

Факторы преаналитического этапа, влияющие на уровни циркулирующих микроРНК плазмы и сыворотки крови

Сотникова Е. А., Киселева А. В., Мешков А. Н.

ФГБУ "Национальный медицинский исследовательский центр терапии и профилактической медицины" Минздрава России.
Москва, Россия

Циркулирующие микрорибонуклеиновые кислоты (микроРНК) являются перспективными биомаркерами различных заболеваний, однако их использование в клинических лабораторных условиях требует высокочувствительных, воспроизводимых, надежных и устойчивых методов, позволяющих проводить их точную количественную оценку в плазме и сыворотке крови. Преаналитическая фаза исследований, проводимых с использованием биообразцов, состоит из их сбора, обработки, хранения и транспортировки. Преаналитические условия остаются основными искажающими факторами в исследованиях микроРНК, а стандартизация этих условий, осуществляемая в биобанках, может оказать положительное влияние на воспроизводимость результатов исследований и возможность их сравнения. Целью обзора является рассмотрение основных современных оригинальных исследований, посвященных изучению преаналитических факторов, которые являются важным источником различий в исследованиях, посвященных циркулирующим микроРНК, на этапах от взятия крови до получения плазмы или сыворотки.

Ключевые слова: микроРНК, преаналитические факторы, плазма, сыворотка, центрифугирование, антикоагулянты, хранение крови.

Отношения и деятельность: нет.

Поступила 04/09-2024

Рецензия получена 12/09-2024

Принята к публикации 18/10-2024



Для цитирования: Сотникова Е. А., Киселева А. В., Мешков А. Н. Факторы преаналитического этапа, влияющие на уровни циркулирующих микроРНК плазмы и сыворотки крови. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2024;23(11):4179. doi: 10.15829/1728-8800-2024-4179. EDN SQPPKZ



Preanalytical factors affecting the plasma and serum levels of circulating microRNAs

Sotnikova E. A., Kiseleva A. V., Meshkov A. N.

National Medical Research Center for Therapy and Preventive Medicine. Moscow, Russia

Circulating microribonucleic acids (microRNAs) are promising biomarkers of various diseases, but their clinical laboratory use requires highly sensitive, reproducible, reliable and sustainable methods for their accurate plasma and serum quantification. The preanalytical phase of studies conducted using biospecimens consists of their collection, processing, storage and transportation. Preanalytical conditions remain the main distorting factors in microRNA studies, and standardization of these conditions, carried out in biobanks, can improve the reproducibility of results and their comparison. The review aim is to consider the main contemporary original studies on preanalytical factors, which are an important source of variability in studies on circulating microRNAs at the stages from blood collection to plasma or serum production.

Keywords: microRNA, preanalytical factors, plasma, serum, centrifugation, anticoagulants, blood storage.

Relationships and Activities: none.

Sotnikova E. A.* ORCID: 0000-0002-8395-4146, Kiseleva A. V. ORCID: 0000-0003-4765-8021, Meshkov A. N. ORCID: 0000-0001-5989-6233.

*Corresponding author: sotnikova.evgeniya@gmail.com

Received: 04/09-2024

Revision Received: 12/09-2024

Accepted: 18/10-2024

For citation: Sotnikova E. A., Kiseleva A. V., Meshkov A. N. Preanalytical factors affecting the plasma and serum levels of circulating microRNAs. *Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2024;23(11):4179. doi: 10.15829/1728-8800-2024-4179. EDN SQPPKZ

кПЦР — количественная полимеразная цепная реакция в режиме реального времени с обратной транскрипцией, КТ — комнатная температура, ПЦР — полимеразная цепная реакция, РНК — рибонуклеиновая кислота, ЭДТА — этилендиаминтетрауксусная кислота, АСД-В — citric acid, trisodium citrate, dextrose (лимонная кислота, тринатрийцитрат, декстроза), СТАД — citrate-theophylline-adenosine-dipyridamole (цитрат натрия, теофиллин, аденозин и дипиридамон), PPP — platelet-poor plasma (бедная тромбоцитами плазма), PRP — platelet-rich plasma (богатая тромбоцитами плазма), PMV — platelet-derived microvesicles (микровезикулы тромбоцитов).

*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):

e-mail: sotnikova.evgeniya@gmail.com

[Сотникова Е. А.* — с.н.с. лаборатории молекулярной генетики Института персонализированной терапии и профилактики, ORCID: 0000-0002-8395-4146, Киселева А. В. — к.б.н., в.н.с., руководитель лаборатории молекулярной генетики Института персонализированной терапии и профилактики, ORCID: 0000-0003-4765-8021, Мешков А. Н. — д.м.н., руководитель Института персонализированной терапии и профилактики, ORCID: 0000-0001-5989-6233].

Ключевые моменты**Что известно о предмете исследования?**

- Внеклеточные микроРНК присутствуют в плазме и сыворотке крови и потенциально могут быть использованы в качестве биомаркеров различных заболеваний.
- Преаналитическая фаза исследований, включающая сбор, обработку, хранение и транспортировку биообразцов, может играть важную роль в надежности и воспроизводимости количественной оценки циркулирующих микроРНК.

Что добавляют результаты исследования?

- Отсутствие стандартизации протоколов обработки образцов для анализа циркулирующих микроРНК плазмы и сыворотки крови ключевым образом влияет на воспроизводимость результатов исследований.
- Экспериментальные данные противоречивы и не позволяют установить оптимальные условия для всех этапов пробоподготовки.

Key messages**What is already known about the subject?**

- Cell-free microRNAs are present in plasma and serum and can potentially be used as biomarkers of various diseases.
- The preanalytical phase of studies, including collection, processing, storage and transportation of biospecimens, can play an important role in the reliability and reproducibility of circulating microRNA quantification.

What might this study add?

- No standardization of sample processing protocols for the analysis of circulating microRNAs in plasma and serum has a key impact on the reproducibility of study results.
- Experimental data are contradictory and do not make it possible to establish optimal conditions for all sample preparation stages.

Введение

Микрорибонуклеиновые кислоты (микроРНК) — это короткие, одноцепочечные, некодирующие РНК длиной 18–25 нуклеотидов, которые функционируют как посттранскрипционные регуляторы экспрессии генов [1, 2]. Внеклеточные микроРНК присутствуют в биологических жидкостях организма, в т.ч. в плазме и сыворотке крови [3]. В кровотоке внеклеточные микроРНК защищены от деградации, поскольку они включены в микровезикулы или экзосомы, связаны с липопротеинами высокой плотности или комплексом AGO2 (семейство белков Argonaute) [4, 5].

Относительно высокая стабильность микроРНК в биологических жидкостях (например, плазме, сыворотке, моче, слюне), малоинвазивность процедуры взятия крови, быстрое высвобождение из межклеточной жидкости в кровоток при развитии патологии, а также возможность классифицировать особенности течения заболевания, его стадию, степень тяжести и другие клинические особенности с помощью профилей экспрессии микроРНК, обусловили повышенный интерес к оценке целесообразности их применения в качестве малоинвазивных биомаркеров для диагностики широкого спектра заболеваний [6–8]. Однако использование циркулирующих микроРНК в качестве биомаркеров в клинической практике требует высокочувствительных, воспроизводимых, надежных и устойчивых методов, позволяющих проводить их точную количественную оценку в плазме и сыворотке крови [8, 9].

Преаналитические условия остаются основными искажающими факторами в исследованиях ми-

кроРНК [10]. Преаналитическая фаза исследований, проводимых с использованием биообразцов, включает их сбор, обработку, хранение и транспортировку. Все этапы могут существенно влиять на биологическую и химическую сохранность образцов и играют важную роль в надежности и воспроизводимости количественной оценки циркулирующих микроРНК [6, 10]. Однако в настоящее время консенсус по методологическим параметрам, используемым при исследовании уровней экспрессии циркулирующих микроРНК, отсутствует [8].

В обзоре Van Der Schueren C, et al. (2024) была проанализирована частота упоминания преаналитических переменных в исследованиях РНК плазмы и было выявлено, что из 22 преаналитических переменных, входящих в три влияющие на анализ категории (забор крови, приготовление плазмы и выделение РНК), только три были указаны достаточно информативно более чем в половине работ (200 исследованиях 2018г и 2023г): проводилась ли очистка РНК, метод очистки и использованная фракция плазмы [11]. Процент представленных переменных варьировался от 4,6 до 54,6% (среднее значение 24,84%) в 2023г и от 4,6 до 57,1% (среднее значение 28,60%) в 2018г, что свидетельствует о недостаточности информации о преаналитических переменных в публикациях результатов исследований внеклеточных РНК [11].

Отсутствие воспроизводимости между исследованиями [9, 12] свидетельствует о том, что для получения достоверных результатов необходимо следовать рекомендациям по повышению стабильности и воспроизводимости количественного определения

Таблица 1

Исследования, включенные в анализ

Источник	Выборка, человек	Биоматериал	Метод	Исследуемые преаналитические факторы	Количество микроРНК	Анализируемые эндогенные микроРНК
Kirschner MB, et al. (2011) [19]	37	Плазма	кПЦР	Гемолиз	2	miR-16, miR-451
McDonald JS, et al. (2011) [15]	8; 10	Сыворотка	кПЦР	Центрифугирование, гемолиз	3	miR-15b, miR-16, miR-24
Cheng HH, et al. (2013) [20]	3	Сыворотка, плазма	кПЦР	Центрифугирование	11, 365	hsa-let-7a, hsa-miR-16, hsa-miR-92a, hsa-miR-122, hsa-miR-124a, hsa-miR-141, hsa-142-3p, hsa-miR-205, hsa-miR-210, hsa-miR-223, hsa-miR-451; miRNA Ready-to-Use PCR, Human panel I, V1.M
Kirschner MB, et al. (2013) [21]	3; 5	Плазма	кПЦР	Гемолиз	754 7	hsa-miR-15b, hsa-miR-16, hsa-miR-24, hsa-miR-451, hsa-miR-92a, hsa-miR-155, hsa-miR-625; TaqMan Array Human MicroRNA A+B Cards Set v3.0
Page K, et al. (2013) [22]	5	Плазма	кПЦР	Центрифугирование, хранение крови	384; 8	hsa-miR-191, hsa-miR-21, hsa-miR-15b, hsa-miR-15b, hsa-miR-16, hsa-miR-16, hsa-miR-24, hsa-miR-155, hsa-miR-484; TLDA Pool A v2.0 Cards
Zhao H, et al. (2014) [23]	164	Плазма	кПЦР	Хранение крови	3	miR-16, miR-134, miR-346
Binderup HG, et al. (2016) [12]	10	Плазма	кПЦР	Центрифугирование	14	miR-142-3p, miR-145, miR-16, miR-26a, miR-28, miR-301, miR-30a-5p, miR-30d, miR-328, miR-331, miR-335, miR-340, miR-92a, miR-93
Basso D, et al. (2017) [24]	3	Сыворотка, плазма	Микрочипы	Сбор биообразцов, центрифугирование, хранение крови, транспортировка	2006	Agilent SureprintG3 Human miRNA
Glinge C, et al. (2017) [25]	12	Сыворотка, плазма	кПЦР	Сбор биообразцов, хранение крови, транспортировка	3	miR-1, miR-21, miR-29b
Binderup HG, et al. (2018) [9]	1	Плазма	кПЦР, цифровая капельная ПЦР	Сбор биообразцов, центрифугирование	3	miR-92a, miR-126, miR-16
Muth DC, et al. (2018) [26]	2	Плазма	кПЦР	Центрифугирование	2	miR-16-5p, miR-21-5p
Murray MJ, et al. (2018) [27]	1; 2; 7	Сыворотка, плазма	кПЦР	Сбор биообразцов, центрифугирование, хранение крови	8; 106	hsa-miR-451a, hsa-miR-23a-3p, hsa-miR-30b-5p, hsa-miR-30c-5p, hsa-miR-191-5p, hsa-miR-130b-3p, hsa-miR-146a-5p, hsa-miR-26a-5p; 106 микроРНК, из исследования Page K, et al. (2013) [22] со значениями Ct <35
Ward Gahlawat A, et al. (2019) [28]	6; 8	Плазма	кПЦР	Сбор биообразцов, хранение крови	6	miR-16, miR-451a; miR-148b, miR-652, miR-376c, miR-200c
Faraldi M, et al. (2020) [29]	10	Плазма	кПЦР	Сбор биообразцов, центрифугирование	179	Exiqon miRCURY LNA miRNA focus panel
Mussbacher M, et al. (2020) [30]	6	Плазма	кПЦР	Сбор биообразцов, центрифугирование, гемолиз, хранение крови	12	miR-223-3p, miR-197-3p, miR-150-5p, miR-23a-3p, miR-191-5p, miR-320a, miR-24-3p, miR-21-5p, miR-126-3p, miR-27-3p, miR-28-3p, miR-451a
Kim SH, et al. (2021) [8]	5	Плазма	кПЦР	Гемолиз, хранение крови	179	Exiqon Serum/Plasma Focus miRNA PCR panel
Suzuki K, et al. (2022) [31]	18	Плазма	NGS малых РНК	Сбор биообразцов, хранение крови	тотальная микроРНК	—

Таблица 1. Продолжение

Источник	Выборка, человек	Биоматериал	Метод	Исследуемые преаналитические факторы	Количество микроРНК	Анализируемые эндогенные микроРНК
Zhelankin AV, et al. (2022) [32]	10	Плазма	NGS микроРНК, кПЦР	Сбор биообразцов	тотальная микроРНК; 11	hsa-miR-223-3p, hsa-miR-126-3p, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-150-5p, hsa-miR-16-5p, hsa-miR-92a-3p, hsa-miR-451a, hsa-miR-23a-3p, hsa-miR-30e-5p
Chan S-F, et al. (2023) [10]	4; 5; 6; 10	Сыворотка, плазма	кПЦР	Сбор биообразцов, гемолиз, центрифугирование, хранение крови	356; 7	hsa-miR-1973, hsa-miR-28-5p, hsa-miR-20b-5p, hsa-miR-363-3p, hsa-miR-451a, hsa-miR-1290, hsa-miR-10b-5p; MiRXES Lab Pte. Ltd. multiplexed quantitative RT-PCR
Sun J, et al. (2023) [33]	4	Плазма	NGS РНК	Хранение крови	тотальная микроРНК	—
Wakabayashi I, et al. (2024) [34]	5	Сыворотка, плазма	Микрочипы	Хранение крови	2632	TRT-XR520 3D-Gene miRNA Oligo chip

Примечание: микроРНК — микро рибонуклеиновая кислота, ПЦР — полимеразная цепная реакция, кПЦР — количественная полимеразная цепная реакция в режиме реального времени с обратной транскрипцией, NGS — next generation sequencing (секвенирование следующего поколения).

циркулирующей микроРНК [13], учитывать влияние таких параметров, как дизайн исследования и анализ данных [14], преаналитические условия [15] и методика профилирования микроРНК [6, 16, 17], поскольку каждый отдельный шаг в методологической процедуре может потенциально иметь большое влияние на обнаружение микроРНК [18].

Цель обзора — рассмотрение основных современных оригинальных исследований, посвященных изучению преаналитических параметров на этапах от взятия крови до получения плазмы или сыворотки.

Методологические подходы

Поиск литературных источников проводился по заголовкам, аннотациям и ключевым словам в системах индексирования научных публикаций (Google Scholar, PubMed, eLIBRARY) с использованием следующих запросов: "serum+microRNA"/"сыворотка+микроРНК" и "plasma+microRNA"/"плазма+микроРНК" с добавлением дополнительных переменных "preanalytical"/"pre-analytical"/"преаналитический", "storage"/"хранение", "processing"/"обработка", "centrifugation"/"центрифугирование", "anticoagulant"/"антикоагулянт". Глубина поиска составила 15 лет. В обзор были включены только оригинальные методические исследования тотальной циркулирующей микроРНК.

Результаты

Преаналитические факторы. Несмотря на растущее внимание к циркулирующим микроРНК, особенно полученным из плазмы или сыворотки крови, как к перспективным кандидатам на роль биомаркеров для выявления различных патологических состояний, их использование в клинических условиях затруднено. Различные факторы влияют на уровни

микроРНК по отдельности или в сочетании, например, тип антикоагулянта крови, содержание тромбоцитов, степень гемолиза, а также процедурные различия, например, время и условия хранения крови, плазмы и сыворотки, протокол центрифугирования и способ выделения микроРНК [8].

В обзор были включено 21 методологическое исследование, направленное на изучение следующих преаналитических факторов: сбор, обработка, хранение, транспортировка биообразцов (таблица 1). Из всех включенных в обзор исследований, большинство посвящены анализу только плазмы (n=14), в остальных изучали и плазму, и сыворотку.

Среди методов анализа микроРНК в анализируемых работах преобладала количественная полимеразная цепная реакция (ПЦР) в режиме реального времени с обратной транскрипцией (кПЦР) (n=16) или цифровая капельная ПЦР [9], в одной из них помимо кПЦР использовалось секвенирование микроРНК [32]. В остальных применялся анализ с помощью микрочипов (n=2) [24, 34], секвенирование РНК (n=1) [33] и малых РНК (n=1) [31].

Ограничением большинства исследований является небольшой размер выборки. Только в 4 исследованиях размер выборки превышал 20 образцов [9, 19, 23, 31], из них >100 образцов было только в одном [23]. В двух исследованиях все образцы для отдельных экспериментов были получены от одного донора [9, 27].

Многие исследования были не лишены недостатков в описании преаналитических факторов. Например, в одной работе [23] не указан набор для выделения микроРНК и протокол центрифугирования, а в другой не описано, как была выполнена нормализация данных кПЦР [28].

При проведении статистического анализа в области количественной генетики необходимо приме-

Таблица 2

Исследования,
сравнивающие разные антикоагулянты

Источник	Антикоагулянты/пробирки
Basso D, et al. (2017) [24]	K ₂ ЭДТА, цитрат натрия, литий-гепарин, ACD-B
Glinge C, et al. (2017) [25]	ЭДТА, цитрат, литий-гепарин
Mussbacher M, et al. (2020) [30]	ЭДТА, цитрат натрия, CTAD
Suzuki K, et al. (2022) [31]	Na ₂ ЭДТА, K ₂ ЭДТА, цитрат натрия, фторид натрия
Zhelankin AV, et al. (2022) [32]	K ₂ ЭДТА, цитрат натрия, ACD-B, CTAD

Примечание: ЭДТА — этилендиаминтетрауксусная кислота, ACD-B — citric acid, trisodium citrate, dextrose (лимонная кислота, тринатрийцитрат, декстроза), CTAD — citrate-theophylline-adenosine-dipyridamole (цитрат натрия, теофиллин, аденозин и дипиридабол).

нение поправки на множественные сравнения [35], отсутствие которой приводит как к завышению уровня значимости, так и нахождению большого числа ложных ассоциаций. Из 21 рассматриваемой работы поправка на множественные сравнения была упомянута в 7 [8, 20, 29–32, 34].

Сбор биообразцов. В ходе многочисленных исследований было показано, что уровни ряда микроРНК в плазме и сыворотке значимо различаются. Так, сравнительный анализ 985 микроРНК, показал, что уровень 249 микроРНК был значимо выше в сыворотке, а 50 — в плазме [34]. В отсутствие сопоставимых результатов важно использовать один тип образцов последовательно на протяжении всего исследования [1].

В работе Binderup HG, et al. (2018) проводили последовательный забор 30 образцов крови у одного донора с помощью одной венопункции. При сравнении средних уровней микроРНК в первых и последних 10 пробирках, вне зависимости от способа нормализации, статистически значимых различий не выявлено [9].

Chan S-F, et al. (2023) оценили уровень гемоглобина, а также относительный уровень эритроцитарных и тромбоцитарных микроРНК в плазме после центрифугирования, при использовании для забора крови пробирок разного объема (6 и 10 мл) и не выявили значимых различий [10].

Неправильная обработка крови может привести к загрязнению клеточным материалом, в т.ч. в результате гемолиза, активации или присутствия тромбоцитов, и изменениям в профиле микроРНК, которые не связаны с патологическими состояниями [10, 21]. Влияние гемолиза эритроцитов на микроРНК плазмы и сыворотки изучалось в ряде работ [15, 19, 21, 30]. Было показано, что в зависимости от уровня гемолиза в образце вызванные им изменения затрагивают до 65% (88/136) детектированных микроРНК плазмы [21]. Были проведены исследования по изучению связи использованных антикоагулянтов

и пробирок разных производителей [27, 28, 31, 32], а также времени и условий хранения крови [8, 10, 34] с гемолизом.

Большинство исследований по изучению влияния этапа забора крови на циркулирующие микроРНК плазмы касаются используемых антикоагулянтов (таблица 2).

Пробирки, содержащие антикоагулянты на основе этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) и цитрата натрия, были включены во все сравнительные исследования, направленные на изучение влияния антикоагулянтов. Литий-гепарин [24, 25], ACD-B (citric acid, trisodium citrate, dextrose; лимонная кислота, тринатрийцитрат, декстроза) [24, 32], CTAD (citrate-theophylline-adenosine-dipyridamole; цитрат натрия, теофиллин, аденозин и дипиридабол) [30, 32] были включены в два исследования каждый.

В плазме, полученной с использованием литий-гепарина, исследуемые микроРНК не были детектированы в обеих работах [24, 25]. Glinge C, et al. (2017) не обнаружили значимых различий в уровнях исследуемых микроРНК в плазме, полученной с другими антикоагулянтами [25], а в работе Basso D, et al. (2017) микроРНК, выделенная из плазмы с другими антикоагулянтами, была оценена как высококачественная [24].

Mussbacher M, et al. (2020) обнаружили значимое повышение уровней микроРНК в ЭДТА-плазме и усиление этого эффекта со временем при хранении при комнатной температуре (КТ) [30]. В рекомендациях этого исследования CTAD указан как предпочтительный антикоагулянт [30]. Zhelankin AV, et al. (2022) выявили различия в микроРНК профилях образцов плазмы, полученных с использованием калиевой соли ЭДТА (K₂ЭДТА), и полученных с использованием других включенных в исследование антикоагулянтов, и предположили, что это связано с повышенным уровнем гемолиза в образцах с ЭДТА [32]. Suzuki K, et al. (2022) обнаружили повышенный уровень эритроцитарных микроРНК, в образцах, полученных с использованием цитрата натрия и фторида натрия, и отдают предпочтение ЭДТА в качестве антикоагулянта [31].

Кроме того, в одном из исследований использовали 2 типа пробирок с K₂ЭДТА в качестве антикоагулянта: с разделительным гелем и без него. При немедленной заморозке плазмы на -80°С, количество обнаруженных микроРНК в плазме, собранной в пробирки без разделительного геля, было значительно меньше (96) по сравнению с плазмой в пробирках с разделительным гелем (161) [29].

В двух исследованиях [27, 28] проводилось сравнение использования пробирок для долгосрочного хранения крови, разработанных для предотвращения лизиса клеток и увеличения продолжительности хранения плазмы для анализа микроРНК. Более низкие уровни гемолиза были детектированы в об-

Таблица 3

Хранение крови		
Источник	Биоматериал	Условия хранения
Page K, et al. (2013) [22]	Плазма (ЭДТА)	Хранение крови 2 ч или 6 ч при КТ
Zhao H, et al. (2014) [23]	Плазма (ЭДТА)	Хранение крови 18 ч при КТ (25°С) при сравнении с немедленным получением плазмы
Basso D, et al. (2017) [24]	Сыворотка, плазма (ЭДТА, цитрат натрия, литий-гепарин, ACD-B)	Хранение и транспортировка крови до 9 ч при 2-8°С или КТ
Glinge C, et al. (2017) [25]	Сыворотка, плазма (ЭДТА)	Хранение крови (ЭДТА) до 3 дней (0, 4, 8, 12, 24, 72 ч), 24 ч и 4 дня при КТ; хранение крови (ЭДТА) 1 день и 9 мес. при -80°С; транспортировка крови, плазмы (ЭДТА) и сыворотки
Murray MJ, et al. (2018) [27]	плазма (ЭДТА)	Хранение крови до 14 дней (0, 2, 4, 7, 10, 14 дней) при КТ в пробирках для долгосрочного хранения разных производителей
Ward Gahlawat A, et al. (2019) [28]	Плазма (ЭДТА)	Хранение крови до 18 ч (4 ч, 12 ч, 18 ч) при КТ и 4°С, хранение крови до 7 дней при КТ в пробирках для долгосрочного хранения разных производителей
Mussbacher M, et al. (2020) [30]	Плазма (СТАВ, цитрат, ЭДТА)	Хранение крови до 24 ч (30 мин, 2 ч, 6 ч, 24 ч) при 4°С или КТ
Kim SH, et al. (2021) [8]	Плазма (ЭДТА)	Хранение крови до 24 ч (30 мин, 2 ч, 6 ч, 24 ч) при 4°С
Suzuki K, et al. (2022) [31]	Плазма (ЭДТА)	Хранение крови до 3 дней (1 ч, 1 день, 2 дня, 3 дня) при 4°С
Chan S-F, et al. (2023) [10]	Плазма (ЭДТА)	Хранение крови до получения плазмы на льду или при КТ до 7 ч
Sun J, et al. (2023) [33]	Плазма (ЭДТА)	Хранение крови до 24 ч (2 ч, 6 ч, 24 ч) при КТ (18-22°С) и 4°С
Wakabayashi I, et al. (2024) [34]	Сыворотка, плазма (ЭДТА)	Хранение крови до 3 ч при КТ перед получением плазмы или до 3 ч после получаса при КТ на образование сгустка перед получением сыворотки

Примечание: КТ — комнатная температура, ЭДТА — этилендиаминтетрауксусная кислота, ACD-B — citric acid, trisodium citrate, dextrose (лимонная кислота, тринатрийцитрат, декстроза).

разцах в Cell-Free DNA BCT (Streck) пробирках по сравнению с пробирками, содержащими ЭДТА, — гемолиз в них не был детектирован до 7 дня, тогда как в образцах с ЭДТА гемолиз был обнаружен в течение часа [27]. В исследовании Ward Gahlawat A, et al. (2019) в образцах плазмы, полученных из крови, хранившейся в пробирках Cell-Free DNA BCT (Streck) значимое повышение уровня гемолиза, оцененного с помощью микроРНК miR-451a было детектировано после 5 дней хранения, в пробирках Cell-Free DNA Collection Tube (Roche Diagnostics) — после 7 дней, в пробирках PAXgene Blood ccfDNA Tube (PreAnalytiX) и cf-DNA/cf-RNA Preservative tubes (Norgen Biotek Corp) не было детектировано после 7 дней [28].

Несмотря на то, что результаты некоторых исследований указывают на то, что ЭДТА может быть не лучшим выбором антикоагулянта для анализа циркулирующих микроРНК [30, 32], он остается одним из самых распространенных — из 13 исследований, включенных в настоящий обзор и не направленных на изучение влияния антикоагулянтов или типов используемых пробирок, антикоагулянты на основе ЭДТА были использованы в 12, в одном был использован ACD [26].

Хранение крови. Известно, что значительные изменения в концентрациях многих измеряемых аналитов может вызывать отложенная обработка биоматериала [1]. При проведении исследований может

потребоваться кратковременное хранение и транспортировка образцов крови из места сбора в лабораторию. Высвобождение микроРНК клеток крови во время хранения крови может влиять на уровень исследуемых микроРНК в плазме и сыворотке [33].

В таблице 3 представлены 12 исследований, в которых проводилось сравнение разных условий хранения (длительность и температурный режим) и/или транспортировки крови. Во всех 12 работах кровь была собрана в пробирки для получения плазмы, в 3 из них также анализировали кровь в пробирках для получения сыворотки [24, 25, 34]. Значения КТ, при которых были проведены исследования, приведены в трех публикациях [23, 24, 33].

Исследуемые условия хранения крови можно разделить на краткосрочные (до одного дня) [8, 10, 22-24, 30, 33] и на долгосрочные (от 3 до 14 дней) [25, 27, 28, 31].

В двух исследованиях изучалось влияние длительности хранения крови при КТ до получения сыворотки [25, 34]: значимых различий в уровне экспрессии 823 различных микроРНК при хранении в течение 3 ч обнаружено не было в работе [34], но в исследовании [25] уровень miR-21 был стабилен только в течение 24 ч, тогда как уровень miR-1 был стабилен в течение 4 дней.

В ряде работ изучали, как влияет на стабильность микроРНК длительность хранения при КТ до получения плазмы (ЭДТА) [22, 23, 25, 27, 28, 33, 34].

Таблица 4

Протоколы центрифугирования для различных типов образцов

Источник	Условия центрифугирования
Cheng HH, et al. (2013) [20]	Плазма: 1) 3400 g, 10 мин, КТ; PPP: 1) 3400 g, 10 мин, КТ; 2) 1940 g, 10 мин, 25°C; PRP: 1) 600 g, 10 мин, 25°C
Page K, et al. (2013) [22]	Плазма: 1) 1000 g, 10 мин, 4°C; 2) 1000 g, 10 мин, 4°C; Плазма: 1) 1000 g, 10 мин, 4°C; 2) 2000 g, 10 мин, 4°C; Плазма: 1) 1000 g, 10 мин, 4°C; 2) 10000 g, 10 мин, 4°C
Binderup HG, et al. (2016) [12]	PRP: 1) 3000 g, 15 мин; 2) 3000 g, 15 мин; Плазма: 1) 2000 g, 10 мин; Плазма: 1) 2000 g, 10 мин; хранение 1 нед. при -80°C; Плазма: 1) 2000 g, 10 мин; хранение 1 нед. при -80°C; 2) 3000 g, 30 мин; Плазма: 1) 2000 g, 10 мин; хранение 1 нед. при -80°C; 2) 3000 g, 15 мин; Плазма: 1) 2000 g, 10 мин; хранение 1 нед. при -80°C; 2) 3000 g, 15 мин; 3) 3000 g, 15 мин
Basso D, et al. (2017) [24]	Сыворотка, плазма: 1) 1200 g, 10 мин, КТ или 4°C; Сыворотка, плазма: 1) 1200 g, 10 мин, КТ или 4°C; 2) 2500 g, 15 мин, КТ или 4°C
Binderup HG, et al. (2018) [9]	PRP: 1) 3000 g, 30 мин, 18°C; PRP: 1) 3000 g, 15 мин, 18°C; 2) 3000 g, 15 мин, 18°C
Muth DC, et al. (2018) [26]	PRP: 1) 1300 g, 15 мин; PRP: 1) 1300 g, 15 мин; 2) 2500 g, 15 мин; 3) 2500 g, 15 мин
Murray MJ, et al. (2018) [27]	Плазма: 1) 1600 g, 10 мин; Плазма: 1) 1600 g, 10 мин; 2) 14400 g, 10 мин
Faraldi M, et al. (2020) [29]	Плазма: 1) 1300 g, 10 мин, КТ (22°C); PRP: 1) 1300 g, 10 мин, КТ (22°C); 2) 2500 g, 15 мин, КТ
Chan S-F, et al. (2023) [10]	PRP: 1) 1500 g, 15 мин; 2) 2500 g, 15 мин; PRP: 1) 1500 g, 15 мин; 2) 1500 g, 20 мин; PRP: 1) 1500 g, 15 мин; 2) 2000 g, 15 мин; PRP: 1) 1500 g, 15 мин; 2) 3000 g, 15 мин; PRP: 1) 1500 g, 15 мин; 2) 5000 g, 5 мин

Примечание: КТ — комнатная температура, ЭДТА — этилендиаминтетрауксусная кислота, PPP — platelet-poor plasma (бедная тромбоцитами плазма), PRP — platelet-rich plasma (богатая тромбоцитами плазма), SDP — Streck DNA plasma, SRP — Streck RNA plasma, 1) — первое центрифугирование, 2) — второе центрифугирование, 3) — третье центрифугирование.

Было показано, что хранение крови с ЭДТА до центрифугирования при КТ значительно изменяло уровни экспрессии анализируемых микроРНК: при сравнении результатов хранения при 2 ч и 6 ч [22], а также при хранении в течение 3 ч [34], 2 ч, 6 ч, 24 ч [30], 6 ч и 24 ч [33], 18 ч [23], 3 и 4 дней [25], и, наконец, а также в течение 14 дней [27] по сравнению с немедленным центрифугированием. В исследовании [28] было выявлено различие в уровнях экспрессии микроРНК после 18 ч хранения по сравнению с 4 ч [28]. Однако в исследовании [25] при хранении крови (ЭДТА) при КТ концентрации микроРНК не изменялись в течение 24 ч.

В двух исследованиях оценивали влияние на хранение крови типа пробирок для длительного хранения разных производителей [27, 28]. Один тип пробирок совпадал между исследованиями Cell-Free DNA (Streck), однако в работе [27] было показано увеличение уровней микроРНК с увеличением длительности хранения (0, 2, 4, 7, 10, 14 дней), в то время как в работе [28] общее содержание микроРНК оставалось стабильным в крови, хранящейся до 1 нед.

В ряде исследований оценивали, как влияет длительность хранения крови (ЭДТА) при 4°C [8, 10, 28, 30, 31, 33] на стабильность микроРНК. В боль-

шинстве работ показано, что при увеличении времени хранения крови при 4°C в течение 2 ч, 6 ч, 24 ч [8, 30], 24 ч [33], после 1 дня [31] при сравнении с немедленным центрифугированием наблюдалось изменение уровней экспрессии микроРНК, в работе Kim SH, et al. (2021) также показано значимое повышение гемолиза с увеличением времени хранения [8]. Однако в работе [28] значимых различий получено не было при хранении в 12 и 18 ч при сравнении с хранением в течение 4 ч.

Кроме того, было проведено изучение влияния хранения крови до получения плазмы на льду или при КТ до 7 ч [10], в результате которого было показано, что в образцах, хранившихся на льду, относительный уровень связанных с эритроцитами микроРНК, использовавшийся как индикатор гемолиза, был значительно выше, чем в образцах, хранившихся при КТ, в которых не было обнаружено значимых различий с образцами, обработанными немедленно. Как было показано ранее, хранение цельной крови на льду приводит к изменению качества плазмы и повреждению целостности мембраны тромбоцитов [36].

Лишь в одном из исследований было проведено хранение крови (ЭДТА) в течение 9 мес. при -80°C,

которое показало увеличение уровней экспрессии микроРНК по сравнению с длительностью хранения в течение 1 дня [25].

Таким образом, результаты большинства обсуждаемых исследований продемонстрировали, что уровни микроРНК значимо меняются уже после нескольких часов хранения крови как при КТ, так и при 4°С, и обработка образцов должна проводиться как можно быстрее после получения.

Транспортировка. Несмотря на то, что транспортировка биообразцов также является преаналитическим фактором, исследований, проводивших сравнение условий транспортировки, немного. В реальных клинических условиях многие диагностические тесты проводятся на аутсорсинге, и образцы крови необходимо отправлять до места проведения анализа [28]. Только в двух из включенных в обзор исследований проводилась оценка влияния транспортировки на биообразцы [24, 25]. В одном из них кровь в пробирках для получения сыворотки или с ЭДТА, а также плазма и сыворотка были помещены в шейкер при КТ на 1 или 8 ч, после чего оценивали концентрацию hsa-miR-1 и hsa-miR-21 [25]. В результате было показано, что после 8 ч экспрессия обеих микроРНК значимо снизилась в плазме, а miR-1 — в сыворотке цельной крови, тогда как после 1 ч воздействия никаких изменений не наблюдалось. Экспрессия микроРНК в обработанной ЭДТА цельной крови была стабильной после 1 или 8 ч воздействия. Образцы цельной крови вероятно являются более устойчивыми, чем разделенные фракции в условиях физического стресса, но они также демонстрируют схожую тенденцию к снижению уровней микроРНК с течением времени [25]. В другом исследовании кровь в пробирках для получения сыворотки и плазмы с разными антикоагулянтами была транспортирована до 9 ч при 2–8°С или КТ [24]. В результате было показано, что на выход микроРНК сыворотки метод хранения существенно не влиял, в то время как статистически значимый эффект хранения был обнаружен для плазмы ЭДТА и АСД-В [24].

Центрифугирование. Во время подготовки сыворотки и плазмы удаление клеточных компонентов обычно достигается путем центрифугирования. Конечная фракция плазмы может различаться по количеству остаточных тромбоцитов и микровезикул, в зависимости от скорости центрифугирования [32]. Тромбоциты содержат множество микроРНК, а условия подготовки плазмы могут вызывать активацию тромбоцитов и высвобождение микровезикул тромбоцитов (platelet-derived microvesicles, PMV), которые содержат специфические сигнатуры микроРНК. PMV составляют основную фракцию всех микровезикул в плазме. Даже следовые количества тромбоцитов или микрочастиц будут искусственно повышать уровни микроРНК и потенциально изменять профили экспрессии микроРНК, связанные

с заболеванием, поскольку концентрации микроРНК в клетках крови намного выше, чем в плазме или сыворотке [1]. Поэтому минимизация активации тромбоцитов *in vitro* является важным аспектом исследования циркулирующих микроРНК [32].

Исследования, направленные на изучение влияния протоколов центрифугирования образцов и установление оптимального протокола центрифугирования, приведены в таблице 4.

Анализ уровней трех микроРНК в плазме после трех последовательных центрифугирований показал, что более высокая концентрация исследованных микроРНК в плазме обусловлена клеточной контаминацией, а дополнительное ультрацентрифугирование при 355000 g привело лишь к незначительному снижению концентрации микроРНК; это указывает на то, что вклад экзосом и везикул в концентрацию исследованных микроРНК минимален [15].

В работе Cheng НН, et al. (2013) были оценены уровни циркулирующих микроРНК, остаточное количество тромбоцитов и содержание микрочастиц в плазме и сыворотке, подвергшихся разным способам обработки. После однократного центрифугирования при 3400 g, содержание тромбоцитов в плазме составило 28 тыс./мкл, повторное центрифугирование, в результате которого была получена бедная тромбоцитами плазма (platelet-poor plasma, PPP) снизило содержание тромбоцитов на 80–90%, а плазма, полученная с помощью центрифугирования при 600 g — богатая тромбоцитами плазма (platelet-rich plasma, PRP), содержала в 13–19 раз больше тромбоцитов. При сравнении PRP после фильтрации через 0,22 мкм фильтр и тромбоцитарного концентрата (ресуспендированный осадок, образовавшийся после получения PRP) уровни 71% детектированных микроРНК (199/282) различались [20].

В других исследованиях также было показано снижение общего выхода микроРНК [24], количества детектируемых микроРНК [29], концентрации отдельных микроРНК [26, 27], в т.ч. ассоциированных с тромбоцитами [29], при двойном центрифугировании плазмы по сравнению с однократным.

При этом, двойное центрифугирование оказывало гораздо меньший эффект на образцы сыворотки, чем плазмы [15], результаты, полученные Basso D, et al. (2017) при сравнении образцов сыворотки после одного или двух центрифугирований, показали, что профили экспрессии зависели преимущественно от температуры, а не от протокола центрифугирования [24].

Page K, et al. (2013) показали, что скорость второго центрифугирования плазмы влияет на количество детектированных микроРНК, которое составило 195 при 1000 g, 187 при 2000 g и 138 при 10000 g. Также было показано снижение уровня ассоциированных с тромбоцитами микроРНК (hsa-miR-24, hsa-miR-191, hsa-miR-197, hsa-miR-223) при

центрифугировании при 10000 g [22]. Однако в работе Chan S-F, et al. (2023) в плазме, полученной после второго центрифугирования при наибольшей из исследованных скоростей (5000 g), относительный уровень ассоциированных с тромбоцитами микроРНК был значимо повышен по сравнению с плазмой, полученной после второго центрифугирования при 1500 g, при этом при повышении скорости второго центрифугирования от 1500 g до 3000 g наблюдался тренд к понижению относительной концентрации тромбоцитарных микроРНК [10].

Были также изучены другие способы получения PPP: тройное центрифугирование [26] и продолжительное одиночное центрифугирование [9].

В ряде исследований, включенных в настоящий обзор и не направленных на изучение условий центрифугирования, была использована плазма, полученная после однократного центрифугирования (условия центрифугирования варьировали от 1200 g в течение 10 мин до 2500 g в течение 20 мин) [19, 25, 31, 34], в других — полученная после двойного (скорость второго центрифугирования варьировала от 2500 g до 12000 g) [8, 28, 30, 32, 33]. В двух исследованиях из первой группы были использованы образцы биобанков [25, 31]. Возможность получения PPP из замороженных образцов плазмы была проанализирована в ряде исследований [10, 12, 20].

Было показано, что при повторном центрифугировании плазмы, замороженной после однократного центрифугирования, происходит значимое снижение содержания тромбоцитов [20]. При двух последовательных центрифугированиях размороженной плазмы при 3000 g в течение 15 мин было показано снижение содержания тромбоцитов до значений, достигнутых в PPP, во всех десяти исследованных образцах, при одном центрифугировании при 3000 g в течение 30 мин — в шести образцах из десяти [12], также было показано снижение относительного уровня ассоциированных с тромбоцитами микроРНК по сравнению с плазмой, полученной при однократном центрифугировании и не подвергавшейся заморозке [10]. Однако в работе

Binderup HG, et al. (2016) уровни всех или большинства (в зависимости от использованной нормализации) исследованных микроРНК были значимо выше, чем в PPP [12].

Таким образом, хотя частота использования плазмы, полученной после одного и двух центрифугирований сопоставима, протоколы центрифугирования, позволяющие получить плазму с наименьшим содержанием тромбоцитов и наименьшей контаминацией тромбоцитарными микроРНК, включают два последовательных центрифугирования непосредственно после забора крови. При этом, актуальным остается вопрос использования образцов из коллекций биобанков. Стандартные протоколы приготовления плазмы, используемые в биобанках, включают одно центрифугирование, а проведение дополнительных центрифугирований после разморозки позволяет снизить до уровня PPP содержание тромбоцитов, но остаются значимые различия в уровнях микроРНК.

Заключение

Результаты исследований показывают, что различия в обработке образцов на каждом этапе пробоподготовки могут приводить к статистически значимым различиям в уровнях исследуемых микроРНК, и подтверждают необходимость унификации процессов пробоподготовки. Биобанки, использующие единые протоколы для всех образцов, позволяют решить эту задачу. В то же время, некоторые данные указывают на возможную неоптимальность наиболее распространенных практик, в т.ч. тех, которые применяются к образцам в коллекциях биобанков, что может потребовать разработки дополнительных протоколов обработки и анализа таких образцов. Для этого, а также для уточнения уже полученных противоречивых результатов необходимы дополнительные исследования.

Отношения и деятельность: все авторы заявляют об отсутствии потенциального конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Литература/References

1. Khan J, Lieberman JA, Lockwood CM. Variability in, variability out: best practice recommendations to standardize pre-analytical variables in the detection of circulating and tissue microRNAs. Clin Chem Lab Med. 2017;55:608-21. doi:10.1515/cclm-2016-0471.
2. Markou AN, Lianidou ES. The impact of pre-analytical factors on the reliability of miRNA measurements. Curr Pathobiol Rep. 2019;7:29-33. doi:10.1007/s40139-019-00191-9.
3. Balzano F, Deiana M, Dei Giudici S, et al. miRNA Stability in Frozen Plasma Samples. Molecules. 2015;20:19030-40. doi:10.3390/molecules201019030.
4. Wang K, Zhang S, Weber J, et al. Export of microRNAs and microRNA-protective protein by mammalian cells. Nucleic Acids Res. 2010;38:7248-59. doi:10.1093/nar/gkq601.
5. O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, et al. Overview of MicroRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation. Front Endocrinol (Lausanne). 2018;9:402. doi:10.3389/fendo.2018.00402.
6. Blondal T, Jensby Nielsen S, Baker A, et al. Assessing sample and miRNA profile quality in serum and plasma or other biofluids. Methods. 2013;59:S1-6. doi:10.1016/j.ymeth.2012.09.015.
7. Reid G, Kirschner MB, van Zandwijk N. Circulating microRNAs: Association with disease and potential use as biomarkers. Crit Rev Oncol Hematol. 2011;80:193-208. doi:10.1016/j.critrevonc.2010.11.004.
8. Kim SH, MacIntyre DA, Sykes L, et al. Whole blood holding time prior to plasma processing alters microRNA expression profile. Front Genet. 2021;12:818334. doi:10.3389/fgene.2021.818334.

9. Binderup HG, Madsen JS, Heegaard NHH, et al. Quantification of microRNA levels in plasma — Impact of preanalytical and analytical conditions. *PLoS One*. 2018;13:e0201069. doi:10.1371/journal.pone.0201069.
10. Chan S-F, Cheng H, Goh KK-R, et al. Preanalytic Methodological Considerations and Sample Quality Control of Circulating miRNAs. *J Mol Diagn*. 2023;25:438-53. doi:10.1016/j.jmoldx.2023.03.005.
11. Van Der Schueren C, Decruyenaere P, Avila Cobos F, et al. Subpar reporting of pre-analytical variables in RNA-focused blood plasma studies. *Mol Oncol*. 2024. doi:10.1002/1878-0261.13647.
12. Binderup HG, Houliand K, Madsen JS, et al. Pre-storage centrifugation conditions have significant impact on measured microRNA levels in biobanked EDTA plasma samples. *Biochem Biophys Rep*. 2016;7:195-200. doi:10.1016/j.bbrep.2016.06.005.
13. Lee J-E, Kim Y-Y. Impact of preanalytical variations in blood-derived biospecimens on omics studies: Toward precision biobanking? *OMICS*. 2017;21:499-508. doi:10.1089/omi.2017.0109.
14. Nair VS, Pritchard CC, Tewari M, et al. Design and analysis for studying microRNAs in human disease: A primer on -omic technologies. *Am J Epidemiol*. 2014;180:140-52. doi:10.1093/aje/kwu135.
15. McDonald JS, Milosevic D, Reddi HV, et al. Analysis of circulating microRNA: preanalytical and analytical challenges. *Clin Chem*. 2011;57:833-40. doi:10.1373/clinchem.2010.157198.
16. Wang K, Yuan Y, Cho J-H, et al. Comparing the MicroRNA spectrum between serum and plasma. *PLoS One*. 2012;7:e41561. doi:10.1371/journal.pone.0041561.
17. Mestdagh P, Hartmann N, Baeriswyl L, et al. Evaluation of quantitative miRNA expression platforms in the microRNA quality control (miRQC) study. *Nat Methods*. 2014;11:809-15. doi:10.1038/nmeth.3014.
18. Matias-Garcia PR, Wilson R, Mussack V, et al. Impact of long-term storage and freeze-thawing on eight circulating microRNAs in plasma samples. *PLoS One*. 2020;15:e0227648. doi:10.1371/journal.pone.0227648.
19. Kirschner MB, Kao SC, Edelman JJ, et al. Haemolysis during sample preparation alters microRNA content of plasma. *PLoS One*. 2011;6:e24145. doi:10.1371/journal.pone.0024145.
20. Cheng HH, Yi HS, Kim Y, et al. Plasma processing conditions substantially influence circulating microRNA biomarker levels. *PLoS One*. 2013;8:e64795. doi:10.1371/journal.pone.0064795.
21. Kirschner MB, Edelman JJB, Kao SC-H, et al. The impact of hemolysis on cell-free microRNA biomarkers. *Front Genet*. 2013;4:94. doi:10.3389/fgene.2013.00094.
22. Page K, Guttery DS, Zahra N, et al. Influence of plasma processing on recovery and analysis of circulating nucleic acids. *PLoS One*. 2013;8:e77963. doi:10.1371/journal.pone.0077963.
23. Zhao H, Shen J, Hu Q, et al. Effects of preanalytic variables on circulating microRNAs in whole blood. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2014;23:2643-8. doi:10.1158/1055-9965.EPI-14-0550.
24. Basso D, Padoan A, Laufer T, et al. Relevance of pre-analytical blood management on the emerging cardiovascular protein biomarkers TWEAK and HMGB1 and on miRNA serum and plasma profiling. *Clin Biochem*. 2017;50:186-93. doi:10.1016/j.clinbiochem.2016.11.005.
25. Glinge C, Clauss S, Boddum K, et al. Stability of circulating blood-based MicroRNAs — pre-analytic methodological considerations. *PLoS One*. 2017;12:e0167969. doi:10.1371/journal.pone.0167969.
26. Muth DC, Powell BH, Zhao Z, et al. miRNAs in platelet-poor blood plasma and purified RNA are highly stable: a confirmatory study. *BMC Res Notes*. 2018;11:273. doi:10.1186/s13104-018-3378-6.
27. Murray MJ, Watson HL, Ward D, et al. "Future-Proofing" Blood Processing for Measurement of Circulating miRNAs in Samples from Biobanks and Prospective Clinical Trials. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2018;27:208-18. doi:10.1158/1055-9965.EPI-17-0657.
28. Ward Gahlawat A, Lenhardt J, Witte T, et al. Evaluation of Storage Tubes for Combined Analysis of Circulating Nucleic Acids in Liquid Biopsies. *Int J Mol Sci*. 2019;20:704. doi:10.3390/ijms20030704.
29. Faraldi M, Sansoni V, Perego S, et al. Study of the preanalytical variables affecting the measurement of clinically relevant free-circulating microRNAs: focus on sample matrix, platelet depletion, and storage conditions. *Biochem Med*. 2020;30:010703. doi:10.11613/BM.2020.010703.
30. Mussbacher M, Krammer TL, Heber S, et al. Impact of Anti-coagulation and Sample Processing on the Quantification of Human Blood-Derived microRNA Signatures. *Cells*. 2020;9:1915. doi:10.3390/cells9081915.
31. Suzuki K, Yamaguchi T, Kohda M, et al. Establishment of preanalytical conditions for microRNA profile analysis of clinical plasma samples. *PLoS One*. 2022;17:e0278927. doi:10.1371/journal.pone.0278927.
32. Zhelankin AV, Iulmetova LN, Sharova EI. The Impact of the Anticoagulant Type in Blood Collection Tubes on Circulating Extracellular Plasma MicroRNA Profiles Revealed by Small RNA Sequencing. *Int J Mol Sci*. 2022;23:10340. doi:10.3390/ijms231810340.
33. Sun J, Yang X, Wang T, et al. Evaluating the Effects of Storage Conditions on Multiple Cell-Free RNAs in Plasma by High-Throughput Sequencing. *Biopreserv Biobank*. 2023;21:242-54. doi:10.1089/bio.2022.0004.
34. Wakabayashi I, Marumo M, Ekawa K, et al. Differences in serum and plasma levels of microRNAs and their time-course changes after blood collection. *Pract Lab Med*. 2024;39:e00376. doi:10.1016/j.plabm.2024.e00376.
35. Goeman JJ, Solari A. Multiple hypothesis testing in genomics. *Stat Med*. 2014;33:1946-78. doi:10.1002/sim.6082.
36. Reid TJ, LaRussa VF, Esteban G, et al. Cooling and freezing damage platelet membrane integrity. *Cryobiology*. 1999;38:209-24. doi:10.1006/cryo.1999.2164.