

ОСНОВЫ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ОНКОГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

А. В. Мисюрин

ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н. Н. Блохина» Минздрава России;
Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24;
ООО «ГеноТехнология»; Россия, 117485 Москва, ул. Профсоюзная, 104

Контакты: Андрей Витальевич Мисюрин cyclon@nm.ru

Для выявления причины патологического состояния, установления диагноза и контроля эффективности лечения у больных онкогематологическими заболеваниями используют методы молекулярной диагностики. В результате хромосомных перестроек в опухолевых клетках при гемобластозах либо возникают химерные онкогены, либо активируется гиперэкспрессия важных регуляторных генов. Это принципиальное различие в исходе хромосомных перестроек необходимо учитывать при разработке молекулярно-генетических диагностик. Методы молекулярной диагностики существенно превосходят в чувствительности другие подходы, поэтому они очень эффективны при выявлении остаточных опухолевых клеток и для раннего выявления рецидива.

Ключевые слова: полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией, полимеразная цепная реакция в реальном времени, транслокация, химерный онкоген, минимальная остаточная болезнь, лейкомия

DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-4-18-24

ESSENTIALS OF THE MOLECULAR DIAGNOSIS OF ONCOHEMATOLOGICAL DISEASES

A. V. Misyurin

N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia; 24 Kashyrskoe shosse, Moscow, 115478, Russia;
«Genotechnology»; 104 Profsoyuznaya St., Moscow, 115478, Russia

Molecular genetic and molecular biology methods enable one to reveal pathogenetic basis of oncohematological diseases, they are particular useful for diagnostic purposes, to control and evaluate treatment efficiency. In leukemia patients there are two different types of chromosomal anomalies: some of them give rise for chimeric oncogenes, others activate hyperexpression of regulatory genes. It is necessary to take into account this difference in order to properly develop molecular genetic tests. Molecular tests are more sensitive to compare with other approaches, due to this fact they are especially useful to monitor residual leukemia cells and for early detection of relapse.

Key words: polymerase chain reaction with reverse transcription, real-time polymerase chain reaction, translocation, chimeric oncogene, minimal residual disease, leukemia

Введение

Методы молекулярной диагностики в онкогематологии применяются для выявления причины патологического состояния, установления диагноза и контроля эффективности лечения на уровне геномной ДНК, РНК и белков. При этом в основе подавляющего большинства современных методов молекулярной диагностики лежат 3 простых природных явления.

Во-первых, комплементарное взаимодействие нуклеиновых кислот, за счет которого можно осуществлять гибридационное связывание изучаемого образца ДНК или РНК со специфической пробой (зондом) [1]. На этом принципе основаны такие важные методы, как гибридизация по Саузерну [2, 3] и Нозерн-гибридизация [4], анализ экспрессии генов

при помощи олигонуклеотидных микрочипов [5]. Кроме того, олигонуклеотиды, комплементарные изучаемому участку ДНК, применяют при проведении полимеразной цепной реакции (ПЦР, polymerase chain reaction – PCR) [6] и полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ, Real Time PCR, RQ PCR) [7]. Анализ первичной последовательности ДНК (секвенирование), который дает прямую информацию о нарушениях структуры генов, в настоящее время также проводят с использованием комплементарных олигонуклеотидов (модифицированный метод Сэнгера, секвенирование нового поколения) [8–10]. На основе принципа комплементарного взаимодействия цепей ДНК работает метод флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) [11],

без которого невозможно представить современную цитогенетическую диагностику. При помощи совокупности этих методов можно выявлять клинически значимые маркеры, проводить поиск новых генных маркеров, характерных для различных заболеваний системы кроветворения, а также определять количество опухолевых клеток в костном мозге и периферической крови, что очень важно для оценки эффективности лечения гемобластозов.

Во-вторых, используется способность иммунной системы высших организмов производить особые белки – антитела, которые могут специфически взаимодействовать с различными молекулами и молекулярными комплексами. При помощи гибридной технологии можно получать моноклональные антитела с заданной специфичностью и в необходимом количестве. Специфические антитела применяют для определения иммунофенотипа клеток. При этом с помощью антител окрашивают мазки крови и костного мозга или анализируют связавшие антитела клетки при помощи проточного цитофлуориметра [12]. Кроме того, специфические антитела используют при проведении иммуноферментного анализа [13], анализа белков при помощи вестерн-блоттинга [14]. С помощью антител определяют группы крови [15], иммунную совместимость доноров и реципиентов костного мозга [16].

В-третьих, ряд методов молекулярной диагностики базируется на способности особых ферментов – эндонуклеаз рестрикции, или рестриктаз, – расщеплять ДНК в характерных нуклеотидных последовательностях (сайтах), узнавание которых определено специфичностью применяемой рестриктазы. Открытие этих ферментов в начале 1970 годов заложило основы нового раздела экспериментальной молекулярной биологии – генетической инженерии [17–19]. При помощи рестриктаз и специфических зондов, комплементарных изучаемому участку геномной ДНК, можно выявлять мутации генов, приводящие к развитию наследственных или онкологических заболеваний.

Общие принципы молекулярной диагностики онкогематологических заболеваний

Молекулярно-биологические методы применяются для установления диагноза, составления прогноза, оценки эффективности и определения тактики лечения гемобластозов. Результаты исследований, проведенных при помощи молекулярных методов, не противоречат, но существенно дополняют канонические цитоморфологические и цитохимические критерии диагностики.

Аномальный иммунофенотип определяют при помощи проточной цитофлуориметрии. Использование широкой панели антител дает возможность определить природу опухолевых клеток, установить

правильный диагноз, без чего невозможно проведение адекватного лечения. Кроме того, проточная цитофлуориметрия применяется и для мониторинга минимальной остаточной болезни (МОБ).

Классические методы цитогенетического анализа позволяют получить неоценимую информацию при установлении диагноза в дебюте заболевания. Диагностика гемобластозов стала более надежной с появлением специфических молекулярных зондов, при помощи которых можно проводить FISH-анализ и выявлять хромосомные aberrации даже в неделящихся клетках. Кроме того, метод FISH позволяет с высокой чувствительностью обнаруживать остаточные опухолевые клетки, что крайне необходимо при мониторинге МОБ.

Применение молекулярных методов, в особенности ПЦР, для диагностики гемобластозов стало возможным в результате накопления данных о молекулярных механизмах возникновения этих заболеваний. В настоящее время охарактеризованы многие генетические дефекты, которые приводят к неопластической трансформации кроветворных клеток. Были исследованы на молекулярном уровне области слияния материала разных хромосом, которые обмениваются своими частями в результате многочисленных повторяющихся транслокаций – маркеров гемобластозов, которые ранее были исследованы и классифицированы с помощью цитогенетических методов.

Оказалось, что существуют 2 принципиально разных варианта структурных перестроек в случае как транслокаций, так и инверсий. Так, некоторые гены оказываются вблизи точек разрыва и приобретают порой такое новое соседство, которое коренным образом изменяет характер их работы, но структура этих генов обычно остается прежней. Если же разрыв происходит внутри самих генов, то в результате возникают гены-химеры, получающиеся путем слияния без сдвига рамки считывания последовательностей разных генов. Таким образом, в первом случае не возникает слитых между собой генов, они только пространственно сближаются, а малигнизация клеток зависит от количественных параметров работы таких генов и их взаимного влияния. Во втором случае образуется слитный новый ген, сохраняющий лишь некоторые важные черты своих предшественников.

Молекулярная диагностика онкомаркеров, которые активируются при гемобластозах одним из двух описанных выше способов, проводится по-разному.

В первом случае диагностику при помощи ПЦР проводят на основе данных о структуре геномных точек разрыва, если они возникают у разных больных, в пределах разрешающей способности ПЦР, определяемой максимальным размером фрагмента

ДНК, который может синтезировать полимеразу. В этом случае анализируемым материалом является препарат геномной ДНК, выделенной из клеток костного мозга или периферической крови пациентов. Кроме того, диагностику можно осуществлять, определяя уровень экспрессии структурно не измененного онкогена, но в процессе хромосомных перестроек оказавшегося гиперэкспрессированным в результате сближения его промоторной области с энхансером гена, который в норме был расположен в другой хромосоме. Для количественной оценки уровня экспрессии таких онкомаркеров применяют метод ПЦР-РВ. При этом в качестве исследуемого материала используют тотальную РНК, выделенную из клеток костного мозга или периферической крови пациентов. При помощи фермента обратной транскриптазы РНК превращается в кДНК, которая затем служит матрицей в ПЦР-РВ. При этом способ количественной оценки зависит от того, каким контрольным материалом располагает исследователь. Примером заболевания, при котором происходит активация онкогена, но не меняется организация его структурной части, может служить лимфома Беркитта [20]. При этом заболевании в 90 % случаев малигнизация В-лимфоцитов происходит в результате транслокации t(8;14)(q24;q32). Данная транслокация приводит к сближению гена *c-MYC* из хромосомы 8 с генами тяжелых цепей иммуноглобулинов из хромосомы 14 [21]. Близость энхансеров генов цепей иммуноглобулинов ведет к повышенной экспрессии гена *c-MYC* [22]. Молекулярную диагностику этого заболевания проводят по оценке уровня экспрессии гена *c-MYC* и при помощи анализа геномных точек разрыва [23].

При 2-м варианте активации протоонкогенов, вызывающих развитие гемобластозов, происходит существенная структурная перестройка, в результате которой возникают химерные онкогены. Структурные особенности химерных онкогенов — маркеров гемобластозов определяют тактику проведения молекулярной диагностики. Как правило, в этих случаях рутинная диагностика при помощи ПЦР-амплификации областей геномной ДНК, содержащих точки разрыва, оказывается невозможна, так как геномные точки разрыва индивидуальны у разных больных и возникают в случайных местах обширных интронных последовательностей. Клонирование и изучение геномных точек разрыва у таких больных до сих пор граничат с искусством, поэтому проводятся исключительно в рамках фундаментальных исследований и не применяются для целей диагностики. При созревании м-РНК химерных онкогенов большое разнообразие, существующее на уровне геномных точек разрыва у разных больных, несущих одну и ту же хромосомную перестройку, нивелируется за счет

природного механизма — сплайсинга. В итоге все сводится к образованию нескольких основных вариантов зрелой м-РНК химерного онкогена, которые могут выявляться у разных больных. В настоящее время диагностику химерных онкогенов при гемобластозах проводят не по геномной ДНК, а по детекции точек слияния экзонов генов-партнеров, которые участвуют в образовании химерного онкогена. Для этого используют метод ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР, reverse transcription PCR — RT-PCR), чувствительность которого позволяет выявлять даже 1 опухолевую клетку среди 10 000–1 000 000 нормальных (чувствительность 10^{-4} – 10^{-6}). При этом всего 2 или 3 системы праймеров позволяют исследователю при помощи ОТ-ПЦР проводить определение основных вариантов того или иного химерного онкогена. Например, при помощи 2 систем праймеров можно выявлять при помощи ОТ-ПЦР 2 основных типа м-РНК химерного онкогена *PML-RARa* (варианты *bcr3* и *bcr1*), а также редкий вариант *bcr2 PML-RARa* (при помощи той же диагностической системы, которую применяют для обнаружения варианта *bcr1*) [24–26]. Таким же образом при помощи ОТ-ПЦР проводят диагностику химерных онкогенов *BCR-ABL* типов p190 и p210 (разные виды транслокации t(9;22) — маркеры острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ) и хронического миелолейкоза (ХМЛ)); *MLL-AF9*, *MLL-AF4*, *MLL-ENL*(t(9;11), t(4;11), t(11;19) — маркеры ОЛЛ); *E2A-PBX1*, *SIL-TAL1*, *TEL-AML1*(t(1;19), del(1)(p32;p32), t(12;21) — маркеры ОЛЛ); *AML1-EVT1*, *AML1-ETO*, *CBFB-MYH11*(t(3;21), t(8;21), inv(16;16) — маркеры острого миелобластного лейкоза [24–28]. Обнаружение у пациента методом ОТ-ПЦР характерного химерного онкомаркера служит основанием для постановки соответствующего диагноза. Последующие определения экспрессии этого онкомаркера у данного больного в костном мозге или периферической крови позволяют оценить эффективность лечения. При некоторых нозологиях, например при ХМЛ и остром промиелоцитарном лейкозе, проводимое лечение может привести к полному исчезновению молекулярного сигнала, несмотря на очень высокий уровень чувствительности диагностики с помощью ОТ-ПЦР. В этом случае говорят о достижении молекулярной ремиссии. Последующий мониторинг тем же методом позволяет вовремя зафиксировать момент молекулярного рецидива, когда вновь будет выявляться экспрессия химерного онкогена, причем до наступления цитогенетического и гематологического рецидива. Эта информация дает возможность провести упреждающее терапевтическое воздействие и предотвратить развитие гематологического рецидива. Сочетание современных методов терапии лейкозов, позволяющих достичь молекулярной ремиссии, и высокочувствительной молекулярной

диагностики стимулирует поиск эффективных способов лечения молекулярных рецидивов.

Обычный метод ОТ-ПЦР, который дает только качественную информацию о наличии или отсутствии экспрессии химерных онкогенов, все больше уступает место сочетанию с ПЦР-РВ. При помощи ПЦР-РВ можно определить, с какой скоростью и какой глубины достигает снижение молекулярного сигнала, соответствующего экспрессии онкомаркера и связанного с изменением в процессе лечения объема опухолевой массы. Чувствительность этого метода сравнима с чувствительностью ОТ-ПЦР, но при этом ПЦР-РВ позволяет оценить количественно динамику убывания/роста опухолевого клона даже при полном цитогенетическом ответе. Скорость и амплитуда снижения/нарастания молекулярного сигнала, полученного при помощи ПЦР-РВ, становятся одними из главных показателей эффективности лечения лейкозов.

Большое разнообразие видов лейкозов затрудняет проведение эффективного мониторинга МОБ, так как не всегда удастся выявить для конкретного пациента уникальный опухолевый маркер. В связи с этим весьма перспективным представляется внедрение в диагностическую практику методов оценки МОБ по анализу универсальных опухолевых маркеров. Одним из наиболее предпочтительных универсальных маркеров гемобластозов на сегодняшний день является онкомаркер WT1 [29, 30]. Перспективным маркером является также онкомаркер PRAME, с которым связаны некоторые особенности клинических проявлений лейкозов [25, 30–32].

Ценную прогностическую информацию для лечения гемобластозов можно получить, если параллельно с определением основного маркера анализировать при помощи молекулярно-биологических методов изменение работы некоторых других генов.

Показано, что при диагностике острого промиелоцитарного лейкоза целесообразно исследовать не только основной маркер PML-RARa, но и оценивать повышение уровня экспрессии и определять частичную дупликацию гена *FLT3* – факторы неблагоприятного прогноза [33]. Кроме того, низкий уровень экспрессии онкомаркера PRAME является прогностическим фактором раннего рецидива острого промиелоцитарного лейкоза [25]. При ОЛЛ и остром миелобластном лейкозе неблагоприятным прогностическим маркером является частичная дупликация гена *MLL*, выявляемая при помощи ОТ-ПЦР [34]. Молекулярная диагностика эритремии оказывается более надежной, если не только оценивать при помощи ПЦР-РВ гиперэкспрессию гена *PRV-1*, но и определять ассоциированную с этим заболеванием точечную мутацию гена *Jak2*-киназы [35–37]. Очень эффективен мониторинг МОБ опухолей

лимфатической природы с помощью анализа уникальных перестроек генов иммуноглобулинов и Т-клеточных рецепторов [38]. Успех пересадки стволовых клеток при лечении гемобластозов во многом зависит от молекулярного анализа приживления клеток донора и поведения остаточных клеток реципиента. При этом можно оценивать поведение опухолевого клона по анализу характерного маркера, если он был выявлен до проведения трансплантации. Но даже при отсутствии такого маркера клетки донора и реципиента можно различить при помощи молекулярного анализа мультиаллельных STR- и VNTR-полиморфизмов, которые используются также в качестве косвенных маркеров при семейном анализе наследственных патологий и для идентификации личности [39].

РНК- и ДНК-маркеры онкогематологических заболеваний являются важными независимыми прогностическими факторами, позволяющими оценить вероятность достижения и продолжительность полной ремиссии. Кроме того, в зависимости от наличия у больного того или иного молекулярного маркера может существенно изменяться общая, бессобытийная и безрецидивная выживаемость. Молекулярно-генетический анализ, направленный на выявление характерных РНК- и ДНК-маркеров, позволяет проводить обоснованный выбор терапевтической тактики, а также судить об эффективности терапии, оценивая скорость и глубину достижения молекулярного ответа.

В результате лечения онкогематологического заболевания происходит постепенное уменьшение количества опухолевых клеток. При этом современные методы лечения позволяют достичь более значительного снижения числа опухолевых клеток в сравнении с методами терапии недавнего прошлого. Еще 15–20 лет назад лечение онкогематологических заболеваний было в основном симптоматическим, а опухолевые клетки на всех этапах терапии можно было видеть в окрашенном мазке крови в обычный световой микроскоп, который стоял на столе каждого гематолога. Внедрение программ интенсивной химиотерапии и появление таргетных препаратов, направленных на подавление механизма молекулярного патогенеза, позволяет уменьшать количество опухолевых клеток в периферической крови и костном мозге до уровня, при котором морфологический анализ уже не обладает достаточной чувствительностью, чтобы эти клетки обнаружить. Был введен специальный термин – минимальная остаточная, или резидуальная, болезнь – остаточная популяция опухолевых клеток, выявить которую можно лишь по определенным хромосомным, иммунофенотипическим или молекулярным маркерам с помощью новых высокочувствительных методов, когда при световой микроскопии в костном мозге определяется не более 5 % бластных

клеток при нормальных показателях периферической крови и отсутствии экстрамедуллярных очагов [40–43]. Дальнейшее снижение уровня опухолевых клеток можно еще наблюдать при помощи проточной цитофлуориметрии и цитогенетического анализа, но и эти методы имеют чувствительность, не превышающую 10^{-2} . Когда возможности всех этих методов исчерпаны, единственным способом обнаружить сигнал, свидетельствующий о сохранении у больного минимального количества опухолевых клеток, является анализ молекулярных РНК- и ДНК-маркеров при помощи соответствующих технологических подходов [24–26, 40–43].

Стандартизация молекулярной диагностики онкогематологических заболеваний

По мере обнаружения РНК- и ДНК-маркеров, отражающих важные особенности опухолевых клеток у пациентов с онкогематологическими заболеваниями, ими пополняется набор параметров, подлежащих обязательному исследованию в дебюте заболевания и на различных этапах лечения. Для детекции РНК- и ДНК-маркеров чаще всего используют модификации методов ПЦР, ОТ-ПЦР и ПЦР-РВ [24–26].

Для проведения ПЦР исследователи разрабатывают собственные протоколы или опираются на протоколы, опубликованные в специализированных статьях. Уже в 90-е годы прошлого века было опубликовано множество протоколов ПЦР, предназначенных для выявления экспрессии химерных онкогенов — продуктов рекуррентных транслокаций, характерных для наиболее часто встречающихся видов лейкозов человека. Европейские специалисты в области молекулярной диагностики лейкозов предприняли попытку стандартизации применяемых ими методик. С этой целью они объединенными усилиями провели сравнение эффективности разных протоколов. В результате проведенной ими работы в 1999 г. в журнале *Leukemia* появилась публикация, в которой были представлены рекомендации по использованию метода ОТ-ПЦР с последующей электрофоретической детекцией для качественного анализа экспрессии наиболее распространенных химерных онкогенов (Протокол Biomed-1) [24]. Следующие по значимости рекомендации были опубликованы в том же журнале в 2003 г. (The Europe Against Cancer Program, EAC [44]). На этот раз речь шла о проведении количественного исследования экспрессии химерных онкогенов у больных лейкозами методом ПЦР-РВ.

После выхода на рынок препарата гливек для лечения ХМЛ [45, 46] компания Новартис и объединение европейских гематологов ELN (European Leukemia Net) учредили программу EUTOS (The European Treatment Outcome Study; <http://www.eutos.org>), целью которой явилось проведение стандартизации

молекулярных исследований экспрессии химерного онкогена *BCR/ABL* в крови и костном мозгу больных ХМЛ. Цели этой программы существенно отличались от целей, которые преследовали Biomed-1 и EAC. Во-первых, в программе EUTOS речь шла только об одной нозологической форме — ХМЛ. Во-вторых, в качестве молекулярного маркера рассматривалась только одна форма химерного онкогена *BCR/ABL* — *p210* в виде 2 наиболее часто встречающихся видов транскриптов — *BCR/ABL p210 b2a2* и *BCR/ABL p210 b3a2*. И в-третьих, самое существенное: от участников программы не требовали использования унифицированного протокола, предусматривающего одинаковые по составу праймеры и зонды, а также отсутствовали требования приобретать ферменты и прочие компоненты реакционных смесей у одних и тех же валидированных производителей. Это последнее обстоятельство связано с тем, что еще при использовании протокола EAC для диагностики ХМЛ было обнаружено, что даже при абсолютном совпадении условий проведения ПЦР-амплификации в режиме реального времени и используемых для этого реактивов результаты, которые получали в разных лабораториях при анализе одних и тех же клинических образцов, значительно различались, иногда на целый порядок. Однако при этом было обнаружено, что с поправкой на разброс, который был индивидуален для каждой лаборатории, медианы результатов отличались примерно на одну и ту же величину. Следовательно, ошибка методики была систематической и зависела не от различий в протоколах ПЦР, а от того, в каких именно лабораториях проводился анализ. В связи с этим в рамках программы EUTOS необходимо было рассчитать для каждой из участвующих в программе лабораторий поправочный коэффициент, который должен был приводить результаты, получаемые в каждой отдельной лаборатории, к размерности единой шкалы, выражающей относительную экспрессию гена *BCR/ABL*. Поправочный коэффициент называли фактором конверсии (conversion factor, CF), шкалу — Международной шкалой (International Scale), а единицы, получаемые после пересчета, получили обозначение IS [47, 48].

Ассоциация ELN проводит значительную работу по стандартизации методов цитогенетической и молекулярной диагностики не только ХМЛ, но и других распространенных видов лейкозов. Под эгидой ELN работает несколько постоянных подпрограмм, результаты которых рассматривают на ежегодных международных конференциях и воркшопах.

Выводы

Для онкогематологических заболеваний характерны разнообразные дефекты генетического аппарата стволовых кроветворных клеток. При этих

заболеваниях часто наблюдают хромосомные аномалии: транслокации, инверсии и делеции, — в результате которых происходит перераспределение генетического материала либо между разными хромосомами (транслокации), либо в пределах одной хромосомы (делеции и инверсии). На молекулярном уровне это выражается в том, что в месте слияния генетического материала из разных хромосомных локусов возникают так называемые химерные онкогены или же создаются условия для гиперэкспрессии важных регуляторных генов. Кроме того, точечные мутации, микроинсерции и микроделеции некоторых генов также могут быть причиной развития онкогематологических заболеваний. Прогрессирование опухолевых заболеваний системы крови происходит в результате появления дополнительных генетических дефектов, приводящих к формированию более агрессивных и резистентных опухолевых клонов.

Идентификация специфических молекулярных маркеров привела к пониманию тонких механизмов патогенеза и клинической гетерогенности онкогематологических заболеваний. На основе этих знаний разрабатываются терапевтические агенты направленного действия, с которыми связан сегодняшний значительный прогресс в лечении лейкозов и лимфом. Количественное определение молекулярных маркеров позволяет достоверно устанавливать диагноз, выбирать тактику терапии и судить об эффективности лечения злокачественных заболеваний системы кроветворных и лимфоидных тканей, а также своевременно выявлять признаки развивающегося молекулярного рецидива с целью предотвращения развития рецидива клинического. В связи с этим возникла необходимость в повсеместном применении специфических, высокочувствительных и количественных методов обнаружения и анализа молекулярных субстратов гемобластозов.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Watson J.D., Crick F.H. C. A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature* 1953;171:737–38. DOI: 10.1038/171737a0. PMID: 13054692.
2. Southern E.M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 1975;98(3):503–17. DOI: 10.1016/S0022-2836(75) 80083–0. PMID: 1195397.
3. Southern E.M. Southern blotting. *Nat Protoc* 2006;1(2):518–25. DOI: 10.1038/nprot.2006.73. PMID: 1195397.
4. Alwine J.C., Kemp D.J., Stark G.R. Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977;74(12):5350–4. DOI: 10.1073/pnas.74.12.5350. PMID: 414220.
5. Kulesh D.A., Clive D.R., Zarlenga D.S., Greene J.J. Identification of interferon-modulated proliferation-related cDNA sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:8453–7. DOI: 10.1073/pnas.84.23.8453. PMID: 2446323.
6. Saiki R.K., Scharf S., Faloona F. et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985;230(4732):1350–4. DOI: 10.1126/science.2999980. PMID: 2999980.
7. Pierce K.E., Wang L.J. LATE-PCR and allied technologies: real-time detection strategies for rapid, reliable diagnosis from single cells. *Methods Mol Biol* 2011;688:47–66. DOI: 10.1007/978-1-60761-947-5_5. PMID: 20938832.
8. Sanger F., Coulson A.R. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol* 1975;94:444–8. PMID: 1100841.
9. Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977;74(12):5463–7. PMID: 271968.
10. Shendure J., Ji H. Next-generation DNA sequencing. *Nature Biotechnology* 2008;26:1135–45. DOI: 10.1038/nbt1486. PMID: 18846087.
11. Рубцов Н.Б. Гибридизация нуклеиновых кислот *in situ* в анализе хромосомных аномалий. В кн.: Молекулярно-генетические методы в диагностике наследственных и онкологических заболеваний. Введение в молекулярную диагностику. Под ред. М.А. Пальцева, Д.В. Залетаева. М.: Медицина, 2011. Т. 2. С. 100–136.
12. Maecker H.T., McCoy J. Ph., Nussenblatt R. Standardizing immunophenotyping for the Human Immunology Project. *Nat Rev Immunol* 2012;12(3):191–200. DOI: 10.1038/nri3158. PMID: 22343568.
13. Lequin R.M. Enzyme Immunoassay (EIA)/Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Clinical Chemistry* 2005;51(12):2415–8. DOI: 10.1373/clinchem.2005.051532. PMID: 16179424.
14. Towbin H., Staehelin T., Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;76(9):4350–4. PMID: 388439.
15. Wiener A.S. Principles of Blood Group Serology and Nomenclature: A Critical Review. *Transfusion* 1961;1(5):269–346. DOI: 10.1111/j. 1537–2995.1961.tb00063.x. PMID: 13785102.
16. Erlich H. HLA DNA typing: past, present, and future. *Tissue Antigens*. 2012 Jul;80(1):1–11. DOI: 10.1111/j.1399-0039.2012.01881.x. PMID: 22651253.
17. Arber W., Linn S. DNA modification and restriction. *Annual Review of Biochemistry* 1969;38:467–500. DOI: 10.1146/annurev.bi.38.070169.002343. PMID: 4897066.
18. Smith H.O., Wilcox K.W. A restriction enzyme from *Hemophilus influenzae*. I. Purification and general properties. *J Mol Biol* 1970 Jul 28;51(2):379–91. PMID: 5312500.
19. Danna K., Nathans D. Specific cleavage of simian virus 40 DNA by restriction endonuclease of *Hemophilus influenzae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1971;68(12):2913–7. PMID: 4332003.
20. Burkitt D. A sarcoma involving the jaws in African children. *The British journal of surgery* 1968;46(197):218–23. PMID: 13628987.
21. Kornblau S.M., Goodacre A., Cabanillas F. Chromosomal abnormalities in adult non-endemic Burkitt's lymphoma and leukemia: 22 new reports and a review of 148 cases from the literature. *Hematol Oncol* 1991;9(2):63–78. PMID: 1869243.
22. Hecht J.L., Aster J.C. Molecular biology of Burkitt's lymphoma. *J Clin Oncol* 2000;18(21):3707–21. PMID: 11054444.
23. Guikema J.E., Schuurin E., Kluin P.M. Structure and consequences of IGH switch

- breakpoints in Burkitt lymphoma. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2008;39:32–6. DOI: 10.1093/jncimonographs/IGN020. PMID: 18647999.
24. Van Dongen J.J., Macintyre E.A., Gabert J.A. et al. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of the BIOMED-1 Concerted Action: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia* 1999;13(12):1901–28. PMID: 10602411.
25. Мисюрин В.А., Лукина А.Е., Мисюрин А.В. и др. Особенности соотношения уровней экспрессии генов PRAME и PML/RARA в дебюте острого промиелоцитарного лейкоза. *Российский биотерапевтический журнал* 2014;13(1):9–16.
26. Шураваина Е.П., Паровичникова Е.Н., Демидова И.А. и др. Мониторинг минимальной резидуальной болезни у больных острым промиелоцитарным лейкозом. *Терапевтический архив* 2006;78(7):25–31.
27. Мисюрин А.В., Суринов В.Л., Тагиев А.Ф. Новые точки разрыва транслокации t(9;22) при хроническом миелолейкозе. *Биоорганическая химия* 1999;25(3):234–6.
28. Мисюрин А.В., Аксенова Е.В., Крутов А.А. и др. Молекулярная диагностика хронического миелолейкоза. *Гематология и трансфузиология* 2007;52(2):35–40.
29. Kitamura K., Nishiyama T., Ishiyama K. et al. Clinical usefulness of WT1 mRNA expression in bone marrow detected by a new WT1 mRNA assay kit for monitoring acute myeloid leukemia: a comparison with expression of WT1 mRNA in peripheral blood. *Int J Hematol* 2016;103(1):53–62. DOI: 10.1007/s12185-015-1882-1. Epub 2015 Oct 31. PMID: 26520650.
30. Гапонова Т.В., Менделеева Л.П., Мисюрин А.В. и др. Экспрессия опухолеассоциированных генов PRAME, WT1 и XIAP у больных множественной миеломой. *Онкогематология* 2009;(2):52–5.
31. Абраменко И.В., Белоус Н.И., Крячок И.А. и др. Экспрессия гена PRAME при множественной миеломе. *Терапевтический архив* 2004;76(7):77–81.
32. Ercolak V., Paydas S., Bagir E. et al. PRAME Expression and Its Clinical Relevance in Hodgkin's Lymphoma. *Acta Haematol* 2015;134(4):199–207. DOI: 10.1159/000381533. PMID: 26044287.
33. Lucena-Araujo A.R., Kim H.T., Jacomo R.H. et al. Internal tandem duplication of the FLT3 gene confers poor overall survival in patients with acute promyelocytic leukemia treated with all-trans retinoic acid and anthracycline-based chemotherapy: an International Consortium on Acute Promyelocytic Leukemia study. *Ann Hematol* 2014;93(12):2001–10. DOI: 10.1007/s00277-014-2142-9. Epub 2014 Jul 2. PMID: 24981688.
34. Ommen H.B., Hokland P., Haeflrich T. et al. Relapse kinetics in acute myeloid leukaemias with MLL translocations or partial tandem duplications within the MLL gene. *Br J Haematol* 2014;165(5):618–28. DOI: 10.1111/bjh. 12792. Epub 2014 Feb 24. PMID: 24611505.
35. Melis S., Vellinga S., Zachée P. et al. JAK2 V617F mutation and PRV-1 overexpression: relevance in the diagnosis of polycythaemia vera and essential thrombocythaemia. *Acta Clin Belg* 2009;64(5):429–33. DOI: 10.1179/acb. 2009.070. PMID: 19999391.
36. Tutaeva V., Misurin A.V., Rozenberg J.M. et al. Application of PRV1- mRNA expression level and JAK2V617F mutation for the differentiating between polycythemia vera and secondary erythrocytosis and assessment of treatment by interferon or hydroxyurea. *Hematology* 2007;12(6):473–9. DOI: 10.1080/10245330701384005. PMID: 17852451.
37. Мисюрин А.В. Молекулярный патогенез миелопролиферативных заболеваний. *Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика* 2009;2(3):211–9.
38. Shin S., Kim A.H., Park J. et al. Analysis of immunoglobulin and T cell receptor gene rearrangement in the bone marrow of lymphoid neoplasia using BIOMED-2 multiplex polymerase chain reaction. *Int J Med Sci* 2013;10(11):1510–7. DOI: 10.7150/ijms. 5342. PMID: 24046525.
39. Koldehoff M., Steckel N.K., Hlinka M. et al. Quantitative analysis of chimerism after allogeneic stem cell transplantation by real-time polymerase chain reaction with single nucleotide polymorphisms, standard tandem repeats, and Y-chromosome-specific sequences. *Am J Hematol* 2006;81(10):735–46. DOI: 10.1002/ajh. 20693. PMID: 16838323.
40. Paietta E. Minimal residual disease in acute myeloid leukemia: coming of age. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2012;2012:35–42. DOI: 10.1182/asheducation-2012.1.35. PMID: 23233558.
41. Paietta E. Should minimal residual disease guide therapy in AML? *Best Pract Res Clin Haematol* 2015;28(2–3):98–105. DOI: 10.1016/j.beha.2015.10.006. Epub 2015 Oct 22. PMID: 26590765.
42. Чельшева Е.Ю., Туркина А.Г., Мисюрин А.В., Захарова А.В. Раннее выявление цитогенетического рецидива при динамическом исследовании уровня BCR-ABL транскрипта у больного хроническим миелолейкозом. *Гематология и трансфузиология* 2007;52(2):50–1.
43. Чельшева Е.Ю., Туркина А.Г., Мисюрин А.В. и др. Мониторинг минимальной остаточной болезни у больных хроническим миелолейкозом: клиническое значение полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. *Терапевтический архив* 2007;79(4):49–52.
44. Gabert J., Beillard E., van der Velden V.H.J. et al. Standardization and quality control studies of “real-time” quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia – A Europe Against Cancer Program. *Leukemia* 2003;17:2318–57. DOI: 10.1038/sj. leu. 2403135. PMID: 14562125.
45. Druker B.J., Tamura S., Buchdunger E. et al. Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat Med* 1996;2(5):561–6. PMID: 8616716.
46. Druker B.J., Guilhot F., O'Brien S.G., et al.; IRIS Investigators. Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *Engl J Med* 2006;355(23):2408–17. DOI: 10.1056/NEJMoa062867. PMID: 17151364.
47. Аксенова Е.В., Крутов А.А., Солдатова И.Н. и др. Молекулярный мониторинг у пациентов с хроническим миелолейкозом: корреляция с цитогенетическим ответом, прогностическое значение, оценка ответа на терапию. *Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика* 2010;3(2):151–9.
48. Аксенова Е.В., Крутов А.А., Солдатова И.Н. и др. Стандартизация молекулярной диагностики хронического миелолейкоза. *Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика* 2010;3(2):160–5.