

ЧАСТОТА ВСТРЕЧАЕМОСТИ МУТАЦИЙ КИНАЗНОГО ДОМЕНА ГЕНА *BCR-ABL* У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ МИЕЛОЛЕЙКОЗОМ, РЕЗИСТЕНТНЫХ К ТЕРАПИИ ИМАТИНИБОМ

А.В. Мисюрин^{1,2}, Е.Н. Мисюрина³, В.В. Тихонова¹, А.А. Крутов², Л.А. Кесаева¹, Ю.П. Финашутина¹, В.А. Мисюрин¹, Н.Н. Касаткина¹, Е.А. Османов¹, А.Г. Туркина⁴, Е.Ю. Челышева⁴, А.Ю. Барышников¹

¹ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24;

²ООО «ГеноТехнология»; Россия, 117485 Москва, ул. Профсоюзная, 104;

³Государственное бюджетное учреждение здравоохранения г. Москвы «Городская клиническая больница № 52 Департамента здравоохранения города Москвы»; Россия, 123182 Москва, ул. Пехотная, 3;

⁴ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России; Россия, 125167 Москва, Новый Зыковский проезд, 4

Контакты: Андрей Витальевич Мисюрин cyclon@nm.ru

Введение. Мутации гена *BCR-ABL* являются основной причиной резистентности больных хроническим миелолейкозом (ХМЛ) к иматинибу — ингибитору тирозинкиназ 1-го поколения (ИТК-1). Некоторые из этих мутаций могут приводить также и к резистентности к нилотинибу и дазатинибу — ингибиторам тирозинкиназ 2-го поколения (ИТК-2), причем наборы мутаций для этих препаратов различны. В связи с тем что ИТК-2 применяют для лечения больных ХМЛ, резистентных к иматинибу, для корректного назначения этих препаратов необходимо знать частоту появления разных видов мутаций гена *BCR-ABL*.

Цель исследования — определить частоту встречаемости мутаций гена *BCR-ABL* у больных ХМЛ, резистентных к иматинибу.

Материалы и методы. Мутации гена *BCR-ABL* исследовали в крови больных ХМЛ, резистентных к иматинибу, методом прямого секвенирования продуктов полимеразной цепной реакции по Сэнгеру.

Результаты. Мутации гена *BCR-ABL* были выявлены у 31 % ($n = 262/846$) больных ХМЛ. Доля всех мутаций, перекрестно резистентных как к иматинибу (ИТК-1), так и к препаратам 2-й линии (ИТК-2), составила для нилотиниба 40,3 %, для дазатиниба — 21 %.

Выводы. Более половины мутаций гена *BCR-ABL*, обнаруженных у больных ХМЛ, резистентных к иматинибу, вызывают также и резистентность к одному или другому препарату ИТК-2. В связи с этим при смене терапии с ИТК-1 на ИТК-2 у резистентных к ИТК-1 больных ХМЛ проведение мутационного анализа является обязательным, так как при случайном назначении этих препаратов высока вероятность, что они могут оказаться неэффективными.

Ключевые слова: хронический миелолейкоз, резистентность к иматинибу, мутация гена *BCR-ABL*

DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-4-102-109

BCR-ABL GENE KINASE DOMAIN MUTATION FREQUENCY IN IMATINIB RESISTANT CHRONIC MYELOID LEUKEMIA PATIENTS

A.V. Misyurin^{1,2}, E.N. Misyurina³, V.V. Tichonova¹, A.A. Krutov², L.A. Kesaeva¹, Yu.P. Finashutina¹, V.A. Misyurin¹, N.N. Kasatkina¹, E.A. Osmanov¹, A.G. Turkina⁴, E.Yu. Chelysheva⁴, A.Yu. Baryshnikov¹

¹N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center at the Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoye Sh., Moscow, 115478, Russia;

²GeneTechnology LLC; 104 Profsoyuznaya St., Moscow, 117485, Russia;

³City Clinical Hospital No. 52, 3 Pekhotnaya St., Moscow, 123182, Russia;

⁴National Research Center for Hematology at the Ministry of Health of Russia; 4 Novyy Zykovskiy proezd, Moscow, 109202, Russia

Background. *BCR-ABL* gene mutations are the main cause of tyrosine kinase 1st generation inhibitor (TKI-1) imatinib resistance in chronic myelogenous (CML) patients. Some of them are resistant both for imatinib and TKI-2. The nilotinib and dasatinib mutation spectra are not the same. To ensure a correct choice of TKI-2 for imatinib CML resistant patient treatment it is necessary to investigate frequency of *BCR-ABL* gene mutations.

Aim. To evaluate *BCR-ABL* gene mutation frequency in imatinib resistant CML patients.

Materials and methods. Peripheral blood of imatinib resistant CML patients were studied by means of direct PCR product Sanger sequencing in order to reveal *BCR-ABL* gene mutations.

Results. *BCR-ABL* gene mutations were found in 31 % ($n=262/846$) imatinib resistant patients. Proportion of resistant mutations were 40,3 % for nilotinib and 21 % for dasatinib.

Conclusion. More than a halve of BCR-ABL mutations resistant for imatinib were resistant either against nilotinib or dasatinib. Consequently, prior to replace imatinib for nilotinib or dasatinib it is necessary to perform BCR-ABL mutational analysis. If to prescribe TKI-2 blindly there may be high risk that nilotinib or dasatinib would be ineffective due to improper mutation in BCR-ABL gene.

Key words: chronic myelogenous, imatinib resistance, BCR-ABL gene mutation

Введение

Основной причиной резистентности больных хроническим миелолейкозом (ХМЛ) к терапии иматинибом и другими ингибиторами тирозинкиназ (ИТК) являются мутации, затрагивающие участок между экзонами а3 и а11 гена *ABL*, которые входят в состав химерного онкогена и соответствующей мРНК *BCR-ABL* [1–3]. Согласно рекомендациям Европейской сети по изучению лейкозов (European Leukemia Net) определение первичной последовательности этого участка мРНК *BCR-ABL* является обязательным анализом для всех больных ХМЛ с недостаточным первичным ответом на терапию иматинибом [4]. Данный вид диагностики необходим также в любой момент терапии ХМЛ иматинибом при появлении признаков потери ответа на этот препарат [5, 6]. Кроме того, такой анализ обязателен при переходе на терапию nilotinibом и dasatinibом, так как спектр мутаций *BCR-ABL*, чувствительных к этим препаратам, различен. Известно, что nilotinib не действует в случае возникновения мутаций E255K/V, F359C/V и Y253H, а для dasatinibа резистентными мутациями являются T317L и F317I. Кроме того, оба препарата не действуют при появлении мутации T315I [7]. **Цель исследования** – определить частоту встречаемости мутаций гена *BCR-ABL* у больных ХМЛ, резистентных к иматинибу. В сообщении приводятся данные о частоте встречаемости мутаций гена *BCR-ABL* у больных ХМЛ, резистентных к терапии иматинибом, в течение длительного времени наблюдавшихся в различных гематологических клиниках России.

Материалы и методы

В исследование включены 846 больных ХМЛ с признаками резистентности к терапии иматинибом, находившихся под наблюдением в 68 клиниках 53 городов России в период с января 2006 г. по март 2012 г. (74 мес). Больные находились в различных фазах заболевания, эффективность терапии иматинибом контролировалась при помощи количественной оценки экспрессии гена *BCR-ABL* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени с применением Международной шкалы IS [8–10]. Мутационный анализ участка мРНК *BCR-ABL* между экзонами а3 и а11 проводился методом прямого секвенирования.

Выделение ядродержащих клеток из крови. Периферическую кровь брали в объеме 10 мл, используя

в качестве антикоагулянта 0,5 мл 6 % этилендиаминтетрауксусную кислоту (этилендиаминтетраацетат, ЭДТА), или в объеме 9 мл при помощи пробирок VACUETTE®. На следующем этапе проводили избирательный лизис эритроцитов, смешивая кровь с 1/10 объема 0,8 % хлорида аммония и выдерживая 2 мин во льду. Нелизированные ядерные клетки осаждали при 1500 g в течение 15 мин при 4 °С. Супернатант сливали, процедуру повторяли еще раз. Осадок ресуспендировали в 2,0 мл раствора STE (10 mM трис-НCl, pH 8,0, 100 mM NaCl, 1 mM ЭДТА, pH 8,0) и повторяли осаждение. Полученные ядерные клетки использовали для выделения РНК.

Выделение РНК. РНК выделяли из ядерных клеток крови быстрым лизисом в гуанидин-изотиоцианатном буфере с последующей фенольной обработкой [11]. Ядерные клетки крови (костного мозга) выделяли, как описано выше, и лизировали в 50 мкл буфера следующего состава: 4,0 M гуанидин-изотиоцианат, 25 mM цитрат натрия, pH 7,0; 0,5 % лаурил саркозил, 0,1 M 2-меркапроэтанол. Добавляли 1/10 объема 2 M ацетата натрия, pH 4,0, 50 мкл насыщенного DEPC-обработанной водой фенола и 20 мкл хлороформа с изоамиловым спиртом (49: 1). Смесь встряхивали на шейкере и помещали на 15 мин в лед, после чего центрифугировали при 4 °С 10 мин при 10000 g. Верхнюю водную фазу еще раз экстрагировали смесью фенола, хлороформа и изоамилового спирта (24:24:1), насыщенной водным раствором 10 mM Трис-НCl, 1 mM ЭДТА, pH 8,0. Водную фазу смешивали с 50 мкл изопропанола и выдерживали не менее 4 ч при –20 °С. Центрифугировали при 10000 g 10 мин при 25 °С и получали осадок РНК. Этот осадок растворяли в буфере TE, сделанном на DEPC-обработанной воде; вновь осаждали РНК 3 объемами 98 % этанола в присутствии 0,5 M NaCl. Качество полученной РНК оценивали электрофорезом в 1,6 % агарозном геле. Пригодными для дальнейшего анализа считали те образцы, которые давали характерную картину распределения пиков рРНК и тРНК.

Обратно-транскриптная реакция (ОТ). Реакционная смесь ОТ при синтезе кДНК содержала в общем объеме 25 мкл 2,0 мкг РНК, 4 основных dNTP в концентрации 1 mM по каждому, 10 нмоль праймера R-ABLMut1 (5'-TGA GGC ATC TCA GGC ACG TC-3'), 50 mM Трис-НCl, pH 8,3, 75 mM хлорида калия, 3,0 mM хлорида магния, 10 mM дитиотреитола, 40 ед. ингибитора РНКаз RNAsin (Promega, США),

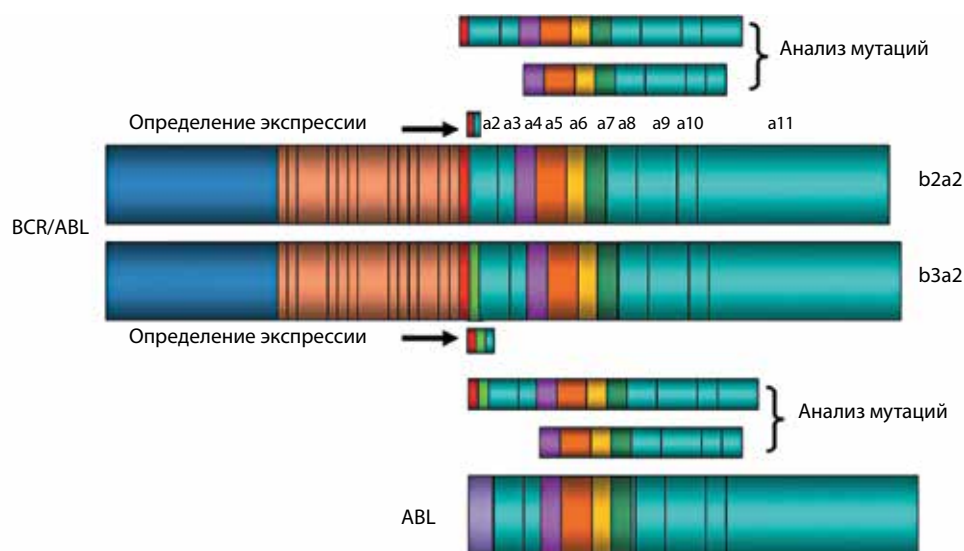


Рис. 1. Схема ПЦР-амплификации кДНК гена BCR-ABL для проведения мутационного анализа

200 ед. ревертазы M-MLV (Promega, США). При составлении реакционной смеси использовали 5-кратный буфер для обратной транскрипции (Promega, США). Инкубировали при 37 °C в течение 45 мин, затем прогревали 2 мин при 94 °C для остановки реакции.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР). После получения кДНК следовало 2 раунда ПЦР (ПЦР-1 и ПЦР-2). Для ПЦР-1 использовали в качестве матрицы 1/10 объема реакционной смеси после ревертазной реакции, которая содержала кДНК, а для ПЦР-2—1/10 реакционной смеси после ПЦР-1. Праймеры для ПЦР были подобраны таким образом, чтобы при проведении ПЦР-1 избирательно амплифицировалась последовательность кДНК гена BCR-ABL, а кДНК нормального гена ABL не амплифицировалась (рис. 1). ПЦР-1 проводили с привлечением внешних праймеров 5 BCR и R-ABLMut1, а для ПЦР-2 применяли внутренние праймеры F-ABLMut и R-ABLMut2. Условия ПЦР-1 и ПЦР-2: денатурация 94 °C — 30 с, отжиг — 60 °C, синтез — 72 °C, 30 циклов. Продукты ПЦР анализировали и очищали с использованием 10 % полиакриламидного геля.

Праймеры для ПЦР-1:

5 BCR 5'-GAA-GCT-TCT-CCC-TGA-CAT-CCG-T-3'

R-ABLMut1 5'-TGA GGC ATC TCA GGC ACG TC-3'.

Праймеры для ПЦР-2:

F-ABLMut 5'-GCA-AGC-TCT-ACG-TCT-CCT-CC-3'

R-ABLMut2 5'-AAG-GTA-GTC-ACA-GCC-CCA-CG-3'.

Секвенирование. Секвенирование проводили с использованием набора реактивов BigDye Terminator

3.1v Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) с учетом рекомендаций производителя. Для секвенирующей реакции в прямом направлении использовали праймер F-ABLMut, в обратном — R-ABLMut2. После проведения секвенирующих реакций продукты ПЦР очищали при помощи набора BigDye XTerminator Purification Kit (Applied Biosystems). Продукты секвенирующей реакции разделяли и анализировали с использованием генетического анализатора ABI PRISM 310 (Applied Biosystems).

Результаты и обсуждение

Мутации гена BCR/ABL были выявлены у 31 % ($n = 262$) больных ХМЛ, резистентных к терапии иматинибом, среди которых было 59,9 % мужчин ($n = 157$) и 40,1 % женщин ($n = 105$), медиана возраста — 50 (от 15 до 74) лет. Поскольку у 5,7 % ($n = 16$) больных были выявлены двойные мутации, то общее количество обнаруженных у 262 больных мутаций составило 278. Обнаружены 40 различных вариантов мутаций, они перечислены в порядке убывания частоты встречаемости, рассчитанной по данным настоящего исследования, с указанием аминокислотных замен: T315I (35/278—12,6 %), G250E (35/278—12,6 %), T317L (22/278—7,9 %), M244V (21/278—7,6 %), F359V (18/278—6,5 %), H396R (18/278—6,5 %), Y253H (18/278—6,5 %), E255K (16/262—5,8 %), E255V (11/278—3,9 %), L248V (11/278—3,9 %), M315T (11/278—3,9 %), E355G (8/278—2,9 %), F359C (7/278—2,5 %), del ex7 (5/278—1,8 %), Q252H (5/278—1,8 %), L387F (5/278—1,8 %), S348L (4/278—1,4 %), Ins 98—72 bp (3/278—1,1 %), F317I (3/278—1,1 %), E255D (3/278—1,1 %), E275K (2/278—0,7 %), E279A (2/278—0,7 %), K247R (2/278—0,7 %), L387M (2/278—0,7 %), V299A (2/278—0,7 %), E292V (1/278—0,3 %), E334G

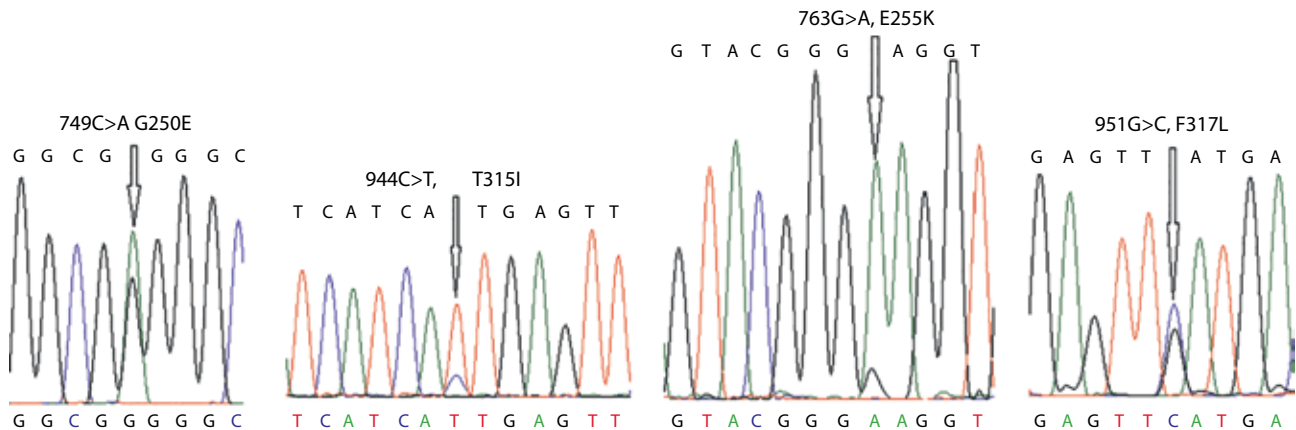


Рис. 2. Примеры обнаруженных мутаций гена *BCR-ABL*: G250E (749G>A) – резистентна к иматинибу, чувствительна к нилотинибу и дазатинибу; T315I (944C>T) – резистентна к иматинибу, нилотинибу и дазатинибу; E255K – резистентна к иматинибу и нилотинибу, чувствительна к дазатинибу; F317L (951G>C) – резистентна к иматинибу и дазатинибу, чувствительна к нилотинибу

(1/278–0,4 %), E450K (1/278–0,4 %), E459A (1/278–0,4 %), E459K (1/278–0,4 %), F359I (1/278–0,4 %), F486S (1/278–0,4 %), L383F (1/278–0,4 %), P441L (1/278–0,4 %), Q252M (1/278–0,4 %), Q491L (1/278–0,4 %), T305I (1/278–0,4 %), T345I (1/278–0,4 %), Y312C (1/278–0,4 %), T520S (1/278–0,4 %), G425Stop (1/278–0,4 %). Примеры обнаруженных мутаций приведены на рис. 2. Среди двойных мутаций преобладали мутации, затрагивающие особо значимый для возникновения резистентности к иматинибу домен Р-петли (табл. 1, рис. 3).

Помимо точечных мутаций, приводящих к единичным аминокислотным заменам, в нашем исследовании были обнаружены мутации, приводящие к более существенным изменениям структуры белка *BCR-ABL*: делеция 81 п. н. 3'-конца экзона $\alpha 4$ (рис. 4), инсерция Ins 98–72 bp (встраивание фрагмента длиной 35 п. н. между экзонами 8 и 9) (рис. 5), del ex7 (делеция экзона 7 из состава мРНК *BCR-ABL*, рис. 6), а также мутация G425Stop, приводящая к появлению стоп-кодона в средней части гена *BCR/ABL*. Эти мутации приводят к появлению укороченных молекул белка *BCR-ABL*, устойчивых к действию препаратов ИТК. Обнаруженные нами делеции связаны с появлением криптических сайтов сплайсинга, а инсерция возникает потому, что активируется небольшой потенциальный экзон, расположенный в средней части 8-го интрона, который по неизвестным причинам обычно не распознается аппаратом сплайсинга.

Медиана срока возникновения мутаций составила 27 (от 3 до 83) мес. Распределение мутаций по стадиям заболевания: хроническая фаза (ХФ) – 49,3 % ($n = 129/262$), фаза акселерации (ФА) – 29,8 % ($n = 78/262$), бластный криз (БК) – 20,9 % ($n = 55/262$). Среди них распределение мутаций, резистентных к нилотинибу и дазатинибу (ИТК 2-й линии), было следующим. Устойчивая к нилотинибу и к дазатинибу

Таблица 1. Двойные мутации гена *BCR-ABL*, выявленные у больных хроническим миелолейкозом, резистентных к иматинибу

№	1-я мутация	Зона	2-я мутация	Зона
1	T315I	B	E255V	P-loop
2	E255V	P-loop	F359V	A-loop
3	E255V	P-loop	Q252H	P-loop
4	E255V	P-loop	Q252H	P-loop
5	T315I	B	L248V	P-loop
6	M351I	C-domain	S348L	C-domain
7	M244V	P-loop	K247R	P-loop
8	M244V	P-loop	G2S0E	P-loop
9	M244V	P-loop	G250E	P-loop
10	M244V	P loop	F317L	B
11	M244V	P-loop	G250E	P-loop
12	M244V	P-loop	T315I	B
13	M244V	P-loop	M351T	C-domain
14	F359V	A-loop	H396R	A-loop
15	G250E	P-loop	E255K	P-loop
16	S348L	C-domain	M351T	C-domain

Примечание. Красный цвет – резистентны к нилотинибу, синий – к дазатинибу, T315I – ко всем ингибиторам тирозинкиназ 1-го и 2-го поколения

T315I: ХФ – 5,6 %, ФА – 16 %, БК – 27 %. Устойчивые к нилотинибу E255V/K/D: ХФ – 6,2 %, ФА – 12,8 %, БК – 16,4 %; F359V/C/I: ХФ – 9,3 %, ФА – 7,7 %, БК – 2,7 %; Y253H: ХФ – 5,4 %, ФА – 8,9 %, БК – 7,3 %. Устойчивая к дазатинибу F317L/I: ХФ – 4,6 %, ФА – 12,8 %, БК – 16,4 %. Доля всех мутаций, устойчивых к ИТК 2-й линии (с учетом T315I), составила для

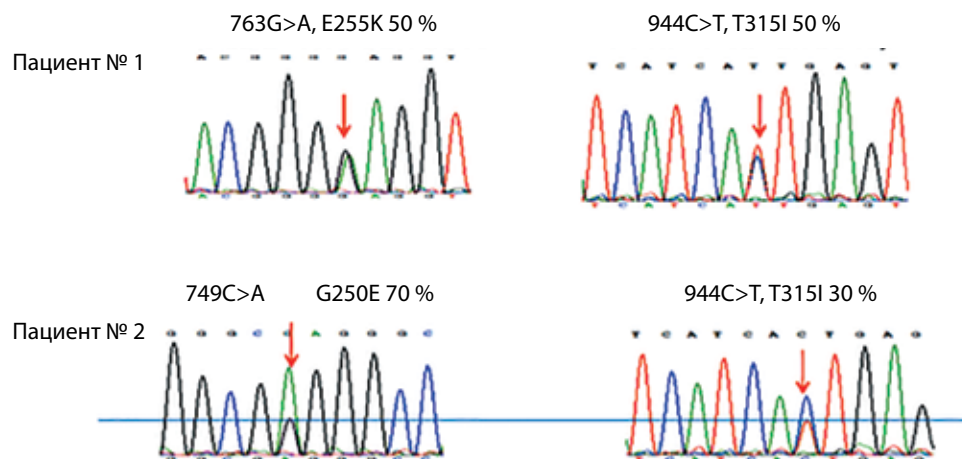


Рис. 3. Примеры обнаружения двойных мутаций гена *BCR-ABL* у больных хроническим миелолейкозом, резистентных к иматинибу. Для пациента № 2 показано, что снижение чувствительности методики в 2 раза могло бы привести к ложноотрицательному ответу по критически значимой мутации *T315I*, резистентной ко всем препаратам — ингибиторам тирозинкиназ 2-го поколения

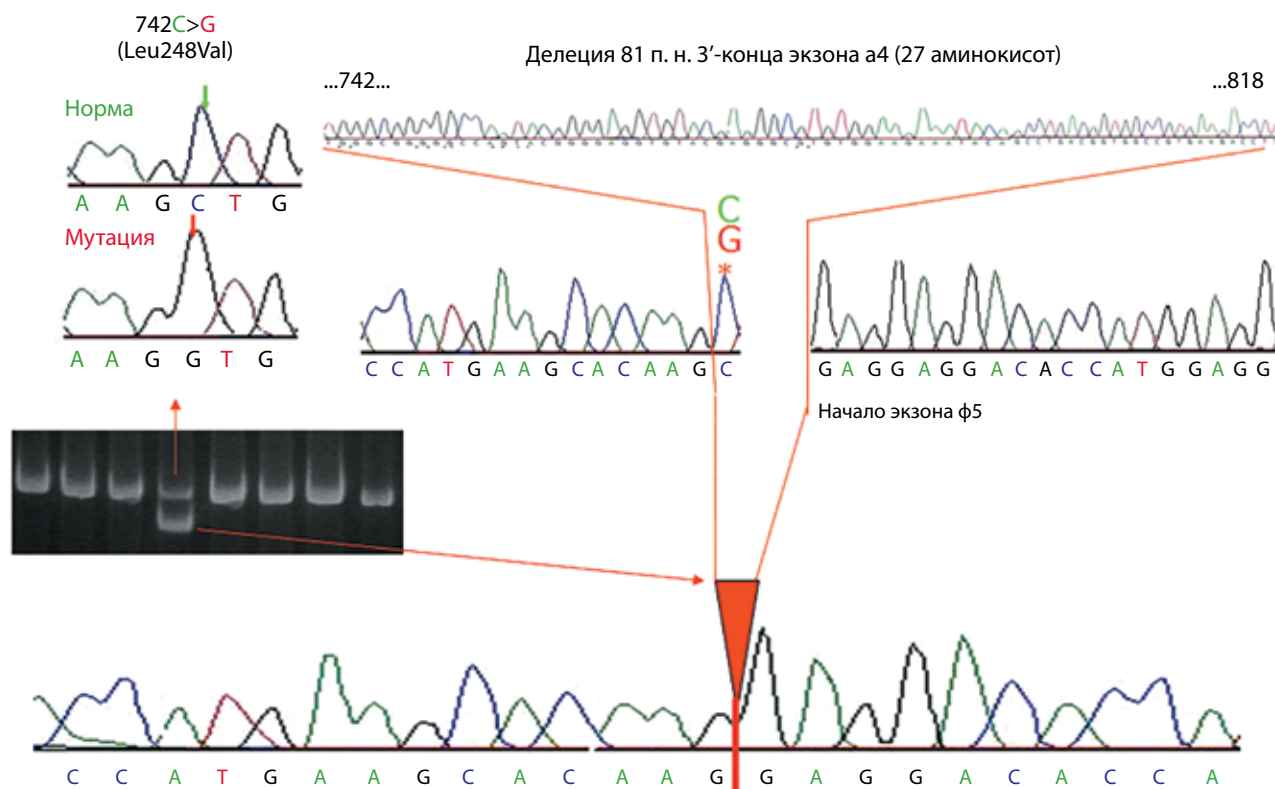


Рис. 4. Мутация с. 742C>G (р. L248V) приводит к появлению криптического сайта сплайсинга, в результате которого происходит делеция 81 п. н. 3' — конца экзона а4

нилотиниба 40,3 %, для дазатиниба — 21 % (табл. 2). При смене терапии на препараты ИТК-2 у больных ХМЛ, резистентных к иматинибу, наблюдалось эффективное подавление клона, несущего мутацию, с которой связана резистентность к ИТК-1 (рис. 7). У 69 % ($n = 584$) больных ХМЛ, резистентных к терапии иматинибом, мутации *BCR/ABL* не обнаружены. В этой группе доля мужчин составила 46 % ($n = 268$),

женщин — 54 % ($n = 316$), медиана возраста — 51 год (от 24 до 74 лет). Любопытно, что число женщин в группе резистентных больных ХМЛ без мутаций было выше, чем в группе с выявленными мутациями (54,0 % против 40,1 %, $p = 0,028$). Частота мутаций, выявленная нами у больных ХМЛ, резистентных к иматинибу, близка к тем, которую описывают авторы из других стран [6, 7], однако в других работах

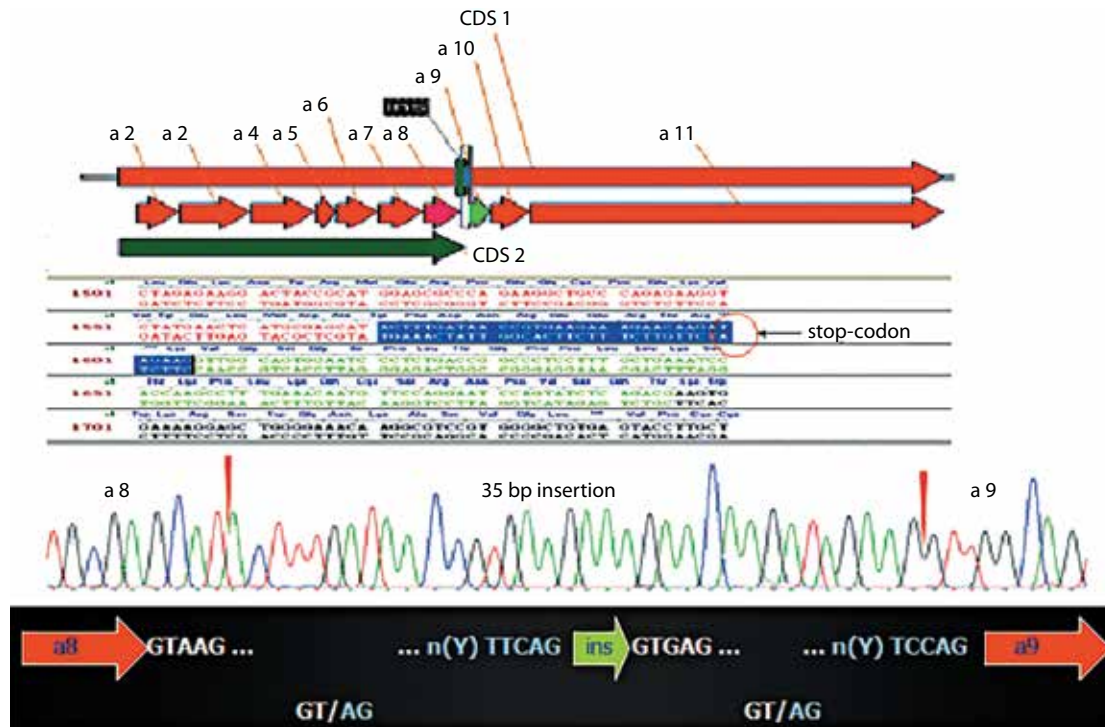


Рис. 5. Инсерция 35 п. н. между экзонами a8 и a9 гена BCR-ABL у больного хроническим миелолейкозом с первичной резистентностью к иматинибу

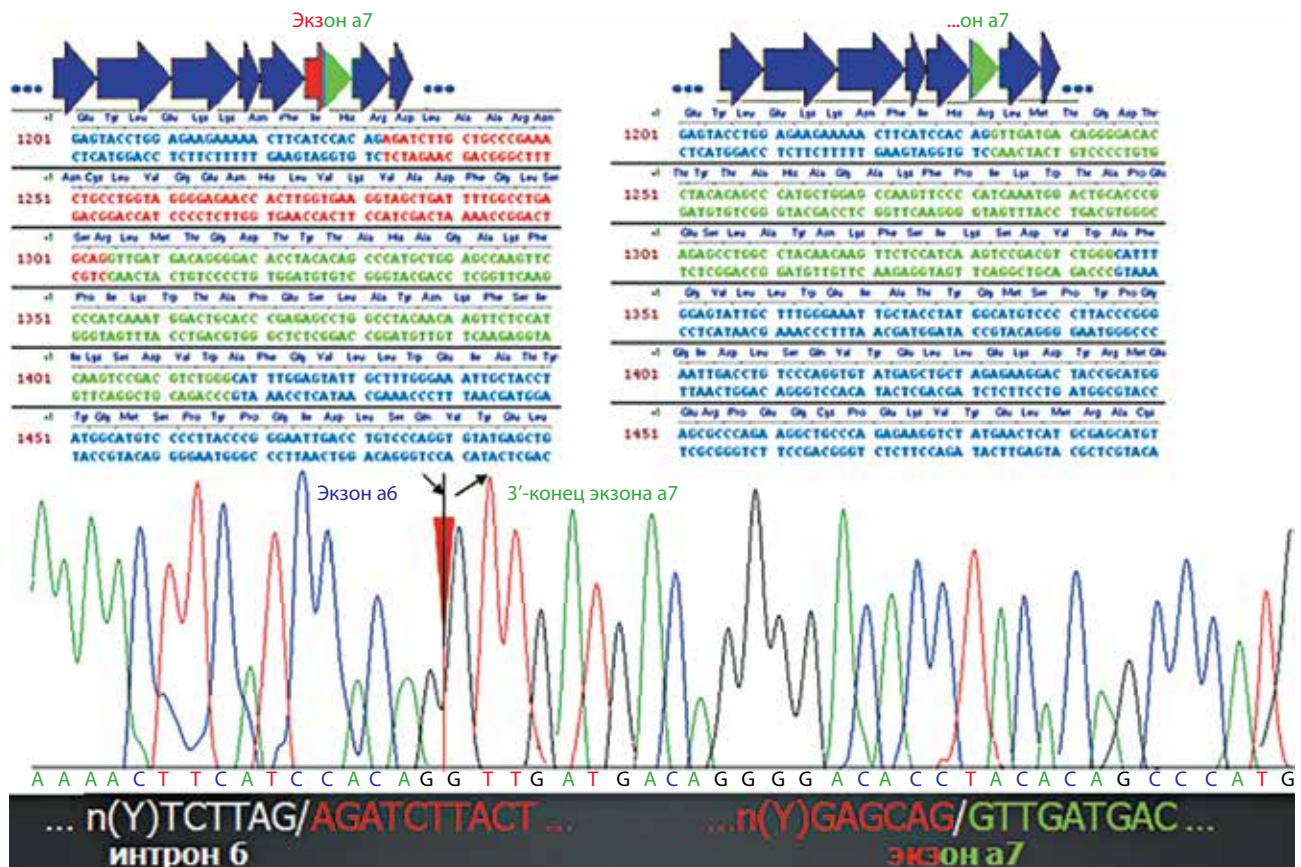


Рис. 6. Делеция 5' – конца экзона a7 гена BCR-ABL у больного хроническим миелолейкозом, резистентного к иматинибу

Таблица 2. Доля мутаций, влияющих на выбор препаратов — ингибиторов тирозинкиназ 2-го поколения для лечения больных хроническим миелолейкозом, резистентных к иматинибу (ингибитору тирозинкиназ 1-го поколения), среди всех обнаруженных мутаций

Мутации	n =	%		Выбор терапии
T315I	35	12,6	12,6 %	ИТК неэффективны (аллоТГСК, клинические исследования)
E255K	16	5,7	25,1 %	Резистентны к нилотинибу
E255V	11	3,9		
F359V	18	6,5		
F359C	7	2,5		
Y253H	18	6,5	8,9 %	Резистентны к дазатинибу
F317L	22	7,9		
F317I	3	1,0		

ИТК — ингибиторы тирозинкиназ, аллоТГСК — аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток

обычно не суммируют и не рассматривают в совокупности частоту встречаемости мутаций, перекрестно резистентных к иматинибу и другим препаратам.

Выводы

Исследование подтвердило существенное значение возникновения мутаций в гене *BCR-ABL* для развития резистентности к иматинибу, доля таких больных составила 31 %. Однако у 2/3 больных ХМЛ, резистентных к иматинибу, такие мутации не выявлены, следовательно, вклад *BCR-ABL*-независимых генетических событий в развитие устойчивости к ИТК-1 является не менее значительным. Результаты данной работы показали, что помимо точечных мутаций причиной

резистентности к препаратам ИТК могут быть другие мутации, которые приводят к более масштабным изменениям структуры белка BCR-ABL. Значительная доля мутаций, приводящих к резистентности к ИТК-2 у больных ХМЛ, получавших терапию ИТК-1, подчеркивает важность мутационного анализа при смене терапии с ИТК-1 на ИТК-2. Некоторое преобладание мутаций, резистентных к нилотинибу, над мутациями, устойчивыми к дазатинибу, можно объяснить структурным сходством молекул иматиниба и нилотиниба, которые в связи с этим имеют пересекающиеся спектры резистентных мутаций. Следует ожидать, что при переходе нилотиниба и дазатиниба в 1-ю линию терапии ХМЛ данная ситуация может измениться.

Благодарность

Благодарим врачей-гематологов за предоставленный клинический материал: М.А. Волкову, В.Л. Иванову, Н.В. Новицкую, Е.Г. Аршанскую, И.Г. Лазареву, Т.И. Пospelову, И.А. Блажиевич, Н.П. Домникову, Т.С. Константинову, Л.Л. Высоцкую, А.К. Голенкова, Е.М. Володичеву, В.А. Лапина, Л.В. Заклякову, Е.Г. Овсянникову, И.Л. Давыдкина, Т.И. Колошейнову, С.Р. Горячеву, А.С. Приступу, Р.А. Голубенко, Л.В. Гаврилову, С.А. Волкову, Г.Б. Кучму, Л.В. Анчукову, Н.А. Вопилину, А.Н. Гавриленко, Г.А. Гайсарову, И.И. Гушанскую, Ю.А. Дунаева, Н.Б. Есеевеву, Н.А. Калинову, К.Д. Капанова, Т.С. Капорскую, Е.Г. Кириллову, Т.А. Киселеву, Т.Ю. Клиторченко, М.В. Косинову, Л.М. Ялунину, О.М. Хомчук, О.М. Фалькович, Г.А. Митрофанову, В.З. Молостову, И.И. Мулину, В.В. Пилюшину, Ж.В. Попову, Т.С. Тикунову, В.С. Скатову, Т.М. Толстокору, В.А. Тумакову, Т.В. Чагорову, М.М. Чукавину, Р.Г. Штыбель, В.В. Яблокову, Е.А. Самышину, Е.В. Сокурову.

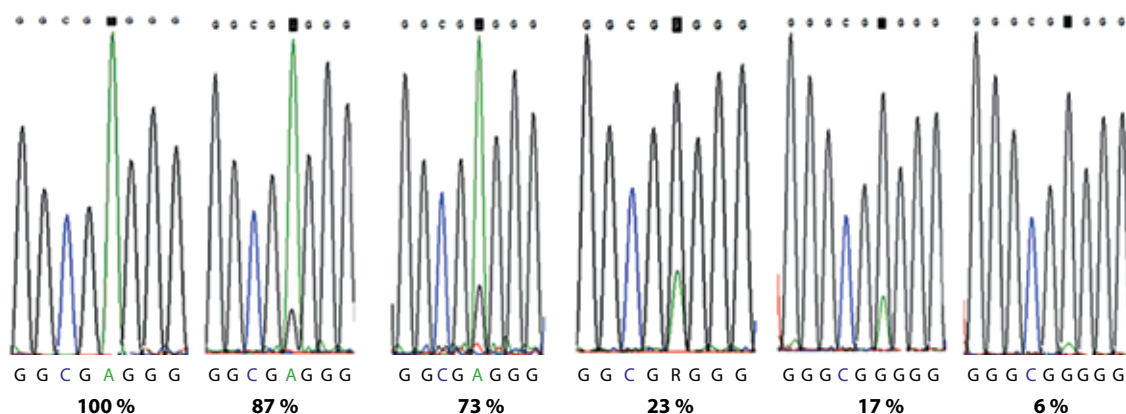


Рис. 7. Эффективное подавление дазатинибом резистентного к иматинибу клона опухолевых клеток, несущего мутацию p. G250E (с. 749G>A). Анализ последующих образцов периферической крови больного хроническим миелолейкозом с интервалом в 2 нед от момента смены терапии

Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

1. Ernst T, La Rosée P, Müller M.C., Hochhaus A. BCR-ABL mutations in chronic myeloid leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am* 2011 Oct;25 (5):997–1008, v-vi. DOI: 10.1016/j.hoc.2011.09.005. PMID: 22054731.
2. Овсянникова Е.Г., Капланов К.Д., Клиточенко Т.Ю. и др. Мутационный статус резистентных к иматинибу больных хроническим миелолейкозом. *Онкогематология* 2012;4:16–24.
3. Jabbour E., Kantarjian H. Chronic myeloid leukemia: 2016 update on diagnosis, therapy, and monitoring. *Am J Hematol* 2016 Feb;91(2):252–65. DOI: 10.1002/ajh.24275. PMID: 26799612.
4. Baccarani M., Cortes J., Pane F. et al. Chronic myeloid leukemia: an update of concepts and management recommendations of European Leukemia Net. *J Clin Oncol* 2009 Dec 10;27(35):6041–51. DOI: 10.1200/JCO.2009.25.0779. Epub 2009 Nov 2. PMID: 19884523.
5. Baccarani M., Pileri S., Steegmann J.-L. et al. on behalf of the ESMO Guidelines Working Group. Chronic myeloid leukemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2012;23 (suppl 7):vii72 – vii77. DOI: 10.1093/annonc/mds228.
6. Jabbour E., Branford S., Saglio G. et al. Practical advice for determining the role of BCR-ABL mutations in guiding tyrosine kinase inhibitor therapy in patients with chronic myeloid leukemia. *Cancer* 2011 May 1;117(9):1800–11. DOI: 10.1002/cnccr.25717. Epub 2010 Nov 29. PMID: 21509757.
7. Soverini S., Hochhaus A., Franck E., Nicolini F.E. et al. BCR-ABL kinase domain mutation analysis in chronic myeloid leukemia patients treated with tyrosine kinase inhibitors: recommendations from an expert panel on behalf of European Leukemia Net. *Blood* 2011;118:1208–15. DOI: 10.1182/blood-2010-12-326405. PMID: 21562040.
8. Cross N.C. Standardisation of molecular monitoring for chronic myeloid leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 2009 Sep;22(3):355–65. DOI: 10.1016/j.beha.2009.04.001. PMID: 19959086.
9. 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): 151–159.
10. 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.
11. Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987 Apr;162(1):156–9. DOI: 10.1006/abio.1987.9999. PMID: 2440339.