

Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение высшего образования  
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии  
Кафедра биофизики

УТВЕРЖДАЮ  
Заведующая кафедрой  
\_\_\_\_\_ В.А. Кратасюк  
подпись  
« \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2021г.

**БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА**

06.03.01 – Биология

Выявление мутации BCR-ABL методом петлевой изотермической  
амплификации

Руководитель	_____	_____	С.В. Столяр
	подпись, дата	должность, ученая степень	
Выпускник	_____		Е.И. Ткаченко
	подпись, дата		
Консультант	_____	_____	И.А. Ольховский
	подпись, дата	должность, ученая степень	

Красноярск, 2021

## РЕФЕРАТ

Выпускная квалификационная работа по теме «Выявление мутации BCR-ABL методом петлевой изотермической амплификации» содержит 28 страниц текстового документа, 6 иллюстраций, 37 литературных источников.

ХРОНИЧЕСКИЙ МИЕЛОЛЕЙКОЗ, BCR-ABL, ПЕТЛЕВАЯ ИЗОТЕРМИЧЕСКАЯ АМПЛИФИКАЦИЯ, ОПТИМИЗАЦИЯ, ПРОТОЧНАЯ ЦИТОМЕТРИЯ, МУТАЦИЯ.

Цель работы: оптимизация исследования крови пациента на наличие или отсутствие мутации BCR-ABL с использованием технологии LAMP.

Актуальность работы заключается в необходимости оптимизации стандартной процедуры выявления мутации BCR-ABL, которой можно достичь, используя метод петлевой изотермической амплификации, отличающийся доступностью, высокой чувствительностью и скоростью обнаружения мутации в исследуемом образце.

В результате проведенной работы была разработана методика обнаружения мутации BCR-ABL с использованием петлевой изотермической амплификации без выделения РНК, а также определен метод фиксации клеток исследуемого образца для сохранения их целостности после проведенной реакции с целью подсчета клеток при помощи проточной цитометрии.

## Содержание

ВВЕДЕНИЕ .....	4
1 Обзор литературы .....	5
1.1 Хронический миелоидный лейкоз .....	5
1.2 Генетические нарушения при ХМЛ .....	6
1.3 Стадии развития заболевания .....	8
1.4 Петлевая изотермическая амплификация.....	9
1.4.1 FLOS-LAMP .....	11
1.5 Этапы метода LAMP. Необходимые компоненты .....	11
1.6 Сравнение методов изотермической петлевой амплификации и полимеразной цепной реакции .....	13
1.7 Проточная цитометрия .....	13
2 Материалы и методы .....	16
2.1 Объект исследования.....	16
2.2 Методы .....	16
2.2.1 Подсчет клеток в камере Горяева .....	16
2.2.2 Подготовка образцов к реакции .....	16
2.2.3 Реакционная смесь для FLOS-LAMP .....	17
2.2.4 Проточная цитометрия .....	18
2 Результаты.....	19
3.1 Выбор набора праймеров для LAMP .....	19
3.2 Подсчет клеток в камере Горяева.....	20
3.3 Оптимизация температурного режима LAMP .....	21
3.4 Проведение реакции без выделения РНК.....	21
3.5 Сравнение методов фиксации.....	22
3.5 Детекция мутации BCR–ABL в клетках с помощью проточной цитометрии .....	24
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	26
Список использованных источников .....	27

## ВВЕДЕНИЕ

Хронический миелоидный лейкоз (ХМЛ) – редкое онкогематологическое заболевание, единственное, которое поддается полному лечению. Важным этапом в лечении является отмена приема лекарственных препаратов в случае ремиссии и отсутствия патогенных клеток в образце крови пациента. Именно на этом этапе часто совершаются поспешные выводы, так как большинство методов, используемых в клинической гематологии, недостаточно чувствительны и раковые клетки, которых может быть очень мало, не заметны.

Именно поэтому в настоящее время активно используется метод LAMP – петлевая изотермическая амплификация, метод более чувствительный по сравнению с остальными, дает быстрый результат, одновременно являясь очень доступным, в том числе в вопросе технического оснащения лаборатории.

Актуальность работы заключается в оптимизации диагностики ХМЛ, а именно в использовании метода LAMP, позволяющего уменьшить время, необходимое для стандартного лабораторного исследования, повысить его доступность, а также отсутствия нескольких этапов, необходимых при проведении стандартной процедуры определения мутации.

Поэтому целью исследования является оптимизация исследования крови пациента на наличие или отсутствие мутации BCR-ABL с использованием технологии LAMP.

Были поставлены такие задачи исследования, как:

1. Подбор оптимальных условий проведения LAMP;
2. Подбор оптимальных условий подготовки клеток;
3. Проведение LAMP на клетках крови пациентов и здоровых добровольцев и сравнение результатов;
4. Проведение реакции LAMP для анализа клеток на проточном цитометре.

## **1 Обзор литературы**

### **1.1 Хронический миелоидный лейкоз**

Хронический миелоидный лейкоз (ХМЛ, хронический миелолейкоз) — это хроническое онкологическое заболевание, поражающее кроветворную систему организма человека. Особенностью заболевания является быстрое и неконтролируемое деление клеток в костном мозге с их последующим накоплением в крови [1].

Миелоидные клетки-предшественники дифференцируются в костном мозге в незрелые миелоидные клетки. Далее миелоидные клетки мигрируют в различные периферические органы, где они подвергаются дифференцировке в зрелые миелоидные клетки, такие как макрофаги, дендритные клетки, тучные клетки или гранулоциты [2]. При данном заболевании делящиеся клетки являются незрелыми предшественниками полноценных элементов крови. Постепенно мутантные клетки вытесняют функциональные эритроциты, тромбоциты и лейкоциты. При дальнейшем развитии заболевания образуются нарушения в различных хромосомах клеток, что влияет на более быстрое поражение организма.

Заболевание изначально обладает вялотекущим характером, постепенно перетекая в стадию обострения с выраженной симптоматикой и образованием системных нарушений.

ХМЛ считается редким заболеванием. Такие выводы ученые делают, основываясь на различных исследованиях. Было подсчитано, что в десяти регионах РФ нормированная на стандартную популяцию ВОЗ заболеваемость составляет 0,7 случая на 100 000 взрослого населения [3]. Заболевание может быть выявлено в любом возрасте. Средний возраст пациентов, которым впервые диагностировали ХМЛ, составляет в большинстве около 50 лет (диапазон 18–82 года), пик заболеваемости приходится на 50–59 лет. Тем не менее доля молодых пациентов в возрасте до 40 лет все же является значительной и составляет до 33 % [4].

## 1.2 Генетические нарушения при ХМЛ

Хронический миелолейкоз обладает специфическим маркером, который обнаруживается в мутантных клетках, а также позволяет идентифицировать эти клетки. Этим маркером является транслокация  $t(9;22)(q34;q11)$ , результат которой именуется филадельфийской хромосомой (Ph-хромосома), названной в честь места, в котором была открыта. Филадельфийская хромосома имеет химерный ген BCR-ABL, обнаружение которого способствует постановке диагноза и началу лечения пациента [5].

Об этой мутации стало известно, когда в 1970-х годах усовершенствованные цитогенетические методы показали, что Филадельфийская хромосома является результатом транслокации между хромосомами 9 и 22 [6]. Впоследствии было показано, что продуктом слияния двух хромосом и образования гена BCR-ABL является киназа, обладающая повышенной активностью и являющаяся стимулятором пролиферации миелоидных клеток для возникновения ХМЛ [7].

Продукт BCR-ABL – тирозинкиназа, регулирующая сигналы, ответственные за клеточный рост, активацию, дифференцировку, адгезию и апоптоз, данный продукт образуется в результате транслокации  $t(9;22)(q34;q11)$  [8]. Тирозинкиназа, образованная геном BCR-ABL, присутствует практически у всех пациентов, которым диагностировали ХМЛ [9]. Продукт BCR-ABL может иметь свыше 16 разных вариантов транскрипта с различной молекулярной массой, возникновение которых зависит от места точки разрыва. Наиболее распространенным (до 95 %) является транскрипт p210, более редкими являются p190 и p230 [10].

Транскрипция гена BCR-ABL происходит непрерывно и независимо от других белков. Помимо того, что белок BCR-ABL активно участвует во многих процессах жизнедеятельности клетки, он также вызывает неустойчивость генома, что делает клетку более восприимчивой к дальнейшим генетическим абберациям [11].

Спустя годы изучения данного заболевания и его особенностей, исследователи смогли достаточно изучить механизм возникновения мутации и образования химерного гена, а также разработали целевую терапию, направленную на устранение тирозинкиназной активности белка. Использование ингибиторов тирозинкиназ может привести к полной ремиссии ХМЛ, что ещё раз подтверждает ведущую роль возникновения и активности BCR-ABL в развитии заболевания [12].

Хронический миелолейкоз, тем не менее, может проявляться у пациента, не имеющего филадельфийской хромосомы, поэтому ее наличие характеризует пациента, как Ph-позитивного [13].

Хронический миелоидный лейкоз отличается от других миелопролиферативных заболеваний перечисленными выше особенностями. Выявление отличительных признаков обязательно при постановке диагноза и начала лечения пациента [14].

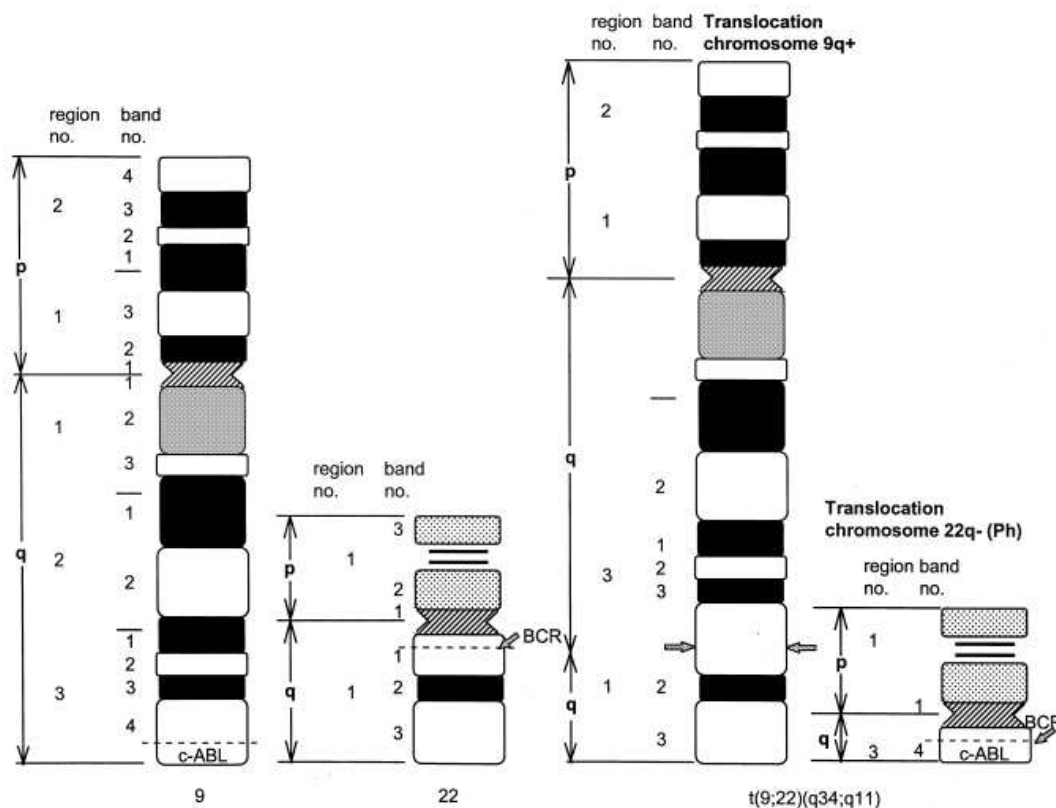


Рисунок 1 – Схема появления филадельфийской хромосомы и химерного гена BCR-ABL1 [15]

### 1.3 Стадии развития заболевания. Диагностика ХМЛ

Патогенез заболевания можно разделить на несколько стадий, которые резко отличаются друг от друга и указывают на степень поражения организма пациента:

— Хроническая фаза (ХФ) является начальной стадией ХМЛ и диагностируется у большинства (до 94%) впервые выявленных больных [16];

— Фаза акселерации (ФА) определяется у 3-5% первичных больных ХМЛ и является более осложненным по сравнению с ХФ этапом развития патологического процесса при ХМЛ, обнаруживается при прогрессировании заболевания;

— Бластный криз (БК) является наиболее агрессивной стадией ХМЛ. Симптоматика на данной стадии выражена очень ярко, так как заболевание поражает не только кровеносную систему, но и другие системы органов. Критически важным является то, что бластный криз очень устойчив к химиотерапии. Устойчивость влияет на то, что развитие заболевания практически невозможно предотвратить, а средняя продолжительность жизни больных при БК ХМЛ составляет от 3 до 12 месяцев [17].

Миелоидный лейкоз способен развиваться в течение десятка лет, постепенно прогрессируя от хронической фазы к фазе акселерации, за которой следует терминальная бластная фаза. Симптоматика может быть практически не выражена на протяжении длительного времени [18].

При диагностировании заболевания изучают образец костного мозга пациента для выявления филадельфийской хромосомы и химерного гена. Качественная обратная транскриптазная ПЦР на клетках периферической крови является обязательной для определения типа транскриптов BCR-ABL1. В случае, если молекулярный анализ демонстрирует наличие у пациента гена BCR-ABL1, но Ph-хромосома не может быть идентифицирована, проводят тест FISH [19]. Типичным транскриптом гена BCR-ABL является p210, при его отсутствии образец направляется на определение более редких транскриптов BCR-ABL (p190, p230) методом качественной или количественной ПЦР.



Принцип метода ПЦР основан на обнаружении в исследуемом материале фрагментов ДНК химерного гена BCR-ABL, их синтезе с образованием большого числа копий. Копирование ДНК мутантного гена происходит после добавления в реакцию праймеров – последовательностей ДНК, аналогичных последовательности BCR-ABL. При этом праймеры используются идентичные той разновидности гена, содержание которой исследуется в образце, – для генов, кодирующих белки с разной молекулярной массой (p190, p210 и p230), нужны разные праймеры, так как их нуклеотидные последовательности отличаются друг от друга [20].

Затем рассчитывают уровень мутантного гена относительно контрольного образца в процентах, в соответствии с международной шкалой экспрессии гена BCR-ABL (IS), или по уровню снижения в логарифмах (в 10 раз – 1 log, в 100 раз – 2 log) по сравнению с выявленным до начала лечения. При этом оценка по IS является более предпочтительной [21].

При исследовании мазка крови пациентов с хроническим миелолейкозом отмечается преобладание молодых форм гранулоцитов: миелоцитов, промиелоцитов, миелобластов.

#### **1.4 Петлевая изотермическая амплификация**

Петлевая изотермическая амплификация (*Loop mediated isothermal amplification, LAMP*) — один из методов амплификации ДНК и РНК в одной пробирке. Данный метод позволяет проводить молекулярную диагностику существенно дешевле и быстрее по сравнению с ПЦР [22]. При диагностике мРНК метод LAMP позволяет проводить обратную транскрипцию и амплификацию в одной пробирке, без переноса жидкости, при добавлении обратной транскриптазы в реакционную смесь. Подобный вариант метода называется RT-LAMP (*reverse transcription-coupled LAMP*) [23].

Амплификация происходит при добавлении в реакционную смесь Bst-полимеразы (ДНК-полимераза I из термофильной бактерии *Bacillus stearothermophilus*), способной к синтезу с вытеснением цепи. Поэтому стадия

плавления при использовании данного метода отсутствует, и вся реакция протекает при постоянной температуре (около 65 °С – оптимальная температура для полимеразы). Кроме того, используются 4 праймера, что позволяет значительно повысить специфичность реакции.

Для проведения реакции используются 2 пары праймеров: внешние (forward outer primer, F3; backward outer primer, B3) и внутренние (forward inner primer, FIP; backward inner primer, BIP). Четыре праймера сконструированы таким образом, чтобы быть нацеленными на шесть определенных областей ДНК-мишени [24]. В более позднем варианте метода было предложено использовать еще 2 праймера. Итог – 6 праймеров, специфичных к 8 участкам исследуемого фрагмента. Еще два петлевых праймера LoopF и LoopB должны быть комплементарны последовательностям между участками F1 и F2, а также B1 и B2 фрагмента-мишени [25].

Принцип действия метода петлевой изотермической амплификации приведен на рисунке 2.

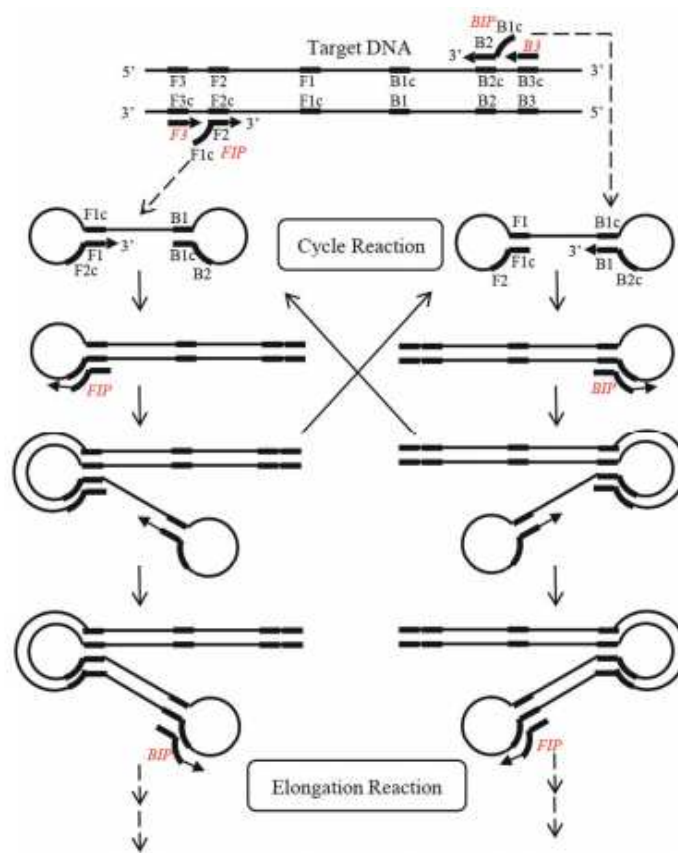


Рисунок 2 – Принцип метода LAMP [Ошибка! Залкадка не определена.]

Петлевая изотермическая амплификация активно используется в последнее время, поэтому методика, а также реакционная смесь претерпели многочисленные усовершенствования с момента первого применения метода для амплификации нуклеиновых кислот [26].

#### **1.4.1 FLOS-LAMP**

FLOS-LAMP – оптимизированный вариант стандартного метода LAMP. Дословно звучит как Флуоресцентный Петлевой Самозатухающий Праймер-LAMP (Fluorescence of Loop Primer Upon Self Dequenching-LAMP). Отличие от классического метода заключается в использовании праймеров, созданных таким образом, чтобы тимидин, имеющий флуоресцентную метку, был окружен гуанозином, химическая природа которого способна гасить флуоресцентный сигнал до того момента, как праймер не присоединится к комплементарной последовательности и начнется достраивание дочерней цепи. В результате действия ДНК-полимеразы цепь продолжает расти, меняется конформация праймера, на флуоресцентную метку не воздействуют никакие тушители, и появляется возможность зафиксировать возникающий флуоресцентный сигнал [27].

#### **1.5 Этапы метода LAMP. Необходимые компоненты**

Процесс амплификации методом LAMP условно можно разделить на три основных этапа:

- 1) образование базовой гантелеобразной структуры;
- 2) этап циклической амплификации;
- 3) этап элонгации и последующего повторения циклов [**Ошибка! Закладка не определена.**].

Для реакции LAMP используют следующие компоненты:

- Бетаин;
- $MgSO_4$ ;
- 10x буфер;
- dNTP;

- 6 праймеров, необходимых для реакции (F3, B3, FIP, BIP, LF1, LB1);
- H<sub>2</sub>O;
- флуоресцентный краситель Eva-green;
- ДНК-полимераза Bst 3.0.

Последним в реакционную смесь добавляется образец, исследуемый на наличие мутации.

В недавнем времени компания «New England Biolabs» разработала версию 3.0 Bst ДНК-полимеразы, обладающую ревертазной активностью. Эта способность ДНК-полимеразы позволила исключить необходимость добавления в реакцию еще одного фермента. Все это приводит к возможности постановки реакции RT-LAMP без добавления обратной транскриптазы.

Для большей эффективности реакционной смеси в нее добавляют бетаин (триметилглицин), так как он способен снижать температуру плавления ДНК [28].

Как правило, исследователь ставит реакцию LAMP с целью обнаружения целевой последовательности в исходном образце (например, определенной последовательности ДНК или РНК). Результаты реакции можно оценить, используя флуоресцентные красители и измеряя изменение флуоресценции. Однако преимуществом метода является то, что результат прошедшей реакции можно оценить и другим способом. В ходе синтеза ДНК в результате гидролиза нуклеозидтрифосфатов высвобождается пирофосфат. При взаимодействии с присутствующими в реакционной смеси ионами магния он способен образовывать белый осадок. Поскольку в ходе LAMP образуется большое количество ДНК, побочного продукта образуется также много. Итогом данных взаимодействий является помутнение реакционной смеси, которое видно невооруженным глазом. Это изменение внешнего вида реакционной смеси и является результатом успешно прошедшей петлевой изотермической амплификации [29].

## 1.6 Сравнение методов изотермической петлевой амплификации и полимеразной цепной реакции

В настоящее время более широко распространен метод полимеразной цепной реакции (ПЦР), однако метод петлевой изотермической амплификации (LAMP) не уступает, а в чем-то даже превосходит ПЦР. Сравнение характеристик отражено в таблице 1.

Таблица 1 – Сравнение характеристик ПЦР и LAMP

Параметр	Полимеразная цепная реакция	Изотермическая петлевая реакция
Фермент	Taq-полимераза, синтез без вытеснения цепи	Bst-полимераза, синтез с вытеснением цепи
Температурный режим	Циклическое изменение температуры	Изотермический
Амплификация	Циклическая	Нециклическая
Число праймеров	2	4-6
Степень амплификации	$10^9$ раз	$10^9 - 10^{10}$ раз
Время реакции	От 45 мин до 2,5 часов в среднем	10 – 60 мин
Прибор	Дорогостоящий амплификатор	Амплификатор не требуется, достаточно термостата или водяной бани

Метод LAMP более специфичен, чем метод ПЦР. Эти особенности достигаются за счет использования большего количества праймеров, также одним из достоинств метода LAMP является его скорость [30].

## 1.7 Проточная цитометрия

Проточная цитометрия – это технология, разработанная для быстрого анализа отдельных клеток или частиц, проходящих мимо одного или нескольких лазеров и находящихся в буферном растворе.

Метод является эффективным инструментом и находит применение во многих дисциплинах, в их числе иммунология, вирусология, молекулярная биология, онкологические исследования и мониторинг инфекционных заболеваний. Например, метод проточной цитометрии очень эффективен и чувствителен при изучении иммунной системы и ее реакции на инфекционные и раковые заболевания.

Проточная цитометрия позволяет одновременно характеризовать смешанные популяции клеток крови, костного мозга, а также твердые ткани, которые могут быть диссоциированы на отдельные клетки. Твердыми тканями

являются, например, лимфатические узлы, селезенка, слизистые ткани, твердые опухоли и т. д. [31].

Преимущество метода, который анализирует отдельные клетки, заключается в том, что клетки можно сканировать с высокой скоростью (от 500 до более 5000 в секунду), а индивидуальные характеристики большого числа клеток можно перечислять, коррелировать и суммировать. Недостатком метода одиночных клеток является то, что клетки, которые не встречаются в виде отдельных частиц, должны быть дезагрегированы; когда ткани дезагрегируются для анализа, некоторые характеристики отдельных клеток могут быть изменены, и вся информация об архитектуре тканей и распределении клеток теряется [32].

Для исследований образцов различных тканей зачастую используют флуоресцентные красители. Флуоресцентные красители могут быть конъюгированы с антителами, и в этом случае флуоресценция клетки будет считывать количество белка/антигена (на поверхности клетки, или в цитоплазме, или ядре), с которым связалось антитело [33].

Для окрашивания клеток используют флуорохромы, которые способны поглощать определенную длину волны освещающего света. Детекторы прибора, фиксирующие длины волн, имеют соответствующие фильтры для обнаружения испускаемой флуоресценции.

Линзы вокруг анализируемой клетки собирают свет, поступающий от самих клеток в результате их освещения лазером (лазерами). Чаще всего имеется две линзы, одна в прямом направлении вдоль траектории лазерного луча и одна под прямым к этому направлению. Объектив в прямом направлении фокусирует свет на фотодиод.

Свет, попадающий на этот фотоприемник прямого рассеяния, называется прямым рассеивающим светом («fsc»).

Свет, собираемый линзой, находящейся под прямым углом к направлению лазерного луча, определяется диаметром линзы и ее расстоянием от точки анализа и называется боковым рассеивающим светом («ssc») или 90°-

рассеивающим светом. Лазерный луч рассеивается на эти углы преимущественно неровностями или текстурой поверхности клетки или цитоплазмы внутри нее. Например, гранулоциты с неправильными ядрами рассеивают больше света, в отличие от лимфоцитов со сферическими ядрами [Ошибка! Закладка не определена.].

Рисунок 3 характеризует распределение клеток крови в цитометре на отдельные популяции.

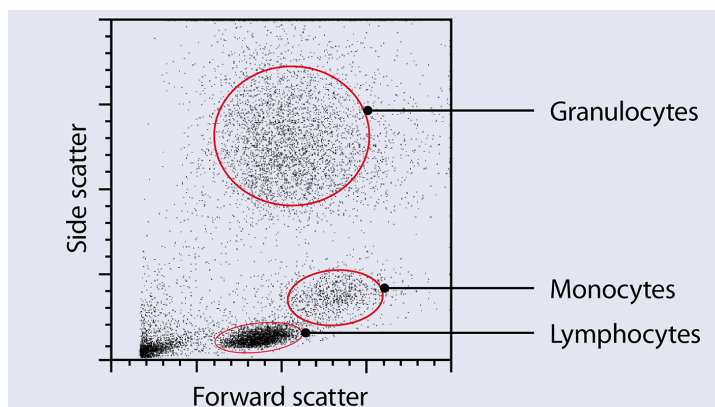


Рисунок 3 – Распределение клеток крови в цитометре [34]

Изъято с 16 по 25 страницы в связи с авторскими правами.



## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При использовании метода петлевой изотермической амплификации для выявления мутации BCR-ABL можно обнаружить, что реакция протекает успешно. Чувствительности метода оказалось достаточно для выявления мутации даже при невысокой экспрессии гена.

Оптимальными условиями проведения петлевой изотермической амплификации для выявления мутации BCR-ABL являются – температурный режим в диапазоне 63 - 64 °С. Оптимальный метод подготовки клеток к постановке петлевой изотермической амплификации без выделения РНК – разрушение целостности клеток путем чередования замораживания и размораживания клеточной суспензии. Для сохранения целостности клеток фиксация с использованием формальдегида оказалась наиболее оптимальным вариантом. Процент меченных клеток, обнаруженных при проверке образца на проточном цитометре после проведения петлевой изотермической амплификации, совпадает с уровнем экспрессии BCR-ABL, выявленном при проведении ПЦР.

Полученные в процессе исследования результаты подтвердили возможность оптимизации стандартной процедуры выявления мутации BCR-ABL с помощью метода петлевой изотермической амплификации.

## Список использованных источников

1. Esfahani M.K. et al. Blastic phase of chronic myelogenous leukemia // Current treatment options in oncology. – 2006. – Т. 7. – №. 3. – С. 189-199.
2. Пономарев А.В. Миелоидные супрессорные клетки: общая характеристика // Иммунология. – 2016. – С. 47–50.
3. Туркина А.Г. и др. Регистр больных хроническим миелолейкозом в Российской Федерации: от наблюдательного исследования к оценке эффективности терапии в клинической практике // Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика. – 2017. – Т. 10. – №. 3.
4. Куликов С.М., Виноградова О.Ю., Чельшева Е.Ю. и др. Заболеваемость хроническим миелолейкозом в 6 регионах России по данным популяционного исследования 2009–2012 гг. // Терапевтический архив. – 2014. – С. 24–30.
5. Nehlmann R. et al. Chronic myeloid leukaemia // The Lancet. – 2007. – Т. 370. – №. 9584. – С. 342-350.
6. Rowley J. D. et al. Ph-positive leukaemia, including chronic myelogenous leukaemia. – 1980.
7. Lugo T. G. et al. Tyrosine kinase activity and transformation potency of bcr-abl oncogene products // Science. – 1990. – Т. 247. – №. 4946. – С. 1079-1082.
8. Deininger M.W.N., Goldman J.M., Melo J.V. The molecular biology of chronic myeloid leukemia // Blood, The Journal of the American Society of Hematology. – 2000. – Т. 96. – №. 10. – С. 3343-3356.
9. Druker B. J. et al. Activity of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome // New England Journal of Medicine. – 2001. – Т. 344. – №. 14. – С. 1038-1042.
10. Туркина А.Г., Зарицкий А.Ю., Шуваев В.А., Чельшева Е.Ю., Ломаиа Е.Г., Морозова Е.В., Голенков А.К., Поспелова Т.И., Шухов О.А., Фоминых М.С., Гусарова Г.А., Кузьмина Л.А., Абдуллаев А.О., Мартынкевич И.С.

Клинические рекомендации по диагностике и лечению хронического миелолейкоза // Клиническая онкогематология. 2017. №3.

11. Hanks S.K., Quinn A.M., Hunter T. The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains (англ.) // Science. — 1988. — Vol. 241, no. 4861. — P. 42–52.

12. Dengjel J., Kratchmarova I., Blagoev B. Receptor tyrosine kinase signaling: a view from quantitative proteomics (англ.) // Mol Biosyst. — 2009. — Vol. 5, no. 10. — P. 1112–1121.

13. Виноградова О.Ю. и др. Влияние различных хромосомных аномалий в Ph-позитивных клетках костного мозга на течение хронического миелолейкоза при терапии ингибиторами тирозинкиназ // Онкогематология. — 2012. — №. 4. — С. 24–34.

14. Мисюрин В.А. и др. Сходство профилей экспрессии раково-тестикулярных генов при хронических миелопролиферативных заболеваниях и хроническом миелоидном лейкозе // Гематология и трансфузиология. — 2014. — Т. 59. — №. S1.

15. Pasternak G. et al. Chronic myelogenous leukemia: molecular and cellular aspects // Journal of cancer research and clinical oncology. — 1998. — Т. 124. — №. 12. — С. 643-660.

16. Hoffmann V., Vaccarani M., Hasford J. et al. The EUTOS population-based registry: incidence and clinical characteristics of 2904 CML patients in 20 European Countries // Leukemia. 2015; 29: 1336-43.

17. Kantarjian H.M. et al. Characteristics of accelerated disease in chronic myelogenous leukemia // Cancer. — 1988. — Т. 61. — №. 7. — С. 1441-1446.

18. Giles F.J., Cortes J.E., Kantarjian H.M., et al.: Accelerated and blastic phases of chronic myelogenous leukemia // Hematol Oncol Clin North Am 2004, 18:753–774.

19. Sokal J. E. et al. Staging and prognosis in chronic myelogenous leukemia // Seminars in hematology. — 1988. — Т. 25. — №. 1. — С. 49-61.

20. Абдуллаев А.О. и др. Количественная оценка уровня транскрипта bcr-abl T315I у больных хроническим миелоидным лейкозом при помощи аллель-специфичной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени // Гематология и трансфузиология. – 2014. – Т. 59. – №. 4.
21. Steegmann J.L. et al. European LeukemiaNet recommendations for the management and avoidance of adverse events of treatment in chronic myeloid leukaemia // Leukemia. – 2016. – Т. 30. – №. 8. – С. 1648-1671.
22. Notomi T. et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): principle, features, and future prospects // Journal of microbiology. – 2015. – Т. 53. – №. 1. – С. 1-5.
23. Wong Y.P. et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a versatile technique for detection of micro-organisms // Journal of applied microbiology. – 2018. – Т. 124. – №. 3. – С. 626-643.
24. Notomi T. et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA // Nucleic acids research. – 2000. – Т. 28. – №. 12. – С. 63.
25. Nagamine K., Hase T., Notomi T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers // Molecular and cellular probes. – 2002. – Т. 16. – №. 3. – С. 223-229.
26. Wong Y.P. et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a versatile technique for detection of micro-organisms // Journal of Applied Microbiology. – 2018. – Т. 124. – №. 3. – С. 626-643.
27. Gadkar V.J. et al. Real-time detection and monitoring of loop mediated amplification (LAMP) reaction using self-quenching and de-quenching fluorogenic probes // Scientific reports. – 2018. – Т. 8. – №. 1. – С. 1-10.
28. Nagamine K. et al. Loop-mediated isothermal amplification reaction using a non-denatured template // Clinical chemistry. – 2001. – Т. 47. – №. 9. – С. 1742-1743.
29. Mori Y. et al. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation // Biochemical and biophysical research communications. – 2001. – Т. 289. – №. 1. – С. 150-154.

30. Макарова Ю.А. и др. Изотермическая петлевая амплификация: эффективный метод экспресс-диагностики в онкологии // Онкоурология. – 2018. – №. 2.
31. McKinnon K.M. Flow cytometry: An overview // Current protocols in immunology. – 2018. – Т. 120. – №. 1. – С. 5.
32. Givan A. L. Flow cytometry: an introduction // Flow cytometry protocols. – Humana Press, 2011. – С. 1–29.
33. Darzynkiewicz, Z., Juan, G., Li, X., Gorczyca, W., Murakami, T., and Traganos, F. (1997) Cytometry in cell necrobiology: Analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis) // Cytometry 27, 1–20.
34. Основные принципы проточной цитометрии [Электронный ресурс] : Miltenyi Biotec. Режим доступа: <https://www.miltenyibiotec.com/DK-en/resources/macs-handbook/macs-technologies/flow-cytometry/flow-cytometry-basics.html?countryRedirected=1> (дата обращения 11.04.2021)
35. Chow S. et al. Whole blood fixation and permeabilization protocol with red blood cell lysis for flow cytometry of intracellular phosphorylated epitopes in leukocyte subpopulations //Cytometry Part A: the journal of the International Society for Analytical Cytology. – 2005. – Т. 67. – №. 1. – С. 4-17.
36. Gadkar V. J. et al. Real-time detection and monitoring of loop mediated amplification (LAMP) reaction using self-quenching and de-quenching fluorogenic probes //Scientific reports. – 2018. – Т. 8. – №. 1. – С. 1-10.
37. Общий лейкоцитарный антиген CD45 [Электронный ресурс] : Beckman Coulter, Inc. Режим доступа: <https://www.mybeckman.ru/reagents/coulter-flow-cytometry/antibodies-and-kits/single-color-antibodies/cd45> (дата обращения 11.04.2021)

Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение высшего образования  
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии  
Кафедра биофизики

УТВЕРЖДАЮ

Заведующая кафедрой

В. Крамас В.А. Кратасюк

подпись

«21» июня 2021 г.

**БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА**

06.03.01 – Биология

Выявление мутации BCR-ABL методом петлевой изотермической  
амплификации

Руководитель

С. Столяр 21.06.21 профессор, д. ф-и н  
подпись, дата должность, ученая степень

С.В. Столяр

Выпускник

Е.И. Ткаченко 21.06.2021  
подпись, дата

Е.И. Ткаченко

Консультант

И.А. Ольховский 21.06.21 к.м.н., доцент  
подпись, дата должность, ученая степень

И.А. Ольховский

Красноярск, 2021