

ISSN 2518-1483 (Online),
ISSN 2224-5227 (Print)

2020 • 6

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ
ҰЛТТЫҚ ҒЫЛЫМ АКАДЕМИЯСЫНЫҢ

БАЯНДАМАЛАРЫ

ДОКЛАДЫ

НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК
РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

REPORTS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES
OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

PUBLISHED SINCE 1944



ALMATY, NAS RK

Б а с р е д а к т о р ы
х.ғ.д., проф., ҚР ҰҒА академигі
М.Ж. Жұрынов

Р е д а к ц и я а л қ а с ы:

Адекенов С.М. проф., академик (Қазақстан) (бас ред. орынбасары)
Бенберин В.В., проф., академик (Қазақстан)
Березин В.Э., проф., корр.-мүшесі (Қазақстан)
Величкин В.И. проф., корр.-мүшесі (Ресей)
Вольдемар Вуйцик проф. (Польша)
Елешев Р.Е., проф., академик (Қазақстан)
Жамбакин Қ.Ж., проф., академик (Қазақстан)
Иванов Н.П., проф., академик (Қазақстан)
Илолов М.И. проф., академик (Тәжікстан)
Кригер Виктор проф. (Германия)
Кененбаев С.Б., проф., академик (Қазақстан)
Леска Богуслава проф. (Польша)
Локшин В.Н. проф., академик (Қазақстан)
Неклюдов И.М. проф., академик (Украина)
Нур Изура Удзир проф. (Малайзия)
Нургожин Т.С., проф., корр.-мүшесі (Қазақстан)
Перни Стефано проф. (Ұлыбритания)
Потапов В.А. проф. (Украина)
Прокопович Полина проф. (Ұлыбритания)
Рамазанов Т.С. проф., академик (Қазақстан)
Раманкулов Е.М., проф., корр.-мүшесі (Қазақстан)
Садықұлов Т., проф., академик (Қазақстан)
Семенов В.Г., проф., академик (Россия)
Сикорски Марек проф., (Польша)
Такибаев Н.Ж. проф., академик (Қазақстан), бас ред. орынбасары
Уразалиев Р.А., проф., академик (Қазақстан)
Харин С.Н. проф., академик (Қазақстан)
Харун Парлар проф. (Германия)
Чечин Л.М. проф., корр.-мүшесі (Қазақстан)
Энджун Гао проф. (Қытай)

«Қазақстан Республикасы Ұлттық ғылым академиясының баяндамалары»

ISSN 2518-1483 (Online),

ISSN 2224-5227 (Print)

Меншіктенуші: «Қазақстан Республикасының Ұлттық ғылым академиясы» Республикалық қоғамдық бірлестігі (Алматы қ.).

Қазақстан Республикасының Ақпарат және қоғамдық даму министрлігінің Ақпарат комитетінде 29.07.2020 ж. берілген № KZ93VPY00025418 мерзімдік басылым тіркеуіне қойылу туралы куәлік.

Тақырыптық бағыты: *наноматериалдар алу, биотехнология және экология саласындағы бірегей зерттеу нәтижелерін жариялау.*

Мерзімділігі: жылына 6 рет.

Тиражы: 500 дана.

Редакцияның мекенжайы: 050010, Алматы қ., Шевченко көш., 28; 219, 220 бөл.; тел.: 272-13-19, 272-13-18,
<http://reports-science.kz/index.php/en/archive>

© Қазақстан Республикасының Ұлттық ғылым академиясы, 2020

Типографияның мекенжайы: «NurNaz GRACE», Алматы қ., Рысқұлов көш., 103.

Главный редактор
д.х.н., проф., академик НАН РК
М. Ж. Журинов

Редакционная коллегия:

Адекенов С.М. проф., академик (Казахстан) (зам. гл. ред.)
Бенберин В.В., проф., академик (Казахстан)
Березин В.Э., проф., чл.-корр. (Казахстан)
Величкин В.И. проф., чл.-корр. (Россия)
Вольдемар Вуйцик проф. (Польша)
Елешев Р.Е., проф., академик (Казахстан)
Жамбакин К.Ж., проф., академик (Казахстан)
Иванов Н.П., проф., академик (Казахстан)
Илолов М.И. проф., академик (Таджикистан)
Кригер Виктор проф. (Германия)
Кененбаев С.Б., проф., академик (Казахстан)
Леска Богуслава проф. (Польша)
Локшин В.Н. проф., академик (Казахстан)
Неклюдов И.М. проф., академик (Украина)
Нур Изура Удзир проф. (Малайзия)
Нургожин Т.С., проф., чл.-корр. (Казахстан)
Перни Стефано проф. (Великобритания)
Потапов В.А. проф. (Украина)
Прокопович Полина проф. (Великобритания)
Рамазанов Т.С. проф., академик (Казахстан)
Раманкулов Е.М., проф., чл.-корр. (Казахстан)
Садыкулов Т., проф., академик (Казахстан)
Семенов В.Г., проф., академик (Россия)
Сикорски Марек проф., (Польша)
Такибаев Н.Ж. проф., академик (Казахстан), зам. гл. ред.
Уразалиев Р.А., проф., академик (Казахстан)
Харин С.Н. проф., академик (Казахстан)
Харун Парлар проф. (Германия)
Чечин Л.М. проф., чл.-корр. (Казахстан)
Энджун Гао проф. (Китай)

Доклады Национальной академии наук Республики Казахстан»

ISSN 2518-1483 (Online),

ISSN 2224-5227 (Print)

Собственник: Республиканское общественное объединение «Национальная академия наук Республики Казахстан» (г. Алматы).

Свидетельство о постановке на учет периодического печатного издания в Комитете информации Министерства информации и общественного развития Республики Казахстан № **KZ93VPY00025418**, выданное 29.07.2020 г.

Тематическая направленность: *публикация оригинальных результатов исследований в области получения наноматериалов, биотехнологии и экологии.*

Периодичность: 6 раз в год.

Тираж: 500 экземпляров

Адрес редакции: 050010, г.Алматы, ул.Шевченко, 28; ком. 219, 220; тел. 272-13-19, 272-13-18,

<http://reports-science.kz/index.php/en/archive>

© Национальная академия наук Республики Казахстан, 2020 г.

Адрес типографии: «NurNaz GRACE», г. Алматы, ул. Рыскулова, 103.

E d i t o r i n c h i e f

doctor of chemistry, professor, academician of NAS RK

M.Zh. Zhurinov

E d i t o r i a l b o a r d :

Adekenov S.M. prof., academician (Kazakhstan) (deputy editor in chief)**Benberin V.V.**, prof., academician (Kazakhstan)**Berezin V.Ye.**, prof., corr. member. (Kazakhstan)**Velichkin V.I.** prof., corr. member (Russia)**Voitsik Valdemar** prof. (Poland)**Eleshev R.E.**, prof., academician (Kazakhstan)**Zhambakin K.Zh.**, prof., academician (Kazakhstan)**Ivanov N.P.**, prof., academician (Kazakhstan)**Iolov M.I.** prof., academician (Tadjikistan)**Krieger Viktor** prof. (Germany)**Kenenbayev S.B.**, prof., academician (Kazakhstan)**Leska Boguslava** prof. (Poland)**Lokshin V.N.** prof., academician (Kazakhstan)**Nekludov I.M.** prof., academician (Ukraine)**Nur Izura Udzir** prof. (Malaysia)**Nurgozhin T.S.**, prof., corr. member. (Kazakhstan)**Perni Stephano** prof. (Great Britain)**Potapov V.A.** prof. (Ukraine)**Prokopovich Polina** prof. (Great Britain)**Ramankulov E.M.**, prof., corr. member. (Kazakhstan)**Sadykulov T.**, prof., academician (Kazakhstan)**Semenov V.G.**, prof., academician (Russia)**Sikorski Marek** prof., (Poland)**Ramazanov T.S.** prof., academician (Kazakhstan)**Takibayev N.Zh.** prof., academician (Kazakhstan), deputy editor in chief**Urazaliev R.A.**, prof., academician (Kazakhstan)**Kharin S.N.** prof., academician (Kazakhstan)**Kharun Parlar** prof. (Germany)**Chechin L.M.** prof., corr. member (Kazakhstan)**Endzhun Gao** prof. (China)**Reports of the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan.****ISSN 2224-5227****ISSN 2518-1483 (Online),****ISSN 2224-5227 (Print)**

Owner: RPA "National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan" (Almaty).

The certificate of registration of a periodical printed publication in the Committee of information of the Ministry of Information and Social Development of the Republic of Kazakhstan **No. KZ93VPY00025418**, issued 29.07.2020.Thematic scope: *publication of original research results in the field of obtaining nanomaterials, biotechnology and ecology.*

Periodicity: 6 times a year.

Circulation: 500 copies.

Editorial address: 28, Shevchenko str., of. 219, 220, Almaty, 050010, tel. 272-13-19, 272-13-18,

<http://reports-science.kz/index.php/en/archive>

Е.Е. Аширбеков¹, А.О. Абайлдаев¹, А.М. Белкожаев^{1,2},
К.О. Шарипов^{1,3}, Н.А. Айтхожина¹

¹ Институт молекулярной биологии и биохимии им. М.А. Айтхожина, Алматы, Казахстан;

² Казахский национальный университет им. аль-Фараби, Алматы, Казахстан;

³ Казахский национальный медицинский университет им. С.Д. Асфендиярова, Алматы, Казахстан.

E-mail: eldarasher@mail.ru

ПЛАЗМЕННЫЕ УРОВНИ НЕКОТОРЫХ микроРНК ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В КАЗАХСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ

Аннотация. Рак молочной железы является наиболее частой формой рака среди женщин во всех мире. Внедрение маммографического скрининга для женщин рискованного возраста позволило значительно снизить смертность от этого заболевания, однако маммография дает значительное число ложноположительных срабатываний у более молодых женщин. Эта проблема служит основанием для поиска новых, надежных, малоинвазивных и дешевых биомаркеров рака молочной железы. Целью данной работы явилась проверка диагностической ценности шести плазменных микроРНК на выборке казахских женщин. Для этого мы, используя метод количественной ПЦР, сравнили уровни микроРНК в плазме больных раком молочной железы ($n = 27$) и здоровых контролей ($n = 33$), а также в опухоли и прилегающей здоровой ткани молочной железы ($n = 28$). Плазменные концентрации miR-145-5p, miR-191-5p и miR-21-5p были достоверно повышены у пациентов по сравнению с контролями ($P = 6.58e-7$, $2.70e-5$ и 0.049 , соответственно). Уровни miR-191-5p и miR-210-3p были достоверно повышены, а уровень miR-145-5p был достоверно понижен в опухоли по сравнению со здоровой тканью ($1.88e-6$, $6.56e-7$ и $9.66e-4$, соответственно). Для проверки гипотезы о секреторном происхождении изученных плазменных микроРНК, мы провели анализ корреляции уровней микроРНК в плазме, опухоли и здоровой ткани молочной железы, который показал, что, возможно, существует зависимость между уровнями miR-145-5p в плазме и опухоли. Согласно ROC-анализу, miR-145-5p и miR-191-5p могут рассматриваться как потенциальные плазменные биомаркеры, а miR-191-5p, miR-210-3p и miR-145-5p – как потенциальные тканевые биомаркеры для диагностики рака молочной железы. Результаты необходимо проверить на более представительной выборке образцов.

Ключевые слова: микроРНК, рак молочной железы, диагностика, биомаркер, плазма.

Введение. Рак молочной железы (РМЖ) является самой частой формой рака среди женщин во всем мире. Наиболее действенной мерой борьбы с РМЖ является раннее обнаружение злокачественных перерождений ткани. Внедрение маммографического скрининга для женщин рискованного возраста позволило значительно снизить смертность от РМЖ. Однако маммография дает значительное число ложноположительных срабатываний, особенно у более молодых женщин – до 61% в промежутке между 40 и 50 годами [1]. Применение дополнительных методов визуального обследования (УЗИ и МРТ) могут уменьшить этот процент, однако они рекомендованы лишь для женщин с повышенным риском [2]. В связи с этим маммографический скрининг уверенно рекомендован для женщин старше 50 лет, несмотря на то, что возрастная категория 40-50 лет также является рискованной [3]. Такое положение вещей делает актуальным поиск и разработку новых методов диагностики РМЖ, в том числе на основе биомаркеров. Циркулирующие микроРНК являются наиболее перспективными из них из-за простоты и малой инвазивности методики [4], а также высокой стабильности микроРНК в биожидкостях [5].

Целью данной работы явилась проверка диагностической ценности шести микроРНК при РМЖ на выборке казахских женщин. Актуальность работе прибавляет тот факт, что РМЖ у казашек чаще развивается в молодом возрасте – на 10 лет раньше, чем у славянок Казахстана [6].

Материалы и методы. Объект исследования. Венозная кровь, опухолевая и прилегающая здоровая ткани 28 женщин казахек с первичным РМЖ собрана в Казахском НИИ онкологии и радиологии МЗ РК, г. Алматы, Казахстан в 2019-2020 году. Средний возраст больных составил $54,1 \pm 11,92$. Венозная кровь 33 практически здоровых женщин казахек собрана в Карасайской центральной районной больнице г. Каскелен Алматинской области Казахстана после маммографического обследования осенью 2019 года. Средний возраст группы контроля составил $53,0 \pm 7,61$. Исследование проведено с соблюдением принципов Хельсинской Декларации, до своего начала прошло проверку и было разрешено локальной этической комиссией Института молекулярной биологии и биохимии им. М.А. Айтхожина г. Алматы, Казахстан. Все доноры были проинформированы и дали свое согласие на сбор и исследование биоматериала.

Получение плазмы. Кровь собиралась в вакуумные пробирки с цитратом натрия 3,8%, и хранилась при 4°C не более 1 суток после забора, после чего из нее получали плазму. Для получения плазмы кровь центрифугировали при 1000g в течение 15 мин при температуре 4°C ; верхняя водная фаза переносилась в новую пробирку и подвергалась центрифугированию при 2500g 15 мин при 4°C . Полученная плазма делилась на аликвоты по 200 мкл и хранилась при 70°C до этапа выделения.

Выделение тотальной РНК. Выделение тотальной РНК из тканей (около 50 мг) и плазмы (200 мкл) проводили на основе методики, разработанной ранее Zanuni Vahed S. с соавт. [7] с небольшими модификациями. Кратко депротеинизация проводилась по стандартной тризольной методике; затем для осаждения РНК к водной фазе добавляли равный объем хлорида лития 2,5M и два объема холодного этанола, смесь инкубировали в течение ночи при -70°C , центрифугировали 16000g 20 мин при 4°C ; осадок высушивали и растворяли в 50 мкл DEPC-воды, инкубируя 5 мин при 65°C . Полученный образец тотальной РНК хранили при -70°C до использования.

Получение кДНК и количественная ПЦР. Обратная транскрипция и количественная ПЦР проводилась с использованием праймеров и зондов набора TaqMan MicroRNA Assay (Applied Biosystems, США). кДНК получали при помощи реагентов TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) согласно протоколу изготовителя. Количественную ПЦР проводили в трех повторях с использованием реагентов TaqMan Universal Master Mix II with UNG (Applied Biosystems) в условиях, рекомендованных производителем на приборе StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Нормировку количественных данных проводили относительно уровня эндогенного контроля miR-16-5p. Пригодность эндогенного контроля оценивали в программе NormFinder [8].

Статистический анализ. Относительный количественный анализ проводится методом comparative Ct ($\Delta\Delta\text{Ct}$) с небольшими модификациями как в [9]. Относительная представленность транскрипта выражалась в ΔCt ($\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{\text{референс}} - \text{Ct}_{\text{целевой}}$). Показатель $\Delta\Delta\text{Ct}$ ($\Delta\Delta\text{Ct} = \text{среднее } \Delta\text{Ct}_{\text{РМЖ}} - \text{среднее } \Delta\text{Ct}_{\text{контроль}}$) рассматривался как диапазон изменений представленности транскрипта, выраженный двоичным логарифмом кратных изменений (\log_2 fold change). Статистические расчеты выполнялись в программе Jamovi [10]. Статистическая значимость полученных различий между группами рассчитывалась с помощью критерия U-критерия Манна-Уитни. Для сравнения экспрессии в опухоли и прилежащей здоровой ткани использовался критерий Уилкоксона. Р значения < 0.05 считались статистически значимыми. Так как исследование имело разведочный характер, поправка на множественность сравнений не производилась. Характеристики маркеров оценивались по результатам ROC-анализа, который был проведен с помощью web-tool easyROC [11] и Jamovi. Для вычисления оптимальной точки отсечения (optimal cut-of point) использовался метод индекса Юдена (Youden's index method).

Результаты.

Уровень микроРНК в плазме больных РМЖ в сравнении с контролем. Значения порогового цикла и сравнительная статистика изученных микроРНК в группах больных РМЖ и контроля представлена в таблице 1. Содержание трех микроРНК (miR-145-5p, miR-191-5p и miR-21-5p) было достоверно повышено в плазме больных РМЖ в сравнении с контролем (рисунок 1). Двоичный логарифм кратности изменений для miR-145-5p и miR-191-5p был выше единицы, что соответствует более чем двухкратной разнице в концентрации.

Таблица 1 – Сравнительный анализ уровней изученных микроРНК (выраженных в значениях порогового цикла, Ct) в плазме пациентов РМЖ и здоровых контролей

микроРНК	Пациенты РМЖ (n = 27)		Контрольная группа (n = 33)		$\Delta\Delta Ct$ (95% ДИ), \log_2 fold change	Тест Mann-Whitney U, значение P
	Ct сред. \pm ст. откл.	ΔCt сред. \pm ст. ошиб.	Ct сред. \pm ст. откл.	ΔCt сред. \pm ст. ошиб.		
miR-145-5p	29.48 \pm 1.60	-6.97 \pm 0.17	32.41 \pm 1.19	-8.48 \pm 0.19	1.51 (0.99; 2.02)	6.58e-7
miR-191-5p	26.59 \pm 1.83	-4.08 \pm 0.19	29.17 \pm 1.17	-5.23 \pm 0.11	1.15 (0.74; 1.57)	2.70e-5
miR-21-5p	25.26 \pm 1.97	-3.75 \pm 0.21	28.13 \pm 1.10	-4.19 \pm 0.14	0.45 (-0.04; 0.94)	0.049
miR-210-3p	32.14 \pm 1.38	-9.63 \pm 0.13	33.53 \pm 1.09	-9.60 \pm 0.12	-0.03 (-0.39; 0.33)	0.801
miR-222-3p	28.60 \pm 1.58	-6.09 \pm 0.17	30.19 \pm 0.84	-6.25 \pm 0.14	0.17 (-0.27; 0.60)	0.294
miR-29c-3p	33.74 \pm 1.81	-11.23 \pm 0.16	35.38 \pm 0.96	-11.44 \pm 0.14	0.22 (-0.20; 0.63)	0.212

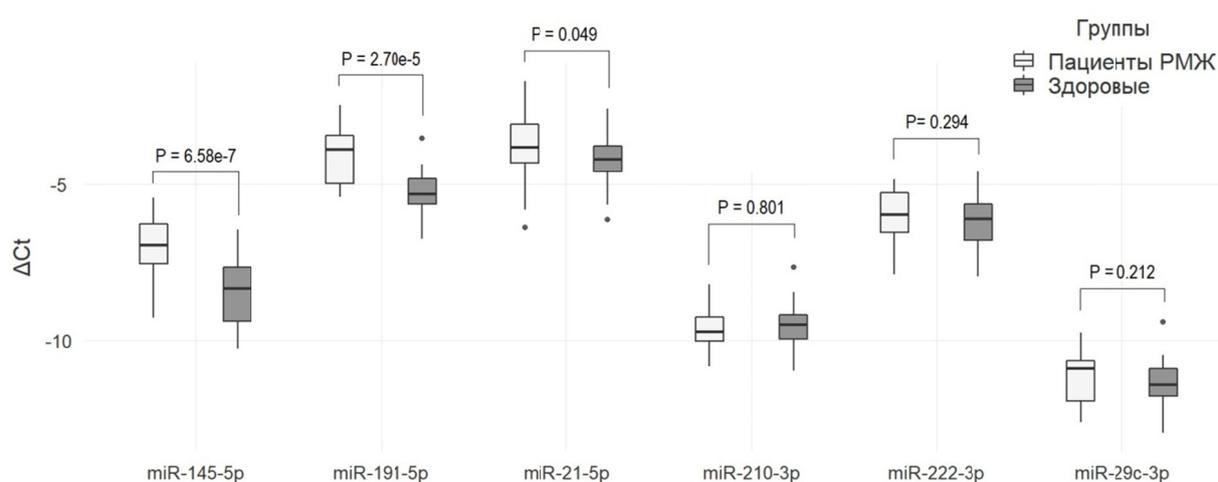


Рисунок 1 – Различия в значениях ΔCt между группами пациентов РМЖ (n = 27) и здоровых контролей (n = 33).

Экспрессия микроРНК в опухоли и прилегающей здоровой ткани. Экспрессия miR-191-5p и miR-210-3p была достоверно повышена, а экспрессия miR-145-5p была достоверно понижена в опухоли по сравнению с прилегающей нормальной тканью (рисунок 2). Различия в экспрессии остальных микроРНК были статистически недостоверны.

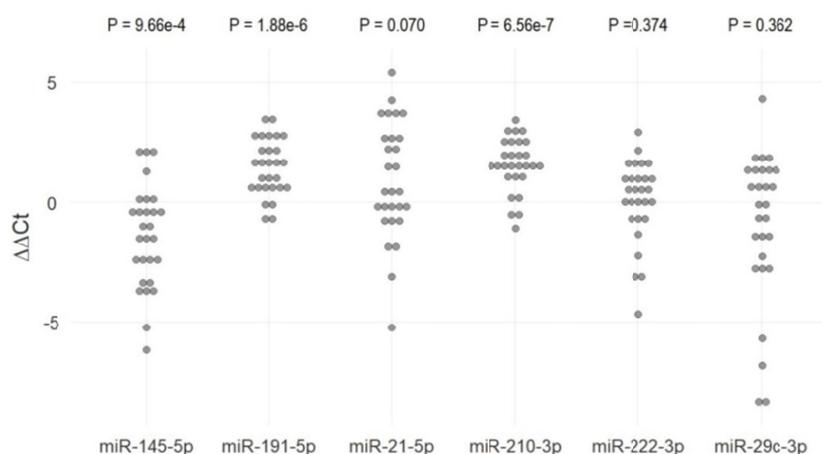


Рисунок 2 – Изменения в экспрессии изученных микроРНК в опухоли (n = 28) в сравнении с прилегающей здоровой тканью, выраженные в $\Delta\Delta Ct$

Корреляционный анализ концентраций микроРНК. Для проверки гипотезы о секреторном происхождении изученных плазменных микроРНК, мы провели анализ корреляции уровней микроРНК в плазме, опухоли и здоровой ткани молочной железы пациентов с РМЖ (таблица 2). Уровни miR-145-5p положительно коррелировали в плазме и опухоли ($P = 0.040$); уровни miR-210-3p положительно коррелировали в плазме и здоровой ткани молочной железы ($P = 0.040$); уровень miR-222-3p в плазме положительно коррелировал с тканевой $\Delta\Delta Ct$ (уровень в опухоли – уровень в здоровой ткани) ($P = 0.022$).

Таблица 2 – Результаты анализа корреляции концентрации микроРНК в плазме, опухоли и здоровой ткани больных РМЖ

Сравниваемые источники микроРНК	Коэффициент корреляции Спирмена / P значение					
	miR-145-5p	miR-191-5p	miR-21-5p	miR-210-3p	miR-222-3p	miR-29c-3p
Плазма vs Опухоль молочной железы	0.338 / 0.040	0.124 / 0.265	-0.076 / 0.650	0.171 / 0.192	0.137 / 0.243	0.143 / 0.233
Плазма vs Здоровая ткань молочной железы	0.178 / 0.182	0.215 / 0.136	0.055 / 0.391	-0.237 / 0.888	0.383 / 0.022	0.100 / 0.694
Плазма vs $\Delta\Delta Ct$	0.174 / 0.188	-0.099 / 0.694	-0.099 / 0.693	0.338 / 0.040	-0.183 / 0.826	0.268 / 0.084

ROC-анализ. Для проверки возможности применения наших микроРНК для различения больных РМЖ от здоровых индивидуумов мы провели ROC-анализ, результаты которого представлены в таблице 3. Наибольшая площадь под ROC-кривой (AUC) получена для miR-145-5p (0.854); немного менее для miR-191-5p (0.818); miR-21-5p значительно уступала по этому показателю (0.649). Для двух последних микроРНК общей слабостью была низкая чувствительность (59 % и 44 %, соответственно). Комбинационные модели позволили лишь незначительно увеличить лучший одиночный показатель. Используя совместно три микроРНК, оказалось возможным с 85% аккуратностью разделить больных РМЖ от здоровых женщин, при высокой специфичности (94 %) и средней чувствительности (74 %). Также мы оценили потенциал изученных микроРНК в качестве маркеров опухолевого процесса в тканях молочной железы (таблица 4). Как индивидуальные маркеры miR-191-5p и miR-210-3p показали одинаково высокую аккуратность разделения (84 %), miR-145-5p показал значительно более скромное значение (71 %). Однако при тестировании комбинационных моделей miR-145-5p хорошо дополняла две другие микроРНК, как в парных, так и в тройной модели.

Таблица 3 – Результаты ROC-анализа для плазменных микроРНК

Потенциальные маркеры/ комбинации	Площадь под ROC-кривой, AUC	Оптимальная точка отсечения	Специфичность	Чувствительность	Аккуратность
miR-145-5p	0.854	-7.38	0.879	0.704	0.800
miR-191-5p	0.818	-4.12	0.970	0.593	0.800
miR-21-5p	0.649	-3.24	0.909	0.444	0.700
miR-145-5p + miR-191-5p	0.878	-	0.909	0.747	0.833
miR-145-5p + miR-21-5p	0.869	-	0.727	0.926	0.817
miR-191-5p + miR-21-5p	0.822	-	0.970	0.593	0.800
miR-145-5p + miR-191-5p + miR-21-5p	0.893	-	0.939	0.741	0.850

Таблица 4 – Результаты ROC-анализа для тканевых микроРНК

Потенциальные маркеры/ комбинации	Площадь под ROC-кривой, AUC	Оптимальная точка отсечения	Специфичность	Чувствительность	Аккуратность
miR-145-5p	0.707	-3.05	0.964	0.464	0.714
miR-191-5p	0.894	-3.64	0.750	0.929	0.839
miR-210-3p	0.892	-8.205	0.857	0.821	0.839
miR-145-5p + miR-191-5p	0.944	-	0.893	0.857	0.875
miR-145-5p + miR-210-3p	0.952	-	0.929	0.857	0.893
miR-191-5p + miR-210-3p	0.917	-	0.821	0.893	0.857
miR-145-5p + miR-191-5p + miR-210-3p	0.962	-	1.000	0.857	0.929

Обсуждение. На этапе планирования эксперимента, опираясь на литературные данные, мы рассматривали два кандидата на роль эндогенного контроля в плазме – miR-191-5p [12-15] и miR-16-5p [12, 16], и один кандидат на роль эндогенного контроля в тканях молочной железы – miR-16-5p [17]. Однако по результатам анализа стабильности концентрации, проведенном с помощью программы NormFinder (данные не показаны), мы отказались от использования miR-191-5p. Таким образом, количественные данные (полученные как для плазмы, так и для ткани молочной железы) были нормализованы относительно единственного эндогенного контроля miR-16-5p.

К настоящему времени накапливаются сведения о значимой роли miR-191 в процессах канцерогенеза и ее дисрегуляции при различных видах рака, включая РМЖ [18, 19]. В двух работах показана ассоциация циркулирующей miR-191 с РМЖ [20, 21]. В согласии с данными работами, мы также обнаружили достоверное повышение уровня циркулирующей miR-191-5p в группе пациентов РМЖ по сравнению с группой контроля, а также в опухоли по сравнению с прилегающей здоровой тканью молочной железы в казахской популяции. MiR-191-5p является одной из наиболее часто используемых в качестве эндогенного контроля при количественных исследованиях плазменных или сывороточных микроРНК. Однако, по нашим данным, уровень этой микроРНК может значительно изменяться в плазме больных РМЖ, что препятствует ее использованию в этих целях.

Наиболее упоминаемой микроРНК в связи с РМЖ является miR-21-5p [22, 23]. Нам также удалось обнаружить ассоциацию плазменной miR-21-5p с РМЖ у казахских женщин. Однако на тканевом уровне зависимость не выявлена: различия в экспрессии miR-21-5p между опухолевой и здоровой тканями были статистически недостоверными. Возможно, это объясняется тем, что наша выборка пациентов РМЖ почти полностью представлена больными с опухолями 2 стадии прогрессии, а больные с опухолями 3 и 4 стадий не представлены вовсе. Предыдущими работами показано, что экспрессия miR-21-5p повышается по мере прогрессирования опухоли, в особенности на поздних стадиях канцерогенеза [24].

Среди плазменных микроРНК наиболее значимую ассоциацию с РМЖ в нашей выборке показала miR-145-5p. Согласно предыдущим исследованиям, miR-145 действует как супрессор опухолей ингибируя экспрессию некоторых онкогенов и, подавляя таким образом пролиферацию, миграцию и инвазию клеток опухоли груди [25]. В соответствии с этой концепцией в большинстве опухолей наблюдается понижение концентрации miR-145 по сравнению с нормальной тканью [26-28]. Мы также наблюдали понижение экспрессии miR-145-5p в большинстве опухолей по сравнению с прилегающей здоровой тканью молочной железы в казахской популяции. В большинстве ранее проведенных исследований уровень циркулирующей miR-145 в у больных РМЖ также был понижен по сравнению со здоровыми контролями [20, 29, 30]. Лишь в одной работе на выборке мексиканских женщин было показано, что уровень miR-145, наоборот, повышался в плазме больных РМЖ [21], что согласуется с нашими данными. Таким образом, по выявленным ассоциациям циркулирующих miR-145-5p и miR-191-5p с РМЖ и направлению их дисрегуляции казахская популяция сходна с мексиканской, и отличается от других популяций.

MiR-210 часто рассматривается в качестве маркера гипоксии при пролиферации опухоли, а гипоксия, в свою очередь, ассоциирована с устойчивостью опухоли к терапии и плохим прогнозом [31,32]. Кроме того, ранее было показано, что дисрегуляция циркулирующей miR-210 ассоциирована с наличием опухоли и метастазами в подмышечные лимфоузлы у пациентов с HER2 позитивными опухолями [33], отдаленными метастазами [34, 35] и устойчивостью к химиотерапии [14]. В нашей выборке, к сожалению, пациенты с положительным статусом подмышечных лимфоузлов представлены незначительно, а пациенты с отдаленными метастазами отсутствовали вовсе, что не позволило нам проверить вышеуказанные эффекты на казахской популяции. Мы не обнаружили различий в уровнях miR-210-3p в плазме больных РМЖ и здоровых контролей. Однако почти во всех изученных опухолях экспрессия этой микроРНК была достоверно повышена. Таким образом, miR-210-3p может быть дополнительным тканевым маркером опухолевого процесса в тканях молочной железы, но не имеет необходимых свойств плазменного маркера.

В отличие от предыдущих исследований, мы не выявили достоверных различий в уровнях miR-222-3p [15, 36, 37] и miR-29c-3p [38, 39] ни в плазме, ни в тканях молочной железы. Наши результаты в сравнении с литературными данными говорят о необходимости подтверждения применимости маркера на конкретных этнических группах.

Считается, что микроРНК попадают в кровотоки из опухолей путем активной секреции, апоптоза или некроза, и поэтому изменения в количестве циркулирующей микроРНК может отражать патологический процесс [22]. Однако уровни микроРНК в опухоли и плазме могут быть дисрегулированы в противоположных направлениях [13], что мы и наблюдали в нашем исследовании для miR-145-5p. Предполагают, что это происходит в результате избирательной секреции микроРНК опухолями [40], однако точные механизмы, лежащие за этими явлениями, остаются неясными. Для проверки секреторной гипотезы мы провели корреляционный анализ уровней наших микроРНК в плазме и опухолевой ткани. По результатам проведенного анализа мы не получили четких свидетельств в поддержку этого предположения: из трех плазменных микроРНК, показавших ассоциацию с РМЖ, только для miR-145-5p была обнаружена корреляция с опухолевым уровнем. Данная корреляция оказалась положительной, несмотря на противоположность в направленности дисрегуляции в плазме и опухоли. При сравнении плазменного уровня miR-145-5p с разностью уровней в опухоли и здоровой ткани (тканевая $\Delta\Delta Ct$) корреляция исчезала. Плазменный уровень miR-210 коррелировал с тканевой $\Delta\Delta Ct$, а плазменный уровень miR-222 – с экспрессией в здоровой ткани, однако концентрации этих микроРНК не отличались в плазме больных РМЖ и здоровых контролей.

ROC-анализ показал, что miR-145-5p и miR-191-5p больше подходят на роль маркеров диагностики РМЖ с одинаковыми показателями аккуратности разделения 80 %. Комбинационная модель из этих двух микроРНК лишь незначительно повышала площадь под ROC-кривой, и соответственно, эффективность разделения по группам до 83%, при достаточно высокой специфичности и средней чувствительности. Возможно, что аккуратность разделения можно будет повысить за счет применения для нормализации более стабильного эндогенного контроля или использования синтетической микроРНК в качестве экзогенного контроля.

Также, с помощью ROC-анализа, мы проверили потенциал изученных микроРНК в качестве маркеров опухолевого процесса в тканях молочной железы. По результатам анализа выяснилось, что две микроРНК (miR-191-5p и miR-210-3p) могут быть использованы для этой цели как индивидуально, так и в комбинации, добавление третьей miR-145-5p дополнительно улучшает комбинационные модели.

Несмотря на обнадеживающие результаты, имеются некоторые ограничения, которые следует устранить в дальнейших исследованиях. Необходимо расширить выборку образцов. Почти все исследованные пациенты имели опухоли на 2 стадии, поэтому необходимо проверить справедливость выводов на других стадиях опухолевой прогрессии. Также желательно проверить уровни наших микроРНК в плазме пациентов после лечения для оценки возможности их использования в качестве маркера эффективности терапии.

Работа выполнена за счет средств гранта №AP05132207 Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Е.Е. Аширбеков¹, А.О. Абайлдаев¹, А.М. Белкожаев^{1,2},
К.О. Шарипов^{1,3}, Н.Ә. Айтхожина¹

¹ М.Ә. Айтхожин атындағы молекулалық биология және биохимия институты, Алматы, Қазақстан;

² Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Алматы, Қазақстан;

³ С.Ж. Асфендияров атындағы Қазақ ұлттық медицина университеті, Алматы, Қазақстан

ҚАЗАҚ ӘЙЕЛІНДЕ КЕЗДЕСЕТІН ҚАТЕРЛІ СҮТ БЕЗІ ІСІГІ КЕЗІНДЕГІ КЕЙБІР микроРНК-ның ПЛАЗМАЛЫҚ ДЕНГЕЙІ

Аннотация. Қатерлі сүт безі ісігі – әлемде әйелдер арасында ең көп тараған қатерлі аурудың бірі. Қауіпті жасқа келген әйелдерге арнап маммографиялық скрининг енгізу аталған аурудан келетін өлім жағдайын едәуір азайтады, бірақ маммография жас әйел бойында жалған көп позитивті нәтиже көрсетеді. Бұл мәселе қатерлі сүт безі ісігін анықтау үшін жаңа сенімді, минималды инвазивті және арзан биомаркерлерін іздеудің негізі болып саналады. Басқа этникалық топтарға қарағанда қатерлі сүт безі ісігінің жас қазақ әйелдерінде жиі кездесу жағдайының анықталуы жұмыстың өзектілігін дәлелдейді. Жұмыстың мақсаты – қазақ әйелдерін мысалға ала отырып, алты плазмалық микроРНК-ның диагностикалық

құндылығын анықтау. Ол үшін сандық ПТР әдісін қолдану арқылы онкологиялық науқастар ($n = 27$) мен сау әйелдер ($n = 33$) плазмасындағы, сондай-ақ сүт безі ісігі мен сау тіндегі ($n = 28$) микроРНК деңгейін салыстырдық. Сандық деректер miR-16-5p эндогендік бақылау деңгейіне байланысты үйлестірілді. Науқастардың плазмадағы miR-145-5p, miR-191-5p және miR-21-5p концентрациясы сау әйелдермен салыстырғанда айтарлықтай жоғарылаған (сәйкесінше, $P = 6.58e-7$, $2.70e-5$ және 0.049). Ісіктегі miR-191-5p және miR-210-3p деңгейі, сау тінмен салыстырғанда, едәуір көбейіп, miR-145-5p деңгейі төмендеген (сәйкесінше, $1.88e-6$, $6.56e-7$ және $9.66e-4$). Зерттелген плазмалық микроРНК-ның секреторлық шығу тегі туралы гипотезаны тексеру үшін плазмадағы, ісік және сау сүт безі тіндегі микроРНК деңгейінің корреляциясын талдадық. Нәтижесінде плазма және ісіктегі miR-145-5p деңгейі арасында байланыстың болу ықтималдығы көрсетілді. Плазмадағы miR-210-3p деңгейі тіндік $\Delta\Delta Ct$ -мен қатынаста, ал плазмадағы miR-222-3p деңгейі сау тіндегі miR-222-3p экспрессиямен қатынаста болды, алайда микроРНК-ның плазмалық деңгейі қатерлі сүт безі ісігі науқастар мен сау әйелдер арасында ерекшеленбеді. Қатерлі сүт безі ісігі ауруын сау адам бойынан байқау үшін зерттелген микроРНК-ның қолдану құндылығын тексеру барысында ROC-талдауын жүргіздік. ROC-қисығы астындағы үлкен ауқым (AUC) miR-145-5p ($0,854$) арнайы алынды, miR-191-5p ($0,818$) біршама азырақ, ал miR-21-5p аталған көрсеткіште айтарлықтай төмен болды ($0,649$). Үш микроРНК-ны бірге қолдану арқылы науқастарды сау әйелдерден 85% дәлдікпен, жоғары ерекшелікпен (94%) және орташа сезімталдықпен (74%) бөліп алуға болады. Сүт безі тіндегі ісік процесінің маркерлері ретінде зерттелген микроРНК потенциалын талдағанда miR-191-5p немесе miR-210-3p қолдану арқылы қатерлі ісікті сау тіннен жоғары дәлдікпен (әрқайсысы 84%) ажыратуға болатындығы анықталды. Жеке miR-145-5p орташа дәлдікті (71%) көрсетумен бірге ол жұптық және үштік модельде қалған екі микроРНК-ны сәтті толықтырды. Осылайша қатерлі сүт безі ісігін диагностикалау үшін miR-145-5p және miR-191-5p потенциалды плазмалық биомаркер ретінде, ал miR-191-5p, miR-210-3p және miR-145-5p потенциалды тіндік биомаркер ретінде қарастыруға болады. Нәтижелер неғұрлым байыпты үлгіде тексерілуі керек.

Түйін сөздер: микроРНК, қатерлі сүт безі ісігі, диагностика, биомаркер, плазма.

Y.Y. Ashirbekov¹, A.O. Abaildayev¹, A.M. Belkozhayev^{1,2},
K.O. Sharipov^{1,3}, N.A. Aitkhozhina¹

¹ M. Aitkhozhin Institute of Molecular Biology and Biochemistry, Almaty, Kazakhstan;

² Al-Farabi Kazakh National University, Almaty, Kazakhstan;

³ Asfendiyarov Kazakh National Medical University, Almaty, Kazakhstan

PLASMA LEVELS OF SOME microRNA IN BREAST CANCER IN THE KAZAKH POPULATION

Abstract. Breast cancer is the most common cancer among women worldwide. The use of mammography screening for women, in the age range the most at risk to breast cancer, has led to a significant reduction in mortality from this disease. However, mammography shows a significant number of false positives in women at a younger age. This problem indicates the need to find new reliable, minimally invasive and cheap biomarkers of breast cancer. The relevance of the research is determined by the fact that breast cancer in Kazakh women often develops at a young age. The aim of this study was to test the diagnostic value of six plasma miRNAs in Kazakh women. For this, using the quantitative PCR technique, we compared the levels of the miRNAs in the plasma of breast cancer patients ($n = 27$) and healthy controls ($n = 33$), as well as in the breast tumor and adjacent normal tissue ($n = 28$). Quantitative data were normalized relative to endogenous control miR-16-5p. Plasma concentrations of miR-145-5p, miR-191-5p, and miR-21-5p were significantly increased in patients compared to controls ($P = 6.58e-7$, $2.70e-5$, and 0.049 , respectively). The levels of miR-191-5p and miR-210-3p were significantly increased, while the level of miR-145-5p was significantly reduced in the tumor compared to normal tissue ($1.88e-6$, $6.56e-7$ and $9.66e-4$, respectively). To test the hypothesis of the secretory origin of the studied plasma miRNAs, we analyzed the correlation of miRNA levels in plasma, tumor, and healthy breast tissue. Correlation analysis showed that there may be a relationship between plasma and tumor levels of miR-145-5p. Plasma level of miR-210-3p correlated with tissue $\Delta\Delta Ct$, plasma level of miR-222-3p correlated with its expression in healthy tissue; however, the concentrations of these miRNAs did not differ in plasma of breast cancer patients and healthy controls. To test whether our circulating miRNAs can be used to differentiate breast cancer patients from healthy individuals, we performed a ROC analysis. The largest area under the ROC-curve (AUC) was obtained for miR-145-5p (0.854), slightly less for miR-191-5p (0.818), and miR-21-5p was significantly inferior in this indicator (0.649). Using three microRNAs together, it was possible to separate patients from healthy women with 85% accuracy, high specificity (94%) and medium sensitivity (74%). When assessing the potential of the studied miRNAs as markers of tumorigenesis in breast tissue, we found that using miR-191-5p or miR-210-3p, it is possible to distinguish cancer from healthy tissue with equally high accuracy

(84% each). Although individually miR-145-5p showed medium separation accuracy (71 %), it complemented two other miRNAs in both paired and triple models. Thus, miR-145-5p and miR-191-5p can be considered potential plasma biomarkers, while miR-191-5p, miR-210-3p, and miR-145-5p can be considered potential tissue biomarkers for the diagnosis of breast cancer. The findings need to be confirmed on a more representative cohort of samples.

Key words: microRNA, breast cancer, diagnostics, biomarker, plasma.

Information about authors:

Ashirbekov Yeldar Yerlanovich, Corresponding author, M. Aitkhozhin Institute of Molecular Biology and Biochemistry, Acting Head of Laboratory, eldarasher@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-2265-9717>;

Abaildayev Arman Orazalyuly, M. Aitkhozhin Institute of Molecular Biology and Biochemistry, Junior Researcher, armandj_92@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1813-1338>;

Belkozhayev Ayaz Maratovich, M. Aitkhozhin Institute of Molecular Biology and Biochemistry, Junior Researcher, ayaz_jarkent@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7429-4994>;

Sharipov Kamalidin Orynbayevich, Doctor of Biological Sciences, Professor, M. Aitkhozhin Institute of Molecular Biology and Biochemistry, General Director, Chief Researcher, imbb-acad.kz@mail.ru, skamalidin@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5946-5521>;

Aitkhozhina Nagima Abenovna, Academician of the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan, Doctor of Biological Sciences, Professor, M. Aitkhozhin Institute of Molecular Biology and Biochemistry, Chief Researcher aytkhozhina.nagima@bk.ru, <https://orcid.org/0000-0003-2507-6645>

REFERENCES

[1] McDonald E.S., Clark A.S., Tchou J., Zhang P., Freedman G.M. Clinical Diagnosis and Management of Breast Cancer // *J Nucl Med*. 2016. Vol. 57, Suppl 1. P. 9S-16S.

[2] Berg W.A. Tailored supplemental screening for breast cancer: what now and what next? // *AJR Am J Roentgenol*. 2009. Vol. 192 (2). P. 390-399.

[3] Siu A.L. U.S. Preventive Services Task Force. Screening for Breast Cancer: U.S. Preventive Services Task Force Recommendation Statement // *Ann Intern Med*. 2016. Vol. 164 (4). P. 279-296.

[4] Pimentel F., Bonilla P., Ravishankar Y.G., Contag A., Gopal N., LaCour S., Lee T., Niemz A. Technology in MicroRNA Profiling: Circulating MicroRNAs as Noninvasive Cancer Biomarkers in Breast Cancer // *J Lab Autom*. 2015. Vol. 20 (5). P. 574-88.

[5] Glinge C., Clauss S., Boddum K., Jabbari R., Jabbari J., Risgaard B., Tomsits P., Hildebrand B., Kääh S., Wakili R., Jespersen T., Tfelt-Hansen J. Stability of Circulating Blood-Based MicroRNAs – Pre-Analytic Methodological Considerations // *PLoS One*. 2017. Vol. 12 (2). e0167969.

[6] Толеутай У.К., Позднякова А.П. Этнические особенности заболеваемости раком молочной железы в Кызылординской области Казахстана // *Медицина*. 2013. №9. С. 48-51. [U.K. Toleutay, A.P. Pozdnyakovova. The ethnic features in the incidence of breast cancer in the Kyzyl-Orda region of Kazakhstan // *Medicina*. 2013. Vol.9. P. 48-51].

[7] Zununi Vahed S., Barzegari A., Rahbar Saadat Y., Mohammadi S., Samadi N. A microRNA isolation method from clinical samples // *Bioimpacts*. 2016. Vol. 6 (1). P. 25-31.

[8] Andersen C.L., Jensen J.L., Ørntoft T.F. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets // *Cancer Res*. 2004. Vol. 64 (15). P. 5245-50.

[9] Königshoff M., Kramer M., Balsara N., Wilhelm J., Amarie O.V., Jahn A., Rose F., Fink L., Seeger W., Schaefer L., Günther A., Eickelberg O. WNT1-inducible signaling protein-1 mediates pulmonary fibrosis in mice and is upregulated in humans with idiopathic pulmonary fibrosis // *J Clin Invest*. 2009. Vol. 119 (4). P. 772-87.

[10] The jamovi project (2020). Jamovi (Version 1.2) [Computer Software]. Retrieved from <https://www.jamovi.org>.

[11] Goksuluk D., Korkmaz S., Zararsiz G., Karaağaoğlu A.E. easyROC: An Interactive Web-tool for ROC Curve Analysis Using R Language Environment // *The R Journal*. 2016. Vol. 8 (2). P. 213-230.

[12] Donati S., Ciuffi S., Brandi M.L. Human Circulating miRNAs Real-time qRT-PCR-based Analysis: An Overview of Endogenous Reference Genes Used for Data Normalization // *Int J Mol Sci*. 2019. Vol. 20 (18). pii:E4353.

[13] Chan M., Liaw C.S., Ji S.M., Tan H.H., Wong C.Y., Thike A.A., Tan P.H., Ho G.H., Lee A.S. Identification of circulating microRNA signatures for breast cancer detection // *Clin Cancer Res*. 2013. Vol. 19 (16). P. 4477-87.

[14] Shao B., Wang X., Zhang L., Li D., Liu X., Song G., Cao H., Zhu J., Li H. Plasma microRNAs Predict Chemoresistance in Patients With Metastatic Breast Cancer // *Technol Cancer Res Treat*. 2019. Vol. 18. 1533033819828709.

[15] Hu Z., Dong J., Wang L.E., Ma H., Liu J., Zhao Y., Tang J., Chen X., Dai J., Wei Q., Zhang C., Shen H. Serum microRNA profiling and breast cancer risk: the use of miR-484/191 as endogenous controls // *Carcinogenesis*. 2012. Vol. 33 (4). P. 828-34.

[16] McDermott A.M., Kerin M.J., Miller N. Identification and validation of miRNAs as endogenous controls for RQ-PCR in blood specimens for breast cancer studies // *PLoS One*. 2013. Vol. 8 (12). e83718.

[17] Davoren P.A., McNeill R.E., Lowery A.J., Kerin M.J., Miller N. Identification of suitable endogenous control genes for microRNA gene expression analysis in human breast cancer // *BMC Mol Biol*. 2008. Vol. 9. 76.

[18] Gao X., Xie Z., Wang Z., Cheng K., Liang K., Song Z. Overexpression of miR-191 Predicts Poor Prognosis and Promotes Proliferation and Invasion in Esophageal Squamous Cell Carcinoma // *Yonsei Med J*. 2017. Vol. 58 (6). P. 1101-1110.

- [19]Zhang X., Wu M., Chong Q.Y., Zhang W., Qian P., Yan H., Qian W., Zhang M., Lobie P.E., Zhu T. Amplification of hsa-miR-191/425 locus promotes breast cancer proliferation and metastasis by targeting DICER1 // *Carcinogenesis*. 2018. Vol. 39 (12). P. 1506-1516.
- [20]Ng E.K., Li R., Shin V.Y., Jin H.C., Leung C.P., Ma E.S., Pang R., Chua D., Chu K.M., Law W.L., Law S.Y., Poon R.T., Kwong A. Circulating microRNAs as specific biomarkers for breast cancer detection // *PLoS One*. 2013. Vol. 8 (1). e53141.
- [21]Mar-Aguilar F., Mendoza-Ramírez J.A., Malagón-Santiago I., Espino-Silva P.K., Santuario-Facio S.K., Ruiz-Flores P., Rodríguez-Padilla C., Reséndez-Pérez D. Serum circulating microRNA profiling for identification of potential breast cancer biomarkers // *Dis Markers*. 2013. Vol. 34 (3). P. 163-9.
- [22]Schwarzenbach H. Clinical Relevance of Circulating, Cell-Free and Exosomal microRNAs in Plasma and Serum of Breast Cancer Patients // *Oncol Res Treat*. 2017. Vol. 40 (7-8). P. 423-429.
- [23]Adhami M., Haghdoost A.A., Sadeghi B., Malekpour Afshar R. Candidate miRNAs in human breast cancer biomarkers: a systematic review // *Breast Cancer*. 2018. Vol. 25(2). P. 198-205.
- [24]Petrović N. miR-21 Might be Involved in Breast Cancer Promotion and Invasion Rather than in Initial Events of Breast Cancer Development // *Mol Diagn Ther*. 2016. Vol. 20 (2). P. 97-110.
- [25]Ye P., Shi Y., An N., Zhou Q., Guo J., Long X. miR-145 overexpression triggers alteration of the whole transcriptome and inhibits breast cancer development // *Biomed Pharmacother*. 2018. Vol. 100. P. 72-82.
- [26]Sachdeva M., Zhu S., Wu F., Wu H., Walia V., Kumar S., Elble R., Watabe K., Mo Y.-Y. P53 represses c-Myc through induction of the tumor suppressor miR-145 // *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009. Vol. 106 (9). P. 3207-12.
- [27]Tang W., Zhang X., Tan W., Gao J., Pan L., Ye X., Chen L., Zheng W. miR-145-5p Suppresses Breast Cancer Progression by Inhibiting SOX2 // *J Surg Res*. 2019. Vol. 236. P. 278-287.
- [28]Jiang Y., Wang D., Ren H., Shi Y., Gao Y. MiR-145-targeted HBXIP modulates human breast cancer cell proliferation // *Thorac Cancer*. 2019. Vol. 10 (1). P. 71-77.
- [29]Kodahl A.R., Lyng M.B., Binder H., Cold S., Gravgaard K., Knoop A.S., Ditzel H.J. Novel circulating microRNA signature as a potential non-invasive multi-marker test in ER-positive early-stage breast cancer: a case control study // *Mol Oncol*. 2014. Vol. 8 (5). P. 874-83.
- [30]Hu J., Xu J., Wu Y., Chen Q., Zheng W., Lu X., Zhou C., Jiao D. Identification of microRNA-93 as a functional dysregulated miRNA in triple-negative breast cancer // *Tumour Biol*. – 2015. – Vol. 36 (1). – P. 251-8.
- [31]Camps C., Buffa F.M., Colella S., Moore J., Sotiriou C., Sheldon H., Harris A.L., Gleadle J.M., Ragoussis J. hsa-miR-210 Is induced by hypoxia and is an independent prognostic factor in breast cancer // *Clinical Cancer Research*. 2008. Vol. 14 (5). P. 1340-1348.
- [32]Pasculli B., Barbano R., Rendina M., Fontana A., Copetti M., Mazza T., Valori V.M., Morritti M., Maiello E., Graziano P., Murgo R., Fazio V.M., Esteller M., Parrella P. Hsa-miR-210-3p expression in breast cancer and its putative association with worse outcome in patients treated with Docetaxel // *Scientific Reports*. 2019. Vol. 9. 14913.
- [33]Jung E.J., Santarpia L., Kim J., Esteva F.J., Moretti E., Buzdar A.U., Leo A.D., Le X.F., Bast Jr R.C., Park S.T., Pusztai L., Calin G.A. Plasma microRNA 210 levels correlate with sensitivity to trastuzumab and tumor presence in breast cancer patients // *Cancer*. 2012. Vol. 118 (10). P. 2603-2614.
- [34]Madhavan D., Peng C., Wallwiener M., Zucknick M., Nees J., Schott S., Rudolph A., Riethdorf S., Trumpp A., Pantel K., Sohn C., Chang-Claude J., Schneeweiss A., Burwinkel B. Circulating miRNAs with prognostic value in metastatic breast cancer and for early detection of metastasis // *Carcinogenesis*. 2016. Vol. 37 (5). P. 461-470.
- [35]Markou A., Zavridou M., Sourvinou I., Yousef G., Kounelis S., Malamos N., Georgoulis V., Lianidou E. Direct Comparison of Metastasis-Related miRNAs Expression Levels in Circulating Tumor Cells, Corresponding Plasma, and Primary Tumors of Breast Cancer Patients // *Clinical Chemistry*. 2016. Vol. 62 (7). P. 1002-1011.
- [36]Song J., Ouyang Y., Che J., Li X., Zhao Y., Yang K., Zhao X., Chen Y., Fan C., Yuan W. Potential Value of miR-221/222 as Diagnostic, Prognostic, and Therapeutic Biomarkers for Diseases // *Frontiers in Immunology*. 2017. Vol. 8. 56.
- [37]Kim J., Oh S., Park S., Ahn S., Choi Y., Kim G., Kim S.I., Lee H. Circulating miR-221 and miR-222 as Potential Biomarkers for Screening of Breast Cancer // *Biomedical Science Letters*. 2019. Vol. 25. P. 185-189.
- [38]Zhang L., Xu Y., Jin X., Wang Z., Wu Y., Zhao D., Chen G., Li D., Wang X., Cao H., Xie Y., Liang Z. A circulating miRNA signature as a diagnostic biomarker for non-invasive early detection of breast cancer // *Breast Cancer Res Treat*. 2015. Vol. 154 (2). P. 423-434.
- [39]Wu Q., Wang C., Lu Z., Guo L., Ge Q. Analysis of serum genome-wide microRNAs for breast cancer detection // *Clinica Chimica Acta*. 2012. Vol. 413 (13-14). P. 1058-1065.
- [40]Fan Q., Yang L., Zhang X., Peng X., Wei S., Su D., Zhai Z., Hua X., Li H. The emerging role of exosome-derived non-coding RNAs in cancer biology // *Cancer Lett*. 2018. Vol. 414. P. 107-115.

**Publication Ethics and Publication Malpractice
in the journals of the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan**

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/journal-authors/ethics>.

Submission of an article to the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <http://www.elsevier.com/postingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. In particular, translations into English of papers already published in another language are not accepted.

No other forms of scientific misconduct are allowed, such as plagiarism, falsification, fraudulent data, incorrect interpretation of other works, incorrect citations, etc. The National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan follows the Code of Conduct of the Committee on Publication Ethics (COPE), and follows the COPE Flowcharts for Resolving Cases of Suspected Misconduct (http://publicationethics.org/files/u2/New_Code.pdf). To verify originality, your article may be checked by the originality detection service Cross Check <http://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

The authors are obliged to participate in peer review process and be ready to provide corrections, clarifications, retractions and apologies when needed. All authors of a paper should have significantly contributed to the research.

The reviewers should provide objective judgments and should point out relevant published works which are not yet cited. Reviewed articles should be treated confidentially. The reviewers will be chosen in such a way that there is no conflict of interests with respect to the research, the authors and/or the research funders.

The editors have complete responsibility and authority to reject or accept a paper, and they will only accept a paper when reasonably certain. They will preserve anonymity of reviewers and promote publication of corrections, clarifications, retractions and apologies when needed. The acceptance of a paper automatically implies the copyright transfer to the National Academy of sciences of the Republic of Kazakhstan.

The Editorial Board of the National Academy of sciences of the Republic of Kazakhstan will monitor and safeguard publishing ethics.

Правила оформления статьи для публикации в журнале смотреть на сайте:

[www:nauka-nanrk.kz](http://www.nauka-nanrk.kz)

ISSN 2518-1483 (Online), ISSN 2224-5227 (Print)

<http://reports-science.kz/index.php/en/archive>

Редакторы: *М. С. Ахметова, Д. С. Аленов, А. Ахметова*

Верстка на компьютере *А. М. Кульгинбаевой*

Подписано в печать 04.12.2020.

Формат 60x881/8. Бумага офсетная. Печать – ризограф.

8,25 п.л. Тираж 500. Заказ 6.