

Қолданылған әдебиеттер:

1. Н. Темірғалиев «Математикалық анализ» бірінші бөлім, Алматы «Мектеп» 1987. -286б
2. С. Мақатаев «Мақал – мәтелдер жинағы» Алматы «Ана тіл» 2005. -137б

Машжан А., Карагандинский государственный университет имени академика Е.А.Букетова, биолого-географический факультет, студент гр. БТ-43
(Научный руководитель – к.б.н., доцент **Погосян Г.П.**)

ОПРЕДЕЛЕНИЕ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА NrfII У БОЛЬНЫХ С РАЗЛИЧНЫМИ ФОРМАМИ ЛЕЙКОЗОВ

Актуальность работы. Проблема исследования причин развития лейкозов и возможностей лечения очень актуальна как в Республике Казахстан, так и во всем мире. Опубликовано большое количество статей, вызывающих тревогу в связи с увеличением количества больных онкогематологическими заболеваниями. Большое значение имеет определение экспрессии генов, функции которых могут быть нарушены в результате развития заболеваний. Известно, что большое значение для диагностики злокачественности или определения прогноза при раке играет выявление мутаций гена Nrf2, так как значительную роль этот транскрипт имеет для дифференцировки клеток [1]. Определение уровня экспрессии гена NrfII позволяет определить дифференцировку, а, следовательно, диагностировать лейкоз.

Научная новизна исследования заключается в том, что не обнаружены сведения об определении экспрессии гена NrfII у больных с хроническим и миелоидным лейкозом и острым лейкозом, проживающих в Карагандинской области.

Практическая значимость настоящего исследования заключается в помощи врачам-гематологам достоверно диагностировать онкогематологические заболевания и определять стратегию лечения с учетом наличия или отсутствия экспрессии гена NrfII.

Целью работы было определение экспрессии гена NrfII в крови больных хроническим миелоидным лейкозом, проживающих в Карагандинской области. Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие **задачи**:

- амплифицировать фрагменты молекул к ДНК, выделенных из крови пациентов с хроническим и острым миелоидным лейкозом;
- определить уровень экспрессии гена NrfII.

Материалы и методы

В качестве объектов исследования использовали кровь шести пациентов с различными формами лейкозов. Проведение данного анализа осуществлялось в 3 этапа, и включало в себя 4 этапа: 1) пробоподготовку, 2) выделение РНК из клинических образцов, 3) постановку реакции обратной транскрипции, 4) постановку и проведение полимеразной цепной реакции и детекцию продуктов амплификации.

Для проведения всех молекулярно-генетических манипуляций с клиническими образцами, целью которых являлось выделение мРНК транскрипта NrfII методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени», применяли

набор реагентов «АмплиСенс Лейкоз Квант М-BCR-FRT», фирмы-производителя ООО «ИнтерЛабСервис».

Набор реагентов включает три комплекса:

- «Рибо-золь-D» - предназначенный для выделения РНК из клинического материала;
- «REVERTA-L» - необходимый компонент проведения реакции обратной транскрипции, с целью получения кДНК на матрице РНК;
- «АмплиСенс» вариант FRT- для ПЦР-амплификации кДНК с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Данный набор реагентов предназначен для скринингового выявления случаев ХМЛ, ассоциированных с хромосомной перестройкой M-BCR-ABL, для подтверждения данного диагноза, а также для мониторинга минимальной остаточной болезни (MRD) и эффективности терапии.

Согласно инструкции, для проведения ПЦР - анализа необходимо было осуществить предобработку проб образцов, для чего пробирки с отобранной кровью центрифугировали в течение 20 минут при комнатной температуре не позднее 48 часов после забора крови (при условии хранения цельной крови при температуре 2-6°C). Все белые клетки крови (белая пленка на поверхности отстоявшейся эритроцитарной массы - «лейкоцитарное кольцо») - аккуратно отбирали (до общего объема образца 200мкл, при этом захват эритроцитов и плазмы допустимы) и немедленно перемещали в подготовленные пробирки объемом 1,5 мл с 800 мкл лизирующего раствора D из прилагавшегося комплекта реагентов «Рибо-золь-D» и тщательно перемешивали.

Выделение РНК из клинических образцов было осуществлено с применением комплекта «Рибо-золь-D» вариант 100, состоящего из 7 основных реагентов (лизирующий раствор D, растворы E, A, B, предназначенные для экстракции НК, C – реагент для преципитации РНК, раствор для отмывки 3, РНК-элюент bcr-abl) и 4 дополнительных (ОКО, rРНК1мкг/мкл, ПКО-1 bcr-abl-rec, ПКО-2 bcr-abl-rec).

Постановку реакции обратной транскрипции осуществляли с применением комплекта реагентов «REVERTA-L» вариант 100, включающего в себя основные компоненты для приготовления реакционной смеси: RT-G-mix, RT-mix, ревертазу (MMlv), ДНК-буфер.

После выделения РНК из клинического материала для получения препарата кДНК проводили реакцию обратной транскрипции, используя программируемый термостат - амплификатор «Терцик» фирмы-производителя «ДНК-Технология», по программе, приведенной в таблице 1.

Таблица 1 - Программа амплификации для проведения реакции обратной транскрипции

Этап	Температура	Продолжительность этапа
1	50°C	15 мин
2	95°C	3 мин

Последующую полимеразную цепную реакцию (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» производили в амплификаторе «ДТ-322», производства ООО «НПО ДНК-Технология». Использовали праймеры, рекомендованные Bobilev I., Novik V., Danilenko M. [1]. Олигонуклеотиды были синтезированы фирмой «Синтол».

Программа амплификации представлена в таблице 2.

Таблица 2 - Программа амплификации для проведения ПЦР в режиме «реального времени»

Этап	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Число циклов
1	94	3 мин	-	1
2	94	15 с	-	38
	62	1 мин	+	
3	10	-	хранение	

Для повышения достоверности результатов исследования в данной методике предусмотрено использование эндогенного внутреннего контроля, что позволяет контролировать основные этапы анализа (забор, транспортирование, выделение РНК, проведение реакции обратной транскрипции РНК и непосредственно амплификации кДНК)

С целью дополнительного контроля основных этапов проведения анализа применяли положительный и отрицательный (ОКО) контрольные образцы.

Результаты и обсуждение

Для определения уровня экспрессии гена Nr1H проводили предварительные эксперименты. Определяли оптимальные условия прохождения ПЦР в режиме реального времени. В результате постановки реакции с концентрациями праймеров 20 пмоль, 10 пмоль, 5 пмоль, 2.5 пмоль и при температурах отжига праймеров 58°C, 60°C, 62°C, 64°C определили, что наибольший уровень амплификации наблюдается при температуре 62°C (рисунок 1) и концентрации прямого праймера 10 пмоль, обратного - 20 пмоль. Концентрация прямого и обратного праймеров также была определена в предыдущих экспериментах по схеме, представленной в таблице 3.

Таблица 3 - Схема эксперимента по определению соотношения праймеров различных концентрации

	F 20	F 10	F 5	F 2.5
R 20	20/20	20/10	20/5	20/2.5
R 10	10/20	10/10	10/5	10/2.5
R 5	5/20	5/10	5/5	5/2.5
R 2.5	2.5/20	2.5/10	2.5/5	2.5/2.5

F – прямой праймер

R- обратный праймер

Анализ кривой плавления показал, что оптимальной концентрацией является соотношение концентраций прямого и обратного праймеров 10 пмоль и 20 пмоль соответственно.

Температуру денатурации и элонгации не тестировали, так как они известны из литературных данных [2-5].

Фотография электрофореграммы представлена на рисунке 1.

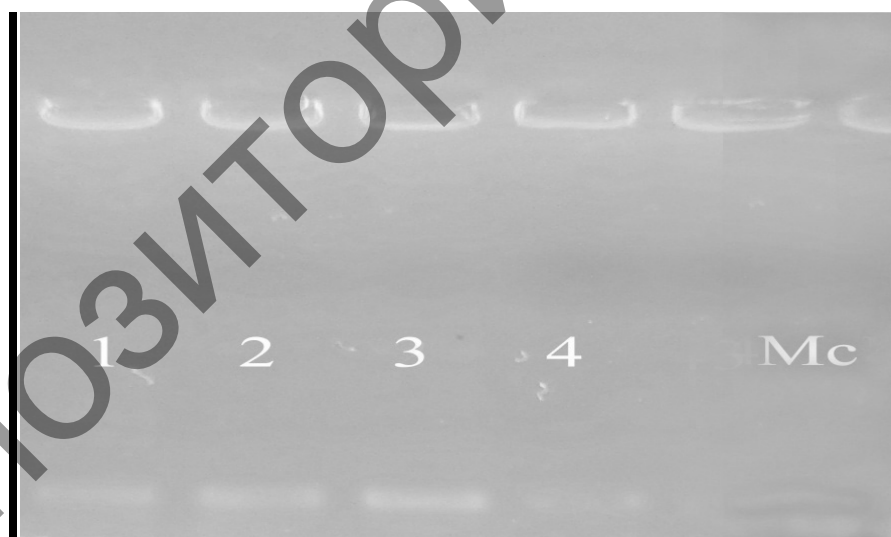


Рисунок 1. Электрофореграмма продуктов амплификации, проведенной при различных температурах отжига.

1. фрагменты, синтезированные при Tm 58°C;
2. фрагменты, синтезированные при Tm 60°C;
3. фрагменты, синтезированные при Tm 62°C;
4. фрагменты, синтезированные при Tm 64°C;

Mc – маркер молекулярного веса.

Электрофореграмма демонстрирует, что наиболее оптимальной температурой отжига праймера является 62°C.

Последующие исследования проводили, анализируя кровь пациентов с диагнозами хронический миелоидный и хронический и острый лимфоцитарный лейкоз (таблица 3). Согласно

данным, представленным в таблице 3, у двух пациентов диагностировали хронический миелоидный лейкоз, у троих – острый лимфоцитарный и у одного – хронический лимфоцитарный лейкоз. Также у двух пациентов обнаружена филадельфийская хромосома. Три пациента из шести впервые заболели, а у остальных наблюдается рецидив, то есть они являются повторно заболевшими.

С целью проведения амплификации молекул нуклеиновых кислот выделяли РНК, для получения кДНК ставили реакции обратной транскрипции. При постановке ПЦР в режиме реального времени использовали результаты, полученные в предыдущих экспериментах с определением концентрации праймеров и температурного режима их отжига.

Таблица 4 - Диагноз и стадия развития заболевания

Номер пациента	Диагноз	Стадия
1	Хронический миелоидный лейкоз (фи хромосома)	Первоначальная
2	Острый лимфоцитарный лейкоз	Первоначальная
3	Острый лимфоцитарный лейкоз	рецидив
4	Острый лимфоцитарный лейкоз (фи хромосома)	рецидив
5	Хронический лимфоцитарный лейкоз	рецидив
6	Хронический миелоидный лейкоз	Первоначальная

Поскольку все реакции ставили в аппарате с Real-time ПЦР, детекцию результатов проводили непосредственно в процессе амплификации.

Всего проанализировали 6 образцов (таблица 2). В качестве отрицательного контроля использовали воду. Результаты одного из экспериментов представлены на рисунке 2. Номера образцов соответствует номерам пациентов, приведенных в таблице 3.

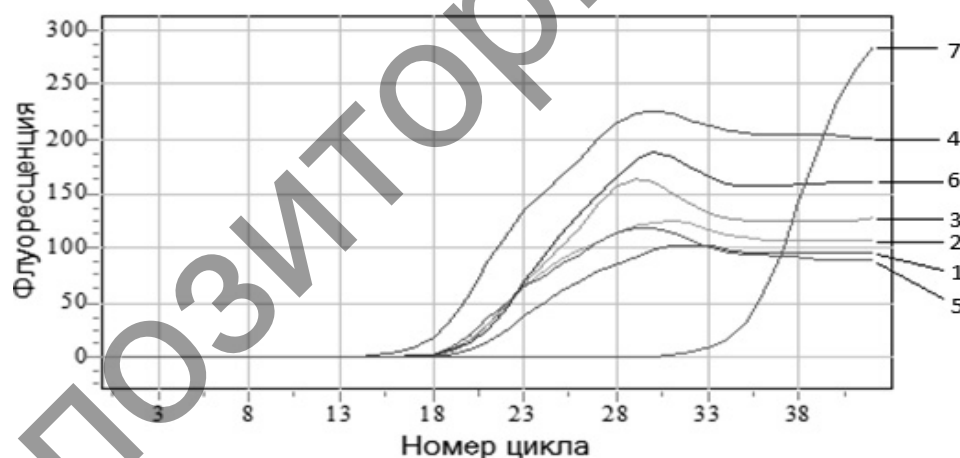


Рисунок 2. Кривые плавления образцов, взятых для определения уровня экспрессии гена NrflI

- 1- пациент с хроническим миелоидным лейкозом
- 2- пациент с острым лимфоцитарным лейкозом
- 3- пациент с лимфоцитарным лейкозом
- 4- пациент с острым лимфоцитарным лейкозом
- 5- пациент с хроническим лимфоцитарным лейкозом
- 6- пациент с хроническим миелоидным лейкозом
- 7- отрицательный контроль

Из рисунка видно, что в образцах №1,2,3,5,6 наблюдается слабая экспрессия гена NrflI, в образце №4 – достаточно сильная. Образец №7 является отрицательным контролем, поэтому у него не наблюдается экспрессии исследуемого гена.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что у больных различными формами лейкозов уровень экспрессии изучаемого гена довольно низкий, что доказывает связь между развитием лейкоза и уменьшением уровня экспрессии гена NrffII.

На основании проведенных исследований можно сделать следующие выводы:

1. В результате подбора оптимальных условий амплифицированы фрагменты молекул кДНК, выделенных из крови пациентов с хроническим и острым миелоидным лейкозом.
2. Определен уровень экспрессии гена NrffII у 6 пациентов с диагнозами острый и хронический лейкоз. В 5 случаях обнаружена слабая экспрессия, что свидетельствует об отсутствии дифференцировки клеток и требует лечения соответствующими препаратами.

Литература:

1. Bobilev I, Novik V, Levi I, Shpilberg O, Levy J, Sharoni Y, Studzinski G.P., Danilenko M. The Nrff2 transcription factor is a positive regulator of myeloid differentiation of acute myeloid leukemia cells. *Cancer Biology & Therapy* 2011;11; 317-329
2. Validation of Gene Expression Data by Quantitative Real Time PCR, Maurizio Provenzano and Simone Mocellin, 2007
3. The real-time polymerase chain reaction Mikael Kubista a,*, Jose' Manuel Andrade b, Martin Bengtsson a, c, Amin Forootan d, Jiri Jona'k e, Kristina Lind a, f, Radek Sindelka e, Robert Sjo'back a, Bjo'rn Sjo'green d, Linda Stro'mbom a, Anders Sta hlberg a, g, Neven Zoric a, 2006
4. Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. М: Мир, 2002, с. 94-96.
5. Mullis K.B., F.Ferre, Gibbs R.A.1994. The polymerase chain reaction. Birkhauser, Boston, Mass.

Мукумбекова Д.М., Карагандинский государственный университет имени академика Е.А.Букетова, факультет математики и информационных технологий, студентка гр. МКМ-214
(Научный руководитель – д.т.н., профессор **Кажикенова С.Ш.**)

ОБ ОДНОМ МЕТОДЕ РЕШЕНИЯ УРАВНЕНИЙ ГИДРОДИНАМИКИ

Для компьютерного моделирования течения расплавов необходимо численное решение уравнений гидродинамики методом конечных разностей.

Рассмотрим плоское течение. Пусть Ω – область евклидова пространства R^n , причем $x = (x_1, x_2)$.

Для демонстрации данного метода после соответствующих преобразований перепишем уравнение гидродинамики в виде:

$$\frac{\partial v}{\partial t} + \sum_{k=1}^n Z_k(v) - \frac{1}{\varepsilon} \nabla \operatorname{div} v = f, \quad (1)$$

$$\text{где: } Z_k(w) = -\gamma \frac{\partial^2 w}{\partial x_k^2} + v_k \frac{\partial w}{\partial x_k} + \frac{1}{2} \frac{\partial v_k}{\partial x_k} w.$$

Для простоты рассмотрим случай, когда $n = 2$. Для этого разобьем временной интервал $[0, T]$

точками: $t_m = m\Delta t, t_{m-\frac{1}{2}} = \left(m - \frac{1}{2}\right)\Delta t, m = 1, 2, \dots, N$. Это позволит рассмотреть слои t_m и t_{m-1} .

Тогда уравнение (1) можно представить следующей разностной схемой:

$$\frac{1}{\Delta t} \left(v_1^{m-\frac{1}{2}} - v_1^{m-1} \right) + \tau_2^m \left(v_1^{m-\frac{1}{2}} \right) = \frac{1}{2} f_1^{m-\frac{1}{2}}, \quad (2)$$