

**ЎЗБЕКИСТОН МИЛЛИЙ УНИВЕРСИТЕТИ БИОФИЗИКА ВА
БИОКИМЁ ИНСТИТУТИ ХУЗУРИДАГИ ИЛМИЙ ДАРАЖАЛАР
БЕРУВЧИ DSc.03/30.12.2019.V.01.13 РАҚАМЛИ ИЛМИЙ КЕНГАШ**

БИОФИЗИКА ВА БИОКИМЁ ИНСТИТУТИ

РУСТАМОВА ШОХИСТА ОМОНЖОНОВНА

**САРАТОН КАСАЛЛИКЛАРИДА *HER2/NEU* ГЕНИНИНГ МИҚДОРИЙ
ВАРИАНТЛАРИНИ ТАДҚИҚ ҚИЛИШ**

03.00.01 – Биокимё

**БИОЛОГИЯ ФАНЛАРИ БЎЙИЧА ФАЛСАФА ДОКТОРИ (PhD)
ДИССЕРТАЦИЯСИ АВТОРЕФЕРАТИ**

Тошкент – 2020

Фалсафа доктори (PhD) диссертацияси автореферати мундарижаси
Оглавление автореферата диссертации доктора философии (PhD)
Contents of dissertation abstract of doctor of philosophy (PhD)

Рустамова Шохиста Омонжоновна Саратон касалликларига <i>HER2/neu</i> генининг микдорий вариантларини тадқиқ қилиш.....	3
Рустамова Шохиста Омонжоновна Исследование количественных вариантов гена <i>HER2/neu</i> при опухолевых заболеваниях.....	21
Rustamova Shokhista Omonjonovna Investigating of quantitative variants of the <i>HER2/neu</i> gene in cancer diseases.....	39
Эълон қилинган ишлар рўйхати Список опубликованных работ List of published works.	42

**ЎЗБЕКИСТОН МИЛЛИЙ УНИВЕРСИТЕТИ БИОФИЗИКА ВА
БИОКИМЁ ИНСТИТУТИ ҲУЗУРИДАГИ ИЛМИЙ ДАРАЖАЛАР
БЕРУВЧИ DSc.03/30.12.2019.В.01.13 РАҚАМЛИ ИЛМИЙ КЕНГАШ**

БИОФИЗИКА ВА БИОКИМЁ ИНСТИТУТИ

РУСТАМОВА ШОХИСТА ОМОНЖОНОВНА

**САРАТОН КАСАЛЛИКЛАРИДА *HER2/NEU* ГЕНИНИНГ МИҚДОРИЙ
ВАРИАНТЛАРИНИ ТАДҚИҚ ҚИЛИШ**

03.00.01 – Биокимё

**БИОЛОГИЯ ФАНЛАРИ БЎЙИЧА ФАЛСАФА ДОКТОРИ (PHD)
ДИССЕРТАЦИЯСИ АВТОРЕФЕРАТИ**

Тошкент – 2020

Фалсафа доктори (PhD) диссертацияси мавзуси Ўзбекистон Республикаси Вазирлар Маҳкамаси ҳузуридаги Олий аттестация комиссиясида B2019.2.PhD/B292 рақами билан рўйхатга олинган.

Диссертация иши Ўзбекистон Миллий университети ҳузуридаги Биофизика ва биокимё институтида бажарилган.

Диссертация автореферати уч тилда (ўзбек, рус, инглиз (резюме)) Илмий кенгашнинг веб-саҳифасида www.ibb-nuu.uz ва «Ziyonet» Ахборот таълим порталида (www.ziyonet.uz) жойлаштирилган.

Илмий раҳбар:

Турдикулова Шахлохон Уткуровна
биология фанлари доктори, профессор

Расмий оппонентлар:

Юлдашев Насирджан Мухамеджанович
биология фанлари доктори, профессор

Мухамедов Рустам Султанович
биология фанлари доктори, профессор

Етакчи ташкилот:

Геномика ва биоинформатика маркази

Диссертация химояси Ўзбекистон Миллий университети Биофизика ва биокимё институти ҳузуридаги илмий даражалар берувчи DSc.03/30.12.2019.B.01.13 рақамли Илмий кенгашнинг 2020 йил «14» октябрь соат 14.00 даги мажлисида бўлиб ўтади (Манзил: 100174, Тошкент шаҳри, Олмазор тумани, Талабалар шаҳарчаси, Университет кўчаси, 174-уй. Тел.: (99871) 246-68-96.

Диссертация билан Ўзбекистон Миллий университети Биофизика ва биокимё институти ҳузуридаги Ахборот-ресурс марказида танишиш мумкин (№20 рақами билан рўйхатга олинган). Манзил: 100174, Тошкент шаҳри, Олмазор тумани, Талабалар шаҳарчаси, Университет кўчаси, 174-уй. Тел.: (99871) 246-68-96, e-mail: ibb-nuu@mail.ru.

Диссертация автореферати 2020 йил «29» сентябрь кuni тарқатилди (2020 йил «29» сентябрь даги 1 рақамли реестр баённомаси).



Сабилов Равшан Заирович
Илмий даражалар берувчи
илмий кенгаш раиси, б.ф.д., академик

Позилов Маъмуржон Комилжонович
Илмий даражалар берувчи илмий кенгаш
илмий котиби в.б., б.ф.д., катта илмий ходим

Кадирова Дилбар Абдуллаевна
Илмий даражалар берувчи илмий кенгаш қошидаги
илмий семинар раиси, б.ф.д., профессор

КИРИШ (Фалсафа доктори (PhD) диссертацияси аннотацияси)

Диссертация мавзусининг долзарблиги ва зарурати. Ҳозирги кунда саратон касаллиги энг хавфли касалликлардан бири бўлиб, кўкрак беги саратони дунё миқёсида ўпка саратонидан кейин иккинчи ўринда (2,09 млн ҳолат), ошқозон саратони олтинчи ўринда (1,03 млн ҳолат) туради. Кўкрак беги саратони ва ошқозон саратонининг ўсимта маркёрларидан бири *HER2/neu* бўлиб, унинг гиперэкспрессияси ва/ёки амплификациясининг кучайиши кўкрак беги саратони касаллигининг 15-30% ида ва ошқозон саратони касаллигининг 9-15% ида аниқланган. *HER2* статусини аниқлашнинг мақбул диагностика усуллари ишлаб чиқиш, касалликнинг ҳар бир ҳолатида алоҳида ёндашув асосида таргет (нишон) терапияли даволаш усулини танлаш, шу жумладан, қиммат ва кўпинча токсик дори-дармонларни тайинланишини бартараф этишда муҳим аҳамият касб этади.

Жаҳонда йирик илмий тадқиқот марказларида олиб борилаётган тажрибаларда *HER2/neu* статусини аниқлашнинг мақбул диагностика усуллари ишлаб чиқиш борасида ген экспрессияси, мРНК гиперэкспрессияси ва оксил экспрессиясига асосланган усулларни такомиллаштириш юзасидан тадқиқотлар олиб борилган. Ҳозирги вақтда *HER2* активациясини баҳолашнинг самарали методлари бўлиб иммуногистокимё усули, онкоген амплификация даражасини аниқлаш имконини берадиган флуоресцент *in situ* гибридизацияси (FISH) ва хромоген *in situ* гибридизацияси (CISH) йўлга қўйилган. Бироқ, махсус жиҳозларнинг етишмаслиги ва реагентларнинг қиммат баҳоси иммуногистокимё, FISH/CISH технологияларини мунтазам фойдаланилишини чегаралайди. *HER2* статусини ДНК даражасида аниқлаш учун самардорлиги, юқори даражада сезгирлиги ва намунадаги ДНКнинг минимал миқдори билан натижани олиш имкониятига эгаллиги билан ажралиб турадиган айна вақтдаги полимераза занжир реакцияси (ПЗР) асосида амалга ошириладиган янги тартибини ишлаб чиқишни тақозо этади.

Мамлакатимизда саратон ўсимта тўқимасида *HER2/neu* генининг миқдорини аниқлаш усуллари ишлаб чиқилган. Мазкур йўналишда амалга оширилган чора тадбирлар асосида муайян натижаларга, хусусан, саратон касалликларини даволашда нишон терапияни қўллаш имкониятини баҳолаш самарадорлигини оширишга эришилган. Ўзбекистон Республикасини янада ривожлантириш бўйича Ҳаракатлар стратегиясида «илмий-тадқиқот ва инновация фаолиятини рағбатлантириш, илмий ва инновация ютуқларини амалиётга жорий этишнинг самарали механизмларини яратиш» ва «аҳолини ижтимоий ҳимоя қилиш ва соғлиқни сақлаш тизимини такомиллаштириш»¹ вазибалари белгиланган. Бу борада, саратон касалликларида *HER2/neu* генининг миқдорий вариантларини аниқлаш, касалликнинг ўзига хос хусусиятлари билан боғлиқлигини аниқлаш ёрдамида тест системаларни

¹ Ўзбекистон Республикаси Президентининг «Ўзбекистон Республикасини янада ривожлантириш Ҳаракатлар стратегияси» тўғрисидаги ПФ-4947-сонли фармони

ишлаб чиқиш ҳамда тадқиқот усуллари жорий қилиш муҳим аҳамият касб этади.

Ўзбекистон Республикаси Президентининг 2017 йил 7 февралдаги ПФ-4947-сонли «2017-2021 йилларда Ўзбекистон Республикасини янада ривожлантириш Ҳаракатлар стратегияси тўғрисида»ги Фармони, Ўзбекистон Республикаси Президентининг 2017 йил 20 июндаги ПҚ-3071-сон «Ўзбекистон Республикаси аҳолисига 2017-2021 йилларда ихтисослаштирилган тиббий ёрдам кўрсатишни янада ривожлантириш чоратадбирлари тўғрисида»ги ва Ўзбекистон Республикаси Президентининг 2018 йил 2 августдаги ПҚ-3894 сон «Ўзбекистон Республикасида соғлиқни сақлашни бошқаришнинг инновацион моделини жорий этиш чоратадбирлари тўғрисида»ги қарорлари ҳамда мазкур фаолиятга тегишли бошқа меъёрий-ҳуқуқий ҳужжатларда белгиланган вазифаларни амалга оширишда ушбу диссертация тадқиқоти муайян даражада хизмат қилади.

Тадқиқотнинг республика фан ва технологиялари ривожланишининг устивор йўналишларига мослиги. Мазкур тадқиқот республика фан ва технологиялари ривожланишининг устивор йўналишларидан VI. «Тиббиёт ва фармакология» устивор йўналишига мувофиқ бажарилган.

Муаммонинг ўрганилганлик даражаси. Ҳозирги кунда дунёнинг кўплаб илмий-тадқиқот марказларида саратон касалликларида *HER2/neu* статусини аниқлаш бўйича тадқиқотлар олиб борилмоқда. Сўнгги йилларда хужайра даражасида *HER2/neu* гени устидаги экспериментал тадқиқотлар, хусусан, флуоросцент *in situ* гибридланиши (FISH) ва хромоген *in situ* гибридланиши (CISH), шунингдек, иммуногистохимёвий (ИГК) ва ПЗР таҳлил усуллари ривожланиши туфайли сезиларли ютуқларга эришилган.

МДХ мамлакатларида Э.Х. Имянитов, Н.У. Маценко, В.С. Рыжикова, С.П. Коваленколар кўкрак беги саратонида *HER2/neu* статусини аниқлаш бўйича иммуногистохимё усули ёрдамида қатор тадқиқотлар ўтказган. Аммо эришилган ютуқларга қарамай, *HER2/neu* генини миқдорий ўзгариши механизмлари билан боғлиқ бир қатор масалалар ўз ечимини кутмоқда.

Республикада Абдувалиев А.А. томонидан ўсимта хужайралари пролиферацияси бошқарилиши бўйича тадқиқотлар ўтказилган. Бироқ, ПЗР асосида ўсма касалликлари учун *HER2/neu* генининг миқдорий вариантлари ўрганилмаган. Кўкрак беги ва ошқозон саратони *HER2*-мусбат ўсмаларининг биологик хусусиятларини ўрганиш, шунингдек, *HER2/neu* онкогени статусини баҳолашда оптимал диагностика усуллари танлаш зарурат бўлиб қолмоқда. *HER2/neu* статусини аниқлаш учун маҳаллий тест системаларни ишлаб чиқиш истиқболли соҳа ҳисобланиб, бу замонавий илм-фан ютуқларига асосланган юқори технологияли ҳамда ресурсларни тежайдиган, жаҳон аналогларига мос келадиган янги технологиядир.

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

Диссертация тадқиқоти Илғор технологиялар марказининг илмий – тадқиқот ишлари режасининг ЁА-10-005 «Ошқозон саратонининг *HER2* мусбат вариантыга тест ўтказиш усулини ишлаб чиқиш» (2016-2017) мавзусидаги амалий илмий лойиҳаси доирасида бажарилган.

Тадқиқотнинг мақсади саратон касалликларида нишон терапияни қўллаш учун маркер сифатидаги *HER2/neu* гени миқдорини аниқлаш усулининг янги тартибини ишлаб чиқишдан иборат.

Тадқиқотнинг вазифалари:

ошқозон саратони ва кўкрак беzi саратони ташхиси тасдиқланган беморларнинг қон ва ўсимта тўқимаси намуналарини ва уларнинг клиник тавсифи маълумотлари банкини яратиш;

ўсимта тўқимаси намуналаридан ДНК олиш усулини танлаш ва оптималлаштириш;

ошқозон ва кўкрак беzi саратони намуналарида *HER2/neu* гени миқдорини аниқлаш учун интеркалорловчи *SYBR Green* бўёғи ёрдамида ва гибридловчи *TaqMan* зондларидан фойдаланган ҳолда айни вақтдаги ПЗР усули тартибини ишлаб чиқиш;

иммуногистокимёнинг натижалари билан ПЗР *SYBR Green* ва ПЗР *TaqMan* ўтказиш тартиблари натижаларини қиёсий таҳлил қилиш;

HER2 статуси ва кўкрак беzi саратони ва ошқозон саратони ташхиси тасдиқланган беморлар намуналарининг биокимёвий мезонлари кўрсаткичлари ҳамда касаллик хусусиятлари ўртасидаги боғлиқликни ўрганиш.

Тадқиқотнинг объекти сифатида кўкрак беzi ва ошқозон саратони ташхиси тасдиқланган беморларнинг қон ва ўсимта тўқималарининг намуналари, шунингдек, ошқозон саратони хужайра линиялари (*AGS(gastric adenocarcinoma)*) и *HGE(human gastric epithelia)* олинган.

Тадқиқотнинг предмети нормал ва патологик ҳолатдаги хужайраларда *HER2/neu* гени нусхалари миқдорини аниқлашдан иборат.

Тадқиқотнинг усуллари. Тадқиқот ишини бажаришда намуналардан нуклеин кислоталарни ажратиш, спектрофотометрия, генларни амплификация қилиш, гель-электрофорез усуллари ҳамда иммуногистокимё, калориметрия усуллари натижаларидан, шунингдек, статистик дастурлардан фойдаланилган.

Тадқиқотнинг илмий янгилиги қуйидагилардан иборат:

ўсимта тўқималаридан айни вақтдаги ПЗР да қўллаш учун яроқли кўп миқдорда сифатли ДНК ажратиш усулининг янги самарали тартиби аниқланган;

кўкрак беzi ва ошқозон саратони намуналарида *HER2/neu* генининг миқдорини аниқлаш учун интеркалорловчи *SYBR Green* бўёқ ёрдамида ва *TaqMan* гибридловчи зондларидан фойдаланган ҳолда айни вақтдаги ПЗР ўтказишнинг янги тартиблари ишлаб чиқилган;

айни вақтдаги ПЗР асосида *HER2/neu* генининг миқдори учун чегара қиймати аниқланган;

HER2 статуси билан кўкрак беши ва ошқозон саратони касалликлари биокимёвий мезонлари ҳамда касаллик хусусиятлари ўртасида боғлиқлик йўқлиги аниқланган.

Тадқиқотларнинг амалий натижалари қуйидагилардан иборат:

кўкрак беши ва ошқозон саратони ҳолатларида қисқа вақт ичида ПЗР усулининг янги тартиби орқали *HER2/neu* генининг миқдорини аниқлаш мумкинлигини исботланган;

HER2/neu генининг миқдорини аниқлаш учун айна вақтдаги ПЗР усулининг интеркалорловчи *SYBR Green* бўёғи ва гибридизацияловчи *TaqMan* зондларидан фойдаланиладиган янги тартиблари ишлаб чиқилган;

иммуногистокимё усулининг ПЗР *SYBR Green* билан 87,5%, ПЗР *TaqMan* 93,75% га мос келишлиги аниқланган;

саратон касалликларида *HER2/neu* генининг миқдорини аниқлашда *TaqMan* гибридловчи зондларидан фойдаланган ҳолда айна вақтдаги ПЗР ўтказиш протоколи сезгирлиги ва спецификлиги юқори эканлиги аниқланган;

саратон касалликларида *HER2* статуси билан беморлардан олинган намуналарнинг биокимёвий мезонлари ҳамда касалликлар характеристикаси ўртасида статистик аҳамиятли боғлиқлик ($p > 0,05$) мавжуд эмаслиги аниқланган.

Тадқиқот натижаларининг ишончлилиги тадқиқотларда замонавий биофизик-биокимёвий, электрофизиологик тадқиқот усуллари қўллаш орқали олинганлиги, натижалар таҳлили замонавий компьютер дастури ёрдамида таҳлил қилинганлиги билан тасдиқланади. Олинган натижаларнинг исботи уларнинг республика ва халқаро анжуманлардаги муҳокамаси, натижалар рецензияланган илмий нашрларда чоп этилиши билан изоҳланади.

Тадқиқот натижаларининг илмий ва амалий аҳамияти. Тадқиқот натижаларининг илмий аҳамияти ўсимта тўқималаридан ДНК ажратиш бўйича самарали усул танлаб олингани ва такомиллаштирилгани, кўкрак беши ва ошқозон саратони касалликларида *HER2/neu* генининг миқдорини аниқлаш учун интеркалорловчи *SYBR Green* бўёғи ёрдамида ва гибридловчи *TaqMan* зондларидан фойдаланган ҳолда айна вақтдаги ПЗР ўтказишнинг янги тартиблари ишлаб чиқилгани, уларнинг стандартлашган аналог усул – иммуногистокимё натижалари билан қиёсий таҳлил қилингани, шунингдек, *HER2* статуси билан саратон касалликлари биокимёвий мезонлари ва хусусиятлари ассоциациясига эга эмаслиги аниқлангани билан изоҳланади.

Тадқиқот натижаларининг амалий аҳамияти шундан иборатки, саратон касалликларида *HER2/neu* генининг миқдорини аниқлаш мумкинлигини, айна вақтдаги ПЗР усулларида республикамиз клиникаларида фойдаланиб, *HER2/neu* генининг миқдорини аниқлаш мумкинлиги билан изоҳланади. Саратон касалликларида интеркалорловчи *SYBR Green* бўёқ ёрдамида ва *TaqMan* гибридловчи зондларидан фойдаланган ҳолда айна вақтдаги ПЗР ўтказиш протоколлари *HER2/neu* генининг миқдорини аниқлаш тест системасини яратиш учун асос бўлади.

Тадқиқот натижаларининг жорий қилиниши. Саратон касалликларида *HER2* гени миқдорий вариантларини тадқиқ қилиш бўйича олинган илмий натижалар асосида:

саратон касалликларида *HER2* гени миқдорий вариантларини аниқлаш учун ишлаб чиқилган *TaqMan* ҳамда *SYBR Green* ПЗР ўтказиш тартибидан А-10-007 рақамли «Саратон касалликларида таргет терапияни қўллаш имконини баҳолаш учун ўсимта турлари молекуляр характеристикаси диагностик панелини ишлаб чиқиш» мавзусидаги лойиҳада диагностик панелни ишлаб чиқишда фойдаланилган (Ўзбекистон Республикаси Инновация вазирлигининг 2020 йил 08 июльдаги 05-05/2677-сонли маълумотномаси). Натижада, ўсимта турлари молекуляр характеристикаси диагностик панелини ишлаб чиқиш имконини берган;

ўсимта тўқимасидан юқори сифат ва миқдорда эга бўлган ДНК эритмасини ажратиб олиш тартибидан МУ-ПЗ-20171025473 рақамли «Кўкрак беги саратони касалликларида метилланиш статусини аниқлашда ДНК бисульфит конверсияси учун реагентлар ишлаб чиқиш» мавзусидаги лойиҳада бирламчи намуна тайёрлашда фойдаланилган (Ўзбекистон Республикаси Инновация вазирлигининг 2020 йил 8 июльдаги 05-05/2677-сонли маълумотномаси). Натижада, мазкур тартиб ДНК бисульфит конверсияси учун фойдаланиладиган намуналарни тайёрлашнинг биринчи босқичини ўтказиш имконини берган.

Тадқиқот натижаларининг апробацияси. Тадқиқот натижалари асосида 3 та халқаро ва 4 та республика илмий-амалий анжуманларда муҳокамадан ўтказилган.

Тадқиқот натижаларининг эълон қилинганлиги. Диссертация мавзуси бўйича жами 15 та илмий иш чоп этилган, шулардан Ўзбекистон Республикасининг Олий аттестация комиссиясининг фалсафа доктори (PhD) диссертацияларининг асосий илмий натижаларини чоп этишга тавсия этилган илмий нашрларда 6 та мақола, жумладан, 2 таси хорижий ва 4 таси республика журналларда нашр этилган.

Диссертациянинг тузилиши ва ҳажми. Диссертациянинг тузилиши кириш, тўртта боб, хулоса, фойдаланилган адабиётлар рўйхатидан иборат. Диссертациянинг ҳажми 114 бетни ташкил этган.

ДИССЕРТАЦИЯНИНГ АСОСИЙ МАЗМУНИ

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

Диссертациянинг «Саратон касалликларининг умумий характеристикаси» деб номланган биринчи бобида ошқозон ва кўкрак беги саратони касалликлари ҳар томонлама таҳлил қилиниб, мавжуд ҳолатга илмий нуқтаи назардан баҳо берилган. Мазкур бобда ошқозон ва кўкрак беги саратони касалликлари молекуляр механизмлари ҳақидаги замонавий тасаввурлар, салбий сифатли трансформация маркери сифатида *HER2/neu* гени таҳлил қилинган, унинг статусини аниқлашнинг замонавий усуллари ҳақида маълумот берилган. Саратон касалликларини даволашда таргет терапиянинг қўлланилиши тўғрисидаги маълумотлар келтирилган.

Диссертациянинг «*HER2/neu* гени миқдорини аниқлашда қўлланилган замонавий усуллар» деб номланган иккинчи бобида тадқиқотларни олиб бориш босқичлари, уларнинг бажарилишида фойдаланилган материаллар ва услублар келтирилган. Хусусан, тадқиқотлар учун Ўзбекистон ҳудудида яшайдиган 58 нафар ошқозон саратони билан оғриган 35–82 ёш (ўртача 56 ± 2 ёш) оралиғидаги беморлар ҳамда 16 нафар кўкрак беги саратони билан оғриган 37–80 ёш (ўртача 55 ± 2 ёш) оралиғидаги беморлар намуналари олинган. Бундан ташқари, ошқозон саратонининг *AGS* (*gastric adenocarcinoma*) ва *HGE* (*human gastric epithelia*) хужайра линияларидан фойдаланилган. Илмий тадқиқотни бажаришда ДНК ажратиш, гель-электрофорез, спектрофотометрия, полимераза занжирий реакцияси (ПЗР) усуллари ҳамда иммуногистохимё, калориметрия усуллари натижаларидан, шунингдек, статистик дастурлардан фойдаланилган.

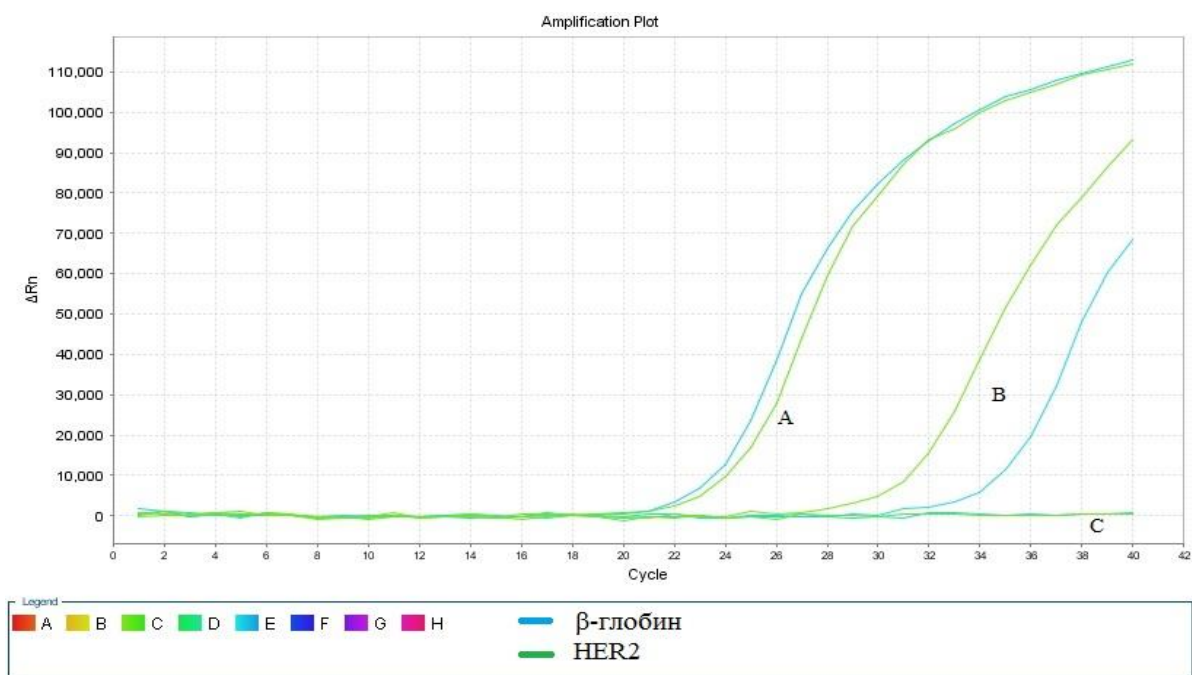
Диссертациянинг «*HER2/neu* генининг миқдорий анализи» номли учинчи бобида саратон касалликлари ўсимта тўқимасидан ДНК ажратиш методикаси, айти вақтдаги ПЗР асосида *HER2* статусини аниқлаш методикаси ишлаб чиқилган ва айти вақтдаги ПЗР натижалари билан иммуногистохимё усули натижалари қиёсий таҳлил қилинган.

Саратон касалликларида ўсимта тўқималаридан айти вақтдаги ПЗР да қўллаш учун яроқли юқори сифат ва миқдорга эга ДНК ажратишнинг янги самарали протоколи ишлаб чиқилган. Бунда, қатор усулларни қўллаш орқали колонкали усулда Biospin Genomic DNA Extraction kit реагентлар тўпламидан фойдаланган ҳолда ДНК ажратиш усули танлаб олинган. Мазкур усулда ДНК ажратиш протокоliga қўшимча равишда механик майдалашни амалга ошириш ҳамда ксилол ва спиртдан фойдаланган ҳолда депарафинизацияни амалга ошириш босқичлари амалга оширилган. Натижада нисбатан юқори сифат ва миқдорга эга ДНК эритмаси ажратиб олинган. Ажратиб олинган ДНК контцентрацияси спектрофотометрда ўлчанган.

Кўкрак беги ва ошқозон саратони ўсимта тўқималарининг хужайра линияларидан ажратилган ДНКдан фойдаланиб *HER2/neu* гени миқдорини аниқлаш учун айти вақтдаги ПЗР *SYBR Green* ва айти вақтдаги ПЗР *TaqMan* протоколларини ишлаб чиқилган. Мазкур протоколлардан фойдаланган ҳолда ошқозон саратонининг иккита хужайра линиялари (*AGS* ва *HGE*), кўкрак беги ва ошқозон саратонининг ўсимта тўқимасидан ажратилган 74

ДНК намуналари, назорат сифатида ишлатилган қондан ажратилган 74 та ДНК намуналари текширилган.

Айни вақтдаги ПЗР протоколларини такомиллаштириш учун *HER2* статуси иммуногистохимёвий усул билан текширилган ошқозон саратонининг иккита *AGS* ва *HGE* хужайра линиялари ишлатилган. *HER2* генига референт ген сифатида β -глобин гени олинган. *HER2* ва β -глобин генлари амплификацияси натижасида айни вақтдаги ПЗР *SYBR Green* протоколи бўйича мазкур генлар миқдорини қиёслашга хизмат қиладиган цикл кўрсаткичлари (*Ct*) орасидаги фарқ *AGS* да $0,03 \pm 0,0039$ ва *HGE* да $5,16 \pm 0,044$ ни ташкил этган ва айни вақтдаги ПЗР ТақМап протоколи бўйича генлар цикл кўрсаткичлари орасидаги фарқ *AGS* да $1,67 \pm 0,046$ ва *HGE* да $5,61 \pm 0,04$ ни ташкил этди. Ушбу кўрсаткичлар айни вақтдаги ПЗР асосида *HER2* статусини аниқлашга имкон беради. *HER2*-мусбат вариантларда ўсимта тўқималарининг *HER2* ва β -глобин генлари *Ct* цикл кўрсаткичлари ўртасидаги фарқ жуда катта бўлиб ($\Delta Ct=5$), бу *HER2* оқсили оверэкспрессиясини англатади, бунинг натижасида ўсимта хужайралари юзасида *HER2* рецепторлари миқдори кўпаяди ва натижада канцерогенез жараёни бошланади. Контроль сифатида фойдаланилган қондан ажратилган ДНК намуналаридаги *HER2* ва β -глобин генлари *Ct* – цикл кўрсаткичлари ўртасидаги фарқ эса одатда кичик бўлади ($\Delta Ct=0,2$) (1-расм).

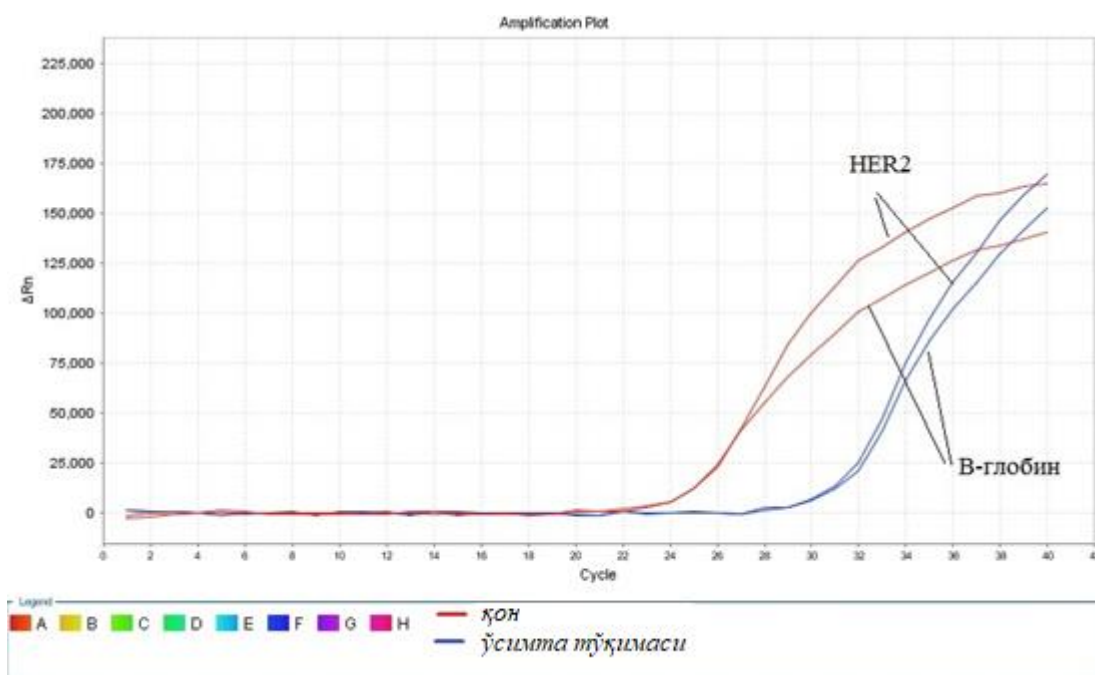


1-расм. *HER2*-мусбат вариантдаги айни вақтдаги ПЗР натижаси

1-расмда А – қон намунасида ажратилган ДНК намунасининг айни вақтдаги ПЗР натижаси, В – ўсимта тўқимасидан ажратилган ДНК намунасининг айни вақтдаги ПЗР натижаси кўрсатилган.

HER2-манфий вариантларда ўсимта тўқималарининг *HER2* ва β -глобин генлари *Ct* – цикл кўрсаткичлари ўртасидаги фарқ ($\Delta Ct=0,3$), контроль сифатида фойдаланилган қондан ажратилган ДНК намуналаридаги *HER2* ва

β -глобин генлари Ct – цикл кўрсаткичлари ўртасидаги фарқдан ($\Delta Ct=0,1$) узоқ эмас (2-расм).



2-расм. *HER2*-манфий вариантдаги ани вақтдаги ПЗР натижаси

Ушбу кўрсаткичларни иммуногистохимё усули кўрсаткичлари билан қиёсий таҳлили натижалари шуни кўрсатадики, иммуногистохимё усулини тўлдирувчи усул сифатида ПЗРдан ҳам *HER2* статусини аниқлаш учун тест тизими сифатида фойдаланиш мумкин (1-жадвал).

1-жадвал

Хужайра линияларида *HER2* статуси учун ИГК ва ани вақтдаги ПЗР усуллари натижаларини таққослаш (n=3)

Хужайра линиялари	ИГК натижаси	<i>Ct-SYBR Green</i>			<i>Ct-TaqMan</i>			<i>HER2</i> статуси
		<i>HER2</i>	β -globin	ΔCt	<i>HER2</i>	β -globin	ΔCt	
AGS	0	24.64 ± 0.37	24.67 ± 0.41	0.03 ± 0.0039	29.08 ± 0.42	30.75 ± 0.49	1.67 ± 0.046	<i>HER2</i> – манфий
HGE	+3	18.76 ± 0.44	23.92 ± 0.45	5.16 ± 0.044	22.94 ± 0.45	28,55 ± 0.36	5,61 ± 0.041	<i>HER2</i> – мусбат

ПЗР усулининг сифатини баҳолаш учун ROC эгри чизиғи ҳосил қилинган ва ИГК усули билан таққослаганда ПЗР усулининг клиник аҳамиятининг рақамли қийматини олиш учун математик трапезоидал усул ёрдамида ҳисобланган AUC (area under curve) индикатори ишлатилган. Бизнинг моделimiz учун AUC қиймати 0.857 ± 0.32 ни ташкил этган, бу эса ушбу моделнинг жуда яхши сифатга эгаллигини англатади.

SYBR Green интеркалаторловчи бўёғи ёрдамида ПЗР ўтказиш протоколи асосида 16 та ИГК усулида *HER2* статусига текширилган кўкрак беши саратони ташхиси тасдиқланган беморлардан ажратилган ДНК намуналари *HER2/neu* гени миқдорини аниқлаш учун текширилган. Беморлар 37 дан 80 ёшгача бўлган, ўртача ёши 55 ± 2 ни ташкил қилган: Тошкент вилоятида яшовчи - 3 нафар (18,75%), Самарқанд - 2 нафар (12,5%), Фарғона - 2 нафар

(12,5%), Сирдарё вилоятида яшовчи - 2 нафар (12,5%) ва Тошкент шаҳрида яшовчи - 7 нафар (43,75%).

Кўкрак беи саратони ташхиси тасдиқланган беморларнинг қони ва ўсимта тўқималаридан ажратиб олинган ДНК намуналарида *SYBR Green* ПЗР протоколи асосида *HER2* ва β -глобин генларининг амплификацияси 20 дан 33 циклгача параллел равишда давом этган. 8та (50%) намунада *HER2*-мусбат, 8та (50%) намунада *HER2*-манфий вариант аниқланган. *HER2*-мусбат намуналарнинг *Ct* – цикл кўрсаткичлари орасидаги фарқ $4,01 \pm 0,053$ дан $5,2 \pm 0,037$ гача, *HER2*-манфий намуналар учун $0,7 \pm 0,058$ дан $3,75 \pm 0,068$ гачани ташкил қилган.

ТақМан гибридизацион зондлари ёрдамида ишлаб чиқилган айни вақтдаги ПЗР протоколи орқали кўкрак беи саратони ташхиси тасдиқланган 16та бемор ўсимта тўқимаси намуналарида *HER2* статуси текширилганда 9 та (56,25%) намуналарда *HER2*-мусбат, 7 та (43,75%) намунада *HER2*-манфий аниқланган. *HER2*-мусбат намуналарнинг *Ct* – цикл кўрсаткичлари орасидаги фарқ $5,48 \pm 0,047$ дан $10,87 \pm 0,055$ гача, *HER2*-манфий намуналар учун $0,56 \pm 0,018$ дан $3,5 \pm 0,027$ гачани ташкил қилган.

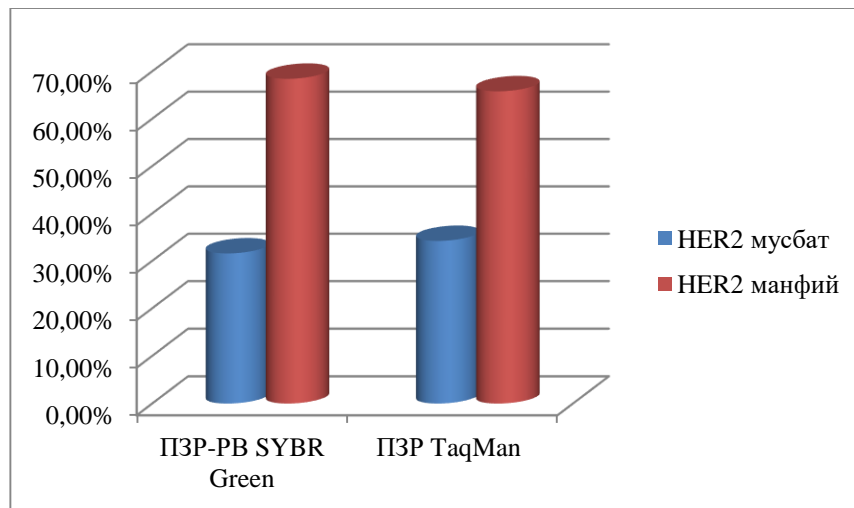
Шунингдек, ушбу тадқиқотда ошқозон саратони ташхиси тасдиқланган 35 дан 82 ёшгача (ўртача ёши 56 ± 2) бўлган, 58 нафар беморда ПЗР ўтказилган. Улардан 30 нафар эркак ва 28 нафар аёлдан иборат. Барчаси Наманган вилоятининг худудларида яшовчи фуқаролар.

SYBR Green ПЗР протоколи асосида *HER2/neu* ва β -глобин генларининг амплификацияси 21 дан 36 циклгача бўлган ораликда параллел равишда ўтган. Натижада 15та (25,86%) намунада *HER2*-мусбат, 43та (74,14%) намунада *HER2*-манфий вариантлар аниқланган. *HER2*-мусбат намуналарнинг *Ct* – цикл кўрсаткичлари орасидаги фарқ $4,12 \pm 0,026$ дан $6,8 \pm 0,047$ гача, *HER2*-манфий намуналар учун $0,7 \pm 0,045$ дан $3,89 \pm 0,056$ гачани ташкил қилган.

ТақМан гибридизацион зондлари ёрдамида ишлаб чиқилган айни вақтдаги ПЗР протоколи орқали ошқозон саратони билан оғриган 58та бемор ўсимта тўқимаси намуналарида *HER2* статуси текширилган. Барча намуналарда, қон ва тўқима намуналаридан ажратиб олинган ДНК намуналарида *HER2* ва β -глобин генларининг амплификацияси 19 дан 35 циклгача бўлган ораликда параллел равишда ўтган. Натижада 16 (27,59%) намунада *HER2*-мусбат, 42 та (72,41%) намунада *HER2*-манфий вариант аниқланди. *HER2*-мусбат намуналарнинг *Ct* – цикл кўрсаткичлари орасидаги фарқ $4,01 \pm 0,075$ дан $11,84 \pm 0,038$ гача, *HER2*-манфий намуналар учун $0,3 \pm 0,038$ дан $3,75 \pm 0,081$ гачани ташкил қилган.

Мазкур маълумотларга таянган ҳолда ошқозон саратони ва кўкрак беи ўсимта тўқималаридаги *HER2* ва β -глобин генларининг *Ct* – цикл кўрсаткичлари орасидаги фарқ асосида *HER2* генининг миқдори учун чегара қиймати $\Delta Ct = 4,0$ эканлиги аниқланган. Чегара қийматининг мавжудлиги ўрганилаётган тўпламни айни вақтдаги ПЗР асосида *HER2/neu* генининг нусхалари миқдorigа кўра гуруҳларга ажратиш имконини беради. 76

намунадан *SYBR Green* интеркалирловчи бўёғи ёрдамида ПЗР ўтказиш протоколи асосида 24 та ҳолатда онкогеннинг мусбат варианты аниқланган, бу 31,57% ни ташкил этган, 52 та (68,43%) намунада *HER2*-манфий вариант аниқланган. *TaqMan* гибридизацион зондлари ёрдамида ишлаб чиқилган айни вақтдаги ПЗР протоколи ёрдамида 76 беморнинг *HER2* статус бўйича 26 тасида (34,21%) *HER2*-мусбат, 50 (65,79%) ҳолатда онкогеннинг манфий варианты аниқланган (3-расм).



3-расм. *HER2* статуси учун айни вақтдаги ПЗР *TaqMan* ва *SYBR Green* усуллари натижаларининг қиёсий таҳлили (n=16)

Курабайши ва бошқаларнинг тадқиқотлари шуни кўрсатадики, *HER2/neu* рецепторларнинг ранги ва сонига кўра, ИГК натижалари (0), (+1), (+2), (+3) га бўлинади. Бунда (0), (+1) бўлганда, *HER2* статуси, шубҳасиз, *HER2*-манфий деб ҳисобланади. Бўяшнинг интенсивлиги ва мутахассиснинг тажрибасидан келиб чиққан ҳолда (+2), *HER2*-манфий ёки *HER2*-мусбат бўлиши мумкин. (+3) натижаси *HER2*нинг мусбат ҳолатини кўрсатади. ИГК ва ПЗР бўйича тест натижаларини таққослаш кўкрак беги ўсимта тўқималарининг 16 намунасида ўтказилган, уларнинг натижалари 2-жадвалда келтирилган (2-жадвал).

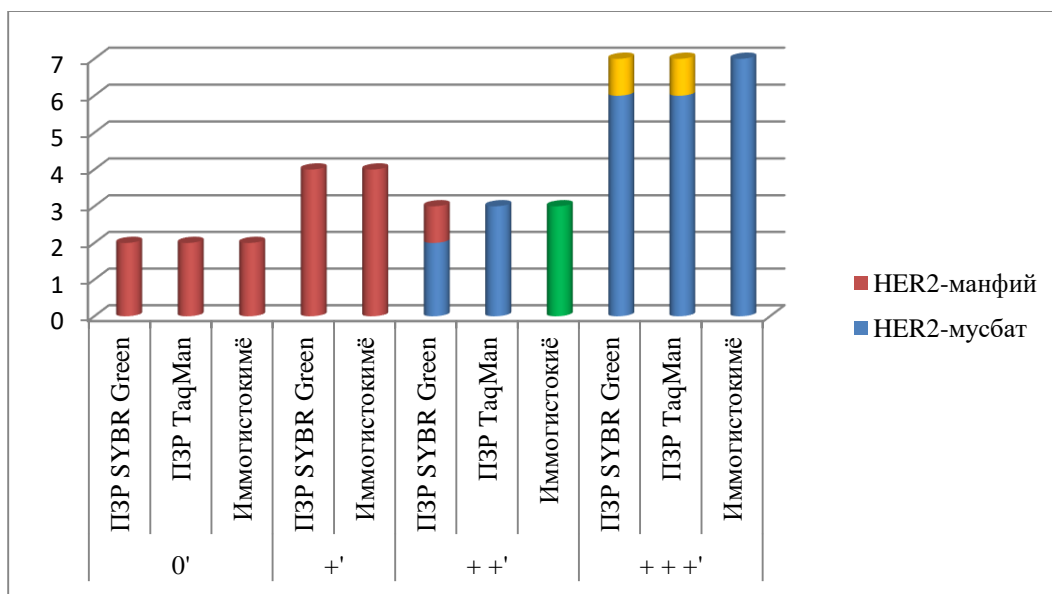
2-жадвал.

***HER2* статуси учун айни вақтдаги ПЗР ва ИГХ усуллари натижаларининг қиёсий таҳлили (n=16)**

Айни вақтдаги ПЗР натижалари	ИГК натижалари									
	Score 0		Score +1		Score +2		Score +3		Жами	
	2	4	3	7	16					
	ПЗР SYBR Green	ПЗР TaqMan	ПЗР SYBR Green	ПЗР TaqMan	ПЗР SYBR Green	ПЗР TaqMan	ПЗР SYBR Green	ПЗР TaqMan	ПЗР SYBR Green	ПЗР TaqMan
<i>HER2</i> -мусбат					2	3	6	6	8	9
<i>HER2</i> -манфий	2	2	4	4	1		1	1	8	7
Жами	2	2	4	4	3	3	7	7	16	16

Айни вақтдаги ПЗР *SYBR Green* ва ПЗР *TaqMan* натижалари ИГК натижаларига тўлиқ мос келишини кўрсатмоқда. 16 та намунадан фақат битта намуна айни вақтдаги ПЗР усулининг икки протоколи орасида фарқли

кўрсаткичларни кўрсатган. ИГК усули бўйича (+2) индикатор остида 3 та намуна мавжуд, айти вақтдаги ПЗР *SYBR Green* бўйича улардан 2 таси *HER2*-мусбат, биттаси *HER2*-манфий. Айти вақтдаги ПЗР *TaqMan* протоколига кўра, барча 3 намуналар *HER2*-мусбатдир. Айти вақтдаги ПЗР усулининг *SYBR Green* ва *TaqMan* протоколлари ўртасидаги фарқ 6,25% ни ташкил этган (4-расм). Бундан келиб чиқиб ПЗР *TaqMan* ПЗР *SYBR Green* га нисбатан 6,25% га юқори спецификликга эга дейиш мумкин.



4-расм. Айти вақтдаги ПЗР ва ИГК усуллари билан *HER2* статусини аниқлаш натижаларини таққослаш

SYBR Green интеркалаторлиги бўёғи ёрдамида ПЗР ўтказиш протоколи билан ИГК усули натижаларини таққослаш 87,5% га, *TaqMan* гибридизация зондлари ёрдамида ишлаб чиқилган реал вақтдаги ПЗР протоколи билан ИГК усули натижалари эса 93,75% га мос келган. ИГК натижалари билан тафовутни шундай тушунтириш мумкин, ДНК даражасида ген миқдорининг кўпайиши кузатилмаслиги мумкин, лекин ИГК усули ёрдамида оксилларнинг кўпайишини аниқлаш билан *HER2* статусини баҳолашга имкон беради. Шунингдек, натижалар ўртасидаги тафовут, *HER2/neu* рецепторлари оксилларининг умумий таркибини аниқлашга асосланган ИГХ усулининг етарлича такомиллашмагани билан боғлиқ бўлиши мумкин. Шунга қарамай, аксарият ҳолларда айти вақтдаги ПЗР усули ИГК билан мос келган.

Диссертациянинг тўртинчи «Саратон касалликларида *HER2* статуси билан биокимёвий мезонлар ва касаллик хусусиятлари ассоциациясини ўрганиш» деб номланган бобида *HER2* статусинининг саратон касалликлари билан боғлиқлиги тадқиқ қилиниб олинган натижалар муҳокамаси келтирилган.

Кўкрак беши саратони ташхиси тасдиқланган беморларнинг клиник маълумотларига кўра, қон плазмасидаги умумий оксил миқдори 36,4 дан 84 г/л гача, аспартаминотрансфераза ва аланинаминотрансфераза ферментларининг миқдори мос равишда 0,34-1,05 мкмол/мл ва 0,34-0,86

мкмол/мл ни ташкил қилди. *HER2* статусинининг турли ҳолатлари учун ушбу кўрсаткичлар 3-жадвалда келтирилган (3-жадвал).

3-жадвал.

Кўкрак беи саратонида *HER2* статуси билан биокимёвий мезонлар кўрсаткичларининг боғлиқлиги

<i>HER2</i> статуси	Қон зардоби умумий оқсил (г/л)	Аспарат аминотрансфераза (АсТ) (мкмоль/мл)	Аланин Аминотрансфераза (АлТ) (мкмоль/мл)
<i>HER2</i> – мусбат	36,4-84	0,34-1,05	0,34-0,8
<i>HER2</i> – манфий	39-73,4	0,6-1	0,4-0,86

Маълумотларни қайта ишлаш жараёнида биокимёвий мезонлар кўрсаткичларининг *HER2* статуси билан ўзаро боғлиқлик коэффициенти ўрганилди. Натижада *HER2* статуси билан аспартатаминотрансфераза ферменти миқдорининг корреляцион коэффициенти энг юқори $r = 0.72$ кўрсаткични намоён қилди. Мазкур маълумотлар асосида кўкрак беи саратонида *HER2* статуси аланинаминотрансферазага нисбатан аспартатаминотрансфераза ферменти миқдори билан яхши боғлиқликга эгаллиги ҳақида хулоса қилиш мумкин. Бу кўкрак беи саратонида аминокислоталар алмашинуви жараёнида аспартатаминотрансфераза фаоллиги нисбатан ортишини англатади.

Кўкрак беи саратони ташхиси тасдиқланган беморларда биокимёвий мезонларнинг турли кўрсаткичлари учун *HER2* гени миқдорини аниқлаш учун ишлаб чиқилган ПЗР усули протоколидан фойдаланиш имкониятини ўрганиш учун Фишер тести ўтказилди. *HER2* статуси ва кўкрак беи саратони ташхиси тасдиқланган беморларнинг биокимёвий мезонлар кўрсаткичлари ўртасидаги ўзаро боғлиқликнинг статистик таҳлили 4-жадвалда келтирилган (4-жадвал).

4-жадвал.

Кўкрак беи саратони ташхиси тасдиқланган беморларда биокимёвий мезонларнинг *HER2* статуси билан боғлиқлиги

Мезон	Онкоген дозасининг намоён бўлиши	Корреляция коэффициенти	Р _{Фишер}
Умумий оқсил	0,1360	0,58	0,8281
Аспартатаминотрансфераза (АсТ)	0,1813	0,72	0,7621
Аланинаминотрансфераза (АлТ)	0,1747	0,63	0,7500

Мазкур таҳлил асосида айни вақтдаги ПЗР асосида аниқланган *HER2* статусининг кўкрак беи саратони касалликларида биокимёвий мезонлар кўрсаткичларига боғлиқ эмас ($p > 0,05$) деган хулоса қилиш мумкин.

Ошқозон саратони ташхиси тадиқланган беморларнинг клиник маълумотларига кўра, қон плазмасидаги умумий оқсил миқдори 24 дан 80 г/л гача, АсТ ва АлТ ферментларининг миқдори мос равишда 0,2-1,18 мкмоль/мл ва 0,9-0,34 мкмоль/мл ни ташкил қилди. *HER2* статусинининг турли ҳолатлари учун ушбу кўрсаткичлар 5-жадвалда келтирилган (5-жадвал).

Ошқозон саратони *HER2* статуси билан биокимёвий мезонлар кўрсаткичларининг боғлиқлиги

Статус <i>HER2</i>	Қондаги умумий оқсил миқдори (г/л)	Аспарат аминотрансфераза (АсТ) (мкмоль/мл)	Аланин Аминотрансфераза (АлТ) (мкмоль/мл)
<i>HER2</i> – мусбат	28,9-80	0,3-1,08	0,34-0,81
<i>HER2</i> – манфий	24-78,9	0,2-1,18	0,35-0,9

Маълумотларни қайта ишлаш жараёнида биокимёвий мезонлар кўрсаткичларининг *HER2* статуси билан ўзаро боғлиқлик коэффициенти ўрганилди. Натижада *HER2* статуси билан АсТ ферменти миқдорининг корреляцион коэффициенти энг юқори $r = 0.73$ эканлигини кўрсатди. Мазкур маълумотлар асосида ошқозон саратонида *HER2* статуси АлТ га нисбатан АсТ ферменти миқдори билан яхши боғлиқликга эгаллиги хақида хулоса қилишга имкон беради. Бу ошқозон саратонида аминокислоталар алмашинуви жараёнида АсТ фаоллиги нисбатан ортишини англатади.

Ошқозон саратони ташхиси тасдиқланган беморларда биокимёвий мезонларнинг турли кўрсаткичлари учун *HER2* гени миқдорини аниқлаш учун ишлаб чиқилган ПЗР усули протоколидан фойдаланиш имкониятини ўрганиш учун Фишер тести ўтказилди. *HER2* статуси ва кўкрак беши саратони ташхиси тасдиқланган беморларнинг биокимёвий мезонлар кўрсаткичлари ўртасидаги ўзаро боғлиқликнинг статистик таҳлили 6-жадвалда келтирилган (6-жадвал).

Ошқозон саратони ташхиси тасдиқланган беморларда биокимёвий мезонларнинг *HER2* статуси билан боғлиқлиги

Мезон	Онкоген дозасининг намоён бўлиши	Корреляция коэффициенти	$P_{\text{Фишер}}$
Умумий оқсил	0,075	0,54	0,7948
аспартатаминотрансфераза (АсТ)	0,2280	0,73	0,2654
Аланинаминотрансфераза (АлТ)	0,1433	0,59	0,7621

Ушбу тадқиқотда айни вақтдаги миқдорий ПЗР тести натижасида олинган *HER2* статуси билан қондаги умумий оқсил миқдори (КБС – $P_{\text{Фишер}}=0,8281$, ОС – $P_{\text{Фишер}}=0,7948$), АсТ (КБС – $P_{\text{Фишер}}=0,7621$, ОС – $P_{\text{Фишер}}=0,2654$), ҳамда АлТ миқдори (КБС – $P_{\text{Фишер}}=0,7500$, ОС – $P_{\text{Фишер}}=0,7621$) ўртасида статистик аҳамиятга эга боғлиқлик аниқланмади.

Статистик таҳлиллар натижасида АсТнинг *HER2* статусининг иккала варианты билан АлТга нисбатан юқори корреляция коэффициенти эгаллиги аниқланди, бу кўкрак беши ва ошқозон саратонида аминокислоталар алмашинуви жараёнида АсТ фаоллиги ошганлигини англатади, аммо шунга қарамай, бу кўрсаткич аҳамиятли боғлиқликга эга эмас. Биокимёвий мезонлар кўрсаткичи ва *HER2* статуси ўртасида статистик жиҳатдан аҳамиятли боғлиқликнинг йўқлиги ($p>0,05$) ошқозон ва кўкрак беши саратони ташхиси тасдиқланган барча беморларда онкоген нусхаларини айни вақтдаги

ПЗР амплификацияси учун маълум чегаравий қийматдан фойдаланиш имкониятини кўрсатади.

Тадқиқотда *HER2* статуси билан жаҳон стандарт таснифи бўйича саратон босқичлари ўртасидаги боғлиқлик ўрганилган. Кўкрак беги саратони ташхиси тасдиқланган 16 нафар беморларнинг 2таси (12,5%) I босқич, биттаси (6,25%) касалликнинг II босқичида, 3та (18,75%) бемор III босқичида, 4 (25%) IIIА, улардан 2 (12,5%) нафари IIIБ босқичида бўлган, 3таси (18,75%) IIIС босқичида ва биттаси (6,25%) кўкрак беги саратонининг IV босқичида бўлган. Айни вақтдаги ПЗР асосида аниқланган *HER2* статуси ва кўкрак беги саратони босқичлари ўртасидаги боғлиқликни ўрганиш натижалари шуни кўрсатдики, IIIБ, IIIА ва IIIБ босқичларида *HER2*-мусбат вариант тенг миқдорда (12,50%) намоён бўлган ва касалликнинг IIIС ва IV босқичларида онкогеннинг манфий варианты умуман аниқланмади айни вақтдаги ПЗР *SYBR Green* протоколи натижаларига кўра, *HER2*-манфий вариант кўкрак беги саратонининг IIIС босқичида энг катта кўрсаткични кўрсатган, IIIА ва IIIБ босқичларида онкоген миқдорининг кўпайиши аниқланмаган. Айни вақтдаги ПЗР *TaqMan* протоколига кўра, *HER2* статусининг мусбат варианты кўкрак беги саратонининг IV босқичида, *HER2*-манфий варианты IIIА ва IIIБ босқичларида аниқланмаган.

HER2 статуси ва кўкрак саратони босқичлари ўртасидаги боғлиқлик касалликнинг турли босқичларида турли кўрсаткичларни кўрсатади, деган хулосага келинган. Хусусан, айни вақтдаги ПЗР *SYBR Green* ва айни вақтдаги ПЗР *TaqMan* протоколлари асосида кўкрак беги саратонида IIIА босқичида фақат мусбат вариантлар аниқланган ва IV босқичида фақат *HER2* статусининг манфий вариантлари аниқланган.

Ошқозон саратони ташхиси қўйилган беморларнинг клиник маълумотлари тавсифи асосида касалликнинг босқичлари ўрганилган. 58 нафар беморда касалликнинг барча I, II, III, IV босқичлари учраган. Улардан: 4 таси (6,89%) IA босқичида, 5 таси (8,62%) IB босқичида, 5 таси (8,62%) IIA босқичида, 4 таси (6,89%) IIB босқичида, 4таси (6,89%) IIIА босқичида, IIB босқичида 6 та (10,34%), IIIС босқичида 8 та (13,79%) ва ошқозон саратонининг IV босқичида 22та (37,93%) ни ташкил қилган. Айни вақтдаги ПЗР ёрдамида аниқланган *HER2* статуси ва ошқозон саратони босқичлари ўртасидаги ассоциациясини ўрганиш натижаларига кўра, IA босқичида *HER2* статуси мусбат ва манфий вариантлар тенг (3,44%) миқдорни ташкил қилган, қолган босқичларда *HER2* нинг мусбат вариантлари миқдори манфий вариант миқдоридан ошиб кетгани кузатилган. Касалликларнинг барча босқичлари орасида IV босқичида *HER2*-мусбат вариант энг кўп қисмини ташкил қилган.

Натижалар шуни кўрсатадики, IV босқичидаги ошқозон саратонида айни вақтдаги ПЗР *SYBR Green* ва айни вақтдаги ПЗР *TaqMan* протоколлари бўйича *HER2* статуси вариантлари миқдори орасида фарқ аниқланди. Ошқозон саратони босқичлари ва *HER2* статуси ўртасидаги бу фарқни кўпчилик беморларни касалликнинг охириги босқичида шифокорларга муружаат қилганлари ва дунё бўйича ўрганилган статистикага кўра,

HER2/neu гени миқдорининг кўпайиши касалликда умумий ҳолда кичик фоизларида аниқланиши билан изоҳлаш мумкин.

Ушбу тадқиқот доирасида касалликнинг босқичлари ва айти вақтдаги ПЗР кўрсаткичлари бўйича тажриба натижалари асосида олинган *HER2* статуси ўртасидаги боғлиқлик аниқланди. Ошқозон ва кўкрак беги саратони ташхиси тасдиқланган беморларнинг касаллик босқичлари билан *HER2/neu* гени миқдорининг кўпайиши частотаси таҳлили ҳам ўтказилди. Умумий таҳлил маълумотлари 7- ва 8-жадвалда келтирилган.

7-жадвал

Кўкрак беги саратони хусусиятлари билан *HER2* статуси ўртасидаги боғлиқликни статистик таҳлил натижалари (n=16)

Критерий	Кичик гуруҳлар	Кўрсаткичлар			
		<i>HER2/neu</i> гени миқдорининг намоён бўлиши, медиана	<i>HER2/neu</i> гени миқдорининг кўпайиши частотаси (%)	P	P _{Фишер}
Ёш бўйича гуруҳлар	55 гача	0,079	31,25	P _{Уилкоксон} 0,7123	0,7631
	55 ёшдан катта	0,062	25		
Саратон босқичлари	I босқич	0,080	6,25	P _{Краскел} Уоллис 0,8156	0,6642
	II босқич	0,070-0,080	18,75		
	III босқич	0,070-0,080	28,12		
	IV босқич	0,070	0		

8-жадвал

Ошқозон саратони хусусиятлари билан *HER2* статуси ўртасидаги боғлиқликни статистик таҳлил натижалари (n=58)

Критерий	Кичик гуруҳлар	Кўрсаткичлар			
		<i>HER2/neu</i> гени миқдорининг намоён бўлиши, медиана	<i>HER2/neu</i> гени миқдорининг кўпайиши частотаси (%)	P	P _{Фишера}
Ёш бўйича гуруҳлар	55 гача	0,083	8,62	P _{Уилкоксон} 0,6271	0,7937
	55 ёшдан катта	0,046	17,24		
Саратон босқичлари	I босқич	0,090	6,89	P _{Краскел} Уоллис 0,8237	0,6571
	II босқич	0,070-0,080	3,44		
	III босқич	0,070-0,080	6,89		
	IV босқич	0,070-0,080	8,72		
Беморлар жинси	Аёллар	0,064	13,79	P _{Уилкоксон} 0,7224	0,7132
	Эркаклар	0,078	12,06		

Айти вақтдаги ПЗР асосида ўтказилган текширувлар натижасида олинган *HER2* статуси ва беморларнинг ёши (ОС – P_{Уилкоксон}=0,6271, КБС – P_{Уилкоксон}=0,7123), касалликнинг босқичи (ОС – P_{Краскел Уоллис}=0,8237, КБС – P_{Краскел Уоллис}=0,8156), шунингдек беморларнинг жинси (P_{Уилкоксон}=0,7224) ўртасида статистик аҳамиятга эга бўлган боғлиқлик ўрнатилмаган. *HER2/neu* гени миқдорининг кўпайиши частотаси, беморларнинг ёш бўйича гуруҳларида (ОС – P_{Фишер}=0,7937, КБС – P_{Фишер}=0,7631), касалликнинг турли босқичларида (ОС – P_{Фишер}=0,6571, КБС – P_{Фишер}=0,6642) фарқ қилмаган,

шунингдек, беморларнинг жинсига боғлиқ ($P_{\text{Фишер}}=0,7132$) бўлмаслиги кўрсатилган.

Касалликларнинг характеристикаси ва *HER2* статуси ўртасида статистик жиҳатдан аҳамиятли боғлиқликнинг йўқлиги ($p>0,05$) ошқозон ва кўкрак беги саратони ташхиси тасдиқланган барча беморларда *HER2/neu* гени миқдорининг кўпайиши аниқлашда айна вақтдаги ПЗР орқали амплификация ўтказиш учун маълум чегаравий қийматдан фойдаланиш имкониятини кўрсатади.

ХУЛОСА

1. Саратон касалликлари ўсимта тўқималаридан айна вақтдаги ПЗР да қўллаш учун яроқли юқори сифат ва миқдорга эга ДНК ажратишнинг янги самарали тартиби таклиф қилинди.

2. *HER2/neu* генининг миқдорини аниқлаш учун *HER2* ва β -глобин генлари *Ct* цикл кўрсаткичлари фарқига асосланган айна вақтдаги ПЗР ўтказишнинг иккита янги тартиблари таклиф этилган.

3. *HER2/neu* генининг миқдори учун *HER2* ва β -глобин кўрсаткичлари фарқига асосланган $\Delta Ct=4,0$ дан кам бўлмаган чегара қиймати аниқланди, бу чегара қийматининг мавжудлиги кўкрак беги ва ошқозон саратони касалликларини юқори сезгирлик билан *HER2*-мусбат ва *HER2*-манфий гуруҳларга ажратиш имконини беради.

4. Кўкрак беги саратони ўсимта тўқималарида ТаqМаn протоколи ёрдамида аниқланган *HER2* генининг миқдори иммуногистохимё усулининг натижалари билан яхши боғлиқлик кўрсатди.

5. Мазкур тартиб асосида ошқозон саратони ташхиси тасдиқланган 58 та беморнинг 15 нафари (25,86%) да, 16 та кўкрак беги саратони намуналаридан 7 таси (43,75%) да *HER2* генининг миқдори ортиши билан изоҳланади.

6. *HER2* статусининг параметрлари ошқозон ва кўкрак беги саратони касалликлари биокимёвий мезонлар кўрсаткичларига ва касаллик хусусиятларига боғлиқ эмас ($p>0,05$), бу барча беморларда айна вақтдаги ПЗР натижаларига кўра онкоген нусхалари миқдорининг ортишини кўрсатувчи маълум чегаравий қийматдан фойдаланиш мумкинлигини кўрсатади.

**НАУЧНЫЙ СОВЕТ DSc.03/30.12.2019.В.01.13 ПО ПРИСУЖДЕНИЮ
УЧЕНЫХ СТЕПЕНЕЙ ИНСТИТУТА БИОФИЗИКИ И БИОХИМИИ
ПРИ НАЦИОНАЛЬНОМ УНИВЕРСИТЕТЕ УЗБЕКИСТАНА**

ИНСТИТУТ БИОФИЗИКИ И БИОХИМИИ

РУСТАМОВА ШОХИСТА ОМОНЖОНОВНА

**ИССЛЕДОВАНИЕ КОЛИЧЕСТВЕННЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНА
HER2/NEU ПРИ ОПУХОЛЕВЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ**

03.00.01 – Биохимия

**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 номером B2019.2.PhD/B292.

Диссертация выполнена в Институте биофизики и биохимии при Национальном университете Узбекистана имени Мирзо Улугбека.

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

Научный руководитель:

Турдикулова Шахлохон Уткуровна
доктор биологических наук, профессор

Официальные оппоненты:

Юлдашев Насирджан Мухамеджанович
доктор биологических наук, профессор

Мухамедов Рустам Султанович
доктор биологических наук, профессор

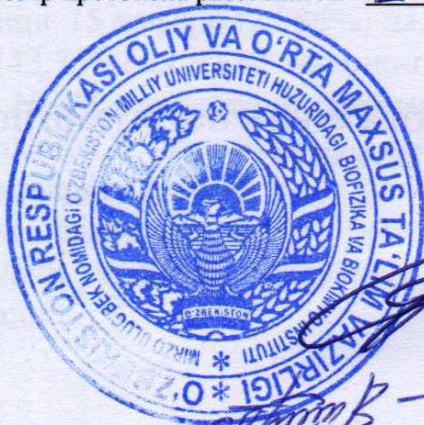
Ведущая организация:

Центр геномики и биоинформатики

Защита диссертации состоится «14» октября 2020 г. в 14.00 часов на заседании Научного совета DSc.03/30.12.2019.B.01.13 при Институте Биофизики и биохимии, Национальном университете Узбекистана. Адрес: 100174, г.Ташкент, Алмазарский район, Студенческий городок, улица Университетская, 174. Тел.: (+99871) 246-68-96.

С диссертацией можно ознакомиться в Информационно-ресурсном центре Института Биофизики и биохимии при Национальном университете Узбекистана (зарегистрировано под № 20). Адрес: 100174, г.Ташкент, Алмазарский район, Студенческий городок, Университетская, 174. Тел.: (+99871) 246-68-96, e-mail: ibb-nuu@mail.ru.

Автореферат диссертации разослан: «29» сентября 2020 г.
(реестр протокола рассылки № 1 от «29» сентября 2020).



Сабилов Равшан Заирович
Председатель Научного совета по присуждению
ученых степеней, д.б.н., профессор, академик

Позилев Маъмуржон Комилжонович
Ученый секретарь Научного совета по присуждению
ученых степеней, и.о., д.б.н., старший научный сотрудник

Кадырова Дилбар Абдуллаевна
Председатель Научного семинара при Научном совете
по присуждению ученых степеней, д.б.н., профессор

ВВЕДЕНИЕ (аннотация диссертации доктора философии (PhD))

Актуальность и востребованность темы диссертации. В настоящее время рак является одним из самых опасных заболеваний в мире, так как рак молочной железы занимает второе место в мире после рака легких (2,09 миллиона случаев) а рак желудка шестое (1,03 миллиона случаев). Одним из опухолевых маркеров рака молочной железы и рака желудка является *HER2/neu*, и его амплификация и/или гиперэкспрессия выявляется в 15-30% случаев рака молочной железы и 9-15% случаев рака желудка. Индивидуальный подход к выбору специального лечения с применением таргетной терапии в каждом конкретном случае, в том числе к устранению назначения дорогостоящих и, зачастую, токсичных препаратов, диктует необходимость выбора оптимальных диагностических подходов в определении *HER2*-статуса.

В исследованиях, проводимых крупными научными центрами по всему миру, ведутся поиски по совершенствованию методов, основанных на экспрессии генов, гиперэкспрессии мРНК и экспрессии белков, с целью разработки оптимальных методов диагностики для определения статуса *HER2/neu*. В настоящее время наиболее эффективными методами оценки активации *HER2/neu* являются иммуногистохимия, также технологии флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH) и хромогенной *in situ* гибридизации (CISH), позволяющие определять уровень амплификации *HER2*. Однако отсутствие специального оборудования и высокая стоимость реагентов ограничивают рутинное использование технологий иммуногистохимии, FISH/CISH. Разработка протокола полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР) для определения статуса *HER2* на уровне ДНК с высоким преимуществом, чувствительностью, возможностью получения результата с минимальным количеством ДНК в образце является крайне востребованным.

В нашей стране разработаны методы определения количества гена *HER2/neu* в опухолевой ткани. На основе мероприятий по этому направлению удалось повысить эффективность оценки возможности применения таргетной терапии для лечения опухолевых заболеваний. В стратегии действий по дальнейшему развитию Республики Узбекистан, определены задачи по «Созданию эффективных механизмов поощрения инновационной и научно-исследовательской деятельности, внедрению инновационных и научно-исследовательских достижений в практику» и «Совершенствованию системы здравоохранения и социальной защиты населения»². В связи с этим, важную роль играет разработка подходящих тест-систем, путем определения количественных вариантов гена *HER2/neu* при опухолевых заболеваниях, изучение связи со специфическими особенностями заболевания, а также внедрение новых методов исследований.

² Указ Президента Республики Узбекистан от 7 февраля 2017 г. № УП-4947 «О стратегии действий по дальнейшему развитию Узбекистан»

Данное диссертационное исследование в определенной степени служит выполнению задач, предусмотренных в соответствии с Указом Президента Республики Узбекистан № УП-4947 «О стратегии действий по пяти приоритетным направлениям развития Республики Узбекистан в 2017-2021 годы» от 7 февраля 2017 года и в Постановлении Президента Республики Узбекистан № ПП-3071 «О мерах по дальнейшему развитию специализированной медицинской помощи населению Республики Узбекистан» от 2 августа 2018 года, а также других нормативно-правовых документах принятых в данной сфере.

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

Степень изученности проблемы. В настоящее время во многих исследовательских и научных центрах мира ведутся исследования по изучению определения статуса *HER2/neu* при опухолевых заболеваниях. В последние годы достигнуты заметные успехи в изучении экспрессии гена *HER2/neu* на клеточном уровне, что обусловлено разработкой новых современных методов анализа, таких как на основе методов флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH) и хромогенной *in situ* гибридизации (CISH), а также иммуногистохимическому (ИГХ) и ПЦР анализу.

В странах СНГ Е.Н. Имянитов Е.Н., Н.У. Маценко, В.С. Рыжикова, С.П. Коваленко проводили ряд исследований по определению статуса *HER2/neu* при раке молочной железы. Но, несмотря на достигнутые успехи, ряд вопросов, связанных с механизмами экспрессии гена *HER2/neu*, остаются нерешенными.

В нашей Республике Абдувалиевом А.А. проведены исследования по регуляции пролиферации опухолевых клеток. Однако, количественные варианты гена *HER2/neu* при опухолевых заболеваниях на основе ПЦР не исследовались. Таким образом, сохраняется необходимость как в изучении биологических особенностей *HER2*-позитивных опухолей молочной железы и желудка, так и в выборе оптимальных диагностических подходов в оценке статуса онкогена *HER2/neu*. Перспективной представляется разработка отечественных тест-систем для оценки статуса *HER2/neu*, что является новой наукоемкой и ресурсосберегающей технологией, базирующейся на современных достижениях фундаментальной науки и разработках, соответствующих мировым аналогам.

Связь темы диссертации с научно-исследовательскими работами института, где выполнена диссертация. Диссертационное исследование выполнено в рамках плана научно-исследовательских работ прикладного проекта Центра передовых технологий ЁА-10-005 «Разработка метода тестирования *HER2* положительных вариантов рака желудка» (2015-2017).

Целью исследования является разработка нового протокола метода для определения количества гена *HER2/neu* при опухолевых заболеваниях в качестве маркера для применения таргетной терапии.

Задачи исследования:

сбор образцов крови и опухолевого материала пациентов с диагнозом рак желудка и рак молочной железы, и создание банка описания их клинических данных;

подбор и оптимизация методики выделения ДНК из опухолевого материала;

разработка протокола метода ПЦР в реальном времени с использованием интеркалирующего красителя *SYBR Green* и при помощи гибридизационных зондов *TaqMan* для определения количества гена *HER2/neu* в образцах рака желудка и молочной железы;

сравнительный анализ результатов проведённых ПЦР *SYBR Green* и ПЦР *TaqMan* с результатами иммуногистохимии;

изучение взаимосвязи статуса *HER2* с показателями биохимических критериев крови пациентов и с характеристиками заболеваний в образцах пациентов с диагнозом рака молочной железы и рака желудка.

Объектом исследования являются образцы крови и опухолевой ткани пациентов с диагнозом рака молочной железы и рака желудка, а также клеточные линии рака желудка (*AGS(gastric adenocarcinoma)* и *HGE(human gastric epithelia)*).

Предметом исследования является определение количество копий гена *HER2/neu* при нормальном и патологическом состоянии клеток.

Методы исследования. При проведении исследований использованы методы выделения нуклеиновых кислот, спектрофотометрии, амплификации генов, гель-электрофореза, результаты методов иммуногистохимии и колориметрии, а также статистические программы.

Научная новизна исследования состоит в следующем:

выявлен новый эффективный протокол выделения ДНК из опухолевой ткани с выходом большего количества качественной ДНК, которая может применяться для проведения ПЦР в реальном времени;

разработаны новые протоколы проведения ПЦР в реальном времени с использованием интеркалирующего красителя *SYBR Green* и при помощи гибридизационных зондов *TaqMan* для определения количества гена *HER2/neu* в образцах рака желудка и молочной железы;

определено пороговое значение для количества гена *HER2/neu* на основе ПЦР в реальном времени;

определено отсутствие ассоциации статуса *HER2* с показателями биохимических критериев и характеристик рака молочной железы и рака желудка.

Практические результаты исследования заключаются в следующем:

доказана возможность определения количества гена *HER2/neu* в ситуациях рака желудка и рака молочной железы в кратчайшие сроки новыми протоколами метода ПЦР;

разработаны новые протоколы проведения ПЦР в реальном времени с использованием интеркалирующего красителя *SYBR Green* и при помощи гибридизационных зондов *TaqMan* для определения количества гена *HER2/neu* в образцах рака желудка и молочной железы;

определено соответствие метода иммуногистохимии с методом ПЦР *SYBR Green* на 87,5%, ПЦР *TaqMan* 93,75%;

определена высокая чувствительность и специфичность протокола ПЦР-РВ с использованием гибридизационных зондов *TaqMan* для определения количества гена *HER2/neu* при опухолевых заболеваниях;

обнаружено отсутствие статистически значимой связи ($p > 0,05$) характеристики и биохимических критериев заболеваний в образцах пациентов со статусом *HER2*.

Достоверность результатов исследования подтверждается тем, что они получены с применением современных биохимических методов исследований, анализы результатов были выполнены с использованием современных компьютерных программ. Достоверность результатов основывается на их обсуждении на республиканских и международных конференциях и публикацией результатов исследований в рецензируемых научных журналах.

Научная и практическая значимость результатов исследования. Научная значимость результатов исследования заключается в том, что выбран и оптимизирован эффективный протокол выделения ДНК из опухолевой ткани, разработаны новые протоколы проведения ПЦР-РВ с использованием интеркалирующего красителя *SYBR Green* и при помощи гибридизационных зондов *TaqMan* для определения количества гена *HER2/neu* в образцах рака желудка и молочной железы, протоколы подтверждены сравнительным анализом результатов с стандартизированным аналоговым методом - иммуногистохимии, также, выявлено отсутствие связи биохимических критериев и характеристик опухолевых заболеваний со статусом *HER2*.

Практическая значимость полученных результатов исследования заключается в том, что они могут служить основным материалом при определении количества гена *HER2/neu* в образцах рака желудка и молочной железы используя метод ПЦР в реальном режиме в медицинских клиниках Узбекистана. На основе полученных результатов можно разработать ПЦР-тест систему для определения количества гена *HER2/neu* при опухолевых заболеваниях использованием метод ПЦР-РВ с использованием интеркалирующего красителя *SYBR Green* и при помощи гибридизационных зондов *TaqMan*.

Внедрение результатов исследования. На основе полученных результатов изучения количественных вариантов гена *HER2/neu* при опухолевых заболеваниях:

результаты определения количественных вариантов гена *HER2/neu* при опухолевых заболеваниях с помощью протоколов (ПЦР) *TaqMan* и *SYBR Green* использованы в проекте А-10-007 «Разработка диагностической панели для молекулярной характеристики типов опухолей для сравнения возможности использования в таргетной терапии онкологических заболеваний» для разработки диагностической панели (справка Министерства инновации Республики Узбекистан № 05-05/2677, 8 июля 2020г.). В результате стала возможной разработка диагностической панели для молекулярной характеристики типов опухолей.

результаты выделения высококачественного и количественного раствора ДНК от опухолевой ткани у онкологических больных в кратчайших сроках с возможностью продолжительного применения для ПЦР по разработанному протоколу использованы в проекте МУ-ПЗ-20171025473 «Разработка реагентов для бисульфитной конверсии ДНК на выявление статуса метилирования у больных раком молочной железы» для приготовления первичных образцов (справка Министерства инновации Республики Узбекистан № 05-05/2677, 8 июля 2020 г.). В результате данный протокол дал возможность к проведению первой стадии приготовления образцов для бисульфитной конверсии ДНК.

Апробация результатов исследования. Результаты исследования прошли апробацию на 3 международных и 4 республиканских научно-практических конференциях.

Опубликованность результатов исследования. По теме диссертации опубликовано всего 15 печатных работ, из них 6 научных статей, в том числе 4 – в республиканских и 2 – в зарубежных журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Республики Узбекистан для публикации основных научных результатов диссертации.

Структура и объем диссертации. Структура диссертации состоит из введения, четырех глав, заключения, списка условных сокращений и списка использованной литературы. Объем диссертации составляет 114 страниц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

Во введении обоснована актуальность и востребованность темы диссертации, сформированы цели и задачи, а также объект и предмет исследования, приведено 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 структуре диссертации.

В первой главе диссертации «**Общая характеристика опухолевых заболеваний**» приведен всесторонний анализ характеристик опухолевых заболеваний, дана научная оценка состояния проблемы. В данной главе представлен обзор литературы, где раскрываются молекулярные механизмы биохимических процессов рака желудка и рака молочной железы, анализ данных гена *HER2/neu* как маркера трансформации отрицательного качества и современных методах определения его статуса. Приведены информации по применению таргетной терапии при лечении опухолевых заболеваний.

Во второй главе диссертации «**Современные методы определения количества гена *HER2/neu***» освещены этапы исследований, материалы и методы, использованные при их реализации. В частности, исследованы образцы 58 пациентов с диагнозом рак желудка в возрасте 35–82 лет (в среднем 56 ± 2 года) и 16 пациентов с диагнозом рак молочной железы в возрасте 37–80 лет (в среднем 55 ± 2 года), проживающих в Узбекистане. Кроме того, исследованы клеточные линии *AGS* (*gastric adenocarcinoma*) и *HGE* (*human gastric epithelia*) рака желудка. При выполнении исследования были применены следующие методы: выделение ДНК, гель-электрофорез, спектрофотометрия, полимеразная цепная реакция (ПЦР) и результаты методов иммуногистохимии и колориметрии, а также статистические программы.

В третьей главе диссертации «**Количественный анализ гена *HER2/neu***» освещены результаты разработки метода выделения ДНК из ткани раковой опухоли, разработка метода определения статуса *HER2* на основе ПЦР в реальном времени и сравнительный анализ результатов иммуногистохимии с ПЦР в реальном времени.

Разработан новый эффективный протокол для выделения ДНК из опухолевой ткани с высоким качеством и количеством, подходящим для использования в современной ПЦР. После использования ряда методов был выбран метод выделения ДНК с использованием набора реагентов Biospin Genomic DNA Extraction, колоночным методом с. В этом методе, в дополнение к протоколу выделения ДНК, выполнялись этапы механического измельчения и депарафинирования с использованием ксилола и спирта. В результате выделен раствор ДНК относительно высокого качества и количества. Концентрацию выделенной ДНК измеряли на спектрофотометре

Разработаны новые протоколы проведения ПЦР-РВ с использованием интеркалирующего красителя *SYBR Green* и при помощи гибридизационных зондов *TaqMan* для определения количества гена *HER2/neu* в образцах рака желудка и молочной железы с использованием ДНК, выделенной из клеточных линий (*AGS* и *HGE*) тканей рака желудка. Использованием этих протоколов были исследованы 74 образца ДНК, выделенных из опухолевой ткани молочной железы и желудка, и 74 образца ДНК, выделенных из крови, использованные в качестве контроля.

Для оптимизации проведения ПЦР-РВ с использованием интеркалирующего красителя *SYBR Green* использовались клеточные линии

рака желудка проверенные методом иммуногистохимии и известными нам результатами: клеточная линия *AGS(gastric adenocarcinoma)* – *HER2* отрицательный и клеточная линия *HGE(human gastric epithelia)* – *HER2* положительный. В качестве референтного гена был выбран ген β -глобин. В результате амплификации генов *HER2* и β -глобина, использованными для сравнения количеств этих генов в соответствии проведения ПЦР-РВ с использованием интеркалирующего красителя *SYBR Green* в образцах ДНК, выделенных обеих клеточных линий разница между циклическими значениями (*Ct*) составляла на *AGS* - 0.03 ± 0.0039 , на *HGE* - 5.16 ± 0.044 . Разница между циклическими значениями (*Ct*) в соответствии с протоколом *TaqMan* ПЦР в реальном времени составляла $1,67 \pm 0,046$ в *AGS* и $5,61 \pm 0,04$ в *HGE*. Эти показатели позволяют определять состояние *HER2* на основе ПЦР. В *HER2*-положительных вариантах разница между генами *HER2* и β -глобина в значение циклов *Ct* опухолевой ткани очень велика ($\Delta Ct = 5$), что означает избыточную экспрессию белка *HER2*, что и приводит к увеличению количества рецепторов *HER2* на поверхности опухолевых клеток и, следовательно, канцерогенезу. Разница между значениями цикла *Ct* генов *HER2* и β -глобина в выделенных образцах ДНК, используемых в качестве контролей, обычно невелика ($\Delta Ct = 0,2$) (рис. 1).

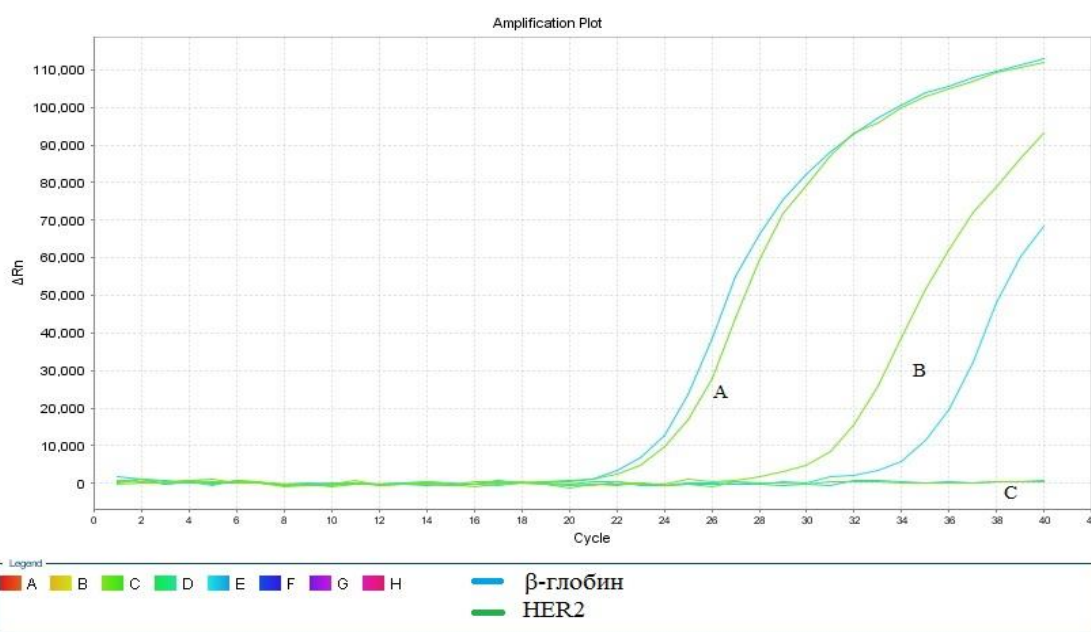


Рис. 1. Результат ПЦР-РВ с использованием интеркалирующего красителя *SYBR Green* при *HER2*-положительном варианте

На рисунке 1 показан результат ПЦР в реальном времени образца ДНК, выделенного из крови – А и результат ПЦР в реальном времени образца ДНК, выделенного из опухолевой ткани – Б. В *HER2*-отрицательных вариантах разница между *Ct* показателя циклов генов *HER2* и β -глобин опухолевых тканей ($\Delta Ct=0,3$) не уходит далеко от разницы между циклами генов *HER2* и β -глобина клеток крови ($\Delta Ct=0,1$) (рис. 2).

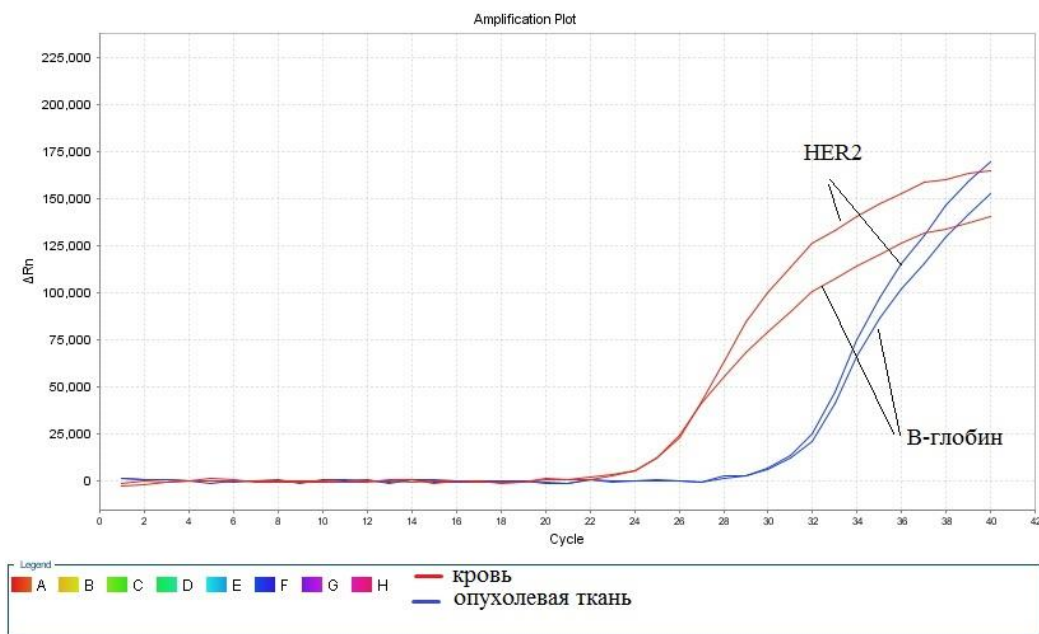


Рис. 2. Результат ПЦР-РВ с использованием интеркалирующего красителя SYBR Green при HER2-отрицательном варианте

Результаты сравнительного анализа этих параметров с показателями метода иммуногистохимии показывают, что ПЦР может также использоваться в качестве тест-системы для определения статуса HER2 в качестве дополнительного метода к методу иммуногистохимии. (1-таблица).

1-таблица

Сравнение результатов методов ИГХ и ПЦР-РВ на статус HER2 клеточных линий

Клеточные линии	Результат ИГХ	Ct-SYBR Green			Ct-TaqMan			Статус HER2
		HER2	β -globin	ΔCt	HER2	β -globin	ΔCt	
AGS	0	24.64 ± 0.37	24.67 ± 0.41	0.03 ± 0.0039	29.08 ± 0.42	30.75 ± 0.49	1.67 ± 0.046	HER2 - отрицательный
HE	+3	18.76 ± 0.44	23.92 ± 0.45	5.16 ± 0.044	22.94 ± 0.45	28,55 ± 0.36	5,61 ± 0.041	HER2 – положительный

Чтобы оценить качество метода ПЦР-РВ, была построена кривая ROC. Для получения численного значения клинической значимости метода ПЦР-РВ по сравнению с методом ИГХ использовался индикатор AUC (area under curve), который рассчитывался с использованием математического трапециевидного метода. Для нашей модели значение AUC составляет $0,857 \pm 0,32$, что, судя по экспертной шкале значений AUC, означает очень хорошее качество этой модели.

Разработанным методом ПЦР-РВ SYBR Green проведены исследования на 16 образцах выделенных ДНК из больных раком молочной железы, которые ранее были проверены на статус HER2 методом ИГХ. Пациентки имели возраст от 37 до 80, средний возраст 55 ± 2 . Они были из Ташкентской – 3 (18,75%), Самаркандской – 2 (12,5%), Ферганской – 2 (12,5%), Сырдарьинской – 2 (12,5%) области и из города Ташкента – 7 (43,75%).

В проведенном исследовании амплификация генов *HER2* и β -глобин, в выделенных образцах ДНК как из крови, так и из тканевого материала больных РМЖ, шла параллельно на уровне от 20 до 33 цикла. *HER2*-положительный вариант был выявлен в 8 (50%) образцах, *HER2*-отрицательный в 8 образцах (50%). Разница между *Ct* циклами *HER2*-положительных образцов варьировала от 4.01 ± 0.053 до 5.2 ± 0.037 , у *HER2*-отрицательных – от 0.7 ± 0.058 до 3.75 ± 0.068 .

В результате ПЦР-РВ с использованием *TaqMan* гибридизационных зондов из 16 образцов рака молочной железы *HER2*-положительный был выявлен в 9 (56,25%) образцах, *HER2*-отрицательный в 7 образцах (43,75%). Разница между циклами *HER2*-положительных образцов варьировала от 5.48 ± 0.047 до 10.87 ± 0.055 , у *HER2*-отрицательных – от 0.56 ± 0.018 до 3.5 ± 0.027 .

В данном исследовании, также, ПЦР-РВ проводился в 58 образцах больных раком желудка с возрастом от 35 до 82 (средний возраст 56 ± 2). Из них 30 мужчин и 28 женщин. Все были из регионов Наманганской области.

Разработанным методом ПЦР-РВ *SYBR Green* во всех образцах амплификация генов *HER2* и β -глобин, выделенных как из крови, так и из тканевого материала больных раком, шла параллельно на уровне от 21 до 36 цикла. В результате *HER2*-положительный был выявлен в 15 (25,86%) образцах, *HER2*-отрицательный в 43 образцах (74,14%). Разница между циклами *HER2*-положительных образцов варьировала от 4.12 ± 0.026 до 6.8 ± 0.047 , у *HER2*-отрицательных – от 0.7 ± 0.045 до 3.89 ± 0.056 .

При помощи разработанного протокола ПЦР-РВ с использованием *TaqMan* гибридизационных зондов в 58 образцах больных раком желудка определен статус *HER2*. Во всех образцах амплификация генов *HER2* и β -глобин, в выделенных образцах ДНК, как из крови, так и из тканевого материала больных раком, шла параллельно на уровне от 19 до 35 цикла. В результате *HER2*-положительный вариант был выявлен в 16 (27,59%) образцах, *HER2*-отрицательный в 42 образцах (72,41%). Разница между *Ct* циклами *HER2*-положительных образцов варьировала от 4.01 ± 0.075 до $11,84 \pm 0.038$, у *HER2*-отрицательных – от 0.3 ± 0.038 до 3.75 ± 0.081 .

При обработке этих данных, основанных на разнице между значениями цикла *Ct* генов *HER2* и β -глобин в образцах рака желудка и рака молочной железы, определено пороговое значение для количества гена *HER2* составляющее $\Delta Ct = 4.0$. Наличие порогового значения позволяет разделить исследуемую когорту на группы с увеличенным количеством копий гена *HER2/neu* и отсутствием количественных изменений маркера по результатам количественной ПЦР в режиме реального времени. При ПЦР-РВ *SYBR Green* из 76 образцов положительный вариант онкогена обнаружен в 24 случаях, что составило 31,57 %, в 52 (68,43%) образцах обнаружен отрицательный вариант *HER2/neu*. А при ПЦР *TaqMan* из 76 пациентов, в 26 (34,21%) случаях статус *HER2* положительный, а в 50 (65,79%) случаях обнаружен отрицательный вариант онкогена (3-рис.).

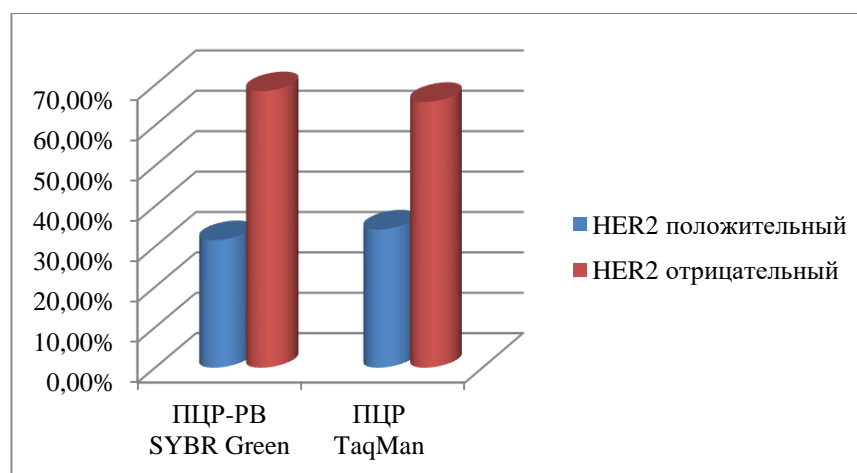


Рис. 3. Сопоставление результатов ПЦР-РВ SYBR Green и ПЦР-РВ TaqMan

Исследования Курабайши и других показывают, что по окраске и количеству рецепторов результаты ИГХ подразделяются на (0), (+1), (+2), (+3). При (0), (+1) статус *HER2*, однозначно, считается *HER2*-отрицательным. Когда (+2), исходя, от интенсивности окрашивания и опыта специалиста может быть либо *HER2*-отрицательным, либо *HER2*-положительным. Результат (+3) означает положительный статус онкогена. Сопоставление результатов тестирования методами ИГХ и ПЦР выполнено в 16 образцах опухолевой ткани молочной железы, сводные результаты которых представлены в таблице 2.

Таблица-2

Сопоставление результатов оценки статуса *HER2* методами ПЦР-РВ и ИГХ

Результаты ПЦР	Результат ИГХ									
	Score 0		Score +1		Score +2		Score +3		итого	
	2		4		3		7		16	
	ПЦР SYBR Green	ПЦР TaqMan	ПЦР SYBR Green	ПЦР TaqMan	ПЦР SYBR Green	ПЦР TaqMan	ПЦР SYBR Green	ПЦР TaqMan	ПЦР SYBR Green	ПЦР TaqMan
HER2-положительный					2	3	6	6	8	9
HER2-отрицательный	2	2	4	4	1		1	1	8	7
Всего	2	2	4	4	3	3	7	7	16	16

Эти результаты показывают, что ПЦР-РВ SYBR Green и ПЦР-РВ TaqMan полностью соответствует с результатами ИГХ. Из 16 образцов только один образец показывает разные показания между протоколами метода ПЦР-РВ. Под показателем (+2) по методу ИГХ существуют 3 образца, по ПЦР SYBR Green 2 из них HER2-положительные, один HER2-отрицательный. По протоколу ПЦР TaqMan все 3 образца выходят HER2-положительными.

Данные результаты свидетельствуют о том, что разница между протоколами ПЦР-РВ SYBR Green и ПЦР-РВ TaqMan составляет 6,25% (рис. 4).

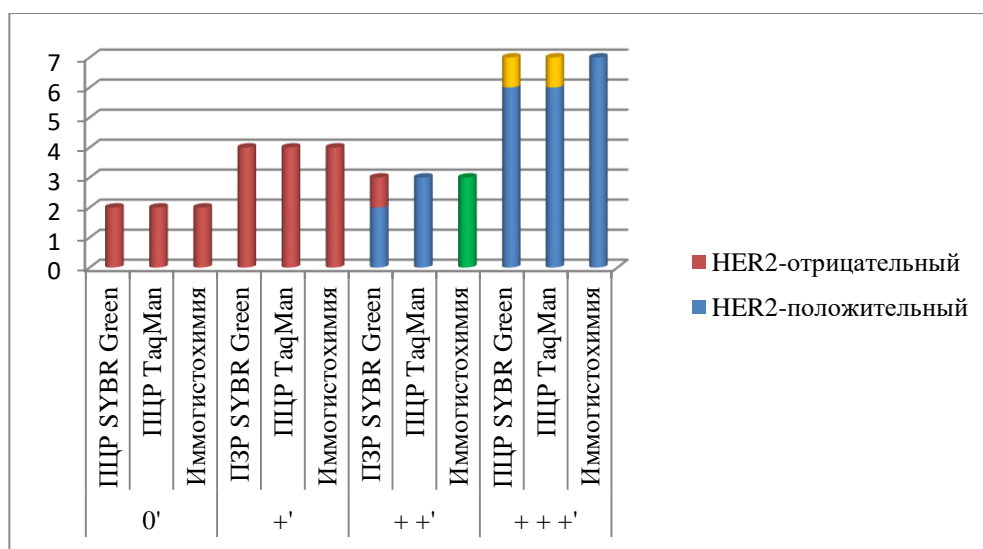


Рис. 4. Сопоставление результатов оценки статуса *HER2* методами ПЦР-РВ и ИГХ

В данном исследовании сравнение результатов ИГХ и ПЦР-РВ с использованием интеркалирующего красителя *SYBR Green* соответствует на 87,5%, а для ПЦР в реальном времени с зондами гибридизации *TaqMan* соответствует на 93,75%. Несоответствие с результатами ИГХ может быть объяснено тем фактом, что увеличение количества гена может не наблюдаться на уровнях ДНК, а повышенный уровень белков позволяет оценить статус *HER2* методом ИГХ.

Также, расхождение результатов может быть связано с недостаточной специфичностью метода ИГХ, при котором определяется суммарное содержание рецепторных белков *HER2/neu*. Тем не менее, в большинстве случаев ПЦР-РВ показал совпадение с ИГХ.

В четвёртой главе диссертации «Исследование ассоциации статуса *HER2* с биохимическими критериями и характеристиками опухолевых заболеваний» приведены и обсуждены результаты исследования ассоциация статуса *HER2* с биохимическими критериями и характеристиками опухолевых заболеваний. По данным клинических обследований больных с диагнозом рак молочной железы, количество общего белка в плазме крови варьировала между 36,4 и 84 г/л, количество ферментов аспаратаминотрансфераза и аланинаминотрансфераза варьировала 0,34-1,05 моль/мл и 0,34-0,86 моль/мл соответственно. Количество этих показателей при разных статусах *HER2* приведены в таблице 3 (табл. 3).

Таблица -3.

Взаимосвязь статуса *HER2* с показателями биохимических критериев

Статус <i>HER2</i>	Общий белок плазмы крови (г/л)	Аспарат аминотрансфераза (АсТ) (моль/мл)	Аланин Аминотрансфераза (АлТ) (моль/мл)
<i>HER2</i> – положительный	36,4-84	0,34-1,05	0,34-0,8
<i>HER2</i> – отрицательный	39-73,4	0,6-1	0,4-0,86

В ходе обработки данных изучен коэффициент корреляции показателей биохимических критериев со статусом *HER2*. В результате было выявлено, что коэффициент корреляции количество фермента аспартатаминотрансферазы со статусом *HER2* показал самую высокую степень $r=0.72$. Это даёт возможность сделать вывод о том, что при раке молочной железы статус *HER2* хорошо коррелируется количеством фермента аспартатаминотрансферазы чем аланинаминотрансферазы, что означает в процессе метаболизма аминокислот при раке молочной железы наблюдается увеличенная активность аспартатаминотрансферазы.

Для изучения возможность применения разработанного протокола метода ПЗР для определения количество гена *HER2* при различных биохимических критериях у пациентов с диагнозом рак молочной железы сделан статистический анализ всех критериев. Статистический анализ взаимосвязи статуса *HER2* с критериями результатов биохимических анализов больных с раком молочной железы приведены в таблице 4 (4-таблица).

Таблица -4.

Взаимосвязь статуса *HER2* с показателями биохимических критериев пациентов с диагнозом рак молочной железы

Критерий	Выраженность дозы онкогена	Коэффициент корреляции	R Фишера
Общий белок плазмы крови	0,1360	0,58	0,8281
Аспартатаминотрансфераза (<i>AcT</i>)	0,1813	0,72	0,7621
Аланинаминотрансфераза (<i>AlT</i>)	0,1747	0,63	0,7500

По результатам исследований ассоциации статуса *HER2* с показателями биохимических критерий пациентов с диагнозом рак молочной железы по методу ПЦР-РВ показали, что критерий биохимических анализов не влияет на статус *HER2* ($p>0,05$).

По данным клинических обследований больных с диагнозом рак желудка, количество общего белка в плазме крови варьировала между 24 и 80 г/л, а количество ферментов *AcT* и *AlT* варьировала 0,2-1,18 моль/мл и 0,9-0,34 моль/мл соответственно. В таблице 3.8 приведено количество этих показателей при *HER2* – положительном и *HER2* – отрицательном статусе *HER2* (табл. 5).

Таблица -5.

Взаимосвязь статуса *HER2* с показателями биохимических критериев

Статус <i>HER2</i>	Общий белок плазмы крови (г/л)	Аспартат аминотрансфераза (<i>AcT</i>) (моль/мл)	Аланин Аминотрансфераза (<i>AlT</i>) (моль/мл)
<i>HER2</i> – положительный	28,9-80	0,3-1,08	0,34-0,81
<i>HER2</i> – отрицательный	24-78,9	0,2-1,18	0,35-0,9

При изучении коэффициента корреляции с показателями биохимических критериев и статуса *HER2* при раке желудка выявлено, что коэффициент

корреляции количество фермента аспаратаминотрансферазы со статусом *HER2* показал самую высокую степень $r=0.73$. Это даёт возможность сделать вывод о том, что при раке желудка статус *HER2* хорошо коррелируется количеством фермента аспаратаминотрансферазы чем аланинаминотрансферазы, что означает в процессе метаболизма аминокислот при раке молочной железы наблюдается увеличенная активность аспаратаминотрансферазы.

Для изучения возможность применения разработанного протокола метода ПЗР для определения количество гена *HER2* при различных биохимических критериях у пациентов с диагнозом рак молочной железы изучен критерий Фишера. Статистический анализ взаимосвязи статуса *HER2* с критериями результатов биохимических анализов больных с раком молочной железы приведены в таблице 6 (6-таблица).

Таблица -6.
Взаимосвязь статуса *HER2* с показателями биохимических критериев пациентов с диагнозом рак желудка

Критерий	Выраженность дозы онкогена	Коэффициент корреляции	$R_{\text{Фишера}}$
Общий белок плазмы крови	0,075	0,54	0,7948
Аспаратаминотрансфераза (<i>AcT</i>)	0,2280	0,73	0,2654
Аланинаминотрансфераза (<i>AlT</i>)	0,1433	0,59	0,7621

Итак, в данном исследовании не установлено статистически значимой связи между статусом *HER2*, полученным по результатам тестирования методом количественной ПЦР в реальном времени и количества общего белка плазмы крови ($PMЖ - R_{\text{Фишера}} = 0,8281$, $RЖ - R_{\text{Фишера}} = 0,7948$), количества аспаратаминотрансферазы ($PMЖ - R_{\text{Фишера}} = 0,7621$, $RЖ - R_{\text{Фишера}} = 0,2654$), также количества аланинаминотрансферазы ($PMЖ - R_{\text{Фишера}} = 0,7500$, $RЖ - R_{\text{Фишера}} = 0,7621$).

В результате статистических анализов обнаружен более высокий коэффициент корреляции аспаратаминотрансферазы чем аланинаминотрансферазы с обеими вариантами статуса *HER2*, что означает в процессе метаболизма аминокислот при раке молочной железы и раке желудка наблюдается увеличенная активность аспаратаминотрансферазы, но тем не менее, этот показатель по критерию Фишера показал статистически не значимую связь. Отсутствие статистически значимой связи ($p > 0,05$) между критериями биохимических анализов и статуса *HER2* свидетельствует о возможности использования определённого порогового значения увеличения количества копий онкогена по результатам ПЦР в режиме реального времени у всех пациентов с раком желудка и молочной железы.

В ходе обработки данных была изучена взаимосвязь между стадиями онкозаболеваний по мировой стандартной классификации со статусом *HER2*. У пациенток с раком молочной железы встречались I, II, III, IV стадии болезни. Из 16 пациенток 2 (12,5%) имели I стадию, одна (6,25%) была на II

стадии болезни, 3 (18,75%) пациенток были на ПБ стадии, 4 (25%) имели ША стадию, 2 (12,5%) из них были на ШБ стадии, 3 (18,75%) на ШС стадии и одна (6,25%) была на IV стадии рака молочной железы. Исследование взаимосвязи статуса *HER2* со стадиями рака молочной железы по методу ПЦР-РВ показали, что на ПБ, ША и ШБ стадиях *HER2* – положительный вариант встречается в одинаковых сравнительно больших количествах (12,50%), а в ШС и IV стадиях болезни положительный вариант онкогена не выявился вообще.

По данным результатам исследования сделан вывод, что взаимосвязь между статусом *HER2* и стадиями рака молочной железы показывает на разных стадиях заболевания разные показатели. В том числе, на стадии ПА выявились только положительные варианты, а на IV стадии рака молочной железы выявились только отрицательные варианты статуса *HER2* по ПЦР-РВ *TaqMan* и *SYBR Green*.

По анкетам заболевания больных раком желудка изучены стадии заболевания во время исследования. У 58 пациентов с раком желудка встречались все I, II, III, IV стадии болезни. Из них: 4 (6,89%) были на IA стадии, 5 (8,62%) были на стадии IB, 5 (8,62%) на IIA, 4 (6,89%) на IIB стадии, 4 (6,89%) на IIIA, 6 (10,34%) на IIIB стадии, 8 (13,79%) на IIIC стадии и 22 (37,93%) были на IV стадии рака желудка.

Исследование взаимосвязи статуса *HER2* со стадиями рака желудка по методу ПЦР-РВ показали, что на IA стадии варианты статуса *HER2* – положительный вариант встречается в одинаковых сравнительно количествах (3,44%), в остальных стадиях количество положительных вариантов онкогена превышает от количества отрицательных вариантов и IV стадии болезни положительный вариант *HER2* показал самую большую часть из всех. Эти результаты показали, что на IV стадии рака желудка выявляется разница количества вариантов статуса *HER2* при ПЦР-РВ *SYBR Green* и ПЦР-РВ *TaqMan*. Такую разницу между стадиями рака желудка и статуса *HER2* можно объяснить тем, что большая часть пациентов обращались к врачам на последней стадии заболевания и также, по мировой статистике повышенное количество копий гена *HER2* выявляется в небольших процентах общих ситуациях заболевания.

В рамках данного исследования оценка связи между статусом *HER2*, полученными по результатам тестирования методом количественной ПЦР в режиме реального времени характеристиками заболевания. Также выполнен анализ частоты увеличенных доз онкогена в подгруппах больных с раком желудка и с раком молочной железы. Сводные данные анализа представлены в таблице 7 и 8. В данном исследовании неустановленно статистически значимой связи между статусом *HER2*, полученным по результатам тестирования методом количественной ПЦР в реальном времени и возрастом пациентов ($R_{\text{Ж}} - R_{\text{Уилкоксона}} = 0,6271$, $R_{\text{МЖ}} - R_{\text{Уилкоксона}} = 0,7123$), стадией заболевания ($R_{\text{Ж}} - R_{\text{Краскела Уоллиса}} = 0,8237$, $R_{\text{МЖ}} - R_{\text{Краскела Уоллиса}} = 0,8156$), также пола пациентов ($R_{\text{Уилкоксона}} = 0,7224$) (табл. 7 и 8).

Таблица-7

**Результаты статистического анализа связи между статусом HER2
характеристиками рака молочной железы**

Критерий	Подгруппы	Показатели			
		Выраженность дозы онкогена, медиана	Частота увеличения дозы онкогена(%)	P	P _{Фишера}
Возрастные подгруппы	До 55 лет	0,079	31,25	P _{Уилкоксона} 0,7123	0,7631
	Старше 55 лет	0,062	25		
Стадии заболевания	I стадия	0,080	6,25	P _{Краскела} Уоллиса 0,8156	0,6642
	II стадия	0,070-0,080	18,75		
	III стадия	0,070-0,080	28,12		
	IV стадия	0,070	0		

Таблица-8

**Результаты статистического анализа связи между статусом HER2
характеристиками рака желудка**

Критерий	Подгруппы	Показатели			
		Выраженность дозы онкогена, медиана	Частота увеличения дозы онкогена(%)	P	P _{Фишера}
Возрастные подгруппы	До 55 лет	0,083	8,62	P _{Уилкоксона} 0,6271	0,7937
	Старше 55 лет	0,046	17,24		
Стадии заболевания	I стадия	0,090	6,89	P _{Краскела} Уоллиса 0,8237	0,6571
	II стадия	0,070-0,080	3,44		
	III стадия	0,070-0,080	6,89		
	IV стадия	0,070-0,080	8,72		
Пол больных	Женщины	0,064	13,79	P _{Уилкоксона} 0,7224	0,7132
	Мужчины	0,078	12,06		

Частота увеличения дозы онкогена не различалась в возрастных подгруппах пациентов (РЖ – P_{Фишера}=0,7937, РМЖ – P_{Фишера}=0,7631), при различных стадиях заболевания (РЖ – P_{Фишера}=0,6571, РМЖ – P_{Фишера}=0,6642), также не зависела от пола пациентов (P_{Фишера}=0,7132).

Отсутствие статистически значимой связи (p>0,05) между характеристиками заболеваний и статуса *HER2* свидетельствует о возможности использования определённого порогового значения увеличения количества копий онкогена по результатам ПЦР в режиме реального времени у всех пациентов с раком желудка и молочной железы.

ВЫВОДЫ

1. Предложен новый эффективный протокол выделения ДНК из опухолевой ткани, с выходом большего количества качественной ДНК для применения в проведении ПЦР-РВ.

2. Для определения статуса *HER2* в образцах опухолевой ткани предложены два усовершенствованных метода ПЦР-РВ *SYBR Green* и ПЦР-РВ *Taqman*, основанные на разнице значений циклов *Ct* между генами *HER2* и β -глобина.

3. Сравнительный количественный анализ генов *HER2* и β -глобина с разницей пороговых значений не менее $\Delta Ct=4,0$ ($AUC=0,857\pm 0,032$) позволяет проводить высокоспецифичное разделение опухолей рака желудка и рака молочной железы на *HER2*-отрицательные и *HER2*-положительные.

4. Результаты определения количество гена *HER2/neu* с помощью предложенного протокола *TaqMan* ПЦР-РВ хорошо коррелируют с результатами ИГХ методов определения статуса *HER2* опухолей РМЖ.

5. Применение данного протокола для анализа образцов опухолевой ткани 58 больных раком желудка выявило увеличение дозы гена *HER2* в 15 (25,86 %) образцах, анализ 16 образцов РМЖ, выявил соответственно *HER2* положительный статус в 43,75 % образцах

6. Параметры статуса *HER2*, определяемые методом ПЦР в режиме реального времени, не зависят ($p>0,05$) от биохимических критериев и характеристик заболеваний, которые свидетельствует о возможности использования определённого порогового значения увеличения количества копий онкогена по результатам ПЦР в режиме реального времени у всех пациентов с раком желудка и молочной железы.

**SCIENTIFIC COUNCIL AWARDING SCIENTIFIC DEGREES
DSc.03/30.12.2019.B.01.13 AT THE INSTITUTE OF BIOPHYSICS AND
BIOCHEMISTRY, NATIONAL UNIVERSITY OF UZBEKISTAN**

INSTITUTE OF BIOPHYSICS AND BIOCHEMISTRY

RUSTAMOVA SHOKHISTA OMONJONOVNA

**INVESTIGATING OF QUANTITATIVE VARIANTS OF THE
HER2/NEU GENE IN CANCER DISEASES**

03.00.01 – Biochemistry

**DISSERTATION ABSTRACT
OF THE DOCTOR OF PHILOSOPHY (PhD) OF BIOLOGICAL SCIENCES**

Tashkent – 2020

This dissertation of PhD has been registered with the number B2019.2.PhD/B292 at the Supreme Attestation Commission of the Cabinet of Ministers of the Republic of Uzbekistan

The dissertation has been prepared at the Institute of Biophysics and Biochemistry at the National University of Uzbekistan.

The abstract of the dissertation is posted in three (Uzbek, Russian, English (resume)) languages on the website of the Scientific Council and on the website of «ZiyoNet» information and educational portal.

Scientific supervisor:

Turdikulova Shahloxon Utkurovna
doctor of biological sciences, professor

Official opponents:

Yuldashev Nasirdjan Muhammedjanovich
doctor of biological sciences, professor

Muhamedov Rustam Sultanovich
doctor of biological sciences, professor

Leading organisation:

Center of Genomics and bioinformatics

The defence of the dissertation will take place on «14» october 2020 year 14.00 at the meeting of the Scientific council DSc.03/30.12.2019.B.01.13 of scientific degrees at the Institute of Biophysics and biochemistry at the National University of Uzbekistan at the following Address: 100174, Tashkent city, Almazar district, Students town, University St. 174. Phone: (+99871) 246-68-96.

The dissertation has been registered at the Information Resource Centre of Institute of Biophysics and biochemistry, National University of Uzbekistan (registration number №20). Address: 100174, Tashkent city, Almazar district, Students town, University St. 174. Phone: (+99871) 246-68-96, e-mail: ibb-nuu@mail.ru.

The abstract of dissertation is distributed on «29» september 2020
(Protocol at the register № 1 dated «29» september 2020)



[Handwritten signature]

Sabirov Ravshan Zairovich
Chairman of scientific degrees awarding
of the scientific council, D.B.Sc., academician

Pozilov Mamurjon Komiljonovich
Scientific secretary of scientific degrees awarding
of the scientific council, D.B.Sc.

[Handwritten signature]

Kadyrova Dilbar Abdullaevna
Chairman of the seminar of scientific degrees
awarding of the scientific council, D.B.Sc., professor

INTRODUCTION (PhD thesis abstract)

The aim of the research work is to develop a new protocol for the method for quantifying the *HER2/neu* gene in cancer diseases as a marker for the use of targeted therapy.

The objects of the research work: blood and tumor tissue samples from patients with breast and stomach cancer, as well as stomach cancer cell lines (*AGS* (gastric adenocarcinoma) and *HGE* (human gastric epithelia)).

The scientific novelty of the research is as follows:

it was determined a new efficient protocol for DNA isolation from tumor tissue with the release of more high-quality DNA, which can be used for real-time PCR;

developed new protocols for real-time PCR using the *SYBR Green* intercalation dye and *TaqMan* hybridization probes to determine the amount of the *HER2/neu* gene in gastric and breast cancer samples;

it was determined a threshold value for the amount of *HER2/neu* gene based on real-time PCR, which allows highly specific separation of gastric and breast cancer tumors into *HER2*-negative and *HER2*-positive groups;

it was determined the absence of an association of *HER2* status with indicators of biochemical criteria and characteristics of breast and stomach cancer.

Implementation of the research results: Based on the results obtained from studying quantitative variants of the *HER2/neu* gene in tumor diseases:

the results of determining quantitative variants of the *HER2/neu* gene in cancer diseases using the *TaqMan* and *SYBR Green* protocols (PCR) were used in project A-10-007 «Development of a diagnostic panel for molecular characterization of tumor types to compare the possibility of using it in targeted therapy of cancer» for developing a diagnostic panel (certificate of the Ministry of Innovation of the Republic of Uzbekistan No. 05-05/2677, July 8, 2020). As a result, it became possible to develop a diagnostic panel for molecular characterization of tumor types.

the results of isolation of a high-quality and quantitative DNA solution from tumor tissue in cancer patients in the shortest possible time with the possibility of long-term use for PCR according to the developed protocol were used in the project MU-PZ-20171025473 «Development of reagents for bisulfite conversion of DNA to identify the methylation status in patients with breast cancer» for preparation of primary samples (certificate of the Ministry of Innovation of the Republic of Uzbekistan No. 05-05/2677, July 8, 2020). As a result, this protocol made it possible to carry out the first stage of preparing samples for bisulfite DNA conversion.

The structure and volume of the dissertation. The dissertation consists of introduction, four chapters, conclusion, list of abbreviations and list of used literatures. The volume of the dissertation is 114 pages.

ЭЪЛОН ҚИЛИНГАН ИШЛАР РЎЙХАТИ
СПИСОК ОБУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ
LIST OF PUBLISHED WORKS

I бўлим (I часть, I part)

1. Рустамова Ш.О., Турдикулова Ш.У. Реал вақтдаги ПЗР асосида ошқозон саратонининг *HER2* мусбат вариантыга тест ўтказиш усулини ишлаб чиқиш // Инфекция, иммунитет ва фармакология. –2017. –№2. – Б. 177-180. (03.00.00. №7)
2. Рустамова Ш.О., Турдикулова Ш.У. Разработка метода определения статуса *HER2* больных раком желудка // Доклады Академии наук Республики Узбекистан. –2018. – №1. – С. 101-105. (03.00.00. №6)
3. Рустамова Ш.О., Турдикулова Ш.У. Онкоген *HER2* - прогностический и предиктивный молекулярно-биологический фактор при опухолевых заболеваниях // Инфекция, иммунитет и фармакология. –2019. – №1. – С. 173-184. (03.00.00. №7)
4. Рустамова Ш.О., Турдикулова Ш.У. Кўкрак беги саратонида *HER2* онкомаркери микдорий анализи: *TaqMan*, *Sybr Green* пзр методлари билан иммуногистохимия натижаларини солиштириш // Хоразм Маъмуни Академияси ахборотномаси. – 2019. – №3/1. – Б. 42-45. (03.00.00. №12)
5. Rustamova Sh.O., Turdikulova Sh.U., Abdullayev A.A. Molecular diagnostics in cancer diseases // International Journal of Bio-Science and Bio-Technology (IJBSBT). – 2019. – №11. – P. 100-110. (IF (2019) 7,4).
6. Rustamova Sh.O., Abdullayev A.A., Turdikulova Sh.U. Determination of quantitation of the *HER2/neu* gene in tumors by a rt-PCR method // International Journal of Advanced Science and Technology. – 2020. – №29/5. – P. 1612-1618. (Scopus CiteScore – 0,2 (2020)).

II бўлим (II часть, part II)

7. Рустамова Ш.О. Наманган ҳудудида ошқозон саратони касаллигини келтириб чиқарувчи омилларни ўрганиш // Наманган давлат университети Илмий ахбороти. – 2015. – №2. – Б. 238-241.
8. Рустамова Ш.О. Ошқозон саратони билан касалланган беморларнинг Наманган вилояти туманлари бўйича тарқалиш динамикаси // Наманган давлат университети Илмий ахбороти. – 2015. – №2. – Б. 241-244.
9. Рустамова Ш.О. Изучение этиологии рака желудка в Наманганской области // Сборник материалов региональной научно-практической конференции под девизом «XXI век – век интеллектуального поколения». – Наманган, 2015. – С. 295-297.
10. Рустамова Ш.О. Разработка метода определения статуса *HER2* методом ПЦР в реальном времени // Сборник материалов 1-ой региональной

научно-практической конференции «Молодые учёные Ферганской долины». – Наманган, 2016. – С. 293-297.

11. Dalimova D.A., Rustamova Sh.O., Turdikulova Sh.U. Quantitative polymerase chain reaction (PCR) methods for diagnostics of HER2-positive breast and gastric cancers // II HARC conference on translational research in healthy ageing. – Poland, 2016. – 13-p.

12. Рустамова Ш.О., Турдикулова Ш.У. Молекулярная диагностика уровня активации онкогена HER-2/neu для оценки возможности применения таргетной терапии онкозаболеваний // «Science, research, development» международная научная конференция. – Лондон, 2019. – С. 93-98.

13. Рустамова Ш.О., Турдикулова Ш.У. Сравнительный анализ ПЦР-РВ Sybr Green и TaqMan с методом иммуногистохимии в образцах рака молочной железы // Материалы Республиканской научной онлайн-конференции по теме «Перспективы развития научного прогресса в XXI веке и роль инноваций в этом процессе». – Ташкент, 2019. – С. 28-29.

14. Рустамова Ш.О., Турдикулова Ш.У. Полимераза цепная реакция как метод определения количественных вариантов гена *HER2* у больных раком желудка // Сборник материалов 23-международной Пущинской школы-конференции «Биология наука XXI века». – Пущино, 2019. – 372-с.

15. Рустамова Ш.О., Турдикулова Ш.У. Оптимизация методов выделения ДНК из опухолевых тканей // Материалы I научно-практической конференции молодых учёных «Достижения и перспективы биофизики и биохимии». – Ташкент, 2019. – С. 83-85.

Автореферат «ЎзМУ хабарлари» журнали таҳририятида таҳрирдан
ўтказилди (10.09.2020 й.).