

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ БІЛІМ ЖӘНЕ ҒЫЛЫМ МИНИСТРЛІГІ

Қ.И. Сәтбаев атындағы Қазақ ұлттық техникалық зерттеу университеті

Геология және мұнай-газ ісі институты

Химиялық және биохимиялық инженерия кафедрасы

Нурим Жұлдыз Мирланқызы

miRNA-ның нысана гендермен өзара байланысын және олардың онкологиялық аурулардағы экспрессиясын анықтау

ДИПЛОМДЫҚ ЖҰМЫС

Биотехнология - 5B070100

Алматы 2022

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ БІЛІМ ЖӘНЕ ҒЫЛЫМ МИНИСТРЛІГІ

Қ.И. Сәтбаев атындағы Қазақ ұлттық техникалық зерттеу университеті

Геология және мұнай-газ ісі институты

Химиялық және биохимиялық инженерия кафедрасы



ДИПЛОМДЫҚ ЖҰМЫС

Тақырыбы: «miRNA-ның нысана гендермен өзара байланысын және олардың онкологиялық аурулардағы экспрессиясын анықтау»

Биотехнология - 5B070100

Орындаған: Нурим Ж.М.

Пікір беруші
Әл-Фараби атындағы Қаз ҰУ-ның
Биология және биотехнология
кафедрасының
профессоры, б.ғ.к.

Атамбаева Ш.А.

Ғылыми жетекші

Ph.D докторы

Амитова А.А.

Алматы 2022

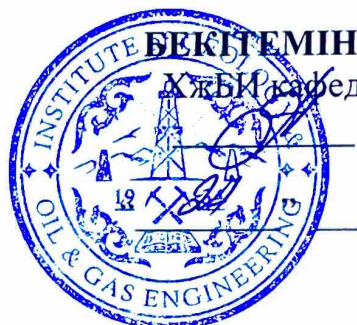
ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ БІЛІМ ЖӘНЕ ҒЫЛЫМ МИНИСТРЛІГІ

Қ.И. Сәтбаев атындағы Қазақ ұлттық техникалық зерттеу университеті

Геология және мұнай-газ ісі институты

Химиялық және биохимиялық инженерия кафедрасы

Биотехнология - 5B070100



ХЖБИ кафедра меңгерушісі
Ph.D докторы
Амитова А.А.
25 2022ж.

Дипломдық жұмыс орындауға
ТАПСЫРМА

Білім алушы: Нурим Ж.М.

Тақырыбы: miRNA-ның нысана гендермен өзара байланысын және олардың онкологиялық аурулардағы экспрессиясын анықтау

Университет Ректорының 2021 жылғы "24" желтоқсан №489 П/Ө
бұйрығымен бекітілген

Аяқталған жұмысты тапсыру мерзімі 2022 жылғы "31" мамыр

Дипломдық жұмыстың бастапқы берілістері: *Диплом алдындағы тақырып бойынша әдебиеттерге шолу нәтижелері, теориялық мәліметтер жинағы*
Дипломдық жұмыста қарастырылатын мәселелер тізімі

а) *Электрондық дерекқорлар базасынан miR-16-5p-ның нысана-гендерін және олардың байланысу ерекшеліктерін сипаттау.*

б) *Эксперименттік зерттелген жұмыс көздерінен сүт безі қатерлі ісігіне биомаркер ретінде ұсынылған miR-16-5p-ның мәнін анықтау*

в) *Сүт безі қатерлі ісігіне биомаркер ретінде ұсынылған miR-16-5p-ның Қазақстандық әйелдер арасында зерттеу жұмысын салыстырмалы түрде бақылау*

Ұсынылатын негізгі әдебиет 40 атаудан тұрады

Дипломдық жұмысты (жобаны) дайындау

КЕСТЕСІ

Бөлімдер атауы, қарастырылатын мәселелер тізімі	Ғылыми жетекші мен кеңесшілерге көрсету мерзімдері	Ескерту
Тақырыптар бойынша әдебиетке шолу, мақалалар оқу, аудару	Қаңтар	-
Лабораторияға келу, дипломдық жұмыстың жазылу ретімен танысу, әдістермен танысу, жұмысқа кіріспе	Қараша-Ақпан	-
Тақырыптар бойынша қолданылған әдістерді дипломдық жұмысқа қосу	Наурыз	-
Алынған нәтижелерді талқылау, дипломдық тақырып бойынша студенттер мен жас ғалымдардың халықаралық ғылыми конференциясына тезис дайындау	Наурыз-Сәуір	-

Дипломдық жұмыс (жоба) бөлімдерінің кеңесшілері мен норма бақылаушының аяқталған жұмысқа (жобаға) қойған
қолтаңбалары

Бөлімдер атауы	Кеңесшілер, аты, әкесінің аты, тегі (ғылыми дәрежесі, атағы)	Қол қойылған күні	Қолы
Норма бақылау	Белкожаев А.М. (тьютор, жаратылыстану ғылымдарының магистрі, PhD кандидат)	26.05.2022ж	
Ғылыми кеңесшісі	Белкожаев А.М. (тьютор, жаратылыстану ғылымдарының магистрі, PhD кандидат)	06.05.2022ж	

Ғылыми жетекші  Ph.D докторы, Амитова А.А.

Тапсырманы орындауға алған білім алушы  Нурим Ж.М.

Күні

" 24 " 05 2022ж.

АНДАТПА

«miRNA-ның нысана гендермен өзара байланысын және олардың онкологиялық аурулардағы экспрессиясын анықтау» атты дипломдық жұмыстың көлемі 30 беттен тұрады. Дипломдық жұмыс кіріспеден, 3 бөлімнен және қорытындыдан, 10 суреттен, 3 кестеден, 40 атаудан тұратын ғылыми мақалалар мен оқу құралдары көрсетілген тізімнен тұрады. Дипломдық жұмыстың мақсаты онкологиялық ауруларға, соның ішінде сүт безі қатерлі ісігіне биомаркерлер ретінде ұсынылған айналымдағы miR-16-5p-ның диагностикалық мәнін Қазақстандық әйелдер арасында салыстырмалы түрде сипаттау. Дипломдық жұмыстың негізгі міндеттері: электрондық дерекқорлар базасынан негізгі miR-16-5p-ның нысана гендерін және олардың байланысу ерекшеліктерін сипаттау; Эксперименттік зерттелген жұмыс көздерінен сүт безі қатерлі ісігіне биомаркер ретінде ұсынылған miR-16-5p-ның мәнін анықтау; Сүт безі қатерлі ісігіне биомаркер ретінде ұсынылған miR-16-5p-ның Қазақстандық әйелдер арасында зерттеу жұмысын салыстырмалы түрде бақылау. *Кілттік сөздер:* miRNA, mRNA, онкология, ген, экспрессия.

АННОТАЦИЯ

Объем дипломной работы «Определение взаимодействия miRNA с генами-мишенями и их экспрессии при онкологии» составляет 30 страниц. Дипломная работа состоит из введения, 3 глав и заключения, списка научных статей и учебников, состоящего из 10 рисунков, 3 таблиц, 40 названий. Цель дипломной работы - сравнительная характеристика диагностической ценности циркулирующей miR-16-5p, рекомендованной в качестве биомаркера онкологических заболеваний, в том числе рака молочной железы, у женщины Казахстана. Основные задачи дипломной работы: Описание основных генов miR-16-5p из электронных баз данных и особенности их соединения; Определение значения miR-16-5p, представленного в качестве биомаркера рака молочной железы из экспериментально изученных источников; Сравнительный мониторинг исследований miR-16-5p, рекомендованных в качестве биомаркера рака молочной железы у женщины Казахстана. *Ключевые слова:* miRNA, mRNA, онкология, ген, экспрессия.

ANNOTATION

The volume of the thesis work "Determining the interaction of miRNA with target genes and their expression in oncology" is 30 pages. The thesis consists of an introduction, 3 chapters and a conclusion, a list of scientific articles and textbooks, consisting of 10 figures, 3 tables, 40 titles. The purpose of the thesis is the comparative description of the diagnostic value of circulating miR-16-5p, recommended as a biomarker for oncological diseases, including breast cancer, among Kazakhstan's women. The main objectives of the thesis: Description of the main miR-16-5p genes from electronic databases and features of their connection; Determination of the value of miR-16-5p, presented as a biomarker for breast cancer from experimentally studied sources; A comparative study of the miR-16-5p, recommended as a biomarker for breast cancer, among Kazakhstan's women. *Key words:* miRNA, mRNA, oncology, gene, expression.

МАЗМҰНЫ

Кіріспе	9
Негізгі бөлім	10
1 Әдебиетке шолу	10
1.1 Қатерлі ісіктің дамуындағы геномның рөлі	10
1.2 Қатерлі ісік геномы және диагностикасы	12
1.3 Mirna және олардың онкологиялық аурулардың дамуындағы рөлі	14
2 Зерттеу материалдары мен әдістері	18
2.1 Биоинформатикалық талдау программалары	18
2.2 Қаннан днк бөлу әдісі	18
2.3 Сандық птр әдісімен жұмыс жасау барысы	19
3 Зерттеу нәтижелері	22
3.1 Биоинформатикалық жағдайда mir-16-5p-ның нысана-гендерін және олардың байланысу ерекшеліктерін сипаттау.	22
3.2 Эксперименттік зерттелген жұмыс көздерінен сүт безі қатерлі ісігіне биомаркер ретінде ұсынылған mir-16-5p-ның мәнін анықтау.	24
3.3 Сүт безі қатерлі ісігіне биомаркер ретінде ұсынылған mir-16-5p-ның қазақстандық әйелдер арасында зерттеу жұмысын салыстырмалы түрде бақылау	25
Қорытынды	27
Пайдаланылған әдебиеттер тізімі	28

КІРІСПЕ

Қазіргі таңда ісік аурулары әлем халқының өлімінің негізгі себептерінің бірі болып отыр. Дүниежүзілік денсаулық сақтау ұйымының мәліметтері бойынша дамыған елдерде әйелдер арасында жиі кездесетін ауру ол сүт безі ісігі, бұл әйелдер арасындағы барлық қатерлі ісік жағдайларының 16% құрайды. Онкологиялық ауруларды емдеудегі басты мәселесі ол ерте диагностиканың сенімді әдістерінің жоқтығы болып табылады. Ісікті ерте симптоматикалық анықтау ісіктің генетикалық маркерлерін талдау арқылы мүмкін болады. МикроРНК (miRNA) молекулалары ісіктерді ерте диагностикалау және болжау үшін өте перспективалы ісік маркерлері болып табылады.

Өзектілігі. Онкологиялық аурулар, әсіресе сүт безі қатерлі ісігі бүкіл әлемде адам өлімінің басты мәселесі екені белгілі. Қазіргі уақытта miRNA ісіктерді ерте диагностикалау және болжау үшін перспективалы маркерлер болып табылады. Сондықтанда біздің дипломдық жұмысымызда miRNA-ның нысана гендермен өзара байланысын және олардың онкологиялық аурулардағы экспрессиясын анықтау маңызды жұмыстардың бірі болып табылады.

Ғылыми жаңалығы. miRNA молекулалары қатерлі ісікті ерте сатыда анықтауға арналған келешегі бар онкомаркерлер болып табылады. Биологиялық сұйықтықтарда айналып жүретін miRNA онкологиялық ауруларды ерте анықтау әдісін жасап шығарудың бірегей мүмкіндігін береді.

Зерттеу нысаны: Қан плазмасынан бөлінген РНК үлгілері, зерттелген әдебиет көздерінен алынған нәтижелер.

Зерттеу әдістері: Биоинформатикалық талдау программалары, РНК\ДНК бөлу, спектрофотометриялық талдау, кері транскрипция, сандық ПТР, статистикалық талдау.

Жұмыстың мақсаты: Онкологиялық ауруларға, соның ішінде сүт безі қатерлі ісігіне биомаркерлер ретінде ұсынылған айналымдағы miR-16-5p-ның диагностикалық мәнін Қазақстандық әйелдер арасында салыстырмалы түрде сипаттау.

Міндеттер:

1. Электрондық дерекқорлар базасынан miR-16-5p-ның нысана гендерін және олардың байланысу ерекшеліктерін анықтау.
2. Эксперименттік зерттелген жұмыс көздерінен сүт безі қатерлі ісігіне биомаркер ретінде ұсынылған miR-16-5p-ның мәнін анықтау.
3. Сүт безі қатерлі ісігіне биомаркер ретінде ұсынылған miR-16-5p-ның Қазақстандық әйелдер арасында зерттеу жұмысын салыстырмалы түрде бақылау.

Жұмысты орындаудың практикалық базасы: Satbayev University-нің химиялық және биохимиялық кафедрасының компьютерлік класстарында in silico-лық, яғни биоинформатикалық зерттеу жұмыстары жүргізілді. М. Ә. Айтхожин атындағы молекулярлық биология және биохимия институтында практикадан өту барысы жүргізілді.

НЕГІЗГІ БӨЛІМ

1 ӘДЕБИЕТКЕ ШОЛУ

1.1 Қатерлі ісіктің дамуындағы геномның рөлі

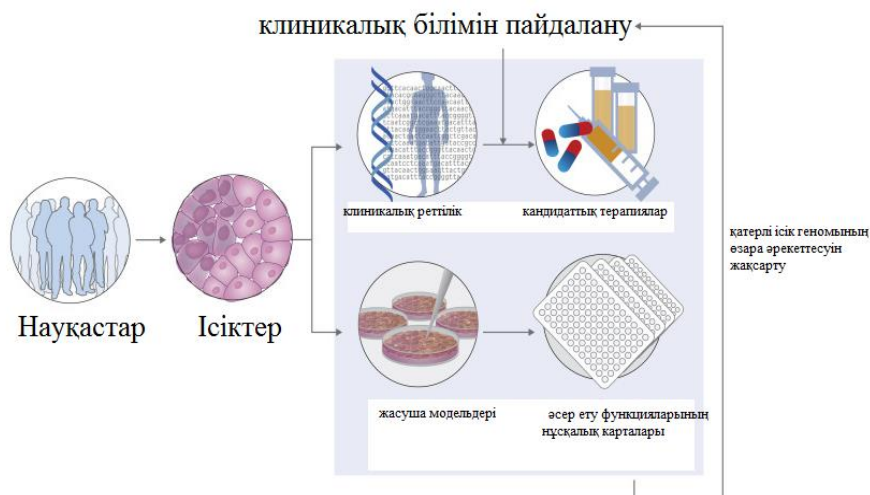
Қатерлі ісіктің дамуындағы геномның рөлін көрсететін ең алғашқы зерттеулер рак клеткаларының аберрантты хромосомаларындағы айырмашылықтарды микроскопиялық жолмен анықтау арқылы жүз жылдан астам уақыт бұрын пайда болды, бұл қатерлі ісік патологиялық тұқым қуалайтын материалымен байланысты деген болжамға әкелді [1-2]. Бұл болжам Уотсон мен Криктің ашылуы нәтижесінде ДНҚ-ның тұқым қуалайтын ақпаратты тасымалдаушы рөлі жалпыға танылған соң расталды және оның құрылымының зақымдануы мен модификациясы қатерлі трансформацияға ықпал ететін мутагендік процесті тудыруы мүмкін екендігі көрсетілді [3].

Соңғы жылдардағы зерттеулер қатерлі ісіктің пайда болуы үшін бір гендегі мутацияның болуы немесе пайда болуы ғана қажет емес екенін түсінуге әкелді. Оның дамуына реттелмеген генаралық өзара әрекеттесу де ықпал ететіні белгілі болды, сонымен қатар әртүрлі гендердің тұтастығын бұзу бір нәтижеге - қатерлі трансформацияға әкелуі мүмкін. Мысал ретінде киназалардың синтезін кодтайтын гендер – *CDK4*, циклин *D1*, *Rb* – ретинобластома ақуызы, *p16* – *CDK* ингибиторы сияқты әртүрлі гендердің мутациясына байланысты жасушалық циклды бақылаудың бұзылуын келтіруге болады. Бұл гендердің алғашқы екеуі онкогендер, ал *Rb* және *p16* онкосупрессорлар. Онкогенез процесін зерттеудің қиындықтары әртүрлі органдардағы және әртүрлі эксперименттік объектілердегі бірдей мутациялар әртүрлі, тіпті қарама-қарсы әсерлерге әкелуі мүмкін екендігімен де қиындайды. *KRAS2* генінің мутациясы ұйқы безінің қатерлі ісігін қоздырады, бірақ тоқ ішек пен аналық бездердің жасушаларында процестің теріс реттеушісі ретінде қызмет етеді. Қалыпты жасушаларда осы рөлде әрекет ете отырып, *KRAS2* геніндегі мутация жасушаларда неоплазияның дамуына ықпал етеді, онда *APC* геніндегі мутация нәтижесінде қатерлі ісіктің басталуына алғышарттар жасалған. *RAS* гені адам ісіктерінде онкоген ретінде әрекет етеді, бірақ тышқан ісіктерінде онкосупрессор ретінде қызмет етеді [4-6].

Соматикалық мутациялар ДНҚ құрылымындағы өзгерістерден туындауы мүмкін. Бұл өзгерістер бір нуклеотидті алмастыру, әртүрлі өлшемдегі ДНҚ фрагменттерін енгізу немесе жою, ДНҚ бөлімдерін қайта құру, қалыпты диплоидты геномда болатын екі көшірмеден бірнеше жүзге дейін ұлғаюы - гендердің күшейтілуі нәтижесінде пайда болады. Заманауи түсініктерге сәйкес, қатерлі ісіктің дамуы гендердің үш түрінің қалыпты құрылымында мутацияның болуы нәтижесінде пайда болады, олар онкогендер, онкосупрессорлар және геномның тұрақтылығын сақтайтын гендер. Онкогеннің активтенуі хромосомалық транслокациялар, гендердің амплификациясы және ең көп таралған жалғыз нуклеотидті алмастырулар немесе полиморфизмдер (бір

нуклеотидтік полиморфизм-SNP) сияқты ДНҚ өзгерістерінің нәтижесінде болуы мүмкін [7-8].

Онкосупрессорлардың функционалдық мүмкіндіктерінің (инактивациясының) өзгеруі гендік өнім мөлшерінің немесе белсенділігінің төмендеуі нәтижесінде басқа жолмен жүреді. Мұндай инактивацияның себептері өнім ақуызының белсенділігіне, оның қалыпты конформациясына, делецияларға жауапты аймақтардағы кате мутациялар немесе эпигенетикалық өзара әрекеттесулер (тыныштау) болуы мүмкін. Әдетте, мутацияланған ісік супрессор гені бар жасушалардың селективті артықшылығы үшін геннің екі аллельінде де өзгерістер қажет. Онкогенезге байланысты гендердің үшінші класына геномның тұтастығын сақтайтын гендер жатады. Олардың құрылымындағы бұзушылықтар қалыпты жағдайда да, әртүрлі сипаттағы мутагендік әсерлер кезінде де репликация кезінде генетикалық ақпаратты дәл беруді қамтамасыз ететін жөндеу процестерінің тиімділігін төмендетеді [9]. Олардың кейбіреулері ДНҚ деңгейінде жұмыс істейді, әртүрлі механизмдер арқылы жүретін репаративті процестерге жауап беретін гендер: MMR (сәйкессіздікті жөндеу), NER (нуклеотидтерді жою жөндеу), BER (негізді эксцизияны жөндеу), HRR (гомологиялық рекомбинацияны жөндеу). Сонымен қатар, болашақ клиникалық болжамдарды жақсарту дәл медициналық болжамдарды жақсарту үшін біріктірілген клиникалық деректер мен мұқият орындалған және салыстырылған эксперименттік деректер біріктірілуі мүмкін. Мұндай жұмыс сонымен қатар есептеу нұсқаларының әсер етуді болжау алгоритмдерін итеративті түрде нақтылауға көмектесуі керек [10-11] (Сурет 1).



1 Сурет - Қатерлі ісік ауруындағы нақты функционалдық геномикадағы прогресс

Көптеген қалпына келтіру гендері жоғары деңгейде сақталған және бактериялардан адамға дейін эволюциялық деңгейде ұқсастықтары бар. Репарация гендерінде полиморфты аллельдердің болуы жасушалық және тіндік

деңгейде ДНК-ның зақымдалуын тудыратын және әртүрлі аурулардың, соның ішінде қатерлі ісіктің дамуын қоздыратын экзогендік және эндогендік агенттердің әрекетіне жеке жауаптың айырмашылығын анықтайды. Геномның тұрақтылығын сақтайтын гендердің тағы бір бөлігі митоздық рекомбинация және хромосомалық сегрегация кезінде хромосомалық деңгейде әрекет ететін - *BRCA*, *BLM*, *ATM* т.б. гендер. Бұл гендер тобы үшін ісіктерді басатын гендер сияқты, қалыпты физиологиялық белсенділікті жоғалту үшін екі аллельді де инактивациялау қажет [12]. Бұл гендер тобының мутация қаупі әртүрлі және геннің фенотиптік көрінісінің жиілігін немесе ықтималдығын білдіретін пенетранттылықпен сипатталады. Жоғары енетін аллельдер, ең алдымен, екі онкосупрессорлық гендер *BRCA1* және *BRCA2* үшін тән, олардың пайда болуы төмен, дегенмен мутация тасымалдаушыларда сүт безі обырының даму қаупі мутацияны тасымалдамайтындардағы осы қауіптен 10-30 есе жоғары. *p53* генінің кейбір жоғары енетін аллельдері онкологиялық аурулармен ауыратын науқастардың геномында бар (Ли-Фраумени синдромы және Пейц-Джегер синдромы). Жиыныс жасушаларындағы мутациялар қатерлі ісікке тұқым қуалайтын бейімділікке әкелуі мүмкін болса, олардың соматикалық жасушаларда пайда болуы қатерлі ісіктің спорадикалық түрлерінің дамуын тудырады. Жиыныс жасушаларында мутацияның болуы аурудың басталуы үшін жеткіліксіз, оның жеке өміріндегі дамуы әртүрлі сыртқы қоздырғыш факторлардың әсерімен де анықталады. Бұл факторларға иондаушы сәулелердің, ультракүлгін сәулелердің, химиялық (канцерогендік) қосылыстардың әсері жатады. Организмге әсер етудің алғашқы екі түрінен қорғау әртүрлі жөндеу жүйелерінің толық жұмыс істеуімен қамтамасыз етіледі. Күрделі органикалық қосылыстардың (канцерогендердің) генотоксикалық әсерінен қорғау негізінен *P450* цитохромы (*CYP*) және глутатион-S-трансферазалардың кең тобына жататын гендердің екі тобымен бақыланатын күрделі жоғары тиімді детоксикация жүйелерінің жұмыс істеуі нәтижесінде қамтамасыз етіледі [13-14].

1.2 Қатерлі ісік геномы және диагностикасы

Соңғы онжылдықта қатерлі ісік механизмдерін зерттеушілер арасында түбегейлі жаңа «рак геномы» термині пайда болды және молекулалық генетика мен биомедицинаның басым міндеттерінің бірі гендердің дамуын анықтайтын гендер мен олардың мутацияларын анықтау болды. Оны шешу барысында үнемі жетілдіріліп отыратын әдістемелік және аналитикалық тәсілдер арқылы алынған деректердің үлкен көлемі ғана емес, одан да көп жаңа сұрақтар туындады [15].

Қатерлі ісік гендері тіндердің алуан түрлілігімен сипатталады және әртүрлі мутация түрлерін көрсетеді. *TP53* және *KRAS* сияқты кейбір гендер қатерлі ісіктің әртүрлі түрлерінде жиі мутацияға ұшырайды, ал басқалары сирек кездеседі және/немесе ісіктің бір түрімен шектеледі. Тоқ ішек және ұйқы

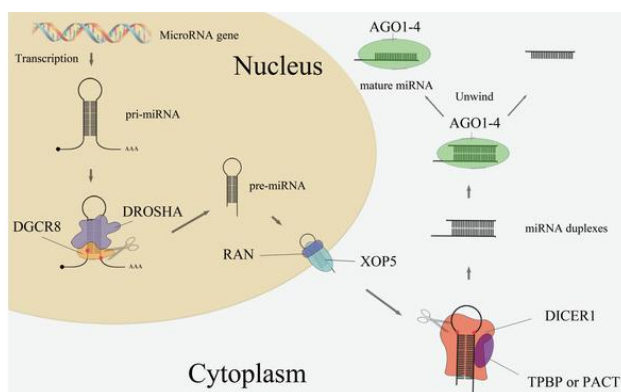
безінің қатерлі ісігі сияқты қатерлі ісік ауруларында бірнеше қатерлі ісік гендерінің ауытқулары ортақ шығу тегі бар. Керісінше, асқазанның қатерлі ісігінде барлық гендердегі мутацияның салыстырмалы түрде аз саны анықталады. Қатерлі ісік гендерінің шамамен 90%-ы доминантты, яғни бір аллельді инактивтендіретін мутация қатерлі ісік тудыруы үшін жеткілікті. Мұндай жағдайларда мутация, әдетте, кодталған ақуыздың белсендірілуіне әкеледі. Қалған он пайызы екі аллельде де мутациямен сипатталатын рецессивті гендер ретінде әрекет етеді және бұл әдетте ақуыз дисфункциясына әкеледі (гендер ісіктерді басатын гендер деп те аталады). Мутациялардың үлгілері немесе үлгілері доминантты және рецессивті нұсқалар арасында ерекшеленеді. Рецессивті ісік гендері бір негізді алмастырудан бастап бүкіл геннің жойылуына дейін өзгертін, бірақ бір нәтижеге әкелетін кодталған ақуыздың жұмыс істеуін жоюға әкелетін мутациялардың алуан түрлерімен сипатталады [16]. Гендердің көпшілігі геномдық қайта құрылымдау арқылы тікелей белсендіріледі, онда екі түрлі гендердің бірізділіктерінің тіркесімі жаңа гибриді генді жасай алады. Гендердің транслокация жағдайы салыстырмалы түрде сирек кездеседі және бұрын лейкоздар, лимфомалар және саркомалар сияқты қатерлі ісіктерде сипатталған. Жақында гибриді қатерлі ісік гендері простата обыры мен өкпе аденокарциномасының жартысынан көбінде табылды. Бұл жақында ашылған жаңалық қатерлі ісікке байланысты гендік өзгерістердің үлкен санының арасында оларды анықтау қиындығын түсіндіруі мүмкін. Қатерлі ісік кезінде өзгертін және бұзылатын биологиялық жолдар мен процестер туралы көп нәрсе қатерлі ісік гендерінің жұмыс істеуі бойынша эксперименттер нәтижесінде белгілі болды. Қатерлі ісік гендерінің арасында гендердің белгілі бір топтары, атап айтқанда протеинкиназа ферменттерінің тобы ерекше орын алады. Сонымен қатар, қатерлі ісік гендері белгілі бір сигналдық жолдарда, атап айтқанда классикалық *MAPK/ERK* сигналдық жолында кластерлерді құрайды. Қазіргі уақытта қатерлі ісіктің кейбір түрлері үшін классификация және емдеу хаттамалары қатерлі ісік гендерінің болуымен анықталады. Жедел миелоидты лейкоз, мысалы, белгілі бір нақты гендерге әсер ететін өзгерістердің болуына байланысты бөлінеді. Әрбір кіші типте аурудың ағымының болжамын және терапиялық әдістерді мақсатты таңдауды анықтайтын нақты экспрессиялық профиль, жасуша морфологиясы және клиникалық ерекшеліктері бар. Сонымен қатар, қатерлі ісік жасушалары мутацияланған гендермен кодталған аномальды белоктарды қажет ететіндіктен, бұл белоктар жаңа терапевтикалық препараттарды әзірлеу мақсатына айналды. Дәрілердің осы жаңа буынының жетекші мүшелеріне созылмалы миелоидты лейкозда, асқазан-ішек стромальды ісіктерінде мутацияға ұшырап, белсендірілетін *ABL* және *KIT* гендерімен кодталған ақуыздың тежегіші болып табылатын иматиниб және трастузумаб атты кодталған ақуызға қарсы антидене кіреді [17-18].

1.3 miRNA және олардың онкологиялық аурулардың дамуындағы ролі

МикроРНК-лар (miRNA) өсімдіктерде, жануарларда және кейбір вирустарда кездесетін, ұзындығы 18–25 нуклеотид (орта есеппен 22 нуклеотид) болатын, РНК арқылы ген экспрессиясының транскрипциялық және посттранскрипциялық реттелуіне қатысатын кішігірім кодталмаған РНК молекулалары. МикроРНК өсімдіктер мен жануарлардың ядролық ДНҚ-сы және кейбір құрамында ДНҚ бар вирустардың вирустық ДНҚ-сы арқылы кодталады. МикроРНК ген белсенділігін басуға қатысады: олар мРНК аймақтарымен комплементарлы жұптасып, олардың трансляциясын тежейді. Сонымен қатар, микроРНК-мРНК кешендері көбінесе жасушамен тез ыдырайды. Сондай-ақ РНК-тәуелді ДНҚ метилденуі кезінде микроРНК-ның ДНҚ-мен тікелей әрекеттесу мүмкіндігін көрсететін деректер бар, бұл гендік репрессияның, аллельді алып тастаудың және транспозон белсенділігінің алдын алуының негізгі механизмдерінің бірі болып табылады [19-20].

Өртүрлі жасушалар мен ұлпалар миРНК-ның өртүрлі жиынтығын синтездейді, сондықтан оларды зерттеу жаңа молекулалардың ашылуына әкелуі мүмкін. МикроРНК-лар эукариоттар арасында жоғары деңгейде сақталады, ал микроРНК-лар ген экспрессиясын реттеу жүйесінің өмірлік маңызды және эволюциялық тұрғыдан ежелгі құрамдас бөлігі болып табылады деп саналады. МикроРНК-ның өмірлік циклінің негізгі құрамдас бөліктері өсімдіктер мен жануарларда бірдей болғанымен, осы екі патшалықтағы миРНК жиынтығы өртүрлі қызмет ету үлгілерімен дербес дамыды [21]. Өсімдік микроРНК-лары нысана мРНК-ға толық немесе толық дерлік комплементарлы сәйкестікпен сипатталады және олар нысана транскрипттердің деградациясын қоздыру арқылы гендік репрессияны тудырады. МикроРНК-ның транскрипттермен байланысуы кодтаушы және кодталмаған аймақтарда да болуы мүмкін. Жануарлардың миРНК-лары, керісінше, қажетті мРНК-ны оның 5' ұшында кемінде 6-8 нуклеотид арқылы тани алады. МикроРНК мен оның нысана мРНК арасында бір-бірден сәйкестік болмауы мүмкін: микроРНК-да бірнеше нысана мРНК болуы мүмкін, ал мРНК-да бірнеше сәйкес микроРНК болуы мүмкін. Алғашқы miRNA-лар 1990-шы жылдардың басында сипатталған, бірақ нақты функциялары бар биологиялық реттеуші молекулалардың жеке класы ретінде олар тек 2000-шы жылдардың басында ғана қарастырыла бастады. Осы сәттен бастап микроРНК-ның көптеген функциялары және механизмдеріне ықтимал қатысу анықталды [22]. МикроРНК гендердің экспрессиясын реттеуге қатысатындықтан, олар биологиялық процестердің көпшілігіне қатысады. МиРНК экспрессиясындағы ауытқулар көптеген ауру күйлерінде көрсетілген. Омыртқалы жануарлардың өрбір микроРНК-да орта есеппен 200-ге жуық мақсатты транскрипт бар екені анықталды. Сондай-ақ, бір миРНК жүздеген белоктардың түзілуін тежей алатыны белгілі, алайда мұндай репрессия салыстырмалы түрде қалыпты (экспрессияның 2 еседен аз төмендеуі). МикроРНК-ларды 1993 жылы Виктор Амброс, Розалинд Ли және Ронда Фейнбаум *Caenorhabditis elegans* нематодының дамуына қатысатын *lin-14* генін

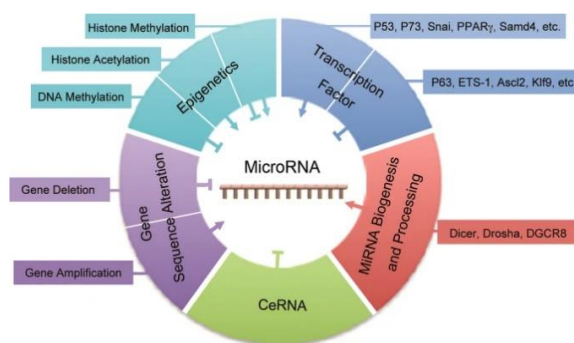
зерттеу кезінде ашты. Олар LIN-14 протеинінің мөлшері *lin-4* генінің қысқа РНҚ өнімімен реттелетінін анықтады. Бұл қысқа РНҚ молекуласында *lin-14*-тен транскрипцияланған мРНҚ-ның 3'-трансляцияланбаған аймағындағы (3'-UTR) кейбір тізбектерге ішінара комплементарлы тізбектер бар. Комплементарлылық *lin-14* мРНҚ-ның *LIN-14* ақуызына трансляциясын басу үшін қажетті және жеткілікті шарт болып шықты. Осылайша, *lin-4* шағын РНҚ алғаш ашылған миРНҚ болды, дегенмен ол кезде мұндай РНҚ-ның болуы нематодтың ерекшелігі деп есептелді. Тек 2000 жылы ғана *lin-41*, *lin-14*, *lin-28*, *lin-42* және *daf-12* экспрессиясын басатын екінші miRNA, *let-7* сипатталды, ол каноргабдит дамуының өтпелі кезеңдерінде болды. Кейіннен *let-7* көптеген түрлерде сақталғаны көрсетілді, бұл бұл құбылыстың кеңірек таралуын көрсетеді. *Let-7* ашылуынан кейін кодталмаған шағын РНҚ-лардың, миРНҚ-лардың жаңа класы бойынша қарқынды зерттеулер жүргізілді [23-24]. Бүгінгі күні адамдардың және басқа түрлердің мыңдаған микроРНҚ-лары сипатталды, оларды зерттеудің әртүрлі әдістері әзірленді және миРНҚ реттілігінің онлайн деректер базалары жасалды (мысалы, miRBase). 2-суретте көрсетілгендей, Drosha, DGCR8, Exportin-5, Ran және Dicer ақуыздары миРНҚ биогенезі жолының шешуші құрамдас бөліктері болып табылады [25]. Канондық miRNA жолы экзоникалық, интрондық немесе интергендік аймақтарда кодталған миРНҚ гендерінен при-миРНҚ транскрипттерін жасайды, одан кейін Drosha/DGCR8 при-миРНҚ транскрипттерін алдын ала miRNA-ға өңдейді. Канондық емес жолының интрондық пре-миРНҚ бөліктері қысқа интрондарды Drosha өңдеуінсіз қосу, бөлу және кесу арқылы қалыптасады. Канондық және канондық емес жолдар арқылы жасалған пре-миРНҚ-лар ядродан Экспортин 5 арқылы экспортталады, содан кейін RISC жүктеу кешені ішінде кейінгі Дисер бөлінуі, Argonaute арқылы miRNA/miRNA* дуплексінің шешілуі және TRBP-ге тәуелді жүктеу РНҚ-индукцияланған RISC кешенімен байланысады. Нысана мРНҚ-ның RISC-тегі миРНҚ-ға байланысуы цитозолдағы р-денелерінің ішінде трансляцияны және/немесе мРНҚ деградациясын тежеумен жалғасады [26-27].



2 Сурет – миРНҚ биогенезінің схемалық көрінісі

миРНК-лар жасушалық функциялардың көбеюін реттеуге қатысады, ал миРНК-ның аберрантты экспрессиясы әртүрлі патологиялық бұзылуларға, әсіресе қатерлі ісікке әкеледі. Соңғы бірнеше жылда миРНК-ның ісік биологиясындағы рөлі туралы көптеген әдебиеттер жарияланды. МиРНК-ның адам қатерлі ісігіне қатысуының алғашқы дәлелі созылмалы лимфоцитарлы лейкозды зерттеулерден алынған, мұнда 13q14 хромосомалық аймақта жиі жойылу және пациенттердің шамамен 69% миR-15 және miR-16 төмендеуі байқалды [28]. миРНК-лар онкогенді болуы мүмкін немесе ісік супрессорларының немесе онкогендердің мРНК-ларына әсер ету арқылы ісік супрессорлары ретінде әрекет етеді. Қатерлі ісік кезінде онкогенді миРНК жоғары реттеледі, ал ісік супрессоры миРНК төмендейді. МиРНК-ның қатерлі ісік ауруындағы жалпы маңыздылығы барлық миРНК гендерінің шамамен 50% геномның нәзік аймақтарында немесе адам қатерлі ісігінде әдетте күшейтілген немесе жойылатын аймақтарда орналасқандығымен атап өтіледі.

МиРНК-ның экспрессиясындағы өзгерістер ерекшелік емес, адам қатерлі ісігіндегі ереже. Шын мәнінде, miRNA экспрессиялық қалыпты және қатерлі тіңдер арасындағы дискриминацияға және шыққан тіңдерді анықтауға мүмкіндік беріп қана қоймайды, сонымен қатар белгілі бір қатерлі ісіктің әртүрлі ішкі түрлерін жоғары дәлдікпен ажырата алады. Ең бастысы, miRNA профильдері аурудың нәтижелерін немесе терапияға жауапты болжай алады. Мысалы, miR-155 және let-7a өрнек деңгейлері өкпе ісігіндегі аурудың нашар нәтижесінің пайдалы болжаушылары болып табылады; miR-143 агрессивті KRAS пациенттерінде колоректальды обырдың тәуелсіз болжамды биомаркері болды. Ғалымдар адам астроцитомасындағы болжамдық биомаркерлер ретінде миРНК маңыздылығын дәлелдеді [29-30]. Осылайша, миРНК нашар сараланған ісіктердің және анықталмаған бастапқы фокусы бар метастаздық ісіктердің мүшелерге қатыстылығын анықтауда қолдану үшін маңызды әлеуетке ие [31]. МиРНК-ны ісіктерді емдеуде қолданудың әртүрлі тәсілдері әзірленді. Бірінші әдіс - экспрессияға әсер ететін препараттармен стандартты терапияның комбинациясы. Мысалы, гемцитабинге төзімді ұйқы безі қатерлі ісігінің жасушаларындағы miRNA-21 экспрессиясы куркумин аналогтарымен төмендетілуі мүмкін, бұл ісіктерді басатын PTEN генінің реактивациясына әкеледі. Сондай-ақ авторлар гемцитабинге төзімді жасушалардың культурасын куркумин аналогтарымен өңдегенде miRNA200c экспрессиясының жоғарылауын атап өтеді, бұл кері эпителий-мезенхималық трансформацияға әкелуі мүмкін. Екінші бағыт – антисенс миРНК тізбегін (анти-миРНК) қолдану. Антисенс тізбегі микроРНК молекуласына комплементарлы қысқа, бір тізбекті нуклеотидтер тізбегі болып табылады [32-33].



3 Сурет – МикроРНК-ның реттелмеген экспрессиясының механизмдері

МикроРНК-ның нуклеотидтер тізбегімен байланысқаннан кейін, соңғысы өзінің нысанасын мРНК-ны тани алмайды, нәтижесінде нысана мРНК-дан ақуыз синтезі қайта басталады. МикроРНК-ны ісіктерді емдеуде қолданудың үшінші жолы - ісіктердің өсуін басу үшін микроРНК-ның өзін қолдану. Скотт және басқалар miRNA-125 көмегімен сүт безі қатерлі ісігі жасушаларының инвазиясын және миграциясын азайтты. МикроРНК-ның экспрессиясына әсер етудің төртінші жолы басқа эпигенетикалық механизмдерді — гистонды модификациялауды немесе ДНҚ метилизациясын қолдану болуы мүмкін. Сонымен, аналық бездің қатерлі ісігінде ДНҚ гипометилизациясы микроРНК-21, микроРНК-203 және микроРНК-205 артық экспрессиясына жауап береді [34].

МикроРНК-ны қатерлі ісік қаупін болжай алатын биомаркер ретінде пайдалану одан да маңызды, өйткені қазіргі уақытта белгілі маркерлер өте аз. Кейбір зерттеушілер кейбір miRNA-лардың экспрессия деңгейі әртүрлі этникалық топтардың өкілдері арасында және әртүрлі ісіктерде әртүрлі болуы мүмкін екенін хабарлады. Дегенмен, соңғы зерттеулердің нәтижелері көңіл қуантарлық. Ал ендігі басты мақсат – алынған нәтижелерді кешенді тексеру және онкологиялық ауруларды диагностикалау мен емдеуге микроРНК талдауын енгізуге мүмкіндік беретін микроРНК бөлу әдістерін біріздендіру [35-36] (Сурет 3).

2. ЗЕРТТЕУ МАТЕРИАЛДАРЫ МЕН ӘДІСТЕРІ

2.1 Биоинформатикалық талдау программалары

Биоинформатикалық әдістерге гендердің mRNA–мен miRNA–дың нуклеотидтік тізбектерін *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), *miRBase* (<http://mirbase.org>) сайтынан жүктеп алу; *mirWalk*, *miRanda*, *TargetScan* бағдарламасының көмегімен miRNA мен mRNA байланыстыру сайттарын іздеу болып табылады.

2.2 Қаннан ДНҚ бөлу әдісі

Қаннан ДНҚ бөлудің хаттамасына сәйкес *QIAGEN* (Германия) шығарған коммерциялық *DNeasy Blood & Tissue Kit* көмегімен ДНҚ бөлініп алынды. Бөлініп алынған ДНҚ мөлшері мен сапалық дәрежесі *NanoVuePlus* спектрофотометрінде (*GE Healthcare*, Ұлыбритания) өлшенді.

Қан плазмасын алу

Қан үлгілерінен 4°C температурада сақтау шартымен сынама алынғаннан кейін бір күннен аспайтын мерзімде плазма алынды. Мұқият араластырғаннан кейін үлгі 4°C температурада 15 минут бойы 1000 g центрифугада айналды. Жоғарғы сулы фаза жаңа түтікке ауыстырылды, және 4°C температурада 2500 g айналымда 15 минут центрифугада айналды. Алынған плазма аликвотталарға бөлініп, қолданылғанға дейін -70°C температурада сақталды.

Қан плазмасынан тотальді РНҚ-ны бөліп алу

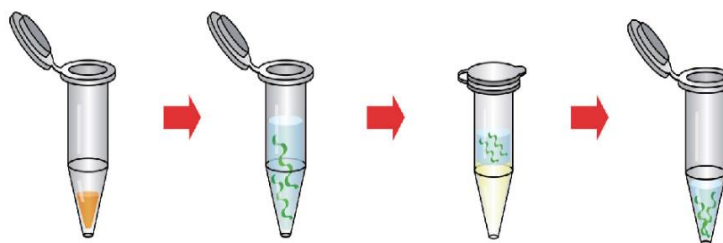
Жалпы РНҚ-ны бөлу бұрын *Zanuni Vahed S. et al.* [37] әзірлеген әдістеме негізінде орындалды:

- а) 200 мкл мұздатылған плазмаға 1 мл Тризол реагенті қосып, 10 минут бойы араластыра отырып инкубациялау.
- б) 200 мкл хлороформ қосып, біртекті консистенцияға дейін араластырып бөлме температурасында 5 минут бойы инкубациялау.
- с) 12000 g айналымда 4°C температурада 12 мин центрифугалап, жоғарғы сулы фазаны жинау.
- д) Бірдей көлемде LiCl 2,5М және екі көлем суық этанол қосылды және түні бойы -70°C температурада инкубацияланды.
- е) 4°C температурада 20 минут бойы 16000 g айналымда центрифугалап, үстіңгі затты алып тастау.
- ф) Тұнба 70% этанолмен жуылады, түтіктерді сүзгі қағазында төңкеру арқылы кептіріледі, содан кейін термостатта 37 ° С температурада ұстайды.

g) Тұнба 100 мкл DEPC суында ерітілді және термостатта 56°C температурада 10 минут бойы инкубацияланады (Сурет 4).

Алынған жалпы РНҚ үлгісі -70°C температурада сақталады.

Бөлінген РНҚ мөлшері мен тазарту дәрежесі *NanoVuePlus* спектрофотометрінде өлшенеді.



4 Сурет – Экстракция реагенті (тотальді РНҚ бөлу сатысы)

кДНК алу барысы

МикроРНҚ-ларды сандық талдауға арналған кДНК өндірушінің хаттамасына сәйкес TaqMan MicroRNA кері транскрипция жинағы (Қолданбалы биосистема) арқылы TaqMan MicroRNA талдау жинағына (Applied Biosystems, АҚШ) енгізілген әрбір микроРНҚ-ға тән праймер арқылы алынады.

мРНҚ мөлшерін анықтауға арналған кДНК өндірушінің хаттамасына сәйкес RT Жоғары сыйымдылығы кДНК реверсиялық транскрипция жинағы арқылы алынады (5 Сурет).

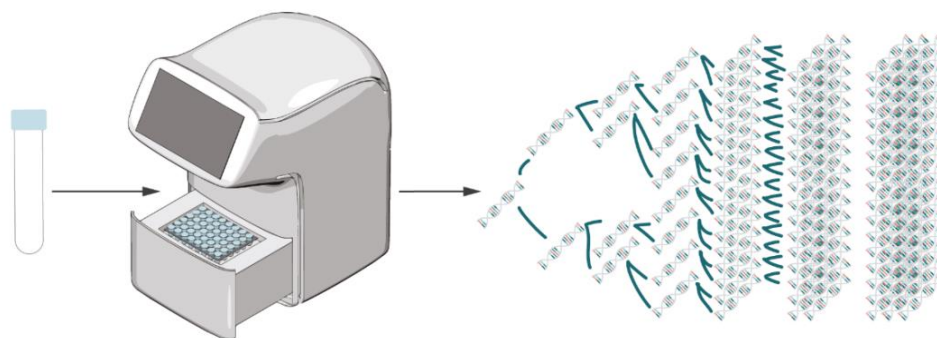


5 Сурет – Кері транскриптаза процесі

2.3 Сандық ПТР әдісімен жұмыс жасау барысы

Сандық ПТР реакциясы 20 мкл көлемінде *TaqMan Universal Master Mix II* көмегімен UNG реагенттерімен *StepOnePlus* нақты уақыттағы ПТР жүйесінде (қолданбалы биожүйелерде) өндіруші ұсынған шарттарда орындалды.

мРНҚ мөлшерін анықтау үшін TaqMan ген экспрессиясын талдау жинағынан алынған арнайы праймерлер мен зондтар пайдаланылды. Нәтижелер StepOnePlus 2.2.2 және ExpressionSuite 1.0.3 бағдарламалық құралында өңделеді. МикроРНҚ мен мРНҚ салыстырмалы сандық талдауы салыстырмалы C_t әдісін (Comparative C_t) қолдану арқылы C_t шекті циклінің (табалдырық циклі, ДНҚ жинақталу графигі мен шекті сызығының қиылысу нүктесіндегі цикл) көрсеткіштері негізінде жүргізіледі. Сандық ПТР реакциясының бейнесі келесі 6 суретте көрсетілген.



6 Сурет – Нақты уақыттағы RT-PCR әдісінің көрінісі

Праймер жұптарының өнімділігін анықтау үшін стандартты калибрлеу қисығын (Стандартты қисық) тұрғызу әдісі қолданылды. Стандартты нүктелік калибрлеу қисығы кері транскрипция өнімдерінің бес дәйекті төрт рет сұйылтуларынан құрастырылды. Калибрлеу қисығының әрбір нүктесі үш данада амплификацияланды. Амплификация реакциясының сапасы келесі шарттарда қолайлы деп танылды:

- а) калибрлеу қисығының қайталанатын нүктелері үшін C_t мәндерінің айырмашылығы 0,5 циклден аспады;
- б) калибрлеу қисығының күтілетін және эмпирикалық теңдеулері арасындағы корреляция индексі 0,98-1;
- в) Амплификация реакциясының эффективтілігі 90-105%.

Нақты уақыттағы ПТР (немесе сандық ПТР, qPCR, qRT-ПТР) – берілген ДНҚ молекуласының мөлшерін бір уақытта амплификациялау және өлшеу үшін қолданылатын полимеразды тізбекті реакция әдісіне негізделген әдіс. Нақты уақыттағы ПТР әдісі үлгідегі белгілі бір ДНҚ тізбегін бір уақытта анықтауды және сандық анықтауды (көшірмелер санын тікелей өлшеу немесе енгізілген ДНҚ немесе қосымша калибрлеу гендеріне қатысты көшірмелерді өлшеу) қамтиды [38]. ПТР әдісі жалпы принциптерін пайдаланады. Негізгі айырмашылығы, амплификацияланған ДНҚ мөлшері әрбір амплификация циклінен кейін нақты уақытта өлшенеді. Сандық анықтау үшін екі әдіс қолданылады - қос тізбекті ДНҚ молекулаларына интеркаляцияланатын флуоресцентті бояғыштар және комплементарлы ДНҚ аймақтарымен

будандастырудан кейін флуоресценцияланатын модификацияланған олигонуклеотидтер (ДНҚ зондтары) [39].

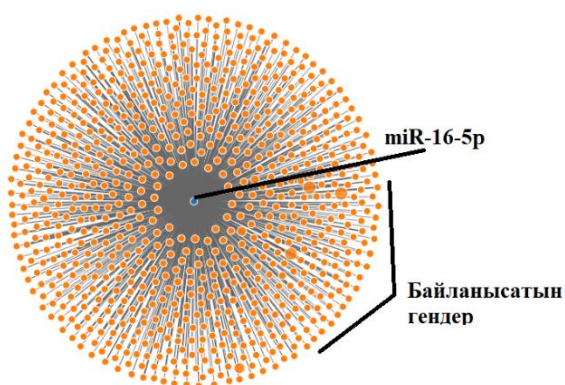
Нақты уақыттағы ПТР нақты амплификацияланған ДНҚ фрагменттерін олардың балқу (денатурация) температурасын талдау арқылы анықтауға мүмкіндік береді, сонымен қатар T_m мәні деп те аталады. Бұл әдіс интеркалирлеуші бояғыштарды пайдаланады, әдетте ол *SYBR Green* деп аталады. ДНҚ-ның балқу температурасы күшейтілген фрагментке тән. Бұл әдістің нәтижелері талданған ДНҚ үлгілерінің диссоциация қисықтарын салыстыру арқылы алынады. Талдау үшін екі балқу қисығы салынған. Біріншісі - флуоресценцияның уақытқа тәуелділігі, екіншісі - уақыт бойынша флуоресценцияның ыдырау жылдамдығы.

Көбінесе нақты уақыт режиміндегі ПТР мРНК-ның аз мөлшерін өлшеу үшін RT-ПТР (кері транскрипция) біріктіріледі, бұл зерттеушіге жасушадағы берілген мРНК мазмұны туралы сандық ақпаратты алуға мүмкіндік береді және тиісінше, жеке жасушада немесе ұлпада берілген геннің экспрессия деңгейі [40-41].

3 ЗЕРТТЕУ НӘТИЖЕЛЕРІ

3.1 Биоинформатикалық жағдайда miR-16-5p-ның нысана-гендерін және олардың байланысу ерекшеліктерін сипаттау.

Биоинформатикалық зерттеулеріміз бойынша miR-16-5p-ы 1533 гендердің mRNA-мен өзара байланысқанын келесі 7 суреттен байқай аламыз. Өзара әрекеттескен гендердің басым бөлігі онкологиялық ауруларда негізгі себепші гендер болып табылды. miR-16-5p-мен NCBI-сайтындағы барлық гендердің өзара әрекеттесуі mirWalk (<http://mirwalk.umm.uni-heidelberg.de/gsea/?geneset=Gene+Ontology+BP>) атты компьютерлік бағдарламаның көмегімен есептелінді.



7 Сурет – mirWalk атты компьютерлік бағдарлама арқылы miR-16-5p-мен байланысқан нысана гендер тобының нәтижесінің бейнесі

mirWalk атты компьютерлік бағдарламаның негізгі ерекшелігі жаңа эксперименталды түрде тексерілген miRNA-дың нысандық өзара әрекеттесулерімен қоса, машиналық оқыту алгоритмімен алынған болжамды деректерді сақтайды. Негізгі назар дәлдікке, қарапайымдылыққа, пайдаланушыға ыңғайлы дизайнға және негізінен жаңартылған ақпаратқа аударылады. Мысалы осы бағдарлама арқылы есептелінген miR-16-5p-мен 1533 гендерінің mRNA-мен өзара байланысы келесі 1 кестеден көре аламыз.

1 Кесте – mirWalk атты компьютерлік бағдарламаның miR-16-5p-мен гендердің байланысу нәтижесі

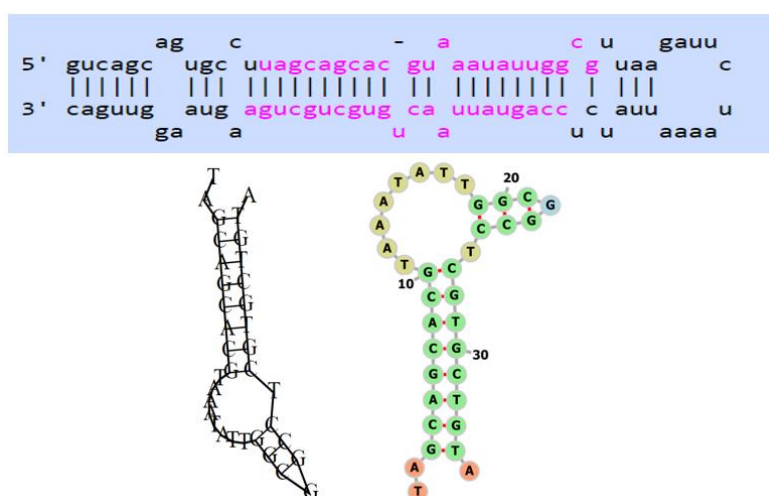
микроРН Қ	Байланысатын ген	Байланысатын аймақ	Позици я
miR-16-5p	<i>TFRC</i>	TAGCAGCACGTAAATATTGGCG#GCCAGTACGTGCTAACAG GCTC	3UTR
miR-16-5p	<i>EXT1</i>	TAGCAGCACGTAAATATTGGCG#GCTAACATGTGCTGCA	3UTR
miR-16-5p	<i>RNF157</i>	TAGCAGCACGTAAATATTGGCG#TGCAATATTTATGGATTGC TGCA	3UTR

1-кестенің жалғасы

miR-16-5p	<i>RDH12</i>	TAGCAGCACGTAAATATTGGCG#GCCAACCCCTAAAGGATTGTCCTCTTG GCCAGCTGGTGTCTGCG	3UT R
miR-16-5p	<i>CCDC80</i>	TAGCAGCACGTAAATATTGGCG#GCCAGTTTCCTCTGCAGCTGCTAA	3UT R
miR-16-5p	<i>CCDC80</i>	TAGCAGCACGTAAATATTGGCG#GCCAGTTTCCTCTGCAGCTGCTAA	3UT R
miR-16-5p	<i>PDLIM7</i>	TAGCAGCACGTAAATATTGGCG#TGCCCTGTGGTACTGCTGTCTGCCAG GTCTGTGTCTGCC	3UT R
miR-16-5p	<i>LIPH</i>	TAGCAGCACGTAAATATTGGCG#GCTAAGAGGGCGGCTGCTGG	3UT R
miR-16-5p	<i>NEK6</i>	TAGCAGCACGTAAATATTGGCG#GCCGGGCGGCTGCTGT	3UT R
miR-16-5p	<i>NCOA6</i>	TAGCAGCACGTAAATATTGGCG#GCCCTTTTGGTGTGCG	3UT R

Бұл жоғарыдағы нәтижелік кестеде қысқартып тек он генмен өзара байланысын көрсеттік. Алынған барлық нәтиже Excell жинағында қосымшамен біріктірілетін болады. Бұл бейне арқылы mirWalk атты компьютерлік бағдарламаның ген аттарымен, байланысатын аймақтарын, оның сипаттамаларын қоса шығарып беретінін байқауымызға болады. Бұл биоинформикалық есептеу құралының нәтижесінде бір miRNA бірнеше гендермен, және бір ген бірнеше miRNA-мен өзара байланыса алатынын айта аламыз. Біздің зерттеуіміздегі miR-16-5p-мен 1533 гендерінің ішіндегі гендердің басым бөлігі онкологиялық ауруларда негізгі рөл атқаратын гендерді тәжірбиелік зерттеулерге нысана ретінде таңдап, биомаркер ретінде болжамды түрде ұсынуға болады.

Сонымен қатар, мысал ретінде miR-16-5p-мен *DDX6* генінің мРНК-ларының өзара байланыстарын төмендегі көрсетілген 8 суреттегі схема түрінде әр генге сәйкес осылай шығарып береді. Бұл жерде микроРНК мен гендердің мРНК-ларының өзара байланысының 3D форматта кескіндеп береді.



8 Сурет – miR-16-5p-мен *DDX6* генінің мРНК-ларының өзара байланысатын аймақтарының схемасы

3.2 Эксперименттік зерттелген жұмыс көздерінен сүт безі қатерлі ісігіне биомаркер ретінде ұсынылған miR-16-5p-ның мәнін анықтау.

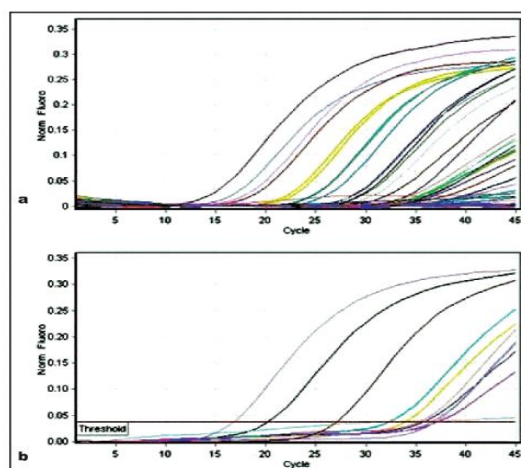
Ambreen Usmani et al., ғалымдарының зерттеген miR-16-5p: сүт безі қатерлі ісігіндегі жаңа тұқым қуалайтын маркер атты мақаласында ісіктің әртүрлі сатысымен ауыратын әйел адамдармен олардың қыздарын қосқанда 194 адамның қаны зерттелді. Барлығы 46,4% қатерлі ісікпен ауыратындар. Қатерлі ісікке қатысушылардың орташа жасы $43 \pm 10,5$ жасты құрады. 2-кестеден қан сарысуындағы miR-16-5p-ның айтарлықтай Ct мәндерін және өзгерістері бар қатерлі ісікпен ауыратын науқастардың саны берілген.

2 Кесте – Ct мәндерін және өзгерістері бар қатерлі ісікпен ауыратын науқастардың рецепторлық көрсеткіштері

Сүт безінің биопсиясы тінінде анықталған ақуыздар	Сүт безі обырының III сатысы бар науқастардың қан сарысуындағы miR-16-5p
	Ct value
	Fold Change
ER +ve	16(32)
ER -ve	18(36)
PR +ve	17(34)
PR -ve	17(34)
HER 2 +ve	17(34)
HER 2 -ve	17(34)
Triple Negative	12(24)

RNA: Рибонуклеин қышқылы
ER: эстроген рецепторлары
PR: прогестерон рецепторлары
HER2: адамның эпидермиялық өсу факторы рецепторы2.

miR-16-5p экспрессиясы көрсетілмеген қалыпты дені сау адамдармен салыстырғанда сүт безі қатерлі ісігімен ауыратын науқастар мен олардың қыздарындағы miR-16-5p айтарлықтай экспрессиясын көрсететін өзгерістер анықталды (Сурет 9).



9 Сурет – а) Сүт безі қатерлі ісігінің III сатысы бар науқастардың өзгеріс циклінің экспрессиясы. б) Сүт безі қатерлі ісігінің III сатысындағы қыздарының өзгерістер циклінің көрінісі

Осы алынған көрсеткіштерге байланысты miR-16-5p-айалымдағы микроРНК сүт безі қатерлі ісігімен ауыратын науқастар мен олардың ұрпақтарында болжамдық, диагностикалық, сондай-ақ болжамдық маркер ретінде пайдаланылуы мүмкін. Сүт безі обыры пациенттерінде дені сау адамдармен салыстырғанда miR-16-5p жоғары экспрессиясы байқалды. Қыздарының көрінісі сау адамдарға қарағанда жоғары, бірақ өздерінің аналарымен салыстырып қарағанда төмен болды. Осы нәтиже бойынша, ұсынылып отырған болжамдық miR-16-5p атты биомаркерін Қазақстандық сүт безі ауруына шалдыққан әйелдердегі мәнін келесі тәжірбиемізде қолдандық.

3.3 Сүт безі қатерлі ісігіне биомаркер ретінде ұсынылған miR-16-5p-ның Қазақстандық әйелдер арасында зерттеу жұмысын салыстырмалы түрде бақылау.

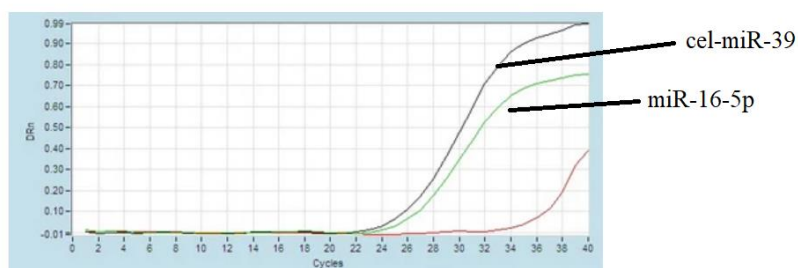
Қазақ онкология және радиология ғылыми-зерттеу институтынан барлығы сүт безі қатерлі ісігімен ауыратын науқастардың веноздық қанынан 100 ге жуық сынама алынды. Алматы облысы Қаскелең қаласындағы Қарасай орталық аудандық ауруханасында маммографиялық скринингтен кейін бақылау тобы мен мастопатиясы бар науқастардан қан алынды. Дені сау донорлардан барлығы 120 веноздық қан сынамасы және мастопатиясы бар науқастардан 52 веналық қан алынды. Бақылау тобындағы әйелдердің жасы шамамен сүт безі обыры бар науқастардың жасына тең болды.

Біздің келесі зерттеуімізде сүт безі қатерлі ісігіне биомаркер ретінде жоғарыдағы зерттеу жұмысында ұсынылған miR-16-5p-ның Қазақстандық әйелдер арасында зерттеу жұмысын салыстырмалы түрде бақыладық. Өртүрлі биологиялық немесе клиникалық үлгілерден алуға болатын РНК мөлшері айтарлықтай өзгереді. Мысалы, бірнеше микрограмм РНК тіндер мен жасушалардан артық мөлшерде (мысалы, бірнеше миллиграмм ұлпалардан) оңай тазартылуы мүмкін болса да, көптеген сұйық биопсияның үлгілері РНК-ның өте төмен мөлшерін беруі мүмкін.

Дұрыс анықталған РНК концентрациясы болмаса, ген экспрессиясын зерттеуде қолданылатын РНК-ның бастапқы мөлшерін қалыпқа келтіру өте қиын болады. Біз осы ең кең тараған экзогендік спик-интродукторын, синтетикалық cel-miR-39 қолдандық. cel-miR-39 Spike-In жинағы РНК экстракция процедуралары және RT-qPCR талдауларындағы кейінгі қалыпқа келтіру кезінде ұлғаю үшін сандық синтетикалық РНК (cel-miR-39) ұсынады. cel-miR-39 қалыпқа келтірумен салыстырғанда 2 еселік логарифмдік өзгеріс miR-16-5p-де айтарлықтай төмендеді (Кесте 3, Сурет 10).

3 Кесте – Сүт безі обыры бар науқастар тобы мен бақылау тобы арасындағы зерттелетін миРНК циклінің шекті мәндері (Ct) және салыстырмалы статистикасы.

микроРНК	$\Delta\Delta C_t$ (95% CI), логарифмдік 2 еселік өзгеріс	P-мәні
miR-16-5p	-0,29 (-0,69; 0,12)	0,081
cel-miR-39	-0,98 (-1,42; -0,53)	0,0002



10 Сурет- Сандық ПТР әдісінің микроРНК-лардың салыстырмалы түрдегі көрсеткіші

miR-16-5p, бақылау тобына қарағанда тұрақтылығы жағынан төмен болды. Дегенмен, әдебиеттерді зерттеу бұл микроРНК-лардың сүт безі обырында реттелмейтінін көрсетті: бірнеше зерттеулер сау бақылаулармен салыстырғанда сүт безі обыры бар емделушілерде miR-16-5p плазмадағы жоғары концентрациясын хабарлайды. Сүт безі қатерлі ісігімен ауыратын науқастар мен Қазақстанның бақылаудағы популяциясы арасында қан плазмасындағы miR-16-5p деңгейінде айтарлықтай айырмашылықтар анықталмады. Оған негізгі себеп қан үлгілерінде гемолиз дәрежесінің жоғары болуы немесе РНҚ бөлу барысында экстракция процесінің дұрыс бөлінбеуіне байланысты.

ҚОРЫТЫНДЫ

Онкологиялық аурулардың алдын алу мақсатында miRNA-ның ашылуы қазіргі жасуша биологиясы мен медицина ғылымында айтарлықтай өзгерістер жасады. miRNA-лар жасушалық процестердің негізгі реттеушілері ретінде белгіленді және олар ісіктің басталуында, прогрессінде және метастазында маңызды рөл атқаратыны белгілі болды.

miRNA-ның нысана гендермен өзара байланысын және олардың онкологиялық аурулардағы экспрессиясын анықтау атты дипломдық жұмыс тақырыбына қойылған негізгі міндеттерге келесідей нәтижелер алынды:

- Электрондық дерекқорлар базасындағы *mirWalk* атты компьютерлік бағдарламаның есептеуі бойынша miR-16-5p-ның 1533-нысана гендерімен байланысатындығы, және олардың ішінде гендердің басым бөлігі онкологиялық ауруларда негізгі қызмет атқаратындығы анықталып, әрбір геннің қызметі жекеленіп сипатталды. Нысана гендердің mRNA-мен miR-16-5p-ның өзара байланысатын сайттарын онкологиялық ауруларда биомаркер ретінде болжамды түрде ұсынуға және практикалық жұмыстарда miR-16-5p-нысана микроРНК бола алатындығы ұсынылды.

- Эксперименттік зерттелген жұмыс көздерінен сүт безі қатерлі ісігіне биомаркер ретінде ұсынылған miR-16-5p-ның мәні анықталып, сүт безі обыры пациенттерінде дені сау адамдармен салыстырғанда miR-16-5p жоғары экспрессиясы байқалғанын анықтадық.

- Сүт безі қатерлі ісігіне биомаркер ретінде ұсынылған miR-16-5p-ның Қазақстандық әйелдер арасында зерттеу жұмысында салыстырмалы түрде бақылап, бақылау тобына қарағанда $\Delta\Delta C_t$ (95% CI), логарифмдік тұрақтылығы жағынан $-0,29$ ($-0,69$; $0,12$) мәнде төмен екендігі анықталды.

Зерттеу жұмысымызда алынған биоинформатикалық және тәжірбиелік салыстырмалы жұмыстарымыз miR-16-5p-ны нысана микроРНК ретінде сүт безі ісігімен қатар, онкологияның басқада ауру түрлеріне зерттеу жұмысына бағыт береді.

ПАЙДАЛАНЫЛҒАН ӘДЕБИЕТТЕР ТІЗІМІ

- 1 Stratton M. R., Campbell P. J., Futreal P. A. The cancer genome // Nature. - 2009. -458(7239). -719–724. doi:10.1038/nature07943
- 2 Berger M. F., Mardis E. R. The emerging clinical relevance of genomics in cancer medicine // Nature reviews.- 2018. -15(6). -3-53–365. doi:0.1038/s41571-018-0002-6
- 3 Strauss B. S. Why Is DNA Double Stranded? The Discovery of DNA Excision Repair Mechanisms // Genetics. -2018. -209(2). -357–366. doi:10.1534/genetics.118.300958
- 4 Topacio B. R., Zatulovskiy E., Cristea S., Xie S., Tambo C. S., Rubin S. M., Sage, J., Kõivomägi M., Skotheim J. M. Cyclin D-Cdk4,6 Drives Cell-Cycle Progression via the Retinoblastoma Protein's C-Terminal Helix // Molecular cell. - 2019. -74(4). -758–770.e4. doi:10.1016/j.molcel.2019.03.020
- 5 Waters A. M., Der C. J. KRAS: The Critical Driver and Therapeutic Target for Pancreatic Cancer // Cold Spring Harbor perspectives in medicine. -2018.-8(9), a031435. doi:10.1101/cshperspect.a031435
- 6 Luo J. KRAS mutation in pancreatic cancer // Semin Oncol. -2021. -48(1):10-18.
- 7 Макконейл Л.Э., Гаррауэй Л.А. Клинические последствия генома рака // Журнал клинической онкологии: официальный журнал Американского общества клинической онкологии. -2010. -28(35). -5219–5228.
- 8 Джексон М., Маркс Л., Мэй Г., Уилсон Дж. Б. Генетическая основа болезни // Очерки биохимии. -2018. -62 (5). -643–723.
- 9 Ривлин Н., Брош Р., Орен М., Роттер В. Мутации в гене супрессора опухоли р53: важные вехи на различных этапах онкогенеза // Гены и рак. - 20112 (4). -466–474.
- 10 Chatterjee N., Walker G. C. Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis //Environmental and molecular mutagenesis. – 2017. -58(5). -235–263.
- 11 Krokan H. E., Bjørås M. Base excision repair // Cold Spring Harbor perspectives in biology. -2013. -5(4).
- 12 Wang Y., Cortez D., Yazdi P., Neff N., Elledge S. J., Qin J. BASC, a super complex of BRCA1-associated proteins involved in the recognition and repair of aberrant DNA structures // Genes & development. -2000.-14(8). -927–939.
- 13 Mehrgou A., Akouchekian M. The importance of BRCA1 and BRCA2 genes mutations in breast cancer development // Medical journal of the Islamic Republic of Iran. -2016.-30.-369.
- 14 Рой Р., Чун Дж., Пауэлл С.Н. BRCA1 и BRCA2: разные роли в общем пути защиты генома // Обзоры природы.- 2011.-2(1),-68–78.
- 15 Wang L., Wheeler D.A. Genomic sequencing for cancer diagnosis and therapy// Annu Rev Med. -2014.-65:33-48. doi:10.1146/annurev-med-120811-171056.
- 16 Nakagawa H., Fujita M. Whole genome sequencing analysis for cancer genomics and precision medicine // Cancer science. -2018.-109(3).-513–522.

17 Mardis E. R., Wilson R. K. Cancer genome sequencing: a review // Human molecular genetics.- 2009. -18(R2). -R163–R168.

18 Мардис Э.Р. Секвенирование генома и рак // Текущее мнение в области генетики и развития. -2012. -22(3). -245–250.

19 Peng Y., Croce C. M. The role of MicroRNAs in human cancer //Signal transduction and targeted therapy. -2016.-1,15004.

20 Peng Y. The role of MicroRNAs in human cancer //Signal Transduct Target Ther. -2016. -28. -1:15004. doi:10.1038/sigtrans.2015.4.

21 Macfarlane L. A., Murphy P. R. MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer.//Current genomics.-2010.-11(7).-537–561. doi.org/10.2174/138920210793175895

22 Ромеро-Кордоба Сандра Л. «Биогенез микроРНК: биологическое влияние на развитие рака» // Биология и терапия рака.- 2014. -15,11. -1444-55.

23 Takasaki S. Roles of microRNAs in cancers and development // Methods Mol Biol. -201.-1218:375-413. doi:10.1007/978-1-4939-1538-5_24.

24 Сталхут СЕ., Slack, F.J.Роль микроРНК в развитии рака // Йельский журнал биологии и медицины.- 2006.-79 (3-4).-131–140.

25 Vannini I., Fanini F., Fabbri M. Emerging roles of microRNAs in cancer // Current opinion in genetics & development. -2018.-48.-128–133. doi.org/10.1016/j.gde.2018.01.001

26 Ди Лева Г., Гарофало М., Кроче К.М. МикроРНК при раке // Ежегодный обзор патологии.-2014.-9.-287–314.

27 Orellana E. A., Kasinski A. L. MicroRNAs in Cancer: A Historical Perspective on the Path from Discovery to Therapy // Cancers.-2015.-7(3).-1388–1405. doi.org/10.3390/cancers7030842

28 Hwang H.W., Mendell J.T. MicroRNAs in cell proliferation, cell death, and tumorigenesis // Br J Cancer. -2006.-27;94(6):776-80. doi: 10.1038/sj.bjc.6603023.

29 Condrat C. E., Thompson D. C., Barbu M. G., Bugnar O. L., Boboc A., Cretoiu D., Suci N., Cretoiu S. M., Voinea S. C. miRNAs as Biomarkers in Disease: Latest Findings Regarding Their Role in Diagnosis and Prognosis // Cells. -2020. -9(2). -276.

30 Zhou Q., Liu J., Quan J., Liu W., Tan H., Li W. MicroRNAs as potential biomarkers for the diagnosis of glioma: A systematic review and meta-analysis // Cancer science.- 2018. -109(9). -2651–2659.

31 Zhi F., Shao N., Wang R., Deng D., Xue L., Wang Q., Zhang Y., Shi Y., Xia X., Wang S., Lan Q., Yang, Y. Identification of 9 serum microRNAs as potential noninvasive biomarkers of human astrocytoma // Neuro-oncology.- 2015. -17(3). -383–391.

32 He J., Jiang Y., Liu L., Zuo Z., Zeng C. Circulating MicroRNAs as Promising Diagnostic Biomarkers for Patients With Glioma: A Meta-Analysis // Frontiers in neurology. -2021.-1.- 610163.

33 Ван Б., Ма Дж. Роль микроРНК в злокачественной глиоме // Китайский медицинский журнал.- 2015.-128(9). -1238–1244.

34 Ivo D'Urso P., Fernando D'Urso O., Damiano Gianfreda C., Mezzolla V., Storelli C., Marsigliante S. miR-15b and miR-21 as Circulating Biomarkers for Diagnosis of Glioma // *Current genomics*.- 2015. -16(5). -304–311.

35 Lee K., Ferguson L. R. MicroRNA biomarkers predicting risk, initiation and progression of colorectal cancer // *World journal of gastroenterology*. -2016.-22(33). -7389–7401.

36 Zununi Vahed S., Barzegari A., Rahbar Saadat Y., Mohammadi S., Samadi, N. A. microRNA isolation method from clinical samples // *BioImpacts*. - 2016.-6(1). -25–31.

37 Garibyan L., Avashia N. Polymerase chain reaction // *The Journal of investigative dermatology*. -2013.-133(3). -1–4.

38 Lorenz T. C. Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies // *Journal of visualized experiments*. - 2012.-63.-e3998.

39 Zhu H., Zhang H., Xu Y., Laššáková S., Korabečná M., Neužil P. PCR past, present and future // *BioTechniques*. -2020.-69(4). -317–325.

40 Garibyan L., Avashia N. Polymerase chain reaction // *J Invest Dermatol*. - 2013. -133(3): 1-4. doi:10.1038/jid.2013.1.

«miRNA-ның нысана гендермен өзара байланысын және олардың онкологиялық аурулардағы экспрессиясын анықтау» тақырыбына ғылыми кеңесшісі Белкожаев Аяз Маратовичтің

ПІКІРІ

Нурим Жұлдыз Мирланқызы 2018 жылдан бепі Satbayev University, Химиялық және биохимиялық инженерия кафедрасында Биотехнология мамандығы бойынша бакалавр дәрежесінде білім алуда. «miRNA-ның нысана гендермен өзара байланысын және олардың онкологиялық аурулардағы экспрессиясын анықтау» тақырыбы бойынша қызығушылық танытып, Айтхожин атындағы молекулалық биология және биохимия институтында менің жетекшілігімен «Құрылымдық және функциональдық геномика» лабораториясында зерттеу жұмысын орындады. Жәнеде Satbayev University-нің химиялық және биохимиялық инженерия кафедрасының меңгерушісі Амитова А.А. жетекшілігімен әдебиетке шолу барысына және диплом жазу қағидаларымен өзара белсенді жұмыс жасағаны дипломдық жұмыстан байқалады.

Satbayev University-нің химиялық және биохимиялық кафедрасының компьютерлік класстарында in silico-лық, яғни биоинформатикалық зерттеу жұмыстары жүргізілді. М. Ә. Айтхожин атындағы молекулалық биология және биохимия институтында практикадан өту барысы жүргізіліп нәтижелер алынған. Практикадан өту барысында биоинформатикалық программалармен жұмыс жасауды, сонымен қатар эксперименттік жағдайда РНК/ДНК бөлу, ПТР әдістерін меңгерген.

Қазіргі таңда биоинформатикалық зерттеу жұмыстары кең ауқымда қолданылуда, осыған орай, Нурим Жұлдыз Мирланқызы тақырыбы бойынша өзекті мәселелерді қарастырған. Сонымен қатар, дипломдық жұмыста электрондық дерекқорлар базасынан miR-16-5p-ның нысана гендерін және олардың байланысу ерекшеліктерін, эксперименттік зерттелген жұмыс көздерінен сүт безі қатерлі ісігіне биомаркер ретінде ұсынылған miR-16-5p-ның мәнін, сүт безі қатерлі ісігіне биомаркер ретінде ұсынылған miR-16-5p-ның Қазақстандық әйелдер арасында зерттеу жұмысын салыстырмалы түрде бақылау бойынша қойылған міндеттерге маңызды нәтижелер алынған.

Зерттеу жұмысының негізгі өзектілігі miRNA молекулалары қатерлі ісікті ерте сатыда анықтауға арналған келешегі бар онкомаркерлер болып табылады. Биологиялық сұйықтықтарда айналып жүретін miRNA онкологиялық ауруларды ерте анықтау әдісін жасап шығарудың бірегей мүмкіндігін береді. Жұлдыздың тақырыбы бойынша тезистер халықаралық конференцияларда жарық көрді. Нурим Жұлдыз Мирланқызының жұмысы талаптарға сай және нәтижелі орындалғанына көз жеткізе отырып өте жақсы деген пікірдемін.

Ғылыми кеңесшісі:

Satbayev University-нің Химиялық және Биохимиялық инженерия кафедрасының тьюторы, М.Ә. Айтхожин атындағы МБЖБ институтының

ғылыми қызметкері



Белкожаев А.М.

**Satbayev University, химиялық және биохимиялық
инженерия кафедрасының 4 курс студенті
Нурим Жұлдыз Мирланқызының
«miRNA-ның нысана гендермен өзара байланысын және олардың
онкологиялық аурулардағы экспрессиясын анықтау» тақырыбындағы
дипломдық жұмысына**

РЕЦЕНЗИЯ

Студенттің «miRNA-ның нысана гендермен өзара байланысын және олардың онкологиялық аурулардағы экспрессиясын анықтау» атты дипломдық жұмысында маңызды мәлімдемелер нақты әрі сенімді мақалалардан алынып, сілтеме жасалған. Дипломдық жұмыстың барлық бөлімдері мен құрылысы логикалық түрде толық байланысқан. Зерттеу материалдары мен әдістерінде miRNA-ның нысана гендермен өзара байланысын және олардың онкологиялық аурулардағы экспрессиясын анықтауда қолданылатын биоинформатикалық бағдарламалар қолданған.

Жұлдыздың зерттеу нәтижелері бойынша алынған биоинформатикалық, және тәжірбиелік салыстырмалы нәтижелер miR-16-5p-ны нысана микроРНК ретінде сүт безі ісігімен қатар, онкологияның басқада ауру түрлеріне зерттеу жұмысына бағыт береді. Жұмыста негізгі қарастырылатын өзектілік miRNA молекулалары қатерлі ісікті ерте сатыда анықтауға арналған келешегі бар онкомаркерлер болып табылатындығы.

Нурим Жұлдыз Мирланқызының дипломдық жұмысының қорытындысы ғылыми тұрғыда ауқымды дәлелдемелерде негізделген. Зерттеу жұмысының теориялық маңыздылығы өте жоғары әрі сапалы түрде жазылған. Суреттер, кестелермен схемалар сапалы түрде алынған. Зерттеу жұмыстың міндеттеріне сай толыққанды нәтижелер алынған, сонымен қатар зерттеу жұмысы магистратуралық оқу бөлімінде жалғастыруға негіз бола алады.

Нурим Жұлдыз Мирланқызының жұмысы талаптарға сай орындалды, зерттеу тақырыбы бойынша қорғауға лайықты деген пікірдемін.

Рецензент:

Әл-Фараби атындағы ҚазҰУ-ның
Биология және биотехнология кафедрасының
профессоры, б.ғ.к.



Атамбаева Ш.А.



Метаданные

Название

2022_БАК_Нурым Ж.М.docx

Автор

Нурым Ж.М.

Научный руководитель

Айгуль Амитова

Подразделение

ИГИНГД

Список возможных попыток манипуляций с текстом

В этом разделе вы найдете информацию, касающуюся манипуляций в тексте, с целью изменить результаты проверки. Для того, кто оценивает работу на бумажном носителе или в электронном формате, манипуляции могут быть невидимы (может быть также целенаправленное вписывание ошибок). Следует оценить, являются ли изменения преднамеренными или нет.

Замена букв	В	3
Интервалы	A→	0
Микропробелы	␣	1
Белые знаки	␣	0
Парафразы (SmartMarks)	a	2

Объем найденных подоби

Обратите внимание! Высокие значения коэффициентов не означают плагиат. Отчет должен быть проанализирован экспертом.



КП1

25

Длина фразы для коэффициента подоби 2



КП2

5037

Количество слов



КЦ

39617

Количество символов

Подобия по списку источников

Просмотрите список и проанализируйте, в особенности, те фрагменты, которые превышают КП №2 (выделенные жирным шрифтом). Используйте ссылку «Обозначить фрагмент» и обратите внимание на то, являются ли выделенные фрагменты повторяющимися короткими фразами, разбросанными в документе (совпадающие сходства), многочисленными короткими фразами расположенные рядом друг с другом (парафразирование) или обширными фрагментами без указания источника ("криптоцитаты").

10 самых длинных фраз

Цвет текста

ПОРЯДКОВЫЙ НОМЕР	НАЗВАНИЕ И АДРЕС ИСТОЧНИКА URL (НАЗВАНИЕ БАЗЫ)	КОЛИЧЕСТВО ИДЕНТИЧНЫХ СЛОВ (ФРАГМЕНТОВ)	
1	Дипломная работа Құайын Дина .doc 16.05.2020 Satbayev University (ИХИБТ)	21	0.42 %

из базы данных RefBooks (0.00 %)

ПОРЯДКОВЫЙ НОМЕР	НАЗВАНИЕ	КОЛИЧЕСТВО ИДЕНТИЧНЫХ СЛОВ (ФРАГМЕНТОВ)
------------------	----------	---

из домашней базы данных (0.42 %)

ПОРЯДКОВЫЙ НОМЕР	НАЗВАНИЕ	КОЛИЧЕСТВО ИДЕНТИЧНЫХ СЛОВ (ФРАГМЕНТОВ)	
1	Дипломная работа Құайын Дина ..doc 16.05.2020 Satbayev University (ИХИБТ)	21 (1)	0.42 %

из программы обмена базами данных (0.00 %)

ПОРЯДКОВЫЙ НОМЕР	НАЗВАНИЕ	КОЛИЧЕСТВО ИДЕНТИЧНЫХ СЛОВ (ФРАГМЕНТОВ)
------------------	----------	---

из интернета (0.00 %)



ПОРЯДКОВЫЙ НОМЕР	ИСТОЧНИК URL	КОЛИЧЕСТВО ИДЕНТИЧНЫХ СЛОВ (ФРАГМЕНТОВ)
------------------	--------------	---

Список принятых фрагментов (нет принятых фрагментов)

ПОРЯДКОВЫЙ НОМЕР	СОДЕРЖАНИЕ	КОЛИЧЕСТВО ИДЕНТИЧНЫХ СЛОВ (ФРАГМЕНТОВ)
------------------	------------	---