

## Влияние условий хранения плазмы и сыворотки на уровни циркулирующих микроРНК

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

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

За последнее десятилетие циркулирующие малые некодирующие молекулы рибонуклеиновой кислоты (микроРНК) продемонстрировали свой потенциал в качестве малоинвазивных диагностических и прогностических биомаркеров различных заболеваний. В надежности и воспроизводимости количественной оценки циркулирующих микроРНК существенную роль играет стандартизация преаналитических и аналитических факторов, в т.ч. сбора, обработки и хранения биообразцов. На сегодняшний день единого мнения касательно различных способов нормализации данных, применяемых при анализе экспрессии циркулирующих микроРНК, нет. Цель настоящего обзора — рассмотреть современные оригинальные работы, в которых изучаются различные условия хранения биобанкированных образцов плазмы и сыворотки крови с последующим выделением для анализа циркулирующих микроРНК.

**Ключевые слова:** микроРНК, плазма, сыворотка, стандартизация, хранение, выделение, преаналитические факторы, аналитические факторы.

**Отношения и деятельность:** нет.

**Поступила** 04/09-2024

**Рецензия получена** 20/09-2024

**Принята к публикации** 23/09-2024



**Для цитирования:** Сотникова Е. А., Киселева А. В., Мешков А. Н. Влияние условий хранения плазмы и сыворотки на уровни циркулирующих микроРНК. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2024;23(11):4180. doi: 10.15829/1728-8800-2024-4180. EDN KMPGLG

### Effect of plasma and serum storage conditions on circulating microRNA levels

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

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

Over the past decade, circulating small non-coding ribonucleic acid molecules (microRNAs) have demonstrated their potential as minimally invasive diagnostic and prognostic biomarkers of various diseases. Standardization of preanalytical and analytical factors, including collection, processing and storage of biosamples, plays a significant role in the reliability and reproducibility of circulating microRNA quantification. To date, there is no consensus regarding the data normalization used in the analysis of circulating microRNA expression. The review aim is to consider modern original papers on various storage conditions of biobanked plasma and serum samples with subsequent isolation of circulating microRNAs for analysis.

**Keywords:** microRNA, plasma, serum, standardization, storage, extraction, preanalytical factors, analytical factors.

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:** 20/09-2024

**Accepted:** 23/09-2024

**For citation:** Sotnikova E. A., Kiseleva A. V., Meshkov A. N. Effect of plasma and serum storage conditions on circulating microRNA levels. *Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2024;23(11):4180. doi: 10.15829/1728-8800-2024-4180. EDN KMPGLG

**Relationships and Activities:** none.

кПЦР — количественная полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией, КТ — комнатная температура, мРНК — матричная РНК, микроРНК — малые некодирующие молекулы рибонуклеиновой кислоты, РНК — рибонуклеиновая кислота, Cq — cycle of quantification (значение пороговых циклов), NGS — next generation sequencing (секвенирование следующего поколения), PPP — platelet-poor plasma (бедная тромбоцитами плазма), PRP — platelet-rich plasma (богатая тромбоцитами плазма).

\*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?**

- МикроРНК (малые некодирующие молекулы рибонуклеиновой кислоты) участвуют в пост-транскрипционной регуляции экспрессии генов и влияют на различные патологические состояния.
- Стандартизация преаналитических переменных представляет собой критический шаг в клинической реализации, а также в научных исследованиях циркулирующих микроРНК.

**Что добавляют результаты исследования?**

- Наибольшая стабильность микроРНК достигается при хранении сыворотки и плазмы при  $-80^{\circ}\text{C}$  при минимизации числа циклов замораживания-оттаивания.

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

- MicroRNAs (small non-coding ribonucleic acid molecules) are involved in post-transcriptional regulation of gene expression and affect various pathological conditions.
- Standardization of preanalytical variables is a critical step in clinical implementation as well as in research of circulating microRNAs.

**What might this study add?**

- Maximum stability of microRNA is achieved by storing serum and plasma at  $-80^{\circ}\text{C}$  while minimizing the number of freeze-thaw cycles.

**Введение**

Исследования циркулирующих микроРНК (малых некодирующих молекул рибонуклеиновых кислот), проведенные за последнее десятилетие, продемонстрировали их потенциал в качестве минимально инвазивных диагностических, прогностических и предиктивных биомаркеров, характеризующих широкий спектр патологических состояний [1-3]. МикроРНК представляют собой короткие (18-25 нуклеотидов), одноцепочечные, некодирующие РНК, которые участвуют в посттранскрипционной регуляции экспрессии генов посредством взаимодействия с матричной РНК (мРНК), приводящего к полной деградации целевой мРНК или подавлению экспрессии генов [1, 4, 5].

В плазме и сыворотке крови внеклеточные микроРНК защищены от деградации с помощью включения их в микровезикулы или экзосомы, или связью с белками [6-8]. Стоит отметить, что при сравнении плазмы и сыворотки, согласно результатам различных исследований микроРНК, сопоставимых результатов получено не было, что свидетельствует о необходимости использовать один и тот же тип образца последовательно на протяжении всего исследования и четко определять, как тип образца, так и его обработку [4, 5].

По мере развития исследований циркулирующих микроРНК как биомаркеров патологий человека накапливались данные, указывающие на влияние преаналитических и аналитических факторов на их уровни [3, 9]. Валидация результатов исследований микроРНК затруднена отсутствием аналитической (т.е. низкой межплатформенной согласованности) и постаналитической (т.е. стратегии нормализации) стандартизации. Влияние микроРНК на принятие медицинских решений ослабляется неопределенностью относительно значенности изменений в их экспрессии [10]. В связи с этим

необходимость тщательного рассмотрения эффектов различных преаналитических и аналитических параметров, которые могут влиять на выделение и стабильность микроРНК, представляется актуальной задачей [6, 11, 12].

Цель обзора — рассмотреть современные оригинальные работы, изучающие различные условия хранения биобанкированных образцов плазмы и сыворотки крови с последующим выделением для анализа циркулирующих микроРНК.

**Методологические подходы**

Поиск литературных источников включал запросы в системах индексирования научных публикаций (Google Scholar, PubMed, eLIBRARY) по заголовкам, аннотациям и ключевым словам: "serum+microRNA"/"сыворотка+микроРНК" и "plasma+microRNA"/"плазма+микроРНК" с добавлением дополнительных переменных "preanalytical"/"pre-analytical"/"преаналитический", "storage"/"хранение", "extraction"/"isolation"/"выделение". В обзор были включены только оригинальные методологические исследования тотальной циркулирующей микроРНК за последние 15 лет.

**Результаты**

**Преаналитические факторы.** На основе систематического поиска было отобрано 19 методологических исследований, в которых изучали такие преаналитические и аналитические факторы, как хранение плазмы и сыворотки крови, а также выделение и хранение микроРНК (таблица 1). Из 18 работ 13 были проведены с использованием плазмы, 2 — плазмы и сыворотки, 4 — сыворотки.

Основным ограничением большинства включенных в обзор исследований является небольшой размер выборки: в двух работах было <3 образцов [15, 23], в двух были использованы пулированные

Таблица 1

Исследования, включенные в анализ

Ссылка	Выборка, человек	Биоматериал	Исследуемые преаналитические и аналитические факторы	Метод	Количество микроРНК	Эндогенные микроРНК, анализируемые с помощью кПЦР
McDonald JS, et al. (2011) [13]	4; 5*	сыворотка	хранение сыворотки, выделение микроРНК	кПЦР	3	miR-15b, miR-16, miR-24
Grasedieck S, et al. (2012) [14]	3	сыворотка	хранение сыворотки, циклы замораживания-оттаивания	кПЦР	4; 182*	miR-223, miR-451, miR-93, miR-24; Serum/Plasma Focus miRNA PCR panels
McAlexander MA, et al. (2013) [15]	1	плазма	выделение микроРНК	кПЦР	5	miR-16, miR-21, miR-34a, miR-126, miR-150
Moret I, et al. (2013) [16]	14	плазма	выделение микроРНК	микрочипы	5818	Affymetrix miRNA 3.0
Page K, et al. (2013) [17]	3; 20*	плазма	хранение плазмы, выделение микроРНК	кПЦР	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
Sourvinou IS, et al. (2013) [6]	60	плазма	хранение плазмы и микроРНК, выделение микроРНК	кПЦР	2	hsa-miR-21, hsa-miR-16
Monleau M, et al. (2014) [18]	10	сыворотка	выделение микроРНК	кПЦР	384	TaqMan Array Human MicroRNA panels A and B
Zhao H, et al. (2014) [19]	164	плазма	хранение плазмы, циклы замораживания-оттаивания	кПЦР	3	miR-16, miR-134, miR-346
Balzano F, et al. (2015) [20]	5	плазма	хранение плазмы	кПЦР	8	miR-125b-5p, miR-425-5p, miR-200b-5p, miR-200c-3p, miR-579-3p, miR-212-3p, miR-126-3p, miR-21-5p
Brunet-Vega A, et al. (2015) [2]	6	плазма	выделение микроРНК	кПЦР	6	miR-23a, miR-30c, miR-103, miR-124, miR-191, miR-451
Tan GW, et al. (2015) [21]	19	плазма	выделение микроРНК	кПЦР	16	hsa-let-7a, hsa-miR-135a, hsa-miR-141, hsa-miR-150, hsa-miR-155, hsa-miR-16, hsa-miR-17, hsa-miR-200a, hsa-miR-200b, hsa-miR-203, hsa-miR-20a, hsa-miR-20b, hsa-miR-21, hsa-miR-223, hsa-miR-29c, hsa-miR-30e
Glinge C, et al. (2017) [22]	12	сыворотка, плазма	хранение сыворотки и плазмы, циклы замораживания-оттаивания	кПЦР	3	miR-1, miR-21, miR-29b
Muth DC, et al. (2018) [23]	2	плазма	хранение плазмы, циклы замораживания-оттаивания	кПЦР	2	miR-16-5p, miR-21-5p
Wong RKY, et al. (2019) [24]	3	плазма	выделение микроРНК	NGS малых РНК, кПЦР	тотальная микроРНК; 10*	let-7d-3p, let-7g-5p, mir-10b-5p, mir-16-5p, mir-16-2-3p, mir-142-3p, mir-26b-5p, mir-223-3p, mir-451a, miR-93-5p
Faraldi M, et al. (2020) [10]	10	плазма	хранение плазмы	кПЦР	179	miRCURY LNA miRNA focus panel
Matias-Garcia PR, et al. (2020) [1]	6; 10*	плазма	хранение плазмы, циклы замораживания-оттаивания	кПЦР	9	miR-30c-5p, miR-103a-3p, miR-191-5p, miR-124-3p, miR-451a, miR-23a-3p, miR-93-5p, miR-24-3p, miR-23a-3p, miR-33b-5p
Курец Т, et al. (2022) [25]	8	сыворотка	хранение сыворотки	кПЦР	16	hsa-miR-361-5p, hsa-miR-28-5p, hsa-miR-194-5p, hsa-miR-125b-5p, hsa-miR-192-5p, hsa-miR-27b-3p, hsa-miR-151a-5p, hsa-miR-1260a, hsa-miR-100-5p, hsa-miR-151a-3p, hsa-miR-323b-5p, hsa-miR-99a-5p, hsa-miR-28-3p, hsa-miR-22-3p, hsa-miR-193a-5p, hsa-miR-193b-3p

Таблица 1. Продолжение

Ссылка	Выборка, человек	Биоматериал	Исследуемые преаналитические и аналитические факторы	Метод	Количество микроРНК	Эндогенные микроРНК, анализируемые с помощью кПЦР
Suzuki K, et al. (2022) [26]	18; 60*	плазма	хранение плазмы	NGS малых РНК	тотальная микроРНК	
Chan S-F, et al. (2023) [3]	4	сыворотка, плазма	хранение сыворотки и плазмы	кПЦР	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

Примечание: \* — два значения указывают на разные выборки в исследовании, кПЦР — количественная ПЦР в режиме реального времени, ПЦР — полимеразная цепная реакция, NGS — секвенирование следующего поколения.

образцы от разных доноров [15, 17], в работе [6] отсутствует четкое описание выборки. Использование пулированных образцов или одного донора применялось для получения стандартного исходного образца [15]. В большинстве исследований размер выборки составлял от 3 до 19 человек, в двух — 60 [26] и 164 [19]. Следует отметить, что в работе Matias-Garcia PR, et al. (2020) сравнение проводилось между образцами, полученными от одних и тех же участников в разные годы [1], а в работе Balzano F, et al. (2015) сравнение образцов, хранившихся больше года, со свежими образцами были использованы образцы разных людей [20].

Ранее было показано, что на уровень микроРНК могут влиять различные факторы, такие как тип антикоагулянта крови, содержание тромбоцитов, степень гемолиза, условия хранения крови, плазмы и сыворотки, а также протокол центрифугирования [11]. Помимо рассматриваемых в данном обзоре параметров, в части исследований изучались и другие преаналитические факторы, а именно: разные антикоагулянты и типы пробирок [22, 26], влияние гемолиза эритроцитов на микроРНК плазмы и сыворотки [13], различные протоколы центрифугирования [3, 13, 17, 23], условия хранения крови [3, 17, 19, 22, 26].

Из 15 исследований, в которых были использованы образцы плазмы, в 13 антикоагулянты были на основе этилендиаминтетрауксусной кислоты, в двух — ACD (citric acid, trisodium citrate, dextrose, лимонная кислота, тринатрийцитрат, декстроза) [15, 23]. При центрифугировании образцов крови для получения плазмы и сыворотки происходит удаление таких клеточных компонентов, как тромбоциты, которые также содержат множество микроРНК [4, 9]. Так, плазма, полученная после двойного центрифугирования, считается бедной тромбоцитами плазмой (platelet-poor plasma, PPP) и содержит значительно меньше тромбоцитов по сравнению с плазмой, полученной после однократного центрифугирования, которая называется богатой тромбоцитами плазмой (platelet-rich plasma, PRP) [27]. В работе Chan S-F, et al. (2023) было показано, что повторное центрифугирование плазмы,

которая была заморожена после однократного центрифугирования, приводит к значимому снижению содержания тромбоцитов [3].

В 7 из 15 работ использовалась плазма или сыворотка, полученная после однократного центрифугирования (795-4000 g) [2, 14, 18, 20, 22, 25, 26], в 8 — после двойного (2500-15000 g) [3, 6, 10, 13, 15, 17, 21, 23], в 4 четко описанный протокол центрифугирования [1, 16, 19, 24] отсутствовал. Несмотря на то, что протокол двойного центрифугирования позволяет получить плазму с наименьшим содержанием тромбоцитов, в анализируемых исследованиях встречается использование плазмы как после одного, так и двух центрифугирований. В то же время стандартные протоколы приготовления плазмы в биобанках используют только одно центрифугирование, проведение после разморозки дополнительного центрифугирования приводит к снижению содержания тромбоцитов до их уровня в РРР, однако значимые различия сохраняются в уровнях микроРНК [28]. Из 19 включенных работ только в шести было указано, что использовались образцы из коллекций биобанков [1, 19, 20, 22, 25, 26].

Среди методов, применяемых для анализа микроРНК, количественная полимеразная цепная реакция (ПЦР) с использованием обратной транскрипции (кПЦР) является золотым стандартом для измерения микроРНК [21, 24]. При кПЦР для анализа полученных данных применяется метод относительной количественной оценки  $2^{-\Delta\Delta Cq}$ , основанный на определении значений пороговых циклов Cq (cycle of quantification) [29]. Кроме того, используются такие методы как секвенирование следующего поколения (next generation sequencing) и микрочипы. Однако NGS постепенно становится основным подходом для глобального профилирования микроРНК, поскольку оно потенциально более чувствительно по сравнению с анализом с использованием микрочипов и имеет преимущество в отсутствии необходимости заранее знать целевые последовательности [24].

кПЦР была наиболее часто используемым методом анализа микроРНК во включенных в обзор исследованиях (n=17), в двух применялось секве-

**Таблица 2**

**Хранение сыворотки**

Источник	Описание исследования
McDonald JS, et al. (2011) [13]	хранение сыворотки до 72 ч (24 ч, 48 ч, 72 ч) при -20°С, 4°С, КТ
Grasedieck S, et al. (2012) [14]	хранение сыворотки 10 дней при -80°С, -20°С, КТ; 20 мес. при -20°С, -80°С; до 10 лет при -20°С
Glinge C, et al. (2017) [22]	хранение сыворотки 24 ч и 4 дня при КТ
Курес Т, et al. (2022) [25]	хранение сыворотки 14 дней при -80°С
Chan S-F, et al. (2023) [3]	хранение сыворотки 3 дня при КТ (25°С), до 30 (3, 7, 30) дней при +4°С; до 360 (3, 7, 30, 90, 180, 360) дней при -20°С и -80°С

Примечание: КТ — комнатная температура.

**Таблица 3**

**Хранение плазмы**

Источник	Описание исследования
Page K, et al. (2013) [17]	хранение плазмы >12 лет при -8°С
Sourvinou IS, et al. (2013) [6]	хранение плазмы до 4 мес. (1 и 2 дня, 1 и 4 мес.) при 4°С, -20°С, -70°С
Zhao H, et al. (2014) [19]	хранение плазмы 6 мес. при -80°С, в жидком азоте
Balzano F, et al. (2015) [20]	хранение плазмы 6 и 12 мес., до 14 (3, 4, 10, 11, 14) лет при -80°С
Glinge C, et al. (2017) [22]	хранение плазмы 1 и 3 дня при КТ, 9 мес. при -80°С
Muth DC, et al. (2018) [23]	хранение плазмы (PRP и PPP) 24 ч при КТ (22°С)
Faraldi M, et al. (2020) [10]	хранение плазмы и PPP 24 часа при 4°С, КТ
Matias-Garcia PR, et al. (2020) [1]	хранение плазмы до 17 (2, 9, 17) лет при -180°С (жидкий азот)
Suzuki K, et al. (2022) [26]	хранение плазмы до 30 (1, 3, 5, 7, 30) дней при -20°С и +4°С; до 5 (3, 4, 5) лет при -80°С
Chan S-F, et al. (2023) [3]	хранение PPP до 7 (3, 7) дней при КТ (25°С), до 30 (3, 7, 14, 30) дней при +4°С, до 360 (3, 7, 14, 30, 60, 90, 180, 270, 360) дней при -20°С и -80°С

Примечание: КТ — комнатная температура, PPP — platelet-poor plasma (бедная тромбоцитами плазма), PRP — platelet-rich plasma (богатая тромбоцитами плазма).

нирование малых РНК [24, 26], в одном — микро-чипов [16]. Количество включенных в анализ микроРНК с использованием кПЦР варьировало от 2 до 384. Наиболее часто анализируемыми среди исследуемых эндогенных микроРНК были miR-16 (n=10), miR-21 (n=7), miR-24 (n=4), а среди экзогенных: cel-miR-39 (n=5) [6, 13, 15, 21, 22].

**Хранение сыворотки.** В обзор были включены пять исследований, в которых были проведены эксперименты по оценке влияния хранения сыворотки крови при разных температурах и длительности на уровень микроРНК (таблица 2).

Изучение влияния условий хранения сыворотки при комнатной температуре (КТ) было выполнено в 5 работах [3, 13, 14, 22]. Хранение сыворотки при КТ в течение 1, 2 и 3 дней [13], 1 и 4 дней [22], 3 дней [3] привело к значимому снижению концентрации исследованных микроРНК по сравнению с немедленным выделением микроРНК после получения сыворотки. Снижение уровней микроРНК также наблюдалось после 10 дней хранения при КТ по сравнению с температурой -80°С [14].

Хранение сыворотки при +4°С было проанализировано в двух исследованиях [3, 13], в результате которых было также показано значимое снижение в уровне изучаемых микроРНК по сравнению с немедленным выделением микроРНК после получения сыворотки: при хранении в течение 3 [13] и 30 дней [3]. Однако стоит заметить, что значимых различий при хранении в течение 3 и 7 дней в работе [3] отмечено не было.

Кроме того, в трех исследованиях были получены противоречивые результаты по хранению сыворотки при -20°С [3, 13, 14]. В одной работе хранение в течение 3 дней также приводило к снижению уровня микроРНК по сравнению с немедленным выделением микроРНК после получения сыворотки [13], тогда как в другой [3] значимых различий не было выявлено при хранении в течение 3, 7, 30, 90, 180, 360 дней, а также после 10 дней и 20 мес. хранения при -20°С по сравнению с -80°С [14]. В исследовании по хранению сыворотки до 10 лет было показано, что после 2 и 4 лет хранения наблюдалась только небольшая разница в уровнях микроРНК, тогда как значимое снижение было обнаружено после 6 лет, которое продолжалось после 10 лет хранения [14].

Хранение сыворотки при -80°С было описано в трех исследованиях [3, 14, 25]. Значимых различий не было выявлено после 10 дней и 20 мес. хранения при -80°С по сравнению с -20°С [14] и при -80°С в течение 360 дней по сравнению с немедленным выделением микроРНК после получения сыворотки [3], тогда как после хранения при температуре -80°С в течение 14 дней только для 1 из 16 микроРНК было продемонстрировано значимое снижение в уровне микроРНК по сравнению с образцами, хранившимися при температуре +4°С и выделенными в течение 24 ч [25].

Выявленные снижения в уровне микроРНК при хранении сыворотки вероятно могут свидетельствовать о деградации микроРНК в биообразцах [13]. Комплексный анализ 356 микроРНК продемонстрировал, что деградация коррелирует с их распространенностью, процентом GC и длиной микроРНК как в образцах сыворотки, так и в образцах PPP [3]. Однако в большинстве проанализированных работ показана высокая стабильность микроРНК в сыворотке при длительном хранении при -20°С и -80°С.

**Хранение плазмы.** В обзор были включены 10 исследований, в которых изучали влияние хранения плазмы разной длительности и при разных температурах на уровень микроРНК (таблица 3).

Хранение плазмы при КТ изучалось в 4 исследованиях [3, 10, 22, 23]. При сравнении количества микроРНК детектируемых в плазме крови, хранившейся 24 ч при КТ и замороженной немедленно при  $-80^{\circ}\text{C}$ , были найдены значимые различия [10]. После инкубации плазмы в течение 24 ч или 4 дней [22], а также 3 и 7 дней [3] было выявлено значимое снижение уровня микроРНК по сравнению с немедленным выделением микроРНК после получения плазмы. Однако в работе Muth DC, et al. (2018) [23] значимых различий при хранении в течение 24 ч выявлено не было, что также подтверждается более ранним исследованием [30].

Изучение влияния условий хранения плазмы  $+4^{\circ}\text{C}$  было проведено в 4 работах [3, 6, 10, 26]. Результаты двух из них демонстрируют снижение уровней эндогенных циркулирующих микроРНК при хранении образцов плазмы через 24 ч, 48 ч, 1 мес. и 4 мес. [6] и через 14 и 30 дней [3] по сравнению с немедленным выделением микроРНК после получения плазмы. Однако в работе Chan S-F, et al. (2023) [26] значимых различий в уровне микроРНК через 3 и 7 дней хранения получено не было. Кроме того, были выявлены значимые различия в количестве микроРНК в плазме после хранения в течение 24 ч по сравнению с замороженной немедленно при  $-80^{\circ}\text{C}$  [10]. В исследовании Suzuki K, et al. (2022) [26] при хранении плазмы в течение 1, 3, 5, 7, и 30 дней значимых различий в уровне изучаемых микроРНК при сравнении с плазмой, хранившейся 1 час после центрифугирования при  $+4^{\circ}\text{C}$ , показано не было.

Хранение плазмы при  $-20^{\circ}\text{C}$  оценивалось в трех исследованиях [3, 6, 26]. Снижение уровней микроРНК при хранении образцов плазмы было продемонстрировано через 24 ч, 48 ч, 1 мес. и 4 мес. [6] и через 270 дней [3] по сравнению с немедленным выделением микроРНК после получения плазмы. Стоит отметить, что в исследовании Chan S-F, et al. (2023) [3] при хранении в течение 3, 7, 14, 30, 60, 90, 180 и 360 дней значимых различий выявлено не было. В другой работе при хранении плазмы в течение 1, 3, 5, 7, и 30 дней не было показано значимых различий в уровне изучаемых микроРНК при сравнении с плазмой, хранившейся 1 ч после центрифугирования при  $-20^{\circ}\text{C}$  [26].

Исследования по хранению плазмы при низких температурах ( $-70$ ,  $-80$ ,  $-180^{\circ}\text{C}$ , жидкий азот) [1, 3, 6, 10, 17, 19, 20, 22, 26] можно разделить на краткосрочные (до 1 года) [3, 6, 10, 19, 20, 22, 26] и долгосрочные (от 1 до 14 лет) [1, 17, 20].

При краткосрочном хранении по сравнению с немедленным выделением микроРНК после по-

лучения плазмы снижение уровней микроРНК плазмы было продемонстрировано через 24 ч, 48 ч, 1 мес. и 4 мес. при  $-70^{\circ}\text{C}$  [6], в то время как значимых различий в уровне микроРНК при хранении в течение 3, 7, 14, 30, 60, 90, 180, 270, 360 дней при  $-80^{\circ}\text{C}$  [3], также, как и в течение 6 мес. в жидком азоте [19] и 6 и 12 мес. при  $-80^{\circ}\text{C}$  выявлено не было [20]. При сравнении хранения при  $-80^{\circ}\text{C}$  и в жидком азоте также не было получено значимых различий [19]. В другом исследовании при сравнении хранения плазмы в течение 9 мес. при  $-80^{\circ}\text{C}$  с хранением в течение 1 дня значимых различий выявлено не было [22].

При анализе долгосрочного хранения было показано, что при сравнении с немедленным выделением микроРНК после получения плазмы хранение при  $-80^{\circ}\text{C}$  в течение 12 лет демонстрирует схожие профили микроРНК, что подчеркивает потенциал анализа хранящихся в биобанках образцов [17]. В работе [26] хранение плазмы в течение 4 и 5 лет сравнивалось с 3 годами, значимые различия были получены только при 5-летнем сроке хранения. При сравнении образцов, хранившихся 3 года, со свежими образцами не было выявлено значимых различий, однако при хранении 4, 10 и 11 лет было обнаружено значимое снижение уровня 1 из 8 микроРНК, а при хранении 14 лет значимое снижение было показано для 7 из 8 микроРНК [20]. Кроме того, не было обнаружено различий при сравнении уровней микроРНК в образцах плазмы, хранившихся в течение 2 и 9 лет при  $-180^{\circ}\text{C}$ , однако значимые различия были получены при хранении в течение 17 лет по сравнению с 2 и 9 годами [1]. Несмотря на довольно противоречивые данные о влиянии различных условий хранения на уровень микроРНК плазмы, большинство проведенных исследований показало, что наиболее стабильны микроРНК при  $-80^{\circ}\text{C}$ .

**Циклы замораживания-оттаивания.** Циркулирующие микроРНК обычно сохраняются путем хранения при температурах, достаточно низких для значительного снижения активности РНКазы, а не путем химической фиксации [4]. Ранее было показано, что циклы замораживания-оттаивания могут потенциально влиять на несколько аналитов [4], и что 8 циклов замораживания-оттаивания плазмы имели минимальный эффект на уровни микроРНК [30].

В обзор были включены 5 исследований, в которых изучали влияние циклов замораживания-оттаивания плазмы и сыворотки крови на уровень микроРНК (таблица 4).

В обоих исследованиях, проведенных с использованием образцов сыворотки, хранившихся при  $-80^{\circ}\text{C}$ , было выявлено снижение уровня микроРНК после 10 ежедневных циклов [14] и 4 циклов [22] замораживания-оттаивания при сравнении с образцами, хранившимися при  $-80^{\circ}\text{C}$ .

**Таблица 4**  
Циклы замораживания-оттаивания

Источник	Биоматериал	Описание исследования
Grasedieck S, et al. (2012) [14]	сыворотка	10 циклов при $-80^{\circ}\text{C}$ , длительность каждого 1 день
Zhao H, et al. (2014) [19]	плазма	1, 2, 4 цикла в жидком азоте, длительность каждого 2 нед.
Glinge C, et al. (2017) [22]	плазма, сыворотка	4 цикла при $-80^{\circ}\text{C}$
Muth DC, et al. (2018) [23]	плазма	6 циклов при $-80^{\circ}\text{C}$ , длительность каждого 4 дня
Matias-Garcia PR, et al. (2020) [1]	плазма	4 цикла при $-80^{\circ}\text{C}$

Из включенных в анализ работ, 4 были проведены с использованием образцов плазмы крови. Снижение уровней микроРНК при увеличении циклов замораживания-оттаивания было выявлено при сравнении с немедленным выделением РНК [19], а также после 4 циклов замораживания-оттаивания при сравнении с образцами, хранившимися при  $-80^{\circ}\text{C}$  [22]. При исследовании влияния множественных циклов замораживания-оттаивания образцов плазмы на уровень микроРНК, было выявлено значимое снижение уровня одной из восьми исследуемых микроРНК [1]. Тогда как в работе Muth DC, et al. (2018) [23] после 6 циклов при  $-80^{\circ}\text{C}$  при сравнении с образцами, полученными из свежей плазмы, значимых различий получено не было для PPP, тогда как для PRP однократное замораживание-оттаивание привело к снижению уровней микроРНК, а дополнительные циклы замораживания-оттаивания не имели последовательного дополнительного эффекта.

Эти результаты показывают, что в связи с противоречивыми результатами влияния циклов замораживания-оттаивания на микроРНК их следует минимизировать, а многократные измерения замороженного образца следует проводить с осторожностью для прямого сравнения результатов. Согласно результатам проведенных исследований, плазма с низким содержанием тромбоцитов менее чувствительна к замораживанию-оттаиванию, а уровни микроРНК в плазме, богатой тромбоцитами, не изменяются при дополнительных циклах замораживания-оттаивания после того, как произошло повреждение тромбоцитов.

**Выделение микроРНК.** Любой успешный маркер или набор маркеров должен быть достаточно стабильным во время и после процесса изоляции, чтобы обеспечить надежное обнаружение и измерение [15]. Отсутствие стандартизации является проблемой для столь необходимых сравнений исследований микроРНК. Биологические жидкости содержат небольшое количество РНК относительно клеток и тканей и, если обработка образцов не удаляет мелкие клетки и клеточные фрагменты, их

микроРНК могут преобладать в любом "внеклеточном" профиле микроРНК, точно так же, как РНК из гемолизованных образцов может влиять на профилирование [13, 15]. Техническим препятствием для изучения экспрессии микроРНК является отсутствие возможности надежного и эффективного выделения микроРНК из биологических образцов из-за их небольшого размера и их прикрепления к липидам и белкам, а также из-за присутствия ингибиторов ПЦР в биологических жидкостях [2, 6, 15]. В настоящее время для выделения доступно несколько коммерческих наборов, использование которых позволяет оптимизировать выделение малых РНК, либо в сочетании с тотальной РНК, либо в виде фракции, обогащенной малыми РНК, а экзогенные синтетические микроРНК были предложены в качестве внешних контролей для нормализации вариаций от образца к образцу в процедурах выделения РНК [6].

Из включенных в обзор исследований, сравнение наборов для выделения микроРНК из плазмы или сыворотки было проведено в 8 (таблица 5). Все исследования были проведены с помощью кПЦР, кроме двух: в исследовании Wong RKY, et al. (2019) [24] использовалось NGS, а в работе Moret I, et al. (2013) [16] — микрочипы. Кроме того, из 19 исследований, включенных в этот обзор, в одном набор для выделения микроРНК не был указан [19].

Только в двух исследованиях выделение микроРНК было выполнено из сыворотки крови, и наибольший выход микроРНК был получен с использованием наборов mirVana PARIS (Invitrogen, США) [13] и NucleoSpin miRNA Plasma (Macherey-Nagel, Германия) [18].

Сравнение наборов для выделения микроРНК из плазмы продемонстрировало, что методы на основе колонок работают лучше, чем TRIzol LS (Invitrogen, США), из-за присутствия органических и фенольных загрязняющих веществ в РНК [6, 16]. Из 15 наборов, представленных во включенных в обзор исследованиях, 7 были проанализированы только в одном из сравнений. В исследовании [2] все пять наборов дали сопоставимые количества РНК с точки зрения конечных значений Cq. Среди наборов для выделения микроРНК из плазмы чаще всего в сравнениях были включены mirVana PARIS (Invitrogen, США) [6, 13, 16, 21] и miRNeasy Serum/Plasma Kit (Qiagen, Германия) [2, 15-17, 21, 24]. Каждый из этих наборов показал наилучшие результаты в трех сравнениях: mirVana PARIS (Invitrogen, США) — [6, 13, 21], miRNeasy Serum/Plasma Kit (Qiagen, Германия) — [2, 16, 17]. Стоит отметить, что между собой эти наборы сравнивались только в двух исследованиях, результаты которых оказались противоречивы [16, 21]: miRNeasy Serum/Plasma Kit (Qiagen, Германия) показал лучший результат в работе [16], а mirVana PARIS (Invitrogen, США) — в [21].

Таблица 5

## Наборы для выделения микроРНК, рассматриваемые в разных исследованиях

Наборы для выделения микроРНК	McDonald JS, et al. (2011) [13]	Monleau M, et al. (2014) [18]	McAlexander MA, et al. (2013) [15]	Moret I, et al. (2013) [16]	Page K, et al. (2013) [17]	Sourvinou IS, et al. (2013) [6]	Brunet-Vega A, et al. (2015) [2]	Tan GW, et al. (2015) [21]	Wong RKY, et al. (2019) [24]
Биоматериал	сыворотка	сыворотка	плазма	плазма	плазма	плазма	плазма	плазма	плазма
Direct-zol RNA MiniPrep (Zymo Research, США)	0	0	0	0	0	0	2	0	0
High Pure miRNA Isolation Kit (Roche, США)	1	0	0	0	0	0	0	0	0
MagnaZol (Bioo Scientific, США)	0	0	0	0	0	0	0	0	2
miRCURY RNA Isolation Kit — Cell and Plant (Exiqon, Дания)	0	0	1	0	0	0	0	0	0
miRCURY RNA Isolation Kit — Biofluids (Exiqon, Дания)	0	0	2	0	0	0	2	2	0
miRNA purification kit (Norgen Biotek, Канада)	0	0	0	0	0	1	0	0	0
miRNeasy Mini Kit (Qiagen, Германия)	1	1	0	0	0	1	0	0	0
miRNeasy Serum/Plasma Kit (Qiagen, Германия)	0	0	1	2	2	0	2	1	1
mirPremier microRNA Isolation Kit (Sigma, США)	1	0	0	0	0	0	0	0	0
mirVana PARIS (Invitrogen, США)	2	0	0	1	0	2	0	2	0
mirVana miRNA Isolation Kit (Invitrogen, США)	0	0	1	0	1	0	0	0	0
NucleoSpin miRNA Plasma (Machereye-Nagel, Германия)	0	2	0	0	0	0	2	2	0
Plasma/Serum Circulating and Exosomal RNA Purification Mini Kit (Norgen Biotek, Канада)	0	1	0	0	0	0	2	1	0
QIAamp Circulating Nucleic Acids kit (Qiagen, Германия)	0	0	0	0	1	0	0	0	0
TRIzol LS (Invitrogen, США)	0	0	1	1	0	1	0	0	0

Примечание: 0 — набор не включен в исследование, 1 — набор включен в исследование, 2 — набор включен в исследование и показал лучший результат, микроРНК — малые некодирующие молекулы рибонуклеиновой кислоты.

Из всех включенных в обзор исследований набор mirVana PARIS (Invitrogen, США) использовался в 4 [6, 13, 16, 21], а miRNeasy Serum/Plasma Kit (Qiagen, Германия) — в 7 [2, 15-17, 20, 21, 24].

Наборы miRCURY RNA Isolation Kit — Biofluids (Exiqon, Дания) [2, 15, 21] и NucleoSpin miRNA Plasma (Machereye-Nagel, Германия) [2, 21] показали лучшие результаты во всех сравнениях, в которые были включены, в отличие от трех других наборов mirVana miRNA Isolation Kit (Invitrogen, США) [15, 17], miRNeasy Mini Kit (Qiagen, Германия) [6, 13] и TRIzol LS (Invitrogen, США) [6, 15, 16].

Только в одном из исследований методом анализа был NGS и сравнение двух наборов для выде-

ления микроРНК проводилось в сочетании с разными наборами для приготовления библиотек [24]. Большая доля прочтений, картированных на микроРНК, была получена в библиотеках, подготовленных с помощью набора MagnaZol (Bioo Scientific, США) по сравнению с набором miRNeasy Serum/Plasma Kit (Qiagen, Германия) [24].

Отсутствие консенсуса относительно выделения микроРНК подчеркивает важность использования одного и того же метода выделения на протяжении всего исследования, чтобы свести к минимуму влияние искажающих переменных [4].

Для количественной оценки микроРНК доступны различные методы обнаружения (кПЦР, ми-

кросс-платформенные, NGS), однако все они требуют нормализации для учета и коррекции вариаций между образцами. Различные методы нормализации приводят к противоречивым результатам анализа уровня экспрессии микроРНК [4]. Так, для нормализации данных кПЦР используют как добавляемые во время выделения экзогенные микроРНК "spike-in" (например, *Caenorhabditis elegans*: cel-miR-39, cel-miR-54, cel-miR-238), так и повсеместно экспрессируемые эндогенные РНК, например, малую ядерную РНК (мяРНК, snRNA) U6 или miR-16 [20]. В большинстве включенных в анализ исследований для нормализации использовались: cel-miR-39 [6, 13, 15, 21, 22]; cel-miR-54 [21]; miR-16 [13]. В двух работах метод нормализации данных кПЦР не описан [14, 24].

Таким образом, необходимо проявлять большую осторожность при выборе подходящей микроРНК, концентрация которой практически не зависит от преаналитических переменных [4]. Включение по крайней мере одной экзогенной контрольной микроРНК или панели экзогенных контрольных микроРНК во все образцы до выделения микроРНК имеет решающее значение для компенсации различий между различными образцами [5].

Кроме того, следует отметить, что в области количественной генетики при проведении статистического анализа необходимо применение поправки на множественные сравнения [31]. В результатах исследований, проведенных без использования поправки на множественные сравнения, может быть завышение уровня значимости и нахождение большого числа ложных ассоциаций [31]. Только в 6 из 19 включенных в обзор исследований была применена поправка на множественные сравнения [1, 2, 10, 16, 24, 26]. Из-за упомянутых ограничений выявленные и описанные ранее различия в преаналитических и аналитических факторах из-за неудовлетворительного статистического анализа могли быть обусловлены ложными обнаружениями.

## Литература/References

1. 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.
2. Brunet-Vega A, Pericay C, Quílez ME, et al. Variability in microRNA recovery from plasma: Comparison of five commercial kits. *Anal Biochem*. 2015;488:28-35. doi:10.1016/j.ab.2015.07.018.
3. Chan S-F, Cheng H, Goh KK-R, Zou R. Preanalytical Methodological Considerations and Sample Quality Control of Circulating miRNAs. *J Mol Diagn*. 2023;25:438-53. doi:10.1016/j.jmoldx.2023.03.005.
4. 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.
5. 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.
6. Sourvinou IS, Markou A, Lianidou ES. Quantification of circulating miRNAs in plasma: effect of preanalytical and analytical parameters on their isolation and stability. *J Mol Diagn*. 2013;15:827-34. doi:10.1016/j.jmoldx.2013.07.005.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. Faraldi M, Sansoni V, Perego S, et al. Study of the preanalytical variables affecting the measurement of clinically relevant

**Хранение микроРНК.** Сравнение условий хранения микроРНК было проведено только в двух из проанализированных работ [6, 23]. Было показано, что выделенная микроРНК стабильна при  $-70^{\circ}\text{C}$  в течение периода хранения до года. Анализ проводился с помощью количественной оценки уровня cel-miR-39 через 2, 6, 8, 9 и 12 мес. [6]. В другом исследовании была продемонстрирована стабильность микроРНК (на примере miR-16-5p) при  $22^{\circ}\text{C}$  в течение 0, 1, 3 и 7 дней до проведения кПЦР, а незначительное увеличение среднего  $C_q$  наблюдалось только через 7 дней при КТ [23]. Приведенные исследования доказывают относительную стабильность микроРНК при хранении.

## Заключение

Стандартизация преаналитических переменных представляет собой критический шаг для клинических задач и научных проблем при определении циркулирующих микроРНК. Несмотря на их стабильность, количественные измерения циркулирующих микроРНК могут быть существенно подвержены как внешним, так и внутрииндивидуальным факторам. Условия хранения сыворотки и плазмы крови перед анализом, а также методы выделения, используемые для обнаружения микроРНК, являются важными преаналитическими переменными. Для того, чтобы анализ микроРНК мог быть реализован в клинических лабораторных условиях, необходимо установить стандартизированные протоколы условий хранения образцов, выделения и нормализации, обеспечивающих воспроизводимую и точную количественную оценку уровней циркулирующей микроРНК.

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

- free-circulating microRNAs: focus on sample matrix, platelet depletion, and storage conditions. *Biochem Med.* 2020;30:010703. doi:10.11613/BM.2020.010703.
11. 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.
  12. 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.
  13. 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.
  14. Grasedieck S, Schöler N, Bommer M, et al. Impact of serum storage conditions on microRNA stability. *Leukemia.* 2012;26:2414-6. doi:10.1038/leu.2012.106.
  15. McAlexander MA, Phillips MJ, Witwer KW. Comparison of methods for miRNA extraction from plasma and quantitative recovery of RNA from cerebrospinal fluid. *Front Genet.* 2013;4:83. doi:10.3389/fgene.2013.00083.
  16. Moret I, Sánchez-Izquierdo D, Iborra M, et al. Assessing an improved protocol for plasma microRNA extraction. *PLoS One.* 2013;8:e82753. doi:10.1371/journal.pone.0082753.
  17. 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.
  18. Monleau M, Bonnel S, Gostan T, et al. Comparison of different extraction techniques to profile microRNAs from human sera and peripheral blood mononuclear cells. *BMC Genomics.* 2014;15:395. doi:10.1186/1471-2164-15-395.
  19. Zhao H, Shen J, Hu Q, et al. Effects of preanalytical variables on circulating microRNAs in whole blood. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2014;23:2643-8. doi:10.1158/1055-9965.EPI-14-0550.
  20. Balzano F, Deiana M, Dei Giudici S, et al. miRNA Stability in Frozen Plasma Samples. *Molecules.* 2015;20:19030-40. doi:10.3390/molecules201019030.
  21. Tan GW, Khoo ASB, Tan LP. Evaluation of extraction kits and RT-qPCR systems adapted to high-throughput platform for circulating miRNAs. *Sci Rep.* 2015;5:9430. doi:10.1038/srep09430.
  22. Glinge C, Clauss S, Boddum K, et al. Stability of circulating blood-based MicroRNAs — pre-analytical methodological considerations. *PLoS One.* 2017;12:e0167969. doi:10.1371/journal.pone.0167969.
  23. 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.
  24. Wong RKY, MacMahon M, Woodside JV, et al. A comparison of RNA extraction and sequencing protocols for detection of small RNAs in plasma. *BMC Genomics.* 2019;20:446. doi:10.1186/s12864-019-5826-7.
  25. Kupec T, Bleilevens A, Iborra S, et al. Stability of circulating microRNAs in serum. *PLoS One.* 2022;17:e0268958. doi:10.1371/journal.pone.0268958.
  26. Suzuki K, Yamaguchi T, Kohda M, et al. Establishment of pre-analytical conditions for microRNA profile analysis of clinical plasma samples. *PLoS One.* 2022;17:e0278927. doi:10.1371/journal.pone.0278927.
  27. 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.
  28. Binderup HG, Houliind 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.
  29. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods.* 2001;25:402-8. doi:10.1006/meth.2001.1262.
  30. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008;105:10513-8. doi:10.1073/pnas.0804549105.
  31. Goeman JJ, Solari A. Multiple hypothesis testing in genomics. *Stat Med.* 2014;33:1946-78. doi:10.1002/sim.6082.