бўлишининг нохуш башоратли омиллари бўлиши кўрсатилган;

остеосаркомада башорат қилишнинг муҳим кўрсаткичлари бўлиб нафақат клиник ва морфологик омиллар, балки  $mtP-53$  ва  $Ki-67$  супрессори – мутант генининг юқори экспрессияси,  $vcl-2$  нинг - паст, хромосома ностабиллик (абберациялар), VEGF-A нинг юқори экспрессияси, цитокинлар ва ФНО- $\alpha$  сингари иммунологик ва молекуляр-генетик маркерлар рол ўйнаши аниқланган;

цитокинлар спекторининг муъерда ва патологияда қиёсий баҳолаш иммун тизимнинг фаоллик ҳолатини ифодалайди, бу эса иммунопатогенезни клиник интерпретацияси, иммунологик ташхислаш ва башоратлаш, ҳамда иммунотерапия, иммунопрофилактика ва иммунореабилитация учун асос бўлиб хизмат қилиши кўрсатилган;

амалиётчи шифокорлар учун, остеосаркомали беморларнинг молекуляр-генетик статуси ва цитокинлар спектри ҳақидаги билимлари касаллик кечишидаги патогенетик хусусиятларини аниқлаш, унинг оғирлиги ва башорати, кучайиш даври ва ремиссиясини дифференцирлаш, ўтказилаётган медикаментоз давони самарадорлигини баҳолаш имкониятини бериши исботланган.

**Тадқиқот натижаларнинг ишончлилиги:** тадқиқот натижалари беморларнинг етарли даражадаги сони, ўзаро бир-бирини тўлдирувчи клиник, иммунологик, рентгенологик, морфологик, иммуногистокимёвий, молекуляр-генетик, цитогенетик тадқиқотларга ва остеосаркомали беморларнинг даволашга ва ташхисига бўлган замонавий илмий-амалий ёндашув ҳамда тасаввурларга асосланган. Мўлжалланган вазифалар ечими аниқ тиббий статистика усуллари билан амалга оширилган

**Тадқиқот натижаларининг илмий ва амалий аҳамияти.**

Тадқиқот натижалари молекуляр-биология, иммунология, тиббий генетика ва онкологиянинг бугунги кундаги ютуқларига чинакам ҳисса қўшиб, остеосаркомани кечишининг клиник функционал хусусиятларини, даволашни ва башоратлашни тадқиқ қилишда, кейинчалик ушбу касалликнинг ривожланишида ўзига хос келиб чиқадиган асоратларини, ўрганишда, ташхис қўйиш ва даволашдаги янги рақобатбардош усулларни

яратишга замин бўлиб хизмат қилади. Натижаларнинг баъзи бирлари талабалар, курсантлар, клиник ординаторлар ва магистрларнинг суяк ўсмаларини ташхислаш ва даволаш бўйича ўқув жараёни дастурлари тақибини мукамаллаштиришга имкон яратади.

Тадқиқот натижаларининг амалий аҳамияти шундаки, остеосаркома ривожланиш жараёнининг эрта босқичларида аниқ ташхис қўйишга ва беморларни самарали даволашга ёрдам берувчи клиник симптомакомплекс ишлаб чиқилганидир. Иммунологик ва генетик тадқиқодларнинг ўтказилиши касалликнинг эрта метастази белгиларини аниқлашга, тарқалишини ва оғирлиги ҳақида кўпроқ маълумот олишга ёрдам беради. Остеосаркома ривожланиши хавфи катта бўлган гуруҳларни ажратишда ва уларда истиқболли молекуляр-генетик маркерларини аниқлашда, клиникада ушбу касалларни даволаш мониторингини ўтказишда ва башоратлашда остеосаркомали беморларнинг молекуляр-генетик фенотиплари ҳақидаги маълумотлар катта аҳамиятга эгадир.

**Тадқиқот натижаларининг жорий қилиниши.** Ишлаб чиқилган тос суягининг диафизар бўлимини ўрнини босувчи, металл “эндопротез” учун №FAP 00851 (11.12.2014 й.) – патенти олинган, суяклар диафизар қисмини эндопротезлашга керакли қурилма-моделига патент олиш учун ижобий қарор (FAP №20150153) олинди, шунингдек 3 тауслубий қўлланма ва тавсиянома ўқув жараёнига киритилган ва амалий тиббиётда қўлланилмоқда (Ўзбекистон Республикаси Соғлиқни сақлаш вазирлигининг 10.02.16 йилдаги № 8 Н-3/41 сон хулосаси).

Олинган натижалар остеоген саркомали беморларни ташхислаш ва даволаш сифатини оширди, даволаш тактикасини оптималлаштирди, ўсма метастази ва рецидивлари частотасини камайтирди, кўрсатилаётган тиббий ёрдамнинг сифатини яхшилаш ҳисобига умрнинг давомийлигини узайтирди ва ўлимни камайтириш имконини яратиб берди. Тизза бўғими учун ватанимизда ишлаб чиқилган эндопротез импорт даражасини камайтирди, чет эл аналогларига нисбатан паст нархда махсулот ишланди, хар томонлама кенг киритилган ишланма пациентлар эрта ижтимоий реабилитация қилишга ва инвалидликни камайтириш ҳисобига пул маблағларини тежашга имкон яратди, шифохонада даволаниш вақти қисқарган ва ётиш куни камайганлиги сабабли иқтисодий самара олинган.

**Тадқиқот натижаларининг апробацияси.** Тадқиқот натижалари 11 та илмий-амалий анжуманларда, шу жумладан 8 та халқаро конференцияларда: онкологлар ва радиологларнинг IV қурултойи МДҲ (Баку, 2006); онкологлар ва радиологларнинг V қурултойи МДҲ (Тошкент, 2008); онкология ва эндокрин хирургия бўйича I Италия-Россия илмий конференцияси (Италия 2010); ESMO 36 The 2011 European Multidisciplinary Cancer Congress (Стокгольм, 2011); ICACT 23<sup>rd</sup> International Congress on anti-cancer treatment (Франция, 2012); 22nd Biennial Congress of the European Association for Cancer Research (Испания, 2012); “Суяк, енгил тўқима саркомаси ва тери ўсмаси” EESG I халқаро конференцияси (Москва, 2014); 34<sup>th</sup> Congress of the ESSO (Англия, 2014) ва 3 та республика конференцияларида: Ўзбекистон

онкологларининг II конгреси (Тошкент, 2011); “Таянч-ҳаракат аппарати ва бош-бўйин ўсмасининг долзарб муаммолари” илмий-амалий конференцияси (Нукус, 2014); Ўзбекистон онкологларининг III конгреси (Тошкент, 2015) ҳамда Республика онкология илмий марказидаги илмий мажлиси ва илмий семинар йиғилишида (Тошкент, 2015) муҳокама қилинди.

**Тадқиқот натижаларининг эълон қилиниши.** Диссертация мавзуси бўйича 58 та илмий ишлар нашр қилиниб, улардан 13 та мақола Ўзбекистон Республикаси Олий аттестация комиссиясининг докторлик диссертациялари асосий натижаларини чоп этиш тавсия этилган илмий нашрлар рўйхатига киритилган журналларда, шу жумладан 6 та мақола халқаро илмий журналларда чоп этилган.

**Диссертациянинг ҳажми ва тузилиши.** Диссертация кириш, асосий қисм (7 та боб), хулоса, амалий таклифлар, фойдаланилган адабиётлар рўйхати, 49 та жадвал ва 38 та расмдан ташкил топган 197 саҳифадан иборат.

## ДИССЕРТАЦИЯНИНГ АСОСИЙ МАЗМУНИ

**Кириш** қисмида мавзунинг долзарблиги, тадқиқотнинг мақсад ва вазифалари, илмий янгилиги ҳамда илмий-амалий аҳамияти очиқ берилган, ҳимояда илгари сурилган ҳолат шакллантирилиб, қўлга киритилган тадқиқот натижаларини ишлаб чиқаришга амалий жорий қилиш асослари тақдим этилган.

Диссертациянинг **“Остеосаркомада молекуляр-биологик ва генетик жиҳатлар ҳақида замонавий тушунчалар ва уларнинг ташхислаш ҳамда даволашдаги роли”** деб номланган биринчи боби остеосаркома ва унга ташхис қўйиш ва даволашда молекуляр-биологик ва генетик маркерларни ўрганишга оид замонавий адабиётлар тахлили бағишланган, шунингдек иммунтанқислик ҳолатларида, айниқса остеосаркомада, иммун тизим фаолияти хусусиятларига қаратилган. Бундан ташқари остеосаркома, унга ташхис қўйиш, клиникаси ва даволашнинг замонавий тушунчаларини ўрганишга қаратилган манбалар тақдим этилган. Шу билан бирга остеосаркома ва унинг молекуляр-биологик ташхислашнинг иммунологик жиҳатларини ўрганишга оид тўлиқ маълумотлар тақдим этилган.

Диссертациянинг **«Клиник материаллар тавсифи ва тадқиқотда қўлланилган усуллар»** деб номланган иккинчи бобида остеосаркомали 221 беморнинг умум тавсифи тақдим этилган. Тадқиқотлар Ўзбекистон Республикаси ССВ Республика онкология илмий марказида 2005-йилдан 2013-йилгача ўтказилган.

Назоратимизда найсимон суяк остеосаркомаси гистологик тасдиқланган 221 бемор бўлди. Тадқиқотларда аниқ натижаларга эришиш учун, ўсма жойлашган ҳудуд ва касаллик босқичлари бир-бирига мос, тарқалиши, ўсма морфологияси ва беморлар гуруҳлари ёши солиштирса бўладиган қилиб тузилди. Беморларни жинсига қараб ажратиш натижалари ушбу касаллик аёлларда 84 (38,1% ), эркекларда 137 (61,9% ) ҳолатларда кузатилди. Беморларни ёши бўйича остеосаркома кўпроқ 20 ёшгача бўлган

эркакларда 66,4% ва ўртача ёш даври  $22,0 \pm 0,7$  бўлган аёлларда 60,7 % ни ташкил этишини кўрсатди. Беморлани кузатиш муддати 1 йилдан то 7 йилгача бўлган даврни ўз ичига олди.

Остеосаркома 65 (53,3%) ҳолатларда сон суягида, 43 (35,2%) ҳолатларда катта болдир суяги ва кам ҳолларда -14 (11,5%) кичик болдир суягида учради. 221 бемордан 71 (32,1%) нафарда рентгенологик остеолитик шакли, 47 (21,3%) нафар беморда остеопластик шакли ва 103 (46,6%) нафар беморда остеосаркоманинг аралаш шакли аниқланди. Рентген текширувларида 33 (14,9%) беморда ўсма жароҳатининг чўзилганлиги 5 см гача, 138 (62,4%) беморда –6 дан 10 смгача, ва 50 (22,6%) беморда – 11см ва ундан юқорилиги қайд этилди.

Ўсма жароҳатининг чўзилганлиги 4,5 см то 17 см гача, ўртача  $9,6 \pm 0,3$  см ни ташкил қилди. 13 нафар (5,9%) беморда патологик синиш ҳолати кузатилди.

Ўсма ривожланиш жараёнининг тарқалганлиги TNM (Халқаро саратонга қарши иттифоқ классификацияси, 2007) да белгиланган. TNM тизимининг ўсма тарқалишига мувофиқ найсимон суякли остеоген саркомали беморларнинг кўпчилигида (81,4%) 2 босқичдаги касаллик бўлган: T2N0M0, T2N1M0, T2N1M1 ва T2N0M (таб. 2.5.), 1-босқичда (T1N0M0, T1N1M0) – 3,6%, 3-босқичда эса (T3N0M0, T3N1M0) – 15% беморларда учраган.

Барча беморларда асосий клиник-лаборатор ва асбобли тадқиқот усуллари ўтказилди (гематологик тадқиқотлар, суякни рентгенологик текшириш, КТ, МРТ, сцинтиграфия, ЭКГ, кўрсатмаларга мувофиқ скелет суякларини радиоизотопли текшириш, эхография). Рақамли субтракцион артериография ёки стандарт васкуляризация маълумотларига асосан сифатли баҳоланиш амалга оширилди. Васкуляризацияни сифатли баҳолаш рақамли субтракцион ёки стандарт артериография маълумотларига асосан амалга оширилди.

Иммунологик тадқиқотлар ЎзР ФА Иммунология институтида бажарилди. Яллиғланишга хос ва яллиғланишга қарши цитокинлар (ФНО- $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-2, ИЛ-6 ва ИЛ-10) миқдорини «Вектор-Бест» (Новосибирск, Россия) тижорат тизимли-тести ёрдамида иммуноферментли таҳлил усули орқали аниқланди. Эндостатин, FGF-1, FGF-2 ва VEGF-1 ва “R&D” (АҚШ) ва «Вектор-Бест» (Новосибирск, Россия) тест-тизимлари ёрдамида иммунофермент усули ёрдамида аниқланди.

Иммуногистокимёвий тадқиқотлар ЎзР ССВ Республика онкология илмий марказининг патологоанатомия бўлимида, ўсмалар биологияси лабораторияси билан биргаликда олиб борилди. Иммуногистокимёвий тадқиқотлар («Dako», Novocastra™) бирламчи антителаларини bcl-2, Ki-67 ва p53 ёрдамида олиб борилди. Ижобий натижа сифатида супрессор-гени p53 ва Ki-67 антигенини ядроларни махсус рангланиши, шунингдек bcl-2 экспрессияси эса цитоплазма мембранасини рангланишини деб ҳисобланди.

Остеосаркомали беморларнинг ўсма тўқимаси ва периферик қоннинг лейкоцитларидан олинган ДНК, молекуляр-генетик тадқиқотлар учун манба бўлиб хизмат қилди. TP53 гени 4, 5, 6, 7, 8 ва 9-экзонининг нуклеотид кетма-

кетлигини секвенирлашда ижобий ва салбий назорат сифатида, ушбу мақомга эга бўлган ўсма линиялари ДНК сидан фойдаланилди. Генетик тадқиқотлар, Н.Н.Петров номидаги Онкология ИТИ (СПб) нинг ўсма ривожланиши биологияси бўлимида ўтказилди, бўлим мудирлари т.ф.д., проф. Имянитов Е.Н.

Бизнинг 2005-2013 йиллардаги тадқиқотларимиз даврида, беморлар ҳар хил даво усуллари қабул қилишди. Неодьювант поликимётерапия (ПКТ) 196 (88.6%) беморларда, улардан 131 (69.1%) нафарида тизимли неодьювант КТ, узоқ муддатли артерия ичи маҳаллий кимётерапияси (УМАИМК) 29 (4%) нафар беморда, қўшма тизимли ПКТ ва УМАИМК 24 (9.9%) касалларда ўтказилди. Тизимли неоадьювант КТ да кўпинча қуйидаги схемалардан фойдаланилди: 74(56.4%) пациентлар CAP схемаси бўйича, EAP- 10 (7,6%), VCAP - 17 (12,9%), MAP - 10 (7,6%) ва AP - 20 (15,2%) муолажа олдилар. УМАИМК схемасини бўйича қуйидагилар: CAP схемаси бўйича - 34 (82,9%) беморга, AP- 3 (7,3%), MAP - 3 (7,3%) ва VCAP - 1 (2,4%) беморга муолажа ўтказилди. Курслар сони муолажага нисбатан жавоб олинишига боғлиқ ҳолда ўзгариб турди, ўртача, ПКТ тизимида,  $3,06 \pm 0,16$  ни, УМАИМКда  $2,81 \pm 0,18$  ни ташкил қилди. Цикллар аро интервал 21 кунни ташкил қилди. Бир неча ҳолатларда, пациентларнинг операциядан бош тортишлари оқибатида, 42 (19,0%) беморларимизда нур терапияси ўтказилди. Нурлантиришнинг бир маротабалик дозаси ўртача  $2,36 \pm 0,12$  Гр бўлиб, умумий нурлантириш дозаси  $48,56 \pm 2,74$  Грни ташкил этди.

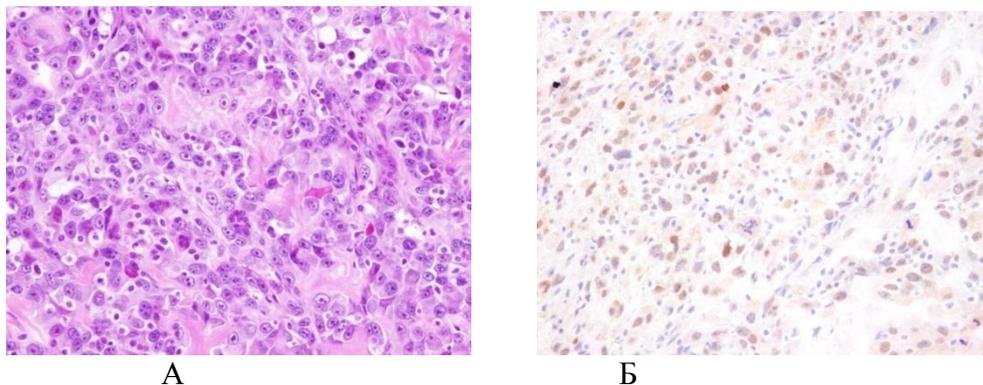
Бизнинг назоратимизда, 162 нафар беморда хирургик даво амалга оширилди. 94 (58,0%) ҳолатларда органларни сақлаб қолувчи операциялар қилинди. Барча кўрсатмалар ва ўсмани кўпайиш хавфи ҳолатларини ҳисобга олган ҳолда 68 (41,9%) нафар беморларда майиб қилувчи операциялар ўтказилди.

Операциядан кейинги даврда 218 та беморда адьювант кимётерапия ўтказилди: чуқур даво патоморфозиди, неоадьювант кимётерапиядаги каби схемалар ўтказилди. Даво патоморфозининг қуйи даражаси кузатилганда олдинги схемаларга Этопозид, Ифосфомид қўшилди, шунингдек, турли схемадаги юқори дозали поликимётерапия ўтказилди.

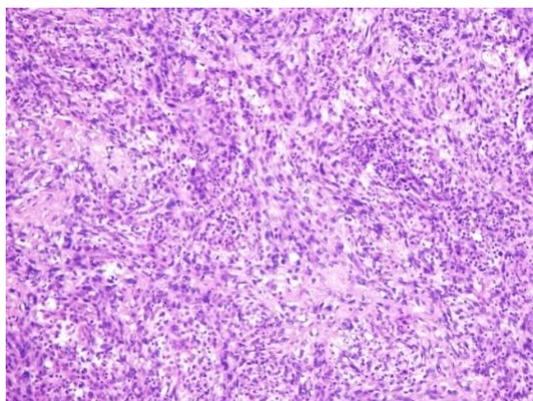
**“Остеосаркомада цитогенетик маркерларнинг роли”** деб номланган учинчи бобда остеосаркомада цитогенетик маркерларни тадқиқоти ҳақидаги маълумотлар келтирилган. Генетик тестлашни амалга оширишни остеосаркомали беморларни ўтказиладиган даволаш самараси мониторинги ва башоратлашда ишлатиш кераклиги кўрсатилди. Остеосаркомаларни цитогенетик, патоморфологик ва клиник тавсифларини комплекс ўрганиш ушбу тадқиқотларни долзарблигидан далолат бериб, булар остеосаркомаларни самарали эрта ташхислаш, даволаш ва башоратлаш мақсадини амалга оширишга ёрдам беради. Цитогенетик тадқиқотлар хромосома беқарорлигининг даражаси дискраминация (5%)дан юқорилиги башорати нохуш омил эканлигини кўрсатди. Неоадьювант кимётерапияси ўтказилганда, беморларнинг бир қисмида тўлиқ морфологик регрессия кузатилди, уларнинг 65,2%да хромасомалар абберрацияси (АХ) даражаси

дискриминация даражадан пастроқ эканлиги аниқланди. Каплан-Мейер усули бўйича ҳисобланганда остеосаркомали беморларнинг яшаб қолиши АХ даражаси 5% дан паст бўлган 3 йилгача яшаб қолиш эҳтимоли 70% беморларда, АХ даражаси 5% дан юқори бўлган даврда яшаш эҳтимоли 50% беморларда бўлади. Юқори ва паст АХ даражаси билан бўлган 40% беморлар 5 йилгача умр кўришади. Бирок, фақат хромаса абберрациялари паст даражада бўлган гуруҳ беморлари 15 йилга қадар яшаши эҳтимоли бор, бу гуруҳга мансуб беморлар 15-20% ни ташкил этиши мумкин. Натижаларга кўра, АХ даражаси паст бўлган беморларда 3 йил мобайнида вафот этиш хатари  $R_1$  0.2 ташкил этади; 5 йилгача -  $R_1$  0.8; 15 йилгача  $R_1$  2.5, АХ даражаси юқори бўлган беморларда эса бу натижалар  $R_2$  0.1 ва 0.6 мувофиқ ташкил этди; 15 йилгача эса ҳеч қим яшаб қолмади. Шу ўринда, ОС кечишига таъсир кўрсатидиган ўсма ва организм хусусиятларини тавсифлайдиган қатор ишончли омиллар кўрсатилди. Ушбу аломатлар қаторига ижобий таъсир кўрсатмайдиган нохуш башоратли омил бўлган, дискриминация даражасидан (5%) юқори бўлган хромосома беқарорлиги даражасини қайд этиш мумкин. У ўсма жарёнининг зўрайиши, ўсманинг дифференцирлашуви ва патоморфоз даражасининг пастлиги, ўсма ҳажмининг катталашуви ва хондробластик гистологик варианты билан, шунингдек, беморлар ҳаётларининг нисбий давомийлиги билан боғлиқ бўлиб, у хромосома беқарорлигининг паст даража беморлардан 1,6 баробар пастроқдир.

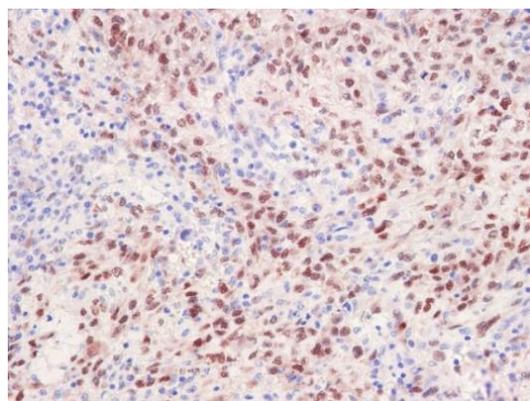
Тўртинчи боб “**Молекуляр – биологик маркерлар ва уларнинг остеосаркомадаги роли**” деб номланган унда суяк саркомаларининг молекуляр – биологик тавсифи келтирилган бўлиб, унда клиник амалиётда суяк саркомасининг бирламчи ташхиси билан беморлар орасида хавфли гуруҳи ва башоратли биомаркерларни аниқлаш биринчи дастурга чиқарилган. Апоптоз ривожланишига ҳар ҳил йўналишда таъсир этганлиги учун P53 ва bcl- 2 онкогенларининг параллел тадқиқотлари олиб борилди (1-расм, 2-расм).



**1-расм. Остеосаркома: Хондробластик гистологик вариант.**  
**А – гематоксилин эозин; Б – иммуногистохимия p53+**



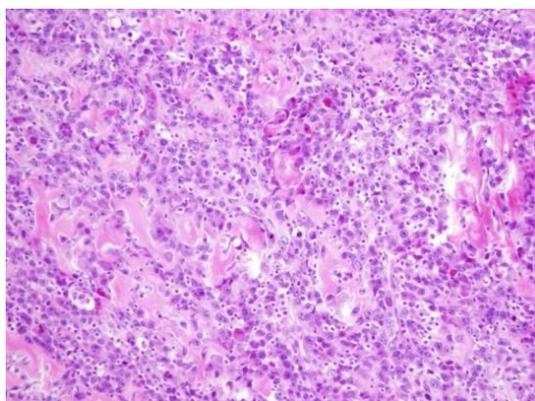
А



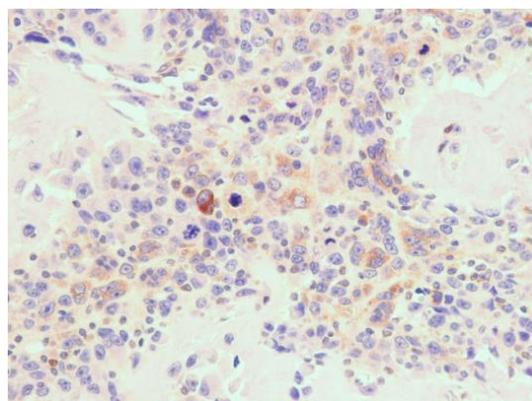
Б

**2-расм. Периостал остеосаркома: А – гематоксилин-эозин;  
Б – иммуногистохимё р53-**

Иммуногистохимёвий тадқиқотларнинг кўрсатишича, неoadъювант кимётерапия (НКТ) ўтказилиши натижасида тўлиқ морфологик регрессга эришиш 13% беморларда аниқланди, шулардан 70,6% беморларда p53 мутант ген экспрессияси ва Ki-67 ген экспрессияси йўқлиги, 80,0% да эса bcl 2 генининг экспрессияси аниқланди. УМАИМК схемасининг қўлланилишидан сўнг, 15,7% беморларда ҳам тўлиқ морфологик регресс кузатилди, p53 мутант гени 87,5% беморларда йўқлиги аниқланди, беморларнинг 90,0% да bcl-2 гени экспрессияси юқори бўлиб, ушбу беморларнинг 80,0% да эса Ki-67 ген экспрессияси аниқланмади. НКТдан сўнг 14,5% беморларда, УМАИМК схемаси қўлланилишидан сўнг 19,4% беморларда ва ХЛТдан сўнг 14,3% беморларда даволанишдан самара бўлмади ва ўсма ўсиш жараёнининг кучайиши кузатилди.



А



В

**3-расм. Остеобластик остеосаркома.**

А - остеобластларни эслатувчи ўсмакатта думалоқ хужайралардан иборат, шишдаги остеоид кам миқдорда, гематоксилин ва эозин тусида, Х200 катталаштирилган. В - остеобластик остеосаркомада bcl-2 нинг иммуногистохимёвий тадқиқоти. Алоҳида бўлган ўсма хужайраларида позитив (цитоплазматик) реакция, реактив лимфоцитларда позитив. Хромоген – диаминобензидин, гематоксилин билан контр бўлган, Х400 катталаштирилган.

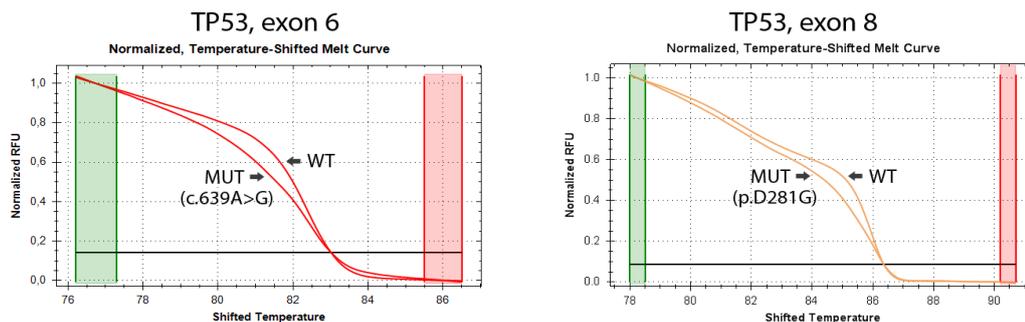
Онкомаркерлар экспрессияларининг ассоциацияси билан Каплан-Мейер методи бўйича ҳисобланган ОС беморларининг яшаб кетиш

функцияси, mtp53 мутант гени экспрессияси ва Ki-67 генининг экспрессияси йўқлигида, 98% беморлар 3 йилгача яшаш эҳтимолига ва ушбу генларнинг экспрессияси борлигида эса шу ҳолатга 85% беморлар етишини таъкидлаб ўтишга имконият берди. (3-расм).

mtp53 ва Ki-67 генлар экспрессияси бўлмаган 50% беморлар ва экспрессияси юқори бўлган 30% - 40% 5 йилгача яшайдилар. Бироқ, mtp53 ва Ki-67 генлари экспрессия бўлмаган беморлар гуруҳи 15 йилгача яшаш эҳтимолига эгадирлар, бундай беморлар 15% ташкил этади. Каплан-Мейер методи бўйича ҳисобланганда, беморларининг яшаб қолиши қайта ассоциация функцияси, bcl-2 гени экспрессиясининг йўқлигида, 90% беморлар 3 йилгача яшаш эҳтимолига ва ушбу генларнинг экспрессияси борлигида эса бу даврга 98% беморлар етишини таъкидлашга имконият берди. Bcl-2 ген экспрессияси бўлмаган 40% беморлар ва 45% беморлар юқори экспрессия билан 5 йилгача яшайдилар. Фақатгина bcl-2 ген экспрессиясига эга бўлган беморлар гуруҳи 15 йилгача яшаш эҳтимолига эгадирлар, бундай беморлар ҳам 15% ташкил этади. Башоратлаш мақсади учун хавф функцияси қўлланилади. Натижаларга кўра, p53 ва Ki-67 генлар мутациялари йўқлигида 3 йил мобайнида вафот этиш хатари  $R_2$  -0.4 ташкил этади; 5 йилгача -  $R_{2-4}$  0.8; 15 йилга қадар –  $R_{2-4}$  2.5 – 2.6, ва ушбу генларнинг экспрессияси бўлган беморларда эса бу натижалар  $R_{2-4}$  0.2 ва 1.0 мос равишда ташкил этди; 15 йилгача ҳеч ким яшамади.

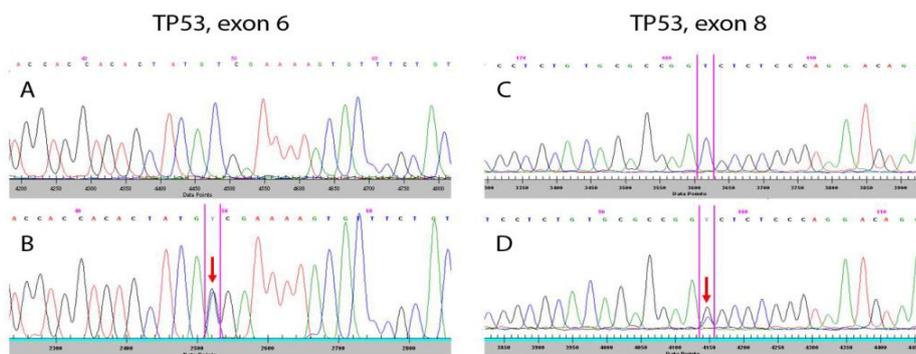
Натижаларга кўра, остеосаркомали беморларда молекуляр-генетик фенотип апоптоз биомаркерларининг экспрессия ва пролиферация даражаси (mtp53+, bcl-2, Ki67+) билан белгиланади, у эса эрта рецидивларнинг пайдо бўлиши ва эрта метастазлашувнинг башоратловчи ноҳуш омилдир. Ушбу фенотип ўсма ўсиш жараёни ривожланишининг башоратловчи, патоморфознинг (1 ва 2) паст даражаси, беморлар умрининг (3 йилгача) нисбатан давомлилигини ноҳуш омили, у дифференцирланишнинг (G3) паст даражаси, ўсма ҳажмининг ўсиши, остеосаркоманинг хондробластик варианты билан боғлиқдир. Ушбу экспрессион профил клиник равишда M (масофадаги метастаз) билан боғлиқ, аммо T (тарқалганлик) билан боғлиқликка эга эмас.

Биз TP53 генининг 5-9 экзонларда мутациялар таҳлилини амалга оширдик. Ушбу экзонларда мутациялар аниқланиши TP53 генининг кодлаш кетма-кетлиги икки этапда амалга оширилди. ДНК фрагментларини кинетик эритишининг юқори даражадаги аниқ таҳлили натижаларини баҳолаш Precision Melting Analysis (протоколлар таҳлили учун мўлжалланган Bio-Rad Laboratories CFX96 асбобида бажарилди) дастури ёрдамида амалга оширилди. Мутацияси бор фрагмент эришининг деформация эгри чизиги “Ёввойи тип” намунаси билан таққослаштириш мисолида 4-расмда кўрсатилган.



4-расм. ДНК фрагментларини кинетик эришишининг юқори аниқ анализи ёрдамида TP53 гени мутацияларининг детекцияси. Чапда - TP53 гени 6 экзонаси таркибида мавжуд бўлган с.639A>G гетерозиготанинг ўзгартирилиши натижасида вужудга келган, ёввойи турнинг намунаси билан мутация таркибида бўлган фрагмент эришининг деформацияси. Бундай ўзгартирилиш функционал аҳамиятга эга бўлмаган “сукут сақлайдиган” полиморфизм ҳисобланади. Ўнгда - таркибида мавжуд бўлган р.D281G (с.842A>G) гетерозигота миссенс-мутацияси натижасида вужудга келган, ёввойи турнинг намунаси билан мутация таркибида бўлган фрагмент эришининг деформацияси. Бундай ўзгартирилиш функционал аҳамиятга эга.

Иккинчи босқичда ДНК фрагментларини кинетик эришининг юқори аниқликдаги таҳлили маълумотларининг верификацияси ва аниқлаш ишлари амалга оширилди. Эгри чизигнинг эриш деформацияси аниқланганда ёки эриш харорати қўзғатилганда амплификациянинг намуна маҳсулоти Сэнджер усули бўйича капилляр секвенациядан ўтказилди.



5-расм. TP53 ген фрагментларининг секвенацияси.

А. TP53 гени 6 экзонаси (тескари праймер) фрагментидаги ёввойи турнинг кетма-кетлик хроматограммаси; В. TP53 гени 6 экзонаси (тескари праймер) фрагментининг кетма-кетлик хроматограммаси. с.639A>G (Т>С) гетерозигота ўзгартирилишининг кўринмоқда. Бундай ўзгартирилиш функционал аҳамиятга эга бўлмаган “сукут сақлайдиган” полиморфизм ҳисобланади. С. TP53 гени 8 экзонаси (тескари праймер) фрагментидаги ёввойи турнинг кетма-кетлик хроматограммаси; D. TP53 гени 8 экзонаси (тескари праймер) фрагментининг кетма-кетлик хроматограммаси. с.842A>G (Т>С) гетерозигота ўзгартирилишининг кўриниши. Бундай ўзгартирилиш функционал аҳамиятга эга бўлган р.D281G миссенс-мутация ҳисобланади

TP53 (p.D281G) генида мавжуд бўлган полиморфизм ва мутация фрагменти, “ёввойи тип” хроматограмма фрагменти қисмларининг намунаси 5-расмда кўрсатилган. Ушбу тадқиқот мобайнида остеосаркомали беморлар гуруҳида TP53 генида ирсий мутацияларнинг содир бўлиш даражасини аниқлаш мўлжалланган эди. Мухим башоратловчи бўлган ушбу маълумотларни остеосаркомали беморларни клиникада даволаш мониторинги мобайнида, истиқболли молекуляр-генетик маркерлар гуруҳини излаш ва аниқлашда ҳисобга олиш даркор.

Бешинчи **“Остеосаркомали беморларининг иммунологик тавсифи”** бобида остеосаркомада иммун тизимининг ҳолатини ҳақидаги маълумотлар келтирилган бўлиб, унда онкологик жараённинг беқарорликда ўтиши, ҳар хил шакллари мавжудлиги ва касалликнинг морфологик вариантлари ифодаланган.

Остеосаркомали беморларининг иммунореактивлиги хусусиятлари лейкоцитларнинг умумий сонининг, CD8+-цитотоксик лимфоцитлар, CD16+-лимфоцитлар, CD20+-лимфоцитлар ва CD38+-лимфоцитлар ошиши, майда ва йирик ўлчамли АЮИК миқдорининг ортиши, CD3+- лимфоцитлар, CD4+-лимфоцитлар ва ИРИ камайиши фонида тавсифланади. Иммун фаолиятининг пасайиши ва касаллик ривожланишининг кўрсаткичи сифатида ИРИ ва АЮИК эканлиги маълум бўлди. ОС беморлар цитокинлари спектри ИЛ-2 унча кўп бўлмаган фаоллашуви ва яллиғланишга қарши ИЛ-6 ва ИЛ-10 цитокинларининг бир неча қарра ортиши фонида яллиғланишга хос ИЛ-1β ва ФНО-α цитокинлар миқдорининг 2 баробар ортгани билан тавсифланади, бу эса ўз навбатида ИЛ-6 ва ИЛ-10 цитокинлари иммун жавоб ва онкогенезни бошқариш механизмида фаол иштирок этишидан далолат беради. Яллиғланишга хос бўлган цитокинлар (ИЛ-1β, ФНО-α) миқдорининг максимал ортиши ўсманинг G2 ва G3 даражали дифференцирланиши, ўсманинг катта ҳажмдалиги, остеобластик гистологик шаклли, патоморфознинг пастки босқичидаги, умрнинг қисқа давом этиши ва узок метастазлари мавжуд III клиник босқичда бўлган беморларга хос эканлиги аниқланди. Яллиғланишга қарши бўлган (ИЛ-6, ИЛ-10) цитокинлар миқдорининг юқорилиги, иммун резистент ўсмали, ўсманинг G2 ва G3 даражали дифференцирланиши, ўсма жараённинг тарқалган бўлиши, ўсманинг остеобласт ва периостал вариантларида, жараённинг даводан кейинги ривожланиши кучайганлиги ва умрнинг қисқа давом этиши IIА-В ва III клиник босқичидаги беморларга хослиги билан тавсифланади. Умумий 5-йиллик яшаб қолишлик ИЛ-6 миқдорининг 60 пг/мл гача бўлган беморларда, унинг 60 пг/млдан юқори бўлган шахсларга нисбатан 1,7 маротаба юқори бўлди. Остеосаркомали беморларда эндостатиннинг ўртача миқдори 2,6 маротаба, FGF-1 миқдори – 3,4 маротаба, қон зардобидagi VEGF-A концентрацияси эса 14,3 баробар юқоридир. Эндостатин, FGF-1 ва VEGF-A нинг юқори бўлган миқдори, умрнинг қисқа давомийлиги ва узок метастазлар мавжудлиги эркак жинсли беморларга хос бўлди. Бинобарин, олинган натижалар остеосаркомали беморларнинг иммунореактивлигини

тавсифлайди ва даволаш мониторингини ташхислаш ва башоратлаш критериялари сифатида хизмат қилиши мумкин.

**“Остеосаркомани даволашда молекуляр-генетик маркерларнинг башоратловчи роли”** деб номланувчи олтинчи бобда остеоген саркомали беморларининг турли комбинацияларда ўтказилган кимётерапиядан кейин олинган тадқиқот натижалари тақдим этилган. Неоадъювант ПКТнинг турли вариантлари ўтказилгандан сўнг, 162 беморда оператив аралашув ўтказилди, 42 беморда операцияга рад жавоб сабабли консерватив даво ўтказилди. Систематик неоадъювант кимётерапия (СНКТ) ўтказилгандан сўнг, 131 бемордан 52 (39,7%) беморда тўлиқ ва қисман патоморфологик регресс (III-IV даражалари) кузатилди, даволаш патоморфозанинг даражасига етмаган 79 (60,3%) беморларга нисбатан ушбу беморларда, кейинчалик, касаллик кечишининг яхшиланиши кузатилди. Операция олди даво муолажаларни олган беморларда орган сақлайдиган операцияларнинг юқорироқ даражаси кузатилди. III-IV даражали даво патоморфози аниқланганда, адъювант ПКТ 39,7% беморларда операциядан олдин қандай ўтказилган бўлса, худди шундай схемада ўтказилди, чунки бундай ҳолатларда ПКТ схемаси энг самарали ҳисобланади. Терапиянинг турига ва Хр-бузилишларининг фон даражасига кўра, ОС беморларни даволаш самарадорлигининг қиёсий баҳоси ўтказилди. Натижаларга кўра, СНКТдан (1-гурух) сўнг 131 беморлар ичидан 78 (59,5%) нафар беморларда қисман ва тўлиқ самарадорлик кузатилди. Бунда, 78 дан 36(46,2%) нафарида Хр-бузилишларининг ўртача фон даражаси 5% дан пастроқ бўлиши (дискриминацион ёки айирувчи даража), аммо Хр-бузилишларининг ўртача фон даражаси эса соғлом шахслар кўрсаткичларидан 2,5 баробар юқори эканини кўрсатди. 42 (53,8%) беморларда самарасиз кечиб, Хр-бузилишларининг фон даражаси уларда 5% дан юқори ва соғлом шахсларнинг кўрсаткичларидан 7,5 баробар юқори натижа кузатилди.

Ўтказилаётган терапия самарадорлигининг қиёсий анализи ва ушбу гуруҳ беморлари ичида Хр-бузилишларининг ўртача фон даражасига кўра, кимётерапия қўлланилишидан ижобий эффе́ктуга эга 46,2% беморлар периферик қонларидаги лимфоцитлар Хр-бузилишларининг ўртача фон даражаси ушбу даврдан самарага эга бўлмаган беморлардан кўра 2,4 мартаба паст бўлган.

УМАИМК ва УМАИМК+СНКТ (53 беморлар - 2-гурух) олган беморлар ва шу билан бирга ижобий (тўлиқ ва қисман) даволаниш самарага эга бўлганлар (62,3%) СНКТ олган беморларга нисбатан Хр-бузилишлари фон даражасининг ўртача фон миқдорида фарқланмади, бироқ, ушбу кўрсаткичлар соғлом шахсларнинг кўрсаткичларидан 4 баробар юқори натижани кўрсатди. Ушбу давонинг самарасизлиги 20 (37,7%) беморларда кузатилди, уларнинг ичидаги 70% да хромосома бузилишларининг даражаси дискриминацион даражасидан юқори бўлди, Хр-бузилишларининг ўртача фон даражаси эса соғлом шахсларнинг кўрсаткичларидан 8 баробар юқори натижани кўрсатди. Турли даво олган ва самарали кечган беморларда лимфоцитлар цитогенетик ўзгаришлар даражалари (6,0 дан 9,2% гача) кам

фарқланди, прогрессив ўсиш жараёни бўлган беморларнинг Хр-бузилишлари даражаси бундан мустасно (16,4%,  $p < 0,05$ ).

162 ОС беморларида оператив даволаш амалга оширилди (3-гурух). Орган саклайдиган операциялар 94 беморларда ўтказилди. Ижобий эффект Хр-бузилишлари ўртача фон даражаси 5% дан кам бўлган 69,1% (65) беморларда ва ушбу кўрсаткич соғлом шахслардан 4,5 баровар юқорилиги кузатилди. Самаранинг мавжуд эмаслиги Хр-бузилишлари ўртача фон даражаси бўлган 30,9% беморларда ва ушбу кўрсаткич соғлом шахслардан 7 баровар юқорилиги аниқланди.

Кимёноур терапия ва/ёки кимётерапия самарасиз кечиши натижасида 68 беморларда майиб қиладиган операциялар амалга оширилди, шунингдек, майиб қиладиган операциялар кимёноур терапия ва/ёки кимётерапия ўтказилишидан аввал ўсманинг юмшоқ тўқима компоненти бўлган 25 беморларда ўтказилди. Ушбу беморлар гуруҳида ўсма жараёнининг прогрессиясида Хр-бузилишлар фон даражаси терапиядан ўтказилганда тўлиқ эффектга эга бўлган беморлардан 1,5-2 баробар юқори бўлди. Ўтказилган тадқиқотлар тахлилига кўра, амалга оширилган даволашнинг эффекти бўлмаганда, хромосомалар абберрациялари фон даражаси соғлом жисмоний шахслар ёки яхши клиник самарага эга бўлган шахслардан кўра юқорироқ бўлади. Бинобарин, ОС беморларнинг периферик қонларидаги лимфоцитларда даволашдан аввал аниқланган хромосомалар абберрацияларининг даражаси бўйича даво самарадорлигини башоратлаш мумкин.

Хр-бузилишларда ОС беморларнинг умумий 3 ва 5 йиллик яшаб қолиши дискриминациядан (5% дан кўп) юқори бўлиши  $78,7 \pm 2,7\%$  ва  $21,3 \pm 2,7\%$  мос равишда, паст даражада эса (5% дан кам) –  $82,2 \pm 3,1\%$  ва  $67,8 \pm 3,1\%$  ташкил этди.

Ўсмаларнинг клиник ўтишини башоратлаш ва даволаш тактикасини ишлаб чиқиш мақсадида пролиферация и апоптознинг иммуногистохимёвий маркерлари муҳим башоратли кўрсаткичлар ҳисобланади. Парафинга тўлғазилган ва стандарт поводкали, нейтрал формалин билан фиксация қилинган ўсма тўқималари намуналарида, апоптоз ва пролиферация онкомаркерлари - p53, bcl-2, Ki67 аниқладик. Даво тури ва ўсма хужайралари фенотипига кўра, беморларнинг самарали даволашининг солиштирма баҳоладик. Систематик кимётерапия олган беморлар ичидан (1 гуруҳ) фақатгина 13% беморларда тўлиқ самара кузатилди. Улар ичидан 70,6% mtp 53 ва Ki67 мутант генига салбий ва кучсиз ижобий ИГХ реакциялар билан ва bcl-2 га мўътадил ва кучли экспрессия билан (80%). mtp 53 мутант генига (58,5%) беморлар салбий ва кучсиз ижобий ИГХ реакцияга, Ki67 (70,6%) беморлар кучсиз ижобий экспрессияга, bcl-2 (46,4%) беморлар юқори экспрессияга эга бўлган ўсма хужайралари фенотипи бўлганларда даволанишдан қисман самара кузатилди. Ушбу гуруҳдан 37,4% беморларда терапиянинг самараси салбий бўлди, уларнинг кўпчилигида mtp53 ва Ki 67 мутант генининг юқори экспрессияли ўсма хужайралари борлиги ва bcl-2 экспрессиясининг мавжуд эмаслиги қайд этилди.

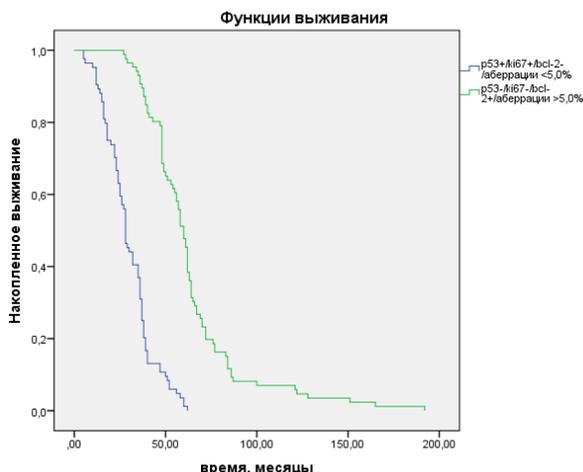
Иккинчи гуруҳда (УМАИМК) ўтказилган терапиядан қисман ва тўлиқ эффектлар 73,6% беморларда аниқланди, улардан, 66,7% беморларда ўсма хужайралари mtp-53 салбий, Ki 67 генининг ўртача ва паст экспрессияси ва bcl-2 бўлган ўртача ва юқори реакцияси кўрилди. Ушбу терапия ўтказилгандан сўнг 35,8% беморларда самара салбий бўлди, уларнинг 73,7% ўсма хужайралари фенотипи mtp53 ва Ki 67 мутант генига юқори экспрессияли хужайраларидан ҳамда bcl-2 генига паст экспрессиясиларидан ташкил топган комбинациядан иборат бўлди. 3 гуруҳда (42 беморларга нур терапияси қўлланилди) терапиядан 56% беморлар ижобий эффект олишди, улардан mtp 53 мутант генига салбий ва кучсиз экспрессияси 75% беморларда ва фақатгина 12,5% ушбу оксилнинг мўътадил экспрессияси аниқланди. Ki67 генининг экспрессияси, кўпинча кучсиз бўлиб ёки кўпчилик беморларда (88,8%) мавжуд бўлмади, bcl-2 экспрессияси эса бу гуруҳда даво ижобий самарага эга бўлган беморларда юқори ва мўътадил бўлди.

Остеоген саркомада 1, 3 ва 5 йил яшаб қолиш кўрсаткичларининг тахлилига кўра, 1 йил кўпроқ яшаш кўрсаткичи 95,1% ҳолатларда, 3 йил кўпроқ яшаш кўрсаткичи 51,8% ҳолатларда кузатилди. 5 йилга қадар 39,37% (87) беморлар умр кўришди. Бу ҳолатда, ОС нохуш башоратлаш мезонлари сифатида кўйидагилар белгиланди: даво патоморфози тавсифлари (I-II даражани аниқланиши), ОС беморларининг периферик кон лимфоцитларида хромосома абберациялари даражаси дискриминацион (5%) даражасидан кўпроқлиги, p53 мутант генининг экспрессияси, bcl-2 экспрессиясининг мавжуд эмаслиги, Ki67 экспрессияси, ўсма хужайраларининг паст дифференциацияси.

221 беморларда ўтказилган самарали даволашнинг тахлилига кўра, оғриқ синдромининг тўлиқ йўқолиши, беморда ўсмани аниқ бармоқлар билан пайпаслаб кўрилганда оғриқни йўқолиши ва қўл-оёқлар функцияларининг тўлиқ тикланиши фақатгина 13 (5,9%) беморларда кузатилди. Бу беморларнинг фенотипи кўйидаги биомаркерлар йиғиндисидан ташкил топган – mtp 53-, bcl 2 +, Ki 67-, ХА < 5%, ушбу ҳолат ПКТга бўлган тўлиқ клиник жавоб сифатида баҳоланди. Қисман клиник жавоб, оғриқ синдроми ва ўсма ҳажмининг камайиши, шунингдек, қўл-оёқлар функциясининг яхшиланиши 84 (38,2%) ҳолатда фенотиплар билан mtp 53-, bcl 2 +, Ki 67-, ХА < 5% ва mtp 53-, bcl 2 +, Ki 67-/+, ХА < 5% кузатилди. 96 беморларда (43,4 %) стабиллашиш ҳолати кузатилди, фенотиплари эса mtp 53-, bcl 2 +/-, Ki 67-/+ и ХА < 5% бўлган. Жараёни ривожланиши - 28 (11,8%) беморларда mtp 53+, bcl 2 +/-, Ki 67-/+ ва ХА > 5% фенотипи билан кузатилди.

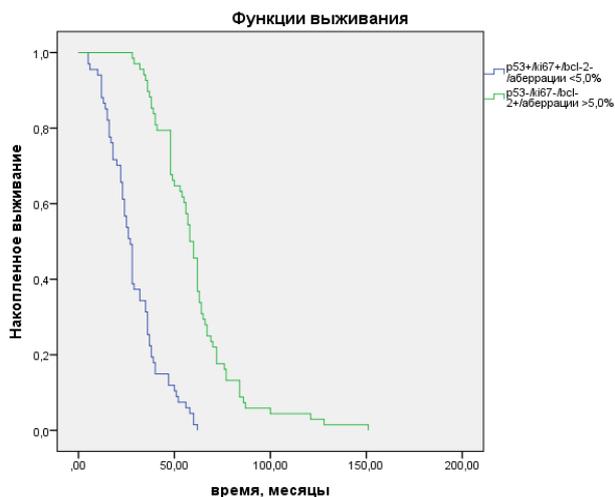
Касаллик кечишини ўрганиш мақсадида, биз, ўсма маркерларининг генетик комбинациялари (P53, Ki-67, Bcl-2, хромосома абберациялари) билан боғлиқ ҳолда кумулятив, метастазсиз ва рецидивсиз яшаб қолишини аниқладик. Каплан-Мейер усули бўйича олинган кумулятив яшаб қолишнинг тахлил натижалари тадқиқот олиб борилаётган онкомаркерлар (p53, bcl 2, Ki 67) экспрессия даражаси бўйича гуруҳланган беморлар ичида 10% дан кам бўлган ўсма хужайраларида p53 мутант генининг экспрессияси, Ki 67 – 20% гача, а bcl-2 - 20% дан кўп хужайраларда (6-расм) кузатилса, яшаб қолган

беморларнинг улушини ўсишига олиб келишини кўрсатди. Ўтказилган статистик таҳлилга кўра, P53+/ Ki-67+/ Vcl-2-/ хромосома абберрациялар даражаси >5,0% комбинациясида 3 ва 5 йил кўпроқ яшаб қолмоқлик ( $40,0 \pm 5,4\%$  ва  $0\%$ ) кўрсаткичларининг хромосома абберрациялар даражаси P53-/ Ki-67-/ Vcl-2+/ ва хромосома абберрациялари <5,0% бўлганидан пастроқ бўлади ва шунда 3 ва 5 йил кўпроқ яшаш кўрсаткичлари  $90,0 \pm 2,9\%$  ва  $40,0 \pm 4,2\%$  ташкил этади, бундан ташқари, ушбу фенотипга эга бўлган беморларда 15 йилгача ( $p < 0,05$ ) яшаш имкони мавжуд бўлади.



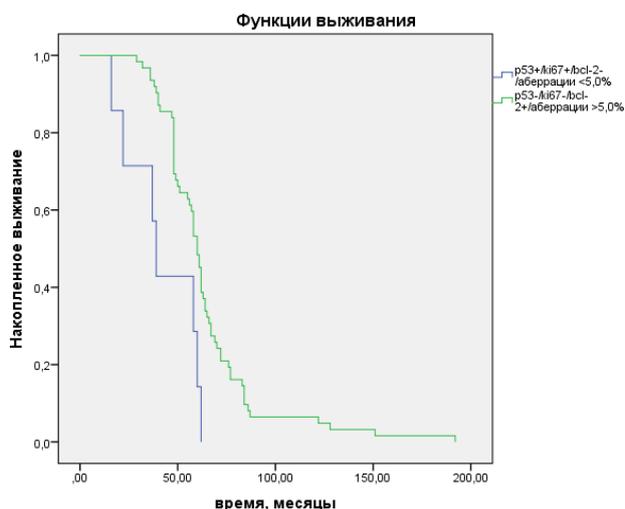
**6-Расм. Негатив фенотип билан p53+/ki67+/bcl-2-/абберрациялар >5,0% (n=84) ва позитив фенотип билан p53-/ki67-/bcl-2+/абберрациялар <5,0% (n=86) яшаб қолган беморларнинг кумулятив улуши.**

Негатив фенотип P53+/ Ki-67+/ Vcl-2-/ хромосома абберрациялар <5,0% билан бўлган беморларнинг рецидивсиз яшаб қолишларининг таҳлилида 3 ва 5 йил кўпроқ яшаб қолмоқлик кўрсаткичлари  $60,0 \pm 4,9\%$  ва  $10,0 \pm 3,4\%$  ташкил қилди, позитив фенотип P53-/ Ki-67-/ Vcl-2+/ хромосома абберрациялар <5,0% бўлганда эса кўрсаткичлар  $90,0 \pm 3,2\%$  ва  $50,0\% \pm 4,2\%$  тенг бўлди. Таққослаш натижасида ушбу кўрсаткичлар статистик ишонарли эканлиги аниқланди ( $p < 0,05$ ) (7-расм).



**7-Расм. Касалнинг қайталанишисиз яшаб қолган беморларнинг улуши - негатив фенотип билан p53+/ki67+/bcl-2-/абберрациялар >5,0% (n=67) ва позитив фенотип билан p53-/ki67-/bcl-2+/абберрациялар <5,0% (n=68).**

Негатив фенотип P53+/ Ki-67+/ Bcl-2-/ хромосома аберрациялар <5,0% билан бўлган беморларнинг метастазсиз яшаб қолишларининг тахлилида 3 ва 5 йил кўпроқ яшаб қолиш қолмоқлик кўрсаткичлари 70,0±3,4% ва 10,0±3,2% ташкил қилди, позитив фенотип P53-/ Ki-67-/ Bcl-2+/ хромосома аберрациялари <5,0% бўлганда эса кўрсаткичлар 90,0±3,4% ва 50,0±4,3% (p<0,05) тенг бўлди. (8- Расм).



**8- Расм. Метастазланмай яшаб қолган беморларнинг улуши - негатив фенотип билан p53+/ki67+/bcl-2-/аберрациялар >5,0% (n=7) ва позитив фенотип билан p53-/ki67-/bcl-2+/аберрациялар <5,0%(n=62).**

Тақдим этилган натижаларга кўра, P53+, Ki-67+ ва хромосома аберрациялари >5% ижобий экспрессияларда бўлганда башорат салбий бўлиб чиқди, P53, Ki-67, Bcl-2+ ва хромосома аберрациялари <5% экспрессияларсиз бўлганда эса башорат ижобий кўрсаткичларни кўрсатди.

Баъзи муаллифлар тадқиқотлари ва бизнинг маълумотларимизга кўра, мутацияли бўлган p53 ген-супрессорнинг экспрессиясини ва хромосома беқарорлигини ўрганиш, остеосаркома анча информатив башоратлаш омили эканлигидан далолат беради.

Ўтказилган тадқиқотларга кўра, 131 клиник–рентгенологик, морфологик, иммунологик, цитогенетик ва молекуляр-генетик аломатлардан ҳаётнинг давом этиш муддати билан коррегирланувчи фақатгина 15 таси касаллик башоратида муҳим аҳамиятга эга экан. Остеоген саркомали беморларда 3 ва 5 йил кўпроқ яшаб қолиш қолмоқлик кўрсаткичларининг бир омилик тахлили ўтказилишида, шунингдек, кумулятив, метастаз бўлмаган, ўсма фенотиби билан рецидивларсиз яшаб қолиш ўртасида ва бошқа турли ўсма генетик маркерларининг бирга келиши (p-53, Bcl-2, Ki-67, хромосома аберрациялари) орасида корреляцион алоқалар ўз ўрнига эга экан.

p53+Ki-67+ ижобий экспрессияларида ва Bcl-2- салбий кўрсаткичларида, хромосома аберрациялар даражаси 5% кўпроқ бўлганида беморлар ноҳуш башоратга эгаллиги аниқланди. Қўшимча башоратлаш аломатлар сифатида ИЛ-2 ва ИЛ-10 цитокинларини ҳамда ангиогенез факторини (VEGF – A) кўрсатиш мумкин. Аниқланган барча омилларни

ташхислаш ва даволаш схемаларини белгилашда хисобга олиш муҳимдир, ушбу аломатларнинг остеосаркомали беморларда бирга учраши, уларнинг даволаш тактикасини индивидуаллаштиришда ва таргет препаратлар белгилашда жуда катта аҳамиятга эга бўлиши мумкин

## ХУЛОСА

1.Замонавий морфологик, иммуногистохимёвий ва молекуляр–генетик тадқиқот усулларини остеосаркоманинг ўсиши, ривожланиши ва авж олишини ўрганишда қўлланилиши унинг рецидивларининг эрта ривожланиши, узоқ метастазлари, остеосаркома дифференцирлашуви даражаси, унинг муҳим даво патоморфозини, ўсма хажмини, онкомаркерлар экспрессияси миқдорлари орасидаги чамбарчас боғлиқлик борлигини имконини берди ( $R = 0,886 - 0,380$ ).

2.Тадқиқот тахлили шуни кўрсатдики, амалга оширилган даволашнинг самараси бўлмаганда хромасомалар аберрациялари фон кўрсаткичи дискриминация даражасидан ( $>5\%$ ) юқори бўлиб, бу соғлом шахсларникидан  $4,8$  марта юқори ( $8,2 \pm 0,9\%$  ва  $1,7 \pm 0,3\%$ ) ва яхши клиник самарали бўлган шахслардан  $2,7$  марта юқори эканлигини кўрсатди ( $p < 0,05$ ).

3.Остеосаркомали беморлар ўсма хужайраларида топилган ва хужайравий даврни бошқарувида иштирок этадиган апоптоз ( $p53$  и  $bcl2$ ) ва пролиферация ( $Ki-67$ ) маркерлари экспрессиясининг тавсифи касалликни клиник кечишини баҳолашда башоратлаш мезони эканлиги исботланди.

4.Беморлар фенотипи  $mtp 53 < 10\%$ ,  $bcl2 > 10\%$ ,  $Ki67 < 20\%$ ,  $XA < 5\%$  биомаркерлар тўпламини ташкил қилса, ПКТ га тўлиқ клиник жавоб берадиган ҳолатида деб баҳоланиши аниқланди.

5.Беморларнинг икки вариантдаги фенотиплар  $mtp 53 < 10\%$ ,  $bcl 2 > 10\%$ ,  $Ki 67 < 20\%$ ,  $XA < 5\%$  ва  $mtp 53 < 10\%$ ,  $bcl 2 > 10\%$ ,  $Ki 67 > 20\%$ ,  $XA < 5\%$  тўпламига эгаллиги, уларнинг ПКТ га қисман клиник жавоб берадиган ҳолатида бўлишлиги исботланди.

6.  $mtp 53 > 10\%$ ,  $bcl 2 > 10\%$ ,  $Ki 67 > 20\%$ ,  $XA > 5\%$  фенотип тўплами бўлган беморларда ўсма жараёнининг авжланишини кўсатиши аниқланди.

7.Т-лимфоцитлар дисбаланси аниқланди, иммунорегуляция индекси  $0,4$  дан  $1,1$  гача (меъёрда  $1,5$  дан  $2,0$  гача) пасайди, бу эса беўхшов иммун жавоб кўрсаткичи эканлиги кўрсатилди.

8. Остеосаркомали беморларда яллиғланишга хос, яъни ИЛ- $1\beta$  и ФНО- $\alpha$  цитокинларининг қон зардобидаги миқдори ( $8,7$  пг/мл ва  $6,3$  пг/мл) меъёрга нисбатан ( $4,3$  пг/мл ва  $2,6$  пг/мл,  $p < 0,05$ ) икки баробар ортиши аниқланди.

9. Яллиғланишга қарши цитокинлар миқдорининг спонтан ортиши аниқланди, ИЛ- $10$  миқдори назорат кўрсаткичларига нисбатан  $1,3$  мартаба ( $9,35$  пг/мл ва  $7,2$  пг/мл), ИЛ- $6$  миқдори эса  $23$  мартаба ( $79,4$  пг/мл ва  $3,4$  пг/мл) ортиши кузатилди ( $p < 0,05$ ).

10.Остеосаркомали беморларда томир эндотелияси ўсиш факторининг (VEGF) қон зардобидаги миқдори назорат гуруҳларга нисбатан  $14,3$  мартаба

(520,2 пг/мл ва 36,3 пг/мл;  $p < 0,05$ ) ортиши аниқланди, бу эса айниқса ўсма авжланиши ва метастазалашуви хавфи юқори бўлган беморларда кузатилди.

**НАУЧНЫЙ СОВЕТ 16.07.2013.Тib.20.01 при АО «РЕСПУБЛИКАНСКИЙ  
СПЕЦИАЛИЗИРОВАННЫЙ ЦЕНТР ХИРУРГИИ ИМЕНИ АКАДЕМИКА  
В.ВАХИДОВА» и ТАШКЕНТСКОЙ МЕДИЦИНСКОЙ АКАДЕМИИ по  
ПРИСУЖДЕНИЮ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ ДОКТОРА НАУК**

---

**РЕСПУБЛИКАНСКИЙ ОНКОЛОГИЧЕСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР**

**ПОЛАТОВА ДЖАМИЛА ШАГАЙРАТОВНА**

**МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ И ГЕНЕТИЧЕСКИЕ  
МАРКЕРЫ, ИХ ЗНАЧЕНИЕ В ДИАГНОСТИКЕ И ЛЕЧЕНИИ  
БОЛЬНЫХ С ОСТЕОГЕННОЙ САРКОМОЙ**

**14.00.14 – Онкология,  
(медицинские науки)**

**АВТОРЕФЕРАТ ДОКТОРСКОЙ ДИССЕРТАЦИИ**

**г.Ташкент-2016 год**

**Тема докторской диссертации зарегистрирована в Высшей аттестационной комиссии при Кабинете Министров Республики Узбекистан за №30.09.2014/Б2014.5.Tib427**

Докторская диссертация выполнена в Республиканском онкологическом научном центре Министерства здравоохранения Республики Узбекистан.

Автореферат диссертации на трех языках (узбекский, русский, английский) размещен на веб-странице Научного совета ([www.med.uz/surgery](http://www.med.uz/surgery)) и Информационно-образовательном портале “ZiyoNet” ([www.ziyo.net](http://www.ziyo.net))

**Научные  
консультант:**

**Наврззов Саримбек Наврззович**  
доктор медицинских наук, профессор

**Официальные  
оппоненты:**

**Алиев Мамед Джавадович**  
доктор медицинских наук, профессор,  
академик РАН

**Арипова Тамара Уктамовна**  
доктор медицинских наук, профессор

**Ведущая  
организация:**

**Ходжаев Абдувахид Валиевич**  
доктор медицинских наук, профессор  
Республиканский Научно-практический Центр  
Онкологии и медицинской радиологии им.  
Н.Н.Александрова, Минск, Республика Беларусь;

Защита состоится «1» апреля 2016 г. в 14.00 часов на заседании Научного совета 16.07.2013.Tib.20.01 при АО «Республиканский специализированный центр хирургии имени академика В.Вахидова» и Ташкентской медицинской академии (Адрес: 100115, г. Ташкент, ул. Малая кольцевая, 10. Тел.: +99871-277-69-10, факс:+998971-277-26-42; e-mail: cs.75@mail.ru.)

С докторской диссертацией можно ознакомиться в Информационно-ресурсном центре АО «Республиканский специализированный центр хирургии имени академика В.Вахидова» (зарегистрирована за № 06) (Адрес: 100115, г. Ташкент, ул. Малая кольцевая, 10. Тел.: +99871-277-69-10, факс:+998971-277-26-42)

Автореферат диссертации разослан «23» февраля 2016 года.

(протокол рассылки №06 от 23 февраля 2016 года).

**Ф.Г.Назыров**

Председатель научного совета по присуждению  
ученой степени доктора наук, д.м.н., профессор

**А.Х.Бабаджанов**

Ученый секретарь научного совета по присуждению  
ученой степени доктора наук, д.м.н.

**А.В. Девятов**

Председатель научного семинара при научном совете  
по присуждению учёной степени доктора наук, д.м.н., профессор

## ВВЕДЕНИЕ (Аннотация докторской диссертации)

**Актуальность и востребованность темы диссертации.** Несмотря на значительный прогресс в современной диагностике и терапии опухолей, прогноз для больных с остеосаркомами, наиболее злокачественной опухолью, остается неутешительным. Сложившаяся ситуация диктует необходимость поиска и создания новых принципиально иных технологий ранней диагностики, мониторинга и лечения пациентов. Благодаря современным достижениям молекулярной биологии, биотехнологии и генетики, в настоящее время появились биологически значимые показатели, которые могут помочь в диагностике, лечении и в прогнозировании исходов злокачественных состояний.

Известно, что остеосаркома – чрезвычайно агрессивная злокачественная опухоль, склонная к быстрому росту и гематогенному метастазированию. В литературе представлено достаточное число исследований, направленных на изучение особенностей метаболизма костной ткани в норме и при новообразованиях костей с целью выявления новых потенциальных молекулярно-биологических маркеров опухолевого роста. Многие исследователи полагают, что именно дисбаланс экспрессии этих факторов может быть одной из причин опухолевого роста. Однако, они являются неоднозначными и спорными. Считается, что именно они, определяют фундаментальные свойства опухолевых клеток, такие как метастазирование, инвазия, неограниченная пролиферация, активность процессов неоангиогенеза, способность противостоять апоптозу, а также их чувствительность к экзогенным и эндогенным регуляторам.

Вместе с тем показано, что важную роль в этих процессах играют цитокины, которые могут выступать в роли активаторов неоангиогенеза и пролиферации опухоли, которые коррелирует с метастазированием и неблагоприятным прогнозом заболевания. С целью более углубленного понимания основ определенных этапов развития новообразований, исследование роли молекулярных маркеров является важным фактором в плане диагностики при исследовании активности злокачественного роста, в частности при саркоме костей. В связи с этим, изучение механизмов развития опухолей остается актуальной задачей медицины и требует применения современных методов исследования и лечения для решения как теоретических, так и практических вопросов онкологии, конечной целью которой является ранняя диагностика и разработка эффективных патогенетических методов лечения. Кроме того, важной задачей представляется улучшение результатов лечения путем преодоления резистентности опухолевых клеток на фоне полихимиотерапии.

Настоящая научно-исследовательская работа соответствует выполнению в рамках исполнения задач, поставленных в Постановление Президента Республики Узбекистан «О мерах по дальнейшему углублению реформирования системы здравоохранения» от 28 ноября 2011 года ПП-1652; Постановление Кабинета Министров Республики Узбекистан «О мерах по

дальнейшему укреплению материально-технической базы и совершенствованию организации деятельности медицинских учреждений» №91 от 29 марта 2012 года (раздел V, пункт 15).

Таким образом, все вышесказанное предопределило актуальность и востребованность данного исследования.

**Соответствие исследования приоритетным направлениям развития науки и технологий республики.** Работа выполнена в соответствии с приоритетными направлениями развития науки и технологии республики ГНТП-11 «Разработка высокоэффективных наукоемких технологий, современных методов и средств в медицине, совершенствование системы охраны здоровья населения и обеспечение экологической безопасности».

**Обзор зарубежных научных исследований по теме диссертации.** Научно-исследовательские работы, направленные на изучение биологического поведения остеосаркомы, разработки эффективных методов диагностики и лечения, с учетом современных представлений о молекулярно-биологических и генетических маркерах, проводятся в крупных международных медицинских центрах, таких как The national cancer Institute in Milan (Italy); Munster multidisciplinary cancer center, Germany; West German cancer center; Cancer center Anderson (USA); German Cancer Research Center (Heidelberg, Germany); Center for Musculoskeletal Surgery, Charité-University Medicine (Berlin, Germany); Department of Paediatric Laboratory Medicine, Hospital for Sick Children, (Toronto, ON, Canada); Department of Pathology and Molecular Medicine, Queen's University (Kingston, ON, Canada); University of Alabama at Birmingham and the Birmingham Veterans Affairs Medical Center (Birmingham, Alabama); Республиканский НПЦ Онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н.Александрова (Минск, Беларусь); РОНЦ им.Н.Н.Блохина, РАМН (Москва, Россия); НИИ онкологии им. Н.Н.Петрова (СПб, Россия); Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко (Украина).

Значимые научные результаты по повышению эффективности диагностики и качеству лечения остеогенной саркомы, а также внедрению новых более эффективных методов лечения и прогнозирования болезни получены в этих онкологических организациях. Так например в Бирменгеме, штат Алабама (США) В Университете патологии, радиологии, клеточной биологии ученые V.D.Ragland, G.Siegel и другие изучают роль цитогенетических и молекулярно-биологических маркеров при костных саркомах. Профессор из Университета в Цюрихе (Швейцария) Dr. Bruno Fuchs разрабатывает новую стратегию в лечении метастаз остеосарком и роль генетических маркеров в прогнозе течения заболевания. В РОНЦ им. Н.Н.Блохина РАМН (Москва) накоплен один из крупнейших в мире клинический материал больных остеосаркомой за последние двадцать лет; в НИИ онкологии им. Н.Н.Петрова (СПб) в отделе «Биологии опухолевого роста» проводятся исследования по ДНК-диагностике наследственных опухолевых синдромов, а также изучается участие онкомаркеров и

полиморфизм генов в наследственных и спорадических формах онкопатологий, в том числе и при остеосаркоме.

Генетические исследования с использованием новейших методов молекулярной генетики, которые ведутся в научно-исследовательских Центрах мира необходимо внедрять и в нашей Республике. Перспективность этих исследований доказана многими ведущими учеными. Необходимо осуществлять выявление генетической наследственной патологии, что позволяет предотвратить рождение больных детей. Методы молекулярной медицины и клеточных технологий позволят проводить диагностику и мониторинг онкологических заболеваний. Молекулярно-генетические исследования дают возможность изучения особенностей опухолей, в том числе и сарком костей, для создания новой стратегии лечения, непосредственно влияющей на определенные молекулы и процессы, то есть развития «таргетной» терапии.

**Степень изученности проблемы.** Этиология, генетические, патогенетические факторы и молекулярные механизмы остеосаркомы до сих пор остаются не до конца изученными (Имянитов, Хансон, 2004; Friedrich et al., 2008). Злокачественная трансформация клеток и опухолевая прогрессия, клинически проявляющаяся инвазией в окружающие ткани, а также регионарным и отдаленным метастазированием, связаны с нарушениями нормального функционирования генома (Egger et al., 2004; Sprague et al., 2007; Копнин, 2007; Заридзе, 2008; Блохин, 2009). Молекулярный патогенез остеосаркомы включает множество генетических и эпигенетических событий, ведущих к активации онкогенов и инактивации генов опухолевой супрессии, лежащих в основе опухолевой трансформации (Ляхович и др., 2004; Payne, Kemp, 2005; Croce, 2008; Залетаев, 2008; Лихтенштейн, 2009).

Известно, что ген *TP53* является одним из ключевых генов-супрессоров опухолевого роста (Phillips, 1999; Чумаков и др., 2007; Vousden, Lane, 2007; Копнин, 2008). Различия в «функциональной значимости» мутаций, по-видимому, не позволяют получить однозначных результатов об их связи с проявлениями опухолевой прогрессии (Feki, Irminger-Finger, 2004; Petitjean et al., 2007; Brosh, Rotter, 2009). В литературе также есть немногочисленные указания, что метилирование гена *TP53* при остеосаркоме может выступать в качестве альтернативного механизма инактивации белка p53 и ассоциировано с инвазивностью опухолевого процесса (Kang et al., 2001). Неоднозначность полученных этими авторами данных указывает на важность продолжения исследований.

В Узбекистане, были проведены единичные работы по изучению клинических особенностей остеосаркомы. Изучена эффективность применения комбинированной и модифицированной комбинированной терапии у больных остеогенной саркомой длинных трубчатых костей (Урунбаев С.Д., Гафур-Ахунов М.А., 2009; 2010; М.Т.Ачилов, А.А.Файзуллаев, Ф.Б.Газиев, А.Р.Акрамов, Т.Ж.Эшкабилов, 2015; М.С.Саломов, М.А. Гафур-Ахунов, 2015). Ранее проведенные в Узбекистане исследования ограничивались изучением влияния различных вариантов

лечения на прогноз заболевания (Гафур-Ахунов М.А., Урунбаев Ж.Д., Нуриддинов К.Р. и др. 2000; Гафур-Ахунов М.А., Урунбаев С.Д., Корень Л.П. и др. 2010). Также изучалась продолжительности жизни и безметастатическая выживаемость при органосохраняющих и калечащих операциях (Гафур-Ахунов М.А., Абдикаримов Х.Г., Урунбаев С.Д., 2008; Хамдамов А.А, Савкин А.В, 2015). Учитывая все вышесказанное, изучение роли молекулярных и клеточных маркеров в течении остеосаркомы является фундаментальным направлением, которое может помочь в ранней диагностике, лечении и прогнозировании заболевания.

**Связь диссертационного исследования с планами научно-исследовательских работ научно-исследовательских учреждений, где выполняется работа.** Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ Республиканского онкологического научного центра по темам: А-9-050 «Цитогенетические и молекулярно – биологические исследования для разработки патогенетического лечения больных остеогенной саркомы» (2006-2008 гг.); ITD - 1109-11.3-10849 «Разработка новых технологий в изучении формирования множественной лекарственной устойчивости при злокачественных опухолях различной локализации и путей ее преодоления» (2009-2011 гг.); Ф-4.3.7. «Изучение молекулярных факторов иммунитета у онкологических больных» (2009–2014 гг.).

**Цель исследования:** выявить изменения молекулярно-биологических и генетических маркеров, характеризующих механизм опухолевой прогрессии при остеосаркоме, а также обосновать их роль в диагностике и лечении этой патологии.

В соответствии с поставленной целью определены следующие **задачи исследования:**

изучить молекулярно-биологические маркеры пролиферации, апоптоза и ангиогенеза в опухоли и сыворотке крови больных остеосаркомой;

определить роль цитогенетических изменений в лимфоцитах периферической крови больных в диагностике и лечении остеосаркомы;

изучить особенность клинического течения остеосаркомы в зависимости от молекулярно-биологических факторов опухоли;

оценить состояние иммунной системы (клеточный и гуморальный) у больных с остеосаркомой в зависимости от клинических особенностей;

выявить функционирования цитокинов (про- и противовоспалительных) иммунной системы у больных с остеосаркомой в зависимости от клинических особенностей;

провести анализ клинико-морфологических и молекулярно-генетических факторов прогноза при остеосаркоме костей;

обосновать прогностическую роль молекулярно-генетических маркеров в лечении больных остеосаркомой.

**Объект исследования:** 221 пациентов с остеосаркомой и 48 здоровых лиц, сопоставимого возраста и пола.

**Предмет исследования:** венозная кровь и сыворотка больных для проведения молекулярно-генетических, цитогенетических и иммунологических исследований, гистологический материал для определения иммуногистохимических онкомаркеров.

**Методы исследований.** Использовались клинические, рентгенологические, морфологические, иммуногистохимические, иммунологические, молекулярно-генетические, цитогенетические и статистические методы исследования.

**Научная новизна исследования:**

впервые показан ряд факторов, характеризующих свойства организма и опухоли, и оказывающих влияние на течение остеосаркомы (ОС), к числу таких признаков относится уровень хромосомной нестабильности выше дискриминационного (5%), который является прогностически неблагоприятным фактором;

было выявлено, что высокая хромосомная нестабильность связана: с прогрессированием опухолевого процесса; низкой степенью патоморфоза и дифференцировки опухоли; увеличением размера опухоли и с хондробластическим гистологическим вариантом; а также с относительной продолжительностью жизни больных, которая в 1,6 раз была меньше, чем у больных с низким уровнем хромосомной нестабильности;

впервые была показана молекулярно-генетическая характеристика опухоли, развивающейся в рамках наследственных синдромов (синдром Ли-Фрумени), выявлена гетерозиготная замена с.842A>G (T>C), данная замена является функционально значимой миссенс-мутацией p.D281G ;

иммуногистохимические исследования выявили, что достижение полного морфологического регресса при проведении неоадьювантной химиотерапии (НХТ) наблюдалось у больных, среди которых у 70,6% отсутствовала экспрессия мутантного гена p53 и экспрессия гена Ki-67, а у 80,0% выявлена экспрессия гена bcl2; у части больных после использования схемы ДВАРХ также наблюдался полный морфологический регресс, у 87,5% этих больных мутантный ген p53 отсутствовал, у 90,0% этих больных экспрессия гена bcl-2 была высокой, а у 80,0% этих больных экспрессия гена Ki-67 была слабой;

впервые определен экспрессионный профиль (молекулярно-генетический фенотип) больных остеосаркомой, высокая хромосомная нестабильность (увеличение аберраций хромосом в лимфоцитах периферической крови больных выше 5%) и высокий уровень экспрессии биомаркеров апоптоза и пролиферации (mtp53<sup>+</sup>, Ki-67<sup>+</sup>) являются прогностически неблагоприятными факторами для раннего метастазирования и появления ранних рецидивов (от 6 до 9 месяцев);

выявленный негативный молекулярно-генетический фенотип коррелирует с низкой степенью патоморфоза (1 и 2), относительной продолжительностью жизни больных до 3 лет, он связан с низкой степенью дифференцировки (G<sub>3</sub>), увеличением размера опухоли, с хондробластическим вариантом остеосаркомы;

установлено иммунодефицитное состояние у больных остеосаркомой, которое выражалось в глубоком Т – клеточном иммунодефиците и активации гуморального звена иммунитета, что позволяет провести раннюю иммунологическую диагностику прогрессирующего течения злокачественного процесса;

впервые у больных остеосаркомой изучен цитокиновый статус, который показал дисбаланс основных цитокинов иммунной системы, играющих важную роль в формировании, развитии и прогрессировании данной опухоли;

впервые изучены особенности реагирования провоспалительных и противовоспалительных цитокинов при иммунопролиферативном синдроме - остеогенной саркоме, установлено преобладание ИЛ-6, что может служить критерием диагностики прогрессирования опухолевого процесса;

впервые изучены особенности прогрессирования остеогенной саркомы в зависимости от развития ангиогенеза, установлено, что экспрессия VEGF-A в первичных остеосаркомах коррелирует с ростом локальной плотности сосудов в ткани опухоли, с развитием легочного метастазирования и неблагоприятным прогнозом для пациентов с указанным диагнозом;

впервые изучено содержание эндостатина, ФРФ-1, -2 у пациентов с остеосаркомой до лечения для выявления их возможной взаимосвязи с клиническими характеристиками заболевания и прогнозом, выявлено, что экспрессия ФРФ-1 и эндостатина имеют связь с патогенетическими изменениями, связанными с ростом опухоли кости.

#### **Практические результаты исследования:**

установлен молекулярно-генетический фенотип больных остеосаркомой, хромосомная нестабильность, высокие уровни экспрессии биомаркеров апоптоза и пролиферации ( $mtp53^+$ ,  $vcl-2^-$ ,  $Ki-67^+$ ), которые являются прогностически неблагоприятными факторами раннего метастазирования и появления ранних рецидивов;

при остеосаркоме существенное значение в прогнозе играют не только клинические и морфологические факторы, а так же иммунологические и молекулярно-генетические маркеры, такие как высокая экспрессия мутантного гена - супрессора  $mtp53$  и  $Ki-67$ , низкая -  $vcl-2$ , хромосомная нестабильность (абберрации), высокая экспрессия VEGF-A, цитокинов и ФНО- $\alpha$ ;

сравнительная оценка цитокинового спектра в норме и при патологии отражает функциональное состояние иммунной системы, которое служит основой для клинической интерпретации иммунопатогенеза, построения иммунологического диагноза и прогноза, а также необходима для проведения иммунотерапии, иммунопрофилактики и иммунореабилитации;

практикующим врачам знание молекулярно-генетического статуса и цитокинового спектра больных при остеосаркоме позволит установить патогенетические особенности течения заболевания, его тяжесть и прогноз, дифференцировать периоды обострения и ремиссии, даст возможность оценить эффективность проводимой медикаментозной терапии.

**Достоверность полученных результатов** подтверждена достаточным количеством больных, взаимодополняющих клинических, иммунологических, рентгенологических, морфологических, иммуногистохимических, молекулярно-генетических, цитогенетических исследований и основывается на современных научно-практических представлениях и подходах к диагностике и лечению больных остеосаркомой. Решение рассмотренных задач выполнено современными апробированными, корректными методами медицинской статистики.

**Научная и практическая значимость результатов исследования.** Полученные результаты вносят существенный вклад современным достижениям молекулярной биологии, иммунологии, медицинской генетики, онкологии в изучение клинико-функциональных особенностей течения, лечения и прогнозирования остеосаркомы, являются базой для дальнейшего изучения особенностей развития заболевания с возможными осложнениями, в целях формирования новых конкурентных методов диагностики и лечения. Отдельные результаты работы дадут возможность в усовершенствовании содержания и структуры программы обучения студентов, а также магистров, клинических ординаторов и курсантов по диагностике и лечению больных с костными опухолями.

Практическая ценность работы заключается в том, что разработанный клинический симптомокомплекс обеспечивает достоверную диагностику остеосаркомы на самых ранних стадиях развития процесса и тем самым способствует эффективности лечения больных. Проведение иммунологических и генетических исследований позволяет обнаружить признаки раннего метастазирования и получить более полную информацию о тяжести и распространенности заболевания. Данные о молекулярно-генетическом фенотипе больных остеосаркомой имеют огромное значение при выявлении группы наибольшего риска развития остеосаркомы и определении у них перспективных молекулярно-генетических маркеров, которые имеют прогностическую ценность в клинике при мониторинге лечения больных остеосаркомой.

**Внедрение результатов исследования.** Разработаны металлические «эндопротезы», замещающие диафизарный отдел бедренной кости на который получен патент – №FAP 00851 (17.10.2013г.), получены 2 положительных решения на выдачу патентов на полезные модели - устройство для эндопротезирования диафиза костей (FAP №20150153), устройство для эндопротезирования коленного сустава (FAP № 20150164), а так же методические пособия и 3 рекомендации включены в образовательный процесс, используются в практической медицине (Заключение Министерства здравоохранения Республики Узбекистан № 8 Н-3/41 от 10.02.16г.).

Полученные результаты исследования позволили улучшить качество диагностики и лечение больных остеогенной саркомой, оптимизировать тактику лечения, снизить частоту рецидивов и метастазов опухоли, сократить летальность, увеличить продолжительность жизни за счет улучшения

качества оказываемой медицинской помощи. Разработка отечественного эндопротеза коленного сустава позволило снизить импорт, получить продукцию по низкой цене в сравнении с зарубежными аналогами; широкое внедрение позволило получить раннюю социальную реабилитацию пациентов и тем самым сэкономить средства за счет снижения инвалидности, сократить сроки стационарного лечения и получить экономическую прибыль за счет сокращения койко-дней.

**Апробация результатов исследований.** Результаты работы доложены на 11 научно-практических конференциях. На 8 международных конференциях: IV съезд онкологов и радиологов СНГ (Баку, 2006); V съезд онкологов и радиологов СНГ (Ташкент, 2008); I итало-российская научная конференция по онкологии и эндокринной хирургии (Италия, 2010); ESMO 36 The 2011 European Multidisciplinary Cancer Congress (Stockholm, 2011); ICACT 23<sup>rd</sup> International Congress on anti-cancer treatment (France, 2012); 22nd Biennial Congress of the European Association for Cancer Research (Spain, 2012); III международная конференции EESG «Саркомы костей, мягких тканей и опухоли кожи» (Москва, 2014); 34<sup>th</sup> Congress of the ESSO (England, 2014). На 3 Республиканских конференциях: II конгрессе онкологов Узбекистана (2011, Ташкент); Научно-практическая конференция «Актуальные проблемы опухолей опорно-двигательного аппарата и головы-шеи» (Нукус, 2014); III конгрессе онкологов Узбекистана (2015, Ташкент) и на заседании ученого совета и на научном семинаре в Республиканском онкологическом научном центре (2015г, Ташкент).

**Опубликованность результатов исследования.** По теме диссертации опубликовано 58 научных работ, в том числе - 13 статей в журналах, рецензируемых ВАК Республики Узбекистан, в том числе 6 - в зарубежных научных журналах; получены 3 патента, 2 свидетельства на рационализаторское предложение.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация в 197 страницах, состоит из введения, основной части (7 глав), заключения, выводов, практических рекомендаций, списка использованной литературы, 49 таблиц и 38 рисунков.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

**Во введении** диссертации раскрывается актуальность темы, цель и задачи исследования, научная новизна и научно-практическая значимость, выносимые на защиту, представлено обоснование практического внедрения полученных результатов исследования.

Первая глава диссертации **«Современные представления о молекулярно-биологических и генетических аспектах при остеосаркоме и их роли в диагностике и лечении»** посвящена анализу современной литературы по изучению молекулярно-биологических и генетических маркеров при остеосаркоме и их роли в диагностике и лечении, а также особенностям функционирования иммунной системы при иммунодефицитных состояниях, в частности, при остеосаркоме. Кроме того, представлен материал по изучению общих современных понятий остеосаркомы, диагностике, клинике и лечению. Также представлен подробный материал по изучению иммунологических аспектов при остеосаркоме, молекулярно-биологической диагностике.

Во второй главе **«Клиническая характеристика материалов и использованные методы исследования»** - представлена общая характеристика 221 обследованных больных остеосаркомой. Исследования были проведены в РОНЦ МЗ РУз с 2005 по 2013 гг.

Под наблюдением находилось 221 больных с гистологически верифицированной остеосаркомой трубчатых костей. Исследуемые группы были составлены из больных сопоставимого возраста, локализации опухоли и стадии заболевания, с условием соблюдения однозначных показателей стадии, распространенности, морфологии опухоли и возраста обследуемых пациентов. Анализ распределения обследованных больных по полу показал, что мужчин было - 137 (61,9%), женщины - 84 (38,1%). Распределение больных по возрасту выявило, что остеосаркома чаще встречается у лиц в возрасте до 20 лет с одинаковой частотой среди мужчин 66,4% и женщин 60,7%, средний возраст составил  $22,0 \pm 0,7$  лет. Длительность наблюдения за больными составила от 1-х до 7 лет.

По локализации больные распределились следующим образом: бедренная кость в 65 (53,3%) случаях, большеберцовая кость в 43 (35,2%) случаях, и реже малоберцовая кость – 14 (11,5%). Из 221 больного у 71 больного (32,1%) рентгенологически выявлена остеолитическая форма, у 47 (21,3%) остеопластическая и у 103 (46,6%) смешанная форма остеосаркомы. При рентгенологических исследованиях было обнаружено, что у 33 больных (14,9%) протяженность опухолевого поражения определялась до 5см, у 138 (62,4%) – от 6 до 10см, и у 50 (22,6%) – 11см и выше.

Протяженность опухолевого процесса составляла от 4,5 до 17см, в среднем составила  $9,6 \pm 0,3$  см. У 13 больных (5,9%) выявлен патологический перелом.

Степень распространенности процесса оценивалась по Международной классификации TNM (классификация Международного противоракового

союза, 2007). В соответствии с этим в наших исследованиях пациенты были распределены с учетом стадии заболевания: у 187 (84,6±3,2%) больных установлена T2N0M0, у 26 (11,8±1,7%) - T2N0M1, T1N0M0 - у 8 (3,6±0,8%). Согласно клинической классификации больные также были распределены по стадиям: IB - 8 (3,6±1,2%), IIA - 12 (5,4±1,5%), IIB - 125 (56,5±3,3%), III - 62 (28,0±3,0%), IVA - 11 (4,9±1,4%), IVB - 3 (1,3±0,7%).

Объем опухоли составил в среднем 434,2±42,17 см<sup>3</sup>

Всем пациентам были проведены основные клинико-лабораторные и инструментальные методы исследования (гематологические исследования, рентгенологическое исследование костей, КТ, МРТ, сцинтиграфия, ЭКГ, по показаниям радиоизотопное исследование костей скелета, эхография). Качественная оценка васкуляризации проводилась по данным стандартной или цифровой субтракционной ангиографии.

Иммунологические исследования проведены в Институте иммунологии АН РУз. Определение основных иммунологических показателей (ФНО- $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-2, ИЛ-6 и ИЛ-10) проводили методом ИФА с использованием коммерческих тест-систем «Вектор-Бест», Россия. Определение эндостатина, FGF-1, FGF-2 и VEGF-1 проводили ИФА-методом с помощью тест-систем производства «R&D» (США) и «Вектор-Бест» (Новосибирск, Россия).

Иммуногистохимические исследования проводились в РОНЦ МЗ РУз в патологоанатомическом отделении совместно с лабораторией биологии опухолей. Иммуногистохимические исследования осуществляли по стандартной методике с использованием первичных антител («Dako», Novocastra<sup>TM</sup>): VEGF, bcl-2, Ki-67 и p53. Оценивали удельное количество позитивно окрашенных опухолевых клеток, экспрессирующих следующие маркеры клеточной пролиферации и апоптоза: bcl-2, Ki-67, p53. Положительным результатом являлось наличие специфического окрашивания ядер при выявлении антигена Ki-67 и гена-супрессора p53, а также окрашивание цитоплазматической мембраны экспрессии bcl-2.

Материалом для молекулярно-генетических исследований послужила ДНК, выделенная из лейкоцитов периферической крови и опухолевой ткани больных остеосаркомой. В качестве негативного и позитивного контролей при секвенировании нуклеотидной последовательности гена *TP53* на участках 4, 5, 6, 7, 8 и 9-го экзонов использовали ДНК опухолевых линий с заведомо известным статусом. Генетические исследования были проведены в НИИ Онкологии им. Петрова Н.Н.(СПб) в отделе биологии опухолевого роста, зав. отделом д.м.н., профессор Имянитов Е.Н.

В наших исследованиях в период с 2005 по 2013 года больные получали различные виды лечения. Неодъювантная полихимиотерапия (ПХТ) проведена 196 (88,6%) больным, из них системная неоадъювантная ХТ была проведена 131 (69,1%) пациентам, длительная внутриартериальная регионарная химиотерапия (ДВАРХ) проведена 29 (4%) больным, сочетание системной ПХТ и ДВАРХ проведено 24 (9,9%) больным. При системной неоадъювантной ХТ наиболее частыми были следующие виды схем: по схеме CAP лечение получили - 74 (56,4%) пациентов, EAP- 10 (7,6%), VCAP - 17

(12,9%), MAP - 10 (7,6%) и AP - 20 (15,2%). Схемы проведения ДВАРХ были следующими: по схеме САР лечение проведено - 34 (82,9%) больным, AP- 3 (7,3%), MAP - 3 (7,3%) и VСАР - 1 (2,4%). Количество курсов варьировало и зависело от ответа на лечение, в среднем, при системной ПХТ, составило  $3,06 \pm 0,16$ , при ДВАРХ  $2,81 \pm 0,18$ . Интервал между циклами составил 21 день. В ряде случаев, из-за отказа пациентов от операции, 42 (19,0%) больным была проведена лучевая терапия. Разовая доза облучения составила в среднем  $2,36 \pm 0,12$  Гр, суммарная доза облучения составила  $48,56 \pm 2,74$  Гр.

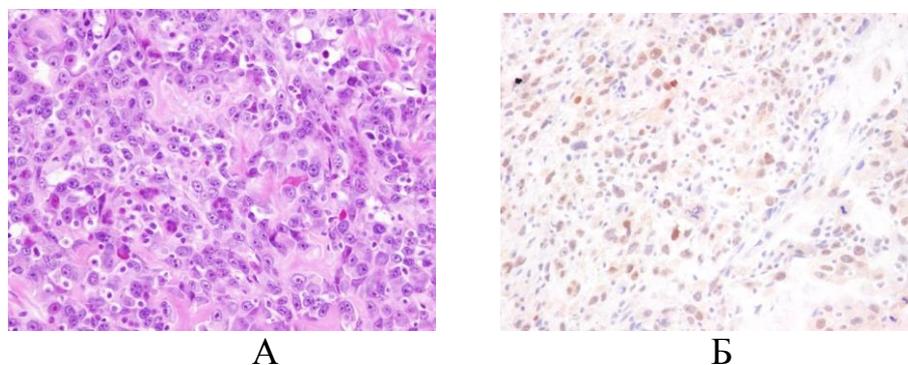
В наших наблюдениях хирургическое лечение было выполнено у 162 больных. Органосохраняющие операции были выполнены в 94 (58,0%) случаях. Учитывая все показания и риски прорастания опухоли, калечащие операции были выполнены у 68 (41,9%).

В послеоперационном периоде 218 больным проводили адьювантную химиотерапию: при выраженном лечебном патоморфозе, проводили те же схемы, что и при неoadьювантной химиотерапии. При низкой степени выраженности лечебного патоморфоза добавляли к предшествующим схемам Этопозид, Ифосфомид, а так же проводили различные схемы высокодозной полихимиотерапии.

В третьей главе **«Роль цитогенетических маркеров при остеосаркоме»** приводятся данные по изучению цитогенетических маркеров при остеосаркоме. Показано, что возможным является вопрос об использовании генетического тестирования для прогнозирования и мониторинга эффективности проводимой терапии больных остеосаркомой. Комплексное изучение цитогенетических, патоморфологических и клинических характеристик остеосарком свидетельствует об актуальности данных исследований, которые преследуют цель повышения эффективности ранней диагностики, лечения и прогноза остеосарком. Цитогенетические исследования показали, что уровень хромосомной нестабильности выше дискриминационного (5%) является прогностически неблагоприятным фактором. При проведении неoadьювантной химиотерапии (НХТ) было выявлено, что у части больных наблюдалось достижение полного морфологического регресса, среди них у 65,2% уровень АХ был ниже дискриминационного. Функция выживания больных остеосаркомой рассчитанная методом Каплан-Мейера позволила констатировать, что при уровне АХ ниже 5% вероятность дожить до 3 лет была у 70% больных, тогда как при уровне АХ выше 5% этот период достигают только 50% больных. Доживают до 5 лет 40% больных и с низким уровнем АХ и с высоким. Однако только больные из группы с низким уровнем aberrаций хромосом имеют вероятность дожить до 15 лет, таких больных может быть 15-20%. Результаты показывают, что риск умереть для больных с низким уровнем АХ в течение 3-х лет составляет  $R_1 0.2$ ; до 5 лет -  $R_1 0.8$ ; до 15 лет –  $R_1 2.5$ , а для больных с высоким уровнем АХ эти показатели были  $R_2 0.1$ ;  $0.6$  соответственно; до 15 лет не дожил никто. Следовательно, показан ряд достоверных факторов, характеризующих свойства организма и опухоли, которые оказывают влияние на течение ОС. К числу таких признаков можно

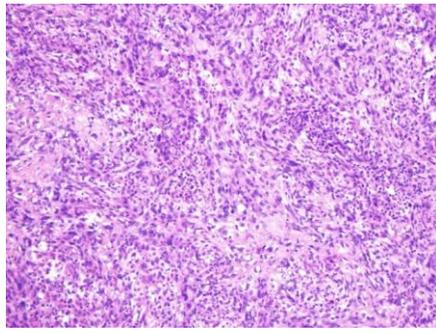
относителен уровень хромосомной нестабильности выше дискриминационного (5%), который является прогностически неблагоприятным фактором. Он связан с прогрессированием опухолевого процесса, низкой степенью патоморфоза и дифференцировки опухоли, увеличением размера опухоли и с хондробластическим гистологическим вариантом, а также с относительной продолжительностью жизни больных, которая в 1,6 раз была меньше, чем у больных с низким уровнем хромосомной нестабильности.

В четвертой главе «**Молекулярно-биологические маркеры и их роль при остеосаркоме**» приводятся данные по изучению молекулярно-биологических характеристик сарком костей, которые выходят на первый план в клинической практике для выявления прогностических биомаркеров и групп риска среди пациентов с первичным диагнозом саркома кости. Параллельные исследования онкогенов p53 и bcl-2 проводят в связи с тем, что они разнонаправленно влияют на развитие апоптоза (рис.1,рис.2).

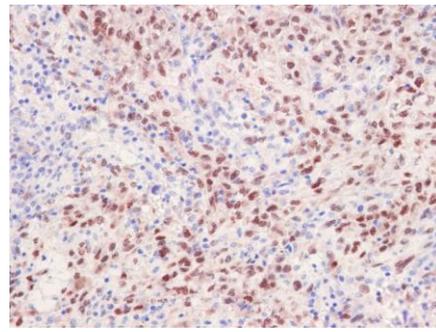


**Рис. 1. Остеосаркома: хондробластический гистологический вариант. А – гематоксилин эозин; Б – иммуногистохимия p53+**

Иммуногистохимические исследования выявили, что достижение полного морфологического регресса при проведении неoadьювантной химиотерапии (НХТ) выявлено у 13% больных, среди которых у 70,6% больных отсутствовала экспрессия мутантного гена p53 и экспрессия гена Ki-67, а у 80,0% была выявлена экспрессия гена bcl-2. У 15,7% больных после использования схемы ДВАРХ также наблюдался полный морфологический регресс, у 87,5% этих больных мутантный ген p53 отсутствовал, у 90,0% этих больных экспрессия гена bcl-2 была высокой, а у 80,0% этих больных экспрессия гена Ki-67 не была выявлена. У 14,5% больных после НХТ, у 19,4% больных после применения схемы ДВАРХ и у 14,3% больных после ХЛТ эффект от лечения отсутствовал и наблюдалось прогрессирование опухолевого процесса.



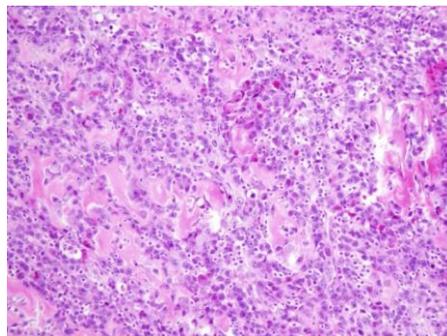
А



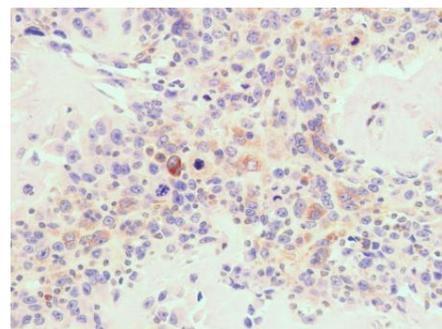
Б

**Рис. 2. Остеосаркома: периостальная. А – гематоксилин-эозин; Б – иммуногистохимия p53**

Функция выживания больных ОС рассчитанная методом Каплан-Мейера в ассоциации с экспрессией онкомаркеров позволила констатировать, что при отсутствии экспрессии мутантного гена *mtp53* и экспрессии гена *Ki-67* вероятность дожить до 3 лет была у 98% больных, тогда как при наличии экспрессии данных генов этот период достигают 85% больных (рис. 3).



А



Б

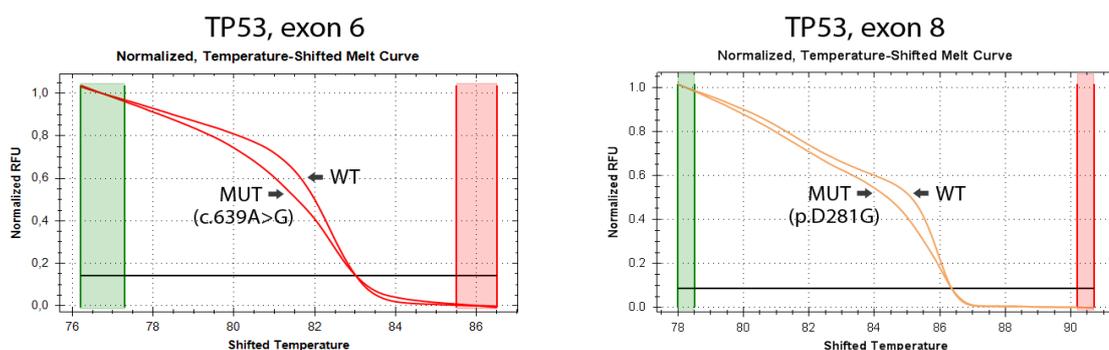
**Рис.3. Остеобластическая остеосаркома. А - опухоль состоит из крупных круглых клеток, напоминающие остеобласты, остеоид в опухоли в небольшом количестве, окраска гематоксилином и эозином, увеличение X200.В - иммуногистохимическое исследование *bcl-2* в остеобластической остеосаркоме. Позитивная (цитоплазматическая) реакция в отдельных опухолевых клетках, позитив в реактивных лимфоцитах. Хромоген – диаминобензидин, контрокрашивание гематоксилином, увеличение X400.**

Доживают до 5 лет 50% больных с отсутствием экспрессии генов *mtp53* и *Ki-67* и 30% - 40% с высокой их экспрессией. Однако, только больные из групп с отсутствием экспрессии гена *mtp53* и гена *Ki-67* имеют вероятность дожить до 15 лет, таких больных 15%. Обратная ассоциация функции выживания больных рассчитанная методом Каплан-Мейера наблюдалась при отсутствии экспрессии гена *bcl-2* вероятность дожить до 3 лет была у 90% больных, тогда как при наличии экспрессии данного гена этот период достигают 98% больных. Доживают до 5 лет 40% больных с отсутствием экспрессии гена *bcl-2* и 45% с высокой экспрессией. Только больные из группы с экспрессией гена *bcl-2* имеют вероятность дожить до 15 лет, таких больных также 15%. Для прогностических целей используется функция риска. Результаты показывают, что риск умереть в течении 3-х лет

для больных с отсутствием мутаций гена p53 и гена Ki-67 составляет  $R_2$  0.4;  $R_{4-0.2}$ ; до 5 лет -  $R_{2-4}$  0.8; до 15 лет -  $R_{2-4}$  2.5 - 2.6, а для больных с экспрессией данных генов эти показатели были  $R_{2-4}$  0.2; 1.0 соответственно; до 15 лет не дожил никто.

Следовательно, молекулярно-генетический фенотип больных остеосаркомой представлен уровнем экспрессии биомаркеров апоптоза и пролиферации ( $mtp53^+$ ,  $bcl-2$ ,  $Ki\ 67^+$ ), которые являются прогностически неблагоприятными факторами раннего метастазирования и появления ранних рецидивов. Этот фенотип является прогностически неблагоприятным фактором прогрессирования опухолевого процесса, низкой степени патоморфоза (1 и 2), относительной продолжительности жизни больных (до 3 лет), он связан с низкой степенью дифференцировки ( $G_3$ ), увеличением размера опухоли, с хондробластическим вариантом остеосаркомы. Данный экспрессионный профиль клинически связан с М (отдаленные метастазы), но нет связи с Т (распространенность).

Нами был проведен анализ мутаций в экзонах 5-9 гена TP53. Выявление мутаций в данных экзонах кодирующей последовательности гена TP53 осуществлялось в два этапа. Оценка результатов высокоточного анализа кинетики плавления фрагментов ДНК осуществлялась при помощи программы PrecisionMeltingAnalysis (предназначена для анализа протоколов, выполненных на приборе CFX96, Bio-RadLaboratories). Пример деформации кривой плавления фрагмента, содержащего мутацию, по сравнению с образцом «дикого типа» показан на рис.4.

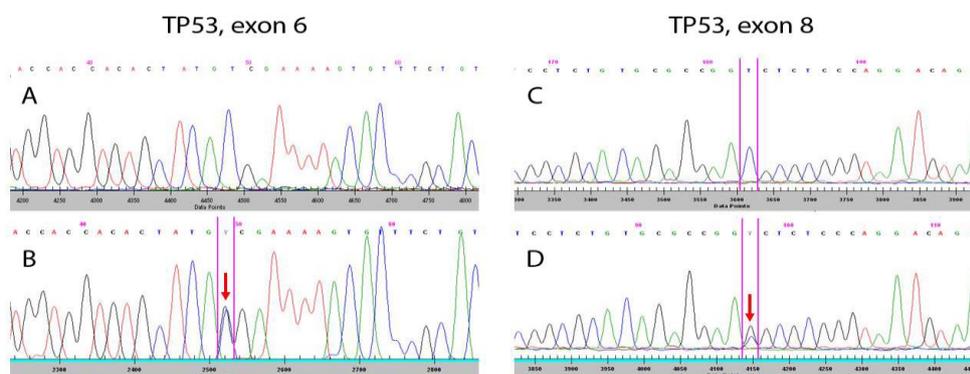


**Рис.4. Детекция мутаций в гене TP53 при помощи высокоточного анализа кинетики плавления фрагментов ДНК. Слева — деформация кривой плавления по сравнению с образцом дикого типа, вызванная наличием гетерозиготной замены с.639A>G в 6 экзоне гена TP53. Данная замена является функционально не значимым «молчащим» полиморфизмом. Справа—деформация кривой плавления по сравнению с образцом дикого типа, вызванная наличием гетерозиготной миссенс-мутацией p.D281G (с.842A>G). Данная замена является функционально значимой.**

На втором этапе проводилась верификация и уточнение данных высокоточного анализа кинетики плавления фрагментов ДНК. При

выявлении деформации кривой плавления или смещения температуры плавления образец продукт амплификации подвергался капиллярному секвенированию по методу Сэнджера.

Пример хроматограммы участков фрагментов «дикого типа», фрагмента, содержащего полиморфизм и мутацию в гене TP53 (p.D281G) представлен на рис.5.



**Рис.5. Секвенирование фрагментов гена TP53. А. Хроматограмма последовательности дикого типа фрагмента 6 экзона гена TP53 (обратный праймер); В. Хроматограмма последовательности фрагмента 6 экзона гена TP53 (обратный праймер). Видна гетерозиготная замена с.639A>G (T>C). Данная замена является функционально не значимым «молчащим» полиморфизмом; С. Хроматограмма последовательности дикого типа фрагмента 8 экзона гена TP53 (обратный праймер); D. Хроматограмма последовательности фрагмента 8 экзона гена TP53 (обратный праймер). Видна гетерозиготная замена с.842A>G (T>C). Данная замена является функционально значимой миссенс-мутацией p.D281G.**

В ходе данного исследования планировалось выявление частоты наследственных мутаций в гене TP53 среди группы больных остеосаркомой. Эти данные необходимо учитывать при поиске и выделении группы наиболее перспективных молекулярно-генетических маркеров, которые имеют прогностическую ценность в клинике при мониторинге лечения больных остеосаркомой.

В пятой главе «**Иммунологическая характеристика больных остеосаркомой**» приведены данные по изучению состояния иммунной системы при остеосаркоме, которые выражаются в нестабильности течения онкологического процесса, в наличии различных форм и морфологических вариантов заболевания. Иммунореактивность больных остеосаркомой характеризовалась повышением общего числа лейкоцитов, CD8+ цитотоксических Т-лимфоцитов, CD16+Т-лимфоцитов, CD20+В-лимфоцитов и CD38+-лимфоцитов, ЦИК мелких и крупных величин на фоне подавления CD3+-Т-лимфоцитов, CD4+Т-лимфоцитов и ИРИ. Выраженными показателями подавления иммунитета и прогрессирования заболевания оказались ИРИ и ЦИК. Цитокиновый спектр больных ОС характеризовался двукратным повышением основных провоспалительных цитокинов ИЛ-1 $\beta$  и ФНО- $\alpha$  на фоне незначительной активации ИЛ-2 и многократным

повышением пограничного противовоспалительного цитокина ИЛ-6 на фоне активации ИЛ-10, что в свою очередь свидетельствует об активном участии ИЛ-6 и ИЛ-10 в регуляции иммунного ответа и онкогенезе. Выявлено, что максимальное содержание провоспалительных цитокинов (ИЛ-1 $\beta$ , ФНО- $\alpha$ ) было характерно для больных на III клинической стадии, с G2 и G3 степенью дифференцировки опухоли, при большом размере опухоли, при остеобластической гистологической форме, низкой стадии патоморфоза, короткой продолжительности жизни и наличии отдаленных метастазов. Высокие значения противовоспалительных цитокинов (ИЛ-6, ИЛ-10) были характерны для больных: с иммунорезистентной опухолью на IIА-В и III клинических стадиях, с G2 и G3 степенью дифференцировки опухоли, при распространенности процесса, при остеобластическом и периостальном вариантах опухоли, при прогрессировании процесса после лечения и короткой продолжительности жизни. Общая 5-летняя выживаемость больных с уровнем ИЛ-6 до 60пг/мл была выше в 1,7 раза, чем у лиц свыше 60пг/мл. В среднем уровень эндостатина у больных остеосаркомой был повышен в 2,6 раза, уровень FGF-1 – 3,4 раза, а концентрация VEGF-A в сыворотке крови в 14,3 раза. При этом высокие значения эндостатина, FGF-1 и VEGF-A были характерны для лиц мужского пола, короткой продолжительности жизни и наличия отдаленных метастазов. Следовательно, полученные результаты характеризуют иммунореактивность больных ОС и могут служить диагностическими и прогностическими критериями мониторинга терапии и прогнозирования.

В шестой главе **«Влияние молекулярно-генетических маркеров на отдаленные результаты и прогноз остеосаркомы»** представлены результаты исследования пациента с остеогенной саркомой после химиотерапии в различных комбинациях. После проведения различных вариантов неoadъювантной ПХТ, 162 больным было проведено оперативное вмешательство, 42 больным, в связи с отказом от операции, проведена консервативная терапия. После проведения системной неoadъювантной химиотерапии (СНХТ) у 52 из 131 (39,7%) больного наблюдался полный и частичный патоморфологический регресс (III-IV степени), у этих же больных впоследствии наблюдалось улучшение исходов заболевания в сравнении с 79 (60,3%) больными не достигших данных степеней лечебного патоморфоза. Более высокая частота органосохраняющих операций наблюдалась у больных, получавших предоперационную терапию. При выявлении III-IV степени лечебного патоморфоза 39,7% больным адъювантная ПХТ проводилась по той же схеме, как и до операции, так как в этих случаях данная схема ПХТ считается наиболее эффективной. Проведена сравнительная оценка эффективности лечения больных с ОС в зависимости от вида терапии и фонового уровня Хр-нарушений. Результаты показали, что среди 131 больного после СНХТ (1-я группа) у 78 (59,5%) отмечены полный и частичный эффект. При этом у 36 из 78 (46,2%) фоновый уровень Хр-нарушений был меньше 5% (дискриминационный или разделительный уровень), но в 2,5 раза превышал средний уровень Хр-нарушений у здоровых

лиц. Отсутствие эффекта наблюдалось у 42 (53,8%) больных, а фоновые Хр-нарушения были выше 5% и в 7,5 раза выше здоровых лиц. Сравнительный анализ эффективности проводимой терапии и среднего фонового уровня Хр-нарушений среди пациентов этой группы показал, что у 46,2% больных, имеющих положительный эффект от применения химиотерапии, средний уровень Хр-нарушений в лимфоцитах периферической крови был в 2,4 раза ниже, чем у больных с отсутствием эффекта от данной терапии.

Больные получившие ДВАРХ и ДВАРХ+СНХТ (53 больных - 2-я группа) и имеющие при этом положительный (полный и частичный) эффект лечения (62,3%) не отличались средним фоновым уровнем Хр-нарушений от больных получивших СНХТ, однако он был в 4 раза выше, чем у здоровых людей. Отсутствие эффекта от данной терапии наблюдали у 20 (37,7%) больных, среди них у 70% уровень хромосомных нарушений был выше дискриминационного, а средний фоновый уровень Хр-нарушений превышал в 8 раз соответствующий показатель здоровых лиц. Уровни цитогенетических изменений (от 6,0 до 9,2%) в лимфоцитах у больных с различным терапевтическим эффектом мало различались, за исключением уровня Хр-нарушений у больных с прогрессированием процесса (16,4%,  $p < 0,05$ ).

Оперативное лечение проведено у 162 больных с ОС (3 группа). Органосохраняющие операции выполнены у 94 больных. Положительный эффект отмечен у 69,1% (65) пациентов со средним фоновым уровнем Хр-нарушений меньше 5% и в 4,5 раза превышающим этот показатель здоровых. Отсутствие эффекта наблюдали у 30,9% больных со средним фоновым уровнем Хр-нарушений в 7 раз выше, чем у здоровых. Калечащие операции провели у 68 больных при неэффективности химиотерапии и/или химиолучевой терапии, а также калечащие операции были проведены и у 25 больных при большом мягкотканом компоненте опухоли до проведения химиотерапии и/или химиолучевой терапии. В данной группе больных при прогрессировании опухолевого процесса фоновый уровень Хр-нарушений был в 1,5-2 раза выше, чем у пациентов с полным эффектом от проведенной терапии. Анализ показал, что при отсутствии эффекта от проведенного лечения фоновые показатели aberrаций хромосом значительно выше, чем у здоровых лиц или у лиц с хорошим клиническим эффектом. Следовательно, по уровню aberrаций хромосом в лимфоцитах периферической крови больных ОС выявленному до начала лечения, можно прогнозировать терапевтический эффект.

Общая 3-х и 5-летняя выживаемость больных ОС при Хр-нарушениях выше дискриминационного (больше 5%) составили  $78,7 \pm 2,7\%$  и  $21,3 \pm 2,7\%$  соответственно, а при низком (ниже 5%) –  $82,2 \pm 3,1\%$  и  $67,8 \pm 3,1\%$ .

Для прогнозирования клинического течения опухолей и выработки лечебной тактики иммуногистохимические маркеры пролиферации и апоптоза являются важными прогностическими показателями. В образцах опухолевой ткани фиксированной нейтральным формалином со стандартной проводкой и заливкой в парафин, определяли онкомаркеры апоптоза и

пролиферации – p53, bcl-2, Ki 67. Проведена сравнительная оценка эффективности лечения больных в зависимости от вида терапии и фенотипа опухолевых клеток. Среди больных (1 группа) получивших системную химиотерапию полный эффект наблюдался у 13% больных. С отрицательной и слабopоложительной ИГХ реакциями на мутантный ген mtp53 и Ki 67 среди них было 70,6%, а с умеренной и сильной экспрессией bcl-2 (80%). Частичный эффект от лечения был у больных с фенотипом опухолевых клеток, имеющих отрицательную или слабopоложительную ИГХ реакцию на мутантный ген mtp53 (58,5%), слабopоложительную экспрессию Ki67 (70,6%), высокую экспрессию bcl-2 (46,4%). У 37,4% больных из этой группы эффект терапии был отрицательным, среди них большинство имели опухолевые клетки с высокой экспрессией мутантного гена mtp53 и Ki-67, отсутствие экспрессии bcl-2.

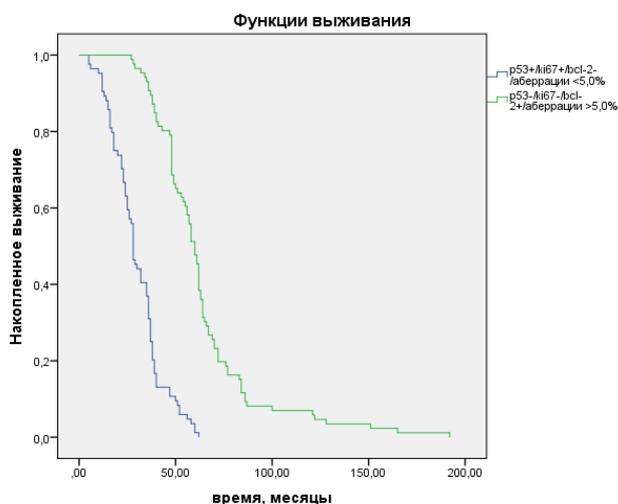
Во второй группе (ДВАРХ) полный и частичный эффекты от проведенной терапии были отмечены у 73,6% больных, среди них у 66,7% больных опухолевые клетки были mtp53 отрицательными, со средней и низкой экспрессией гена Ki-67 и с умеренной и высокой реакцией на bcl-2. У 35,8% больных после проведения данной терапии эффект был отрицательным, среди них у 73,7% фенотип опухолевых клеток имел комбинацию, состоящую из клеток с высокой экспрессией мутантного гена mtp53 и Ki-67, а также низкую экспрессию гена bcl-2. В 3 группе (42 больным проведена лучевая терапия) с положительным эффектом от терапии было 56% больных, среди них со слабой и отсутствием экспрессии мутантного гена mtp53 было 75% и только у 12,5% была выявлена умеренная экспрессия этого белка. Экспрессия генов Ki-67, так же была слабой или отсутствовала у большинства больных (88,8%), а экспрессия bcl-2 у больных с положительным эффектом лечения в этой группе была высокой и умеренной.

Анализ 1, 3 и 5 летней выживаемости всех обследованных больных остеосаркомой показал, что 1-году выживаемость наблюдалась в 95,1% случаев, 3-году выживаемость составила 51,8%. До 5 лет дожили 39,37% (87) больных. Следовательно, критериями неблагоприятного прогноза ОС являются: характеристика лечебного патоморфоза (выявление I-II степени) уровень aberrаций хромосом в лимфоцитах периферической крови больных ОС больше дискриминационного (5%), экспрессия мутантного гена p53, отсутствие экспрессии bcl-2, экспрессия Ki-67, низкая дифференцировка опухолевых клеток.

Анализ эффективности проведенного лечения у 221 больного показал, что полное исчезновение болевого синдрома при четко пальпируемой опухоли и полное восстановление функции конечности наблюдалось у 13 (5,9%) больных, у которых фенотип имел следующий набор биомаркеров – mtp53<sup>-</sup>, bcl-2<sup>+</sup>, Ki67<sup>-</sup>, ХА<5%, данное состояние оценивалось как полный клинический ответ на ПХТ. Частичный клинический ответ, уменьшение болевого синдрома и размеров опухоли, а также улучшение функции конечности отмечалось у 84 (38,2%) с фенотипами mtp53<sup>-</sup>, bcl-2<sup>+</sup>, Ki-67<sup>-</sup>,

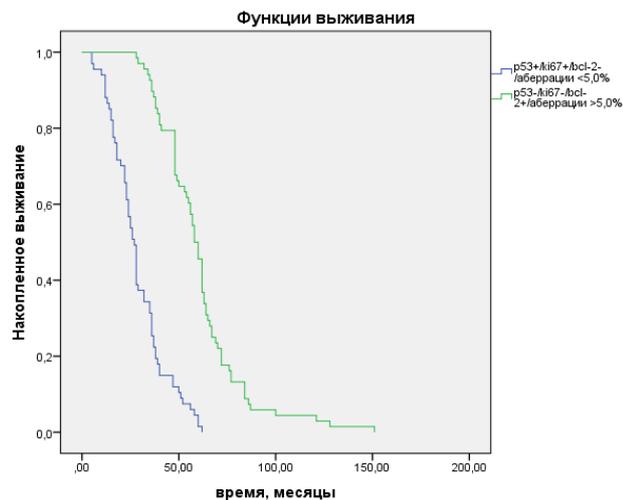
ХА<5% и mtp53<sup>-</sup>, bcl-2<sup>+</sup>, Ki-67<sup>-/+</sup>, ХА<5%. У 96 больных (43,4 %) наблюдалась стабилизация состояния, а фенотип был mtp 53<sup>-</sup>, bcl-2<sup>+/-</sup>, Ki67<sup>-/+</sup> и ХА<5%. Прогрессирование процесса - у 28 (11,8%) больных с фенотипом mtp53<sup>+</sup>, bcl-2<sup>+/-</sup>, Ki 67<sup>-/+</sup> и ХА>5%.

С целью изучения исхода заболевания нами была определена кумулятивная, безметастатическая и безрецидивная выживаемость в зависимости от комбинации генетических маркеров опухоли (p53, Ki-67, Bcl-2, хромосомная aberrаций). Результаты анализа кумулятивной выживаемости, полученные по методу Каплан-Мейера, среди больных сгруппированных в зависимости от уровня экспрессии исследуемых онкомаркеров (p53, bcl-2, Ki-67) показали, что экспрессия мутантного гена p53 в опухолевых клетках ниже 10%, Ki-67 – до 20%, а bcl-2 больше 20% клеток (рис.9) способствует увеличению доли выживших больных.

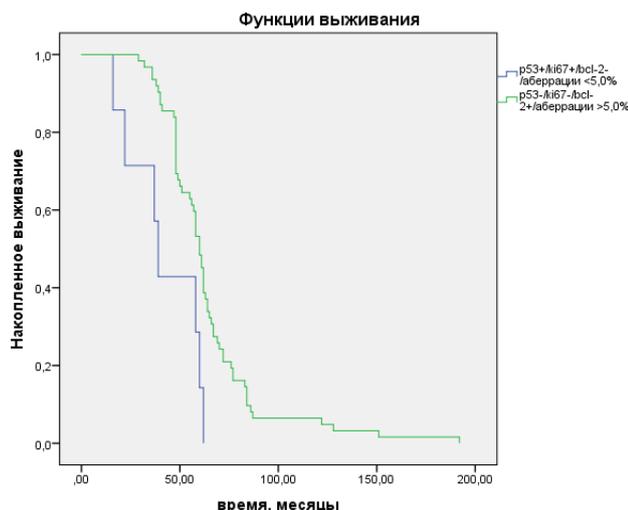


**Рис. 6. Кумулятивная доля выживших больных с негативным фенотипом p53+/ki67+/bcl-2-/абerrации >5,0% (n=84) и позитивным фенотипом p53-/ki67-/bcl-2+/абerrации <5,0% (n=86).**

Проведенный статистический анализ показал, что при комбинации признаков p53+/Ki-67+/Bcl-2-/уровень хромосомной aberrации>5,0% показатели 3-х и 5-летней выживаемости были ниже (40,0±5,4% и 0% соответственно), чем при p53-/Ki-67-/Bcl-2+ и хромосомные aberrации <5,0%, при этом показатели 3-х и 5-летней выживаемости составили 90,0±2,9% и 40,0±4,2%, кроме того, есть возможность больным с данным фенотипом дожить до 15 лет (p<0,05). При анализе безрецидивной выживаемости больных с негативным фенотипом p53+/Ki-67+/bcl-2-/хромосомная aberrация <5,0% показатели 3-х и 5-летней выживаемости составили 60,0±4,9% и 10,0±3,4%, а при позитивном фенотипе p53-/Ki-67-/Bcl-2+/хромосомная aberrации <5,0% показатели равнялись 90,0±3,2% и 50,0%±4,2% (p<0,05).



**Рис. 7. Безрецидивная доля выживших больных с негативным фенотипом p53+/ki67+/bcl-2-/абберрации>5,0% (n=67) и позитивным фенотипом p53-/ki67-/bcl-2+/абберрации <5,0% (n=68)**



**Рис. 8. Безметастатическая доля выживших больных с негативным фенотипом p53+/ki67+/bcl-2-/абберрации>5,0%(n=7) и позитивным фенотипом p53-/ki67-/bcl-2+/абберрации <5,0%(n=62)**

При изучении безметастатической выживаемости при негативном фенотипе p53+/Ki-67+/bcl-2-/хромосомные aberrации >5,0% 3-х и 5- летняя выживаемость составила 70,0±3,4% и 10,0±3,2%, а при позитивном фенотипе p53-/Ki-67-/bcl-2+/хромосомная aberrации <5,0% составили 90,0±3,4% и 50,0±4,3% (p<0,05) (рис.8).

Представленные результаты показывают, что при положительных экспрессиях p53+, Ki-67+ и хромосомные aberrации >5% прогноз оказался неблагоприятным, а при отсутствии экспрессии p53, Ki-67, bcl-2+ и хромосомной aberrации <5% прогноз оказался благоприятным.

Исследования некоторых авторов и наши данные свидетельствуют о том, что изучение экспрессии мутированного гена-супрессора p53 и

хромосомной нестабильности является более информативными прогностическими факторами при остеосаркоме.

Проведенные исследования показали, что на прогноз заболевания при остеогенной саркоме из 131 клинико-рентгенологических, морфологических, иммунологических, цитогенетических и молекулярно-генетических признаков существенное влияние оказывали 15, которые имели корреляционную связь с продолжительностью жизни. Проведенный однофакторный анализ с изучением 3-х и 5-ти летней выживаемости среди больных остеосаркомой, а так же корреляционные связи имели место между кумулятивной, безметастатической, безрецидивной выживаемости с фенотипом опухоли и при сочетании различных генетических маркеров опухоли (p-53, Vcl-2, Ki-67, хромосомные аберрации).

Установлено, что при положительных экспрессиях p53+Ki-67+ и отрицательных показателях vcl-2-, при уровне хромосомных аберраций больше 5% больные имели неблагоприятный прогноз. Дополнительными прогностическими признаками являются ИЛ-2 и ИЛ-10, а также фактор ангиогенеза VEGF-A. Все эти факторы необходимо учитывать при определении прогноза и выборе схем лечения, а сочетание этих признаков у больных остеосаркомой может играть важную роль при индивидуализации тактики лечения и при назначении таргетных препаратов.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Использование современных методов морфологического, иммуногистохимического и молекулярно-генетического для исследования роста, развития и прогрессирования остеосаркомы позволило выявить тесную связь между ранним развитием рецидивов, отдаленных метастазов, степенью дифференцировки остеосаркомы, выраженностью ее лечебного патоморфоза, объемом опухоли, уровнем экспрессии онкомаркеров ( $R$  0,886 – 0,380 ).

2. Проведенный анализ показал, что у больных при отсутствии эффекта от проведенного лечения фоновые показатели аберраций хромосом были больше дискриминационного уровня ( $>5\%$ ), что в 4,8 раза выше, чем у здоровых лиц ( $8,2\pm 0,9\%$  по сравнению с  $1,7\pm 0,3\%$ ) и в 2,7 раза выше, чем у лиц с хорошим клиническим эффектом ( $p < 0,05$ ).

3. Установлено, что характер экспрессии маркеров апоптоза (p53 и vcl 2) и пролиферации (Ki-67), участвующих в регуляции клеточного цикла и обнаруженных в опухолевых клетках больных остеосаркомой, является прогностическим критерием в оценке клинического течения этого заболевания.

4. Фенотип больных, имеющих набор биомаркеров такой как  $mp$  53 $<10\%$ , vcl 2 $>10\%$ , Ki 67 $<20\%$ , ХА $< 5\%$  был выявлен при состоянии оценивающимся как полный клинический ответ на ПХТ.

5. Установлено, что частичный клинический ответ на ПХТ имели больные, у которых было два варианта фенотипов  $mtp\ 53 < 10\%$ ,  $bcl\ 2 > 10\%$ ,  $Ki\ 67 < 20\%$ ,  $ХА < 5\%$  и  $mtp\ 53 < 10\%$ ,  $bcl\ 2 > 10\%$ ,  $Ki\ 67 > 20\%$ ,  $ХА < 5\%$ .

6. У больных с фенотипом  $mtp\ 53 > 10\%$ ,  $bcl\ 2 > 10\%$ ,  $Ki\ 67 > 20\%$ ,  $ХА > 5\%$  выявлено прогрессирование опухолевого процесса.

7. Выявлен дисбаланс субпопуляций Т-лимфоцитов. Отмечается снижение иммунорегуляторного индекса от 0.4 до 1.1 (в норме от 1.5 до 2.0), что является показателем неадекватности иммунного реагирования.

8. Выявлено двукратное повышение сывороточной концентрации провоспалительных цитокинов, таких как ИЛ-1 бета и ФНО-альфа у больных с остеосаркомой (8.7 пг/мл и 6.3 пг/мл соответственно), по сравнению с нормой (4.3 пг/мл и 2.6 пг/мл соответственно  $p < 0,05$ ).

9. Была установлена высокая спонтанная продукция противовоспалительных цитокинов (ИЛ-10 и ИЛ-6). Так, ИЛ-10 был повышен в 1,3 раза (9,35 пг/мл и 7,2 пг/мл соответственно), а ИЛ-6 в 23 раза (79,4 пг/мл и 3,4 пг/мл) выше контрольных значений ( $p < 0,05$ ).

10. Установлено, что сывороточная концентрация фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) у больных с остеосаркомой была повышена в 14,3 раза в сравнении с данными контрольной группы (520,2 пг/мл и 36,3 пг/мл;  $p < 0,05$ ). Это особенно выразалось в группе больных с высоким риском метастазирования и прогрессии опухоли.

**SCIENTIFIC COUNCIL 16.07.2013.Tib 20.01 at «REPUBLIC  
SPECIALIZED CENTER OF SURGERY NAMED after ACADEMICIAN V.  
VAHIDOV» JSC and TASHKENT MEDICAL ACADEMY on AWARD of  
SCIENTIFIC DEGREE of DOCTOR of SCIENCES**

---

**REPUBLICAN ONCOLOGY SCIENTIFIC CENTER**

**POLATOVA DJAMILA SHAGAYRATOVNA**

**MOLECULAR-BIOLOGIC AND GENETIC MARKERS, THEIR  
SIGNIFICANCE IN DIAGNOSTICS AND CURE OF PATIENTS WITH  
OSTEOGENOUS SARCOMA**

**14.00.14 – Oncology,  
(medical sciences)**

**ABSTRACT OF DOCTORAL DISSERTATION**

**Tashkent-2016**

**The theme of dissertation has been registered at High attestation committee at Cabinet of Ministries of the Republic of Uzbekistan №30.09.2014/Б2014.5.Tib427**

Dissertation has been done at Republican oncologic centre of Health Care Ministry of the Republic of Uzbekistan.

Author's abstract is in three languages (Uzbek, Russian, English) has been placed on Scientific council's web-site ([www.med.uz/surgery](http://www.med.uz/surgery)) and on "ZiyoNet" Information-educational portal ([www.ziynet.uz](http://www.ziynet.uz)).

**Scientific consultant:**

**Sarimbek Navruzovich Navruzov**  
Professor, M.D.

**Official  
opponents:**

**Mamed Djavadovich Aliev,**  
Professor, M.D., academician of RAS

**Tamara Uktamovna Aripova**  
Professor, M.D.

**Abduvakhid Valievich Khodjaev**  
Professor, M.D.

**Leading organization:**

Republican Scientific and Practical Center of  
Oncology and Medical Radiology. N.N.Aleksandrov,  
Minsk, Republic of Belarus

Defense will take place «\_\_» \_\_\_\_\_ 2016 at \_\_\_ at the meeting of scientific council number 16.07.2013.Tib.20.01 at «Republic specialized center of surgery named after acad.V.Vahidov» JSC and Tashkent medical academy to address: 100115, Uzbekistan, Tashkent, Small circular str. 10. Phone: (+998971) 277-69-10; fax: (+998971) 277-26-42; e-mail: [cs.75@mail.ru](mailto:cs.75@mail.ru).

Doctoral dissertation is registered in the information-resource center at «Republic specialized center of surgery named after acad. V.Vahidov» JSC (№ 05 is possible to review it IRC) (100115, Uzbekistan, Tashkent, Small circular str.10. Phone: (+998971) 277-69-10, fax: (+99871) 277-26-42).

Author's abstract has been distributed «\_\_» \_\_\_\_\_ 2016.

(distribution proto № \_\_\_\_ dated by \_\_\_\_\_ 2016.).

**F.G.Nazirov**

Chairman of Scientific Council on conferment of scientific degree, M.D.,  
professor

**A.Kh.Babadjanov**

Scientific secretary of Scientific Council on conferment of scientific  
degree, M.D.

**A.V.Devyatov**

Chairman on scientific work-shop at Scientific Council on conferment of  
scientific degree, M.D., professor

## INTRODUCTION (Abstract of dissertation)

**Relevance and demand for dissertation subject.** In spite of significant progress in the modern diagnostics and therapy of tumors, prognosis for patients with osteosarcomas still remains unfavourable. A formed situation dictates a necessity of searching and creating new techs of early diagnostics, monitoring and treatment of patients. Due to up-to-date achievements of molecular biology, biotechnology and genetics significant indications which can help in diagnostics, treatment and predicting out-comes of malignant tumors appeared nowadays.

It is known that osteosarcoma is extremely aggressive malignant tumor disposed to rapid growth and hematogenous metastasis. There are enough quantity of investigations in literature directed at study of bone tissue metabolism peculiarities in norm and at bones neoplasms with the aim of detection new potential molecular-biologic markers of tumor growth. A variety of researchers suppose that exactly expression imbalance of these factors can be one of the reasons of tumor growth. But they are diverse and disputable. It is supposed that they determine fundamental features of tumor cells such as metastatic disease, invasion, absolute proliferation, neoangiogenesis processes activity, ability to withstand to apoptosis and also their sensibility to exogenous and endogenous regulators.

At the same time cytokines which can be neoangiogenesis and neoplastic proliferation activators play important role in these processes and correlate with metastatic disease and unfavourable prediction of disease. Investigation of molecular markers role is an important factor in diagnostics at study of malignant growth activity at bones sarcoma. Study of tumors development mechanisms remains actual and requires applying up-to-date investigation and treatment methods for solving both theoretic and practical issues of oncology the final aim of which is early diagnostics and devise effective pathogenetic methods of treatment. Besides, a main task is improving treatment results by overcoming tumor cells resistance on the background of polychemotherapy.

The research corresponds to implementation of tasks including to President of Uzbekistan Decree «About measures on further intensification of health care system» dated by the 28<sup>th</sup> of November, 2011 PP-1652; Decree of Cabinet of ministries of the republic of Uzbekistan «About measures on further strengthening of material and technical basis and improvement of organization of medical institutions activity» №91 dated by the 29<sup>th</sup> of March, 2012 (chapter V, item 15).

So, all mentioned above predetermined relevance and demand of research.

**Conformity of research with priority directions of republican science and techs development.** The research has been done in the correspondence with priority directions of republican science and techs development SSTP-11 «Devise of highly effective science intensive techs, up-to-date methods in medicine, improving of health care system protection and providing ecologic safety».

**Review of foreign investigations.** Scientific researches directed to study osteosarcoma biologic behaviour, devise of effective diagnostics and treatment methods subject to up-to-date conceptions about molecular-biological and genetic

markers which are carried out at the big international medical centers such as The national cancer Institute in Milan, Italy; Munster multidisciplinary cancer center, Germany; West German cancer center; Cancer center Anderson, USA, German Cancer Research Center, Heidelberg, Germany; Center for Musculoskeletal Surgery, Charité-University Medicine Berlin, Germany; Department of Paediatric Laboratory Medicine, Hospital for Sick Children, Toronto, ON, Canada; Department of Pathology and Molecular Medicine, Queen's University, Kingston, ON, Canada; University of Alabama at Birmingham and the Birmingham Veterans Affairs Medical Center, Birmingham, Alabama; Republican Scientific-practical Center of Oncology and medical radiology named after N.N.Aleksandrov, Minsk, Belorussia; ROSC named after N.N.Blokhin, RAMS (Moscow), Research Institute of oncology named after N.N.Petrov (St.Petersburg, Russia); Kiev National University named after Taras Shevchenko.

Significant scientific results on increasing diagnostics efficiency and treatment quality of osteogenous sarcoma and adoption new more effective treatment methods and predicting of disease have been received in these oncologic institutions. For instance, in Birmingham, Alabama (USA) in the University of pathology, radiology, cellular biology B.D.Ragland, G.Siegel at all study the role of cytogenetic and molecular-biological markers at bones sarcomas. Professor Bruno Fuchs devised new strategy in cure osteosarcomas metastasis and genetic markers role in clinical course prediction. One of the biggest clinical material of patients with osteosarcoma for the last 20 years in the world has been kept in ROSC named after N.N.Blokhin; investigations on DNA-diagnostics of inherited tumor syndromes and participation of oncomarkers and genes polymorphism in inherited and sporadic forms of oncopathologies including osteocarcoma at Research Institute of oncology named after N.N.Petrov (St.Petersburg).

Genetic investigations with the use of up-to-date molecular genetics methods which are carried out in world scientific-research centers are necessary to adopt in our country too. Availability of these investigations is proved by variety of leading scientists. It is necessary to carry out a detection of genetic inherited pathology, it allows to prevent birth of sick children. Methods of molecular medicine and cellular techs allow to perform diagnostics and monitoring of oncologic diseases. Molecular-genetic investigations give possibility of study tumors peculiarities including bones sarcomas for creating new treatment strategy influencing on particular molecules and processes, i.e. "target" therapy development.

**Extent of studied issue.** Etiology, genetic, pathogenetic factors and molecular mechanisms of osteosarcoma still remain finally studied (Imyanitov, Hanson 2004; Friedrich et al., 2008). Cells malignant transformation and tumor progression clinically revealing by invasion into surrounding tissues and also by regional and distant metastasis are connected with disorders of genome normal functioning (Egger et al., 2004; Sprague et al., 2007; Kopnin, 2007; Zaridze, 2008; Blokhin, 2009). Osteosarcoma molecular pathogenesis includes a number of genetic and epigenetic events leading to activation of oncogenes and inactivation of tumor suppression genes underlying of tumor transformation (Lyakhovich et all, 2004; Payne, Kemp, 2005; Croce, 2008; Zaletaev, 2008; Liechtenstein, 2009).

It is known that gene *TP53* is one of the key-point suppressor-gene of tumor growth (Phillips, 1999; Chumakov et al., 2007; Vousden, Lane, 2007; Kopnin, 2008). Differences in «functional significance» of mutations do not allow to receive definite results about their relation with manifestation of tumor progression (Feki, Irminger-Finger, 2004; Petitjean et al., 2007; Brosh, Rotter, 2009). There are also few references that *TP53* gene methylation at osteosarcoma can act as alternative mechanism of p53 protein inactivation and associated with tumor process invasiveness (Kang et al., 2001). Ambiguity of received data by these authors shows an importance of continuing investigations.

Singular researches on study clinical peculiarities of osteosarcoma have been carried out in Uzbekistan. Efficiency of applying combined and modified therapy in patients with osteogenous sarcoma of long cortical bones has been studied (S.D.Urunbaev, M.A.Gafur-Akhunov, 2009; 2010; M.T.Achilov, A.A.Fayzullaev, F.B.Gaziev, A.R.Akramov, T.J.Eshkabilov, 2015; M.S.Salomov, Саломов, M.A. Gafur-Akhunov, 2015). Early underwent investigations in Uzbekistan were limited by study the influence of different treatment types on disease prediction (M.A.Gafur-Akhunov, J.D.Urunbaev, K.R.Nuriddinov et al 2000; , M.A.Gafur-Akhunov, S.D.Urunbaev, L.P.Koren et al 2010). Life span and survivability without metastasis at organ-saving and crippling surgeries have been also studied (M.A.Gafur-Akhunov, Kh.G.Abdikarimov, S.D.Urunbaev,2008; A.A.Khamdamov, A.V.Savkin, 2015). In consideration of all mentioned above, study the role of molecular and cellular markers in sarcoma course is basic direction which can help in early diagnostics, treatment and prediction of disease.

**Connection of investigation with scientific-research works plan of institution where research has been carried on.** Dissertation has been made in accordance with scientific-research works plan of Republican Oncologic Center on themes: A-9-050 «Cytogenetic and molecular-biologic investigations for devise pathogenetic treatment of patients with osteogeneous sarcoma » (2006-2008); SSTP-1109-11.3-10849 «Devise up-to-date techs in study of forming multiple drug resistance at malignant tumors of different localization and the ways of its overcoming» (2009-2011); F-4.3.7. «Study of immunity molecular factors in oncologic patients» (2009–2014).

**Goal** is to detect changes of molecular-biologic and genetic markers characterizing tumor progression mechanisms at osteosarcoma and to prove their role in diagnostics and treatment of this pathology.

#### **Tasks**

- To study molecular-biologic markers of proliferation, apoptosis and angiogenesis in tumor and in blood serum in patients with osteosarcoma;
- To define the role of cytogenetic changes in patients' peripheral blood lymphocytes in diagnostics and treatment of osteosarcoma;
- To study peculiarity of osteosarcoma clinical course subject to molecular-biologic factors of tumor;
- To estimate immune system condition (cellular and humoral) in patients with osteosarcoma subject to clinical peculiarities;

- To detect functioning of immune system cytokines (pro- and anti-inflammatory) in patients with osteosarcoma subject to clinical peculiarities;
- To perform analysis of prediction clinical-morphologic factors at bones osteosarcoma;
- To prove prognostic role of molecular-genetic markers in treatment of patients with osteosarcoma.

### **Subject**

221 patients with osteosarcoma and 48 healthy people of comparable age and sex.

### **Object**

venous blood and serum of patients for conduction molecular-genetic, cytogenetic and immunologic investigations, histologic material for testing immunohistochemical oncomarkers.

### **Methods**

Clinical, X-ray, morphologic, immunohistochemical, molecular-genetic, cytogenetic and statistic methods of investigation have been used.

### **Scientific novelty**

- A number of factors characterising organism's and tumor's features impacting on osteosarcoma (OS) course, rate of chromosomal instability higher than discriminatory one (5%) which is prognostically unfavourable factor has been shown for the first time;
- It has been detected that high chromosomal instability is connected: with progressing of tumor process; low rate of pathomorphism and tumor differentiation; increasing of tumor size and with chondroblastic histologic variant; and also with relative life span of patients which was 1,6 times less than in patients with low rate of chromosomal instability;
- tumor molecular-genetic characteristics developing in the network of inherited syndromes (Lee-Frumeni syndrome), heterozygous change c.842A>G (T>C), it is functional significant missense mutation p.D281G;
- immunohistochemical investigations detected that achievement of full morphologic regress at performing neoadjuvant chemotherapy was observed in patients among which in 70,6% expression of mutant gene p53 and expression of Ki-67 gene was absent, and in 80,0% expression of bcl2 has been detected; in some patients after using scheme of CIARCT it was also observed full morphologic regress, in 87,5% of those patients mutant gene p53 was absent, in 90,0% of these patients expression of bcl-2 gene was high and in 80,0% of patients expression of Ki-67 gene was weak;
- expressive profile (molecular-genetic phenotype) of patients with osteosarcoma has been detected for the first time, high chromosomal instability (increasing chromosomes aberrations in lymphocytes of peripheral blood of patients 5% higher) and high level of apoptosis biomarkers expression and proliferation (mtp53<sup>+</sup>, Ki-67<sup>+</sup>) is prognostic

unfavourable for early metastasis and appearing of early relapses (from 6 to 9 months);

- revealed negative molecular-genetic phenotype correlates with low rate of pathomorphism (1 and 2), relative life span of patients to 3 years, it is connected with low rate of differentiation ( $G_3$ ), increase of tumor size, with chondroblastic variant of osteosarcoma;
- immunodeficiency condition has been determined in patients with osteosarcoma which expressed in deep T- cellular immunodeficiency and activation of humoral chain of immunity, it allows to perform early immunologic diagnostics of progressing course of malignant process;
- cytokine status in patients with osteosarcoma which showed imbalance of immune system basic cytokines playing important role in forming, development and progressing of tumor has been studied for the first time;
- peculiarities of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines response at immune-proliferative syndrome – osteogenous sarcoma have been studied for the first time, the prevalence of IL-6 has been detected and it can serve as criteria of tumor progressing diagnostics;
- peculiarities of osteogenous sarcoma progressing subject to angiogenesis development have been studied for the first time, it has been determined that VEGF-A expression in primary osteosarcomas correlate with the growth of local density of vessels in tumor tissues, with development of pulmonary metastasis and unfavourable prediction for patients with such diagnosis;
- content of FGF-1, -2 endostatin in patients with osteosarcoma before treatment for revealing their possible correlation with disease clinical characteristics and prediction have been studied for the first time, it has been determined that FGF-1 and endostatin have relation with pathogenetic changes connected with bone tumor growth.

### **Practical results**

- it has been determined molecular-genetic phenotype of patients with osteosarcoma, chromosome instability, high rates of apoptosis biomarkers and proliferation ( $mtp53^+$ ,  $bcl-2^-$ ,  $Ki-67^+$ ) which are prognostic unfavourable factors of early metastasis and appearing early relapses;
- at osteosarcoma significant role in prognosis play not only clinic and morphologic factors but also immunologic and molecular-genetic markers such as high expression of mutant gene-suppressor  $mtp53$  and  $Ki-67$ , low -  $bcl-2$ , chromosome instability (aberration), high expression of VEGF-A, cytokines and  $TNF-\alpha$ ;
- comparative estimation of cytokine spectrum in norm and at pathology reflects functional condition of immune system which serves as base for clinic interpretation of immunopathogenesis, constructing of immunologic diagnosis and prediction and necessary for conducting immunotherapy, immunoprofilaxis and immunorecovery;

- knowledge of molecular-genetic status and cytokine spectrum of patients at osteosarcoma will allow to determine pathogenetic peculiarities of disease, its severity and prognosis, to differentiate periods of aggravation and remission, will give a possibility to estimate efficiency of conducting drug therapy.

**Significance of received results** is proved by adequate quantity of patients, mutually complementary clinical, immunologic, X-ray, morphologic, immunohistochemical, cytogenetic investigations and is based on up-to-date scientific approaches to diagnostics and treatment of patients with osteosarcoma. Solving of tasks has been done by modern approved, correct methods of medical statistics.

### **Scientific and practical significance of investigation results**

Received results make significant contribution to up-to-date achievements of molecular biology, immunology, medical genetics, oncology in study of clinic-functional peculiarities of course, treatment and prognosis of osteosarcoma and are the base of disease development peculiarities further study with possible complications with the aim of forming new competitive methods of diagnostics and treatment. Particular results of research will give possibility for improving the content and structure of students, clinical residents teaching programs on diagnostics and treatment of patients with bones tumors.

Practical value of the research is in devised clinical symptom complex which provides significant diagnostics of osteosarcoma at early stages of process development and promotes treatment efficiency of patients. Conducting of immunologic and genetic investigations allows to detect the features of early metastasis and to get more full information about severity and prevalence of disease. Data on molecular-genetic phenotype of patients with osteosarcoma has important meaning at revealing group of the biggest risk of osteosarcoma development and definition of perspective molecular-genetic markers in them which have prognostic value in clinics at monitoring of treatment patients with osteosarcoma.

### **Adoption of investigation results**

Metal “endoprosthesis” replacing diaphysis area of femoral bone have been devised and patent № FAP 00851 (17.10.2013.) have been received, 2 positive solutions for getting patents on useful models – device for endoprosthesis of bones diaphysis (FAP №20150153), device for endoprosthesis of knee joint (FAP №20150164 ) and also methodical textbooks and recommendations have been included in educational process and are used in practical medicine (Conclusion of health Ministry of the Republic of Uzbekistan № 8 H-3/41 dated by 10.02.16r.).

Received investigation results allowed to improve quality of diagnostics and treatment of patients with osteosarcoma, to optimize treatment tactics, to reduce relapses and metastasis frequency, to increase life span due to improving of quality of medicine. Working-out of domestic knee joint endoprosthesis allowed to reduce import, to get product by lower price in compare with foreign analogs; wide adoption allowed to get early social recovery of patients and to save

expenditures due to reducing of invalidity and to get economic profit due to decreasing of hospital staying.

### **Approbation of investigation results**

Results have been reported at 11 scientific-practical conferences, 8 international conferences: IV Congress of oncologists and radiologists of SIC countries (Baku , 2006); V Congress of oncologists and radiologists of SIC countries (Tashkent, 2008); I Italian-Russian scientific conference on oncology and endocrine surgery (Italy, 2010); ESMO 36 The 2011 European Multidisciplinary Cancer Congress (Stockholm, 2011); ICACT 23<sup>rd</sup> International Congress on anti-cancer treatment (France, 2012); 22nd Biennial Congress of the European Association for Cancer Research (Spain, 2012); III International conference EESG «sarcomas of bones, soft tissues and skin tumors » (Moscow, 2014); 34<sup>th</sup> Congress of the ESSO (England, 2014). At 3 Republican conferences: II Congress of Uzbekistan oncologists (2011, Tashkent); Scientific-practical conference «Actual issues of locomotor apparatus and head-neck tumors » (Nukus, 2014); III Congress of Uzbekistan oncologists (Tashkent, 2015).

### **Publications of investigation results**

58 researches have been published including 14 articles in journals reviewed by HAC of Uzbekistan, 6 – in foreign journals; 3 patents, 2 certificates for innovations.

### **Structure and volume of dissertation**

There are **197** pages including Introduction, main part, conclusion, practical recommendations, reference, 49 tables and 38 pictures.

## **Contents**

**Introduction** presents relevance, goal and tasks of the research, scientific novelty and practical value, ground of practical adoption of received investigation results.

The 1<sup>st</sup> chapter «**Modern view on molecular-biologic and genetic aspects at osteosarcoma and their role in diagnostics and treatment (literary review)**» is devoted to analysis of modern literature on study of molecular-biologic and genetic markers at osteosarcoma and their role in diagnostics and treatment and also peculiarities of immune system functioning at immunodeficiency state at osteosarcoma. Besides, material on study common modern conception of osteosarcoma, diagnostics, clinics and treatment has been presented. Detailed information on study immunologic aspects at osteosarcoma, molecular-biologic diagnostics.

The 2<sup>nd</sup> chapter «**Material and methods**» represents general characteristics of 221 investigated patients with osteosarcoma. Investigations were performed at RORC of Health Ministry of the Republic of Uzbekistan from 2005 to 2013.

221 patients with histologic verified osteosarcoma of cortical bone were observed. Investigation groups were consisted of patients of comparable age, tumor localization and disease stage with condition of well-defined stage

indications maintenance, prevalence, morphology of tumor and patients age. Patients randomizing analysis by sex showed that there were 137 (61,9%) men and 84 (38,1%) women. Randomizing of patients by age revealed that osteosarcoma often occurred in people at the age till 20 years with the same frequency among men 66,4% and women 60,7%, mean age made up  $22,0 \pm 0,7$  years. Observation duration of patients was from 1 to 7 years.

By localization patients were randomized as follows: femoral bone in 65 (53,3%) cases, shinbone in 43 (35,2%) cases and rarely fibular bone - 14 (11,5%). From 221 patients in 71 ones (32,1%) osteolytic form was detected by X-ray, in 47 (21,3%) cases - osteoplastic type and in 103 (46,6%) patients - combined form of osteosarcoma. At radiologic investigations it has been revealed that in 33 (14,9%) patients extension of tumor affection was defined to 5cm, in 138 (62,4%) - from 6 to 10 cm and in 50 (22,6%) - 11cm and higher.

Extension of tumor process made up from 4,5 to 17 cm and at the average made up  $9,6 \pm 0,3$  cm. In 13 patients (5,9%) pathologic crisis has been revealed.

Process extension rate was estimated by TNM international classification (classification of International anti-cancer union 2007). Patients were randomized subject to disease stage: in 187 (84,6 $\pm$ 3,2%) patients it has been detected T2N0M0, in 26 (11,8 $\pm$ 1,7%) - T2N0M1, T1N0M0 - in 8 (3,6 $\pm$ 0,8%). As per clinical classification patients were also randomized by stages: IB - 8 (3,6 $\pm$ 1,2%), IIA - 12 (5,4 $\pm$ 1,5%), IIB - 125 (56,5 $\pm$ 3,3%), III - 62 (28,0 $\pm$ 3,0%), IVA - 11 (4,9 $\pm$ 1,4%), IVB - 3 (1,3 $\pm$ 0,7%).

Tumor volume made up  $434,2 \pm 42,17$  cm<sup>3</sup>

All patients were performed basic clinic-laboratory and instrumental methods of investigation (hematologic, radiologic investigations of bones, CT, MRI, scintigraphy, ECG, skeleton bones radioisotopic investigation by indications, echography). Qualitative estimation of vascularization has been underwent by data of standard or digital subtraction arteriography.

Immunologic investigations have been done at Institute of immunology of Academy of sciences of Uzbekistan. Determination of basic immunologic indexes (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6 and IL-10) has been made by IFA with the use of commercial test-systems «Vector-Best», Russia. Determination of endostatin, FGF-1, FGF-2 and VEGF-1 was performed by IFA-method with the use of test-systems produced by «R&D» (USA) and «Vector-Best» (Novosibirsk, Russia).

Immunohistochemical investigations were made at RORC of the Health Ministry of the Republic of Uzbekistan in pathologic anatomy department together with laboratory of tumors biology. Immunohistochemical investigations were carried out by standard method with the use of primary antibodies («Dako», Novocastra<sup>TM</sup>): VEGF, bcl-2, Ki-67 and p53. Specific quantity of positively colored tumor cells expressing the following markers of cellular proliferation and apoptosis has been estimated: bcl-2, Ki-67, p53. Positive result was the presence of nuclei specific staining at revealing of Ki-67 antibody and p53 suppressor-gene, also staining of bcl-2 cytoplasmic membrane expression.

DNA was a material for molecular-genetic investigation separated from peripheral blood leukocytes and tumor tissues of patients with osteosarcoma. As negative and positive controls at sequencing of nucleotide sequence of *TP53* gene at areas of 4<sup>th</sup>, 5<sup>th</sup>, 6<sup>th</sup>, 7<sup>th</sup>, 8<sup>th</sup> and 9<sup>th</sup> exons were used DNA of tumor lines with knowingly status. Genetic investigations were made at Research institute of oncology named after N.N.Petrov (St.Petersburg) at the department of tumor growth biology by chief of department professor E.N.Imaynitov.

From 2005 to 2013 patients got different types of treatment. Neoadjuvant polichemotherapy (NPCT) has been performed in 196 (88,6%) patients, but among them systemic neoadjuvant chemotherapy has been performed in 131 (69,1%) patients, long intra-arterial regional chemotherapy (CIARCT) has been performed in 29 (4%) cases, combination of systemic PCT and CIARCT has been underwent in 24 (9,9%) patients. At systemic NCT the most frequent types of schemes were as follows: by CAP scheme treatment was performed in 74 (56,4%) patients, EAP- in 10 (7,6%), VCAP – in 17 (12,9%), MAP – in 10 (7,6%) and AP – in 20 (15,2%). Schemes of conducting CIARCT were as follows: by CAP scheme treatment was performed in 34 (82,9%) patients, AP- in 3 (7,3%), MAP – in 3 (7,3%) and VCAP – in 1 (2,4%). Quantity of courses varied and depended on response for treatment, at the average, at systemic PCT made up  $3,06 \pm 0,16$ , at CIARCT  $2,81 \pm 0,18$ . Interval between cycles was 21 days. In some cases due to patients' refusal from operation, 42 (19,0%) patients were performed radiotherapy. Single dose of irradiation made up  $2,36 \pm 0,12$  Gr, at the average  $2,36 \pm 0,12$  Gr, total dose made up  $48,56 \pm 2,74$  Gr.

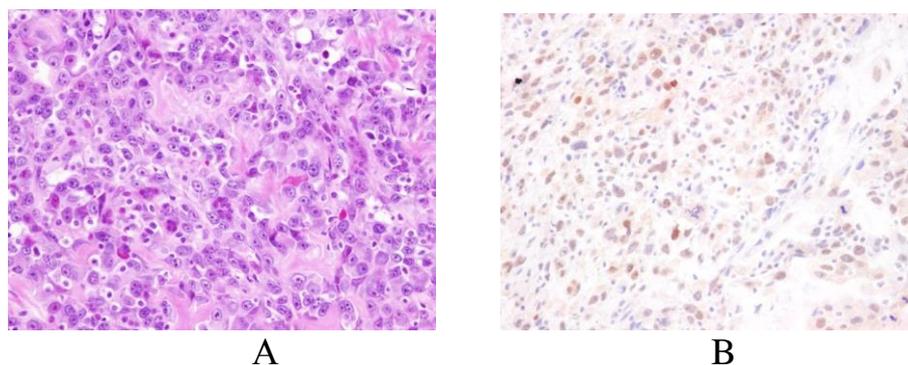
Surgical treatment has been performed in 162 patients. Organs saving surgeries were performed in 94 (58,0%) cases. Taking into account all indications and tumor invasion risks, crippling surgeries have been underwent in 68 (41,9%) cases.

In the post-operative period 218 patients were performed adjuvant chemotherapy: at evidenced medical pathomorphism the same schemes as at neoadjuvant chemotherapy have been performed. At low rate of evidenced medical pathomorphism there were added Etoposide, Iphosphamide to previous schemes and also different schemes of high dosed polichemotherapy have been performed.

The 3<sup>rd</sup> chapter «**The role of cytogenetic markers at osteosarcoma**» presents data on study cytogenic markers at osteosarcoma. It has been shown that issue of use genetic testing for prognosis and monitoring of conducted therapy efficiency of patients with osteosarcoma is possible. Combined study of cytogenetic, pathomorphologic and clinical characteristics of osteosarcoma indicates actuality of the research which has the aim of increasing efficiency of early diagnostics, treatment and prognosis of osteosarcomas. Cytogenetic investigations showed the level of chromosome instability is (5%) higher than discrimination one is prognostic infavourable factor. At conduction of NCT it was revealed that part of patients had achievement of full morphologic regress, in 65,2% among them level of chromosome aberration (ChA) was lower than discrimination one. Survival function of patients with osteosarcoma accounted by Kaplan-Meyer's method allowed to state that at ChA rate 5% lower possibility to

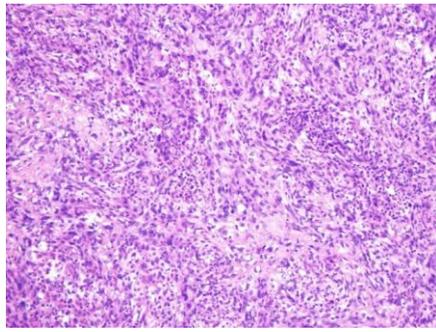
live up to 3 years was in 70% patients and at ChA rate 5% higher only 50% patients reach this period. 40% patients live up to 5 years with both high and low rate of chromosome aberration. But only patients from group with low rate of chromosome aberration have probability to live up to 15 years, such patients can be 15-20%. Results show that risk to die for patients with low rate of ChA within 3 years makes up  $R_1$  0.2; up to 5 years -  $R_1$  0.8; 15 years –  $R_1$  2.5, and for patients with ChA high level those indexes were  $R_2$  0.1; 0.6 correspondingly; up to 15 years nobody lived. Therefore, a number of significant factors characterizing organism and tumor features which impact on OS course. The rate of chromosome instability (5%) higher than discrimination one can be refer to such signs which is prognostic unfavourable factor. It is connected with progressing of tumor process, low degree of pathomorphism and tumor differentiation, increase of tumor size and chondroblastic histologic type and also with relative life span of patients which 1,6 times less than in patients with low rate of chromosome instability.

The 4<sup>th</sup> chapter «**Molecular-biological markers and their role at osteosarcoma**» is devoted to data on study molecular-biologic characteristics of bones sarcomas which go to the first plan in clinical practice for revealing prognostic biomarkers and risk groups among patients with bone sarcoma primary diagnosis. Parallel investigations of p53 and bcl-2 oncogenes is performed subject to their impact on apoptosis development (pict.1,2).

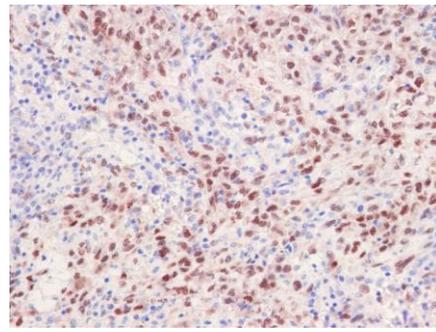


**Pict. 1. Osteosarcoma: chondroblastic histologic variant. A – hematoxylin-eosin; B – immunohistochemistry p53+**

Immunohistochemical investigations revealed that achievement of full morphologic regress at conduction NCT was detected in 13% patients among who in 70,6% patients p53 mutant gene and Ki-67 gene expressions was absent and in 80,0% bcl-2 gene expression was revealed. In 15,7% patients after use of CIARCT scheme full morphologic regress has been observed, in 87,5% of these patients p53 mutant gene was absent, in 90,0% of these patients expression of bcl-2 gene was high and in 80,0% patients Ki-67 gene expression was not revealed. In 14,5% patients after NCT, in 19,4% ones after applying CIARCT scheme and in 14,3% patients after chemioradiotherapy treatment effect was absent and tumor process progressing was observed.



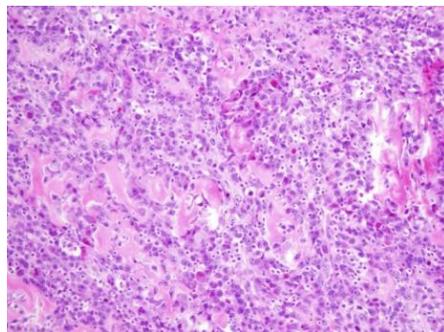
A



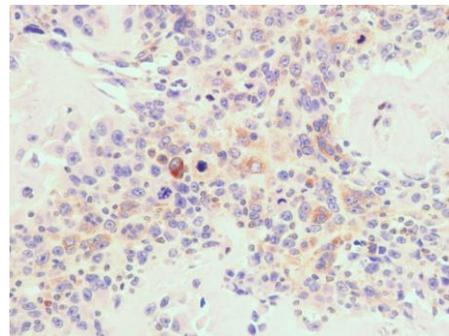
B

**Pict. 2. Osteosarcoma: periosteal. A – hematoxylin-eosin; B – immunohistochemistry p53+**

Survival function of patients with OS accounted by Kaplan-Meyer's method in association with oncomarkers expression allowed to state that at absence of mtp53 mutant gene and expression of Ki-67 gene probability to live up to 3 years was in 98% patients, whereas at the presence of those genes expression this period reaches 85% patients (pict. 3).



A



B

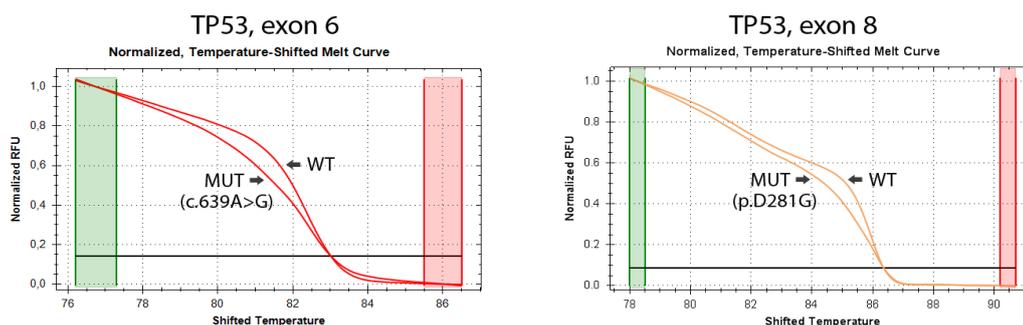
**Pict.3. Osteoblastic osteosarcoma. A – tumor consists of big round cells resembling osteoblasts, osteoid in tumor is in small quantity, stain by hematoxylin and eosin, X200. B – immunohistochemical investigation bcl-2 in osteoblastic osteosarcoma. Positive (cytoplasmic) reaction in separate tumor cells, positive in reactive lymphocytes. Chromogen – diaminobenzidin, counterstain by hematoxylin, X400.**

50% patients with absence of mtp53 and Ki-67 gene expression live up to 5 years and 30% - 40% with their high expression. But only patients from group with absence of mtp53 and Ki-67 genes expression have probability to live up to 15 years, such patients are 15%. Anatomic association of survival function of patients accounted by Kaplan-Meyer's method was observed at the absence of bcl-2 gene expression, probability to live up to 3 years was in 90% patients, whereas at the presence of expression of that gene this period 98% patients reach. 40% patients live up to 5 years with the absence of bcl-2 gene expression and 45% - with high expression. Only patients from the group with bcl-2 gene expression have probability to live up to 15 years, such patients are also 15%. Risk function is used for prognostic aims. Results show that within 3 years for patients with absence of mutations of p53 and Ki-67 genes risk to die makes up  $R_{2-0.4}$ ;  $R_{4-0.2}$ ; up to 5 years -  $R_{2-4} 0.8$ ; up to 15 years -  $R_{2-4} 2.5 - 2.6$ , and for patients with

expression of those genes these indexes were  $R_{2-4}$  0.2; 1.0; nobody lived up to 15 years.

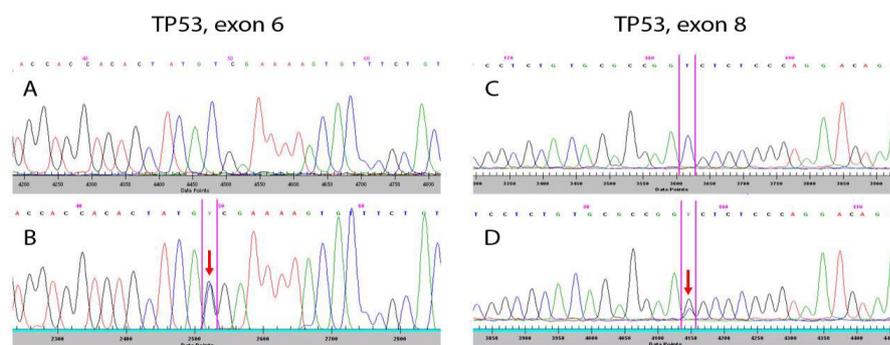
Therefore, molecular-genetic phenotype of patients with osteosarcoma is presented by expression rate of apoptosis biomarkers and proliferation (mtp53<sup>+</sup>, bcl-2, Ki 67<sup>+</sup>) which are prognostic unfavourable factors of early metastasis and appearing early relapses. This phenotype is prognostic unfavourable factor of tumor process progressing, low rate of pathomorphism (1 and 2), relative life span of patients (up to 3 years), it is connected with low rate of differentiation (G<sub>3</sub>), tumor size increasing, with osteosarcoma chondroblastic variant. This expressive profile is clinically connected with M (distant metastasis), but no relations with T (prevalence).

We have done analysis of mutation in exons 5-9 of TP53 gene. Revelation of mutations in those exons of coding sequence of TP53 gene has been carried out in two stages. Estimation of results of high-precision analysis of DNA fragments melting kinetics has been made with the help of PrecisionMeltingAnalysis program (intended for protocols analysis made on CFX96, Bio-RadLaboratories). Example of curve of fragments melting containing mutation in compare with a sample of “wild type” is shown in the pict.4.



**Pct.4. Mutations detection in TP53 gene with the help of high-precision analysis of DNA fragments melting kinetics. To the left — melting curve deformation in compare with the sample of wild type activated by the presence of heterozygous substitute c.639A>G in 6 exon of TP53 gene. This substitute is not functionally significant «keeping silence» polymorphism. To the right — melting curve deformation in compare with the sample of wild type activated by the presence of heterozygous missense mutation p.D281G (c.842A>G). This substitute is functionally significant.**

Verification and refinement of high-precision analysis of DNA fragments melting kinetics data. At revelation of melting curve deformation or displacement of melting temperature sample of amplification product was exposed to capillary sequencing by Sandjer's method.



**Pict.5. Sequencing of TP53 gene fragments. A. Sequence chromatogram of wild type fragment of 6 exon of TP53 gene (anotropic primer); B. Sequence chromatogram of wild type fragment of 6 exon of TP53 gene (anotropic primer). Heterozygous substitute c.639A>G (T>C) is seen. This substitute is not functionally significant «keeping silence» polymorphism; C. Sequence chromatogram of wild type fragment of 8 exon of TP53 gene (anotropic primer); D. Sequence chromatogram of fragment 8 exon of TP53 gene (anotropic primer). Heterozygous substitute c.842A>G (T>C) is seen. This substitute is functionally significant missense mutation p.D281G.**

Example of “wild type” fragments chromatogram containing polymorphism and mutation in TP53 (p.D281G) is presented in pict.5. During this investigation it was planned to reveal frequency of heritated mutations in TP53 among group of patients with osteosarcoma. Those data are necessary to be taken into account at searching and separating the most perspective molecular-genetic markers which have prognostic value in clinics at monitoring of treatment patients with osteosarcoma.

The 5th chapter «**Immunologic characteristics of patients with osteosarcoma (cellular, humoral, activation parameters of immune system and cytokines)**» presents data on study immune system condition at osteosarcoma which are expressed by oncologic process course instability, by the presence of different forms and morphologic types of disease. Immunoreactivity of patients with osteosarcoma was characterized by increase of leukocytes general quantity CD8+ cytotoxic T-lymphocytes, CD16+T-lymphocytes, CD20+B-lymphocytes and CD38+lymphocytes, CIC of small and large sizes on the background of inhibition CD3+-T-лимфоцитов, CD4+T- lymphocytes and IRI. Revealed indexes of immunity repression and disease progressing were IRI and CIC. Cytokine spectrum of patients with OS was characterized by twofold increase of basic proinflammatory cytokines IL-2 and IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  on the background of non-significant activation of IL-2 and multiple increase of border-line anti-inflammatory cytokine IL-6 on the base of Il-10 activation and it is an evidence of

active participation of IL-6 and IL-10 in regulation of immune response and oncogenesis. Maximal content of pro-inflammatory cytokines (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) was typical for patients at III clinical stage, with G2 and G3 stages of tumor differentiation, at large size of tumor and presence of metastasis. High indexes of anti-inflammatory cytokines (IL-6, IL-10) were typical for patients: with immunoresistant tumor at IIA-B and III clinical stages, with G2 and G3 stages of tumor differentiation, at process progressing after treatment and short life span. At the average rate of endostatin in patients with OS was increased in 2,6 times, FGF-1 – in 3,4 times, VEGF-A concentration in serum in 14,3 times. High indexes of endostatin, FGF-1 and VEGF-A were typical for men and characterized by short life span and presence of distant metastasis.

The 6<sup>th</sup> chapter «**Prognostic role of molecular-genetic markers in osteosarcoma treatment**» is devoted to the investigation results of patient with OS after chemotherapy in different combinations. After conduction of different variants of neoadjuvant PCT 162 patients were performed operative intervention, After conduction systemic neoadjuvant chemotherapy (SNCT) in 52 from 131 (39,7%) patients it was observed full or partial pathomorphologic regress (III-IV stage), in these patients afterwards improvement of disease outcome was observed in compare with 79 (60,3%) ones who did not achieve those rates of medical pathomorphism. Higher frequency of organs saving operations has been observed in patients receiving pre-operation therapy. At revelation of III-IV stages of medical pathomorphism 39,7% patients were performed adjuvant PCT by the same scheme as before operation because this scheme PCT in these cases is the most effective. Comparative estimation of efficiency of treatment patients with OS subject to therapy type and background rate of Xp-disorders. Results showed that among 131 patients after SNCT (the 1<sup>st</sup> group) in 78 (59,5%) full or partial effect has been noted. In 36 from 78 (46,2%) background rate of Xp-disorders was 5% less (discrimination or separating level) but in 2,5 times exceeded midrange of Xp-disorders in healthy people. Effect absence was observed in 42 (53,8%) patients and background Xp-disorders were 5% higher and 7,5 times higher than in healthy people. Comparative analysis of conducted therapy efficiency in patients of this group showed that in 46,2% patients having positive effect from used chemotherapy, average rate of Xp-disorders in peripheral blood leukocytes was 2,4 times lower than in patients with the absence of this therapy effect.

Patients received CIARCT and CIARCT + SNCT (53 patients – the 2<sup>nd</sup> group) and having positive (full or partial) treatment effect (62,3%) did not differ by average background rate of Xp-disorders from those ones who received SNCT, but it was 4 times higher than in healthy people. Effect absence from such type of therapy was observed in 20 (37,7%) patients, больных, in 70% from them the rate of chromosome disorders was higher than discrimination one and average and background rate of Xp-disorders exceeded in 8 times than in healthy people. Rates of cytogenetic changes (from 6,0 to 9,2%) in lymphocyte of patients with different therapeutic effect except rate of Xp-disorders in patients with process progressing (16,4%,  $p < 0,05$ ).

Operative treatment has been conducted in 162 patients with OS (the 3<sup>rd</sup> group). Organs- saving operations have been performed in 94 patients. Positive effect was noted in 69,1% (65) patients with average background rate of Xp-disorders 5% less and 4,5 times exceeding this index in healthy people. Effect absence was observed in 30,9% patients with average background rate of Xp-disorders 7 times higher than in healthy people. Crippling operations have been conducted in 68 patients at inefficiency of chemotherapy and/or chemoradiotherapy. In such patients group at progressing of tumor process background rate of Xp-disorders was 1,5-2 higher than in patients with full effect from performed therapy.

General 3 and 5 years survivability of patients with OS at Xp-disorders is higher than discrimination one (5% higher) made up  $78,7 \pm 2,7\%$  and  $21,3 \pm 2,7\%$  correspondingly and at low (5% lower) –  $82,2 \pm 3,1\%$  and  $67,8 \pm 3,1\%$ .

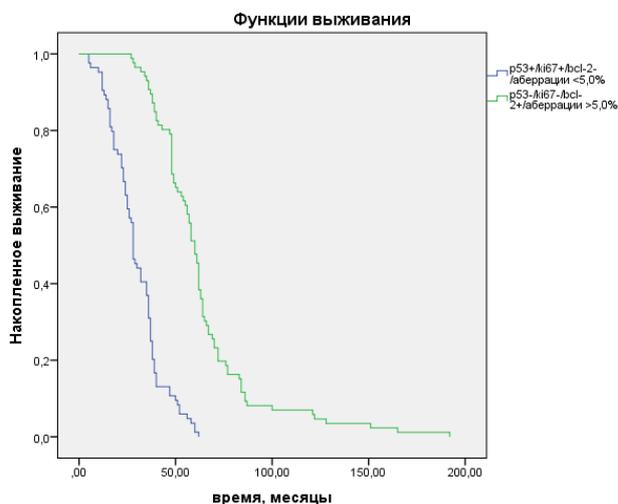
For prediction tumors clinical course and choice of treatment tactics immunohistochemical markers of proliferation and apoptosis are important prognostic indexes. In the samples of tumor tissue fixed by neutral formalin and pouring into paraffin there were defined oncomarkers of proliferation and apoptosis– p53, bcl-2, Ki 67. Among patients (the 1<sup>st</sup> group) who received systemic chemotherapy full effect was observed in 13% patients. With negative and weak positive IHC reactions on mtp53 mutant gene and Ki 67 were 70,6% among them and with moderate and strong expression bcl-2 (80%). Partial treatment effect was in patients with tumor cell phenotype having negative or weak positive IHC reactions on mtp53 mutant gene (58,5%), weak positive expression Ki67 (70,6%), high expression bcl-2 (46,4%). In 37,4% patients from this group therapy effect was negative.

In the second group CIARCT full and partial effects from conducted therapy were noted in 73,6% patients, in 66,7% among them tumor cells were mtp53 negative with moderate and low expression of Ki-67 gene and with moderate and high reaction for bcl-2. In 35,8% patients after performing that therapy effect was negative, in 73,7% of them phenotype of tumor cells had combination consisting from cells with high expression of mutant mtp53 and Ki-67 genes and also low expression of bcl-2 gene. In the 3<sup>rd</sup> group (42 patients were performed radiotherapy) with positive effect were 56% patients, and with weak or absence of mutant mtp53 gene among them were 75% and only in 12,5% it was revealed moderate expression of this protein. Expression of Ki-67 genes was also weak or absent in majority of patients (88,8%), and expression of bcl-2 in patients with positive treatment effect in this group was high and moderate.

Analysis of 1, 3 and 5 years survivability of all examined patients with OS showed that 1 year survivability was observed in 39,37% (87) patients. Therefore criteria of unfavourable prognosis of OS are: characteristics of medical pathomorphism (revelation of I-II stages), chromosomes aberration rate in peripheral blood lymphocytes in patients with OS higher than discrimination one (5%), mutant p53 gene expression, absence of bcl-2 expression, Ki-67 expression, low differentiation of tumor cells.

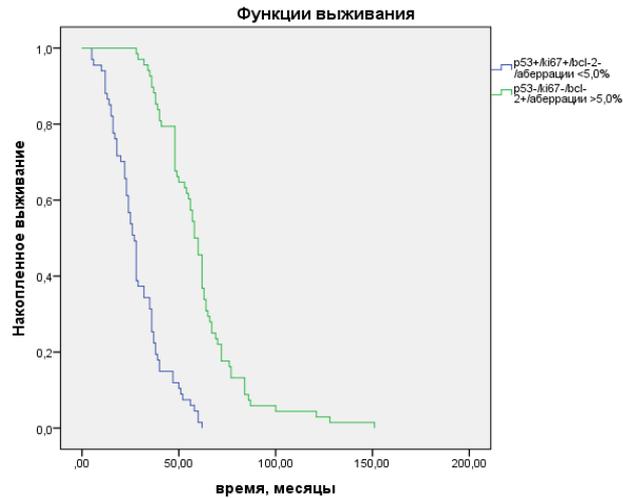
Analysis of conducted treatment efficiency in 221 patients showed that full disappearance of pain syndrome at palpated tumor and full recovery of extremity function was observed in 13 (5,9%) patients in who phenotype had the following set of biomarkers– mtp53<sup>-</sup>, bcl-2<sup>+</sup>, Ki67<sup>-</sup>, XA<5%, this condition was estimated as full clinical response on PCT. Partial clinical response, decreasing of pain syndrome and tumor sizes and also improving extremity functions was noted in 84 (38,2%) with phenotypes mtp53<sup>-</sup>, bcl-2<sup>+</sup>, Ki-67<sup>-</sup>, XA<5% and mtp53<sup>-</sup>, bcl-2<sup>+</sup>, Ki-67<sup>-/+</sup>, XA<5%. In 96 patients (43,4 %) it has been observed condition's stabilization and phenotype was mtp 53<sup>-</sup>, bcl-2<sup>+/-</sup>, Ki67<sup>-/+</sup> and XA<5%. Process progressing - in 28 (11,8%) cases with phenotype mtp53<sup>+</sup>, bcl-2<sup>+/-</sup>, Ki 67<sup>-/+</sup> and XA>5%.

With the aim of study disease out come we have defined cumulative, non-metastasis and non-relapse survivability subject to combination of genetic tumor markers (p53, Ki-67, Bcl-2, chromosome aberration). Analysis results of cumulative survivability got by Caplan-Meyer's method due to expression rate of investigated oncomarkers (p53, bcl-2, Ki-67) showed that expression of mutant p53 gene in tumor cells 10% lower, Ki-67 – up to 20%, and bcl-2 20% higher (pict.9) and promotes increasing of survived patients share. Conducted statistical analysis showed that at combination of signs p53+/Ki-67+/Bcl-2-/rate of chromosome aberrations >5,0% indexes of 3 and 5 years survivability were lower (40,0±5,4% and 0% correspondingly) than at p53-/Ki-67-/Bcl-2+and chromosome aberrations <5,0%, indexes of 3 and 5 years survivability made up 90,0±2,9% and 40,0±4,2%, besides, there is a probability to patients with such phenotype to live up to 15 years (p<0,05).



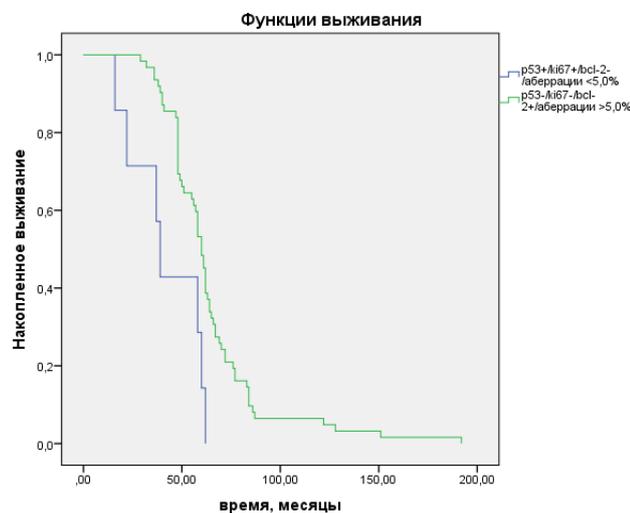
**Pict. 6. Cumulative share of survived patients with negative phenotype p53+/ki67+/bcl-2-/aberrations >5,0% (n=84) and positive phenotypes p53-/ki67-/bcl-2+/aberrations <5,0% (n=86).**

At analysis of non-relapse survivability of patients with negative phenotype p53+/Ki-67+/bcl-2-/ chromosome aberrations <5,0% indexes of 3 and 5 years survivability made up 60,0±4,9% and 10,0±3,4%, and at positive phenotype p53-/Ki-67-/Bcl-2+/ chromosome aberrations <5,0% indexes were 90,0±3,2% and 50,0%±4,2% (p<0,05).



**Pict. 7. Non-relapse share of survived patients with negative phenotypes p53+/ki67+/bcl-2-/aberrations>5,0% (n=67) and positive phenotype p53-/ki67-/bcl-2+/aberrations <5,0% (n=68)**

At study of non-metastasis survivability at negative phenotype p53+/Ki-67+/bcl-2-/ chromosome aberrations >5,0% 3 and 5 years survivability made up 70,0±3,4% and 10,0±3,2%, and at positive phenotype p53-/Ki-67-/bcl-2+/ chromosome aberrations <5,0% made up 90,0±3,4% и 50,0±4,3% (p<0,05) (pict.10).



**Pict. 8. Non-metastasis share Безметастатическая of survived patients with negative phenotypes p53+/ki67+/bcl-2-/aberrations>5,0%(n=7) and positive phenotype p53-/ki67-/bcl-2+/aberrations <5,0%(n=62)**

Represented results show that at positive expressions of p53+, Ki-67+ and chromosome aberrations >5% prognosis was unfavourable and at the absence of expression of p53, Ki-67, bcl-2+ chromosome aberrations <5% prognosis was favourable.

Investigations of some authors and our data testify that study of expression of mutant gene-suppressor p53 chromosome instability are the most informative prognostic factors at osteosarcoma.

Conducted investigations showed that on disease prognosis at OS only 15 from 131 clinical-radiologic, morphologic, immunologic, cytogenetic and molecular-genetic signs which had correlation with life span have significantly impacted. Conducted one-factor analysis with study 3 and 5 years survivability among patients with OS and also correlation between cumulative, non-metastasis, non-relapse survivability with tumor phenotype and at combination of different genetic tumor markers (p-53, Bcl-2, Ki-67, chromosome aberrations).

It has been detected that at positive expressions of p53+Ki-67+ and negative indexes of bcl-2-, at the rate of chromosome aberrations 5% higher patients had unfavourable prognosis. Additional prognostic signs are IL-2 and IL-10 and also VEGF-A angiogenesis factor. All these factors are necessary to be taken into account at definition of prognosis and choice of treatment schemes, combination of these signs in patients with OS can play an important role at individualization of treatment tactics and at prescribing target medicines.

## CONCLUSION

1. Applying up-to-date methods of morphologic, molecular-genetic, immunohistochemical investigations for growth, development and progressing of osteosarcoma allowed to reveal close correlation between early development of relapses, distant metastasis, osteosarcoma differentiation rate, revelation of its medical pathomorphism, tumor volume, oncomarkers expression rate ( $R = 0,886 - 0,380$ ).

2. Conducted analysis showed that in patients at the absence of treatment effect background indexed of chromosome aberrations were higher than discrimination one ( $>5\%$ ), it is 4,8 times higher than in healthy people ( $8,2 \pm 0,9\%$  in compare with  $1,7 \pm 0,3\%$ ) and 2,7 times higher than in peoples with good clinical effect ( $p < 0,05$ ).

3. It has been defined that nature of apoptosis markers expression (p53 and bcl 2) and proliferation (Ki-67), participating in regulation of cellular cycle and revealed in tumor cells of patients with OS is prognostic criteria in estimation of this disease clinical course.

4. Phenotype of patients having the following set of biomarkers mtp  $53 < 10\%$ , bcl 2  $> 10\%$ , Ki 67  $< 20\%$ , XA  $< 5\%$  was revealed at the condition estimating as full clinical response for PCT.

5. It has been defined that partial clinical response for PCT had those patients who had two variants of phenotype mtp  $53 < 10\%$ , bcl 2  $> 10\%$ , Ki 67  $< 20\%$ , XA  $< 5\%$  and mtp  $53 < 10\%$ , bcl 2  $> 10\%$ , Ki 67  $> 20\%$ , XA  $< 5\%$ .

6. In patients with phenotype mtp  $53 > 10\%$ , bcl 2  $> 10\%$ , Ki 67  $> 20\%$ , XA  $> 5\%$  progressing of tumor process has been revealed.

7. Imbalance of T-lymphocytes subpopulation has been detected. Decrease of immunoregulation index from 0.4 to 1.1 (in norm from 1.5 to 2.0) has been noted and it is an index of immune reaction inadequacy.

8. It has been revealed that twofold increase of serum concentration of pro-inflammatory cytokines such as IL-1 $\beta$  TNF- $\alpha$  in patients with osteosarcoma (8.7 pg/ml and 6.3 pg/ml correspondingly), in compare with norm (4.3 pg/ml and 2.6 pg/ml correspondingly  $p < 0,05$ ).

9. It has been defined high spontaneous production of anti-inflammatory cytokines (IL-10 and IL-6). So, IL-10 was increased in 1,3 times (9,35 pg/ml and 7,2 pg/ml correspondingly) and IL-6 23 times (79,4 pg/ml and 3,4 pg/ml) higher than control figures ( $p < 0,05$ ).

10. It has been defined that serum concentration of vessels endothelium growth factor (VEGF) in patients with OS was higher in 14,3 times in compare with control group data ( 520,2 pg/ml and 36,3 pg/ml;  $p < 0,05$ ). It was especially expressed in patients group with high risk of metastasis and tumor progression.

**ЭЪЛОН КИЛИНГАН ИШЛАР РУЙЎАТИ**  
**СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ**  
**LIST OF PUBLISHED WORKS**

**I часть (I бўлим; I part)**

1. Полатова Д.Ш., Гафур-Ахунов М.А., Гильдиева М.С., Хаитов Ф.Э., Исламов У.Ф. Количественное исследование маркеров апоптоза при остеогенной саркоме. // Журнал клинической и теоретической медицины. - Ташкент, 2008 - № 4.- С. 96-99 (14.00.00, № 3).
2. Полатова Д.Ш., Гафур-Ахунов М.А., Гильдиева М.С., Хаитов Ф.Э. Каримова Н.М., Урунбаев С.Д. Определение маркеров пролиферации и апоптоза в опухолевых клетках при остеогенной саркоме у детей и подростков. // Медицинский журнал Узбекистана. - Ташкент, 2008 - № 5.- С. 14-16 (14.00.00, № 8).
3. Гафур-Ахунов М.А., Полатова Д.Ш., Мустафаев Т.К., Хаитов Ф.Э., Каримова Н.М., Нишанов Д.А., Гильдиева М.С., Абдурахмонов Д.А. Иммуногистохимическое исследование в диагностике и лечении остеогенной саркомы у детей. // Медицинский журнал Узбекистана. - Ташкент, 2009 - №1.- С. 32-34 (14.00.00, № 8).
4. Полатова Д.Ш., Гафур-Ахунов М.А., Гельдиева М.С. Цитогенетические изменения в лимфоцитах периферической крови в оценке эффективности лечения больных с остеогенной саркомой. // Российский онкологический журнал. - Москва, 2010 - №3. - С.16-18 (14.00.00, № 196).
5. Наврузов С.Н., Полатова Д.Ш., Гафур-Ахунов М.А., Абдикаримов Х.Г. Значение маркерных белков p53, bcl-2, Ki-67 в прогнозировании эффективности терапии при остеогенной саркоме трубчатых костей // Вопросы онкологии. – СПб, 2012 - №5. - С. 691-693 (14.00.00, № 56).
6. Наврузов С.Н., Полатова Д.Ш., Гильдиева М.С., Нуриева Э.И. Возможности изучения основных цитокинов иммунной системы у больных с остеогенной саркомой. // Вопросы онкологии. - СПб, 2013. - №5. - С. 599-602 (14.00.00, № 56).
7. Полатова Д.Ш., Гильдиева М.С., Нуриева Э.И., Абдикаримов Х.Г. Состояние иммунореактивности у больных с остеогенной саркомой на фоне проведения химиотерапии. // Журнал клинической и теоретической медицины. - Ташкент, 2013 - № 4. - С. 118-122 (14.00.00, № 3).
8. Наврузов С.Н., Полатова Д.Ш., Абдикаримов Х.Г., Гельдиева М.С., Исламов У.Ф., Урунбаев С.Д. Изучение роли молекулярно-биологических маркеров при остеогенной саркоме. // Журнал клинической и теоретической медицины. - Ташкент, 2014 - № 3(1). - С. 210-214 (14.00.00, № 3).
9. Абдикаримов Х.Г., Гафур-Ахунов М.А., Исламов У.Ф., Полатова Д.Ш., Урунбаев С.Д., Давлетов Р.Р., Султонов Б.Б. Результаты эндопротезирования в лечении опухолей длинных трубчатых костей. Вопросы онкологии. СПб, 2013г., №3, С.-1042. (14.00.00, № 56).

10. Наврузов С.Н., Полатова Д.Ш., Абдикаримов Х.Г., Нишанов Д.А. Характеристика основных цитокинов иммунной системы в зависимости от особенностей клинического течения остеогенной саркомы // Журнал клинической и теоретической медицины. - Ташкент, 2015 - № 4. - С. 218-224 (14.00.00, № 3).
11. Гафур-Ахунوف М.А., Полатова Д.Ш., Наврузов С.Н., Гельдиева М.С. Изучение молекулярно-биологических маркеров в лечении остеосаркомы // Журнал клинической и теоретической медицины. - Ташкент, 2015 - № 5. - С. 131-136 (14.00.00, № 3).
12. Navruzov S.N., Polatova D.Sh., Gafur-Akhunov M.A., Gildiyeva M.S., Abdikarimov Kh.G., Nishanov D.A. Characterisation of basic cytokines of the immune system depending on peculiarities of a clinical course of osteosarcoma // American Journal of Medicine and Medical Sciences. 2015, 5 (5). - P 264-271 (14.00.00, № 2).
13. Наврузов С.Н., Полатова Д.Ш. Молекулярно-генетическая диагностика в изучении инициации и прогрессии при остеогенной саркоме // Журнал клинической и теоретической медицины. - Ташкент, 2016 - № 1. - С. 6-10 (14.00.00, № 3).

### **II часть (II бўлим; II part)**

14. Исломов У.Ф. Абдукаримов Х.Г., Полатова Д.Ш. Устройство эндопротезирования диафиза костей. // Агентство по интеллектуальной собственности Республики Узбекистан, Патент на полезную модель РУз. 17.10.13г., № FAP 00851.
15. Наврузов С.Н., Полатова Д.Ш., Гафур-Ахунوف М.А., Гильдиева М.С. Программа для прогнозирования течения заболевания в зависимости от экспрессии генов и хромосомных аберраций при остеосаркоме после противоопухолевой терапии. Агентство по интеллектуальной собственности Республики Узбекистан, 24.11.2015г. № DGU 20150350.
16. Полатова Д.Ш. Программа для определения результатов противоопухолевого лечения при остеосаркоме. Агентство по интеллектуальной собственности Республики Узбекистан, 24.11.2015г.
17. Polatova D.Sh., Gildieva M.S., Abdikarimov Kh.G. Changes of immunoreactivity status in patients with osteosarcoma on the background of chemotherapy. // Journal of Health Science. New York, July 2014. – Vol. 2, №7- P.318-324.
18. Polatova D.SH., Gafur-Ahunov M.A. Gildiyeva M.S. Gene –suppressor p-53 in diagnostics and treatment of osteogenic sarcoma. // AVICENA – printed in Germany. Heft 2, Jahrgang 2011, С. - 58-64
19. Polatova D.Sh. Evaluation of efficiency of the treatment of patients with osteogenic sarcoma in dependence on the changes in the peripheral blood lymphocytes. // Итало-российская конференция. Spoleto-Italiya, 2010 – P. 241-245

20. Gafur-Akhunov M.A., Gildieva M.S., Polatova D., Abdikarimov H.G., Khoiyitov F.E., Karimova N.M. Molecular-genetic characteristics of tumor cells in osteogenic sarcoma in children and adolescents // Италo-российская конференция. Spoleto-Италиya, 2010 – P. 241-245
21. Polatova D.Sh., Gafur-Akhunov M.A., Gildieva M.S., Abdikarimov Kh.G., Islamov U.F., Urunbayev S.D. Main cytokines of immune system at patients with osteogenic sarcoma // International Conference on European Science and Technology. - Munich.Germane, 2013, -Vol. II, P.221-223.
22. Abdikarimov H.G., Polatova D.Sh., Islamov U.F., Urunbayev S.D., Davletov R.A. Comparative results of chemotherapy of osteosarcoma metastasis in lungs comparative results of chemotherapy of osteosarcoma metastasis in lungs. // ICACT 24<sup>th</sup> International Congress on anti-cancer treatment. Paris, France, – 2013. - P. 350.
23. Polatova D.Sh., Gafur-Akhunov M.A., Geldieva M.S. Tumor markers and their prognostic value in the choice of treatment of osteogen sarcoma. // ICACT 23<sup>rd</sup> International Congress on anti-cancer treatment. Paris, France, 2012. - P. 329.
24. Polatova D.SH. Clinical significance of markers of proliferation and apoptosis in tumour cells by estrogenic sarcoma. // ICACT 23<sup>rd</sup> International Congress on anti-cancer treatment. Paris, France, 2012. - P. 326-327.
25. Polatova D.Sh., Gafur-Akhunov M.A., Geldieva M.S. Karimova N.M., Haitov F. Prognostic value of apoptosis markers at osteogen sarcoma. // ICACT 23<sup>rd</sup> International Congress on anti-cancer treatment. Paris, France, 2012. - P. 330.
26. Hayitov F., Gafur-Akhunov M.A., Mustafaev T., Polatova D.Sh. Results of immunogenetik and molecular-genetic methods of investigation in malignant tumors in children. // ICACT 23<sup>rd</sup> International Congress on anti-cancer treatment. Paris, France, 2012. - P. 314.
27. Gafur-Akhunov M.A., Gildieva M.S., Polatova D., Abdikarimov H.G. Of the expression of BCl-2 gene in osteogen sarcoma. // Emsos. Stuttgart, Germany, 2009, P. 271.
28. Gafur-Akhunov M.A., Polatova D.Sh., Gildieva M.S. Morphological and immunohistochemical aspects of osteogenous sarcoma // Antalya, Turkey, 2009. abstract 65.
29. Gafur-Akhunov M.A., Polatova D.SH., Khayitov F. Molecular genetics profile of estrogen tubular sarcoma in children and teenagers. // Annals of Oncology.- Milan, 2010.- vol.21. №8. P.536.
30. Urunbayev S.D., Gafur-Akhunov M.A., Polatova D.SH., Abdikarimov Kh.G. Prolonged intra-arterial regional chemotherapy of osteosarcoma of long-tubular bones of lower extremities. // ESMO 36 The 2011 European Multidisciplinary Cancer Congress. Stockholm, 2011. book of abstracts S 669.
31. Polatova D.Sh, Abdikarimov H.G., Urunbayev S.D. Clinical Value of proliferation and apoptosis markers in osteogenic sarcoma tumor cells. // 22nd Biennial Congress of the European Association for Cancer Research. Barselona, Spain, 2012. - S26, №107.

32. Polatova D. Sh, Abdikarimov H.G., Urunbayev S.D. Specific gene toxicity of tumor cells in patients with osteogenic sarcoma. // 22nd Biennial Congress of the European Association for Cancer Research: Barselona. Spain, 2012, S26, P. 107.
33. Urunbayev S.D, Abdikarimov Kh.G., Polatova D.Sh. Serum factors of angiogenesis and the growth of fibroblasts in osteogenic sarcoma. // 39 th ESMO Congress (ESMO 2014). Madrid, Spain, 2014. vol.25, №4, P.1459.
34. Abdikarimov Kh.G., Gafur-Akhunov M.A., Polatova D.Sh., Islamov U.F., Urunbayev S.D., Davletov R.A. Cytokine spectrum of patients with osteosarcoma. // 26<sup>th</sup> European musculoskeletal Oncology society meeting. 14th Nurse allied professions grout meeting. Gothenburg, Sweden, 2013. - P.
35. Polatova D.Sh, Urunbayev S.D., Nasritdinov S.D., Sadriddinov Sh.O. Endoprothesis in treatment of bone tumors. // Fist korean-uzbek scientific medical seminar. Tashken, 2012.C 58.-59.
36. Abdikarimov Kh., Urunbaev S., Polatova D., Islamov U. Modified treatment of osteosarcoma. // 26th ICACT International Congress on Anti-Cancer Tretment. Paris, France, 2015. P. 326.
37. Abdikarimov Kh., Polatova D., Urunbaev S., Islamov U. Immunological characteristic of patients with osteosarkoma. // 26th ICACT International Congress on Anti-Cancer Tretment. Paris, France, 2015. P. 326.
38. Polatova D.Sh., Gafur-Akhunov M, A., Abdikarimov Kh.G., Urunbayev S.D. Analysis of clinical manifestations and diagnostic signs of osteosarcoma with lung metastases. // 22nd Biennial Congress of the European Association for Cancer Research. Barselona, Spain, 2012, S269, №1120.
39. Polatova D.Sh., Gildieva M.S., Gafur-Akhunov M.A., Abdikarimov Kh.G. Prognostic value of apoptosis markers in osteogenetic sarcoma. // EMSOS 2010, 5-7 may, Bermingham ,England, 2010, book of abstracts 32.
40. Abdikarimov Kh., Gafur-Akhunov M.A., Islomov U.F., Polatova D.Sh., Urinbayev S.D., Davletov R.A. Endoprotheses of proximal part of humerus after tumor resection. // 27<sup>th</sup> EMSOS meeting. Vienna, Austria, 2014. P15:110.
41. Abdikarimov Kh., Gafur-Akhunov M.A., Islomov U.F., Polatova D.Sh., Urinbayev S.D., Davletov R.A, sultanov B.B. Replacement of large joints in treatment of bone tumors. // 27<sup>th</sup> EMSOS meeting. Vienna, Austria, 2014. P15:111.
42. Полатова Д.Ш. Маркеры клеточного цикла и генетические изменения при остеогенной саркоме. // Онкология и радиология Казахстана. - Алматы, 2010.- №3-4 (16-17), - С.37.
43. Гафур-Ахунов М.А., Полатова Д.Ш., Нишанов Д.А., Хайтов Ф.Э., Каримова Н.М. Молекулярно-генетический профиль остеогенной саркомы трубчатых костей у детей и подростков. // Онкология и радиология Казахстана. - Алматы, 2010.- №3-4 (16-17), - С.159.
44. Гофур-Ахунов М.А., Абдикаримов Х.Г., Полатова Д.Ш., Исломов У.Ф. Факторы, влияющие на рецидивирование после органосохранных операций при опухолях трубчатых костей. // XI съезд онкологов Украины: Киев.-2006.- С. 223.

45. Гафур-Ахунов М.А., Полатова Д.Ш., Абдикаримов Х.Г., Нишонов Д.А., Гильдиева М.С., Наврузов С.Н. Иммунодиагностика при остеогенной саркоме. // XI Российский онкологический конгресс: Москва, 2007. - С.171 - 172.
46. Полатова Д.Ш. Цитогенетические изменения и маркеры клеточного цикла при остеогенной саркоме. // XI Российский онкологический конгресс: Москва, 2007. - С.174-175.
47. Гильдиева М.С., Полатова Д.Ш., Гафур-Ахунов М.А., Каримова Н.М., Хаитов Ф.Э. Иммуногистохимическая характеристика остеосаркомы у подростков. // XI Российский онкологический конгресс: Москва, 2007. - С.135.
48. Гафур-Ахунов М.А., Полатова Д.Ш., Абдикаримов Х.Г., Урунбаев С.Д. Органосохраняющие операции при опухолях длинных трубчатых костей нижней конечности. // XI Российский онкологический конгресс: Тез. докладов. - Москва, 2007. - С.166.
49. Полатова Д.Ш. Остеогенная саркома и маркеры пролиферации апоптоза. // XI Российский онкологический конгресс: Москва, 2007. - С.169.
50. Гафур-Ахунов М.А., Абдикаримов Х.Г., Полатова Д.Ш., Исломов У.Ф., Урунбаев С.Д., Дустов Ш.Х. Эндопротезирование крупных суставов в комплексном лечении опухолей длинных трубчатых костей. // V съезд онкологов и радиологов СНГ: Ташкент, 2008. - С. 339.
51. Полатова Д.Ш., Гильдиева М.С., Гафур-Ахунов М.А., Абдикаримов Х.Г. Прогностическое значение маркеров апоптоза при остеогенной саркоме. // XII Российский онкологический конгресс: Москва, 2009.- С.304.
52. Гафур-Ахунов М.А., Усмонов И.Х., Абдикаримов Х.Г., Исламов У.Ф., Полатова Д.Ш., Урунбаев С.Д. Тактические ошибки в лечении остеогенной саркомы трубчатых костей. // VI съезд онкологов и радиологов СНГ: Душанбе, 2010. - С.217.
53. Полатова Д.Ш., Гильдиева М.С., Гафур-Ахунов М.А. Уровень хромосомной нестабильности и экспрессия опухолевых маркеров при лечении остеогенной саркомы. // Петровские чтения – 2010:Тез.докл.6-й Российской конф. по фундаментальной онкологии. - СПб, 2010. - С. 33.
54. Гафур-Ахунов М.А., Абдикаримов Х.Г., Урунбаев С.Д., Полатова Д.Ш., Исламов У.Ф. Влияние неадьювантной химиотерапии на выживаемость больных с остеогенной саркомой нижней конечности. // VII съезд онкологов и радиологов стран СНГ: Астана, 2012. - С - 432.
55. Абдикаримов Х.Г., Полатова Д.Ш., Урунбаев С.Д. Эффективность химиолучевой терапии метастазов остеогенной саркомы в легкие. // VII съезд онкологов и радиологов стран СНГ: Астана, 2012. - С - 242.
56. Абдикаримов Х.Г., Исламов У.Ф., Полатова Д.Ш., Урунбаев С.Д., Давлетов Р.Р., Султонов Б.Б. Органосохранное хирургическое лечение при метастатическом поражении длинных костей. // VIII-съезд онкологов и радиологов стран СНГ и Евразии. - Евроазиатский онкологический журнал: Тез.докл. Казань, 2014.- №3.- С.- 633.

57. Абдикаримов Х.Г., Исламов У.Ф., Полатова Д.Ш., Урунбоев С.Д., Давлетов Р.Р., Султонов Б.Б. Новый способ хирургического лечения при опухолях диафиза длинных костей. // VIII-съезд онкологов и радиологов стран СНГ и Евразии. - Евроазиатский онкологический журнал: Казань, 2014.- №3.- С.- 633.

58. Полатова Д.Ш., Гильдеева М.С., Абдикаримов Х.Г., Исламов У.Ф., Урунбоев С.Д. Молекулярно-биологические и генетические маркеры, их роль в диагностике, лечении и прогнозе остеогенной саркомы. // VIII-съезд онкологов и радиологов стран СНГ и Евразии. - Евроазиатский онкологический журнал: Казань, 2014.- №3.- С.- 653-654.