

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ УЗБЕКИСТАН**

ТАШКЕНТСКАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ

На правах рукописи
УДК 616.15+615.38+615.2.03.

МУХИТДИНОВА Гузал Бахтияровна

**ОПТИМИЗАЦИЯ ДИАГНОСТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ ОСТРОГО
ПРОМИЕЛОЦИТАРНОГО ЛЕЙКОЗА НА ОСНОВЕ ДЕТЕКЦИИ
ЭКСПРЕССИИ ХИМЕРНОГО ОНКОГЕНА PML/RAR α**

14.00.29 – Гематология и переливание крови

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Ташкент – 2012

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

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

Официальные оппоненты: доктор медицинских наук, профессор
Бабаджанова Шоира Агзамовна

доктор медицинских наук, профессор
Солиев Кодир Каримджанович

Ведущая организация: Ташкентский институт усовершенствования врачей

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

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Ташкентской медицинской академии.

Автореферат разослан «__» _____ 2012 г.

Ученый секретарь Объединенного
специализированного совета, доктор
биологических наук, профессор

Н.М. ЮЛДАШЕВ

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДИССЕРТАЦИИ

Актуальность работы. Острый промиелоцитарный лейкоз (ОПЛ), будучи достаточно редко встречающейся патологией, все же является одним из самых ярких примеров эффективности широкомасштабных исследований в медицине. Успешное внедрение результатов лабораторных и клинических исследований, выполненных за последние 15-20 лет, фактически привели к тому, что эта молниеносно развивающаяся и фатальная болезнь в наши дни преобразилась в одну из наиболее успешно излечиваемых форм лейкемии взрослых (Tallman M.S. et al, 2002; Sanz M.A. et al, 2005).

Как известно, генетической характеристикой ОПЛ считается сбалансированная реципрокная транслокация $t(15;17)(q22;q11-12)$, где на участке 17q21 хромосомы картируется ген, кодирующий рецептор ретиноевой кислоты ($RAR\alpha$), а на хромосоме 15, в локусе 15q22, идентифицируется ген промиелоцитарного лейкоза (PML) (транслокация $t(15;17)(q22;q11.2)$), которая является сугубо специфической и не была выявлена ни в одном другом типе лейкемии миелоцитов или другом злокачественном заболевании (Manola K.N. et al, 2010). Целевая терапия может быть эффективнее и безопаснее для нормальных клеток, чем методы лечения, используемые сейчас, поскольку она сосредоточена на молекулярных и клеточных изменениях, характерных только для раковых клеток.

Степень изученности проблемы. Следует отметить, что частота встречаемости различных вариантов точек разрыва в гене PML ($bcr1$, $bcr2$, $bcr3$) отличается в зависимости от этнического происхождения (Santillana S., 2001; Ribeiro R.C., 2006). Подобных исследований, проведенных в узбекской популяции, в доступной литературе мы не обнаружили

Связь диссертационной работы с тематическим планами НИР.

Работа выполнена в соответствии с планами НИР НИИГиПК МЗ РУз. Номер гос. регистрации ИТСС 14-7 «Разработка и внедрение новых молекулярно-биологических способов детекции и оценки экспрессии химерного онкогена BCR-ИABL при остром лимфолейкозе и хроническом миелолейкозе».

Цель исследования: оптимизация диагностики и лечения ОПЛ на основе изучения особенностей клинико-лабораторной характеристики и молекулярно-биологической детекции экспрессии химерного онкогена PML/ $RAR\alpha$ и вариантов точек разрыва в гене PML ($bcr1$, $bcr2$, $bcr3$).

Задачи исследования:

1. Обосновать целесообразность и внедрить в клиническую практику протокол молекулярно-генетического обследования больных с ОПЛ.
2. Изучить корреляцию клинико-лабораторных характеристик и прогноза ОПЛ с вариантами транскрипта химерного онкогена PML/ $RAR\alpha$.
3. В сравнительном аспекте изучить терапевтическую эффективность протокола 7+3+АТРА и традиционных схем химиотерапии.

4. На основе внедрения и оценки результатов молекулярно-генетического мониторинга определить оптимальный протокол поддерживающей терапии больных с ОПЛ.

Объект и предмет исследования. Изучены результаты исследования аномального онкогена PML/RAR α у 60 больных с ОПЛ, которые были подвергнуты цитохимическим и молекулярно-биологическим исследованиям.

Основным предметом исследований явилось изучение корреляции клинико-лабораторных характеристик ОПЛ с вариантами транскрипта химерного онкогена PML/RAR α . Изучалась также динамика клинико-гематологической и молекулярной ремиссии на фоне различных протоколов химиотерапии.

Методы исследования: анамнестические, клинические, лабораторные: биохимические, морфологические, цитогенетические и молекулярно-биологические.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Проведение молекулярно-биологического исследования на предмет выявления аномального транскрипта PML/RAR α в первичном образце костного мозга и/или периферической крови является наиболее информативным методом диагностики ОПЛ.

2. У больных с ОПЛ, проживающих в Узбекистане, примерно с одинаковой частотой встречаются bcr1/2 (48%) и bcr3 (52%) варианты транскрипта PML/RAR α , что несколько отличается от аналогичных показателей пациентов из Латинской Америки, Китая и США. Вариант аномального онкогена PML/RAR α не влияет на общую 3-х летнюю выживаемость, на безрецидивную выживаемость больных и вероятность сохранения полной ремиссии.

3. Эффективность программы сочетания ATRA с цитостатическими препаратами и использование только цитостатических препаратов для сохранения клинико-гематологической (87,1% и 81,8% соответственно) и молекулярной (64,5% и 72,7% соответственно) ремиссии приблизительно одинакова, и, напротив, эффективность программы биологической терапии («АТ-РА+интерферон- α ») – крайне невелика – 50% (гематологическая) и 37,5% (молекулярная).

Научная новизна:

- Впервые у жителей Узбекистана проведены молекулярно-биологические исследования у больных с ОПЛ.

- Впервые выявлены этнические особенности выявления варианта транскрипта аномального онкогена PML/RAR α у больных с ОПЛ – жителей Узбекистана. Изучена степень корреляции клинико-лабораторных проявлений ОПЛ и варианта аномального транскрипта PML/RAR α .

- Прослежены особенности общей пятилетней выживаемости, безрецидивной выживаемости и вероятности сохранения полной ремиссии у больных с ОПЛ в зависимости от исходного уровня лейкоцитов и варианта аномального транскрипта PML/RAR α .

- Впервые показаны преимущества индукции и консолидации по протоколу 7+3+АТРА у больных с ОПЛ. Оценена эффективность применения АТРА в сочетании с цитостатическими препаратами и в комбинации с биологической терапией (программа «АТРА+интерферон альфа») на этапе поддерживающей терапии.

- Научно обосновано и внедрена в клиническую практику методика ПЦР-мониторинга минимальной остаточной болезни и рецидива ОПЛ. Доказана эффективность протокола 7+3+АТРА в лечении молекулярного рецидива заболевания.

Научная и практическая значимость результатов исследования:

- Традиционный комплекс клинического обследования больных с ОПЛ дополнен более информативным методом диагностики – ОТ-ПЦР на предмет выявления экспрессии химерного онкогена PML/RAR α .

- Обоснована и подробно описана техника выявления вероятного и доказанного молекулярного рецидива.

- Предложена методика молекулярного мониторинга минимальной остаточной болезни, что позволяет своевременно изменять программу поддерживающей терапии для достижения стойкой гематологической ремиссии заболевания. Для клинической практики предлагается принцип таргетной терапии на основе протокола индукции и консолидации, а также поддерживающей терапии по схеме «7+3+АТРА».

Реализация результатов. Результаты выполненных научных исследований внедрены в клиническую практику отделения гематологии НИИГиПК, включены в учебную программу кафедры гематологии ТМА.

Апробация работы. 2-го съезда гематологов и трансфузиологов Узбекистана «Актуальные проблемы гематологии и трансфузиологии» (Ташкент, 2009), международной конференции «Современные методы диагностики, лечения заболеваний системы крови и проблемы трансфузиологии» посвященной 70-летию НИИ Г и ПК МЗ РУз (Ташкент, 2010), научно-практической конференции «Актуальные проблемы гематологии и трансфузиологии» (Ташкент, 2011), на заседании Ученого Совета НИИГ и ПК от 8.11.2011г., на научном семинаре при Объединенном специализированном совете Д.087.09.02 при Ташкентской медицинской академии (протокол №23 от 20.12.2011г.)

Опубликованность результатов. По материалам диссертации опубликовано 6 печатных работ, в том числе 4 журнальных статьи, 2 тезиса, 1 информационное письмо.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работы изложена на 103 страницах компьютерного текста, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, заключения, выводов и практических рекомендаций. Диссертация иллюстрирована 14 таблицами, 12 рисунками. Библиографический

указатель содержит 87 источников, в том числе 13 авторов из стран СНГ и 74 из дальнего зарубежья.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

В первой главе проводятся сведения, посвященные этиологии, патогенезу, клинической картине острого промиелоцитарного лейкоза. Также освещаются актуальные вопросы терапии, методы и значение диагностики в эффективности проводимого лечения.

Вторая глава посвящена описанию материалов и методов исследования. В данной главе приводится характеристика больных с аномальным геном PML/RAR α у больных с острым промиелоцитарным лейкозом, которые были подвергнуты клинико-биохимическим, цитохимическим и молекулярно-биологическим исследованиям в лаборатории молекулярной генетики НИИ Гематологии и переливания крови МЗ РУз.

Молекулярное исследование костного мозга и крови больных проводили в различные сроки: до начала лечения, в периоды индукции и консолидации, перед началом поддерживающей терапии, один раз в 2 месяца в период поддерживающей терапии и один раз в 3-4 месяца после прекращения лечения.

Исследуемые больные делились на несколько следующих групп:

- I. Больные ОПЛ, которым проводили лечение по протоколу 7+3+АТРА (основная группа).
- II. Больные ОПЛ, которым проводили лечение по разным программам (контрольная группа).
- III. Больные ОПЛ на этапе поддерживающей терапии, которые делились на следующие подгруппы:
 - а) больные, которым проводили чередование курсов химиотерапии и АТРА в период поддерживающего лечения;
 - б) больные, которым проводили только химиотерапию в период поддерживающего лечения;
 - с) больные, которым проводили поддерживающую терапию сочетанием АТРА и интерферона-б.
- IV. Группа сравнения (интактная) включающая 10 здоровых доноров

В 1-ю группу было включено 60 больных с впервые выявленным острым промиелоцитарным лейкозом. Минимальный срок наблюдения пациентов составил 1 мес., максимальный - 46 мес. На этапе индукции больным назначали полностью транс-ретиноевую кислоту, весаноид, начинали курс химиотерапии по программе «7+3» Консолидацию проводили по программе «7+3» - два курса (Савченко В.Г. с соавт., 2002). На этапе консолидации также включается АТРА. Кариологическое исследование клеток костного мозга выполнили 22 (36,7%) больным из 60 пациентов основной группы. Молекулярное исследование методом ОТ-ПЦР выполнили всем 60 больным из дан-

ной группы (у 55 больных костный мозг исследовали до начала ХТ, а у 5 – после индукционного курса ХТ).

Во вторую группу было включено 30 больных, среди них 14 мужчин и 16 женщин со стандартным отклонением среднего возраста $30,1 \pm 19,6$ лет и с диапазоном от 7 до 65. Минимальный срок наблюдения за больными 1 мес, максимальный - 3 года. Больным проводили терапию по программе «5Д». Перерыв между курсами составлял 4-6 недель (3 курса консолидации) (Ольшанская Ю.В. с соавт., 1999) Всем 30 больным было выполнено молекулярное исследование костного мозга.

Поддерживающую терапию проводили больным, у которых была достигнута полная клинико-гематологическая и молекулярная ремиссия ОПЛ. Поддерживающую терапию проводили до 2 лет от момента достижения клинико-гематологической ремиссии. Как было указано, всего 57 больным мы смогли провести поддерживающую терапию, которая осуществлялась в трех вариантах:

Подгруппа А - сочетание химиотерапии и АТРА (n = 32);

Подгруппа В - только химиотерапия (n = 23);

Подгруппа С - сочетание интерферона- α (роферон) и АТРА (n = 2).

Характеристика подгруппы А – больные, которым проводили чередование курсов химиотерапии и АТРА в период поддерживающего лечения. Интервал между курсами АТРА и химиотерапией составлял 4-5 недель (Савченко В.Г. с соавт., 2002).

В подгруппе А было включено 12 мужчин 20 женщин. Поддерживающую терапию проводили 2 года от момента достижения полной ремиссии.

В подгруппу В было включено 23 больных контрольной группы, среди них 9 мужчин и 14 женщин. При этом поддерживающую терапию проводили по программе «5+2» (Савченко В.Г. с соавт., 2002). Интервал между курсами химиотерапии составлял 4-5 недель.

В подгруппу С было включено 2 больных - 1 мужчина и 1 женщина. Курс поддерживающей терапии состоял из введения (Савченко В.Г. с соавт., 2002). Интервал между курсами составлял 4-5 недель. Терапию больным проводили до 2 лет от момента достижения клинико-гематологической ремиссии. Для группы контроля были отобраны 10 здоровых доноров (5 мужчин и 5 женщин в возрасте $27,4 \pm 14,1$ лет (14-56)).

В качестве используемых методов исследования проводилось выявление химерного транскрипта PML/RAR α методом двухэтапной обратнотранскриптазной полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР).

Диагноз ОПЛ устанавливали на основании данных морфологического и цитохимического исследования костного мозга, молекулярного исследования крови и костного мозга. С целью выявления экспрессии гена PML/RAR α методом ОТ-ПЦР исследовали лейкоциты периферической крови и миелокариоциты костного мозга больных.

Первое исследование выполняли в момент установления диагноза ОПЛ с целью определения типа аномального транскрипта.

У больных первой группы повторное исследование PML/RAR α проводили после завершения курса индукции (при сохраняющемся положительном генетическом маркере ОПЛ исследование повторялось после каждого курса химиотерапии) и после проведения курса консолидации.

Во второй группе контроль за экспрессией аномального онкогена PML/RAR α проводили в среднем 1 раз в 1,5-2 месяца. При появлении транскрипта PML/RAR α , пациентам проводили повторное исследование костного мозга и периферической крови через 2 недели.

Если химерный онкоген выявляли при повторном молекулярном исследовании, то у больного констатировали молекулярный рецидив заболевания. На этапе поддерживающей терапии всем больным проводили молекулярное исследование 1 раз в 2-3 месяца, при двукратном положительном результате PML/RAR α (интервал между исследованиями 2-3 недели) при сохранении клинко-гематологической ремиссии у больного регистрировали молекулярный рецидив ОПЛ

Метод ОТ-ПЦР был выбран с учетом его высокой чувствительности (10^4 - 10^6). Синтез праймеров и подбор условий реакций осуществляли с учетом рекомендаций BIOMED-1 Concerted Action (Херрингтон С, Макги Дж., 1999). С целью повышения чувствительности метода (выявление одной опухолевой клетки на 10^6 исследованных) ПЦР амплификацию проводили в два этапа с двумя парами праймеров. Методика исследования включала следующие этапы:

1. Выделение ядерных клеток крови и костного мозга и выделение из них РНК. Качество полученной РНК оценивали электрофорезом в 1,6% агарозном геле. Пригодным для дальнейшего анализа считали образцы, которые давали характерную картину распределения пиков р-РНК и т-РНК (28S и 18S, соответственно) (Маниатис Т., 1984).

2. Обратная транскрипция (ОТ) С помощью реакции обратной транскрипции получали комплементарную ДНК (к-ДНК).

3. Полимеразная цепная реакция (ПЦР). Оценку результата реакции обратной транскрипции выполняли с помощью контрольной ПЦР. Так как ОТ проводили с random гексамерами, в образце помимо нужной к-ДНК получали и к-ДНК актина. Он и служил положительным контролем прохождения реакции ОТ. Длина отрезка характерная для В-актина соответствовала 232 п.н. Нуклеотидные последовательности праймеров были следующие (Burnet A.K. et al, 1999):

Act 1: 5'-GCG-GGA-AAT-CGT-GCG-TGA-CAT-3'

Act 2: 5'-GAT-GGA-GTT-GAA-GGT-AGT-TTC-GTG-3'

4. Анализ ПЦР продуктов. Анализ полученных фрагментов после проведения двустадийной ПЦР (размер амплифицированного фрагмента составил для bcr1 218 п.н., а для bcr3 - 289 п.н.) осуществляли в 6% полиакрила-

мидном геле. Визуализацию фрагмента осуществляли в ультрафиолетовом свете после окрашивания бромистым этидием. Гели фотографировали в проходящем ультрафиолете на цифровой фотоаппарат фирмы Olympus C-3040 ZOOM и анализировали с помощью программы DigiDoc-It фирмы BioRad. Правильность полученных фрагментов подтверждали методом секвенирования продуктов ПЦР.

5. Выделение ПЦР-продуктов из гелей. Участки гелей, содержащие интересующие ПЦР-продукты, вырезали и выделяли из них соответствующие участки ДНК. Проверку полноты элюции и качества препаративного выделения ПЦР-фрагмента проверяли с помощью электрофореза в 6% ПААГ.

Чувствительность метода определяли при помощи оценки минимального количества экспрессирующих ген PML/RAR α клеток, выявляемого на фоне нормальных клеток, не экспрессирующих данный онкоген.

Стандартное цитогенетическое исследование проводили следующим образом: клетки костного мозга культивировали в питательной среде RPMI 1640 («Sigma»). G-дифференциальное окрашивание хромосом проводили с использованием краски Wright («Merk»). При возможности анализировали 20 митозов. Кариотип описывали в соответствии с Международной цитогенетической номенклатурой ISCN, 1995.

Статистическую обработку данных проводили методом четырехпольных таблиц с использованием Критерия χ^2 . Эффективность лечения оценивалась посредством построения кривых общей и безрецидивной выживаемости с использованием метода Каплан-Майер (Stat View, Microsoft Word).

Третья глава посвящена описанию результатов собственного исследования. В данной главе описываются результаты первичного обследования (табл. 1), поддерживающая терапия, мониторинг минимальной остаточной болезни, лечение молекулярных рецидивов. больных с острым промиелоцитарным лейкозом (ОПЛ), а также технические особенности проведения мониторинга минимальной остаточной болезни (МОБ).

Результаты проведенного исследования показывают что, при практически одинаковых общих лабораторных характеристиках у больных ОПЛ с bcr1 вариантом транскрипта PML/RAR α отмечалась более глубокая тромбоцитопения в сравнении с больными с bcr3 вариантом (Среднее значение $24 \times 10^9/\text{л}$ и $39 \times 10^9/\text{л}$, соответственно).

При построении кривых общей выживаемости, безрецидивной выживаемости и вероятности сохранения полной ремиссии статистически достоверных отличий не выявлено. Исходя из полученных данных, можно утверждать, что проводимая в нашем исследовании программа лечения позволяет нивелировать такой фактор риска, как уровень лейкоцитов выше $10 \times 10^9/\text{л}$.

Результаты индукции и консолидации у больных ОПЛ, которым проводили лечение по протоколу 7+3+АТРА (основная группа).

В данную группу включили 60 больных ОПЛ. Всем больным выполняли исследование костного мозга и/или периферической крови для определе-

Таблица 1

Клинико-лабораторные показатели первичных больных ОПЛ в зависимости от варианта аномального транскрипта PML/RAR α

Показатели	Вариант транскрипта PML/RAR α	
	bcr1 (n=40)	bcr3 (n=43)
Мужчин /женщин	19/21	20/23
Возраст, лет	26 (8-68)	30 (10-67)
Лейкоциты, $\times 10^9/\text{л}$	3,1 (0,6-108)	3,7 (0,4-77)
Тромбоциты, $\times 10^9/\text{л}$	24 (5-170)	39 (30-154)
Гемоглобин, г/л	66 (28-133)	72 (28-128)
Бластные клетки, % (периферическая кровь)	29 (0-98)	35 (0-94)
Бластные клетки, % (костный мозг)	76 (34-100)	69 (38-100)
Дополнительные хромосомные перестройки	0	del 6q (n=1); inv 17 (n=1)

Примечание: в таблице указано среднее значение по выборке, в скобках - разброс показателей в выборке.

ния экспрессии химерного онкогена PML/RAR α методом ОТ-ПЦР в дебюте заболевания и после каждого курса химиотерапии в период индукции и консолидации ремиссии. Результаты лечения больных ОПЛ мы оценивали по нескольким показателям: достижение клинико-гематологической ремиссии, ранняя летальность (в период проведения индукционного курса), достижение молекулярной ремиссии (табл. 2).

Таблица 2

Сроки достижения молекулярной ремиссии у больных, с лечением, проведенным по протоколу «7+3+ATRA», (абс., %)

Событие	Вариант транскрипта PML/RAR α	
	bcr1, n=22	bcr3, n=25
Молекулярная ремиссия после 1-го курса ХТ	17 (77,3)	17 (68)
Молекулярная ремиссия после 2-го курса ХТ	+3 (+13,6)	+7 (+28)
Молекулярная ремиссия после 3-го курса ХТ	+2 (+9,1)	+1 (+4)

Как видно из представленных выше данных, после первого индукционного курса химиотерапии молекулярная ремиссия была достигнута у 77,3% больных с bcr1 вариантом и у 68% больных с bcr3. После второго курса химиотерапии молекулярная ремиссия была достигнута всего у 24 (96,0%)

больных с bcr3 вариантом транскрипта и у 20 (90,9%) - с bcr1 вариантом транскрипта (χ^2 -тест=0,48).

После третьего курса химиотерапии по протоколу «7+3+АТРА» у всех больных была достигнута молекулярная ремиссия независимо от варианта транскрипта PML/RAR α , Проведение мониторинга МОБ на первых этапах терапии необходимо для выделения группы больных с высоким риском развития рецидива.

В нашем исследовании безрецидивная выживаемость и вероятность сохранения полной ремиссии у больных, у которых молекулярная ремиссия констатируется после 1 курса индукции, не отличается от таковой у больных, у которых молекулярная ремиссия достигается после 1 или 2 курса консолидации (66% и 64%, соответственно). Полная программа индукции и консолидации по протоколам «7+3+АТРА» была выполнена 42 больным с известным вариантом транскрипта (bcr1 - 20 больных, bcr3 - 22 больных) и 5 больным с неизвестным вариантом транскрипта.

Результаты индукции и консолидации у больных ОПЛ, которым проводили лечение по разным программам (контрольная группа).

Во вторую группу было включено 30 больных. Больным проводили лечение различными антрациклиновыми препаратами в сочетании с АТРА и по программе «7+3+АТРА» в редуцированных дозах (Савченко В.Г. с соавт., 2002). Молекулярный мониторинг экспрессии химерного онкогена PML/RAR α методом ПЦР в дебюте заболевания и после каждого курса химиотерапии проводили всем больным из этой группы. У 12 больных обнаружили bcr1 вариант аномального транскрипта PML/RAR α , а у 18 больных выявили bcr3 вариант транскрипта. Ранняя летальность в период индукционного курса была связана с тем, что в эту группу включались больные с исходно тяжелыми сопутствующими заболеваниями (лечение проводили в редуцированных дозах), следовательно, вероятность развития тяжелых осложнений и ранняя летальность у этих больных была выше.

После первого курса химиотерапии молекулярная ремиссия была достигнута у 7 больных с bcr1 вариантом транскрипта и у 8 больных с bcr3 вариантом транскрипта (табл. 3).

Таблица 3

Сроки достижения молекулярной ремиссии у больных контрольной группы, (абс.)

Событие	Вариант транскрипта PML/RAR α	
	bcr1, n=10	bcr3, n=11
Молекулярная ремиссия после 1-го курса ХТ	7	8
Молекулярная ремиссия после 2-го курса ХТ	+2	+2
Молекулярная ремиссия после 3-го курса ХТ	+1	+1

После 2-го курса химиотерапии еще у четырех (по две с bcr1 и bcr3 вариантами транскрипта) пациентов была достигнута молекулярная ремиссия. 3-й курс химиотерапии обеспечил достижение полной молекулярной ремиссии у 21 больного.

Общая выживаемость первичных больных ОПЛ в основной и контрольной составила 75% у больных первой группы, сохранявшаяся в течение 3-х лет, а во второй - у 45% больных. Меньший процент выживаемости больных во второй группе связан с высоким процентом ранней летальности в период индукционного лечения. Полученные различия статистически достоверны ($p=0,002$). Полную программу индукции и консолидации выполнили 85,0% больным из основной группы и 70,0% больным из контрольной группы (табл. 4). Ранняя летальность больных в основной группе в 2,5 раза меньше, чем у больных во второй группе (10,0% и 26,7%, соответственно, χ^2 -тест=0,04). Исключили из протоколов лечения в связи с развитием тяжелых инфекционных осложнений соответственно по 5,0% и 3,3% больных из двух групп.

Таблица 4
Результаты лечения больных из первой и второй групп (абс., %)

Событие	Основная группа (n=60)	Контрольная группа (n=30)
Исключили из протокола	3 (5,0%)	1 (3,3%)
Ранняя летальность	6 (10,0%)	8 (26,7%)
	χ^2 -тест=0,04	
Выполнили протокол индукции и консолидации	51 (85,0%)	21 (70,0%)

Нормативную группу в нашем исследовании составили 13 здоровых доноров. Было исследовано 7 образцов костного мозга и 6 образцов периферической крови методом ОТ-ПЦР, экспрессии химерного онкогена PML/RAR α не обнаружено.

Поддерживающая терапия. Одной из основных задач нашего исследования было определение эффективности применения АТРА в сочетании с цитостатическими препаратами в период поддерживающей терапии и эффективности применения биологической терапии на этом же этапе (программа «АТРА+интерферон- α »). Основным принципом разделения больных на подгруппы стало выполнение им разных программ поддерживающей терапии. При выполнении поддерживающей терапии у больных оценивали состояние клинико-гематологической ремиссии, частоту развития гематологических рецидивов, проводили молекулярный мониторинг минимальной остаточной болезни и регистрировали молекулярные рецидивы (табл. 5 и 6).

Таблица 5

Распределение больных в зависимости от программы поддерживающей терапии

Подгруппы	Программа поддерживающей терапии	Число больных	
		абс.	%
Подгруппа А	Цитостатические препараты + АТРА	31	43,1
Подгруппа Б	Цитостатические препараты	33	45,8
Подгруппа В	АТРА+интерферон-α	8	11,1
Всего		72	100

Таблица 6

Результаты поддерживающей терапии, (абс., %)

Событие	Подгруппы больных			Всего, n=72
	А, n=31	Б, n=33	В, n=8	
Полная первая ремиссия	27 (87,1)	27 (81,8)	4 (50)	58 (80,6)
Гематологический рецидив	4 (12,9)	6 (18,2)	4 (50)	14 (19,4)
Вторая полная ремиссия	1 (3,2)	5 (15,2)	1 (12,5)	7 (9,7)
Смерть в рецидиве	3 (9,7)	1 (3,0)	3 (37,5)	7 (9,7)

Таким образом, оценивая вероятность развития рецидивов в зависимости от варианта поддерживающего лечения, можно предположить, что эффективность программы сочетание АТРА с цитостатическими препаратами и использование только цитостатических препаратов приблизительно одинакова, и, напротив, эффективность программы биологической терапии («АТРА+интерферон-α») на данном этапе лечения ОПЛ - невелика.

Мониторинг минимальной остаточной болезни. Во время поддерживающей терапии 72 больным с известным вариантом химерного онкогена проводили мониторинг минимальной остаточной болезни методом ОТ-ПЦР.

По данным наших исследований у 4 (23,5%) из 17 больных с вероятным молекулярным рецидивом, и у 2 (25,0%) из 8 пациентов с доказанным молекулярным рецидивом развился гематологический рецидив. Несколько большая частота развития гематологического рецидива при выявлении ВМР, чем при диагностировании ДМР, возможно, связана с тем, что при выявлении доказанного молекулярного рецидива практически всем больным изменили программу поддерживающей терапии.

Отсутствие отличий по проценту развития гематологических рецидивов у больных с и без молекулярных рецидивов, может определяться периодичностью выполняемых исследований. Если интервал более 2-3 месяцев, то диагностика гематологического рецидива без обнаружения молекулярных

рецидивов очень вероятна. Вероятный и доказанный молекулярные рецидивы не подтвердились при исследовании костного мозга у 47 больных методом гибридизации *in situ* (FISH-анализ).

Молекулярный мониторинг МОБ в подгруппах А и Б. Учитывая полученные результаты можно сказать, что в нашем исследовании вариант экспрессии химерного онкогена PML/RAR α не влияет на сохранение молекулярной ремиссии и развитие гематологического рецидива.

При изучении общей, безрецидивной выживаемости больных и вероятности сохранения полной ремиссии в зависимости от варианта проводимого поддерживающего лечения статистически достоверных отличий не получено. Эффективность поддерживающего лечения только цитостатическими препаратами и цитостатическими препаратами в сочетании с АТРА одинакова, и не влияет на общую пятилетнюю выживаемость, безрецидивную выживаемость и вероятность сохранения полной ремиссии у больных ОПЛ.

Молекулярный мониторинг МОБ в подгруппе В. В подгруппу В было включено 8 больных, которым проводили поддерживающую терапию по программе «АТРА+интерферон- α ». При анализе результатов проведенного лечения больные из этой подгруппы были разделены по варианту аномального онкогена.

Общая выживаемость больных в подгруппе В не отличается от общей выживаемости больных, которым проводили другие программы поддерживающего лечения и составляет 65%. В отдаленном периоде только у 1 (25%) больного из данной подгруппы сохранялась молекулярная и гематологическая ремиссия за счет изменения поддерживающей терапии (цитостатическое воздействие).

Лечение молекулярных рецидивов. При проведении нашего исследования молекулярные рецидивы были диагностированы у 24 больных. При выявлении вероятного молекулярного рецидива у 4 (25%) из 16 больных изменили программу поддерживающей терапии, и у них гематологический рецидив не развился. При выявлении вероятного рецидива в среднем через 24 месяца (12-38 месяцев) проводимая поддерживающая терапия цитостатическими препаратами была изменена на протокол «АТРА+интерферон- α ».

По данным разных исследовательских групп было установлено, что обнаружение транскрипции аномального гена при повторных исследованиях костного мозга (2 раза в месяц), позволяет предсказывать развитие рецидива с большой долей вероятности

Учитывая результаты мониторинга МОБ в нашем исследовании и данные других исследовательских групп, при регистрации вероятного или доказанного молекулярного рецидива целесообразно изменить программу поддерживающей терапии. Лечение молекулярных рецидивов у больных осуществляли по малоинтенсивным протоколам. В нашем исследовании при выявлении раннего молекулярного рецидива (от 4 до 12 месяцев от момента достижения гематологической ремиссии) лечение больным проводили по про-

грамме «7+3+АТРА». При диагностировании позднего молекулярного рецидива лечение больным проводили по программе «АТРА+интерферон альфа», а молекулярный рецидив на фоне лечения «АТРА+интерферон альфа» – 6-МП + метотрексат + АТРА.

Технические особенности проведения мониторинга МОБ. Одной из задач нашего исследования было сопоставить результаты молекулярной диагностики, полученные при исследовании образцов костного мозга и периферической крови. Наиболее информативным материалом для проведения мониторинга МОБ в результате исследования был признан костный мозг. При выполнении костномозговой пункции необходимо чередовать место взятия костного мозга (грудина, правая подвздошная кость, левая подвздошная кость). При диагностировании вероятного молекулярного рецидива повторное исследование костного мозга целесообразно выполнять по образцам из грудины и подвздошной кости. Следует отметить, что костный мозг больных нужно исследовать методом ОТ-ПЦР в строго определенные сроки: в момент установления диагноза, после курсов индукции и консолидации, 1 раз в 2 месяца во время проведения поддерживающей терапии и 1 раз в 3-4 месяца после завершения лечения больных. Нерегулярные исследования костного мозга у больных являются причиной поздней диагностики рецидивов ОПЛ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На сегодняшний день ОТ-ПЦР является эффективным диагностическим средством, способствующим индивидуализации лечения острого промиелоцитарного лейкоза, позволяющим своевременно выявлять больных, нуждающихся в дополнительной терапии, а также выделять отдельно пациентов, которые могут быть вылечены с меньшей химической нагрузкой. Основу современных подходов к выбору противолейкемического препарата составляют упор на лечебные средства с уменьшенной токсичностью, в частности ретиноидной кислоты, а также учет результатов молекулярного мониторинга для коррекции целевой терапии, который, к тому же, позволяет оценивать минимальную резидуальную болезнь на разных этапах лечения.

Выводы:

1. Наиболее информативным методом диагностики ОПЛ на сегодняшний день является ОТ-ПЦР костного мозга и периферической крови на предмет выявления химерного онкогена PML/RAR α .
2. Частота встречаемости bcr1/2 (48%) и bcr3 (52%) вариантов транскрипта PML/RAR α у больных с ОПЛ зависит от этнического состава исследуемой группы – у жителей Узбекистана соотношение частоты выявляемости указанных транскриптов составляет примерно 1/1, что несколько отличается

от аналогичных показателей пациентов из Северной и Латинской Америки, Европы, Китая и США.

3. Общая лабораторная характеристика больных с ОПЛ достоверно не отличается у пациентов с bcr1/2 и bcr3 вариантами транскрипта PML/RAR α , однако транскрипт bcr1/2 отличается более глубокой тромбоцитопенией по сравнению с больными с bcr3 вариантом (среднее значение $24 \times 10^9/\text{л}$ и $39 \times 10^9/\text{л}$, соответственно). Манифестация ОПЛ характеризуется лейкопенией – среднее значение в группах bcr1/2 и bcr3 соответственно составляет $3,1 \times 10^9/\text{л}$ и $3,7 \times 10^9/\text{л}$.

4. Прогноз исхода ОПЛ – показатели общей 3-х летней выживаемости, безрецидивной выживаемости больных и вероятности сохранения полной ремиссии заболевания – не зависит от варианта аномального онкогена PML/RAR α .

5. Проведение индукции и консолидации по протоколу 7-3-АТРА позволяет снизить раннюю летальность на 2,5 раза (с 26,7% до 10,0%, χ^2 -тест=0,04). Однако на этапе поддерживающей терапии включение в протокол лечения АТРА достоверно не влияет на отдаленные результаты лечения. Отказ по разным причинам от цитостатиков в пользу программы биологической терапии («АТРА+интерферон альфа») сопровождается малой эффективностью поддерживающей терапии – гематологическую ремиссию удается достичь только в 50% случаях, молекулярную – только в 37,5%.

Практические рекомендации:

1. Протокол комплексного обследования больных с ОПЛ должен быть дополнен наиболее информативным методом диагностики заболевания – ОТ-ПЦР на предмет выявления химерного онкогена PML/RAR α .

2. Определение вариантов транскриптов химерного онкогена PML/RAR α bcr1/2 и bcr3 не имеет практического значения для выбора оптимального протокола индукции и консолидации, а также поддерживающей терапии.

3. Вероятный молекулярный рецидив констатируется при однократном выявлении экспрессии химерного онкогена PML/RAR α методом ОТ-ПЦР в костном мозге на фоне сохранения гематологической ремиссии. При двукратном выявлении аномального транскрипта PML/RAR α в двух образцах костного мозга с интервалом между исследованиями 2-3 недели следует считать молекулярный рецидив доказанным.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Каримов Х.Я., Мухитдинова Г.Б., Абдуллаев А.О. Дифференциация терапии острого промиелоцитарного лейкоза на основе детекции экспрессии химерного онкогена T(15;17) PML/RAR β // Медицинский журнал Узбекистана – Ташкент, 2008. – № 5. – С. 88-91.
2. Мухитдинова Г.Б. эпидемиологические и молекулярно-генетические аспекты ОПЛ в Узбекистане // Фундаментальная наука и клиническая медицина: тез. докл. науч. конф. – Санкт-Петербург, 2009. – С. 259-260.
3. Мухитдинова Г.Б. Роль ПЦР в диагностике и прогнозировании течения острого, промиелоцитарного лейкоза // Врач-аспирант 2010 – № 5.2 (42). – С. 247-251.
4. Каримов Х.Я., Мухитдинова Г.Б. Эпигенетические механизмы и молекулярная диагностика экспрессии химерного онкогена PML/RAR α при остром промиелоцитарном лейкозе // Медицинский журнал Узбекистана. – Ташкент, 2010. – № 4. – С. 9-12.
5. Каримов Х.Я., Мухитдинова Г.Б., Бабаев А.Т. ПЦР мониторинг в ранней диагностике острого промиелоцитарного лейкоза и профилактике фатальной геморрагии // Вестник экстренной медицины. – 2011. – № 3. – С. 108-114.
6. Мухитдинова Г.Б. Молекулярно-биологические аспекты лейкоemий // Современная диагностика, лечения заболеваний системы крови и проблемы трансфузиологии: Сб. науч. трудов. научн.-практ. конф. с международным участием. – Ташкент. – 2011– С.51
7. Каримов Х.Я., Мухитдинова Г.Б. Оптимизация диагностики и лечения острого промиелоцитарного лейкоза на основе детекции химерного онкогена PML/RAR α / Информационное письмо Минздрава РУз. – Ташкент, 2012. – 4 с.

Тиббиёт фанлари номзоди даражасига талабгор Мухитдинова Гузал Бахтияровнанинг 14.00.29 – Гематология ва қон қуйиш ихтисослиги бўйича «PML/RAR α химер онкоген экспрессиясининг детекциясига асосланган равишда ўткир промиелоцитар лейкозни ташхислаш ва даволашни мукамаллаштириш» мавзусидаги диссертациясининг

РЕЗЮМЕСИ

Таянч сўзлар: ўткир промиелоцитар лейкоз (ЎПЛ), PML/RAR α химер онкогени, молекуляр ремиссия, минимал қолдиқ касаллик, умумий яшовчанлик.

Тадқиқот объекти: ЎПЛ билан оғриган 100 бемор: асосий гуруҳни 60 нафар бемор ташкил қилган бўлиб, уларга стандар “7+3” дастури бўйича да-вони АТРА билан бирга ўтказилди; контрол гуруҳдаги 30 беморга турли хил дастур бўйича химиотерапия ўтказилган ва 10 соғлом киши (5 эркак ва 5 аёл) назорат кўрсаткичларни олиш учун фойдаланилди. Ушбуларда клиник-анамнестик маълумотлар тўпланди, қон ва суяк ичкилиги тахлил қилинди.

Ишнинг мақсади: ЎПЛнинг клиник-лаборатор кўринишлари ҳамда PML/RAR α химер онкоген экспрессиясининг молекуляр-биологик детекциясининг ва PML генидаги узилиш нуқталари вариантлари (bcr1, bcr2, bcr3) нинг хусусиятларидан келиб чиқиб, касаллик диагностикаси ва даволашни оқиллаштириш.

Тадқиқот усуллари: анамнестик, клиник, лаборатор (биокимёвий, морфологик, цитогенетик ва молекуляр-биологик).

Олинган натижалар ва уларнинг янгилиги: PML/RAR α транскриптининг bcr1/2 (48%) ва bcr3 (52%) вариантларининг беморларда аниқланиши частотаси ўрганилди. Ўзбекистон ва хорижий мамлакатлар аҳолисида ушбу транскриптларнинг тарқалганлик даражаси қиёсий тахлил қилинди. ЎПЛнинг кечиш прогнози аниқланди, яъни умумий беш йиллик яшовчанлик, рецидивсиз яшовчанлик ва тўлиқ ремиссиянинг сақланиши эҳтимоли кўрсаткичлари PML/RAR α аномал онкогеннинг вариантлари билан боғлиқ эмаслиги топилди. Қўллаб турувчи терапия давомида турли сабаблар билан цитостатиклардан воз кечиш ва биологик даво («АТРА+интерферон альфа») дастурига ўтиш касаллик прогнозига салбий таъсир қилиши кўрсатилган.

Амалий аҳамияти: Тадқиқот натижалари ЎПЛи беморларни комплекс текшириш жараёнини ОТ-ПЦР усули билан тўлдиришга асос бўлади, ҳамда молекуляр рецидивнинг салбий прогностик критерийлари (PML/RAR α аномал транскриптнинг суяк ичкилигининг 2 нусхасида 2-3 ҳафта ичида қайта аниқланишини эрта аниқлашга имкон яратади.

Татбиқ этиш даражаси ва иқтисодий самарадорлиги: тадқиқотлар натижалари ЎЗР ССВнинг Гематология ва қон қуйиш ИТИнинг илмий лабораторияси ва гематология бўлимлари амалиётига тадбиқ қилинган.

Қўлланиш соҳаси: гематология, онкогематология.

РЕЗЮМЕ

диссертации Мухитдиновой Гузал Бахтияровны на тему: «Оптимизация диагностики и лечения острого промиелоцитарного лейкоза на основе детекции экспрессии химерного онкогена PML/RAR α », на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.00.29 – Гематология и переливание крови.

Ключевые слова: острый промиелоцитарный лейкоз (ОПЛ), химерный онкоген PML/RAR α , молекулярная ремиссия, минимальная остаточная болезнь, общая выживаемость.

Объекты исследования: 100 обследуемых разделенных на 3 группы – основную, состоящую из 60 больных ОПЛ которым проводили лечение по стандартной программе «7+3» в сочетании с АТРА и контрольную группу из 30 больных, которым проводили лечение по разным программам, интактную состоящую из 10 здоровых обследуемых (5 мужчин и 5 женщин); клинико-анамнестические данные; периферическая кровь; костный мозг

Цель работы: Оптимизация диагностики и лечения ОПЛ на основе изучения особенностей клинико-лабораторной характеристики и молекулярно-биологической детекции экспрессии химерного онкогена PML/RAR α и вариантов точек разрыва в гене PML (bcr1, bcr2, bcr3).

Методы исследования: Анамнестические, клинические, лабораторные: биохимические, морфологические, цитогенетические и молекулярно-биологические.

Полученные результаты и их новизна: Исследована частота встречаемости bcr1/2 (48%) и bcr3 (52%) вариантов транскрипта PML/RAR α у больных с ОПЛ. Выявлена зависимость и установлены отличия в частоте выявляемости указанных транскриптов у жителей Узбекистана и в других странах. Определен прогноз исхода ОПЛ – показатели общей пятилетней выживаемости, безрецидивной выживаемости больных и вероятности сохранения полной ремиссии заболевания – не зависит от варианта аномального онкогена PML/RAR α . В то же время на этапе поддерживающей терапии отказ по разным причинам от цитостатиков в пользу программы биологической терапии («АТРА+интерферон альфа») сопровождается малой эффективностью поддерживающей терапии.

Практическая значимость: Результаты исследования будут служить основанием для дополнения комплексного обследования больных с ОПЛ методом ОТ-ПЦР и раннего выявления, с его помощью, неблагоприятных прогностических критериев молекулярного рецидива, в качестве которых определено двукратное выявление аномального транскрипта PML/RAR α в двух образцах костного мозга с интервалом между исследованиями 2-3 недели.

Степень внедрения и экономическая эффективность: результаты клинических исследований внедрены в практику научной лаборатории и в

отделении гематологии клиники НИИ Гематологии и переливания крови МЗ РУз

Область применения: гематология, онкогематология.

RESUME

Thesis of Mukhitdinova Guzal Bahtiyarovna on on the scientific degree competition of the doctor of philosophy in medicine on specialty 14.00.29 – hematology and blood transfusion, subject: "Optimizing the diagnosis and treatment of acute promyelocytic leukemia based on expression of a chimeric oncogene detection of PML/RAR α »

Key words: acute promyelocytic leukemia (APL), a chimeric oncogene PML / RAR β , molecular remission, minimal residual disease, overall survival

Subjects of research: 100 subjects were divided into 3 groups - basic, consisting of 60 patients with APL who have been treated with the standard program "7 +3" in combination with ATRA (VG Savchenko et al., 2002) and a control group of 30 patients who underwent treatment for various programs, consisting of the intact 10 healthy subjects (5 men and 5 women), clinical and medical history, peripheral blood, bone marrow.

Purpose of work: Optimization of diagnosis and treatment of APL, based on studying the characteristics of clinical and laboratory characteristics and molecular biological detection of the expression of a chimeric oncogene PML/RAR α and variants of the points of discontinuity in the gene PML (bcr1, bcr2, bcr3).

Methods of research: Anamnestic, clinical, laboratory: biochemical, morphological, tsitogeneticheskies and molecular-biological.

The results obtained and their novelty: We investigate the frequency of bsr1 / 2 (48%) and bsr3 (52%) of the transcript variants of PML / RAR β in patients with APL. The dependence of the set and the differences in the frequency of detection of these transcripts the residents of Uzbekistan and elsewhere. Determined the outcome of outlook APL - indicators of the overall 3-year survival, disease-free survival and the likelihood of preservation of complete remission of the disease - not dependent on the abnormal variant of the oncogene PML / RAR β . Conducting induction and consolidation via 7-3-atra can reduce early mortality by 2.5 times. At the same time during maintenance treatment failure for various reasons from the cytostatic program in favor of biological therapy («ATRA + interferon alpha") accompanied by low efficiency of maintenance therapy.

Practical value: The results will serve as a basis to complement the comprehensive examination of patients with APL by RT-PCR and early detection with the help of poor prognostic criteria for molecular relapse, which are two-fold identification of abnormal transcript PML / RAR β in two samples of bone marrow with an interval between the two studies -3 weeks.

The degree of implementation and economic efficiency: the results of experimental research have been implemented in practice and research laboratory at the hematology department clinic of the Research Institute of Hematology and Blood Transfusion MH RUz.

Field of application: oncohematology