



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(51) МПК
G01N 21/64 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
(52) СПК
G01N 21/64 (2021.08)
C12Q 1/68 (2021.08)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

Статус: действует (последнее изменение статуса: 14.03.2023)
Пошлина: учтена за 3 год с 09.04.2023 по 08.04.2024. Установленный срок для уплаты пошлины за 4 год: с 09.04.2023 по 08.04.2024. При уплате пошлины за 4 год в дополнительный 6-месячный срок с 09.04.2024 по 08.10.2024 размер пошлины увеличивается на 50%.

(21)(22) Заявка: [2021109745](#), 08.04.2021

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
08.04.2021

Дата регистрации:
11.01.2022

Приоритет(ы):
(22) Дата подачи заявки: 08.04.2021

(45) Опубликовано: [11.01.2022](#) Бюл. № 2

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: RU 2434940 C1, 27.11.2011. WO 2009021518 A1, 19.02.2009. ДЁМИНА И.А. и др. Измерение абсолютной длины теломер методом проточной цитометрии / Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии, 2018. RUFER N. et al. Telomere length dynamics in human lymphocyte subpopulations measured by flow cytometry / NATURE BIOTECHNOLOGY, 1998, vol.

16, pages 743-747. GUTIERREZ-RODRIGUES F. et al. Direct Comparison of Flow-FISH and qPCR as Diagnostic Tests for Telomere Length Measurement in Humans / PLOS ONE, 2014, vol. 9, is. 11, e113747, 9 pages.

Адрес для переписки:
125167, Москва, Новый Зыковский пр-д, 4,
ФГБУ "НМИЦ гематологии" Минздрава
России, В.Г. Савченко

(72) Автор(ы):

Гальцева Ирина Владимировна (RU),
Давыдова Юлия Олеговна (RU),
Капранов Николай Михайлович (RU),
Лучкин Антон Владимирович (RU),
Менделеева Лариса Павловна (RU),
Савченко Валерий Григорьевич (RU),
Филипенко Максим Леонидович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное учреждение "Национальный медицинский исследовательский центр гематологии" Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ "НМИЦ гематологии" Минздрава России) (RU)

(54) Способ определения абсолютной длины теломер лейкоцитов с помощью метода проточной цитометрии

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине, клинической и лабораторной практике. Способ определения абсолютной длины теломер (АДТ) лейкоцитов с помощью метода проточной цитометрии заключается в том, что измеряют длину теломер на проточном цитометре для определения значения средней интенсивности флуоресценции (СИФ). Далее получают значения СИФ. Строят калибровочную прямую для перевода СИФ в молекулярный эквивалент флуоресценции (МЭФ). Затем получают уравнение для перевода СИФ в МЭФ. Получают значения МЭФ. Рассчитывают значения АДТ на основе регрессионной модели. При этом регрессионную модель получают на основе регрессионного анализа значений МЭФ и с использованием данных АДТ, полученных

параллельно методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР РВ). Изобретение обеспечивает простой, быстрый, точный и универсальный способ определения АДТ. 2 з.п. ф-лы, 4 пр., 5 ил.

Изобретение относится к медицине, клинической и лабораторной практике, а именно к способу определения абсолютной длины теломер лейкоцитов методом проточной цитометрии на основе регрессионного анализа с результатами определения длины теломер с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени.

Теломерами называют концевые участки хромосом, которые состоят из tandemных нуклеотидных повторов (TTAGGG), соединенных с белками [1, 2]. Известно, что после каждого деления клетки происходит укорочение хромосом, в среднем, на 50-60 нуклеотидов [3]. Это укорочение происходит за счет потерь теломерных повторов, количества которых хватает на несколько десятков делений, поэтому не происходит потери важной генетической информации, вследствие чего теломеры являются критически важными в поддержании и жизнеспособности клетки [4].

Укорочение теломер в клетках крови наблюдается при некоторых заболеваниях, в частности, при врожденном дискератозе, апластической анемии, циррозе печени, идиопатическом легочном фиброзе [5-7]. Большое количество исследований посвящено изучению роли теломер в канцерогенезе. Предполагается, что значительное укорочение длины теломер приводит к геномной нестабильности и образованию хромосомных поломок, которые нередко обнаруживаются как при различных онкогематологических заболеваниях, так и солидных новообразованиях [8-11].

Несмотря на несомненную актуальность исследования, стандартизованный лабораторный метод определения длины теломер к настоящему моменту отсутствует.

Золотым стандартом измерения абсолютной длины теломер по данным литературы признается анализ концевых рестрикционных фрагментов с помощью блот-гибридизации по Саузерну. Однако этот метод достаточно трудоемкий, отсутствуют стандартные протоколы, воспроизводимость - низкая, присутствует субъективность анализа, а также необходимость использования радиоактивных меток сильно ограничивает применение этого метода [12, 13]. Более подходящими для рутинной практики могут быть полимеразная цепная реакция (ПЦР) в реальном времени и проточная цитометрия - flow-FISH (объединение проточной цитометрии (flow cytometry) и флуоресцентной гибридации in situ (FISH)) [14-17].

Определение длины теломер с помощью ПЦР в реальном времени имеет свои преимущества, такие как простота выполнения, возможность проведения исследования образца даже с низким количеством ДНК, высокая пропускная способность, а главное, возможность получить абсолютную длину теломер (АДТ) [18]. Недостатком этого метода является низкая воспроизводимость, вариабельность результатов, трудности в определении длины коротких теломер [12].

В ряде исследований показаны достоинства метода flow-FISH, такие как высокая чувствительность, специфичность, воспроизводимость и возможность определения длины теломер в целевых популяциях клеток без предварительного сортирования [12]. Однако этот метод позволяет определить только относительную длину теломер (ОДТ), то есть относительно некоторого контроля, в роли которого обычно выступают клеточная линия 1301, клетки бычьего или мышинового тимуса или костного мозга мышей [19, 20]. Получение относительной длины теломер (ОДТ) делает мало сопоставимыми результаты разных исследовательских групп. Поэтому разрабатываются подходы для пересчета флуоресценции в абсолютную длину в тысячах пар нуклеотидов (килобазах, кб).

Известен способ пересчета АДТ с помощью метода flow-FISH, используя клеточную культуру 1301, и зная тот факт, что длина теломер этих клеток равна приблизительно 70 кб [21]. В другом исследовании сопоставляли результаты flow-FISH и результаты анализа концевых рестрикционных фрагментов Саузерн-блотом. Получив значимую корреляцию ($r=0,9$; $p<0,0001$) авторы получали уравнение линейной регрессии [19] (прототип).

Таким образом, методы, которые применяются для определения длины теломер, разнообразны и имеют разную физическую основу. Метод flow-FISH является наиболее подходящим для рутинной практики, относительно прост в исполнении и обладает высокой воспроизводимостью, чувствительностью и специфичностью, однако для сопоставления результатов разных лабораторий необходим способ получения длины теломер в абсолютном выражении.

Целью настоящего изобретения является разработать точный и надежный способ определения абсолютной длины теломер в тысячах пар нуклеотидов методом flow-FISH с использованием регрессионного анализа.

Техническим результатом изобретения является его простота, точность, быстрота, а также универсальность, которые позволяют лаборатории, оснащенной проточным цитометром, определять абсолютную длину теломер.

Дополнительным техническим результатом является то, что данный способ доступен для проведения исследований в рутинной лабораторной практике, позволяет сравнивать результаты разных исследовательских групп и, в дальнейшем, применять его в клинических исследованиях.

Поставленная цель достигается благодаря разработке способа определения длины теломер методом проточной цитометрии на проточном цитометре с помощью регрессионного анализа.

Заявленный способ включает измерение длины теломер методом проточной цитометрии на проточном цитометре с получением молекулярных эквивалентов флуоресценции (МЭФ), которые сопоставляют с результатами количественного измерения длины теломер методом ПЦР в реальном времени и проводят регрессионный анализ, получают уравнение зависимости МЭФ от длины теломер, определенной методом ПЦР. Получение этого уравнения регрессии позволяет в дальнейшем переводить МЭФ от клеток любого исследуемого образца в абсолютную длину теломер и сопоставлять эти данные с результатами исследований, проведенных в других лабораториях, а также проводить их совместный анализ.

Существенными признаками разработанного способа определения абсолютной длины теломер являются:

- измерение длины теломер на проточном цитометре для определения значения средней интенсивности флуоресценции (СИФ),
- получение значения СИФ,
- построение калибровочной прямой для перевода СИФ в молекулярный эквивалент флуоресценции (МЭФ),
- получение уравнения для перевода СИФ в МЭФ,
- получение значения МЭФ,
- получение значения абсолютной длины теломер (АДТ) с помощью уравнения регрессии зависимости от МЭФ, определенного на основе проведенного регрессионного анализа,
- регрессионный анализ проводят однократно для конкретного цитометра с использованием данных АДТ, полученных при параллельном исследовании методом ПЦР в реальном времени.

Существенным отличием заявляемого способа является то, что в отличие от прототипа в разработанном способе не используют блот-гибридизацию по Саузерну, которая трудно выполнима вследствие необходимости применения радиоактивных меток, а также характеризуется субъективностью анализа и высокой трудоемкостью и времязатратностью. А для проведения регрессионного анализа применяют результаты исследования ПЦР в реальном времени, которая является более универсальной и характеризуется доступностью, быстротой проведения и простотой постановки.

Полученные уравнения регрессии несколько отличаются для разных цитометров, несмотря на использование одних и тех же частиц для расчета МЭФ. Была подтверждена высокая сходимость анализа данных, полученных с разных цитометров, что указывает на стабильность и воспроизводимость метода. Следовательно, при планировании многоцентровых исследований, является необходимым построение калибровочных прямых и выведения уравнения для пересчета АДТ в индивидуальном порядке. Кроме того, эти уравнения можно применять при условии сохранения флуоресцентного сигнала на постоянном уровне, а это значит, что калибровка прибора является обязательной, так как способствует сохранению воспроизводимости данных.

В найденных источниках информации авторами не обнаружено сведений, касающихся реализованного способа.

Сущность предлагаемого изобретения пояснена на графических материалах:

Фиг. 1 - Пример точечных диаграмм, получаемых при определении длины теломер методом проточной цитометрии: (а) без добавления теломерного зонда, меченого флуорохромом FITC (отрицательный контроль) и (б) с добавлением теломерного зонда; в результате анализа которых получают среднюю интенсивность флуоресценции мононуклеаров, связавших теломерный зонд.

Фиг. 2 - Построение калибровочной прямой с помощью флуоресцентных сфер с известным числом молекул флуорохрома (FluoroSpheres 6-Peak, Dako) и получение уравнение для перевода средней интенсивности флуоресценции (СИФ) в молекулярный эквивалент флуоресценции (МЭФ).

Фиг. 3 - Получение регрессионного уравнения при параллельном исследовании длины теломер методами flow-FISH и ПЦР в реальном времени, позволяющим

перевести МЭФ в абсолютный показатель длины теломер (кб).

Фиг. 4 - Взаимосвязь между показателями МЭФ, полученных от одних и тех же проб на цитометрах BD FACSCanto II и CytoFLEX.

Фиг. 5 - Взаимосвязь длины теломер, определенной методами ПЦР и Flow-FISH на цитометрах CytoFLEX и BD FACSCanto II.

Сущность изобретения пояснена примерами его реализации и использования, которые не ограничивают его объем.

Пример 1. Осуществление способа

Определение длины теломер методом проточной цитометрии проводят с помощью коммерческого набора Telomere PNA Kit/FITC (Dako, Дания). Пробоподготовка проводится в соответствии с рекомендациями производителя этого набора. В качестве контроля гибридизации зонда используют клеточную линию 1301 (ATCC, Великобритания). Выделенные мононуклеары (0,5-2 млн) периферической крови смешивают с эквивалентным количеством клеток линии 1301, затем разделяют на равные части в четыре пробирки и добавляют в две из этих четырех пробирок раствор с теломерным зондом, а в две другие - раствор без зонда. После гибридизации и инкубации проводят отмывку от не связавшегося зонда. Получают две исследуемые пробы (пробирки с зондом) и две контрольные пробы (пробирки без зонда). Далее проводят цитометрический анализ (Фиг. 1), где определяется средняя интенсивность флуоресценции (СИФ) мононуклеаров для канала FITC в каждой из 4 проб. Рассчитывается среднее значение СИФ двух исследуемых проб (с зондом) и двух контрольных проб (без зонда). Затем вычитается из среднего значения проб с зондом среднее значение проб без зонда - это и есть конечный показатель СИФ по теломерному зонду для исследуемых мононуклеаров периферической крови.

С целью перевода полученных СИФ в показатель молекулярного эквивалента флуоресценции (МЭФ) применяют набор FluoroSpheres 6-Peak, Sensitivity Particles (Dako, Дания). Набор содержит 6 вариантов частиц размером 3,2 мкм с разным содержанием флуорохромов на поверхности - МЭФ. С каждой группы шариков снимается показатель СИФ, а затем строится калибровочная прямая (Фиг. 2) и рассчитывают уравнение перевода СИФ в МЭФ. Данная процедура проводится предпочтительно каждый день перед выполнением новой серии исследований.

Параллельно с определением длины теломер с помощью flow-FISH проводят исследование методом ПЦР, позволяющим получить абсолютную длину теломер в килобазах [12, 18]. Далее проводят регрессионный анализ полученных МЭФ и АДТ и выводят соответствующее уравнение пересчета (Фиг. 3).

Пример 2. Получение уравнения регрессии

Для получения уравнения регрессии провели исследование образцов периферической крови, полученных от 21 здорового донора.

Способ получения согласно примеру 1. Для каждого из образцов рассчитали значения СИФ мононуклеаров по теломерному зонду и перевели эти показатели в МЭФ для двух цитометров CytoFLEX (Beckman Coulter, КНР) и BD FACSCanto II (Becton Dickinson, США).

Анализ клеток выполняли параллельно на двух цитометрах CytoFLEX (Beckman Coulter, КНР) и BD FACSCanto II (Becton Dickinson, США). Перед новой серией измерений проводили калибровку цитометра CytoFLEX с целью поддержания выхода флуоресцентного сигнала с помощью набора FluoroSpheres 6-Peak, Sensitivity Particles (Dako, Дания). Регулировка напряжения на фотоумножителях цитометра BD FACSCanto II проводилась с применением Cytometer Setup & Tracking Beads kit (BD Biosciences, США).

Гейтирование выполняли с помощью программы Kaluza 2.1 (Beckman Coulter, США). Определяли среднюю интенсивность флуоресценции (СИФ) по каналу FITC для мононуклеаров и клеток линии 1301. В пробах, инкубированных с гибридизационным буфером без зонда, СИФ отражала аутофлуоресценцию клеток, которую вычитали из СИФ от проб, инкубированных с зондом. Затем подсчитывали среднее значение полученных разниц СИФ.

Набор FluoroSpheres 6-Peak, Sensitivity Particles применяли для построения калибровочных прямых с целью перевода полученных средних СИФ к показателю молекулярного эквивалента флуоресценции (МЭФ) [19, 21].

Параллельно проведено исследование методом ПЦР и получены АДТ в килобазах [12, 18].

Статистическая обработка выполнена с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 6 и R 3.4.4. Корреляционный анализ выполняли с использованием критерия Пирсона, так как выборки были с нормальным распределением. Проверку нормальности распределения осуществляли с помощью критерия Шапиро-Уилка. При анализе линейной регрессии проверяли остатки регрессии на гомоскедастичность и

нормальность распределения. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Пример 3. Оценка воспроизводимости МЭФ и сходимости данных

Была оценена воспроизводимость МЭФ, полученных от одних и тех же проб на разных цитометрах. Обнаружена сильная прямая связь между МЭФ, полученными при анализе проб на BD FACSCanto II и CytoFLEX ($r=0,97$; $p < 0,0001$) (Фиг. 4).

При корреляционном анализе результатов ПЦР в реальном времени и результатов flow-FISH была обнаружена значимая взаимосвязь между АДТ и МЭФ, полученных и на BD FACSCanto II, и CytoFLEX. Далее рассчитали уравнения зависимости АДТ от МЭФ для обоих приборов: для CytoFLEX $y=0,0043x$ (доверительный интервал (ДИ)=0,0040 - 0,0046); для BD FACSCanto II $y=0,0051x$ (ДИ=0,0048 - 0,0055) (Фиг. 5).

По регрессионным моделям для CytoFLEX и BD FACSCanto II были подтверждены гомоскедастичности ($p=0,10$ и $p=0,09$) и нормальности распределения остатков регрессии ($p=0,29$ и $p=0,35$ соответственно). Проведенные проверки регрессионного анализа указывают на правомерность применения выведенных уравнений для перевода МЭФ в АДТ. Эти уравнения можно использовать для перевода относительных значений флуоресценции в абсолютные значения длины теломер. Высокая сходимость анализа данных, полученных с двух цитометров, указывает на стабильность и воспроизводимость метода.

Пример 4. Пример проведения исследования

Пациент А.Б. - мужчина, 26 лет. Проводилась дифференциальная диагностика между идиопатической апластической анемией и врожденным дискератозом. Из образца периферической крови были выделены мононуклеары и проведена процедура пробоподготовки с помощью набора Telomere PNA Kit/FITC (Dako, Дания). Исследование проводилось на цитометре CytoFLEX (Beckman Coulter, КНР).

Для двух пробирок с теломерным зондом получены СИФ: 6673 и 6746, а для двух повторов без зонда: 1360 и 1340. Рассчитано конечное значение СИФ для мононуклеаров: $(6673+6746)/2 - (1360+1340)/2=5359,5$.

С помощью FluoroSpheres 6-Peak, Sensitivity Particles получено уравнение перевода СИФ в МЭФ: $y=0,5289x-612,79$. Подставляя в это уравнение вместо «х» полученное значение СИФ, получаем МЭФ=2221,8.

Далее используя ранее выведенное уравнение для перевода МЭФ в абсолютные значения длины теломер для цитометра CytoFLEX ($y=0,0043x$) (Фиг. 5), получаем АДТ= $0,0043 \times 2221,8=9,6$ кб.

Заключение: длина теломер мононуклеаров периферической крови пациента А.Б. составила 9,6 килобаз. Что указывает на то, что диагноз врожденного дискератоза маловероятен.

Таким образом, предложенный способ определения абсолютной длины теломер методом проточной цитометрии на основе регрессионного анализа с результатами определения длины теломер с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени позволяет достаточно быстро, просто, но при этом с высокой точностью получить значение абсолютной длины теломер методом проточной цитометрии.

Список источников информации, использованных при составлении описания к заявке на изобретение «Способ определения абсолютной длины теломер лейкоцитов с помощью метода проточной цитометрии».

1. Blackburn E.H., Greider C.W., Szostak J.W. Telomeres and telomerase: The path from maize, Tetrahymena and yeast to human cancer and aging. *Nat Med.* 2006; 12(10):1133-8.

2. Palm W., De Lange T. How shelterin protects mammalian telomeres. *Annu Rev Genet.* 2008; 42:301-34.

3. Blackburn E.H. Telomere states and cell fates. *Nature.* 2000;408(6808):53-6.

4. Hayflick L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp Cell Res.* 1965; 37(3):614-36.

5. Calado R.T., Young N.S. Mechanisms of disease: Telomere diseases. *N Engl J Med.* 2009;361(24): 2353-65.

6. Демина И.А., Овсянникова Г.С., Калинина И.И., Сунцова Е.В., Горонкова О.В., Райкина Е.В. и др. Значение длины теломер для индивидуализации терапии апластической анемии. *Педиатрия Журнал им ГН Сперанского.* 2017;96(5):97-103.

7. Кулагин А.Д., Борисов В.И., Пронкина Н.В., Лисуков И.А., Козлов В.А., Афанасьев Б.В. Частота и прогностическое значение укорочения теломерных участков ДНК при апластической анемии. *Гематология и трансфузиология.* 2014;59(S1):20.

8. Engelhardt M., Mackenzie K., Drullinsky P.R., Silver R.T., Moore M.A.S. Telomerase activity and telomere length in acute and chronic leukemia, pre-and post-ex vivo culture. *Cancer Res.* 2000; 60(3):610-7.

9. Cottliar A., Pedrazzini E., Corrado C, Engelberger M.I., Narbaitz M., Slavutsky I. Telomere shortening in patients with plasma cell disorders. *Eur J Haematol.* 2003; 71(5):334-40.
10. Boultonwood J., Fidler C, Kusec R., Rack K., Elliott P.J.W., Atoyebi O., et al. Telomere length in myelodysplastic syndromes. *Am J Hematol.* 1997; 56(4):266-71.
11. Kim N.W., Piatyszek M.A., Prowse K.R., Harley C.B., West M.D., Ho P.L., et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science.* 1994; 266(5193):2011-5.
12. Gutierrez-Rodrigues F., Santana-Lemos B.A., Scheucher P.S., Alves-Paiva R.M., Calado R.T. Direct comparison of Flow-FISH and qPCR as diagnostic tests for telomere length measurement in humans. *PLoS One.* 2014; 9(11):e113747.
13. Борисов В.И., Демаков С.А., Непомнящих В.М., Леонова М.И., Демина Д.В., Баровская Н.А. и др. Особенности изменения средней длины теломер в лимфоцитах у больных бронхиальной астмой. *Медицинская иммунология.* 2009;11(6):523-30.
14. Baerlocher G.M., Mak J., Tien T., Lansdorp P.M. Telomere length measurement by fluorescence in situ hybridization and flow cytometry: Tips and pitfalls. *Cytometry.* 2002;47(2):89-99.
15. Law H.K.W., Lau Y.L. Validation and development of quantitative flow cytometry-based fluorescence in situ hybridization for intercenter comparison of telomere length measurement. *Cytometry.* 2001;43(2): 150-3.
16. Gil M.E., Coetzer T.L. Real-time quantitative PCR of telomere length. *Appl Biochem Biotechnol - Part B Mol Biotechnol.* 2004;27(2): 169-72.
17. O'Callaghan N.J., Dhillon V.S., Thomas P., Fenech M. A quantitative real-time PCR method for absolute telomere length. *Biotechniques.* 2008;44(6):807-9.
18. Cawthon R.M. Telomere length measurement by a novel monochrome multiplex quantitative PCR method. *Nucleic Acids Res.* 2009;37(3):e21.
19. Rufer N., Dragowska W., Thornbury G., Roosnek E., Lansdorp P.M. Telomere length dynamics in human lymphocyte subpopulations measured by flow cytometry. *Nat Biotechnol.* 1998;16(8):743-7.
20. Борисов В.И., Кожевников В.С., Сенюков В.В., Сизиков А.Э., Коненкова Л.П., Герцог О.А. и др. Укорочение длины теломер моноцитов при ревматоидном артрите. *Медицинская иммунология.* 2006;8(1):87-90.
21. Демина А.И., Семченкова А.А., Кагирова З.Р., Попов А.М. Измерение абсолютной длины теломер методом проточной цитометрии. *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии.* 2018; 17 (4): 66-72.

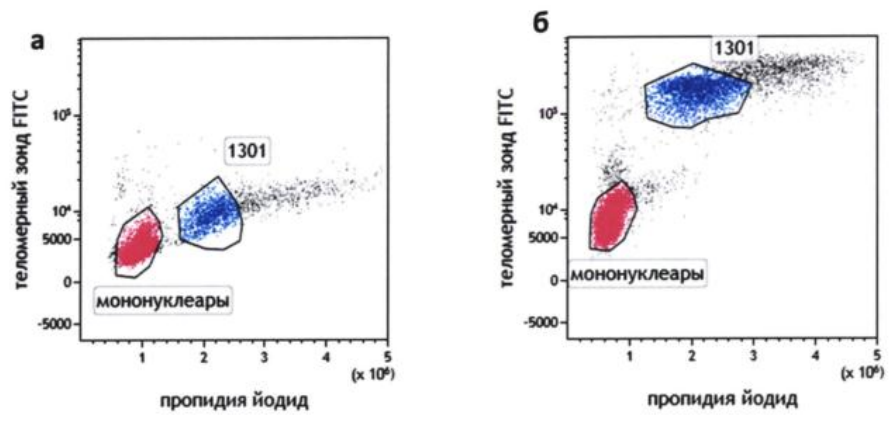
Формула изобретения

1. Способ определения абсолютной длины теломер (АДТ) лейкоцитов с помощью метода проточной цитометрии, включающий следующие стадии:

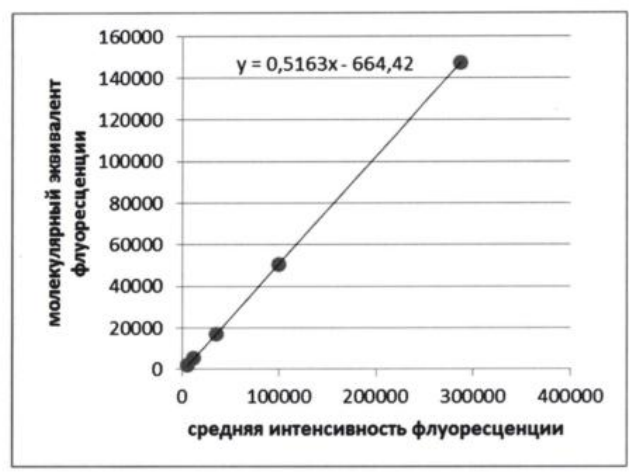
- измеряют длину теломер на проточном цитометре для определения значения средней интенсивности флуоресценции (СИФ),
- получают значения СИФ,
- строят калибровочную прямую для перевода СИФ в молекулярный эквивалент флуоресценции (МЭФ),
- получают уравнение для перевода СИФ в МЭФ,
- получают значения МЭФ,
- рассчитывают значения АДТ на основе регрессионной модели, отличающийся тем, что регрессионную модель получают на основе регрессионного анализа значений МЭФ и с использованием данных АДТ, полученных параллельно методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР РВ).

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что регрессионный анализ МЭФ, полученных с помощью проточной цитометрии, и АДТ, полученных методом ПЦР РВ, проводят однократно и индивидуально для используемого цитометра и получают регрессионную модель в виде уравнения линейной регрессии.

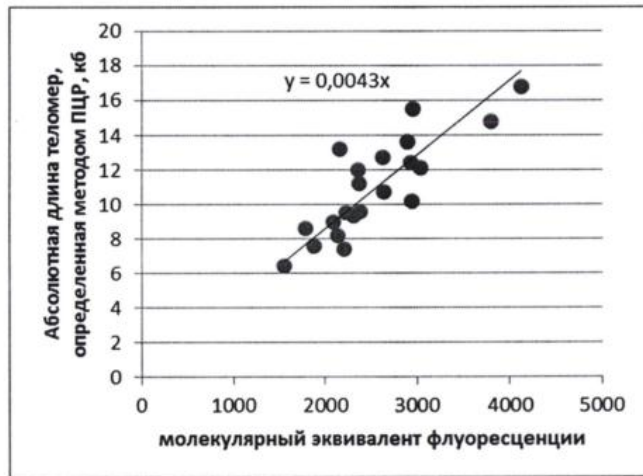
3. Способ по п. 1, отличающийся тем, что построение калибровочной прямой и получение уравнения для перевода СИФ в МЭФ предпочтительно проводить как минимум ежедневно перед новой серией исследований.



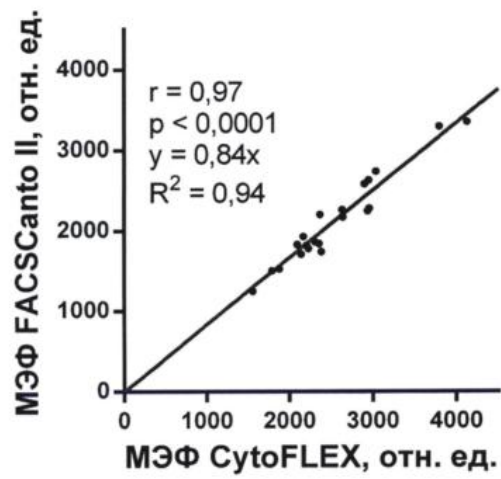
Фиг. 1



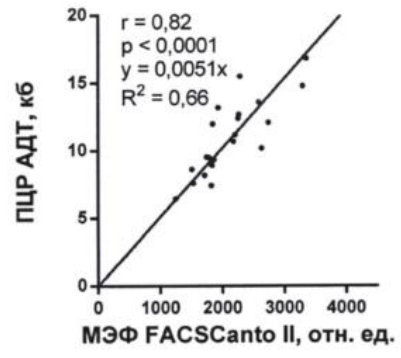
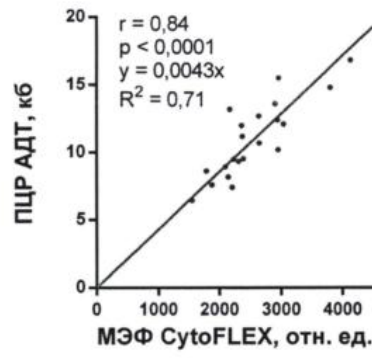
Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5