

Влияние долгосрочного хранения плазмы крови на профиль циркулирующих микроРНК

Киселева А.В.¹, Сотникова Е.А.¹, Жарикова А.А.^{1,2}, Куценко В.А.¹, Васильев Д.К.¹,
Покровская М.С.¹, Ершова А.И.¹, Мешков А.Н.¹, Драпкина О.М.¹

¹ФГБУ "Национальный медицинский исследовательский центр терапии и профилактической медицины" Минздрава России.
Москва; ²ФГБОУ ВО "Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова". Москва, Россия

Цель. Оценить влияние длительного хранения биобанкированных образцов плазмы крови на профиль циркулирующих малых некодирующих молекул рибонуклеиновой кислоты (микроРНК).

Материал и методы. В исследование были включены парные аликовоты плазмы крови 10 пациентов из коллекции биобанка ФГБУ "НМИЦ ТПМ" Минздрава России. Контрольную группу составили образцы микроРНК, выделенные через 1,5 года после получения плазмы и хранившиеся далее в водном растворе 3,5 года. В группе с длительным хранением плазмы микроРНК была выделена из второй аликовоты плазмы через 5 лет. Все образцы хранились при -70 °C. Секвенирование было выполнено для обеих групп одновременно на платформе NextSeq 550 (Illumina, США) по протоколу High Output 1×75 п.н.

Результаты. Анализ главных компонент на основании данных об уровне экспрессии генов микроРНК человека (версия ENCODE v47) показал разнородность изучаемых групп. В группе с длительным хранением плазмы по сравнению с контролем было выявлено статистически значимое снижение концентрации и размера библиотек, а также более чем двукратное повышение уровня экспрессии для 31 микроРНК.

Заключение. Циркулирующие микроРНК показали более высокую стабильность при хранении в плазме крови, чем в водном растворе. Полученные результаты указывают на необходимость учета

времени хранения выделенной микроРНК наряду с другими преаналитическими факторами для повышения воспроизводимости исследований микроРНК.

Ключевые слова: микроРНК, малые некодирующие РНК, плазма, хранение, секвенирование следующего поколения, стандартизация.

Отношения и деятельность. Государственное задание "Свободно циркулирующие микроРНК плазмы крови как диагностические и прогностические биомаркеры ИБС".

Поступила 21/08-2025

Рецензия получена 26/08-2025

Принята к публикации 22/09-2025



Для цитирования: Киселева А. В., Сотникова Е. А., Жарикова А. А., Куценко В. А., Васильев Д. К., Покровская М. С., Ершова А. И., Мешков А. Н., Драпкина О. М. Влияние долгосрочного хранения плазмы крови на профиль циркулирующих микроРНК. Кардиоваскулярная терапия и профилактика. 2025;24(11):4550. doi: 10.15829/1728-8800-2025-4550. EDN: DXJSGS

Effect of long-term plasma storage on the profile of circulating microRNAs

Kiseleva A. V.¹, Sotnikova E. A.¹, Zharikova A. A.^{1,2}, Kutsenko V. A.¹, Vasilev D. K.¹, Pokrovskaya M. S.¹, Ershova A. I.¹, Meshkov A. N.¹, Drapkina O. M.¹

¹National Medical Research Center for Therapy and Preventive Medicine. Moscow; ²Lomonosov Moscow State University. Moscow, Russia

Aim. To assess the impact of long-term storage of biobanked plasma samples on the profile of circulating small non-coding ribonucleic acids (microRNAs).

Material and methods. The study included paired plasma aliquots from 10 patients from the biobank collection of the National Medical Research Center for Therapy and Preventive Medicine. The control group consisted of microRNA samples isolated 1,5 years after plasma collection and then stored in aqueous solution for 3,5 years. In the long-

term plasma storage group, microRNA was isolated from a second plasma aliquot after 5 years. All samples were stored at -70 °C. Sequencing was performed for both groups simultaneously on the NextSeq 550 platform (Illumina, USA) using the High Output 1×75 bp protocol.

Results. Principal component analysis based on human microRNA gene expression data (ENCODE v47) revealed heterogeneity between the study groups. In the long-term plasma storage group, compared to the control group, a significant decrease in library concentration

*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):

e-mail: sanyutabe@gmail.com

[Киселева А. В. — к.б.н., в.н.с., руководитель лаборатории молекулярной генетики Института персонализированной терапии и профилактики, ORCID: 0000-0003-4765-8021, Сотникова Е. А. — с.н.с. лаборатории молекулярной генетики Института персонализированной терапии и профилактики, ORCID: 0000-0002-8395-4146, Жарикова А. А. — к.б.н., в.н.с. лаборатории молекулярной генетики Института персонализированной терапии и профилактики; старший преподаватель факультета бионженерии и биоинформатики, ORCID: 0000-0003-0723-0493, Куценко В. А. — к.ф.-м.н., с.н.с. лаборатории биостатистики отдела эпидемиологии хронических неинфекционных заболеваний, ORCID: 0000-0001-9844-3122, Васильев Д. К. — к.м.н., руководитель отдела инновационных эндокардиальных методов профилактики и лечения сердечно-сосудистых заболеваний, ORCID: 0000-0003-2602-5006, Покровская М. С. — к.б.н., в.н.с. лаборатории "Банк биологического материала" Института персонализированной терапии и профилактики, ORCID: 0000-0001-6985-7131, Ершова А. И. — д.м.н., руководитель лаборатории клинико-диагностической биомедицины, зам. директора по научной работе, ORCID: 0000-0001-7989-0760, Мешков А. Н. — д.м.н., руководитель Института персонализированной терапии и профилактики, ORCID: 0000-0002-4453-8430].

Адреса организаций авторов: ФГБУ "Национальный медицинский исследовательский центр терапии и профилактической медицины" Минздрава России, Петроверигский пер., д. 10, стр. 3, Москва, 101990, Россия; ФГБОУ ВО "Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова", Ленинские горы, д. 1, Москва, 119991, Россия.

Адреса of the authors' institutions: National Medical Research Center for Therapy and Preventive Medicine of the Ministry of Health of the Russian Federation, Petroverigsky Lane, 10, bld. 3, Moscow, 101990, Russia; Lomonosov Moscow State University, Leninskiye Gory, 1, Moscow, 119234, Russia.

and size was observed, as well as a more than twofold increase in expression levels for 31 microRNAs.

Conclusion. Circulating microRNAs demonstrated higher stability during storage in plasma than in aqueous solution. The obtained results indicate the need to consider the storage time of isolated microRNA, along with other preanalytical factors, to improve the reproducibility of microRNA studies.

Keywords: microRNA, small non-coding RNA, plasma, storage, next-generation sequencing, standardization.

Relationships and Activities. State assignment "Circulating MicroRNAs in Plasma as Diagnostic and Prognostic Biomarkers of CAD".

Kiseleva A. V.* ORCID: 0000-0003-4765-8021, Sotnikova E. A. ORCID: 0000-0002-8395-4146, Zharikova A. A. ORCID: 0000-0003-0723-0493, Kutsenko V. A. ORCID: 0000-0001-9844-3122, Vasiliev D. K. ORCID:

0000-0003-2602-5006, Pokrovskaya M. S. ORCID: 0000-0001-6985-7131, Ershova A. I. ORCID: 0000-0001-7989-0760, Meshkov A. N. ORCID: 0000-0001-5989-6233, Drapkina O. M. ORCID: 0000-0002-4453-8430.

*Corresponding author: sanyutabe@gmail.com

Received: 21/08/2025

Revision Received: 26/08/2025

Accepted: 22/09/2025

For citation: Kiseleva A. V., Sotnikova E. A., Zharikova A. A., Kutsenko V. A., Vasiliev D. K., Pokrovskaya M. S., Ershova A. I., Meshkov A. N., Drapkina O. M. Effect of long-term plasma storage on the profile of circulating microRNAs. *Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2025; 24(11):4550. doi: 10.15829/1728-8800-2025-4550. EDN: DXJSGS

кПЦР — количественная полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией (qRT-PCR), миРНК — малые некодирующие молекулы рибонуклеиновой кислоты, РНК — рибонуклеиновая кислота, NGS — next generation sequencing (секвенирование следующего поколения), PCA — principal component analysis (анализ главных компонент), UMI — unique molecular identifiers (уникальные молекулярные идентификаторы).

Ключевые моменты

Что известно о предмете исследования?

- В настоящее время малые некодирующие молекулы рибонуклеиновой кислоты (миРНК) активно изучаются в качестве возможных биомаркеров различных заболеваний.
- Воспроизводимость результатов затруднена из-за различий в методах обработки биоматериала, типах образцов и отсутствия стандартизованных протоколов.

Что добавляют результаты исследования?

- Показано, что длительное хранение биообразцов может влиять на профиль циркулирующих миРНК плазмы крови.
- Циркулирующие миРНК более стабильны при хранении в плазме, чем в водном растворе.

Key messages

What is already known about the subject?

- Small non-coding ribonucleic acids (microRNAs) are currently being actively studied as potential biomarkers for various diseases.
- Reproducibility of results is hindered by differences in biomaterial processing methods, sample types, and the lack of standardized protocols.

What might this study add?

- We showed that long-term biosample storage can affect the profile of plasma circulating microRNAs.
- Circulating microRNAs are more stable when stored in plasma than in aqueous solution.

Введение

Малые некодирующие молекулы рибонуклеиновой кислоты (миРНК) — короткие одноцепочечные некодирующие рибонуклеиновые кислоты (РНК), длиной ~18–25 нуклеотидов. МиРНК участвуют в посттранскрипционной регуляции, которая может приводить к деградации матричной РНК или ингибиции трансляции [1]. Внеклеточные миРНК избегают деградации в плазме и сыворотке крови, поскольку они либо заключены в экзосомы и микровезикулы, либо связаны с белковыми комплексами [2, 3].

На сегодняшний день значительное количество исследований направлено на изучение возможности использования миРНК в качестве биомаркеров различных заболеваний [4–6]. Накоплен большой массив данных, свидетельствующих о значительном влиянии преаналитических и аналитических факто-

ров на спектр и уровни циркулирующих миРНК [7–10]. Результаты, полученные при исследовании миРНК, не всегда воспроизводимы, что объясняется в т.ч. использованием различных биологических образцов, различных методов и отсутствием стандартизованных подходов [4, 5, 11, 12].

Исследования стабильности циркулирующих миРНК плазмы крови при долгосрочном хранении немногочисленны [1, 10, 13, 14] и в большинстве из них для оценки уровня миРНК использовался метод количественной полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (кПЦР), который позволяет оценить только ограниченное число миРНК.

Цель настоящего исследования — оценить влияние длительного хранения биобанкированных образцов плазмы крови на профиль циркулирующих миРНК.

Таблица 1

Характеристика групп сравнения

Показатель, Me [Q25; Q75]	Группа с длительным хранением плазмы крови	Контрольная группа	p
Время хранения плазмы до выделения РНК (-80 °C), годы	5,0 [5,0; 5,0]	1,6 [1,6; 1,8]	0,005
Время хранения РНК до приготовления библиотек (-80 °C), дни/годы	21 [20; 21] день	3,3 [3,3; 3,3] года	0,005
Время хранения библиотек до секвенирования (-25 °C), дни	15 [15; 15]	44 [44; 44]	0,004
Концентрация микроРНК, нг/мкл	0,75 [0,67; 1,07]	0,85 [0,74; 0,95]	0,65
Концентрация библиотек, нг/мкл	3,01 [2,10; 4,46]	10,69 [8,12; 13,15]	0,002
Количество чтений на образец (размер библиотеки), млн	1,24 [1,15; 1,35]	1,83 [1,66; 2,02]	0,002
Количество чтений длиной >14 нуклеотидов после удаления UMI дубликатов, млн	0,98 [0,89; 1,04]	1,16 [0,98; 1,39]	0,027
Количество картированных чтений, млн	0,90 [0,83; 0,96]	0,79 [0,67; 0,81]	0,32
Количество картированных чтений, попавших в границы генов*, млн	0,20 [0,18; 0,26]	0,26 [0,22; 0,40]	0,027
TPM на образец (по генам человека) [†]	0,004 [0,003; 0,005]	0,025 [0,014; 0,03]	0,002
TPM на образец (по генам микроРНК)	104,15 [94,43; 115,85]	81,50 [69,36; 88,28]	0,064
Количество экспрессированных микроРНК (>2 чтений на микроРНК)	206,5 [198,2; 213,8]	182,0 [170,5; 198,5]	0,083
Количество экспрессированных микроРНК (>50 чтений на микроРНК)	81,0 [73; 90,25]	52,0 [48,5; 68,5]	0,049

Примечание: * — рассчитано для генов, на которые картировано хотя бы 2 чтения и как минимум в четверти образцов из выборки, [†] — версия ENCODE v47, микроРНК — малые некодирующие молекулы рибонуклеиновой кислоты, Me [Q25; Q75] — медиана [интерквартильный размах], TPM — tags per million reads (теги на миллион прочтений), UMI — unique molecular identifiers (уникальные молекулярные идентификаторы).

Материал и методы

Выборка. В исследование были включены образцы плазмы крови 10 пациентов, полученные в период с декабря 2019г по июль 2020г [15]. Возраст пациентов в момент взятия крови составлял 67,5 лет [63,5; 74,25], доля мужчин — 70%. Образцы плазмы были получены и хранились в коллекции биобанка ФГБУ "НМИЦ ТПМ" Минздрава России (далее Биобанк) [16]. Исследование одобрено Независимым этическим комитетом ФГБУ "НМИЦ ТПМ" Минздрава России (протоколы № 05-05/15 от 09.06.2015, № 02-02/22 от 17.03.2022). Все участники дали письменное информированное согласие.

Получение плазмы крови. Для взятия крови использовались пробирки с солью этилендиаминетрауксусной кислоты (ЭДТА), а именно K₂ЭДТА, в качестве антикоагулянта, которые хранили при комнатной температуре не >1 ч до выделения плазмы. В Биобанке кровь центрифугировали 15 мин при 1200 g при +4 °C (5702 R, Eppendorf, Германия), после чего отбирали плазму, которую хранили при -70 °C (DF 590, Nuve, Турция) без циклов замораживания-оттаивания. В исследовании было использовано две аликвоты каждого образца плазмы. Одна аликвота каждого образца через год была использована для выделения РНК, которая далее хранилась в Биобанке при температуре -70 °C (контрольная группа, n=10). Из второй аликвоты плазмы РНК была выделена через 5 лет (группа с длительным хранением плазмы, n=10).

Выделение РНК. Перед выделением РНК биообразцы плазмы размораживали и центрифугировали при 16000 g в течение 15 мин при +4 °C. Супернатант отбирали и переносили в чистые пробирки, свободные от нуклеаз; образцы сразу использовались для выделения тотальной РНК, включая микроРНК, с помощью miRNeasy Serum/Plasma Advanced Kit (Qiagen, Германия). Сразу после выделения каждый образец РНК разделяли на аликвоты для хранения при -70 °C в Биобанке до дальнейшего анализа,

во избежание циклов размораживания-оттаивания. Концентрацию выделенной микроРНК определяли с использованием флуориметра Qubit 4 (Thermo Fisher Scientific, США) и набора Qubit microRNA Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Ни в одном образце из включенных в исследование, не был детектирован гемолиз [15].

Секвенирование следующего поколения (NGS — next generation sequencing). Библиотеки для NGS были подготовлены с помощью набора QIAseq miRNA UDI Library Kit (Qiagen, Германия) в соответствии с версией протокола производителя для сыворотки/плазмы ("Serum/Plasma") с использованием уникальных молекулярных идентификаторов (unique molecular identifiers, UMI). Концентрацию приготовленных библиотек определяли с помощью флуориметра Qubit 4 (Thermo Fisher Scientific, США) с использованием набора Qubit 1X dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, США). При анализе с помощью Bioanalyzer 2100 (Agilent, США) средняя высота соответствующего димерам адаптеров пика (178 п.н.) составляла ~50% высоты пика, соответствующего микроРНК (200 п.н.), дополнительная очистка от димеров с использованием электрофореза в полиакриламидном геле не проводилась. NGS было проведено на платформе NextSeq 550 (Illumina, США) по протоколу High Output 1×75 п.н.

Биоинформационный анализ. Для обработки UMI были использованы возможности пакета UMI-tools [17]. С помощью программы cutadapt [18] были оставлены чтения длиной не <14 нуклеотидов. Одноконцевые чтения в формате fastq были выровнены на референсный геном GRCh38 с помощью программы STAR [19]. Файлы с выравниванием чтений на референсный геном были отсортированы и проиндексированы с помощью программы Samtools [20]. Аннотация генов была реализована средствами программы featureCounts [21] с учетом цепь-специфичности со следующими параметрами: -O--largestOverlap -s 1 -t gene -g gene_id. Версия генной аннота-

ции ENCODE v47 [22]. Для визуализации полученных результатов был использован пакет для языка R *ggplot2* [23].

Статистический анализ. Статистический анализ проведен в среде R 4.2. Непрерывные параметры представлены в виде медианы и интерквартильного размаха — Me [Q25; Q75]; дискретные — в виде абсолютных значений и относительных частот.

Вычисление главных компонент (PCA, principal component analysis) проводилось для центрированных и нормированных данных с помощью пакета *factoextra* [24]. Различия между двумя зависимыми выборками для уровня экспрессии оценивали при помощи стандартных тестов пакета *DESeq2* (1.42.1) [25], для остальных непрерывных параметров — критерием Вилкоксона. Поправка на множественные сравнения проводилась на геномном уровне при помощи пакета *DESeq2* (1.42.1) [25].

Следует отметить, что критерии и методы коррекции, предусмотренные пакетом *DESeq2* по умолчанию разработаны для непарных данных геномного уровня, что может приводить к снижению мощности анализа в данном исследовании. Тем не менее их применение обосновано широкой распространностью в данной области исследований и высокой воспроизводимостью результатов. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Для образцов обеих групп сравнения (контрольная группа и группа с длительным хранением плазмы) было проведено секвенирование в одном запуске в 2025г. Сравнительная характеристика обеих групп приведена в таблице 1.

Метод PCA был использован для определения однородности полученных данных и на основании данных об уровне экспрессии генов миРНК человека показал разнородность двух групп (рисунок 1).

На основании данных NGS был проведен анализ дифференциальной экспрессии генов миРНК человека. В группе с длительным хранением плазмы по сравнению с контролем обнаружено 116 миРНК со статистически значимым повышением уровня экспрессии (рисунок 2, желтые, зеленые и красные точки), из которых у 86 наблюдалось более чем 2-кратное изменение (рисунок 2, зеленые и красные точки). Поскольку среднее количество чтений на образец составило 1,5 млн (при ожидаемых 5 млн согласно протоколу), для дальнейшего анализа установили пороговое значение среднего количества нормированных чтений (≥ 50 на выборку). После фильтрации число дифференциально экспрессируемых миРНК составило 31 (рисунок 2, красные точки).

Обсуждение

Влияние долгосрочного (от 1 года) хранения плазмы крови при различных температурах на уровня циркулирующих миРНК исследовалось ранее преимущественно с использованием кПЦР [1, 13, 14].

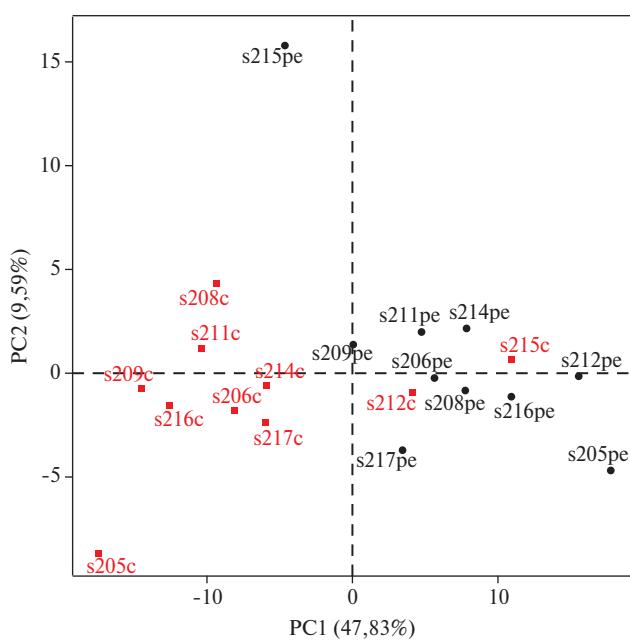


Рис. 1 Анализ главных компонент на основании данных об уровне экспрессии генов миРНК человека.

Примечание: РС — главная компонента, красный квадрат обозначает контрольную группу, черный круг — группу с длительным хранением плазмы, суффикс "c" в названии образцов указывает на контрольную группу, "pe" — на группу с длительным хранением плазмы. Цветное изображение доступно в электронной версии журнала.

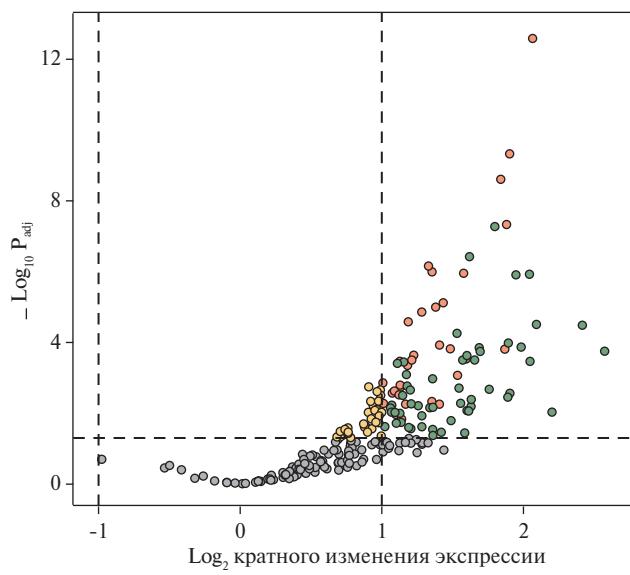


Рис. 2 Дифференциальная экспрессия генов миРНК человека. Примечание: для всех миРНК на графике ниже горизонтальной пунктирной линии не детектировано значимого изменения экспрессии между группами ($p_{adj} > 0,05$, серый цвет); желтый — миРНК, у которых детектировано значимое изменение экспрессии ($p_{adj} < 0,05$) и кратное изменение экспрессии $<$ чем в 2 раза; зеленый — $p_{adj} < 0,05$ и $>$ чем в 2 раза изменение экспрессии; красные — $p_{adj} < 0,05$, $>$ чем в 2 раза изменение экспрессии и среднее количество чтений в образцах > 50 ; p_{adj} — p значения с поправкой на множественные сравнения. Цветное изображение доступно в электронной версии журнала.

В двух из них количество проанализированных микроРНК было <10 [1, 14]. Наибольшее число микро-РНК (n=384) было проанализировано в исследовании Page K, et al. (2013): при анализе микроРНК в 10 образцах плазмы больных раком, хранившихся в течение 12 лет, было детектировано меньшее число микроРНК по сравнению со свежими образцами плазмы (177 и 202, соответственно), при этом значения СТ и ДСТ значимо не различались [13].

В отличие от кПЦР метод NGS позволяет охватить весь спектр микроРНК в образце [12]. Проведенный поиск литературы выявил только одну работу с использованием NGS [10]. Дизайн этого исследования совпадал с нашим по следующим параметрам: использовался тот же набор для приготовления библиотек, NGS было проведено на таком же секвенаторе с одноконцевыми прочтениями длиной 75 п.н. [10]. В то же время, протокол приготовления плазмы (однократное центрифугирование при 1200 g при +4 °C в течение 10 мин), набор для выделения РНК и размер выборки (n=18) различались.

Кроме того, в этой работе не приведено технических данных, касающихся секвенирования образцов эксперимента по хранению, но приводятся данные для других экспериментов: в среднем, было получено 7 млн ридов на образец, из них 3 млн было картировано и 2 млн были с UMI [10].

В уже упомянутой работе [10] было выполнено сравнение образцов плазмы крови, хранившихся 3 года, с образцами, хранившимися 4 и 5 лет. Однако из описания не ясно, выполнялось ли секвенирование сразу по истечении исследуемых сроков хранения (т.е. через 3, 4 и 5 лет после получения плазмы) или же одновременно по завершении максимального срока хранения плазмы с различными сроками хранения выделенной микроРНК. В нашем исследовании максимальный срок хранения плазмы (5 лет, группа с длительным сроком хранения плазмы) совпадал с работой [10]. Однако срок хранения плазмы в контрольной группе был меньше (1,5 года), а выделенная РНК хранилась 3,5 года до приготовления библиотек и секвенирования.

Полученные нами результаты показали значимое снижение концентрации библиотек, что согласуется с результатами работы [10], где также было показано значимое снижение концентрации библиотек при сравнении плазмы, хранившейся 3 года и 5 лет. При этом более чем 2-кратное увеличение уровня было установлено лишь для одной микроРНК, тогда как в нашем исследовании — для 31 микроРНК.

Приготовление плазмы в настоящем исследовании и в исследовании Suzuki K, et al. (2022) проводилось по схожим протоколам, включавшим однократное центрифугирование при 1200 g, что соответствует стандартным протоколам биобанкирования [10]. Согласно данным литературы, однократное цен-

трифугирование не обеспечивает полного удаления тромбоцитов, а цикл замораживания/оттаивания плазмы резко увеличивает количество тромбоцитарных микрочастиц и существенно влияет на уровни детектируемых микроРНК [26]. Введение в пробоподготовку этапа дополнительного центрифугирования после разморозки плазмы перед выделением РНК способствует снижению количества остаточных тромбоцитов, но не позволяет полностью устранить контаминацию тромбоцитарными микроРНК [27]. Важно отметить, что в обеих сравниваемых группах настоящего исследования использовалась идентичная пробоподготовка плазмы крови и выделение РНК, что исключает возможность влияния различий в контаминации тромбоцитарными микроРНК на полученные результаты.

Ранее стабильность выделенной микроРНК при хранении после выделения была продемонстрирована только в одном исследовании с помощью оценки уровня spike-in микроРНК (cel-miR-39) в течение 12 мес. при -70 °C [2]. Полученные нами данные могут свидетельствовать о более высокой стабильности микроРНК при хранении в плазме (в составе экзосом и белковых комплексов) по сравнению с водными растворами, не содержащими нуклеаз.

Ограничением настоящего исследования был небольшой размер выборки и разная продолжительность сроков хранения библиотек до секвенирования в группах сравнения. Кроме того, количество чтений на образец, полученных в результате секвенирования, могло повлиять на глубину последующего анализа.

Заключение

Результаты исследования продемонстрировали статистически значимые различия между группами: в образцах с длительным хранением плазмы наблюдалось снижение концентрации и размера библиотек по сравнению с контролем, а также выявлено 31 микроРНК с уровнем экспрессии, превышающим контрольные значения более чем в 2 раза. Сравнительный анализ показал более высокую стабильность циркулирующих микроРНК при хранении в плазме относительно водного раствора. Эти данные указывают на необходимость учета продолжительности хранения биологических образцов как важнейшего преаналитического фактора, что имеет принципиальное значение для обеспечения воспроизводимости результатов исследований микроРНК.

Отношения и деятельность. Государственное задание "Свободно циркулирующие микроРНК плазмы крови как диагностические и прогностические биомаркеры ИБС".

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. 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.
3. 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.
4. Mikhailina VI, Meshkov AN, Kiseleva AN, et al. MicroRNA as biomarkers of coronary artery disease in real-world practice. *Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2024;23(12):4225. (In Russ.) Михайлова В. И., Мешков А. Н., Киселева А. В. и др. МикроРНК как биомаркеры ишемической болезни сердца для использования в клинической практике. Кардиоваскулярная терапия и профилактика. 2024;23(12):4225. doi:10.15829/1728-8800-2024-4225.
5. Kiseleva AV, Sotnikova EA, Kutsenko VA, et al. Circulating microRNAs and collateral circulation in coronary chronic total occlusion. *Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2024; 23(10):4190. (In Russ.) Киселева А. В., Сотникова Е. А., Куценко В. А. и др. Циркулирующие микроРНК и развитие коллатерального кровообращения при хронической окклюзии коронарной артерии. Кардиоваскулярная терапия и профилактика. 2024;23(10):4190. doi:10.15829/1728-8800-2024-4190.
6. Wang J, Chen J, Sen S. MicroRNA as biomarkers and diagnostics. *J Cell Physiol*. 2016;231:25-30. doi:10.1002/jcp.25056.
7. 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.
8. Sotnikova EA, Kiseleva AV, Meshkov AN. Effect of plasma and serum storage conditions on circulating microRNA levels. *Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2024;23(11):4180. (In Russ.) 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.
9. Sotnikova EA, Kiseleva AV, Meshkov AN. Preanalytical factors affecting the plasma and serum levels of circulating microRNAs. *Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2024;23(11): 4179. (In Russ.) 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.
10. 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.
11. Brunet-Vega A, Pericay C, Quilez 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.
12. Coenen-Stass AML, Magen I, Brooks T, et al. Evaluation of methodologies for microRNA biomarker detection by next generation sequencing. *RNA Biol*. 2018;15:1133-45. doi:10.1080/15476286.2018.1514236.
13. 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.
14. Balzano F, Deiana M, Dei Giudici S, et al. miRNA Stability in Frozen Plasma Samples. *Molecules*. 2015;20:19030-40. doi:10.3390/molecules201019030.
15. Kiseleva AV, Vasiliev DK, Soplenkova AG, et al. Association of plasma microRNA levels with different collateral circulation degree in chronic total occlusion patients with coronary artery disease: a pilot study. *Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2024;23(7):4086. (In Russ.) Киселева А. В., Васильев Д. К., Сопленкова А. Г. и др. Ассоциация уровней микроРНК плазмы крови с различной выраженностью коллатерального кровообращения при хронической окклюзии коронарной артерии у пациентов с ишемической болезнью сердца: пилотное исследование. Кардиоваскулярная терапия и профилактика. 2024;23(7):4086. doi:10.15829/1728-8800-2024-4086.
16. Kopylova OV, Ershova AI, Pokrovskaya MS, et al. Population-nosological research biobank of the National Medical Research Center for Therapy and Preventive Medicine: analysis of biosamples, principles of collecting and storing information. *Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2021;20(8):3119. (In Russ.) Копылова О. В., Ершова А. И., Покровская М. С. и др. Популяционно-нозологический исследовательский биобанк "НМИЦ ТПМ": анализ коллекций биообразцов, принципы сбора и хранения информации. Кардиоваскулярная терапия и профилактика. 2021;20(8):3119. doi:10.15829/1728-8800-2021-3119.
17. Smith T, Heger A, Sudbery I. UMI-tools: modeling sequencing errors in Unique Molecular Identifiers to improve quantification accuracy. *Genome Res*. 2017;27:491-9. doi:10.1101/gr.209601.116.
18. Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet J*. 2011;17:10. doi:10.14806/ej.17.1.200.
19. Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, et al. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*. 2013;29:15-21. doi:10.1093/bioinformatics/bts635.
20. Danecek P, Bonfield JK, Liddle J, et al. Twelve years of SAMtools and BCFtools. *GigaScience*. 2021;10:giab008. doi:10.1093/gigascience/giab008.
21. Liao Y, Smyth GK, Shi W. featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics*. 2014;30:923-30. doi:10.1093/bioinformatics/btt656.
22. ENCODE Project Consortium. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature*. 2012;489:57-74. doi:10.1038/nature11247.
23. Wickham H. *Ggplot2: Elegant graphics for data analysis*. New York, NY: Springer; 2009.
24. Kassambara A, Mundt F. Package "factoextra". Extract and visualize the results of multivariate data analyses. 2017;76:10-18637.
25. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol*. 2014;15:550. doi:10.1186/s13059-014-0550-8.
26. Mitchell AJ, Gray WD, Hayek SS, et al. Platelets confound the measurement of extracellular miRNA in archived plasma. *Sci Rep*. 2016;6:32651. doi:10.1038/srep32651.
27. Binderup HG, Houlind 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.