

# ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

Восточная  
Европа

www.lab.recipe.by

2017, том 6, № 2

## Беларусь

**Журнал зарегистрирован**  
Министерством информации  
Республики Беларусь 02.12.2011  
Регистрационное свидетельство № 1496

**Учредитель:**  
УП «Профессиональные издания»  
при участии Республиканского научного  
общества специалистов клинической  
лабораторной диагностики Беларуси

**Адрес редакции:**  
220049, Минск, ул. Кнорина, 17  
Тел.: +375 (17) 322 16 77, +375 (17) 322 16 78  
e-mail: lab@recipe.by

**Директор** Евтушенко Л.А.  
**Заместитель главного редактора** Игнатова С.С.  
**Руководитель службы рекламы  
и маркетинга** Коваль М.А.  
**Технический редактор** Нужин Д.В.

## Украина

**Журнал зарегистрирован**  
Государственной регистрационной  
службой Украины 02.12.2014  
Регистрационное свидетельство № 21184-10984ПР

**Учредители:**  
Национальная медицинская академия  
последипломного образования имени П.Л. Шупика  
УП «Профессиональные издания»

**Представительство в Украине:**  
ООО «Издательский дом  
"Профессиональные издания"»

**Контакты:** тел.: +38 (067) 363 65 05, (095) 091 24 50,  
e-mail: profidom@ukr.net

### Подписка

в каталоге РУП «Белпочта» (Беларусь):  
индивидуальный индекс 01389  
ведомственный индекс 013892  
в каталоге ОАО «Арзи» (Российская Федерация)  
индекс 01389

в каталоге АО «Казпочта» (Казахстан)  
индекс 01389

В Украине подписка оформляется через офис  
ООО «Издательский дом "Профессиональные издания"»

В электронных каталогах «Газеты и журналы»  
на сайтах агентств:

**01389** – единый индекс в электронных каталогах  
«Газеты и журналы» на сайтах агентств:  
ООО «Информнаука» (Российская Федерация),  
ЗАО «МК-Периодика» (Российская Федерация),  
ГП «Пресса» (Украина), ГП «Пошта Молдовей» (Молдова),  
АО «Летувос паштас» (Литва),  
ООО «Подписное агентство PKS» (Латвия),  
Фирма INDEX (Болгария), Kubon&Sagner (Германия)

Электронная версия журнала доступна  
на сайте lab.recipe.by, в Научной электронной  
библиотеке eLibrary.ru, в базе данных East View,  
в электронной библиотечной системе IPRbooks

По вопросам приобретения журнала обращайтесь  
в редакцию в Минске  
и представительство издательства в Киеве  
по тел.: +38 (067) 360 93 80

Журнал выходит 1 раз в 3 месяца.  
Цена свободная

Подписано в печать 13.06.2017.  
Тираж в Беларуси 1000 экз.  
Тираж в Украине 1500 экз.  
Заказ №

Формат 70x100 1/16. Печать офсетная

**Отпечатано** в типографии ОДО «Дивимакс»  
г. Минск, пр. Независимости, 58, корпус № 17  
Тел.: +375 (017) 233 92 06  
Лиц. № 02330/53 от 03.04.2009  
продлена 14.02.2014 № 22 до 03.04.2019

**Главный редактор** Камышников Владимир Семенович, д.м.н., профессор, заведующий кафедрой клинической лабораторной диагностики Белорусской медицинской академии последипломного образования

**Редакционная коллегия:**

Алехнович Л.И., к.м.н., доц. (Минск)  
Бадыгина Н.А., к.б.н. (Минск)  
Вергун О.М., к.б.н., доц. (Минск)  
Владимирская Т.Э., к.б.н. (Минск)  
Гусина Н.Б., к.м.н., доц. (Минск)  
Доценко Э.А., д.м.н., проф. (Минск)  
Дубровский А.Ч., к.м.н. (Минск)  
Качеровская Е.Р. (Минск)  
Коломиец Н.Д., д.м.н., проф. (Минск)  
Коневалова Н.Ю., д.б.н., проф. (Витебск)  
Костин Г.М., к.м.н., доц. (Минск)  
Костюк С.А., д.м.н., доц. (Минск)  
Кочетов А.Г., д.м.н. (Москва)  
Кузнецов О.Е., к.м.н., доц. (Гродно)  
Кузьменко А.Т., к.м.н., доц. (Минск)  
Лелевич В.В., д.м.н., проф. (Гродно)  
Ляликов С.А., д.м.н., проф. (Гродно)  
Новикова И.А., д.м.н., проф. (Гомель)  
Поталнев М.П., д.м.н., проф. (Минск)  
Прохорова В.И., д.м.н., проф. (Минск)  
Смирнова Л.А., д.м.н., проф. (Минск)  
Смолякова Р.М., д.б.н., доц. (Минск)  
Таганович А.Д., д.м.н., проф. (Минск)

**Главный редактор** Лунёва Анна Геннадьевна, д.м.н., профессор, заведующая кафедрой клинической лабораторной диагностики Национальной медицинской академии последипломного образования имени П.Л. Шупика, президент Всеукраинской ассоциации клинической химии и лабораторной медицины

**Редакционная коллегия:**

Бодня Е.И., д.м.н., проф. (Харьков)  
Воронцова Л.Л., д.м.н., проф. (Запорожье)  
Вьюницкая Л.В., к.б.н., доц. (Киев)  
Гавриленко Т.И., д.б.н., проф. (Киев)  
Ермоленко Т.А., д.м.н., проф. (Одесса)  
Завадецкая Е.П., к.м.н., доц. (Киев)  
Зяблицев С.В., д.м.н., проф. (Донецк)  
Игнатъев А.М., д.м.н., проф. (Одесса)  
Клименко С.В., д.м.н., проф. (Киев)  
Клищ И.Н., д.б.н., проф. (Тернополь)  
Криницкая И.Я., д.м.н., проф. (Тернополь)  
Лаповец Л.Е., д.м.н., проф. (Львов)  
Леонтьева Ф.С., к.б.н. (Харьков)  
Липкан Г.Н., д.м.н., проф. (Киев)  
Магомедов А.М., проф. (Киев)  
Мацегора Н.А., д.м.н., проф. (Одесса)  
Медведева И.М., к.м.н. (Сумы)  
Олейник Е.А., к.м.н., доц. (Киев)  
Проценко В.Н., к.м.н., доц. (Харьков)  
Ткач Ю.И., д.м.н., проф. (Харьков)  
Хейломский А.Б. (Киев)  
Шахнин Д.Б., к.х.н. (Киев)  
Якимова Т.П., д.м.н., доц. (Харьков)  
Ястремська О.О., к.м.н., доц. (Львов)

**Рецензируемое издание**

Входит в Перечень научных изданий Республики Беларусь для опубликования результатов диссертационных исследований. Решение коллегии ВАК от 24.10.2012 (протокол № 06-18/2).

Научные статьи, опубликованные в журнале, для украинских соискателей ученых степеней на основании приказа МОНмолодьспорта Украины от 17.10.2012 № 1112 приравниваются к зарубежным публикациям.

Ответственность за точность приведенных фактов, цитат, собственных имен и прочих сведений, а также за разглашение закрытой информации несут авторы.

Редакция может публиковать статьи в порядке обсуждения, не разделяя точки зрения автора

International scientific journal  
**LABORATORY**  
diagnostics

Eastern Europe

Laboratornaya diagnostika. Vostochnaya Evropa

www.lab.recipe.by

**2017, volume 6, № 2**

## Belarus

**The journal is registered**  
in the Ministry of information of the Republic of  
Belarus 02.12.2011  
Registration certificate № 1496

**Founders:**  
UE "Professional Editions" with the participation of  
the Republican scientific society of experts of the  
clinical laboratory diagnostics of Belarus

**Address of the editorial office:**  
220049, Minsk, Knorin str., 17.  
Phone: +375 (17) 322 16 77, +375 (17) 322 16 78,  
e-mail: lab@recipe.by

**Director** Evtushenko L.  
**Deputy editor-in-chief** Ignatova S.  
**Head of advertising and marketing** Koval M.  
**Technical editor** Nuzhyn D.

## Ukraine

**The journal is registered**  
at the State registry of Ukraine 02.12.2014  
Registration certificate № 21184-10984PR

**Founder:**  
Shupyk National Medical Academy  
of Postgraduate Education  
UE "Professional Editions"

**Representative Office in Ukraine:**  
LLC "Publishing house «Professional Edition»"

**Contacts:**  
phone: +38 (067) 363 65 05, (095) 091 24 50,  
e-mail: profidom@ukr.net

## Subscription Belarus:

in the Republican unitary enterprise "Belposhta"  
individual index – 01389  
departmental index – 013892

in catalogue JSC "ARZI" (Russian Federation)  
index 01389

in JSC "Kazpochta" catalogue (Kazakhstan)  
index 01389

In Ukraine the subscription is made out through office  
LLC "Publishing house «Professional Edition»"

Index **01389** in the electronic catalogs "Newspapers  
and Magazines" on web-sites of agencies:  
LLC "Interpochta-2003" (Russian Federation);  
LLC "Informnauka" (Russian Federation);  
JSC "MK-Periodika" (Russian Federation);  
SE "Press" (Ukraine); SE "Poshta Moldovey" (Moldova);  
JSC "Letuvos pashtas" (Lithuania);  
LLC "Subscription Agency PKS" (Latvia);  
INDEX Firm agency (Bulgaria);  
Kubon&Sagner (Germany)

The electronic version of the journal  
is available on lab.recipe.by,  
on the Scientific electronic library elibrary.ru,  
in the East View database, in the electronic  
library system IPRbooks

Concerning acquisition of the journal address  
to the editorial office in Minsk  
and publishing house representation in Kyiv  
phone: +38 (067) 360 93 80

The frequency of journal is 1 time in 3 months.  
The price is not fixed.

Sent for the press 13.06.2017.  
Circulation in Belarus is 1000 copies  
Circulation in Ukraine is 1500 copies  
Order №

Format 70x100 1/16. Litho

**Printed** in printing house ALC "Divimax"  
Minsk, Nezavisimosti ave., 58, building № 17  
Phone: +375 (017) 233 92 06  
License № 02330/53 from 03.04.2009  
was extended 14.02.2014 № 22 до 03.04.2019

## Belarus

## Ukraine

**Editor-in-chief** Kamyshnikov Vladimir,  
Prof., Full Doctor, head of Clinical Laboratory Diagnostics department of Belarusian Medical Academy of Post-Graduate Education

### Editorial council:

Alekhnovich L., Assoc. Prof., M.D. (Minsk)  
Badygina N., PhD (biol.) (Minsk)  
Dotsenko E., Prof., Full Doctor (Minsk)  
Dubrovsky A., M.D. (Minsk)  
Gusina N., M.D. (Minsk)  
Kacherovskaya E. (Minsk)  
Kochetov A., Full Doctor (Moscow)  
Kolomiets N., Prof., Full Doctor (Minsk)  
Konevalova N., Prof., Dr.Sci. (biol.) (Vitebsk)  
Kostin G., Assoc. Prof., M.D. (Minsk)  
Kostyuk S., Assoc. Prof., Full Doctor (Minsk)  
Kuzmenko A., Assoc. Prof., M.D. (Minsk)  
Kuznetsov O., M.D. (Grodno)  
Lelevich V., Prof., Full Doctor (Grodno)  
Lyalikov S., Prof., Full Doctor (Grodno)  
Novikova I., Prof., Full Doctor (Gomel)  
Potapnev M., Prof., Full Doctor (Minsk)  
Prokhorova V., Prof., Full Doctor (Minsk)  
Smirnova L., Prof., Full Doctor (Minsk)  
Smolyakova R., Dr.Sci. (biol.) (Minsk)  
Taganovich A., Prof., Full Doctor (Minsk)  
Vergun O., PhD (biol.) (Minsk)  
Vladimirskaya T., PhD (biol.) (Minsk)

**Editor-in-chief** Lunova Ganna,  
Prof., Full Doctor, head of Clinical Laboratory Diagnostics department of Shupyk National Medical Academy of Post-Graduate Education, President of Ukrainian association of clinical chemistry and laboratory medicine

### Editorial council:

Bodnya E., Prof., Full Doctor (Kharkiv)  
Ermolenko T., Prof., Full Doctor (Odessa)  
Gavrilenko T., Prof., Dr.Sci. (biol.) (Kyiv)  
Ignatyev A., Prof., Full Doctor (Odessa)  
Kheilomskyi A. (Kyiv)  
Klimenko S., Prof., Full Doctor (Kyiv)  
Klishch M., Prof., Dr.Sci. (biol.) (Ternopil)  
Krinitckaya I., Prof., Full Doctor (Ternopil)  
Lapovets L., Prof., Full Doctor (Lviv)  
Leont'eva F., PhD (biol.) (Kharkiv)  
Lipkan G., Prof., Full Doctor (Kyiv)  
Magomedov A., Prof. (Kyiv)  
Matsegora N., Prof., Full Doctor (Odessa)  
Medvedeva I., M.D. (Sumy)  
Oliyynyk E., Assoc. Prof., M.D. (Kyiv)  
Protsenko V., Assoc. Prof., M.D. (Kharkiv)  
Tkach Yu., Prof., Full Doctor (Kharkiv)  
Shakhnin D., Dr.Sci. (chem.) (Kyiv)  
Vorontsova L., Prof., Full Doctor (Zaporizhia)  
Vyyunitskaya L., Assoc. Prof., PhD (biol.) (Kyiv)  
Yakimova T., Prof., Full Doctor (Kharkiv)  
Yastremska O., Assoc. Prof., M.D. (Lviv)  
Zavadetskaya E., Assoc. Prof., M.D. (Kyiv)  
Zyablitshev S., Prof., Full Doctor (Donetsk)

### Peer-reviewed edition

The journal is included into a List of scientific publications of the Republic of Belarus for the publication of the results of the dissertation research. HCC board decision of 12.10.2012 (protocol № 06-18/2).

Scientific articles published in the journal for Ukrainian applicants of academic degrees on the basis of the order of Ministry of Education and Science, Youth and Sports of Ukraine from 17.10.2012 № 1112 are equated to foreign publications.

Responsibility for the accuracy of the given facts, quotes, own names and other data, and also for disclosure of the classified information authors bear.

Editorial staff can publish articles as discussion, without sharing the point of view of the author

Уважаемые читатели!

В этом номере журнала содержатся статьи, отражающие как новые аспекты развития научной специальности «клиническая лабораторная диагностика», так и предлагаемые их авторами пути решения ряда актуальных проблем, возникших вследствие происходящего в последнее время в системе клинической лабораторной службы бурного научно-технического прогресса. В этой связи невольно привлекает внимание статья наших коллег из Республики Татарстан, поделившихся приобретенным ими, заслуживающим большого внимания опытом внедрения разработанной системы менеджмента качества при выполнении химико-токсикологических исследований в деятельность республиканского бюро судебно-медицинской экспертизы. Подтверждением актуальности данной проблемы служит и статья из Украины, посвященная значению лабораторных исследований в судебно-медицинской экспертизе.

Все более широкое внедрение новых, весьма информативных молекулярно-биологических технологий лабораторного исследования в практику диагностики инфекционных заболеваний открыло перспективу создания иммунобиологических препаратов на принципиально ином уровне, позволяющем вакцинировать не популяцию людей против какой-то определенной болезни, а конкретного человека в популяции с учетом индивидуальных иммунобиологических особенностей его организма, т.е. реализовать принцип персонализированной медицины.

Из содержания ряда опубликованных статей также следует, что для объективного суждения о частоте встречаемости отдельных проявлений метаболизма, а также об оценке динамики заболеваемости разными видами инфекции с использованием высокотехнологичных методов исследования требуется их стандартизация и унификация.

В связи с прошедшим в июне 2017 г. Всемирным днем донора крови заслуживает особого внимания и статья о встречаемости у доноров крови ДНК вирусов TTV и ENV, для выявления которых предложен апробированный авторами метод, основанный на использовании полимеразной цепной реакции.

Несомненно, большой интерес у читателей вызовет статья о механизмах, определяющих скорость оседания эритроцитов, и о причинах, обуславливающих ее изменение.

В ряде статей затронуты также новые аспекты клинико-лабораторных исследований.

Хочется думать, что ознакомление специалистов в области лабораторной медицины с материалом этого номера журнала окажется весьма полезным и будет способствовать дальнейшему совершенствованию организации и развитию клинико-лабораторной службы.

Главный редактор в Беларуси  
Камышников Владимир Семенович



**Оригинальные исследования**

Влияние иммуномодулирующего препарата двуспиральной рибонуклеиновой кислоты дрожжей на показатели клеточного иммунитета у пациентов с хроническим вирусным гепатитом В, протекающим на фоне хронического бескаменного холецистита  
*Елизарова Т.А., Кузнецова Л.В., Литус В.И.* ..... 161

Изменение концентрации эозинофильного катионного белка у пациентов с хроническим гепатитом В до и после традиционного лечения с использованием иммуномодулирующего препарата  
*Елизарова Т.А., Кузнецова Л.В., Литус В.И.* ..... 168

Алгоритм прогнозирования и диагностики внутрижелудочковых кровоизлияний у доношенных новорожденных детей  
*Леонова Е.Ю., Сержан Т.А., Артюшевская М.В., Чура А.Н.* ..... 174

**Практикующему врачу**

Ассоциированный с беременностью протеин-А плазмы – новый биомаркер дестабилизации атеросклеротической бляшки, предиктор осложненного течения острого коронарного синдрома  
*Камышников В.С., Яковлев-Малых Н.Н.* ..184

Липопротеин-ассоциированная и секреторная фосфолипазы А<sub>2</sub>: особенности метаболического влияния и клиническая значимость исследования  
*Камышников В.С., Литвинко Н.М., Пехтерева Н.В., Яковлев-Малых Н.Н., Юрага Т.М.* ..... 196

Клинико-диагностическое значение скорости оседания эритроцитов  
*Федорова Т.Т., Лунёва А.Г., Олейник Е.А., Кривенко Е.А., Завадецкая Е.П.* ..... 207

**Организация выполнения лабораторных исследований**

Пути оптимизации стратегии создания иммунобиологических препаратов на основе программно-целевого планирования  
*Владыко А.С., Фомина Е.Г., Счесленок Е.П., Семижон П.А., Лущик А.Я., Дормешкин Д.О., Гилеп А.А.* ..... 213

Значение лабораторных исследований в судебно-медицинской экспертизе дорожно-транспортных происшествий  
*Плевинскис П.В.* ..... 218

#### **Высокотехнологические лабораторные исследования**

Состояние про/антиоксидантной системы крови у реципиентов почечного аллотрансплантата  
*Петренко Т.С., Новикова И.А., Зыблев С.Л., Дундаров З.А., Зыблева С.В.* ..... 224

Поиск циркулирующих опухолевых клеток: итоги и перспективы  
*Шляхтунов Е.А., Семенов В.М., Савченко А.В.* ..... 232

Метод количественной оценки химерного онкогена NPM1-ALK с использованием ПЦР в реальном времени для диагностики минимальной диссеминированной и минимальной остаточной болезни при анапластической крупноклеточной лимфоме у детей  
*Стёганцева М.В., Фёдорова А.С.* ..... 247

#### **Микробиология и вирусология**

Анализ заболеваемости урогенитальной хламидийной инфекцией

в Республике Беларусь за период 2001–2015 гг.  
*Рубаник Л.В., Шиманович В.П., Глинская И.Н., Зданович А.В., Полещук Н.Н.* ..... 257

Выявление ДНК вирусов TTV и SENV у пациентов с заболеваниями печени и доноров крови  
*Мицура В.М., Воропаев Е.В., Осипкина О.В., Терешков Д.В., Змушко М.Н., Скуратов А.Г., Фомченко Н.Е., Воропаева А.Е.* ..... 266

#### **Химико-токсикологические исследования**

Опыт применения процессного подхода при организации и проведении химико-токсикологических исследований в Государственном автономном учреждении здравоохранения «Республиканское бюро судебно-медицинской экспертизы Министерства здравоохранения Республики Татарстан»  
*Низамов А.Х., Шашин С.Л., Газизянова Р.М., Тимерзянов М.И.* ..... 276

Прерывистая морфиновая интоксикация изменяет метаболизм незаменимых аминокислот и аргинина в тимусе  
*Шейбак В.М., Павлюковец А.Ю., Лелевич В.В., Лелевич С.В., Смирнов В.Ю.* ..... 282

**Original researches**

Influence of immunomodulation preparation of double-helical ribonucleic acid of yeasts on the indices of cellular immunity in patients with chronic viral hepatitis B on the background of chronic acalculous cholecystitis  
*Yelizarova T., Kuznetsova L., Litus V.* ..... 161

The study of the amount of eosinophilic cationic protein in patients with chronic hepatitis B before and after traditional treatment using an immunomodulating drug  
*Yelizarova T., Kuznetsova L., Litus V.* ..... 168

A new choice in the diagnostics of intraventricular hemorrhage in full-term infants  
*Leonava K., Serzhan T., Artsiusheuskaya M., Chura A.* ..... 174

**To the practitioner**

Protein-A of plasma associated with pregnancy is a new biomarker of destabilization of atherosclerotic plaque, predictor of a complicated course of acute coronary syndrome  
*Kamyshnikov V., Yakovlev-Malykh N.* ..... 184

Lipoprotein-associated and secretory phospholipase A<sub>2</sub>: features of metabolic influence and clinical significance of research  
*Kamyshnikov V., Litvinko N., Pekhtereva N., Yakovlev-Malykh N., Yuraga T.* ..... 196

Clinical diagnostic significance of erythrocyte sedimentation rate (ESR)  
*Fedorova T., Lunova A., Oliylyk E., Kryvenko E., Zavadetska E.* ..... 207

**Organization of laboratory researches**

Ways of optimization of the strategy of creation of immunobiological preparations on the base of program-target planning  
*Vladyko A., Fomina E., Scheslenok E., Semizhon P., Lushchik A., Dormeshkin D., Gilep A.* ..... 213

Importance of laboratory analysis in forensic-medical examination of modern traffic accidents  
*Pleninskis P.* ..... 218

**High-tech laboratory testing**

The state of pro/antioxidant system of blood in recipients of renal allograft  
*Petrenko T., Novikova I., Zyblev S., Dundarov Z., Zybleva S.* ..... 224

Search of circulating tumor cells: results and prospects  
*Shlyakhtunou Y., Semenov V., Savchenko A.* ..... 232

Method of quantitative assessment of chimeric oncogene NPM1-ALK using real-time PCR to diagnose the minimal disseminated and minimal residual disease in anaplastic large-cell lymphoma in children  
*Stegantseva M., Fedorova A.* ..... 247

**Microbiology and virology**

Analysis of the incidence of urogenital chlamydia infection in Belarus for the period 2001–2015 years  
*Rubanik L., Shimanovich V., Glinskaya I., Zdanovich A., Poleshchuk N.* ..... 257

Detection of DNA of TT and SEN viruses in patients with liver diseases and blood donors  
*Mitsura V., Voropaev E., Osipkina O., Tereshkov D., Zmushko M., Skuratau A., Fomchenko N., Voropaeva A.* ..... 266

**Chemical and toxicological researches**

Experience of use of process approach in organization and conducting chemical and toxicological studies in the State Autonomous Institution of Health Care “Republican Bureau of Forensic Medicine of the Ministry of Health of the Republic of Tatarstan”  
*Nizamov A., Shashin S., Gazizyanova R., Timerzyanov M.* ..... 276

Intermittent morphine intoxication alters the metabolism of essential amino acids and arginine in the thymus  
*Sheibak V., Pauliukavets A., Lelevich V., Lelevich S., Smirnov V.* ..... 282

УДК 616.411-006.441/.65:575.113.4]-07:577.21-053.2

Стёганцева М.В., Фёдорова А.С.  
Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии  
и иммунологии, Минск, Беларусь

Stegantseva M., Fedorova A.  
Belarusian Research Center of Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, Minsk, Belarus

## Метод количественной оценки химерного онкогена NPM1-ALK с использованием ПЦР в реальном времени для диагностики минимальной диссеминированной и минимальной остаточной болезни при анапластической крупноклеточной лимфоме у детей

Method of quantitative assessment of chimeric oncogene NPM1-ALK using real-time PCR to diagnose the minimal disseminated and minimal residual disease in anaplastic large-cell lymphoma in children

---

### Резюме

На сегодняшний день доказано неблагоприятное прогностическое значение выявления минимальной диссеминированной (МДБ) и минимальной остаточной болезни (МОБ) при анапластической крупноклеточной лимфоме (АККЛ) у детей. Однако данный анализ затруднен во многих лабораториях в связи с отсутствием количественных стандартов для полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ). В данной статье представлено исследование по разработке метода количественного анализа химерного онкогена NPM1-ALK методом ПЦР-РВ. Определена специфичность и чувствительность метода. Приведен пример клинического случая, где разработанный метод использовался для мониторинга МДБ/МОБ.

**Ключевые слова:** анапластическая крупноклеточная лимфома, химерный онкоген NPM1-ALK, минимальная диссеминированная болезнь, минимальная остаточная болезнь.

---

### Abstract

Today there is proved the unfavorable prognostic significance of detection of minimal disseminated (MDD) and minimal residual disease (MRD) in children with anaplastic large cell lymphoma (ACCL). However, this analysis is difficult in many laboratories because of the absence of quantitative standards for real-time polymerase chain reaction (RT-PCR). In this article, we present the method for

quantitative analysis of a chimeric oncogene NPM1-ALK with the RT-PCR. Specificity and sensitivity of the method were determined. An example of clinical case was discussed in order to demonstrate the developed method for MDD/MRD monitoring.

**Keywords:** anaplastic large cell lymphoma, chimeric oncogene NPM1-ALK, minimal disseminated disease, minimal residual disease.

---

## ■ ВВЕДЕНИЕ

Неходжкинские лимфомы составляют около 6% в структуре детского рака и являются на сегодняшний день одними из самых курабельных онкологических заболеваний у детей. Использование современных программ полихимиотерапии (ПХТ) позволяет вылечить 70–90% пациентов в зависимости от стадии и морфологического варианта [1–5]. В то же время результаты лечения рецидивов остаются неудовлетворительными, выживаемость детей после возврата болезни не превышает 20% [6].

Анапластическая крупноклеточная лимфома (АККЛ) составляет 10–15% в структуре неходжкинских лимфом у детей. Полная ремиссия достигается у подавляющего большинства пациентов при использовании различных схем ПХТ умеренной интенсивности, однако частота рецидивов остается чрезвычайно высокой и составляет 25–30% [5, 7, 8]. Поэтому поиск ранних предикторов развития рецидива для этого заболевания является крайне актуальным.

Известно, что патогенетическими для развития АККЛ являются транслокации с вовлечением гена, кодирующего рецептор тирозинкиназы анапластической лимфомы (ALK) [9]. Мутации этого гена играют ключевую роль в лимфомагенезе, вызывая аномальное фосфорилирование внутриклеточных структур и приводя к неконтролируемой пролиферации лимфоидных клеток. Более чем в 80% случаев АККЛ у детей выявляется транслокация t(2;5)(p23;q35), в результате которой происходит слияние гена нуклеофосмина (NPM1) с геном ALK с образованием химерного онкогена NPM1-ALK [9, 10]. Данный химерный онкоген может служить специфическим маркером для определения диссеминированных в костном мозге или циркулирующих в крови клеток АККЛ (так называемой минимальной диссеминированной болезни (МДБ)), а также для оценки их клиренса во время лечения или после его окончания (так называемой минимальной остаточной болезни (МОБ)).

При морфологическом исследовании костного мозга (КМ) клетки АККЛ выявляются лишь в 5–10% случаев. Иммуногистохимическое исследование и FISH-анализ позволяют выявить CD30+ или ALK+ клетки при субмикроскопическом поражении КМ, однако чувствительность этих методов не превышает  $10^{-2}$ – $10^{-3}$  [11]. Оптимальным для определения МДБ является метод полимеразной цепной реакции (ПЦР), в частности гнездная ПЦР, которая быстро и с высокой специфичностью выявляет наличие химерного транскрипта в опухолевых клетках [12].

Чувствительность метода составляет  $10^{-5}$ – $10^{-6}$ . Для анализа МОБ преимущественными являются количественные методы, позволяющие оценить скорость и степень элиминации NPM1-ALK-позитивных клеток из крови и костного мозга. Так, например, может быть использована полуколичественная ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ), основанная на применении TaqMan-проб. Недостатком этого метода является отсутствие информации об инициальном количестве NPM1-ALK-экспрессирующих клеток.

В настоящее время доказано неблагоприятное прогностическое значение выявления МДБ и МОБ при АККЛ у детей. Согласно результатам наиболее крупного из проведенных исследований, показатели 5-летней общей выживаемости (ОВ) и бессобытийной выживаемости (БСВ) для 180 педиатрических пациентов с АККЛ составили 84% и 65% соответственно, частота рецидивов – 32%. Методом ПЦР в реальном времени МДБ была выявлена у 57% пациентов (частота рецидивов у этих пациентов составила 46%, а 5-летняя БСВ – 51%). Детектируемая МОБ перед вторым курсом ПХТ являлась самым весомым независимым фактором неблагоприятного прогноза (5-летняя ОВ у МОБ-позитивных пациентов составила 65% против 91% у МОБ-негативных). Частота рецидивов составила 81% в группе МДБ/МРБ-позитивных пациентов, 31% в группе МДБ-позитивных/МРБ-негативных пациентов и 15% в группе МДБ/МОБ-негативных пациентов. Результаты исследования других авторов также однозначно свидетельствуют о клинической целесообразности оценки МДБ/МОБ [13–15].

На сегодняшний день определение МДБ и МОБ при АККЛ затруднено по причине отсутствия стандартов для количественной ПЦР.

## ■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Получить количественные стандарты для химерного онкогена NPM1-ALK и разработать лабораторный метод для количественной оценки МДБ и МОБ у детей с АККЛ.

## ■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### **Получение ДНК-стандарта химерного онкогена NPM1-ALK и его серийных разведений**

Для создания стандартов была применена методика клонирования ДНК-последовательности химерного онкогена NPM1-ALK от пациента с АККЛ.

ПЦР-продукт с мишенью NPM1-ALK очищали в агарозном геле, а затем экстрагировали из геля набором QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, США). Концентрацию очищенного продукта устанавливали методом электрофореза в 2%-ном агарозном геле с использованием маркера молекулярного веса Gene Ruler 1Kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, США). Лигирование вектора, содержащего требуемую последовательность NPM1-ALK, проводили с использованием набора Rapid DNA Ligation & Transformation Kit (Fermentas, Литва) согласно прилагаемой инструкции. В качестве вектора использовали плазмиду pTZ57R/T. Соединение ДНК вставки с вектором осуществляли по TA-концам. Соотношение концентраций вставка/вектор определяли с помощью программы Ligation Calculator ([http://www.insilico.uni-duesseldorf.de/Lig\\_Input.html](http://www.insilico.uni-duesseldorf.de/Lig_Input.html)). Реакция лигирования протекала при +4 °С на ночь.

Трансформацию проводили кальций-хладовым методом. Специфичность ДНК-вставки проверяли при помощи ПЦР реакции, также методом секвенирования проверяли идентичность нуклеотидной последовательности вставки с референсной последовательностью, указанной в базе данных Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>).

Плазмиды из клеток *E. coli* выделяли с использованием набора GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Qiagen, США). Выделенные плазмиды линеаризировали посредством рестрикции с ферментом EcoRI (Fermentas, Литва). Реакция протекала при 37 °С в течение 90 минут в объеме 10 мкл.

Продукт рестрикции разгоняли в агарозном геле для определения концентрации выделенных плазмид. Используя полученную концентрацию (нг/мкл) и известный размер вектора (пары оснований) определяли количество копий в мкл раствора при помощи Calculator for determining the number of copies of a template (<http://cels.uri.edu/gsc/cndna.html>). Далее получали серийные разведения линеаризованной плазмидной ДНК, содержащей соответствующие вставки NPM1-ALK, с шагом в 10 раз ( $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ ), которые непосредственно служили стандартом для количественной ПЦР.

#### **ПЦР в режиме реального времени для количественного определения NPM1-ALK и оценки МОБ**

Образец биоматериала пациента обрабатывали в соответствии с общепринятыми методиками для выделения РНК и получения кДНК [16, 17]. Реакционную смесь для ПЦР готовили согласно данным, представленным в табл. 1. Использовали последовательности праймеров: прямой – 5'-CAGTGCATATTAGTGGACAGCACTTAG-3', обратный – 5'-TGATGGTTCG AGGTGCGGA-3' и гидролизующий зонд – 5'-FAM-CACCAGGAGCTGCAAGCCATGCA-BHQ1-3'.

В каждую ПЦР обязательно включали отрицательные контроли (NTC-деионизированную воду и NAC-амплификационный контроль, представляющий собой заведомо отрицательную матрицу), пробы пациентов ставились в триплетах.

Для минимизации возможных неточностей в процессе пипетирования, выделения РНК, обратной транскрипции и прочего экспериментом предусматривалась нормализация по референсному гену. В качестве референсного гена использовался ген β-глюкуронидазы GUS (ipsogen GUS Control Gene Standards, Qiagen). Таким образом, для каждой постановки ПЦР включались серийные разведения стандартов химерного гена NPM-ALK (концентрации  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^5$  копий) и стандартов референсного гена GUS (концентрации  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$  копий).

**Таблица 1**  
**Приготовление ПЦР-смеси**

Компонент	Объем на 1 реакцию, мкл
TaqMan2xPCR Master Mix (Life Technologies, США)	12,5
Праймеры и проба, 100 пмоль/мкл	1,25
Вода	6,25
кДНК пациента	5

Принцип измерения МОБ основывался на методе, описанном в статье авторами J. Gabert et al. [18].

Согласно схеме эксперимента в лунки 96-луночного ПЦР планшета последовательно вносилась реакционная смесь – 20 мкл, затем кДНК пациента – 5 мкл, в последнюю очередь стандарты химерного и референсного гена – 5 мкл. Планшет герметично покрывался соответствующими оптическими крышками или пленкой. Планшет центрифугировали в течение минуты для осаждения компонентов, затем загружали в ПЦР-блок амплификатора CFX96 (Bio-Rad). ПЦР протокол включал следующие этапы: 50 °С – 2 мин, 95 °С – 10 мин, 95 °С – 15 сек, 60 °С – 1 мин.

После выполнения ПЦР-анализа оценивались кривые флюоресценции. Вручную устанавливали значение Baseline Threshold, равное 30.

Критерии отрицательного/положительного результата:

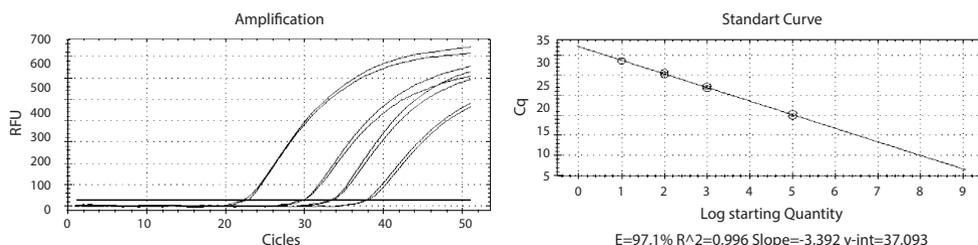
- положительным считается образец с S-образной кривой амплификации (логарифмическая шкала) и значением Ct ниже значения Ct, равного y-intercept стандартной кривой + один Ct;
- если одна из лунок в триплете имеет положительное значение, результат считается отрицательным;
- ложноотрицательным результат считается, если позитивная кДНК имеет амплификацию менее чем в 50% лунок (0/2, 0/3, 1/3);
- если одна из лунок в триплете имеет отрицательное значение, результат считается положительным;
- ложноположительным результат считается, если отрицательный образец проходит по крайней мере в 50% лунок (1/2, 2/3, 3/3);
- наличие амплификации в NAC и/или NTC контролях свидетельствует о контаминации. В таком случае положительным считается образец, значение Ct которого меньше, чем в контроле.

Критерии количественного анализа:

- разница показателей Ct образцов в дубле не более 0,5;
- показатели Ct контрольного гена в диапазоне 20–26 циклов;
- количество копий контрольного гена должно быть не менее 103.

Образцы, которые удовлетворяли данным требованиям, в дальнейшем анализировались (рис. 1).

Абсолютное количество копий (CN – copy number) искомого гена и референсного гена автоматически рассчитывалось программным обеспечением амплификатора в соответствии с калибровочными кривыми.



**Рис. 1. Амплификационные кривые разведений стандартов химерного онкогена NPM-ALK (10<sup>1</sup>, 10<sup>2</sup>, 10<sup>3</sup>, 10<sup>5</sup>)**

Подсчет нормализованного количества копий (NCN – normalized copy number) производился по следующей формуле:

$$\text{NCN (NPM1-ALK)} = \text{CN (NPM1-ALK)} / \text{CN (GUS)}$$

Для записи результата МДБ и МОБ используется значение количества копий NPM1-ALK на  $10^4$  копий GUS. Для отслеживания динамики МОБ сравнивались показатели NCN (NPM1-ALK) образцов биоматериала, взятые в разные дни терапии, по сравнению с NCN (NPM1-ALK) в первичной точке (день 1, при диагностике до лечения заболевания), которое приравнивалось к 100%. Таким образом, получали значение МОБ (%) на этапе терапии (день X):

$$\text{МОБ, \%} = \text{NCN (NPM1-ALK)}_{\text{день X}} / \text{NCN (NPM1-ALK)}_{\text{день 1}} \times 100\%$$

Результат исследования МОБ при использовании в расчетах логарифмической шкалы может быть выражен также в натуральном виде числа.

### Характеристики метода

Аналитическая чувствительность метода определялась в серийных разведениях клеточной линии Каграс 299 (полученной от пациента с АККЛ и позитивной по NPM1-ALK гену). Предлагаемый метод определения МОБ детектирует менее 10 NPM1-ALK-позитивных клеток на  $10^6$  контрольных негативных клеток, демонстрируя чувствительность  $10^{-5}$  на клеточном уровне.

Диагностическая чувствительность описываемого теста была оценена путем тестирования образцов биоматериала от 47 пациентов с диагнозом АККЛ, установленным на основании морфологических и иммунологических критериев классификации ВОЗ [19]. Поскольку все протестированные образцы показали положительные результаты (при этом ложноположительных случаев в протестированных контролях не было), диагностическая чувствительность метода составила 100%, что позволяет использовать данный метод в клинической практике.

Таблица 2

Амплификационные характеристики стандартной кривой по гену NPM1-ALK

№	Показатель			
	Эффективность, %	Коэффициент, R2	Угол наклона	Интерсепт
1	87,6	0,992	-3,659	39,936
2	88,5	0,996	-3,632	40,631
3	89,8	0,977	-3,595	39,187
4	88,8	0,996	-3,622	39,066
5	85,0	0,991	-3,743	40,079
6	85,7	0,995	-3,722	40,366
7	89,1	0,985	-3,616	39,945
8	89,1	0,985	-3,616	39,945
Среднее значение	87,95	0,99	-3,65	39,89
Коэффициент вариации, %	1,97	0,68	1,48	1,33

Оценка диагностической специфичности предложенного теста, осуществленная с использованием NPM1-ALK-негативных мононуклеаров периферической крови, выявила полное отсутствие ложноположительных результатов, в силу чего она составила 100%.

Стабильность полученных стандартов NPM1-ALK была оценена по результатам проведения 8 постановок ПЦР в реальном времени тремя разными лаборантами (табл. 2).

Согласно данным табл. 3, основные критерии качества амплификации соблюдены: показатель  $R^2$  для стандартной кривой составляет 0,99 и превосходит необходимый уровень в 0,95. Угол наклона лежит в промежутке  $-3,1$  и  $-3,65$ , и эффективность во всех случаях составляет более 85%.

## ■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты экспериментов по воспроизводимости метода внутри одной серии (N=20) и между сериями (N=20) приведены в табл. 3. Коэффициент вариации для внутри- и межсерийных измерений для показателя Ct был менее 5%. При этом число копий при 20-кратных измерениях внутри серии также не сильно варьировало – коэффициент вариации

**Таблица 3**  
**Воспроизводимость метода внутри серии и между сериями**

№	Внутри серии		Между сериями	
	Ct	Число копий	Ct	Число копий
1	24,21	2,61E+04	24,07	2,48E+04
2	24,43	2,22E+04	23,82	2,90E+04
3	24,93	1,56E+04	23,86	2,25E+04
4	24,29	2,46E+04	20,27	–
5	24,52	2,08E+04	24,26	3,15E+04
6	24,34	2,38E+04	24,2	2,66E+04
7	24,35	2,35E+04	24,33	2,84E+04
8	24,56	2,03E+04	24,32	3,09E+04
9	24,3	2,44E+04	24,2	2,91E+04
10	24,57	2,01E+04	24,17	2,81E+04
11	24,53	2,07E+04	23,54	4,36E+04
12	24,47	2,16E+04	24,21	2,69E+04
13	24,22	2,58E+04	24,16	4,01E+04
14	24,28	2,47E+04	23,99	4,19E+04
15	24,27	2,49E+04	24,44	3,19E+04
16	24,1	2,82E+04	24,24	4,18E+04
17	24,08	2,87E+04	24,37	–
18	24,45	2,19E+04	24,32	3,89E+04
19	24,12	2,78E+04	24,32	3,10E+04
20	24,35	2,35E+04	24,21	–
Среднее значение	24,37	2,34E+04	23,965	6,40E+04
Коэффициент вариации, %	0,79	13,22	3,64	19,75

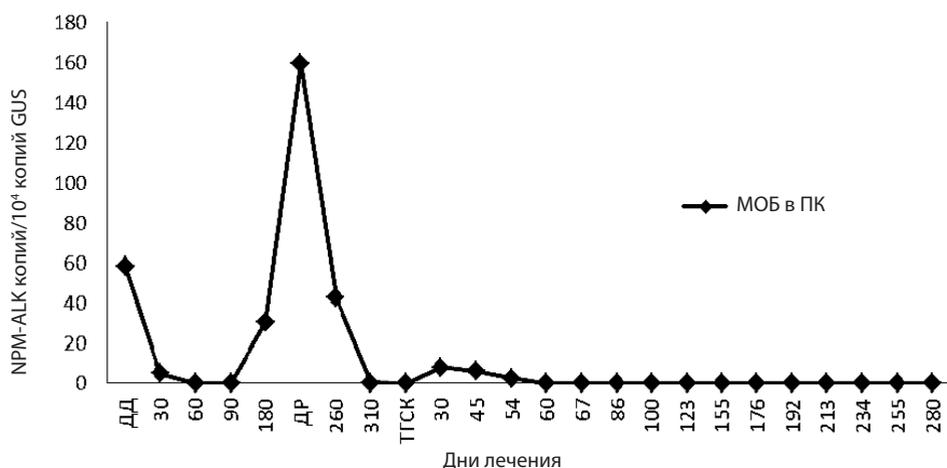
составил 13,22%, что является удовлетворительным и клинически приемлемым. Однако межсерийные измерения показали большую вариабельность при подсчете числа копий – 19,75%. Тем не менее данный факт, отмеченный многими исследователями, имеет место при всех измерениях абсолютного числа копий с помощью количественной ПЦР, особенно в области низких концентраций искомым мишеней. Основной причиной этого являются неточности пипетирования микрообъемов, поскольку количество вносимой в реакцию пробы составляет микроколичества. Именно поэтому в исследованиях, аналогичных выполненным нами, применяется технология нормализации по референсному гену. Разработанный нами метод также предусматривает использование референсного гена  $\beta$ -глобулина GUS, что на выходе нивелирует эту погрешность [18, 20].

### **Клиническое применение метода**

Приобретенный нами опыт использования метода свидетельствует о клинической значимости определения МДБ/МОБ пациентам с АККЛ. Наглядным описанием применения разработанного метода может служить нижеприведенный клинический случай.

Пациентке 4 лет был установлен диагноз ALK-позитивная АККЛ. Методом ПЦР была выявлена экспрессия химерного онкогена NPM1-ALK в костном мозге и в периферической крови, что позволило использовать NPM1-ALK как маркер для анализа МОБ. Уровень NPM1-ALK в крови был на порядок выше, чем в костном мозге (58,4 и 3,0 NCN NPM1-ALK соответственно) (рис. 2, точка ДД). Уровень МОБ определяли в крови перед каждым курсом ПХТ и после окончания лечения.

После проведения 1-го курса ПХТ МОБ стала ниже детектируемого уровня и оставалась отрицательной на протяжении всего периода лечения. Полная ремиссия была констатирована после 2-го курса ПХТ. Через 2 месяца после окончания лечения (180-й день) у пациентки снова была выявлена экспрессия NPM1-ALK в крови, а еще через 2 недели появилось объемное образование в левой подмышечной области (рис. 2, точка ДР). Был диагностирован ранний рецидив АККЛ. В результате биопсии остаточной опухоли после 3-го курса противорецидивной ПХТ данных за рост лимфомы получено не было, однако сохранялся высокий уровень МОБ (снижение лишь на 0,5 log от уровня при диагностике рецидива). В связи с чем пациентка получила 4 курса монотерапии таргетным (анти-CD30) препаратом брентуксимабом ведотином (БВ). Уже после 1-го введения БВ был получен МОБ-негативный результат. В качестве консолидации пациентке была проведена трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (рис. 2, точка ТГСК) от гаплоидентичного родственного донора. При контрольном обследовании на 30-е и 45-е сутки после алло-ТГСК снова были получены положительные результаты МОБ, что послужило основанием продолжить терапию БВ с 50-го дня, в том числе трижды в комбинации с инфузиями донорских лимфоцитов. После 1-го курса БВ с донорскими лимфоцитами уровень NPM1-ALK в крови стал ниже детектируемого. К настоящему времени пациентка получила 14 курсов БВ, находится во второй полной клинической и молекулярной ремиссии на сутки +280 после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток.



**Рис. 2.** Динамика уровня МОБ у пациентки К. во время прохождения лечения

Примечания:

ДД – дата диагноза,

ДР – дата рецидива,

ТГСК – трансплантация гемопоэтических стволовых клеток.

## ■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Описанный в данной статье метод количественной оценки химерного онкогена NPM1-ALK позволяет проводить лабораторное измерение МДБ и МОБ у пациентов с NPM1-ALK-позитивной АККЛ. Созданные стандарты обладают высокой стабильностью и воспроизводимостью, необходимыми для их клинического применения. Преимущество данного метода заключается в возможности определения точного количества (нормализованного числа копий) химерного транскрипта. Это позволит планировать и корректировать лечение в зависимости от уровня МДБ и МОБ и тем самым снизить вероятность развития рецидива.

## ■ ЛИТЕРАТУРА

1. Reiter A. (2000) Intensive ALL-type therapy without local radiotherapy provides a 90% event-free survival for children with T-cell lymphoblastic lymphoma: A BFM group report. *Blood*, vol. 95, pp. 416–421.
2. Burkhardt V., Woessmann W., Zimmermann M. (2006) Impact of cranial radiotherapy on central nervous system prophylaxis in children and adolescents with central nervous system-negative stage III or IV lymphoblastic lymphoma. *J. Clin. Oncol.*, vol. 24, pp. 491–499.
3. Patte C., Auperin A., Gerrard M. (2007) Results of the randomized international FAB/LMB96 trial for intermediate risk B-cell non-Hodgkin lymphoma in children and adolescents: it is possible to reduce treatment for the early responding patients. *Blood*, vol. 109, pp. 2773–2780.

4. Le Deley M.-C., Reiter A., Williams D. (2008) Prognostic factors in childhood anaplastic large cell lymphoma: results of a large European intergroup study. *Blood*, vol. 111, pp. 1560–1566.
5. Le Deley M.-C., Rosolen A., Williams D. (2010) Vinblastine in children and adolescents with high-risk anaplastic large-cell lymphoma: results of the randomized ALCL99-vinblastine trial. *J Clin Oncol*, vol. 28, pp. 3987–3993.
6. Gross T., Hale G., He W. (2010) Hematopoietic stem cell transplantation for refractory or recurrent non-Hodgkin lymphoma in children and adolescents. *Biol. Blood Marrow Transplant.*, vol. 16, no 2, pp. 223–230.
7. Lowe E.J., Spoto R., Perkins S.L. (2009) Intensive chemotherapy for systemic anaplastic large cell lymphoma of children and adolescents: final results of Children's Cancer Group Study 5941. *Pediatr. Blood Cancer*, vol. 52, pp. 335–339.
8. Brugières L., Le Deley M.C., Rosolen A. (2009) Impact of the methotrexate administration dose on the need for intrathecal treatment in children and adolescents with anaplastic large-cell lymphoma: results of a randomized trial of the EICNHL Group. *J. Clin. Oncol.*, vol. 27, pp. 897–903.
9. Liang, X., Meech S.J., Odom L.F. (2004) Assessment of t(2;5)(p23;q35) translocation and variants in pediatric ALK+ anaplastic large cell lymphoma. *Am. J. Clin. Pathol.*, vol. 121, pp. 496–506.
10. Damm-Welk C., Klapper W., Oschlies I. (2009) Distribution of NPM1-ALK and X-ALK fusion transcripts in paediatric anaplastic large cell lymphoma: a molecular-histological correlation. *Br. J. Haemat.*, vol. 146, pp. 306–309.
11. Drexler H.G., Gignac S.M., Wasielewski R. (2000) Pathobiology of *NPM-ALK* and variant fusion genes in anaplastic large cell lymphoma and other lymphomas. *Leukemia*, vol. 14, no 9, pp. 1533–1559.
12. Weiss L.M., Lopategui J.R., Sun L.H. (1995) Absence of the t(2;5) in Hodgkin's Disease. *Blood*, vol. 85, pp. 2845–2847.
13. Stark B., Avigad S., Luria D. (2009) Bone marrow minimal disseminated disease (MDD) and minimal residual disease (MRD) in childhood T-cell lymphoblastic lymphoma stage III, detected by flow cytometry (FC) and real-time quantitative polymerase chain reaction (RQ-PCR). *Pediatr. Blood Cancer*, vol. 52, pp. 20–25.
14. Mussolin L., Pillon M., d'Amore E.S. (2005) Prevalence and clinical implications of bone marrow involvement in pediatric anaplastic large cell lymphoma. *Leukemia*, vol. 19, pp. 1643–1647.
15. Damm-Welk C., Busch K., Burkhardt B. (2007) Prognostic significance of circulating tumor cells in bone marrow or peripheral blood as detected by qualitative and quantitative PCR in pediatric NPM-ALK-positive anaplastic large cell lymphoma. *Blood*, vol. 110, pp. 670–677.
16. Chomczynski P., Sacchi N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, vol. 162, pp. 156–159.
17. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (2012) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press. *Cold Spring Harbor*, pp. 994–997.
18. Gabert J., Beillard E., van der Velden V.H. (2003) 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*, vol. 17, pp. 2318–2357.
19. Delsol G., Jaffe E.S., Swerdlow S.H., Campo E. (2008) Anaplastic large cell lymphoma, ALK-positive. WHO Classification of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. IARC Pres, 4-th edition, pp. 312–316.
20. Velden V.H. (2003) Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia*, vol. 17, no 6, pp. 1013–34.