

**ТОШКЕНТ ТИББИЁТ АКАДЕМИЯСИ ҲУЗУРИДАГИ ИЛМИЙ
ДАРАЖАЛАР БЕРУВЧИ DSC.27.06.2017.Tib.30.02 РАҚАМЛИ ИЛМИЙ
КЕНГАШ АСОСИДАГИ БИР МАРТАЛИК ИЛМИЙ КЕНГАШ**

**ГЕМАТОЛОГИЯ ВА ҚОН ҚУЙИШ ИЛМИЙ ТЕКШИРИШ
ИНСТИТУТИ**

АЛЛАНАЗАРОВА БАХТИГУЛ РАХМАНКУЛОВНА

**СУРУНКАЛИ МИЕЛОПРОЛИФЕРАТИВ КАСАЛЛИКЛАРДА
ЦИТОГЕНЕТИК ЎЗГАРИШЛАРНИ ДИАГНОСТИК ВА
ПРОГНОСТИК АҲАМИЯТИ**

14.00.29 – Гематология ва трансфузиология

**Биология фанлари бўйича фалсафа доктори (PhD) диссертацияси
АВТОРЕФЕРАТИ**

ТОШКЕНТ – 2020

Фалсафа (PhD) доктори диссертацияси автореферати мундарижаси

Оглавление автореферата диссертации доктора философии (PhD)

Contents of dissertation abstract of doctor of philosophy (PhD)

Алланазарова Бахтигул Рахманкуловна

Сурункали миелопролифератив касалликларда цитогенетик
ўзгаришларни диагностик ва прогностик аҳамияти..... 3

Алланазарова Бахтигул Рахманкуловна

Диагностическое и прогностическое значение цитогенетических
изменений при хронических миелопролиферативных заболеваниях..... 19

Allanazarova Bakhtigul Rakhmankulovna

Diagnostic and prognostic value of cytogenetic changes in chronic
myeloproliferative diseases..... 35

Эълон қилинган ишлар рўйхати

Список опубликованных работ
List of published works..... 39

**ТОШКЕНТ ТИББИЁТ АКАДЕМИЯСИ ҲУЗУРИДАГИ ИЛМий
ДАРАЖАЛАР БЕРУВЧИ DSC.27.06.2017.Tib.30.02 РАҚАМЛИ ИЛМий
КЕНГАШ АСОСИДАГИ БИР МАРТАЛИК ИЛМий КЕНГАШ**

**ГЕМАТОЛОГИЯ ВА ҚОН ҚУЙИШ ИЛМий ТЕКШИРИШ
ИНСТИТУТИ**

АЛЛАНАЗАРОВА БАХТИГУЛ РАХМАНКУЛОВНА

**СУРУНКАЛИ МИЕЛОПРОЛИФЕРАТИВ КАСАЛЛИКЛАРДА
ЦИТОГЕНЕТИК ЎЗГАРИШЛАРНИ ДИАГНОСТИК ВА
ПРОГНОСТИК АҲАМИЯТИ**

14.00.29 – Гематология ва трансфузиология

**Биология фанлари бўйича фалсафа доктори (PhD) диссертацияси
АВТОРЕФЕРАТИ**

ТОШКЕНТ – 2020

Фалсафа доктори (PhD) диссертацияси мавзуси Ўзбекистон Республикаси Вазирлар Маҳкамаси ҳузуридаги Олий Аттестация комиссиясида В2019.1.PhD/B283 рақами билан рўйхатга олинган.

Диссертация гематология ва қон қуйиш илмий текшириш институти бажарилган.

Диссертация автореферати уч тилда (ўзбек, рус, инглиз (резюме)) Илмий кенгаш веб-саҳифасида (www.tma.uz) ва «Ziyonet» ахборот-таълим порталида (www.ziyonet.uz) жойлаштирилган.

Илмий раҳбар:	Бобоев Қодиржон Тўхтабоевич тиббиёт фанлари доктори, профессор
Расмий оппонентлар:	Бабажанова Шоира Агзамовна тиббиёт фанлари доктори, профессор Гильдиева Маргарита Сабировна биология фанлари доктори
Етакчи ташкилот:	Самарқанд давлат тиббиёт институти

Диссертация ҳимояси Тошкент тиббиёт академияси ҳузуридаги DSc.27.06.2017.Tib.30.02 рақамли Илмий кенгаш асосидаги Бир марталик Илмий кенгашнинг 2020 йил «___» _____ соат _____ даги мажлисида бўлиб ўтади. (Манзил: 100109 Тошкент, Олмазор тумани, Фаробий кўчаси 2-уй. Тел./факс: (+998 78) 150-78-25, e-mail: tta2005@mail.ru).

Диссертация билан Тошкент тиббиёт академияси Ахборот-ресурс марказида танишиш мумкин (___ рақам билан рўйхатга олинган). Манзил: 100109, Тошкент шаҳри, Олмазор тумани, Фаробий кўчаси 2-уй. Тел./факс: (99878) 150-78-14.

Диссертация автореферати 2020 йил «___» _____ куни тарқатилди.
(2020 йил «___» _____ даги _____ рақамли реестр баённомаси)

А. Г. Гадаев

Илмий даражалар берувчи Илмий кенгаш асосидаги Бир марталик илмий кенгаш раиси, тиббиёт фанлари доктори, профессор

Д. А. Набиева

Илмий даражалар берувчи Илмий кенгаш асосидаги Бир марталик илмий кенгаш илмий котиби, тиббиёт фанлари доктори

Р.С. Мухамедов

Илмий даражалар берувчи Илмий кенгаш асосидаги Бир марталик илмий семинар раиси, биология фанлари доктори, профессор

КИРИШ (Фалсафа доктори (PhD) диссертацияси аннотацияси)

Диссертация мавзусининг долзарблиги ва зарурияти. Бугунги кунда, дунёда сурункали миелопролифератив касалликлар патогенезини ўрганишга бўлган кизиқиш ортиб бормоқда. Сурункали миелопролифератив неоплазиялар (СМПН) – қон ишлаб чиқариш тизими ўзак хужайраларининг генетик бузилиши билан кечади ва кўп сонли тадқиқотлар шуни кўрсатдики, хромосома абберрациялари СМПН патогенезида муҳим аҳамият касб этади. Бу борада стандарт цитогенетик текшируви (СЦТ) – хужайрадаги барча хромосомаларни ва улардаги бузилишларни аниқлай оладиган ягона амалий усул ҳисобланади. Онкогематологик касалликларда баъзи хромосома бузилишлари мустақил диагностик аҳамиятга эга, масалан, «...СЦТ ёрдамида аниқланадиган филадельфия (Ph) хромосомаси 9чи ва 22чи хромосомалар транслокацияси $t(9;22)(q34;q11)$, натижасида пайдо бўлиб, сурункали миелолейкоз касаллиги учун цитогенетик маркер ҳисобланади»¹.

Жаҳонда онкогематологик марказларда стандарт цитогенетик усул ёрдамида бир қанча янги хромосома абберрациялари аниқланмоқда ва генлар базасида қайд этилиб, уларнинг касаллик патогенезига таъсирини ўрганиш давом этмоқда. Ph-хромосома аниқланганда Ph-позитив (+), аниқланмаган ҳолатларда Ph-негатив (-) СМПН ташхиси қўйилади. Ph-(-) СМПН ташхислашда цитогенетик маркер бузилиш йўқ, лекин касаллик авж олиш олдидан бир қанча прогностик хромосома бузилишлари мавжуд бўлиб улар касаллик кечишини прогностлашда муҳим аҳамият касб этади. СМПНларда янги аниқланаётган ва кам учрайдиган хромосома аномалиялари, бундан ташқари Ph-(-) СМПН патогенезида *Jak2*, *MPL*, *CALR* каби драйвер генлар мутацияси учраш частотаси ва касаллик кечишига таъсирини тўлалича ўрганишни тақозо этмоқда.

Мамлакатимиз томонидан тиббиёт соҳасини ривожлантириш, турли хил касалликларни, жумладан гематологик касалликларда келиб чиқадиган асоратларни олдини олиш, уларни ривожланиш механизмларини бартараф этиш ва эрта даволаш-профилактика тадбирларини самарали ўтказишга қаратилган қатор вазифалар юклатилган. «Соғлиқни сақлаш тизимини тубдан такомиллаштириш бўйича комплекс чора-тадбирлар тўғрисида»ги Фармонида «...мамлакатимизда аҳолига кўрсатилаётган тиббий ёрдамнинг самарадорлигини, сифатини ошириш ва оммабоплигини таъминлаш, шунингдек, тиббий стандартлаштириш тизимини шакллантириш, ташхис қўйиш ва даволашнинг юқори технологик усулларини жорий қилиш...»² каби вазифалар белгиланган. Бу борада қон касалликлари билан оғриган беморларга юқори технологияларни қўллаш орқали эрта ва тўғри ташхис қўйиш ва ўз вақтида таргет терапия ўтказиш муҳим аҳамият касб этмоқда.

Ўзбекистон Республикаси Президентининг 2017 йил 20 июндаги ПҚ-3071-сонли «Ўзбекистон Республикаси аҳолисига 2017-2021 йилларда

¹ Johansson B., Fioretos T., Mitelman F., 2019

² Ўзбекистон Республикаси президентининг 2018 йил 7 декабрдаги ПФ-5590-сон «Соғлиқни сақлаш тизимини тубдан такомиллаштириш бўйича комплекс чора тадбирлар тўғрисидаги» Фармони

ихтисослашган тиббий ёрдам кўрсатишни янада такомиллаштириш чора-тадбирлари тўғрисида»ги қарори, 4 апрел 2017 йилдаги ПФ-№2866 «2017-2021 йилларда онкологик хизмат ва Ўзбекистон Республикаси аҳолисига онкологик ёрдамни такомиллаштириш тўғрисидаги чора тадбирлар ҳақида»ги ва бошқа шу каби, соҳадаги амалга оширилаётган меъёрий-ҳуқуқий ҳужжатларда белгиланган вазифаларни амалга ошириш учун мазкур диссертация тадқиқоти муайян даражада хизмат қилади.

Тадқиқотнинг Республика фан ва технологиялари ривожланишининг устувор йўналишларига мослиги. Мазкур тадқиқот республика фан ва технологиялар ривожланишининг VI. «Тиббиёт ва фармакология» устувор йўналишига мувофиқ бажарилган.

Муаммонинг ўрганилганлик даражаси. Ҳозирги вақтда сурункали миелопролифератив касалликлардаги генетик ўзгаришларни ўрганиш дунёнинг кўплаб йирик илмий тадқиқот марказларида давом этмокда. Юқори технологик текширувларни қўллаш Ph(+)- ва Ph(-)-СМПН беморлар ўртасида аниқ фарқловчи диагностика ўтказиш имконини беради. Сурункали миелолейкоз ташхиси молекуляр генетик таҳлиллари асосида Ph-хромосома ва/ёки *BCR-ABL* химер гени аниқлангандагина қўйилади. Бундан ташқари, «...кариотиплаш СМПН ва қон ишлаб чиқариш тизими ҳужайраларининг бошқа ёмон сифатли миелоид ўсмаларни фарқлашда ҳам ўтказилади»³.

СМЛ беморлари кариотипида Ph-хромосомадан ташқари, касалликнинг ривожланиш характерини белгиловчи иккиламчи мутациялар ҳам учраши ва ушбу мутациялар касалликнинг бошланишида ёки унинг кейинги ривожланиш даврида аниқланиши мумкин. Бундай иккиламчи мутациялар касалликни кечиши ҳақида олдиндан билиш имконини беради бу эса ўз навбатида даволаш-профилактика чора тадбирларини мақсадли равишда амалга оширишга сабаб бўлади. Ph-негатив СМПН ҳолатларида маркер хромосома бузилиши йўқлиги сабабли кариотиплаш диагностик аҳамияти катта эмас, бироқ ушбу текширув беморларда патологик клонал гемопозни тасдиқлашда қўлланилиши зарур. Бундан ташқари, Ph-негативли сурункали миелопролифератив неоплазияларда пайдо бўладиган цитогенетик ўзгаришлар сурункали миелейкоз ҳолатидаги каби касалликнинг ривожланиш характерини аниқлаши ва бу ўзгаришлар яхши ёки ёмон прогностик аҳамиятга эга бўлиши мумкин.

Ўзбекистонда ҳозирги кунгача СМПНларда маркер ва маркер бўлмаган цитогенетик ўзгаришларни ўрганиш бўйича тадқиқотлар ўтказилмаган, чунки ушбу усул онкогематология амалиётига тадбиқ қилинганига унча кўп вақт бўлгани йўқ. Сурункали миелопролифератив касалликларда пайдо бўлувчи генетик ўзгаришлар ва уларнинг диагностик ва прогностик аҳамиятини ўрганиш Республикада ҳам тиббий, ҳам иқтисодий нуқтаи назардан муҳим аҳамиятга эга.

Тадқиқотнинг диссертация бажарилган илмий-тадқиқот муассасасининг илмий-тадқиқот ишлари режалари билан боғлиқлиги.

³ Arber D.A. Orazi, A.,2018

Диссертация тадқиқоти Гематология ва қон қуйиш илмий текшириш институтининг илмий-тадқиқот ишлари режасининг АДСС-14.6. «СМПК турларини верификацияси ва даволаш мониторингида ўсма хужайраларидаги ўзига хос генли ва хромасомали ўзгаришларни аниқловчи самарали янги молекуляр усуллари ишлаб чиқиш ва уларни такомиллаштириш» (2014-2017) мавзусидаги лойиҳаси доирасида бажарилган.

Тадқиқотнинг мақсади стандарт цитогенетик усулни такомиллаштириш, Ph-позитив ва Ph-негатив сурункали миелопролифератив неоплазияларда кузатиладиган маркер ва маркер бўлмаган хромосома абберрацияларининг диагностик ва прогностик аҳамиятини баҳолашдан иборат.

Тадқиқотнинг вазифалари:

стандарт цитогенетик текширув усулини такомиллаштириш асосида Ph-позитив ва Ph-негатив СМПНлар диагностикасида маркер, маркер бўлмаган (қўшимча ва кам учрайдиган) абберрацияларни учраш частотасини баҳолаш;

касалликнинг турли босқичларида цитогенетик текширувлар натижаларини, клиник-морфологик ва молекуляр-генетик текшируви маълумотлари билан солиштириш;

сурункали миелопролифератив неоплазияларда аниқланган хромосома абберрацияларни диагностик аҳамиятини ва касаллик кечишига таъсирини аниқлаш;

Ph-позитив ва Ph-негатив сурункали миелопролифератив неоплазиялар ташхисини аниқлаштириш ва касаллик кечишини прогностлаш учун цитогенетик алгоритм яратиш.

Тадқиқотнинг объекти сифатида гематология ва қон қуйиш илмий текшириш институтига даволаниш мақсадида мурожат қилган 529 нафар (429 та сурункали миелолейкоз, 39 та чин полицитемия, 24 та бирламчи миелофиброз, 9 та эссенциал тромбоцитемия ва 24 та тури номаълум сурункали миелопролифератив неоплазия) бемор олинган.

Тадқиқотнинг предмети сифатида СМПН беморлар периферик қони ва суяк қўмиги материаллари олинган.

Тадқиқотнинг усуллари. Тадқиқот жараёнида клиник-морфологик, стандарт цитогенетик, молекуляр-генетик (сифатий ва микдорий полимеразли занжирли реакция (ПЗР)) ва олинган маълумотларни таҳлил қилиш учун статистик усуллардан фойдаланилган.

Тадқиқотнинг илмий янгиллиги қуйидагилардан иборат:

Ўзбекистонда СМПН ташхисли беморларда маркер ва маркер бўлмаган цитогенетик бузилишларни спектри ва учраш частотаси аниқланган;

сурункали миелопролифератив неоплазиялар периферик қон клиник-морфологик кўрсаткичлари билан генетик бузилишлар ўртасидаги ассоциатив боғлиқлик аниқланган;

сурункали миелопролифератив касалликларда кузатиладиган периферик қоннинг бир қанча кўрсаткичлари жинсга, касаллик турига, босқичига ва қўшимча хромосома аномалияларига боғлиқлиги исботланган;

сурункали миелопролифератив неоплазияларда биринчи марта модификацияланган стандарт цитогенетик усул ёрдамида лейкоз жараёнига боғлиқ уникал ва кам учрайдиган кўшимча хромосома бузилишлари аниқланган.

Тадқиқотларнинг амалий натижалари қуйидагилардан иборат:

сурункали миелопролифератив касалликларда цитогенетик маркерларни текшириш учун классик кариотиплаш усули илк бор қўлланилган;

оптималлаштирилган стандарт цитогенетик текшириш усули ёрдамида миелоид қаторидаги хужайралар митотик индекси кўпайганлиги, метафаза пластинкаларида хромосома морфологияси яхшиланганлиги исботланган;

СМПН ташхисли беморларда маркер бўлмаган янги уникал хромосома бузилишлари аниқланган;

СМПН беморлар клиник-морфологик кўрсаткичлари ва цитогенетик таҳлил натижалари асосида тўғри ташхис қўйиш учун диагностик текширув алгоритми яратилган.

Тадқиқот натижаларининг ишончлилиги ўтказилган текширувлар услубий жиҳатдан тўғрилиги, етарли даражада беморлар тўпланганлиги қўлланилган усулларнинг мақсадга мувофиқлиги, уларга бири иккинчисини тўлдирадиган клиник-лаборатор, цитогенетик ва молекуляр-генетик ҳамда статистик усуллар қўлланилиши, хулоса ва олинган натижаларнинг ваколатли тузилмалар томонидан тасдиқлангани, натижаларнинг республика ва халқаро анжуманлардаги муҳокамаси ҳамда рецензияланган ҳорижий илмий нашрларда чоп этилиши билан изоҳланган.

Тадқиқот натижаларининг илмий ва амалий аҳамияти. Тадқиқот натижаларининг илмий аҳамияти Rh-позитив ва Rh-негатив СМПН беморларнинг периферик қони бир қанча кўрсаткичлари жинсга, касаллик босқичига, турига ва кўшимча хромосома аномалияларига боғлиқлиги аниқланган. Ўзбекистонда СМПН ташхисли беморларда маркер ва маркер бўлмаган цитогенетик бузилишларнинг спектри ва учраш частотаси аниқланган ва бу эса ўз навбатида касаллик кечишини олдиндан баҳоланиши билан изоҳланади.

Rh-позитив ва Rh-негатив СМПН беморларда илк марта модификацияланган стандарт цитогенетика усули қўлланилган ва унинг ёрдамида лейкоз жараёнига боғлиқ уникал ва кам учрайдиган кўшимча хромосома бузилишлари аниқланган. Олинган маълумотлар асосида сурункали миелопролифератив неоплазиялар дифференциал диагностикасида маркер ва маркер бўлмаган цитогенетик бузилишлар роли аниқланган ва унинг асосида СМПН беморлар диагностикасида эрта ва тўғри ташхис қўйишга хизмат қиладиган генетик текширувлар алгоритми яратилган.

Тадқиқот натижаларининг жорий қилиниши. Кариотиплашнинг стандарт ҳамда оптималлаштирилган усули Ўзбекистон Республикаси онкогематология соҳаси амалиётига жорий қилиниши бўйича олинган илмий натижалар асосида:

«Қон тизими касалликлари диагностикасида стандарт цитогенетик усул» услубий тавсияномаси тасдиқланган (Соғлиқни сақлаш вазирлигининг 2011

йил 12 майдаги 8н-д/78-сон маълумотномаси). Мазкур услубий тавсиянома қон касалликларида хромосома бузилишларини аниқлаш ва тўғри ташхис қўйиш имконини берган;

«Гемобластозларда модификацияланган стандарт цитогенетик усул» услубий тавсияномаси тасдиқланган (Соғлиқни сақлаш вазирлигининг 2019 йил 24 сентябрдаги 8н-р/372-сон маълумотномаси). Мазкур услубий тавсиянома асосида сурункали миелопролифератив неоплазиялар диагностикасида маркер ва маркер бўлмаган қўшимча ва вариантли хромосома аномалиялари аниқланган ва касаллик кечишини прогнозлаш имконини берган;

оптималлаштирилган кариотиплашнинг классик усули Қорақалпоғистон Республикаси, Нукус шаҳри, У. Халмуратов номидаги Республика кўп тармоқли тиббиёт марказида ҳамда Республика онкология ва радиология илмий марказида жорий қилинган (Соғлиқни сақлаш вазирлигининг 2019 йил 25 декабрдаги 8н-з/245–сон маълумотномаси). Натижада СМПНли беморларда даволашни ўтказиш ва дори воситалари таннари учун бўладиган сарф ҳаражатни 26%га қисқартириш имконини берган.

Тадқиқот натижаларининг апробацияси. Мазкур тадқиқот натижалари, 2та халқаро ва 4 та республика илмий амалий анжуманларида муҳокамадан ўтказилган.

Тадқиқот натижаларининг чоп этилганлиги.

Диссертация мавзуси бўйича ҳаммаси бўлиб 57 та иш чоп этилган бўлиб улардан 17 таси илмий мақолалар, шу жумладан, Ўзбекистон Республикаси Олий аттестация комиссияси томонидан тавсия қилинган республика илмий журналларида 16 та ва хорижий журналларда 1 та мақола чиқарилган, 35 та тезислар Республика ва хорижий давларларда чоп этилган конференция материаллари, 2 услубий тавсияномалар, 2 кўлланма, 1 услубий кўлланма.

Диссертациянинг тузилиши ва ҳажми. Диссертация таркиби қисқартмалар рўйхати, кириш, 4та боб (адабиётлар шарҳи, материаллар ва усуллар, 2 та боб тадқиқот натижаси ва уларнинг муҳокамаси), хулосалар, амалий тавсиялар, фойдаланилган адабиётлар рўйхати ва иловалардан иборат. Диссертациянинг ҳажми 118 бетни ташкил этади.

ДИССЕРТАЦИЯНИНГ АСОСИЙ МАЗМУНИ

Кириш қисмида ўтказилган тадқиқотларнинг долзарблиги ва зарурати, тадқиқотнинг мақсади ва вазифалари, объект ва предметлари тавсифланган, Ўзбекистон Республикаси фан ва технологиялари ривожланишининг устувор йўналишларига мослиги кўрсатилган, тадқиқотнинг илмий янгилиги ва амалий натижалари баён қилинган, олинган натижаларнинг илмий ва амалий аҳамияти очиқ берилган, тадқиқот натижаларини амалиётга жорий қилиш, нашр этилган ишлар ва диссертация тузилиши бўйича маълумотлар келтирилган.

Диссертациянинг «сурункали миелопролифератив неоплазияларнинг тиббий-биологик муаммолари аспекти» деб номланган биринчи

бобида СМПН муаммолари ҳар томонлама таҳлил қилиниб, мавжуд ҳолатга илмий нуқтаи назардан баҳо берилган. Мазкур бобда касаллик патогенезининг клиник-морфологик, биокимёвий, цитогенетик ва молекуляр-генетик механизмлари таҳлил қилинган ва замонавий текшириш усуллари ҳақида маълумотлар берилган. Сурункали миелопролифератив неоплазияларнинг келиб чиқиши, ривожланиши билан боғлиқ бўлган генетик маркерлар структураси, жойлашган ўрни ва фаолияти кўриб чиқилган.

Диссертациянинг «тадқиқот материали ва текширув усуллари» деб номланган иккинчи бобида тадқиқот объекти ва усуллари баён қилинган. Тадқиқотга олинган беморларнинг умумий сони (n=529) ва уларни таққослаш, гуруҳларга бўлиш тартиблари кўрсатилган. Тадқиқотга киритилган беморлар 2014-2018 йиллар давомида ЎзР ССВ гематология ва қон қуйиш илмий текшириш институтига биринчи марта ташхис қўйиш ва даволаниш мақсадида мурожат қилганлардан ташкил топган. Умумий 529та сурункали миелопролифератив неоплазия ташхиси қўйилган (429 нафари сурункали миелолейкоз, 39 нафари чин полицитемия, 24 нафари бирламчи миелофиброз, 9 нафари эссенциал тромбоцитемия ва 24 нафари тури номаълум СМПН) беморлар киритилди. Уларга ташхислар клиник-морфологик (периферик қон таҳлили ва миелограмма), стандарт цитогенетик (Ph-хромосома ва қўшимча хромосома аномалиялари) ва молекуляр генетик (BCR-ABL химер онкоген ва Jak2 ген мутацияси) текшируви натижалари асосида аниқлаштириб қўйилди.

Тадқиқот вазифаларига мувофиқ ва цитогенетик текширув натижаларига кўра СМПН беморлар дастлаб Ph(+) ва Ph(-) гуруҳларига бўлинди. Молекуляр-генетик текширувларга кўра Ph(+)- ва Ph(-) ташхиси қўйилган беморлар кўзда тутилган мақсад ва бажариладиган вазифаларга кўра яна бир қанча гуруҳчаларга ажратиб ўрганилди. Тадқиқотга танланганларнинг барчасида 529 нафаридида цитогенетик таҳлил ўтказилди. Стандарт цитогенетик таҳлили учун биоматериал сифатида беморлар илик қўмиги хужайралари ва бўлинишга қодир периферик қон хужайралари олинди. Цитогенетик таҳлилни қуйидаги босқичлари мавжуд: биоматериал олиш, олинган биоматериални озиқа муҳитига экиш, метафаза босқичига келган хужайраларини ўсишини тўхтатиш, гипотонизациялаш, фиксациялаш, фиксацияланган хужайра суспензиясини буюм ойнасига томизиш ва уларни мақсадли бўйлаш, метафаза пластинкаларини микроскопда излаш ва уларни расмга олиш, цитогенетик таҳлил ва натижаларни интерпретация қилиш. Тадқиқот учун қўйилган вазифалар асосида, модификацияланган классик цитогенетик усул ишлаб чиқилди ва амалиётга тадбиқ қилинди. Стандарт цитогенетик таҳлил модификацияси хужайраларни метафаза босқичида бўлинишини тўхтатиш, гипотонизациялаш, фиксациялаш ва хромосома препаратларини тайёрлаш босқичларини ўз ичига олган.

Кариотиплаш «АХЮ Score.A1, Zeiss» микроскопи ёрдамида «ВидеоТесТ» Карио 3.1 махсус компьютер дастур орқали амалга оширилди. Сурункали миелопролифератив неоплазияларни кариотипини таҳлили учун 20 тадан 80 тагача (ўртача 30та) метафаза пластинкалари кўрилди.

Хромосома идентификацияси ҳалқаро цитогенетика номенклатура тизимлари (ISCN 2009) талабларига мос равишда амалга оширилди.

Клиник СМПН ташхиси қўйилган 426 нафар беморда молекуляр-генетик таҳлил, уларнинг каритипи аниқлангандан кейин ўтказилди. Молекуляр-генетик таҳлил учун беморлар периферик қонидан фойдаланилди. СМЛ учун маркер ген (*BCR-ABL* p210 химер ген) миқдори молекуляр-генетик текширувининг *real-time-PCR* (RT-PCR) усули ёрдамида амалга оширилди. Ph(-)-СМПН беморлар геномида *JAK2V617F* гени мутациясини бор ёки йўқлигини периферик қон хужайраларидан ажратиб олинган ДНК намуналарида ПЗР усули ёрдамида амалга оширилди.

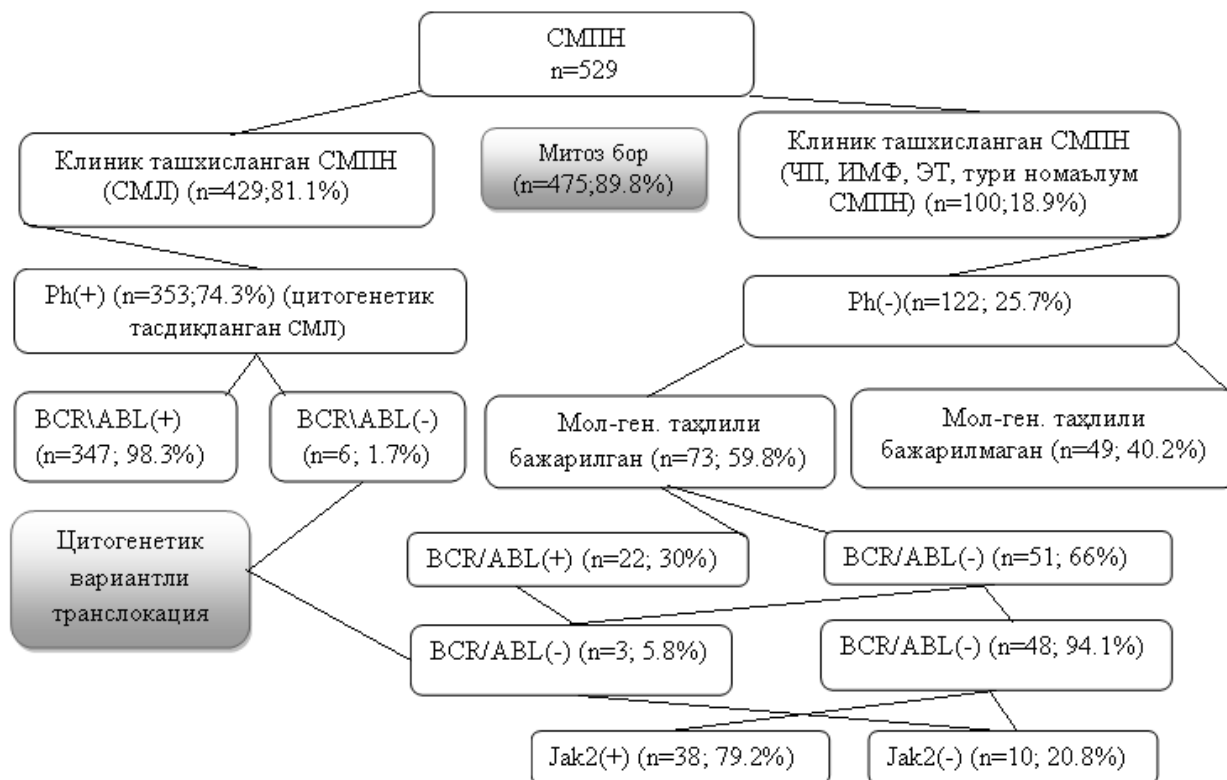
Диссертация ишининг **учинчи** ва **тўртинчи** бобида олинган натижалар муҳокамаси баён қилинган.

Учинчи бобда **«сурункали миелопролифератив неоплазияли беморлар кариотипини текшириш учун стандарт цитогенетика усулини модификациялаш»** классик ва модификацияланган усулни асосий босқичлари ва уларнинг биологик самараси ёритилган. Стандарт цитогенетик таҳлил модификацияси хужайраларни метафаза босқичида бўлинишини тўхтатиш, гипотонизациялаш, фиксациялаш ва хромосома препаратларини тайёрлаш босқичида амалга оширилди. Ишлаб чиқилган модификация туфайли беморлар хужайра културасида метафаза босқичидаги миелоид катори хужайралари миқдорининг ошишига, хужайраларнинг шишишини ҳамда хужайра мембранаси ва органеллалари емирилишини кучайтириб уларни олиб ташлашга, хужайраларнинг гипотоник таъсирга адаптациялашувига, шунингдек хужайра таркибларининг кескин емирилишини камайтириб, хромосомаларнинг техник йўқолишини олдини олишга эришилди. Шулар билан биргаликда хромосомаларнинг кескин қисқаришини камайтириб, уларнинг тўпланиб бир бирларининг устига тушиб қолиши каби цитогенетик таҳлилни қийинлаштирувчи ҳолатларга имкон даражасида барҳам берилди.

Модификацияланган стандарт цитогенетик таҳлил усулининг ижобий натижалари текширув ўтказилган СМПН беморларда маркер ва маркер бўлмаган хромосома ўзгаришларининг янада кўпроқ аниқланганлигида намаён бўлди. Стандарт цитогенетика модификацияларининг ишлаб чиқилиши ва амалиётга киритилиши СМПН беморларда кариотиплаш натижадорлигини яхшиланишига, цитогенетик аномал маркер Ph-хромосома, 9 ва 22 хромосомалари қатнашган вариантли транслокацияларни, шунингдек жуда кам учрайдиган қўшимча хромосома ўзгаришларининг самарали аниқланишига эришилди, бу хромосомаларда кечадиган иккиламчи қўшимча бузилишлар касалликни авж олишини унинг клиник сипмтомларидан олдин билиш имконини беради. Сурункали миелопролифератив неоплазияларда клонал эволюция жараёнида пайдо бўладиган қўшимча ва маркер бўлмаган хромосома ўзгаришларининг аниқланиши беморларнинг даволаш режасига ўз вақтида ўзгартириш киритишни таъминлайди.

Тўртинчи **«сурункали миелопролифератив неоплазияли беморларда цитогенетика таҳлили натижалари билан клиник-морфологик ва**

молекуляр-генетик таҳлиллар ассоциацияси» бобида СМПН беморлар биологик характеристикаси ва генетик маркерлар билан периферик қоннинг лаборатор-морфологик параметрлари ассоциатив таҳлили келтирилган. Клиник ташхис, цитогенетик ва молекуляр текширувлар натижасига таяниб пациентлар гуруҳ ва гуруҳчаларга ажратилди. Пациентлар генетик таҳлил маълумотлари асосида гуруҳ ва гуруҳчаларга стратификация қилинган ва куйидаги 1-расмда келтирилган.



1-расм. Генетик текширув маълумотлари асосида пациентлар гуруҳ ва гуруҳчаларга стратификация қилингани таҳлили.

СМПН ташхисли беморлар периферик қон лаборатор-морфологик параметрлари ва генетик маркерлар ўртасидаги ассоциатив таҳлили шуни кўрсатдики, кариотипда цитогенетик тасдиқланган 9чи ва 22чи хромосомалар транслокацияси $t(9;22)(q34;q11)$ бўлиши, умумий лейкоцитлар $Ph(+)$ – $141.6 \cdot 10^9/л$ ва $Ph(-)$ – $74.1 \cdot 10^9/л$, $t=3.0$; $p<0.05$), миелоцитлар $Ph(+)$ – 9.4% ва $Ph(-)$ – 5.9%, $t=2.2$; $p<0.05$) ва таёкча ядролар $Ph(+)$ – 11.0% ва $Ph(-)$ – 8.3%, $t=2.1$; $p<0.05$) миқдори юқорилиги ва лимфоцитларнинг $Ph(+)$ – 9.3% ва $Ph(-)$ – 17.6%, $t=4.1$; $p<0.05$) кам кўрсатгичи билан ассоцияланади.

Аёлларда эркакларга нисбатан $Ph(+)$ -СМПН сурункали босқичида гемоглобин анча паст кўрсатгичда (91,0 г/л ва 97,2 г/л; $t=2.5$; $p<0.05$), ва акселерация босқичида бласт хужайралар (9,5% ва 4,1%; $t=3.7$; $p<0.05$) етарли даражада юқори бўлиши тасдиқланди. Периферик қон лаборатор-морфологик кўрсатгичлари $Ph(+)$ -СМПНда (СМЛ), $Ph(-)$ -СМПНга (ИП, ПМФ, ЭТ ва тури номаълум СМПН) қараганда умумий лейкоцитлар абсолют

микдори ва ундан ташқари миелоид-гранулацит қаторда етилмаган ёш хужайралар анча юқорилиги билан тасдиқланди.

Ph(-)-СМПНларда маркер бўлмаган хромосома аномалиялари бўлиши гемоглабин даражасини (94,2 г/л ва 124,2 г/л; $t=2.9$; $p<0.05$) ва эритроцитлар микдорини ($3.6 \cdot 10^{12}/л$ ва $4.5 \cdot 10^{12}/л$; $t=2.3$; $p<0.05$) паст бўлиши билан ассоцияланди. Қўшимча хромосома аномалиялари бўлган ва бўлмаган Ph(+)-СМПН беморларда, ўрганилган периферик қон кўрсаткичлари бўйича умуман фарқ аниқланмади. Бу факт ҳар бир маркер бўлмаган хромосома бузилишлари хужайралар бўлинишида, ривожланишида ва апоптозда мустақил генетик омилга эга эканлиги билан тушунтирилади. Кўпгина қўшимча хромосома аномалиялари таъсири, бир неча хил генларга бирданига ёки унча катта бўлмаган натижа билан баҳоланиши мумкин. Олинган натижалардан шуни хулоса қилиш мумкинки СМПНларда ёмон сифатли лейкоз фенотиплари шаклланишида қўшимча хромосома аномалияларининг (ҚХА) таъсири индивидуал баҳоланади. Шунинг учун, ҳар бир маркер бўлмаган қўшимча хромосома аномалиялари клиник ва лаборатор-диагностик мезонлари билан ассоцияланишини чуқур ўрганишни талаб қилади.

Тўртинчи боб ости бўлимида «**Модификацияланган стандарт цитогенетика усули ёрдамида аниқланган Ph-позитив ва Ph-негатив СМПН беморлардаги маркер бўлмаган хромосома аномалияларини ўрганиш**» биз аниқлаган маркер бўлмаган, шу жумладан кам учрайдиган ва уникал, хромосома аберрациялари келтирилган.

Цитогенетик (Ph(+)) ёки молекуляр-генетик (*BCR-ABL(+)*) текширувлари ёрдамида тасдиқланган сурункали миелолейкозли ($n=378$) беморларнинг 9.0%да қўшимча хромосома аномалиялари ва Ph(-)-СМПН ($n=97$) беморларда 15,4%да хромосома аномалиялари (ХА) аниқланди. Бунда маркер бўлмаган хромосома аномалиялари бўйича Ph(+)-СМПН (СМЛ) ва Ph(-)-СМПН эркак ва аёл беморларни солиштирганда улар ўртасида статистик фарқ аниқланди натижалар 1чи жадвалда кўрсатилган.

1-жадвал

СМПН беморларда маркер бўлмаган ХА учраш частотаси

Пациентлар		Ph(+)/(-)СМПН (СМЛ) ($n=378$)				Ph(-)СМПН (ЧП, БМФ, ЭТ, тури номаълум СМПН) ($n=97$)			
		ҚХАсиз ($n=344$)		ҚХА ($n=34$)		Нормал кариотип ($n=82$)		Патологик кариотип ($n=15$)	
		абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
Жинс:	Эркак	180	52.3±2.7	23	67.6±8.0	49	59.8±6.6	6	40.0±6.6
	Аёл:	163	47.4±3.8	11	32.4±3.5*	33	40.2±7.5	9	60.0±6.2*
Ph (+)/(-)-СМПН (СМЛ) – Э/А ҚХАсиз $t=1.0$; $p>0.05$; Ph(+)/(-)-СМПН (СМЛ) – Э/А ҚХА* $t=4.0$; $p<0.05$. Ph(-)-СМПН – Э/А ҚХАсиз $t=1.97$; $p>0.05$; Ph(-)-СМПН – Э/А ҚХА* $t=2.2$; $p<0.05$.									

Ph(+)-СМПН (СМЛ) ва Ph(-)-СМПН (ЧП, БМФ, ЭТ) пациентларда аниқланган маркер бўлмаган хромосома аномалиялари турлари ва фоизи 2чи ва 3чи жадвалларда келтирилган. Унга кўра, Ph(+)-СМПН (СМЛ) акселерации, бластли криз босқичларида кўшимча хромосома аномалиялари сурункали босқичга нисбатан кўпроқ кузатилди. Ph(-)-СМПНлар ўртасида тури номаълум СМПН гуруҳидаги беморларда хромосома аномалиялари бошқа гуруҳларга қараганда кўп учради.

2-жадвал.

Ph(+)-СМПН (СМЛ) пациентларда аниқланган кўшимча цитогенетик аномалиялар спектри.

Хромосома аномалиялари гуруҳи	Ph(+)-СМПН (СМЛ) пациентлар (n=378)			
	Сурункали босқич (n=323)		Акселерации/ Бластли криз босқичлари (n=54)	
	абс.	%	абс.	%
Ҳаммаси	22	7.1±1.43*	12	22.2±5.6
Моносомия	1	4.3	1	9.1
Трисомия	4	17.4	1	9.1
Инверсии	1	4.3	0	0
Делеция	3	13.0	0	0
Транслокация	8	34.8	2	18.2
Гипердиплоидия (2n=48-52)	2	8.7	3	18.2
Гиподиплоидия (2n<46)	4	17.4	4	36.4
Полиплоидия (4n=92)	0		1	9.1

* Сурункали босқич / акселерации, бластли криз босқичлари: t=2.6; p<0.05

Биз аниқлаган маркер бўлмаган цитогенетик аномалиялар ўртасида олдин адабиётларда кўрсатилган ва маълум бўлмаган яъни ҳали беморларда кузатилмаган мутациялар ҳам бўлди. Адабиётларда маълум мутациялар ҳар хил хромосомаларнинг, трисомияси +1p, +8, +9, +17, +19, +21, +22, +Ph, ванолисомия -Y (эркакларда Y бўлмаслиги), гипоплоидия <46, гипердиплоидия >46, полиплоидия 4n=92, делециялар: del4(q28-31), del13(q), del12(q31-32), del18(p11), del20(q), инверсиялар: inv11(p15-q22), inv3(q21-26), транслокациялар: t(3;9;22)(p24;q34;q11), t(3;7)(q31;p22) каби хромосома бузилишлари аниқланди.

Бундан ташқари, Ph(+)-СМЛ ва Ph(-)-СМПН GTG-бэндлаш (дифференциал бўйаш) ёрдамида кариотипни модификацияланган стандарт цитогенетика усулидан фойдаланилганда бир қанча янги олдин адабиётларда ёритилмаган уникал маркер бўлмаган цитогенетик ўзгаришлар аниқлашга эришилди. Модификацияланган усул қўлланилганда хромосома морфологияси яхшиланганлиги туфайли хромосомалардаги цитогенетик бузилган жой локус ҳақида тўлиқ маълумотга эга бўлди. Бундай олдин маълум бўлмаган реаранжировкаларга қуйидагиларни, саккизинчи хромосома моносомияси: -8, ўн тўртинчи хромосома инверсияси: inv14(p13-

q21), ва иккинчи, учинчи, бешинчи, еттинчи, саккизинчи, тўққизинчи, ўн биринчи, ўн иккинчи, ўн учинчи, ва йигирма иккинчи хромосомалар иштирокида ҳосил бўлган транслокацияларни: t(7;9;22)(q22;q34;q11), t(12;22)(q13;q22), t(2;22)(q21;q13), t(5;8;9;22)(q34;q13;q34;q11), t(9;9)(?), t(3;7)(q26;q21), t(5;11)(?), t(9;12)(p12;q13), t(3;13)(q13-21;q31-32) кўрсатиб ўтиш мумкин.

Ўтказилган текширувлар натижасида олинган маълумотларга таяниб пациентларга генетик таҳлил ўтказишни кетма кетлиги ва амалий заруратини аниқлаш учун сурункали миелопротрофиератив неоплазияларда диагностикасида генетик алгоритм ишлаб чиқилди (2-расм). Қўйилган мақсаддан келиб чиққан ҳолда клиник-лаборатор босқичдаги маълумотлар асосида алгоритмнинг генетик босқичи бир қанча тестларни ўз ичига олади. Шундай қилиб, умумий лейкоцитларнинг юқори кўрсаткичи (14,4±2,3дан), миелоцитларнинг (0,97±0,22дан) ва таёқча ядроларнинг (5,6±0,6дан) нисбий миқдори юқорилиги, ва яна лимфоцитларининг (21,3±0,5гача) нисбий миқдори камлиги, клиник ташхис қўйилган СМПН беморлар кариотипида Ph-хромосома борлиги эхтимолини оширади.

3-жадвал

Ph(-)СМПН пациентларда аниқланган қўшимча цитогенетик аномалиялар спектри.

Хромосома аномалиялари гуруҳи	Ph(-)СМПН пациентлар (n=97)							
	ЧП (n=39)		БМФ (n=24)		ЭТ (n=8)		Тури номаълум СМПН (n=26)	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
Ҳаммаси	1	2.5±2.5	4	15.4±7.1	2	22.2±13.8	8	31.0±9.1
Моносомия	0	0	0	0	0	0	0	0
Трисомия	0	0	1	25	0	0	3	37.5
Инверсия	0	0	1	25	0	0	1	12.5
Делеция	0	0	1	25	0	0	2	25
Транслокация	1	100.0	0	0	0	0	1	12.5
гипердиплоидия	0	0	0	0	0	0	0	0
гиподиплоидия	0	0	1	25	0	0	1	12.5
Полиплоидия	0	0	0	0	2	100.0	0	0

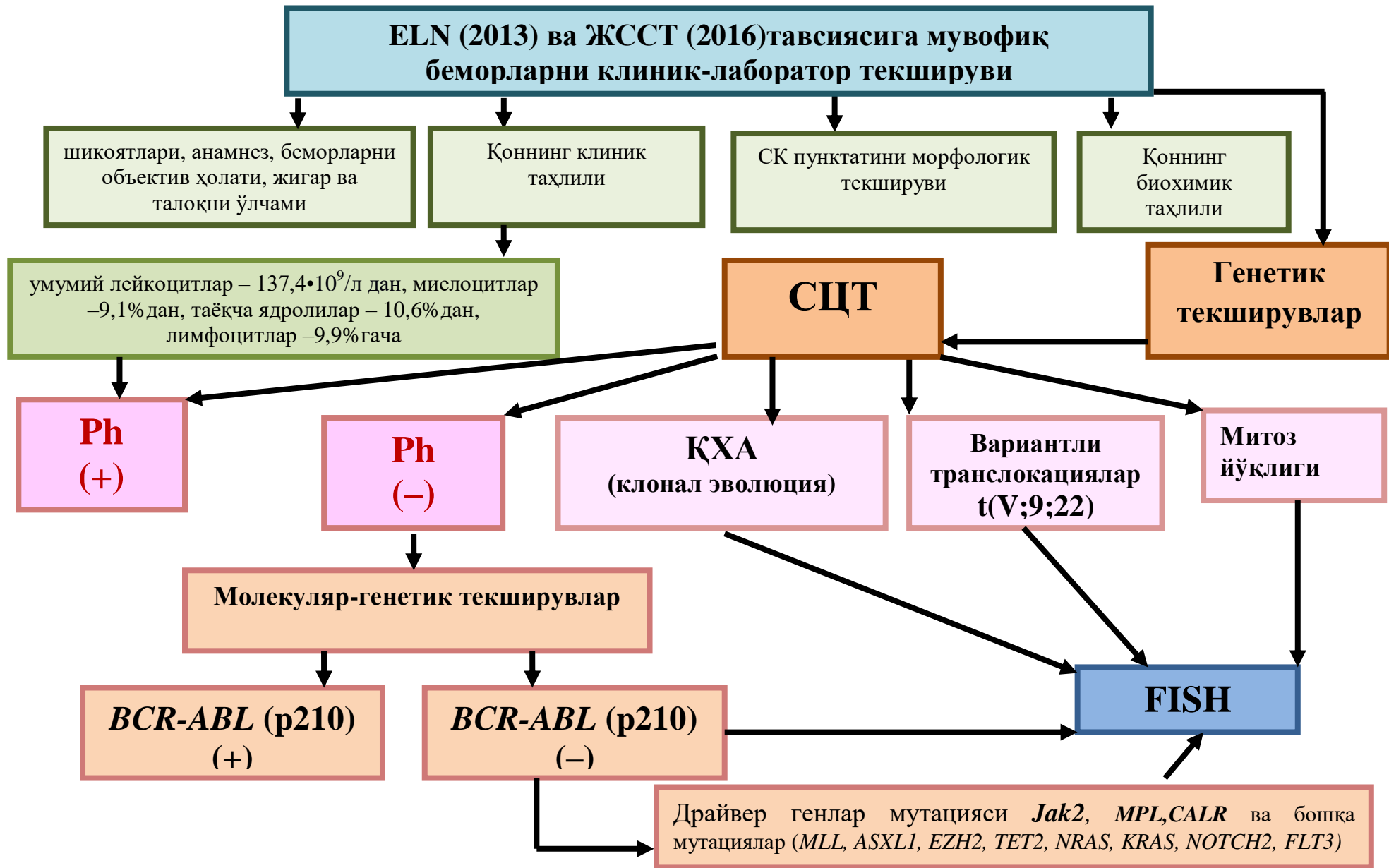
ЧП/БМФ – t=1.7; p>0.05; ЧП/ЭТ – t=1.4; p>0.05; БМФ/ЭТ – t=1.4; p>0.05;
ЭТ/тури номаълум СМПН – t=0.5; p>0.05; ЧП/тури номаълум СМПН – t=3.0; p<0.05;
БМФ/тури номаълум СМПН – t=1.4; p>0.05;

Бирламчи генетик таҳлил ҳисобланган GTG-бэнд билан ўтказиладиган цитогенетик таҳлил бемор кариотипида маркер бузилишни, t(9;22)(q34;q11), 89,8% бор ёки йўқлигини, бундан ташқари, патогенетик транслокациялар вариантли турларини ва барча хромосомалар ва генетик локуслар билан

юзага келиши мумкин бўлган, қўшимча хромосома аномалияларни аниқлашга имкон беради. Стандарт цитогенетик таҳлил айрим сабабларга кўра натижа бермаганда касалликни ташхислаш босқичида *BCR-ABL* химер генини аниқлаш учун флюорисцентли *in situ* гибридизация (FISH) ёки оддий ПЗР қўлланилиши мумкин. Тадқиқотда қўлланилган модификацияланган классик кариотиплаш усули, стандарт цитогенетика текширувнинг самарадорлигини ошириш, сурункали миелопролифератив неоплазия касалликлари диагностикасини яхшилаш, диагностик текширувлар вақтини қисқартиришга қаратилган масалалар кўрилган ва бу эса ўз навбатида СМПК эрта ва тўғри ташхис қўйиш имконини беради. Бундан ташқари, такомиллаштирилган усулнинг қўлланилиши СМПКларда хромосомаларни морфологик таҳлил қилиш сифатини яхшилашни таъминлайди, бу эса янги цитогенетик маркер ва маркер бўлмаган хромосома бузилишларини аниқлашни осонлаштиради, шу билан бирга хромосомалар абберацияларининг ташхислашдаги ўрнини ва уларнинг касаллик ривожланишига таъсирини ўрганиш имконини беради.

Ўтказилган текширувлар натижасида олинган маълумотларга таяниб пациентларга генетик таҳлил ўтказишни кетма кетлиги ва амалий заруратини аниқлаш учун СМПКлар диагностикасида генетик алгоритм ишлаб чиқилди (2-расм). Қўйилган мақсаддан келиб чиққан ҳолда клиник-лаборатор босқичдаги маълумотлар асосида алгоритмнинг генетик босқичи бир қанча тестларни ўз ичига олади. Шундай қилиб, умумий лейкоцитларнинг юқори кўрсаткичи ($14,4 \pm 2,3$ дан), миелоцитларнинг ($0,97 \pm 0,22$ дан) ва таёкча ядролиларнинг ($5,6 \pm 0,6$ дан) нисбий миқдори юқорилиги, ва яна лимфоцитларининг ($21,3 \pm 0,5$ гача) нисбий миқдори камлиги, клиник ташхис қўйилган СМПК беморлар кариотипида Ph-хромосома борлиги эхтимолини оширади.

Бирламчи генетик таҳлил ҳисобланган GTG-бэнд билан ўтказиладиган цитогенетик таҳлил бемор кариотипида маркер бузилишни, $t(9;22)(q34;q11)$, 89,8% бор ёки йўқлигини, бундан ташқари, патогенетик транслокациялар вариантли турларини ва барча хромосомалар ва генетик локуслар билан юзага келиши мумкин бўлган, қўшимча хромосома аномалияларни аниқлашга имкон беради. Стандарт цитогенетик таҳлил айрим сабабларга кўра натижа бермаганда касалликни ташхислаш босқичида *BCR-ABL* химер генини аниқлаш учун флюорисцентли *in situ* гибридизация (FISH) ёки оддий ПЗР қўлланилиши мумкин.



2-расм. СМПНли беморларни генетик текшируви алгоритми.

ХУЛОСАЛАР

1. Стандарт цитогенетик текширув усулининг II, III, IV и V босқичлари оптималлаштирилиши миелоид қатор хужайралари митотик индекси ва метафаз пластинкалар миқдорини ошишига, метафаза пластинкаларида хромосомалар ёйилиши ва морфологияси яхшиланишига олиб келди ва бу СМПН беморлардаги цитогенетик таҳлилни самарадорлигини ошишига имкон берди.

2. СМПН беморларда кариотиплашни модификацияланган стандарт цитогенетик усулда бажариш СМЛ учун маркер бўлган бузилиш Ph-хромосомани аниқланишини 58,9% дан 79,1% гача ошишига олиб келди. Модификацияланган стандарт цитогенетик текширув усулини қўллаш беморларга ташхис қўйиш босқичида қўшимча хромосома аномалияларни 7,1% касалликнинг сурункали босқичида, 22,2% касалликнинг авж олиш даврида аниқланишига имкон берди, бундан ташқари, касалликнинг сурункали даврида 6 та ва касалликнинг авж олиш даврида 3 та уникал аномалиялар аниқланди.

3. Периферик қонда умумий лейкоцитлар, миелоцитлар, таёқча ядролилар юқори кўрсаткичи, ва яна лимфоцитларнинг нисбий камлиги кариотипда цитогенетик тасдиқланган транслокация $t(9;22)(q34;q11)$ бўлиши билан ассоциацияланиши статистик изохланади.

4. Ph(-)-СМПН беморлардаги маркер бўлмаган цитогенетик аномалиялар кузатилганда периферик қонда гемоглабин миқдори ва эритроцит абсолют миқдори статистик ишончли кам бўлиши аниқланган.

5. СМПНга чалинган беморларда касаллик ташхисини фарқлашда ва кечишини прогнозлашга имкон берадиган диагностик алгоритм ишлаб чиқилган. Бу мезон клиник-морфологик ва цитогенетик таҳлиллар асосида генетик маркер ва маркер бўлмаган қўшимча ва вариантли хромосома аномалияларини аниқланишига асосланади.

**РАЗОВЫЙ НАУЧНЫЙ СОВЕТ НА ОСНОВЕ НАУЧНОГО СОВЕТА
DSc.27.06.2017.Tib.30.02 ПО ПРИСУЖДЕНИЮ УЧЕНЫХ СТЕПЕНЕЙ
ПРИ ТАШКЕНТСКОЙ МЕДИЦИНСКОЙ АКАДЕМИИ**

**НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ГЕМАТОЛОГИИ И
ПЕРЕЛИВАНИЯ КРОВИ**

АЛЛАНАЗАРОВА БАХТИГУЛЬ РАХМАНКУЛОВНА

**ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ И ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ
ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ ПРИ ХРОНИЧЕСКИХ
МИЕЛОПРОЛИФЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ**

14.00.29 – Гематология и трансфузиология

**АВТОРЕФЕРАТ
диссертации доктора философии (PhD) по биологическим наукам**

ТАШКЕНТ – 2020

Тема диссертации доктора философии (PhD) по биологическим наукам зарегистрирована в Высшей аттестационной комиссии при Кабинете Министров Республики Узбекистан за №В2019.1.PhD/В 283

Диссертация выполнена в Научно-исследовательском институте Гематологии и переливания крови. МЗРУз.

Автореферат диссертации на трех языках (узбекский, русский, английский (резюме)) размещен на веб-странице Научного совета (www.tma.uz) и на Информационно-образовательном портале «ZiyoNet» (www.ziyo.net).

Научный руководитель:

Бобоев Кодиржон Тухтабоевич
доктор медицинских наук, профессор

Официальные оппоненты:

Бабаджанова Шоира Агзамовна
доктор медицинских наук, профессор

Гильдиева Маргарита Сабировна
доктор биологических наук

Ведущая организация:

**Самаркандский государственный
медицинский институт**

Защита диссертации состоится «__» _____ 2020 г. в ____ часов на заседании Разового научного совета на основе Научного совета DSc.27.06.2017.Tib.30.02 при Ташкентской медицинской академии. (Адрес: 100109, г. Ташкент, Алмазарский район, ул. Фароби, дом 2. Тел./факс: (+99878) 150-78-25; e-mail: tta2005@mail.ru).

С диссертацией можно ознакомиться в Информационно-ресурсном центре Ташкентской медицинской академии (зарегистрирована за _____). Адрес: 100109, г. Ташкент, Алмазарский район, улица Фароби, дом 2. Тел./факс: (+99878)150-78-14.

Автореферат диссертации разослан «__» _____ 2020 года.

(реестр протокола рассылки № _____ от «__» _____ 2020 года)

А.Г. Гадаев

Председатель Разового научного совета на основе Научного совета по присуждению ученых степеней, доктор медицинских наук, профессор

Д.А. Набиева

Ученый секретарь Разового научного совета на основе Научного совета по присуждению ученых степеней, доктор медицинских наук

Р.С. Мухамедов

Председатель научного семинара при Разовом научном совете на основе Научного совета по присуждению ученых степеней, доктор биологических наук, профессор

ВВЕДЕНИЕ (Аннотация диссертации доктора философии (PhD))

Актуальность и востребованность темы диссертации. В настоящее время в мире повышается интерес к изучению патогенеза хронических миелопролиферативных заболеваний. Хронические миелопролиферативные неоплазии (ХМПН) – представляют собой клональную патологию, возникающую на уровне стволовой кроветворной клетки. Результаты многочисленных исследований указывают на то, что хромосомные aberrации играют значительную роль в процессе возникновения и эволюции гематологических неоплазий и определяют биологические свойства лейкозных клеток. Большинство наиболее распространенных хромосомных перестроек при онкогематологическом заболевании имеют самостоятельное диагностическое значение. Транслокация $t(9;22)(q34;q11)$, цитогенетическим проявлением которой является филадельфийская хромосома – считается генетическим диагностическим маркером ХМЛ¹.

В мире проводится ряд исследований по изучению молекулярно-генетических особенностей ХМПН, имеющих значение для диагностики и прогнозирования. Наличие той или иной аномалии кариотипа позволяет судить о типе злокачественности опухоли, предполагать варианты течения заболевания и, в соответствии с этим, проводить точную верификационную диагностику, назначать адекватное лечение и прогнозировать эффективность терапии. На выявлении Ph-хромосомы базируется диагностическая дифференциация между Ph(+)- и Ph(-)-ХМПН. В патогенезе Ph-отрицательных ХМПН лежат драйверные мутации в генах *Jak2*, *MPL*, *CALR* и др. В последние годы основное внимание исследованиям в области диагностики и мониторинга ХМПН уделяется стратегии, основанной на молекулярно-генетических технологиях, в то время как классическое кариотипирование и исследования цитогенетических маркеров, несмотря на общепризнанную значимость, отошло на второй план.

В нашей стране активно разрабатываются программы, способствующие развитию медицинской сферы, ранней диагностике и снижению осложнений различных заболеваний, в том числе и гематологических болезней. В постановлении «О комплексных мерах по коренному совершенствованию системы здравоохранения Республики Узбекистан» указано: «...повысить эффективность, качество и доступность медицинской помощи в стране, а также путем разработки эффективных моделей патронажной службы и диспансеризации внедрить высокотехнологичные методы диагностики, лечения и профилактики заболеваний...»². Решение этих задач поможет повышению уровня качества современных медицинских услуг, включая диагностику и лечение, а также совершенствованию использования современных технологий в оказании качественной медицинской помощи.

¹ - Johansson B., Fioretos T., Mitelman F., 2019

² Указ Президента Республики Узбекистан за № УП 5590 «О комплексных мерах по коренному совершенствованию системы здравоохранения Республики Узбекистан» от 7 декабря 2018 года.

Данное диссертационное исследование в определенной степени служит выполнению задач, предусмотренных в Указах Президента Республики Узбекистан от 20 июня 2017 г. № ПП-3071 «О мерах по дальнейшему развитию специализированной помощи населению Республики Узбекистан», ПП-№2866 от 4 апреля 2017 года «О мерах по дальнейшему развитию онкологической службы и совершенствованию онкологической помощи населению Республики Узбекистан на 2017-2021 годы», а также задач, обозначенных в других нормативно-правовых документах, касающихся данной деятельности.

Соответствие исследования приоритетным направлениям развития науки и технологий Республики. Данное исследование выполнено в соответствии с приоритетным направлением развития науки и технологий Республики Узбекистан: VI «Медицина и фармакология».

Степень изученности проблемы. В настоящее время исследования генетических изменений при ХМЛ ведутся во многих научных центрах мира. Диагноз ХМЛ устанавливается на основании данных клинико-лабораторных исследований при обязательном обнаружении Ph-хромосомы и/или химерного гена *BCR-ABL*, которое позволяет провести дифференциальную диагностику между Ph(+)- и Ph(-)-ХМЛ. Кроме того, кариотипирование может использоваться для дифференциальной диагностики и способствовать выявлению различий между ХМЛ и другими миелоидными злокачественными опухолями³.

Помимо Ph-хромосомы в кариотипе пациентов с ХМЛ могут встречаться и другие (вторичные) мутации, которые могут появляться как в дебюте заболевания, так и по мере его развития, и определять характер течения болезни. Кариотипирование при Ph-негативных ХМЛ не обладает диагностической значимостью, однако стандартный цитогенетический анализ может быть использован для подтверждения патологического клонального гемопоэза. Кроме того цитогенетические изменения, возникающие по мере развития Ph-негативных ХМЛ, как и в случае ХМЛ, могут определять характер течения заболевания и иметь ту или иную прогностическую значимость.

В Республике Узбекистан исследования маркерных и немаркерных цитогенетических изменений при ХМЛ до настоящего времени не проводились, поскольку данный метод был внедрен в отечественную онкогематологическую практику всего несколько лет назад. В связи с этим изучение цитогенетических изменений при хронических миелопролиферативных заболеваниях и их диагностическое и прогностическое значение проводится в Узбекистане впервые.

Связь темы диссертации с научно-исследовательскими работами института, где выполнена научная работа. Диссертационное исследование выполнено в рамках плана научно-исследовательских работ научно-исследовательском институте гематологии и переливания крови по

³ Arber D.A. Orazi, A., 2019

грантовому проекту АДСС-14.6. на тему «Совершенствование методов диагностики, верификации форм и мониторинга эффективности лечения ХМПЗ на основе разработки новых молекулярных способов выявления специфических хромосомных и генных перестроек в опухолевых клетках» (2014-2017гг).

Цель исследования: на основе оптимизации метода стандартного цитогенетического исследования разработать способ выявления хромосомных реаранжировок при Ph-положительных и Ph-отрицательных ХМПН и определить значимость маркерных, дополнительных и редких неслучайных аберраций в диагностике и течении заболевания.

Задачи исследования:

оптимизация метода стандартного цитогенетического исследования, разработка способа выявления хромосомных реаранжировок и оценка частоты встречаемости маркерных и немаркерных (дополнительных и редких встречаемых) цитогенетических изменений при диагностике больных Ph-положительным и Ph-отрицательными ХМПН;

проведение сравнительного анализа данных цитогенетических исследований с данными клиничко-морфологических и молекулярно-генетических исследований у больных Ph-положительным и Ph-отрицательными ХМПН на разных стадиях заболевания;

изучение диагностической значимости и влияние на течение заболевания маркерных, дополнительных и редких неслучайных аберраций, выявляемых при Ph-положительных и Ph-отрицательных ХМПН;

определение цитогенетических критериев и оценка возможности их использования для верификации диагноза и прогнозирования варианта течения заболевания при Ph-положительных и Ph-отрицательных ХМПН.

Объектом исследования являлись 529 пациентов (429 больных – с хроническим миелолейкозом, 39 больных – с истинной полицитемией, 24 больных – с первичным миелофиброзом, 9 больных – с эссенциальной тромбоцитемией и 26 больных – с ХМПН неустановленного подтипа), которые были направлены в научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови для обследования и лечения

Предметом исследования являлись образцы костного мозга и периферической крови больных ХМПН.

Методы исследования. При выполнении диссертационной работы были использованы следующие методы исследования: клиничко-морфологический метод, стандартный цитогенетический метод, молекулярно-генетические методы (качественный и количественный ПЦР) и статистические методы обработки полученных результатов.

Научная новизна исследования заключается в следующем:

определены данные о частоте встречаемости и спектре маркерных и немаркерных цитогенетических изменений у больных ХМПН в Узбекистане;

выявлена ассоциативная связь генетических аномалий с клиничко-морфологическими показателями периферической крови у больных ХМПН;

доказаны достоверные изменения ряда параметров ПК у больных Ph-положительным и Ph-отрицательными ХМПН, связанные с полом пациентов, стадиями заболевания или нозологическими вариантами, а также наличием дополнительных хромосомных аномалий;

впервые с использованием модифицированной методики СЦИ выявлены и описаны уникальные и редко встречаемые дополнительные хромосомные изменения, связанные с лейкозным процессом у больных Ph-положительными и Ph-отрицательными ХМПН.

Практические результаты исследования заключаются в следующем:

впервые в Узбекистане в онкогематологическую практику внедрен метод классического кариотипирования с целью выявления цитогенетических маркеров хронических миелопролиферативных заболеваний;

оптимизирован классический метод стандартного цитогенетического исследования, что позволило увеличить митотический индекс клеток миелоидной линии и количество метафаз, улучшить разброс и морфологию хромосом в пределах метафазной пластинки и в целом повысить результативность цитогенетического анализа у больных ХМПН;

выявлено 9 новых уникальных хромосомных изменений – потенциальных маркеров варианта течения заболевания при ХМПН;

на основе результатов анализа цитогенетических и клинкоморфологических данных пациентов разработан алгоритм диагностического обследования больных с ХМПН, позволяющий верифицировать диагноз и прогнозировать вариант течения заболевания с учетом маркерных генетических мутаций, а также немаркерных дополнительных и вариантных хромосомных аномалий.

Достоверность результатов исследования подтверждена методологической корректностью проведенных исследований, достаточным количеством больных, современностью и целесообразностью использованных статистических методов, использованием взаимодополняющих клинко-лабораторных, генетических и статистических методов исследования; использование различных методов эффективного прогнозирования методологической эффективности и оценки особенностей течения заболевания. Полученные результаты и заключение были подтверждены полномочными структурами.

Научная и практическая значимость результатов исследования.

Научная значимость результатов работы заключается в выявлении достоверных изменений ряда параметров ПК у больных Ph-положительным и Ph-отрицательными ХМПН, связанных с полом пациентов, стадиями заболевания или нозологическими вариантами, а также наличием дополнительных хромосомных аномалий. Впервые изучена частота встречаемости и спектр маркерных и немаркерных цитогенетических изменений у больных ХМПН в Узбекистане.

На основании применения модифицированной методики СЦИ выявлены и описаны уникальные и редко встречаемые дополнительные хромосомные

изменения, связанные с лейкозным процессом у больных Ph-положительными и Ph-отрицательными ХМПН. На основании данных исследования определена роль маркерных и немаркерных цитогенетических изменений в дифференциальной диагностике ХМПН, что позволило разработать алгоритм диагностического генетического обследования больных ХМПН в Узбекистане.

Внедрение результатов исследования. На основании полученных научных результатов исследования по внедрения классического и оптимизированного метода кариотипирования в онкогематологическую практику Узбекистана:

утверждены методические рекомендации «Стандартное цитогенетическое исследование в диагностике заболеваний системы крови» (справка Министерства Здравоохранения за №8/78 от 12 мая 2011года). Данные рекомендации позволили определить хромосомные изменения и верифицировать диагноз у больных с заболеваниями системы крови;

утверждены методические рекомендации «Модификация стандартного цитогенетического исследования при гемобластозах» (справка Министерства Здравоохранения за №8н-р/372 от 24 сентября 2019 года). Данные рекомендации позволили определить маркерные генетические мутации, а также немаркерные дополнительные и варианты хромосомные аномалии при диагностике у больных ХМПН и их влияние на течение заболевания;

оптимизированный метод кариотипирования внедрен в практику научно-исследовательского института гематологии и переливания крови (НИИГиПК МЗРУз), Республиканского многопрофильного медицинского центра имени У. Халмуратова в городе Нукус и Республиканского специализированного научно-практического медицинского центра онкологии и радиологии (РСНПМЦОиР МЗРУз) (справка Министерства Здравоохранения за №8н-р/372 от 25 декабря 2019 года). Разработанные методические рекомендации по методом диагностики способствуют снижению потребности в медикаментах, с экономической выгодой средств в 26%.

Апробация результатов исследования. Результаты данного научного исследования были доложены и обсуждены на 6 научно-практических конференциях, в том числе 2 международных и 4 республиканских с международным участием.

Публикация результатов исследования. По теме диссертации опубликовано 57 научных работ, из них: 17 статей в рецензируемых журналах, в том числе 16 – в республиканских и 1 – в зарубежном журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Республики Узбекистан для публикации основных научных результатов диссертаций на соискание ученой степени доктора философии по биологии, 35 тезисов и материалов конференций, 2 методические рекомендации, 2 руководства, 1 методическое пособие.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из списка сокращений, введения, 4 глав (Обзор литературы, Материалы и методы, 2

главы с изложением результатов исследования и их обсуждения), заключения, выводов, практических предложений, списка использованной литературы и приложений. Объем диссертации составляет 118 стр.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

Во введении обоснована актуальность и востребованность темы диссертации, сформулированы цели и задачи, обозначены объект и предмет исследования, указано соответствие исследований приоритетным направлениям развития науки и технологий Республики Узбекистан, изложены научная новизна и практические результаты исследований, раскрыты теоретическая и практическая значимость полученных результатов, даны сведения о внедрении результатов исследований в практическую медицину, по опубликованным работам и о структуре диссертации.

В первой главе диссертации представлены «**Медико-биологические аспекты проблемы ХМПН**» (**Обзор литературы**), изложение которых раскрывает современное состояние проблемы ХМПН. Представлены известные клинико-морфологические, биохимические, молекулярно-генетические механизмы патогенеза заболевания. Также рассмотрены структура, локализация и функции генетических маркеров, ассоциированных с развитием и возникновением хронических миелопролиферативных неоплазий.

Во второй главе диссертации «**Материалы и методы исследования**» представлена характеристика объектов и методов исследования. Указаны общее количество больных, включенных в исследование ($n=529$), и принципы деления больных на группы сравнения. Отмечено, что в исследование включены пациенты, первично обратившиеся в поликлинику и онкогематологические отделения НИИ Гематологии и переливания крови МЗ РУз для диагностики и лечения за период с 2014 по 2018 гг. В выборку обследуемых были включены больные с клиническим диагнозом хроническая миелопролиферативная неоплазия (ХМПН), из них 429 больных – с диагнозом хронический миелолейкоз (ХМЛ), 39 пациентов – с диагнозом истинная полицитемия (ИП), 24 – с диагнозом первичный миелофиброз (ПМФ), 8 – с диагнозом эссенциальная тромбоцитномия (ЭТ) и 26 – с диагнозом ХМПН неустановленного подтипа. Диагнозы верифицировались на основании результатов клинико-морфологического (ОАК и миелограмма), стандартного цитогенетического (наличия Ph-хромосомы и ДХА) и молекулярно-генетического (химерный онкоген BCR-ABL и мутация в гене Jak2) исследования.

В соответствии с задачами исследования и на основании данных кариотипирования больные ХМПН были разделены на группы Ph(+)-пациентов и Ph(-)-пациентов с ХМПН. На основании данных молекулярно-генетического исследования Ph(+)- и Ph(-)-пациенты, в свою очередь, были разделены на несколько подгрупп.

Цитогенетический анализ был выполнен 529 пациентам. Биоматериалом для стандартного цитогенетического исследования (СЦИ) явились клетки костного мозга, а также делящиеся клетки периферической крови больных. Цитогенетический анализ включал следующие этапы: забор крови, культивирование клеток на питательной среде, остановка деления на стадии метафазы, гипотонизация, фиксация, приготовление и окрашивание препаратов, микроскопирование с поиском и фотографированием метафазных пластин, цитогенетический анализ и интерпретация результатов. В соответствии с задачами исследования, были разработаны и внедрены в практику модификации классической методики, затрагивающие этапы остановки деления клетки на стадии метафазы, гипотонизации, фиксации и приготовления хромосомных препаратов.

Кариотипирование проводили с помощью микроскопа «AXIO Scope.A1, Zeiss», с использованием компьютерной системы анализа изображений «ВидеоТест». Для определения кариотипа у больных ХМПН были исследованы от 20 до 80 метафаз (в среднем 30). Идентификацию хромосом проводили в соответствии с международной системой цитогенетической номенклатуры ISCN 2009.

Молекулярно-генетический анализ был выполнен 426 пациентам с клинически установленным диагнозом ХМПН после проведения кариотипирования. Для молекулярно-генетического анализа использовалась периферическая кровь (ПК) больных. Исследование молекулярно-генетического маркера ХМЛ (химерный ген *BCR-ABL* p210) проводили количественным методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (RT-PCR). Для качественного определения наличия в геноме больных ХМПН мутации гена *JAK2V617F* из периферической крови (ПК) выделяли ДНК и проводили полимеразную цепную реакцию (ПЦР).

В третьей и четвертой главе диссертации приведены результаты собственных исследований и их обсуждение.

В третьей главе «Модификация стандартного цитогенетического метода для исследования кариотипа больных хронических миелопролиферативных неоплазий» проведены основные принципы классической методики, её модификации и описан биологический эффект изменений. Оптимизация затронула этапы остановки деления клеток на стадии метафазы, гипотонизации, фиксации и приготовления хромосомных препаратов; способствовала увеличению количества делящихся клеток миелоидной линии, полученных у больных ХМПН, на стадии метафазы; способствовала усилению набухания клеток, разрушению и устранению клеточных мембран и органелл, улучшению разброса хромосом, адаптации клеток к гипотоническому воздействию; уменьшала резкое разрушение клеточных структур, приводящее к техническим потерям хромосом; уменьшала резкое сокращение хромосом и возникновение их скупенности; снижала количество хромосомных наложений и улучшала разброс хромосом в пределах метафазной пластинки.

Результативность практического применения модификации стандартной методики цитогенетического анализа была показана нами при исследовании больных ХМПН и выявлении у них маркерных и немаркерных цитогенетических аномалии. Разработка и введение в практику модификаций стандартного цитогенетического анализа позволили улучшить результативность кариотипирования у больных ХМПН и эффективно выявлять у них маркерное цитогенетическое изменение – Ph-хромосому, варианты транслокации с участием хромосом 9 и 22, а также часто и редко встречаемые дополнительные изменения хромосом, указывая на первые доклинические признаки прогрессии заболевания. Детекция дополнительных и неспецифических хромосомных мутаций, появляющихся при клональной эволюции, позволяет своевременно внести корректирующие изменения в терапевтические программы больных гемобластомами.

В четвертой главе «**Проведение ассоциативного анализа данных цитогенетических, клиничко-морфологических и молекулярно-генетических исследований у больных хроническими миелопролиферативными неоплазиями**» приводится биологическая характеристика и ассоциативный анализ лабораторно-морфологических параметров периферической крови и генетических маркеров у больных ХМПН. На основании клинического диагноза, результатов цитогенетического и молекулярно-генетического анализа пациенты были разделены нами на соответствующие группы и подгруппы для проведения дальнейшего исследования. Стратификация пациентов на группы и подгруппы в соответствии с данными генетического исследования представлены на рисунке.

Ассоциативный анализ лабораторно-морфологических параметров периферической крови и генетических маркеров у больных ХМПН показало, что наличие в кариотипе цитогенетически подтвержденной $t(9;22)(q34;q11)$ ассоциируется с достоверно более высоким количеством общих лейкоцитов (Ph(+) $-141.6 \cdot 10^9/\text{л}$ и Ph(-) $-74.1 \cdot 10^9/\text{л}$, $t=3.0$; $p<0.05$), миелоцитов (Ph(+) -9.4% и Ph(-) -5.9% , $t=2.2$; $p<0.05$) и палочкоядерных клеток (Ph(+) -11.0% и Ph(-) -8.3% , $t=2.1$; $p<0.05$), а также с достоверно более низким относительным количеством лимфоцитов (Ph(+) -9.3% и Ph(-) -17.6% , $t=4.1$; $p<0.05$). У женщин с Ph(+)-ХМПН уровень Hb в хронической стадии заболевания был достоверно ниже (соответственно, 91,0 г/л и 97,2 г/л; $t=2.5$; $p<0.05$), а количество бластных клеток в стадии акселерации - достоверно выше, чем у мужчин (соответственно, 9,5% и 4,1%; $t=3.7$; $p<0.05$). У больных Ph(+)-ХМПН (ХМЛ) имел место значимо более высокий уровень показателя абсолютного количества общих лейкоцитов по сравнению со всеми другими подтипами Ph(-)-ХМПН (ИП, ПМФ, ЭТ и ХМПН неустановленного подтипа). Кроме того, у больных Ph(+)-ХМПН (ХМЛ) значимо выше были показатели юных и молодых форм клеток миелоидно-гранулацитарного ряда.

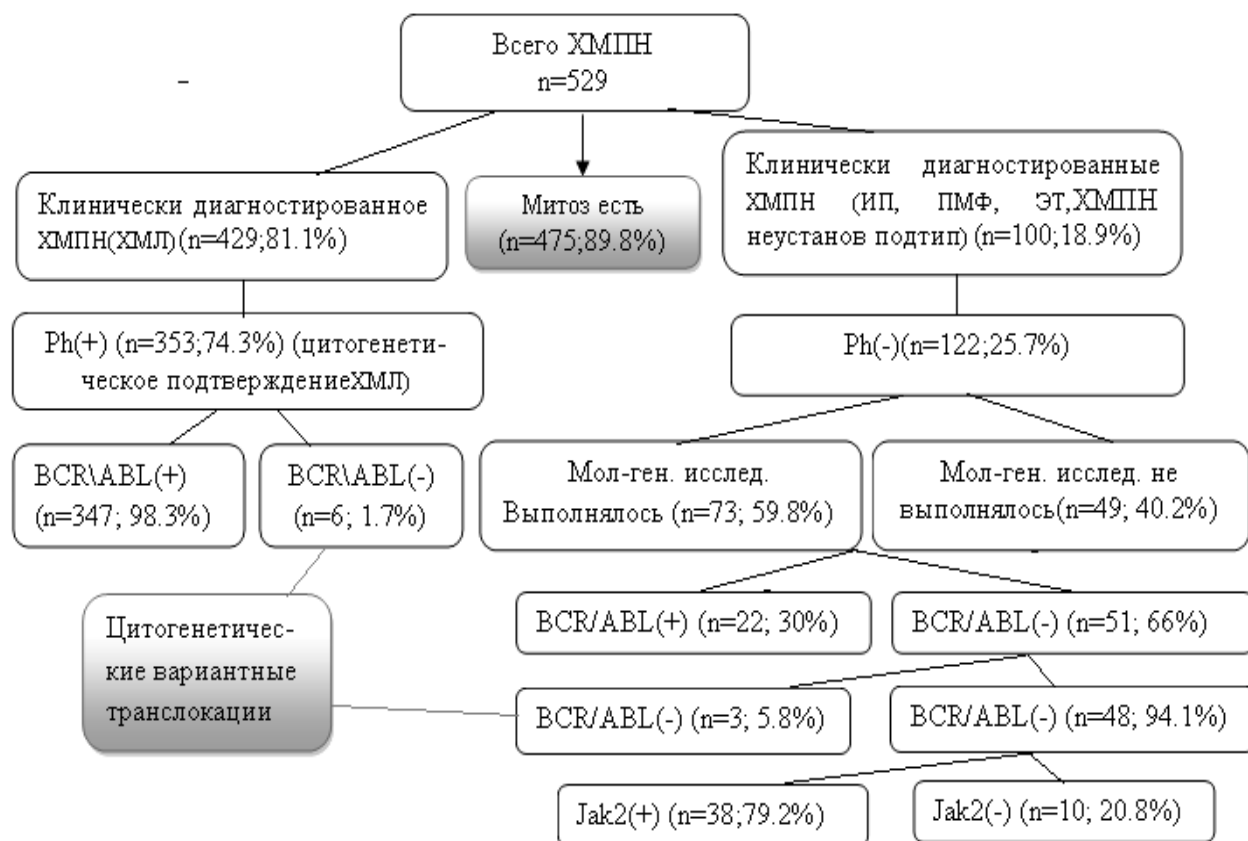


Рис. 1. Обоснование для стратификации пациентов на группы и подгруппы в соответствии с данными генетического исследования.

Наличие немаркерных ХА у больных с Ph(-)-ХМПН достоверно ассоциировалось с более низким уровнем Hb (соответственно, 94,2 г/л и 124,2 г/л; $t=2.9$; $p<0.05$) и более низким количеством эритроцитов (соответственно, $3.6 \cdot 10^{12}/л$ и $4.5 \cdot 10^{12}/л$; $t=2.3$; $p<0.05$). Сравнительная оценка морфологических показателей ПК больных Ph(+)-ХМПН с ДХА и без ДХА не выявила значимых различий ни по одному из изучаемых параметров. Данный факт объясняется тем, что, каждое немаркерное хромосомное изменение является самостоятельным независимым генетическим фактором, который может быть как функционально нейтральным, так и участвующим в клеточном делении, дифференцировке и апоптозе. Вследствие этого, оценка эффекта множества дополнительных хромосомных аномалий может дать результат, который отражает либо суммарное действие различных мутаций, либо нивелированное действие одних мутации другими. Полученные результаты позволили заключить, что объективизация суждений о влиянии ДХА на формирование злокачественного фенотипа лейкозных при ХМПН клеток требует индивидуальной оценки каждого немаркерного хромосомного изменения с глубоким изучением его ассоциации с клиническими и лабораторно-диагностическими критериями.

В подглаве «Изучение немаркерных хромосомных аномалий у больных Ph-положительным и Ph-отрицательными ХМПН, выявленных

модифицированным методом стандартного цитогенетического исследования» представлены данные о выявленных нами немаркерных, в том числе – редких неслучайных и уникальных хромосомных aberrациях. Среди больных с клинически установленным диагнозом ХМЛ (n=378), подтвержденным цитогенетически (Ph(+)) или молекулярно-генетически (BCR-ABL(+)), у 9.0% пациентов были выявлены дополнительные хромосомные аномалии (ДХА), а среди больных с клинически установленным диагнозом Ph(-)-ХМПН (n=97), у 15,4% пациентов были выявлены хромосомные аномалии (ХА). При этом нами выявлены достоверные различия в частоте немаркерных ХА у пациентов мужского и женского пола с ХМЛ, а также у пациентов мужского и женского пола с Ph(-)-ХМПН (Табл.1).

Таблица 1

Частота немаркерных ХА у больных с ХМПН

Пациенты		Ph(+)/(-)ХМПН (ХМЛ) (n=378)				Ph(-)ХМПН (ИП, ПМФ, ЭТ, ХМПН неустанов.подтипа) (n=97)			
		Без ДХА (n=344)		С ДХА (n=34)		Нормальный кариотип (n=82)		Патологический кариотип (n=15)	
		абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
Пол:	Муж	180	52.3±2.7	23	67.6±8.0	49	59.8±6.6	6	40.0±6.6
	Жен:	163	47.4±3.8	11	32.4±3.5*	33	40.2±7.5	9	60.0±6.2*

Ph (+)/(-)-ХМПН (ХМЛ) – М/Ж без ДХА t=1.0; p>0.05; Ph(+)/(-)-ХМПН (ХМЛ) – М/Ж с ДХА* t=4.0; p<0.05.
Ph(-)-ХМПН – М/Ж без ДХА t=1.97; p>0.05; Ph(-)-ХМПН – М/Ж с ДХА* t=2.2; p<0.05.

Спектр различных групп немаркерных хромосомных аномалий, выявленных нами у больных с Ph(+)-ХМПН (ХМЛ) и больных Ph(-)-ХМПН представлен в таблицах 2 и 3.

Таблица 2.

Спектр дополнительных цитогенетических аномалий, выявленных у пациентов с Ph(+)-ХМПН (ХМЛ)

Группы хромосомных аномалий	Пациенты с Ph(+)-ХМПН (ХМЛ) (n=378)			
	Хроническая стадия (n=323)		Стадия акселерации/ Бластный криз (n=54)	
	абс.	%	абс.	%
Всего	22	7.1±1.43*	12	22.2±5.6
Моносомия	1	4.3	1	9.1
Трисомия	4	17.4	1	9.1
Инверсии	1	4.3	0	0
Делеция	3	13.0	0	0
Транслокации	8	34.8	2	18.2
2n=48-52 (гипердиплоидия)	2	8.7	3	18.2
2n<46 (гиподиплоидия)	4	17.4	4	36.4
Полиплоидия (4n=92)	0		1	9.1

* Хрон.стад/стад акселер. и БК: t=2.6; p<0.05

Среди выявленных нами немаркерных цитогенетических аномалий имеются как уже описанные в литературе, так и ранее неизвестные мутации. В числе первых можно назвать такие, как трисомии +1p, +8, +9, +17, +19, +21, +22, +Ph, потеря -Y, гипоплоидия <46, гипердиплоидия >46, полиплоидия 4n=92, делеции: del4(q28-31), del13(q), del12(q31-32), del18(p11), del20(q), инверсия inv11(p15-q22), inv3(q21-26), транслокации: t(3;9;22)(p24;q34;q11), t(3;7)(q31;p22). Кроме того, модификация стандартного метода кариотипирования с использованием GTG-бэндинга у больных с Ph(+) (ХМЛ) и Ph(-)-ХМПН позволила выявить ряд новых уникальных, ранее не упоминавшихся в литературе немаркерных цитогенетических изменений, уточнить цитогенетические локусы разрывов и дать полное описание выявленным реаранжировкам в ассоциации с изучаемой патологией. К числу таких реаранжировок относятся впервые выявленные нами: моносомия 8, инверсия inv14(p13-q21), транслокации t(7;9;22)(q22;q34;q11), t(12;22)(q13;q22), t(2;22)(q21;q13), t(5;8;9;22)(q34;q13;q34;q11), t(9;9)(?), t(3;7)(q26;q21), t(5;11)(?), t(9;12)(p12;q13), t(3;13)(q13-21;q31-32

Таблица 3.

Спектр цитогенетических аномалий, выявленных у пациентов с Ph(-)ХМПН

Названия хромосомной аномалии	Пациенты с Ph(-)ХМПН (n=97)							
	ИП (n=39)		ПМФ (n=24)		ЭТ (n=8)		ХМПН неустанов. подтипа (n=26)	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
Всего	1	2.5±2.5	4	15.4±7.1	2	22.2±13.8	8	31.0±9.1
Моносомия	0	0	0	0	0	0	0	0
Трисомия	0	0	1	25	0	0	3	37.5
Инверсии	0	0	1	25	0	0	1	12.5
Делеция	0	0	1	25	0	0	2	25
Транслокации	1	100.0	0	0	0	0	1	12.5
2n>46 (48-52) (гипердиплоидия)	0	0	0	0	0	0	0	0
2n<46 (40-45) (гиподиплоидия)	0	0	1	25	0	0	1	12.5
Полиплоидия	0	0	0	0	2	100.0	0	0

ИП/ПМФ – t=1.7; p>0.05; ИП/ЭТ – t=1.4; p>0.05; ПМФ/ЭТ – t=1.4; p>0.05;
ЭТ/МПН неустанов. подтипа – t=0.5; p>0.05; ИП/МПН неустанов. подтипа – t=3.0; p<0.05;
ПМФ/МПН неустанов. подтипа – t=1.4; p>0.05;

На основе результатов проведенных исследований нами разработан алгоритм генетической диагностики ХМПН, определяющий практическую необходимость и последовательность выполнения генетического анализа у больных. Генетический этап алгоритма включает ряд тестов, выполняемых исходя из целесообразности, базирующейся на данных клинико-лабораторных этапов. Так, наличие высокого уровня общих лейкоцитов (от 14,4±2,3), относительного количества миелоцитов (от 0,97±0,22) и палочкоядерных клеток (от 5,6±0,6), а также низкого уровня относительного количества лимфоцитов (до 21,3±0,5) предполагает высокую вероятность

наличия Ph-хромосмы в кариотипе лейкозных клеток больного с клинически установленным диагнозом ХМПН.

Первичным генетическим анализом является кариотипирование с использованием метода GTG-бэндинга, поскольку данный анализ с эффективностью 89,8% позволяет установить наличие или отсутствие маркерной мутации – $t(9;22)(q34;q11)$, а также варианты формы патогенетической транслокации и дополнительные хромосомные изменения с вовлечением любых хромосом и генетических локусов. В случае если стандартный цитогенетический анализ оказался не результативным, может быть выполнена флюорисцентная *in situ* гибридизация (FISH) или качественная ПЦР – с диагностической целью для выявления молекулярного проявления транслокации – химерного гена *BCR-ABL*.

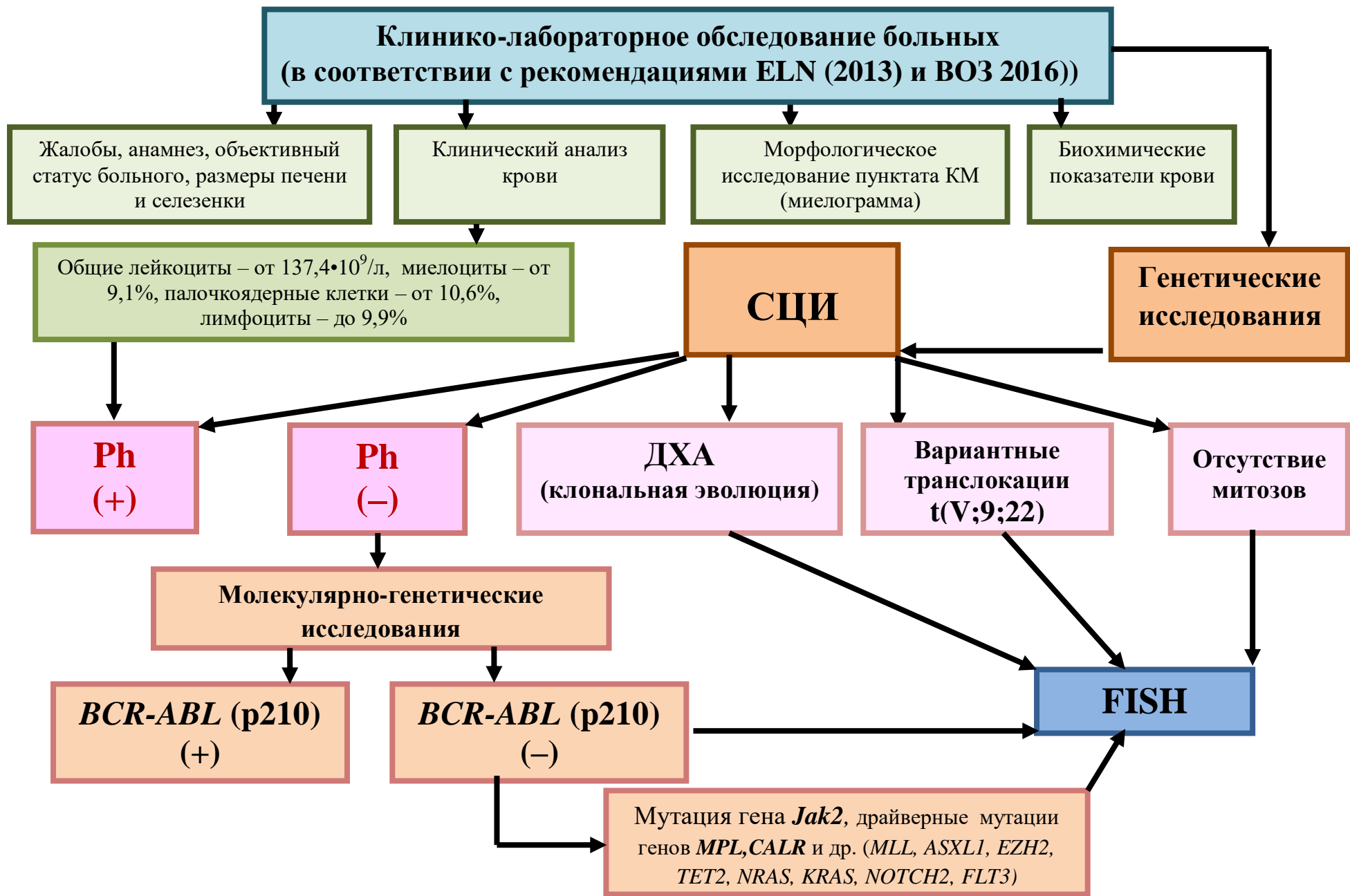


Рис.2. Алгоритм генетического обследования больных с ХМПН.

ВЫВОДЫ

1. Оптимизированы II, III, IV и V этапы стандартного цитогенетического метода исследования: увеличение митотического индекса клеток миелоидной линии и количества метафаз, улучшение разброса и морфологии хромосом в пределах метафазной пластинки позволили повысить результативность цитогенетического анализа у больных ХМПН.

2. Проведение кариотипирования больных ХМПН модифицированным методом СЦИ позволило увеличить выявление цитогенетического маркера ХМЛ – Ph-хромосомы с 58,9% до 79,1%. Применение модифицированного метода СЦИ при диагностическом исследовании позволило выявить дополнительные хромосомные аномалии у 7,1% больных в хронической стадии и у 22,2% больных при прогрессии заболевания, а также 8 уникальных аномалий у больных в хронической стадии и 3 уникальные аномалии у больных при прогрессии заболевания.

3. Наличие в кариотипе цитогенетически подтвержденной транслокации $t(9;22)(q34;q11)$ ассоциируется с достоверно более высоким количеством общих лейкоцитов, миелоцитов и палочкоядерных клеток, а также с достоверно более низким относительным количеством лимфоцитов.

4. Выявлено достоверное снижение уровня гемоглобина и абсолютного количества эритроцитов, ассоциированное с немаркерными цитогенетическими аномалиями у больных Ph(-)-ХМПН.

5. На основе результатов анализа цитогенетических и клинимоρφологических данных пациентов разработан алгоритм диагностического обследования больных с ХМПН, позволяющий верифицировать диагноз и прогнозировать вариант течения заболевания с учетом маркерных генетических мутаций, а также немаркерных дополнительных и вариантных хромосомных аномалий.

**ONE - TIME SCIENTIFIC COUNCIL ON AWARDING
THE SCIENTIFIC DEGREE DSc.27.06.2017.Tib.30.02 AT
THE TASHKENT MEDICAL ACADEMY**

**SCIENTIFIC RESEARCH INSTITUTE OF HEMATOLOGY
AND BLOOD TRANSFUSION**

ALLANAZAROVA BAKHTIGUL RAKHMANKULOVNA

**DIAGNOSTIC AND PROGNOSTIC VALUE OF CYTOGENETIC
CHANGES IN CHRONIC MYELOPROLIFERATIVE DISEASES**

14.00.29 – Hematology and transfusiology

**DISSERTATION ABSTRACT
of the Doctor of Philosophy (PhD) on biological sciences**

TASHKENT–2020

The theme of the dissertation of the Doctor of Philosophy (PhD) on medical sciences was registered by the Supreme Attestation Commission of the Cabinet of Ministers of the Republic of Uzbekistan under № B2019.1.PhD/B283

Doctoral dissertation was carried out in Scientific research institute of Hematology and transfusiology.

The abstract of the dissertation was posted in three (uzbek, russian, english (resume)) languages on the website of the Scientific Council at (www.tma.uz) and on the website of «ZiyoNet» information-educational portal at (www.ziynet.uz).

Scientific leader:

Boboev Kodirjon Tuhtaboevich
Doctor of medical sciences, professor

Official opponents:

Babadjanova Shoira Agzamovna
Doctor of medical sciences, professor

Gildieva Margarita Sabirovna
Doctor of biological sciences

Leading organization:

Samarkand state medical Institute

The defence of the dissertation will be held on « ____ » _____ 2020, at ____ at the meeting of the One-time Scientific Council DSc.27.06.2017.Tib.30.02 at Tashkent Medical Academy (Address: 2 Farobi str., Almazar district, 100109 Tashkent. Tel./Fax (+99878) 150-78-25, e-mail: tta2005@mail.ru).

The dissertation can be looked through in the Information Resource Centre of Tashkent Medical Academy (registered under No. _____). Address: 2 Farobi str., Almazar district, 100109 Tashkent. Tel./Fax (+99878) 150-78-14.

The abstract of dissertation was distributed on « ____ » _____ 2020.
(Registry record No. ____ dated « ____ » _____ 2020)

A.G. Gadaev

Chairman of the One-time Scientific Council
for the Award of Scientific Degrees, Doctor of
Medical Sciences, Professor

D.A. Nabieva

Scientific Secretary of the One-time Scientific
Council for the Award of Scientific Degrees,
Doctor of Medical Sciences

R.S. Mukhamedov

Chairman of the One-time Scientific Seminar
at the Scientific Council for the Award of
Scientific Degrees, Doctor of Biological
Sciences, Professor

INTRODUCTION (abstract of PhD thesis)

The objective: on the basis of optimization of the standard cytogenetic research method, to develop a method for detecting chromosomal rearrangements for Ph-positive and Ph-negative chronic myeloproliferative diseases, to determine the significance of marker, additional and rare non-random aberrations in the diagnosis and course of the disease.

The object of the research work: 529 patients were referred to the Research Institute of Hematology and Blood Transfusion for examination and treatment. Of these, 429 patients with a clinical diagnosis of chronic myeloid leukemia, 39 patients with polycythemia vera, 24 patients with primary myelofibrosis, 9 patients with essential thrombocythemia, and 26 patients with chronic myeloproliferative diseases of an unspecified subtype.

Scientific novelty of the research work is as follows:

data on the frequency of occurrence and the spectrum of marker and non-marker cytogenetic changes in patients with chronic myeloproliferative diseases has been obtained in Uzbekistan;

an associative relationship of genetic abnormalities with clinical and morphological parameters of peripheral blood in patients with chronic myeloproliferative diseases has been studied;

reliable changes in a number of peripheral blood parameters in patients with Ph-positive and Ph-negative CMPD associated with patient gender, disease stages or nosological options, as well as the presence of additional chromosomal abnormalities have been proven;

for the first time, unique and rarely encountered additional chromosomal changes associated with the leukemia process in patients with Ph-positive and Ph-negative chronic myeloproliferative diseases has been identified and described with the help of the modified standard cytogenetic research method.

Implementation of the research results:

for the first time in Uzbekistan, the method of classical karyotyping was introduced into oncohematological practice in order to identify cytogenetic markers of chronic myeloproliferative diseases;

The classical method of standard cytogenetic research method has been optimized, which allowed to increase the mitotic index of myeloid line cells and the number of metaphases, improve the spread and morphology of chromosomes within the metaphase plate and generally increase the effectiveness of cytogenetic analysis in patients with chronic myeloproliferative diseases;

9 new unique chromosomal changes potential markers of the variant of the course of the disease chronic myeloproliferative diseases has been revealed;

Based on the results of the analysis of cytogenetic and clinical-morphological data of patients, an algorithm for the diagnostic examination of patients with chronic myeloproliferative diseases has been developed, which allows one to verify the diagnosis and predict the course of the disease taking into account marker genetic mutations, as well as non-marker additional and variant chromosomal abnormalities.

The structure and volume of the thesis. The PhD thesis includes introduction, four chapters, conclusion, references and attachment. The PhD thesis is 118 pages.

ЭЪЛОН ҚИЛИНГАН ИШЛАР РЎЙХАТИ
СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ
LIST OF PUBLISHED WORKS

I бўлим (I часть; Part I)

1. Алланазарова Б. Р., Ассесорова Ю.Ю., Улашева Х.У., Содикова Ш.Э. «Хронический миелолейкоз с уникальной вариантной транслокацией t(3;13;22)(q21;q34;q11)» ISSN 2091-5853, «Журнал теоретической и клинической медицины», №2, Ташкент 2019, с.13-16. (03.00.00; №4)

2. Каримов Х.Я., Бобоев К.Т., Ассесорова Ю.Ю., Алланазарова Б. Р., Мустафина Л.К. «Случай хронического миелопролиферативного заболевания с транслокацией t(3;13)(q21;q32)» Медицинский журнал Узбекистана. – 2018. –№5. –С. 63-66. (14.00.00; №8)

3. Алланазарова Б. Р., Каримов Х.Я., Бобоев К.Т., Ассесорова Ю.Ю. «Случай вариантной транслокации t(3;9;22)(p24;q34;q11) при хроническом миелоидном лейкозе» Журнал Вопросы онкологии. Санкт-Петербург. – №6-2018 том 64 VOL.64.С. 810-814. (14.00.00; №158)

4. Алланазарова Б.Р., Ассесорова Ю.Ю., Казакбаева Х.М., Қодирова И.Т., Ахадова М.Р., Эгамова С.К. «Сурункали миелолейкоз касаллигининг кариотип бузилишларини аниқлашда стандарт цитогенетика текширув усулини ўрни» Инфекция иммунитет и фармакология, 2016. – №2. – С. 18-21 (03.00.00; №7)

5. Каримов Х.Я., Алланазарова Б. Р., Ассесорова Ю.Ю. Пулатова Н.С. «Сыворотка IV(AB)-группы крови человека как новая биологически активная добавка к культуральной среде при стандартном цитогенетическом методе исследования» Инфекция иммунитет и фармакология, 2016. – №2. – С. 66-73. (03.00.00; №7)

6. Каримов Х.Я., Бобоев К.Т., Алланазарова Б. Р., Шамсутдинова Д.Б., Ибрагимов З.З., Казакбаева Х. М. «Современные методы молекулярного мониторинга экспрессии химерного онкогена BCR/ABL у больных, получающих ингибиторы тиразинкиназ» Медицинский журнал Узбекистана. –2014. –№6. – С.6-9. (14.00.00; №8)

7. Каримов Х.Я., Ассесорова Ю.Ю., Алланазарова Б.Р., Болтаева Ю.Ю., Бобоев К.Т. «Медицинская цитогенетика: возможности и перспективы» Медицинский журнал Узбекистана. –2013. –№3. –С.42-44. (14.00.00; №8)

8. Ассесорова Ю.А., Алланазарова Б. Р., Казакбаева Х.М., Юнусова З.Д., Болтаева Ю.Ю., Бобоев К.Т. «Случай Ph-положительного хронического миелолейкоза с дополнительными цитогенетическими изменениями» Медицинский журнал Узбекистана. №6, 2012, С.42-44. (14.00.00; №8)

II бўлим (II часть; Part II)

9. Ассесорова Ю.Ю., Алланазарова Б. Р. «Атипичные цитогенетические изменения при хроническом миелоидном лейкозе» «The using of High tech methods of diagnosis and treatment for the blood system diseases» IV International

Uzbek-Turkish Congress of hematologists and transfusiologists of Uzbekistan. – 20-21 april Tashkent-2018. – С. 26-28.

10. Ассесорова Ю.Ю., Алланазарова Б.Р., Юсупова С.А. «Новая биологически активна добавка к культуральной среде, используемой при стандартном цитогенетическом методе исследования» «The using of High tech methods of diagnosis and treatment for the blood system diseases» IV International Uzbek-Turkish Congress of hematologists and transfusiologists of Uzbekistan. 20-21 april Tashkent-2018. – С. 87-89.

11. Ассесорова Ю.Ю., «Значение стандартного цитогенетического исследования в выявлении Rh-хромосомы при хроническом миелолейкозе» Молекулярная диагностика. –Сб. трудов VIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. –Москва, 2014. – Том II. Раздел 8. –С.51-52.

12. Бобоев К.Т., Алланазарова Б.Р., Ассесорова Ю.Ю. «Анализ хромосомных нарушений при хроническом миелолейкозе» Сборник научных трудов научно-практическая конференция гематологов и трансфузиологов Узбекистана «Нововведения в лечении и профилактике заболеваний системы крови и проблемы трансфузиологии» 16-17 мая Ташкент-2013 ст. 16-17

13. Ассесорова Ю.Ю., Алланазарова Б.Р., Болтаева Ю.Ю. «Модифицирование стандартного цитогенетического исследования для выявления хромосомных нарушений» Сборник научных трудов научно-практическая конференция гематологов и трансфузиологов Узбекистана «Нововведения в лечении и профилактике заболеваний системы крови и проблемы трансфузиологии» 16-17 мая Ташкент-2013 ст. 18-19.

Автореферат «Тошкент тиббиёт академияси ахборотномаси» журнали
тахририятида тахрирдан ўтказилди.
(18 январ 2020 йил)



Разрешено к печати: 18 января 2020 года
Объем – 1,9 уч. изд. л. Тираж –100. Формат 60x84. 1/16. Гарнитура «Times New Roman»
Заказ № 0530 -2020. Отпечатано РИО ТМА
100109. Ул. Фароби 2, тел: (998 71)214-90-64, e-mail: rio-tma@mail.ru