

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ ТЕРАПИИ ХРОНИЧЕСКОГО МИЕЛОЛЕЙКОЗА ИНГИБИТОРАМИ ТИРОЗИНКИНАЗ

С.И. Куцев, М.В. Вельченко, А.Н. Зельцер

ГОУ ВПО Ростовский государственный медицинский университет, Ростов-на-Дону

Терапия Ph-позитивного хронического миелолейкоза (ХМЛ) ингибитором тирозинкиназ иматинибом приводит к достижению гематологической и цитогенетической ремиссии с большой частотой. Однако у большинства пациентов с полным цитогенетическим ответом молекулярными методами обнаруживается минимальная остаточная болезнь. В связи с этим роль молекулярного мониторинга терапии ХМЛ в последние годы возросла. Регулярный молекулярный мониторинг позволяет рано выявить рецидив и, как следствие терапевтической интервенции, улучшить результаты лечения. Для пациентов с ХМЛ, получающих лечение иматинибом, резистентность к проводимой терапии или повышение уровня экспрессии гена BCR-ABL служат показанием для анализа мутаций киназного домена этого гена. Выявление мутаций, ставших причиной резистентности к иматинибу, необходимо для выбора тактики терапии. Молекулярные методы полимеразной цепной реакции в режиме реального времени и ДНК-секвенирования должны войти в практику мониторинга ХМЛ.

Ключевые слова: хронический миелолейкоз, экспрессия гена BCR-ABL, мутации киназного домена гена BCR-ABL, ингибиторы тирозинкиназ

MOLECULAR GENETICS MONITORING OF TYROSINE KINASE INHIBITOR THERAPY FOR CHRONIC MYELOID LEUKEMIA

S.I. Kutsev, M.V. Velchenko, A.N. Zelzer

Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russia

Therapy for Ph-positive chronic myeloid leukemia (CML) with the tyrosine kinase inhibitor imatinib results in achievement of high hematological and cytogenetic response rates. However, most patients with a complete cytogenetic response were found to have a minimal residual disease. Therefore the role of molecular monitoring during CML therapy has recently increased. Regular molecular monitoring allows to early diagnosis of relapse and improvement of treatment outcome as a result of therapeutic intervention. For the imatinib-treated patients therapy resistance or increased BCR-ABL gene expression is an indication for kinase domain mutations testing. Detection of the mutations causing imatinib resistance is required for therapy choice. Real-time polymerase chain reaction and DNA sequencing should become customary for CML monitoring.

Key words: chronic myeloid leukemia, BCR-ABL gene expression, mutations of BCR-ABL gene kinase domain, tyrosine kinase inhibitors

Введение

Успешное лечение пациентов с хроническим миелоидным лейкозом (ХМЛ) невозможно без соответствующего мониторинга эффективности проводимой терапии. Это положение стало особенно очевидным со времени внедрения в клиническую практику первого препарата группы ингибиторов тирозинкиназ (ИТК) — иматиниба мезилата (Гливек, «Novartis Pharma»). В настоящее время прошли клинические испытания и зарегистрированы для лечения ХМЛ ИТК II поколения — нилотиниб (Тасigna, «Novartis Pharma») и дазатиниб (Спрайсел, «Bristol-Mayers Squibb»). Во II и III фазах клинических испытаний находятся новые лекарственные вещества уже III поколения ИТК [1–4]. Возможности терапии ХМЛ не ограничиваются использованием только ИТК. Несомненно, что тактика ведения пациентов с ХМЛ включает и трансплантацию костного мозга у больных с высоким риском развития рецидива на фоне терапии ИТК [4, 5], и применение α -интерферонов у пациентов с низким риском возникновения рецидива, а также для улучшения результатов лечения ИТК [6, 7]. Широкий диапазон доступных в настоящее время подходов к терапии ХМЛ требует унифицированной системы мониторинга эффективности лечения ХМЛ для своевременного выбора наиболее оптимального и потенциально эффективного подхода к терапии ХМЛ в каждом конкретном случае.

Провести достоверную диагностику и мониторинг лечения ХМЛ позволяет стандартное цитогенетическое исследование (СЦИ) клеток костного мозга. СЦИ является единственным методом, позволяющим анализировать весь хромосомный набор клетки. Посредством СЦИ можно обнаружить дополнительные хромосомные аберрации, которые в ряде случаев свидетельствуют о неблагоприятном прогнозе заболевания. При этом необходимо понимать, что разрешающая способность этого метода относительно низкая и составляет 1–5% клеток. Филадельфийская хромосома с помощью стандартной цитогенетики выявляется почти у 90% вновь диагностированных нелеченых больных с ХМЛ [8].

Метод флюоресцентной *in situ* гибридизации (FISH) хромосом является более чувствительным и позволяет обнаружить 1 опухолевую клетку на 200–500 клеток костного мозга. При использовании метода FISH можно определить Ph⁺ клон клеток даже при отсутствии делящихся клеток. Для выявления BCR-ABL слитного гена используют ДНК-зонды, меченные различными флуорохромами. С помощью FISH-технологий данную перестройку удается обнаружить у 95% больных с клиническим диагнозом ХМЛ [8]. СЦИ и FISH-анализ используются как для диагностики ХМЛ, так и для мониторинга эффективности терапии ХМЛ ИТК.

В соответствии с рекомендациями European Leukemia Net [9] контрольные СЦИ или FISH-анализ (в случае отсутствия митозов клеток костного мозга) на

фоне терапии ХМЛ ИТК проводят 1 раз в 6 мес до достижения полного цитогенетического ответа, а затем 1 раз в год.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) применяется как для диагностики ХМЛ, так и для мониторингирования минимальной остаточной болезни (МОБ) в процессе терапии [10, 11]. С помощью ПЦР или FISH-анализа диагноз подтверждается в тех 5% случаев, при которых СЦИ Ph-хромосому не выявляет. Для проведения исследования можно использовать образцы как крови, так и костного мозга. Чувствительность этого метода высока и позволяет обнаружить одну единственную клетку со специфической ДНК или РНК среди 10^4 — 10^6 клеток. Более чем у четверти из Ph-негативных пациентов с помощью ПЦР выявляют химерный ген *BCR-ABL*. Только небольшая часть больных (2—3%) с классической картиной ХМЛ — Ph/*BCR ABL*-негативны [8].

Молекулярный мониторинг уровня *BCR-ABL*-транскрипта при помощи количественной ПЦР в реальном времени все чаще используется в качестве оценки ответа на лечение у пациентов с ХМЛ [12]. Этот метод становится особенно важным в эру терапии ХМЛ ИТК, когда резидуальный уровень лейкозных клеток обычно ниже уровня чувствительности цитогенетического исследования [13, 14].

Мониторинг у пациентов, получающих иматиниб, молекулярным методом производится путем определения уровня экспрессии *BCR-ABL*-транскрипта до начала терапии и затем каждые 3 мес. Этот подход позволяет оценить динамику терапии и предсказать возможность развития рецидива.

Значимость молекулярного анализа определяется также тем, что уровень молекулярного ответа служит предиктором безрецидивной выживаемости [15]. Повышение уровня экспрессии *BCR-ABL*-транскрипта на фоне терапии иматинибом косвенно может указывать на наличие мутаций в гене *Bcr-Abl*-киназы, являющихся ведущей причиной резистентности к иматинибу. Как следствие, молекулярный мониторинг целесообразно использовать в качестве скрининговой стратегии мутационного анализа [16].

Методология идентификации *BCR-ABL* эволюционировала на протяжении последних лет [17]. Изначально было возможно только качественное определение *BCR-ABL*-транскрипта с использованием одношаговой амплификации или двухшаговой «гнездовой» амплификации с внутренними праймерами, повышающими чувствительность [18—20].

Качественный ПЦР-анализ, показывающий только наличие или отсутствие транскрипта, недостаточно информативен. В связи с этим для оценки динамики терапии на первый план вышли количественные ПЦР-исследования и поиск прогностически важных уровней транскрипта *BCR-ABL*. Для определения МОБ применяют методику количественной ПЦР в режиме реального времени (Real-time PCR, RQ-PCR). В основе метода лежат регистрация накопления продуктов реакции в реальном времени и построение калибровочных кривых по реальным процессам, происходящим в каждой конкретной пробирке. Для определения ПЦР-продукта используются флуоресцентные красители, обеспечивающие флуоресценцию, прямо пропорциональную количеству ПЦР-продукта — так называемая репортерная флуоресценция.

Результат исследования методом ПЦР в реальном времени выражают отношением уровня экспрессии гена *BCR-ABL* к уровню экспрессии контрольного (*housekeeping*) гена. В качестве контрольных наиболее часто используют гены *ABL*, *BCR*, $\beta 2$ -M. Полным молекулярным ответом считают случаи, когда *BCR-ABL*-транскрипт выявить не удастся. Негативные результаты подтверждают с помощью качественной реакции ПЦР, чувствительность которой выше, чем у RQ-PCR [17].

Альтернативный метод выражения результатов ПЦР в реальном времени был введен Т. Hughes и соавт. в 2003 г. [21] в ходе новаторского международного рандомизированного исследования STI571 (IRIS Study), доказавшего высокую эффективность лечения ХМЛ иматинибом. В этом исследовании среднее значение экспрессии гена *BCR-ABL* в 30 образцах крови, полученных у пациентов с хроническим миелоидным лейкозом до терапии, считалось показателем среднего базового значения. Авторы предложили концепцию мониторингирования ответа на терапию иматинибом с использованием десятичного логарифма ($\log_{10}$): редукция экспрессии гена *BCR-ABL* по сравнению со стандартной базовой линией не леченных иматинибом пациентов оценивалась в $\log_{10}$ [21].

Другой вариант выражения результатов — это отношение числа копий гена *BCR-ABL* к числу копий контрольного гена или представление данного соотношения в процентном выражении, где число копий контрольного гена принято за 100% [17].

Уровень экспрессии транскрипта коррелирует с числом опухолевых клеток, присутствующих в крови, являясь своеобразным маркером ответа на таргетную терапию [22]. Лейкозоспецифичный *BCR-ABL*-транскрипт является удобным маркером для молекулярного мониторинга терапии ХМЛ методом количественной ПЦР, так как почти у всех пациентов с данным заболеванием обнаруживаются 1 или 2 типа транскрипта, которые различаются только по одному *BCR*-экзону [22].

У больных, принимающих иматиниб, рядом авторов выявлена выраженная корреляция между процентом Ph-позитивных метафаз в костном мозге и уровнем *BCR-ABL*-транскрипта, оцененным RQ-PCR-исследованием периферической крови [23—25]. Ранняя редукция уровня *BCR-ABL*-транскрипта предсказывает цитогенетический ответ у пациентов в хронической фазе ХМЛ, принимающих иматиниб. В свою очередь, повышение уровня *BCR-ABL*-транскрипта — неблагоприятный прогностический признак, как правило, предшествующий развитию цитогенетического рецидива и прогрессии болезни. С учетом того, что у небольшой части больных с продолжительной полной цитогенетической ремиссией впоследствии возникают рецидивы с быстрой прогрессией вплоть до бластного криза, метод молекулярного мониторинга приобретает особенное значение.

Опыт ведения пациентов с ХМЛ при использовании монотерапии иматинибом показал необходимость регулярного цитогенетического и/или молекулярно-генетического мониторинга ремиссии. Так, в клиническом исследовании IRIS у вновь выявленных пациентов с ХМЛ, получающих терапию иматинибом в дозе 400 мг/сут, в 4% случаев не удалось достичь полной гематологической ремиссии по истечении 3 мес терапии, в 16% случаев не достигнут большой цитогенетический ответ после 12 мес терапии и у 23% — после 18 мес тера-

пии [26]. Таким образом, приблизительно 20—25% пациентов с только что установленным диагнозом ХМЛ характеризуются субоптимальным ответом или резистентностью к иматинибу в дозе 400 мг/сут [26]. По мнению большинства исследователей, наиболее частой причиной резистентности к иматинибу являются точечные мутации гена *BCR-ABL*-киназы [27—33], которые приводят к замене аминокислот в белке *BCR-ABL* и, как следствие, изменяют конформацию белка или структуру активного центра *BCR-ABL*-киназы. В результате аминокислотных замен иматиниб не способен эффективно связываться с *BCR-ABL*-киназой и оказывать на нее ингибирующее действие.

Частота мутаций, приводящих к резистентности, у пациентов с ХМЛ зависит от фазы заболевания. Так, в исследовании итальянской рабочей группы GIMEMA [34] проведен мутационный анализ у 297 пациентов с первичной и вторичной резистентностью к иматинибу, и мутации выявлены у 127, что составило 43%. При этом мутации были обнаружены у 27% больных в хронической фазе, у 52% — в фазе акселерации, у 75% пациентов с миелоидным и у 85% — с лимфоидным бластным кризом. Мутации отмечены у 30% пациентов с первичной и в 57% случаев — вторичной (приобретенной) резистентностью к иматинибу.

В настоящее время идентифицировано по крайней мере 90 точечных мутаций киназного домена гена *BCR-ABL*, каждая из которых приводит к замене одной из 53 аминокислот в белке тирозинкиназы *BCR-ABL* и обуславливает резистентность к иматинибу [35]. Мутации встречаются у резистентных к иматинибу пациентов с различной частотой. Т. Hughes и соавт. [36] обобщили данные 20 опубликованных работ, проанализировав частоту различных мутаций у 245 пациентов (219 больных с ХМЛ и 26 — с Ph-позитивным острым лимфобластным лейкозом). Чаще всего у резистентных пациентов с ХМЛ и Ph-позитивным острым лимфобластным лейкозом обнаруживают мутации E255K/V и M351T, а также мутацию T315I, устойчивую не только к иматинибу, но и к ИТК II поколения (рис. 1). По данным S. Soverini и соавт. [34], мутации M244V, G250E, Y253F/H, E255K/V, T315I, M351T и F359V составляют 85% всех мутаций, ассоциированных с резистентностью к иматинибу.

Наиболее широко распространенным методом выявления мутаций гена *BCR-ABL* у резистентных пациентов является молекулярно-генетический метод прямого секвенирования ДНК, позволяющий расшифровать первичную структуру гена. Из крови или костного мозга пациентов выделяют тотальную РНК, которую с помощью реакции обратной транскрипции (ОТ) переводят в комплементарную ДНК (кДНК). Из полученной кДНК с помощью реакции ПЦР амплифицируют ген *BCR-ABL* и затем определяют его первичную последовательность [27, 37, 38].

Наиболее вероятно, что появление мутаций является результатом повышенной тирозинкиназной активности самого белка *BCR-ABL* [39], и вероятность появления мутаций, а следовательно, и ухудшение прогноза заболевания, увеличиваются по мере его прогрессирования. Так, частота обнаружения мутантных клонов в фазе бластного криза в несколько раз выше таковой в хронической фазе. Об этом же свидетельствует снижение риска появления мутаций на фоне терапии иматинибом, по-

скольку редуцируется клон клеток, содержащих гиперактивную форму тирозинкиназы — *BCR-ABL*. В связи с этим уже с молекулярно-биологических позиций становится очевидной клиническая значимость ранней диагностики и раннего начала терапии ХМЛ иматинибом.

Таким образом, помимо стандартных цитогенетических и FISH-исследований, уже прочно вошедших в практику врача-гематолога, наиболее перспективным нам представляется развитие и внедрение в диагностический процесс и мониторинг терапии ХМЛ молекулярно-генетических технологий.

Целью нашего исследования являлось изучение возможностей комплексного молекулярно-генетического подхода с использованием методов ПЦР в режиме реального времени и мутационного анализа для диагностики и мониторингирования ответа на терапию пациентов с ХМЛ. В задачи нашего исследования входило рассчитать базовый уровень экспрессии гена *BCR-ABL* в группе вновь диагностированных, не леченных иматинибом пациентов с ХМЛ, изучить эффективность метода ПЦР в реальном времени для оценки МОБ у пациентов, достигших полного цитогенетического ответа на терапию иматинибом, выяснить корреляционную связь уровня экспрессии гена *BCR-ABL* и степени цитогенетического ответа на терапию иматинибом, проанализировать уровень экспрессии гена *BCR-ABL* и изучить мутационный профиль у иматиниб-резистентных пациентов.

Материалы и методы

Характеристика групп пациентов

В работе представлены результаты молекулярных исследований крови и костного мозга 100 больных с цитогенетически подтвержденным диагнозом Ph⁺-ХМЛ. Все пациенты находились в хронической фазе заболевания. 1-ю группу составили 35 больных с впервые выявленным ХМЛ, 2-ю — 35 пациентов, достигших полного цитогенетического ответа на терапию иматинибом в дозе 400 мг/сут в течение 12—18 мес лечения, 3-ю группу — 30 пациентов, резистентных к терапии иматинибом в дозе 400 или 600 мг/сут.

Больные рассматривались как резистентные к терапии иматинибом в соответствии с критериям European Leukemia Net [9]: отсутствие гематологического ответа после 3 мес терапии иматинибом в дозе 400 мг/сут, цитогенетического ответа — после 6 мес, частичного цитогенетического ответа — после 12 мес, полного цитогенетического ответа — после 18 мес терапии, потеря уже достигнутого гематологического, ци-

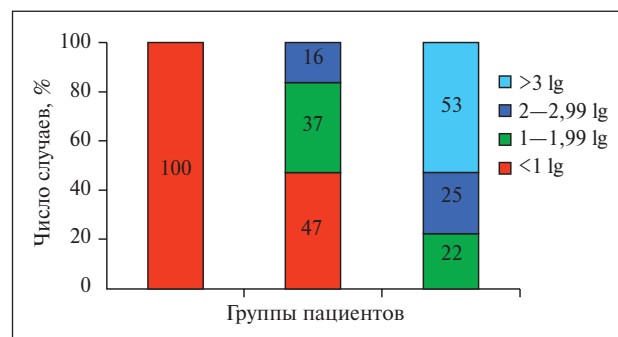


Рис. 1. Структура молекулярного ответа с использованием значений $\Delta\lg$ у пациентов с резистентностью к иматинибу (3-я группа) и при полном цитогенетическом ответе на терапию иматинибом (2-я группа)

тогенетического или молекулярного ответов, прогрессирование заболевания с переходом в фазу акселерации или бластного криза. Число выполненных исследований на этапе диагностики и в динамике терапии ХМЛ представлено в табл. 1.

Цитогенетические исследования костного мозга

Цитогенетическое исследование костного мозга на этапе постановки диагноза ХМЛ выполнено у всех 100 пациентов. Контрольные цитогенетические исследования проведены через 6, 12 и 18 мес терапии иматинибом у 35 больных, достигших полного цитогенетического ответа, через 6 и 12 мес — у 30 пациентов, резистентных к терапии иматинибом. Всего было выполнено 256 цитогенетических исследований. Образцы костного мозга в количестве 0,5—1 мл в пробирках с гепарином Li транспортировались в лабораторию в течение 0,5—24 ч при температуре 4—8°C. В работе использовались общепринятые прямой метод и метод культивирования образцов костного мозга в течение 24 ч. Для стандартного цитогенетического анализа препараты окрашивались методом GTG (дифференциальная окраска G). Для FISH-анализа в 11 случаях использовали двухцветный ДНК-зонд LSI BCR/ABL Dual Color, Dual Fusion Translocation Probe («ABBOT»). Флюоресцентную гибридизацию хромосом на цитогенетических препаратах проводили в соответствии с протоколом производителя.

Молекулярные исследования

Молекулярно-генетические исследования экспрессии гена *BCR-ABL* методом ПЦР в режиме реального времени в клетках крови выполнены на этапе постановки диагноза — у 35 больных, вошедших в группу с впервые диагностированным ХМЛ, на 12-й или 18-й месяц — у 35 пациентов, достигших полного цитогенетического ответа, и на 12-й и 18-й месяцы — у 30 резистентных пациентов. Всего методом ПЦР в реальном времени выполнено 100 исследований.

Образцы крови и выделение РНК

Образцы венозной крови для молекулярных исследований в количестве не менее 10 мл в пробирках с этилендиаминтетраацетатом транспортировались в лабораторию в течение 0,5—24 ч при температуре 4—8°C. Выделение тотальной РНК проводили не позже чем через 24 ч после забора крови гуанидин-тиоционат-хлороформ-фенольным методом по P. Chomczynski, N. Sacchi [40] с использованием реагентов для выделения РНК, входящих

в состав набора Онкоскрин-1-1-Q (ООО «ГеноТехнология», Россия).

Реакция ОТ

Для реакции ОТ применяли от 1 до 3 мкг выделенной тотальной РНК, случайные гексамерные праймеры и M-MLV-обратную транскриптазу, входящие в состав набора Онкоскрин-1-1-Q.

ПЦР в режиме реального времени

ПЦР с определением в режиме реального времени осуществлялась в термоциклере Rotor-Gene 6000 (версии 1.7, «Corbett Life Science», Австралия). Для проведения ПЦР в реальном времени использовались наборы реагентов Онкоскрин-1-1-Q. Определение интенсивности экспрессии химерного онкогена *BCR-ABL* типа p210 и контрольного (housekeeping) гена *ABL* проводилось согласно протоколу производителя. Для построения калибровочной кривой применялись десятикратные разведения положительных контрольных образцов (плазмиды, содержащие клонированные фрагменты генов *BCR-ABL* и *ABL*), концентрации которых составляли 10², 10³, 10⁴, 10⁵, 10⁶ копий в 5 мкл раствора.

Результат относительной экспрессии гена *BCR-ABL* выражали как отношение среднего числа копий гена *BCR-ABL* к среднему числу копий гена *ABL*, умноженное на 10⁶.

Для удобства представления данных по изменению уровня экспрессии *BCR-ABL* в процессе лечения была использована логарифмическая шкала измерений [41]. Результаты выражали в виде десятичного логарифма (lg) снижения экспрессии по отношению к базовому уровню. Снижение экспрессии на 1 lg по отношению к базовому уровню означало уменьшение уровня экспрессии *BCR-ABL*-транскрипта по сравнению с базовым уровнем в 10 раз, на 2 lg P в 100 раз, на 3 lg P в 1000 раз, на 4 lg P в 10 000 раз.

Также для оценки динамики изменений экспрессии гена *BCR-ABL* использовалась международная шкала (International Scale, IS), рекомендованная Экспертной группой European Leukemia Net (ELN) [8]. При этом экспрессия контрольного гена (в нашем случае гена *ABL*) принимается за 100%. Относительная экспрессия гена *BCR-ABL* по IS определялась как отношение среднего числа копий гена *BCR-ABL* к среднему числу копий гена *ABL*, умноженное на 100%. Согласно рекомендациям ELN, обнаружение гена *BCR-ABL* более чем в 1% клеток

Таблица 1. Число выполненных цитогенетических и молекулярно-генетических исследований на этапе диагностики и в динамике наблюдения пациентов с ХМЛ

Группа	Длительность терапии иматинибом (мес)				Итого
	0	6	12	18	
Число СЦИ и FISH-исследований					
1-я (n=35)	35	—	—	—	35
2-я (n=35)	35	33	35	35	138
3-я (n=30)	30	23	30	—	83
Число исследований экспрессии гена <i>BCR-ABL</i> методом ПЦР в реальном времени					
1-я (n=35)	35	—	—	—	35
2-я (n=35)	—	—	23	12	35
3-я (n=30)	—	—	25	5	30
Число исследований мутаций гена <i>BCR-ABL</i>					
3-я (n=30)			16	7	23

свидетельствует о выраженной экспрессии *BCR-ABL*, оценить которую можно с помощью СЦИ. Экспрессия гена *BCR-ABL* в 0,1–1% клеток характерна для умеренного уровня экспрессии, который уже невозможно оценить с помощью СЦИ. Определение экспрессии гена *BCR-ABL* на уровне менее чем в 0,1% говорит о достижении пациентом большого молекулярного ответа.

Анализ мутаций гена *BCR-ABL*

Анализ мутаций гена *BCR-ABL* был выполнен методом прямого ДНК-секвенирования у 23 больных, входящих в группу резистентных к иматинибу пациентов. В исследовании определялась первичная последовательность кДНК, полученной в результате реакции ОТ-топальной РНК.

На первом этапе проводили амплификацию анализируемых фрагментов с помощью термоциклера Bio-Rad PTC200 («BioRad Lab», США). Амплификация интересующего фрагмента гена *ABL* осуществлялась в 2 этапа в соответствии с рекомендациями S. Branford, T. Hughes [42]. На первом этапе амплифицировали участок гена *BCR-ABL* с помощью праймеров BCR F P 5'-*tga cca act cgt ggt tga aac tc* -3' и ABL R — 5'-*tcc act tgg tct gag ata ctg gat t* -3'. При этом, в случае если у пациента был вариант гена *BCR-ABL b2a2*, при электрофорезе в 2% агарозном геле выявлялся фрагмент длиной 1504 пар оснований (п.о.), а если имелся вариант *b3a2* — обнаруживали фрагмент длиной 1579 п.о. На втором этапе из полученного фрагмента *BCR-ABL* амплифицировали участок только гена *ABL* с помощью праймеров к гену *ABL* — ABL F - 5'-*cgc aac aag ccc act gtc t* -3' и ABL R - 5'-*tcc act tgg tct gag ata ctg gat t* -3'. В результате амплификации получали фрагмент гена ABL длиной 863 п.о., кодирующий Р-петлю, С-спираль, область SH2-контакт, А-петлю. Реакции были выполнены в 20 мкл общего объема смеси, содержащей 7 мкл деионизированной воды («Sigma»), 5 мкл (1–3 мкг) полученной кДНК, 4 мкл 5-кратного ПЦР-буфера, 15мМ MgCl₂, 0,3 мкл (5 ЕД/мкл) TaqF ДНК-полимеразы («ИнтерЛабСервис»), 2 мкл смеси dNTP и по 1 мкл каждого праймера. Реакцию амплификации проводили при следующих условиях: 95°C — 10 мин; 45 циклов: 95°C — 15 с, 60°C — 20 с, 72°C — 120 с; 72°C — 5 мин.

Реакция секвенирования полученного фрагмента гена *ABL* осуществлялась с помощью набора GenomeLab™Methods Development Kit Dye Terminator Cycle Sequencing («Beckman Coulter», США) согласно протоколу производителя. Реакционная смесь для ДНК-секвенирования включала 5,5 мкл Pre-mix, 1 мкл ABL-F праймера и 3,5 мкл очищенного ПЦР-продукта. Секвенирование проводили по следующей схеме: 94°C — 1 мин; 45 циклов; 94°C — 15 с, 64°C — 20 с, 60°C — 60 с.

Определение нуклеотидной последовательности выполняли посредством применения автоматического секвенатора CEQ8000 («Beckman Coulter», США). Параметры проводимого электрофореза: вольтаж — 6 кВ, время — 60 мин, температура — 56°C, время подъема температуры — 5 мин. Анализ полученных результатов определялся с помощью программного обеспечения для Beckman Coulter CEQ8000.

Статистическая обработка данных

Статистическая обработка данных проводилась с использованием программного обеспечения Excel и включала в себя определение медианы, максимальных и минимальных значений, коэффициента корреляции.

Результаты и обсуждение

Расчет базового уровня экспрессии *BCR-ABL*

Для оценки изменения уровня экспрессии *BCR-ABL* на фоне терапии иматинибом наиболее информативно исследование динамики экспрессии *BCR-ABL*-транскрипта у каждого пациента начиная от момента установления диагноза ХМЛ. Однако на практике не у всех больных удается определить диагностический уровень экспрессии *BCR-ABL*. В связи с этим в нашем исследовании мы использовали методический подход с определением диагностического (или базового) уровня экспрессии гена *BCR-ABL*, впервые примененный в многоцентровом исследовании IRIS. Полученное значение медианы экспрессии *BCR-ABL* применялось для оценки динамики экспрессии *BCR-ABL* в качестве базового (диагностического) значения. Экспрессия гена *BCR-ABL* была определена у 35 больных с впервые диагностированным нелеченым ХМЛ в хронической фазе. Диапазон значений экспрессии гена *BCR-ABL* у этих пациентов составил от 7150 до 624 487 копий *BCR-ABL*×10⁶/копий ABL (табл. 2). Медиана экспрессии *BCR-ABL* у больных с впервые выявленным ХМЛ составила 161 104 копий *BCR-ABL*×10⁶/копий ABL и была принята за величину базового уровня.

На сегодняшний день данные мировой литературы сводятся к тому, что представление экспрессии гена *BCR-ABL* в абсолютных числах малоинформативно. Клиническое значение имеет динамика изменений относительно начального базового уровня. Для удобства представления данных по изменению уровня экспрессии *BCR-ABL* в динамике были использованы логарифмическая [41] и международная шкалы измерений [8].

ПЦР в реальном времени в оценке МОБ

При изучении МОБ в рамках нашего исследования в группе пациентов с полным цитогенетическим ответом медиана значений экспрессии гена *BCR-ABL* по данным количественной ПЦР в реальном времени составила 1047

Таблица 2. Экспрессия гена *BCR-ABL* на этапе диагностики и в динамике наблюдения пациентов с ХМЛ, выраженная в абсолютных значениях (*BCR-ABL*×10⁶/*ABL*), по логарифмической (Δlg) и международной (% IS) шкалам

Показатель	Экспрессия <i>BCR-ABL</i> в группах						
	1-я (n=35) <i>BCR-ABL</i> ×10 ⁶ / <i>ABL</i>	2-я (n=35)			3-я (n=30)		
		<i>BCR-ABL</i> ×10 ⁶ / <i>ABL</i>	Δlg	% IS	<i>BCR-ABL</i> ×10 ⁶ / <i>ABL</i>	Δlg	% IS
Медиана	161 104	1047	3,64	0,1	46 029	0,95	4,6
Максимальное значение	624 487	5753	4,97	0,57	536 205	2,29	53,6
Минимальное значение	7150	0	1,21	0	428	0,76	0,04

копий $BCR-ABL \times 10^6$ /копий ABL (диапазон значений от 0 до 5753 копий $BCR-ABL \times 10^6$ /копий ABL). По логарифмической шкале измерений медиана снижения уровня экспрессии $BCR-ABL$ относительно начального базального уровня экспрессии в случае полного цитогенетического ответа была равна 3,64 lg. При анализе структуры молекулярного ответа (см. рис. 1) установлено, что при полном цитогенетическом ответе в 53% случаев происходило снижение экспрессии $BCR-ABL$ более чем на 3 lg по сравнению с начальным базовым уровнем, в 25% случаев — на 2—2,99 lg, в 22% случаев — на 1—1,99, в 0% случаев — менее чем на 1 lg. Таким образом, у большинства больных с полным цитогенетическим ответом (78%) отмечено снижение экспрессии $BCR-ABL$ более чем на 2 lg по сравнению с начальным базовым уровнем. По международной шкале измерений в группе пациентов с полным цитогенетическим ответом медиана экспрессии гена $BCR-ABL$ составила 0,1%, максимальное значение экспрессии гена — 0,57%, а минимальное значение — 0%.

Из 35 больных с полным цитогенетическим ответом у 26 (74,2%) методом количественной ПЦР в реальном времени был обнаружен остаточный опухолевый клон клеток. В этой подгруппе пациентов с обнаруженной МОБ медиана экспрессии гена $BCR-ABL$ составила 1326 копий $BCR-ABL \times 10^6$ /копий ABL , или 0,13%. Минимальное значение экспрессии гена $BCR-ABL$ у больных с полным цитогенетическим ответом — 112 копий $BCR-ABL \times 10^6$ /копий ABL , а максимальное — 5753 копий (см. табл. 2).

На основании полученных нами результатов в рамках проведенного исследования стало очевидно, что данных СЦИ (чувствительность $1:10^{-2}$ клеток) недостаточно для суждения о степени полноты ответа на терапию иматинибом. Это наиболее актуально для пациентов, достигших не только полной клинико-гематологической ремиссии, но и полного цитогенетического ответа [14, 16].

Real-time ПЦР в оценке экспрессии гена $BCR-ABL$ у пациентов, резистентных к иматинибу

В группе пациентов, соответствующих критериям резистентности к иматинибу [8], медиана экспрессии гена $BCR-ABL$ составила 46 029 копий $BCR-ABL \times 10^6$ /копий ABL , максимальное значение — 536 205 копий $BCR-ABL \times 10^6$ /копий ABL , минимальное — 428 копий. Медиана снижения уровня экспрессии $BCR-ABL$ относительно начального базального уровня экспрессии по логарифмической шкале — 0,95 lg. При анализе структуры молекулярного ответа (см. рис. 1) в 16% случаев наблюдалось снижение экспрессии $BCR-ABL$ на 2—2,99 lg по сравнению с начальным базовым уровнем, в 37% случаев — на 1—1,99 lg, в 47% — менее чем на 1 lg. По международной шкале (IS) в этой группе пациентов медиана экспрессии гена $BCR-ABL$ составила 4,6%, максимальное значение экспрессии соответствовало 53,6%, а минимальное — 0,04%.

СЦИ является общепринятым подходом для оценки ответа на терапию иматинибом. В соответствии с этим важное значение имеет вопрос о возможности сопоставления результатов СЦИ и данных количественной ПЦР в реальном времени. Мы установили степень корреляции между результатами этих исследований в изученных группах пациентов. В первом случае результаты молекулярно-генетического исследования были выражены в абсолютных числах копий $BCR-ABL \times 10^6$ /копий ABL и ко-

эффициент корреляции составил 0,54. Во втором случае результат, полученный при количественном исследовании образцов периферической крови методом ПЦР в реальном времени, отображали в виде десятичного логарифма снижения экспрессии по отношению к базовому уровню; коэффициент корреляции при этом составил 0,83.

Полученные данные свидетельствуют о высокой корреляции между результатами цитогенетического и молекулярно-генетического анализов и целесообразности применения количественной ПЦР в реальном времени для диагностики и мониторинга терапии ХМЛ как на стадии обнаружения Ph-хромосомы стандартным цитогенетическим методом, так и, безусловно, на стадии полного цитогенетического ответа. Более высокий коэффициент корреляции при выражении результатов *real-time* ПЦР в виде десятичного логарифма снижения (Δ lg) экспрессии по отношению к базовому уровню свидетельствует о более высокой клинической значимости интерпретации полученных результатов этим способом, подтверждая тем самым данные мировой литературы.

Мутационный анализ

Мутационный анализ проводился в группе резистентных к иматинибу пациентов ($n=23$) методом прямого секвенирования кДНК, полученной в результате реакции ОТ РНК. В результате проведенного исследования у 5 (21,7%) пациентов обнаружены следующие мутации: L248V ($n=2$), M244V + M351T ($n=1$), T315I ($n=1$), L248V + F359C ($n=1$) (рис. 2). Выявленные мутации, несомненно, имеют клиническое значение, поскольку связь их с резистентностью к иматинибу уже доказана в тестах *in vitro* и в ряде клинических исследований. Так, в исследованиях *in vitro* данные мутации приводят к повышению показателя IC_{50} — концентрации иматиниба, снижающей на 50% тирозинкиназную активность фермента Abl в биохимическом тесте и пролиферативную активность Ph-позитивных клеточных линий.

Мутация L248V способствует замене лейцина на валин в Р-петле тирозинкиназы Bcr-Abl, что приводит к изменению пространственной конформации белка и, как следствие, снижению эффективности иматиниба. Мутация в положении L248 обуславливает развитие высокого уровня резистентности, о чем свидетельствует повышение IC_{50} в тесте на пролиферативную активность более чем в 30 раз [43].

Мутация M244V вызывает замену метионина в 244-м положении на валин в Р-петле тирозинкиназы Bcr-Abl. В исследованиях А. Corbin и соавт. [44] Т. О'Наре и соавт. [45] была доказана роль мутации M244V в снижении чувствительности и развитии резистентности.

Мутация M351T (замена метионина на треонин в 351-м положении), по данным N. Shah и соавт. [28], Т. О'Наре и соавт. [46], приводит к умеренному снижению чувствительности к иматинибу. Однако у одного из наших больных мутация M351T была обнаружена в комбинации с мутацией M244V, что, возможно, потенцирует еще большую степень резистентности.

У 1 пациента выявлена мутация T315I, вызвавшая замену треонина в 315-м положении на изолейцин. По современным данным эта мутация обуславливает практически полное отсутствие чувствительности к иматинибу и высочайшую степень резистентности у пациентов с ХМЛ [28, 34, 44—47].

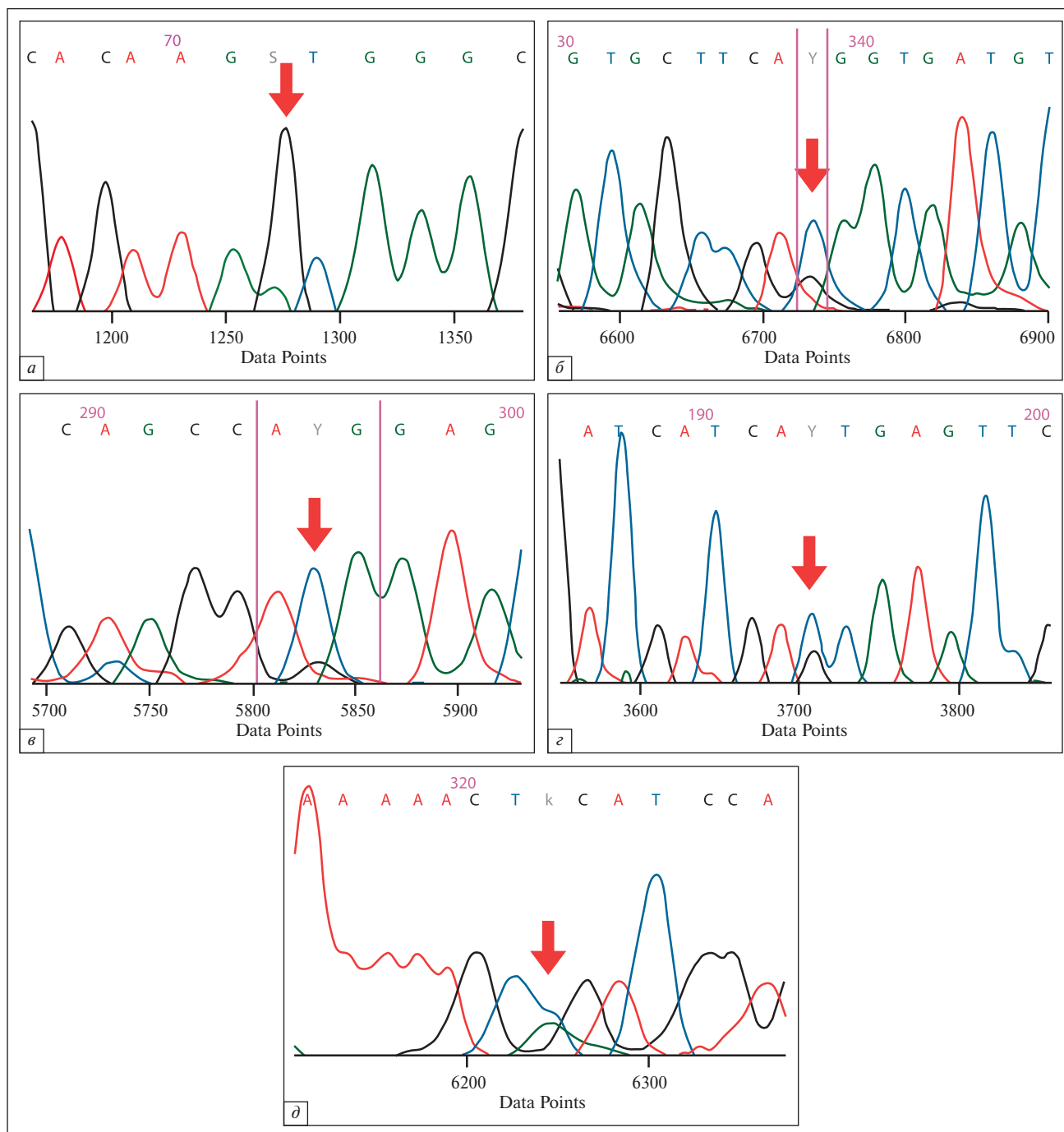


Рис. 2. Результаты секвенирования кДНК пациентов, резистентных к иматинибу, демонстрирующие мутации L248V (а), V244V(б), M351T (в), T315I (г), F359C (д)

Мутация F359V (замена фенилаланина в 359-м положении на цистеин) нарушает водородные связи между пиперазиновым кольцом иматиниба и Bcr-Abl-киназой и чаще наблюдается у пациентов с ХМЛ в рецидиве [28]. F359V-мутация вызывает слабое снижение чувствительности к иматинибу - в 1,8 и 2,8 раза в биохимическом и пролиферативном тестах соответственно.

Таким образом, полученные нами данные позволили выявить ряд мутаций гена *BCR-ABL*, обуславливающих резистентность к иматинибу. Их обнаружение рассматривается экспертной группой ELN как признак неблагоприятного прогноза и основание для модификации терапии, проводимой пациентам с мутациями киназного

домена *BCR-ABL*: повышение дозы иматиниба, переключение на терапию ИТК II поколения или, в случае панрезистентной мутации T315I, перевод с консервативной терапии на программу трансплантации стволовых кроветворных клеток.

Так, в одном из изученных нами случаев пациент с резистентностью к иматинибу (отсутствие какого-либо цитогенетического ответа после 6 мес терапии иматинибом в дозе 400 мг/сут) и мутацией L248V в киназном домене *BCR-ABL* был включен в клиническое исследование эффективности препарата II поколения ИТК - нилотииниба (Тасигна, «Novartis Pharma»; исследование CAMN107A2109, руководитель Центра — профессор

Ю.В. Шатохин). В результате терапии нилотинибом в дозе 800 мг/сут больной достиг полного цитогенетического ответа через 1 мес и большого молекулярного ответа — через 3 мес терапии.

В другом случае пациенту с резистентностью к иматинибу (отсутствие цитогенетического ответа после 12 мес терапии иматинибом в дозе 400 мг/сут) и мутацией T315I было рекомендовано проведение аллогенной трансплантации костного мозга, поскольку выявление данной мутации предполагает резистентность ко всем известным ИТК, прошедшим клинические испытания.

В остальных 3 случаях больных не удалось включить в клинические исследования ИТК II поколения, поэтому им была повышена доза иматиниба до 600 мг/сут, хотя наиболее оптимальным был бы переход с терапии иматинибом на терапию, например, нилотинибом.

Заключение

Корректный мониторинг лечения ХМЛ в настоящее время должен включать как цитогенетические, так и молекулярные исследования МОБ (определение уровня экспрессии *BCR-ABL*, поиск мутаций гена *BCR-ABL*-киназы) и проводиться на регулярной основе. СЦИ необходимо проводить 1 раз в 6 мес до достижения полного цитогенетического ответа, а затем 1 раз в год. Молекулярно-генетические исследования методом количественной ПЦР в реальном времени должны выполняться 1 раз в 3 мес. Определение мутаций киназного домена гена *BCR-ABL* следует выполнять у всех пациентов, являющихся резистентными к терапии иматинибом, в соответствии с критериям ELN.

Особую важность молекулярные исследования приобретают после достижения полного цитогенетического ответа, поскольку их результаты являются единственным способом мониторинга МОБ. Так, в нашем исследовании было показано, что в достаточно высоком проценте случаев пациенты с ХМЛ, достигшие полного цитогенетического ответа, сохраняют *BCR-ABL*-позитивный клон лейкозных клеток. Даже понятие «полный молекулярный ответ», когда *BCR-ABL*-транскрипт не определяется, должно использоваться осторожно. Применение этого термина предполагает абсолютное отсутствие лейкозных клеток, между тем даже данные молекулярных исследований могут быть обманчивы. Отчасти это связано с вариабельностью чувствительности метода ПЦР в режиме реального времени [21] и в большей степени обусловлено тем, что значительное число опухолевых клеток может присутствовать в организме больного, когда *BCR-ABL*

транскрипт не определяется стандартными методами молекулярного анализа [14].

Также большую роль играет то, что в условиях полного цитогенетического ответа увеличение экспрессии гена *BCR-ABL* является неблагоприятным фактором, указывающим на возможность развития рецидива, и вполне служит показанием для проведения стандартного цитогенетического и мутационного анализа.

Наиболее высокая степень корреляции наблюдается между результатами СЦИ и количественной ПЦР в реальном времени, выраженных в виде десятичного логарифма снижения ($\Delta\lg$) экспрессии по отношению к начальному базовому уровню. Кроме того, клинически информативно выражение результатов количественной ПЦР в процентном соотношении гена *BCR-ABL* к гену-нормализатору *ABL*. Несмотря на значительный разброс значений экспрессии гена *BCR-ABL*, отмечены достоверные различия в значениях экспрессии гена *BCR-ABL* в соответствии с цитогенетическим ответом.

Молекулярно-генетический мониторинг позволяет проводить первичный скрининг пациентов, нуждающихся в анализе мутаций гена *BCR-ABL*. Резистентные к иматинибу пациенты с ХМЛ в большинстве случаев характеризуются высоким уровнем экспрессии гена *BCR-ABL*, что часто ассоциируется с наличием мутаций в киназном домене гена *BCR-ABL*. Мутации обуславливают снижение активности иматиниба и даже, в случае T315I, полностью блокируют его действие.

Результаты секвенирования гена *BCR-ABL* у пациентов, резистентных к иматинибу, должны стать общедоступными для врачебной практики. Обнаружение различных мутаций киназного домена гена *BCR-ABL* позволяет рационализировать тактику терапии ХМЛ: повысить дозу иматиниба, перейти на терапию ИТК II поколения, рекомендовать экспериментальную терапию или воспользоваться программой трансплантации костного мозга. Для молекулярно-генетических лабораторий, занимающихся мониторингом лечения ХМЛ методом *real-time* ПЦР, мутационный анализ возможен, поскольку в обоих случаях используются одни и те же образцы кДНК.

Таким образом, комплекс молекулярно-генетических технологий для мониторинга терапии ХМЛ ИТК должен включать как минимум количественный метод ПЦР в режиме реального времени для отслеживания в динамике уровня экспрессии *BCR-ABL*-транскрипта и секвенирование кДНК гена *BCR-ABL* с целью исследования мутационного статуса у пациентов, резистентных к иматинибу.

Л и т е р а т у р а

1. O'Brien S.G., Guilhot F., Larson R.A. et al. Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2003; 348:994—1004.
2. Hehlmann R., Hochhaus A., Baccarani M. Chronic myeloid leukaemia. *Lancet* 2007;370:342—50.
3. Jabbour E., Cortes J.E., Giles F.J. et al. Current and emerging treatment options in chronic myeloid leukemia. *Cancer* 2007;109:2171—81.
4. Goldman J.M. How I treat chronic myeloid leukemia in the imatinib era. *Blood* 2007;110:2828—37.
5. Gratwohl A., Brand R., Apperley J. et al. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for chronic myeloid leukemia in Europe 2006: transplant activity, long-term data and current results. An analysis by the Chronic Leukemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *Haematologica* 2006;91:513—21.
6. Baccarani M., Russo D., Rosti G. et al. Interferon- α for chronic myeloid leukemia. *Semin Hematol* 2003;40:22—33.
7. Baccarani M., Martinelli G., Rosti G. et al. Imatinib and pegylated human recombinant interferon- α 2b in early chronic-phase chronic myeloid leukemia. *Blood* 2004;104:4245—51.
8. Зарицкий А.Ю., Ломаиа Э.Г. Перспективы фармакотерапии ХМЛ. *Эффект фармакотерапии* 2006;1:38—42.

9. Baccarani M., Saglio G., Goldman J. et al. Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European Leukemia Net. *Blood* 2006;108:1809–20.
10. Туркина А.Г., Челышева Е.Ю. Цитогенетический и молекулярный ответ — ранние маркеры эффективности терапии Гливеком больных Ph⁺-хроническим миелолейкозом. *Фарматека* 2004;18(95).
11. Мисюрин А.В., Аксенова Е.В., Крутов А.А. и др. Молекулярная диагностика хронического миелолейкоза. *Гематол трансфузиол* 2007;2:35–40.
12. Челышева 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. *Гематол трансфузиол* 2007;2:50–1.
13. Kaeda S.A., Chase A., Goldman J.M. Cytogenetic and molecular monitoring of residual disease in chronic myeloid leukemia. *Acta Hematol* 2002;107:64–75.
14. Goldman J.M. Chronic myeloid leukemia—still a few questions. *Exp Hematol* 2004;32:2–10.
15. Marin D., Marktel S., Szydlo R. et al. Survival of patients with chronic phase chronic myeloid leukemia after failed response to interferon-alfa. *Lancet* 2003;362:617–9.
16. Hughes T., Branford S. Molecular monitoring of BCR-ABL as a guide to clinical management in chronic myeloid leukaemia. *Blood Reviews* 2006;20:29–41.
17. Hughes T., Deininger M., Hochhaus A. et al. Monitoring CML patients responding to treatment with tyrosine kinase inhibitors: review and recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts and kinase domain mutations and for expressing results. *Blood* 2006;108(1):28–37.
18. Kawasaki E.S., Clark S.S., Coyne N.Y. et al. Diagnosis of chronic myelogenous and acute lymphocytic leukemias by detection of leukemia specific mRNA sequences amplified in vitro. *Proc Nat Acad Sci USA* 1988;85:5698–702.
19. Morgan G.J., Hughes T., Janssen J.W.G. et al. Polymerase chain reaction for detection of residual leukaemia. *Lancet* 1989;1:928–9.
20. Hughes T.P., Morgan G.J., Martiat P. et al. Detection of residual leukemia after bone marrow transplantation: role of PCR in predicting relapse. *Blood* 1991;77:874–8.
21. Hughes T., Kaeda J., Branford S. et al. Frequency of major molecular response to imatinib or interferon alfa plus cytarabine in newly diagnosed chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2003;349:1423–32.
22. Branford S., Hughes T.P., Rudzki Z. Monitoring chronic myeloid leukaemia therapy by real-time quantitative PCR in blood is a reliable alternative to bone marrow cytogenetics. *Br J Haematol* 1999;107:587–99.
23. Merx K., Muller M.C., Kreil S. et al. Early reduction of BCR-ABL mRNA transcript levels predicts cytogenetic response in chronic phase CML patients treated with imatinib after failure of interferon alfa. *Leukemia* 2002;16:1579–83.
24. Branford S., Rudzki Z., Harper A. et al. Imatinib produces significantly superior molecular responses compared to interferon alfa plus cytarabine in patients with newly diagnosed chronic myeloid leukemia in chronic phase. *Leukemia* 2003;17:2401–9.
25. Wang L., Pearson K., Ferguson J.E. et al. The early molecular response to imatinib predicts cytogenetic and clinical outcome in chronic myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 2003;120: 990–9.
26. O'Brien S., Guilhot F., Larson R. et al. Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2003;348:994–1004.
27. Branford S., Rudzki Z., Walsh S. et al. Detection of BCR-ABL mutations in patients with CML treated with imatinib is virtually always accompanied by clinical resistance, and mutations in the ATP phosphate-binding loop (P-loop) are associated with a poor prognosis. *Blood* 2003;102:276–83.
28. Shah N., Nicoll J., Nagar B. et al. Multiple BCR-ABL kinase domain mutations confer polyclonal resistance to the tyrosine kinase inhibitor imatinib (STI571) in chronic phase and blast crisis chronic myeloid leukemia. *Cancer Cell* 2002;2:117–25.
29. Gambacorti-Passerini C., Gunby R., Piazza R. et al. Molecular mechanisms of resistance to imatinib in Philadelphia chromosome-positive leukaemias. *Lancet Oncol* 2003;4:75–85.
30. Kreil S., Mueller M., Hanfstein B. et al. Management and clinical outcome of CML patients after imatinib resistance associated with ABL kinase domain mutations. *Blood* 2003;102:71.
31. Shah N., Sawyers C. Mechanisms of resistance to STI571 in Philadelphia chromosome-associated leukemias. *Oncogene* 2003;22:7389–95.
32. Al-Ali H., Heinrich M., Lange T. et al. High incidence of BCR-ABL kinase domain mutations and absence of mutations of the PDGFR and KIT activation loops in CML patients with secondary resistance to imatinib. *Hematol J* 2004;5:55–60.
33. Hochhaus A., La Rosee P. Imatinib therapy in chronic myelogenous leukemia: strategies to avoid and overcome resistance. *Leukemia* 2004;18:1321–31.
34. Soverini S., Colarossi S., Gnani A. et al. Contribution of ABL kinase domain mutations to imatinib resistance in different subsets of Philadelphia-positive patients: by the GIMEMA Working Party on Chronic Myeloid Leukemia. *Clin Cancer Res* 2006;12(24):7374–9.
35. Branford S. Chronic myeloid leukemia: molecular monitoring in clinical practice. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2007:376–83.
36. Hughes T., Deininger M., Hochhaus A. et al. Monitoring CML patients responding to treatment with tyrosine kinase inhibitors: review and recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts and kinase domain mutations and for expressing results. *Blood* 2006;108(1):28–37.
37. Hochhaus A., Kreil S., Corbin A. et al. Molecular and chromosomal mechanisms of resistance to imatinib (STI571) therapy. *Leukemia* 2002;16:2190–6.
38. Roche-Lestienne C., Soenen-Cornu V., Grardel-Duflos N. et al. Several types of mutations of the Abl gene can be found in chronic myeloid leukemia patients resistant to STI571, and they can pre-exist to the onset of treatment. *Blood* 2002;100:1014–8.
39. Sattler M., Verma S., Shrikhande G. et al. The BCR/ABL tyrosine kinase induces production of reactive oxygen species in hematopoietic cells. *J Biol Chem* 2000;275(32):24273–8.
40. Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162(1):156–9.
41. Branford S., Rudzki Z., Parkinson I. et al. Real-time quantitative PCR analysis can be used as a primary screen to identify patients with CML treated with imatinib who have BCR-ABL kinase domain mutations. *Blood* 2004;104:2926–32.
42. Branford S., Hughes T. Diagnosis and monitoring of chronic myeloid leukemia by qualitative and quantitative RT-PCR. *Methods Mol Med* 2006;125:69–92.
43. Burgess M., Skaggs B., Shah N. et al. Comparative analysis of two clinically active BCR-ABL kinase inhibitors reveals the role of conformation-specific binding in resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:3395–400.
44. Corbin A., La Rose P., Stoffregen E. et al. Several BCR-ABL kinase domain mutants associated with imatinib mesylate resistance remain sensitive to imatinib. *Blood* 2003;101(11):4611–4.
45. O'Hare T., Eide C.A., Deininger M. Bcr-Abl kinase domain mutations, drug resistance, and the road to a cure for chronic myeloid leukemia. *Blood* 2007;110(7):2242–9.
46. O'Hare T., Walters D., Stoffregen E. et al. In vitro activity of Bcr-Abl inhibitors AMN107 and BMS-354825 against clinically relevant imatinib-resistant Abl kinase domain mutants. *Cancer Res* 2005;65:4500–5.
47. Gorre M., Mohammed M., Ellwood K. et al. Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science* 2001;293:876–80.