

<https://doi.org/10.29001/2073-8552-2021-36-4-62-69>
УДК 577.217:612.11:618.2

Пилотное исследование изменения уровня рiРНК в плазме и сыворотке крови у женщин на разных сроках физиологической беременности

А.С. Глотов^{1, 2}, П.Ю. Козюлина^{1, 3}, Е.С. Вашукова¹, Р.А. Илларионов^{1, 2, 4},
Н.О. Юркина¹, О.В. Пачулия¹, М.Г. Бутенко¹, Т.Б. Постникова^{1, 5},
О.Н. Беспалова¹

¹ Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта, 199034, Российская Федерация, Санкт-Петербург, Менделеевская линия, 3

² Санкт-Петербургский государственный университет, 199034, Российская Федерация, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7

³ Всероссийский НИИ сельскохозяйственной микробиологии, 196608, Российская Федерация, Санкт-Петербург, Пушкин-8, шоссе Подбельского, 3

⁴ Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет), 190013, Российская Федерация, Санкт-Петербург, Московский пр., 26

⁵ Родильный дом № 10, 198259, Российская Федерация, Санкт-Петербург, ул. Тамбасова, 21

Аннотация

Цель: провести исследование изменения уровня рiРНК в плазме и сыворотке крови беременных женщин на разных сроках гестации.

Материал и методы. Проведено исследование 42 образцов плазмы и сыворотки крови, полученных от 7 женщин с физиологической одноплодной беременностью без акушерско-гинекологической патологии в трех временных точках (первая – 8–13, вторая – 18–25 и третья – 30–35 нед. беременности). Для оценки спектра и уровня рiРНК методом NGS проведено полногеномное секвенирование малых РНК. Анализ данных секвенирования осуществлен с использованием веб-программы GeneGlobe Data Analysis Center. Дифференциальная экспрессия оценена с помощью пакета DESeq2 R package.

Результаты и обсуждение. Содержание рiРНК среди всех малых РНК составило 2,29; 2,61 и 4,16% для плазмы и 7,29; 7,02 и 10,82% – для сыворотки в первом, втором и третьем триместре соответственно. От первого триместра к третьему в плазме крови увеличивается содержание следующих рiРНК: piR 000765, piR 020326, piR 019825, piR 020497, piR 015026, piR 001312, piR 017716. Показано, что в сыворотке по сравнению с плазмой значительно больше piR 000765, piR 020326, piR 019825, piR 015026, piR 020497, piR 001312, piR 017716, piR 004153, тогда как в плазме – только одной молекулы – piR 018849.

Заключение. Данная пилотная работа создает определенный базис для понимания процессов экспрессии рiРНК в плазме и сыворотке беременных женщин и может стать основой для поиска биомаркеров различных осложнений беременности.

Ключевые слова:	рiРНК, беременность, плазма, сыворотка, массовое параллельное секвенирование.
Конфликт интересов:	авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Прозрачность финансовой деятельности:	исследование проведено при поддержке гранта РФ № 19-75-20033.
Соответствие принципам этики:	информированное согласие получено от каждого пациента. Исследование одобрено этическим комитетом НИИ АГиР имени Д.О. Отта (протокол № 97 от 27.06.2019 г.).
Для цитирования:	Глотов А.С., Козюлина П.Ю., Вашукова Е.С., Илларионов Р.А., Юркина Н.О., Пачулия О.В., Бутенко М.Г., Постникова Т.Б., Беспалова О.Н. Пилотное исследование изменения уровня рiРНК в плазме и сыворотке крови у женщин на разных сроках физиологической беременности. <i>Сибирский журнал клинической и экспериментальной медицины</i> . 2021;36(4):62–69. https://doi.org/10.29001/2073-8552-2021-36-4-62-69 .

Pilot study of changes in the level of piRNA in plasma and serum in women at different stages of physiological pregnancy

Andrey S. Glotov^{1,2}, Polina Yu. Kozyulina^{1,3}, Elena S. Vashukova¹,
Roman A. Illarionov^{1,2,4}, Natalia O. Yurkina¹, Olga V. Pachulia¹,
Maria G. Butenko¹, Tatyana B. Postnikova^{1,5}, Olesya N. Bespalova¹

¹ D. O. Ott Research Institute for Obstetrics, Gynecology, and Reproduction,
3, Mendeleevskaya liniya, Saint Petersburg, 199034, Russian Federation

² St. Petersburg State University,
7, Universitetskaya emb., Saint-Petersburg, 199034, Russian Federation

³ All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology,
3, Podbelsky chausse, Saint-Petersburg, 196608, Russian Federation

⁴ St. Petersburg State Institute of Technology (Technical University),
26, Moskovsky ave., Saint-Petersburg, 190013, Russian Federation

⁵ Maternity Hospital No. 10,
21, Tambasova str., Saint-Petersburg, 198259, Russian Federation

Abstract

Aim. To study changes in the level of piRNA in plasma and serum of pregnant women at different stages of gestation.

Material and Methods. A total of 42 samples of plasma and blood serum were obtained from seven women with physiological singleton pregnancy without obstetric and gynecological pathology. The study was carried out at three time points corresponding to 8–13, 18–25, and 30–35 weeks of pregnancy, respectively. To assess the spectrum and levels of piRNA by the NGS method, whole genome sequencing of small RNAs was carried out. Sequencing data analysis was performed using the GeneGlobe Data Analysis Center web application. Differential expression was assessed using the DESeq2 R package.

Results and Discussion. The piRNA contents among all small RNAs were 2.29%, 2.61%, and 4.16% in plasma and 7.29%, 7.02%, and 10.82% in serum during the first, second, and third trimesters, respectively. The contents of the following piRNAs increased in blood plasma from the first to the third trimester: piR 000765, piR 020326, piR 019825, piR 020497, piR 015026, piR 001312, and piR 017716. The study showed that the levels of piR 000765, piR 020326, piR 019825, piR 015026, piR 020497, piR 001312, piR 017716, and piR 004153 were significantly higher in serum compared with the corresponding values in plasma whereas the content of only one molecule, piR 018849, was higher in plasma.

Conclusion. This pilot work created a basis for understanding the processes of piRNA expression in plasma and serum of pregnant women and can become the foundation for the search for biomarkers of various complications in pregnancy.

Keywords:	piRNA, pregnancy, plasma, serum, massive parallel sequencing.
Conflict of interest:	the authors do not declare a conflict of interest.
Financial disclosure:	the study was supported by the Russian Science Foundation (grant No. 19-75-20033).
Adherence to ethical standards:	informed consent was obtained from all patients. The study was approved by the Ethics Committee of D.O. Ott Research Institute for Obstetrics, Gynecology, and Reproduction (protocol No. 97 from 27.06.2019).
For citation:	Glotov A.S., Kozyulina P.Yu., Vashukova E.S., Illarionov R.A., Yurkina N.O., Pachulia O.V., Butenko M.G., Postnikova T.B., Bespalova O.N. Pilot study of changes in the level of piRNA in plasma and serum in women at different stages of physiological pregnancy. <i>The Siberian Journal of Clinical and Experimental Medicine</i> . 2021;36(4):62–69. https://doi.org/10.29001/2073-8552-2021-36-4-62-69 .

Введение

Исследование и поиск новых транскриптомных биомаркеров многофакторных заболеваний, включая большие акушерские синдромы, представляет интерес как для фундаментальной науки, так и для практической медицины. Однако, несмотря на длительную историю изучения, этиология и патогенез наиболее распространенных и тяжелых осложнений беременности остаются по-прежнему малопонятными.

Внедрение технологии секвенирования следующего поколения в различные аспекты биомедицины способствовало развитию интереса к малым некодирующим РНК в качестве перспективных молекулярных биомаркеров [1]. В настоящее время известно, что многие микроРНК определяют риск развития распространенных осложнений беременности, таких как, например, гестационный диабет [2] и преэклампсия [3, 4]. Про роль других классов малых некодирующих РНК в развитии гестационной патологии известно намного меньше. В то же время показано, что такой тип малых РНК, как рiРНК наиболее активен во время эмбриогенеза, когда непредсказуемые «перетасовки» генома особенно опасны и могут привести к гибели плода [5, 6].

Пилотные работы уже продемонстрировали перспективность использования рiРНК в качестве потенциального неинвазивного пренатального биомаркера

врожденных пороков развития и эффективности процессов имплантации [6, 7].

Несмотря на то, что основной функцией рiРНК (небольших молекул длиной 2135 нуклеотидов) является подавление активности транспозонов, регуляция экспрессии некоторых генов и «борьба» с вирусной инфекцией, ее роль в эмбриональном развитии остается открытой [5, 8].

Цель настоящего исследования: провести пилотный анализ спектра и оценить изменение уровня рiРНК в плазме и сыворотке крови женщин при физиологической беременности, включая ранние стадии развития плода, как первый шаг, необходимый для последующей оценки роли рiРНК в качестве биомаркера акушерской патологии.

Материал и методы

Формирование клинических групп и сбор образцов

Исследование было проведено на образцах биологического материала, полученных от женщин с физиологической одноплодной беременностью без акушерско-гинекологической патологии (преэклампсии, гестационного диабета и др.) и хронических заболеваний (гипертензии, сердечно-сосудистых заболеваний, диабета, гепатита, болезней почек и др.), таблица 1. Всего было собрано 42 образца плазмы и сыворотки крови от 7 пациенток в трех временных точках (первая – 813, вторая – 1825 и третья – 3035 нед. беременности).

Таблица 1. Основные характеристики исследуемой группы

Table 1. Main characteristics of the research group

Характеристики Characteristics	Исследуемая группа (n = 7) Research group (n = 7)
Характеристика матери Maternal characteristic	
Возраст, лет Age, years	32 (29–33)
Национальность Ethnicity	Русская, 7/7 Russian, 7/7
Вес, кг Weight, kg	64 (62–67)
Рост, м Height, m	1,70 (1,62–1,76)
Индекс массы тела, кг/м ² Body mass index, kg/m ²	24,5 (22,1–25,4)
Срок гестации во время сбора образцов Gestational age during sample collection	
Первый триместр, нед. The first trimester, weeks	11 (10–12)
Второй триместр, нед. The second trimester, weeks	22 (20–23)
Третий триместр, нед. The third trimester, weeks	32 (31–33)
Исход беременности Pregnancy outcome	
Способ родоразрешения Mode of delivery	Естественное родоразрешение / Кесарево сечение Vaginal delivery / Cesarean section
Гестационный возраст во время родов, нед. Gestational age at delivery, weeks	40 (39–41)
Вес плода, г Fetal weight, g	3500 (3200–3700)
Рост плода, см Fetal height, cm	52 (49–54)

Исследование было одобрено этическим комитетом ФГБНУ «НИИ АГиР им. Д.О. Отта» № 97 от 27.06.2019 г. Информированное согласие было подписано каждым участником до их включения в исследование и обработки личных и медицинских данных. Исследование проведено в соответствии с Хельсинкской декларацией.

Пробоподготовка

Образцы крови были взяты в стандартные 8 мл вакуумные пробирки с активатором свертывания крови (для сыворотки) и с K₂EDTA (для плазмы). Для получения сыворотки крови давали сгуститься, оставляя ее нетронутой при комнатной температуре в течение 30 мин после сбора цельной крови, после чего сгусток удаляли центрифугированием при 3000 g в течение 20 мин при +4 °С. Для получения плазмы пробирки с кровью центрифугировали при 1600 g в течение 10 мин при температуре +4 °С. Супернатант осторожно переносили в стерильную пробирку и снова центрифугировали при 2500 g в течение 10 мин при +4 °С, чтобы удалить остатки и нерастворимые компоненты клеток. После стадий центрифугирования образцы сыворотки или плазмы аликвотировали, помещали в криопробирки (LVL, Великобритания), замораживали и хранили при температуре –80 °С до дальнейшей обработки. Все процедуры с сывороткой и плазмой проводили параллельно в одно и то же время.

Выделение малых РНК и подготовка библиотек для секвенирования

Фракцию малых некодирующих РНК выделяли из 200 мкл плазмы или сыворотки, используя miRNeasy Serum/Plasma Kit (Qiagen, Германия), в соответствии с инструкцией. РНК растворяли в 12 мкл RNase-free воды и затем хранили при температуре –80 °С до момента подготовки библиотек для секвенирования.

Для создания образцов кДНК использовали набор реагентов QIAseq miRNA Library Kit (Qiagen, Германия), рекомендованный для приготовления библиотек с целью последующего полногеномного секвенирования.

Для оценки качества полученных кДНК-библиотек (размера, количества, концентрации) использовали прибор 2200 Tape Station Instrument с набором реагентов High Sensitivity D1K ScreenTape and High Sensitivity D1K Reagents (Agilent Technologies, США). Количество библиотек, необходимой для секвенирования, определяли в соответствии с инструкцией производителя набора miRNeasy Serum/Plasma Kit (Qiagen, Германия).

NGS секвенирование

Библиотеки были просеквенированы на приборе HiSeq 2500 (Illumina, США) с прочтениями в одну сторону на 75 п.о. в соответствии с протоколом производителя.

Анализ данных секвенирования

Анализ данных секвенирования малых РНК, включая «обрезку» адаптеров и картирование, осуществляли с использованием веб-программы GeneGlobe Data Analysis Center (<https://geneglobe.qiagen.com/us/analyze>). Среднее количество прочтений по типам РНК в плазме и сыворотке рассчитывали отдельно по группам (7 образцов на группу). Анализ дифференциальной экспрессии между двумя группами образцов с различными фенотипами проводили с помощью пакета DESeq2 R package [9], используя поправку на парные образцы и триместры. Ста-

тистически значимыми отличия в уровне piPHK считали при $p < 0,05$ и абсолютном значении $\log_2$ (fold change) > 2 . Коррекцию p -значений при множественных сравнениях проводили с помощью алгоритма FDR по методу Беньямини – Хохберга [10].

Анализ клинических данных

Для обработки клинических данных использовали пакет программ STATISTICA 10.0 (StatSoft, США). Непрерывные переменные представлены в виде среднего значения $\pm$ стандартная ошибка.

Результаты и обсуждение

В настоящей работе впервые изучен спектр и изменение уровня piPHK в крови беременной на протяжении всего периода гестации. Такой подход позволяет не только изучать новые механизмы, связанные с особенностями развития плода, и оценивать состояние здоровья беременной женщины, но и является важным элементом для сравнительной оценки эффективности молекулярных биомаркеров, которые будут выявлены при изучении различной патологии беременности в будущем.

Для оценки спектра и изменения piPHK на уровне транскриптома был использован метод полногеномного секвенирования. Данный метод позволяет оценивать все разнообразие малых РНК и их количество, которое может быть обнаружено в биологическом образце с наибольшей чувствительностью [11]. Для исследования нами были выбраны два типа биологического материала – плазма и сыворотка венозной крови, из которых наиболее просто получить биологические образцы для исследования.

Всего было просеквенировано 42 библиотеки кДНК (по 21 на каждую биологическую жидкость). В результате секвенирования из образцов плазмы и сыворотки было получено 34 013 380 и 32 981 722 прочтений (просеквенированных фрагментов ДНК) в первом, 38 145 207 и 34 342 265 во втором, 38 391 138 и 33 991 358 в третьем триместре соответственно. Процент картированных на геном человека (hg19) прочтений составил 46,7; 50,7 и 42,5% для плазмы, 45,5; 41,3 и 44,1% – для сыворотки в первом, втором и третьем триместре соответственно. МикроРНК были выявлены в качестве наибольшей фракции среди всех малых РНК на всех стадиях беременности и в обеих биологических жидкостях, и их общее содержание превысило 65% для плазмы и 46% – для сыворотки. Процент piPHK среди всех малых РНК составил 2,29; 2,61 и 4,16% для плазмы, 7,29; 7,02 и 10,82% – для сыворотки в первом, втором и третьем триместре соответственно. Необходимо отметить увеличение процента содержания данного класса РНК среди прочих к третьему триместру беременности и большую долю piPHK в сыворотке крови (превышающую соответствующую в плазме в 2,5–3 раза).

В общем, 73 известных piPHK были обнаружены в плазме и сыворотке крови после фильтрации по уровню экспрессии (суммарно не менее 10 прочтений на все образцы) в первом триместре, 84 piPHK – во втором триместре и 68 piPHK – в третьем триместре беременности соответственно. Среди наиболее представленных piPHK в плазме беременных на протяжении всего периода гестации были следующие: piR 008113, piR 008112, piR 000765, piR 020381, piR 016658, piR 019675, тогда как в сыворотке наиболее часто встречались piPHK: piR 000765, piR 020326, piR 008113, piR 008112, piR 020381, piR 019675.

Далее нами было проведено сравнение спектра piRNA между разными триместрами беременности. Статистически значимые отличия были выявлены только для образцов плазмы. От первого триместра к третьему увеличивалось содержание следующих piRNA: piR 000765, piR 020326, piR 019825, piR 020497, piR 015026, piR 001312, piR 017716 ($\log_2 > 2,33$, $p \text{ adj} < 3,92 \cdot 10^{-2}$). От первого триместра ко второму уменьшалось содержание только одной piRNA: piR 019825 ($\log_2 = -15,65$, $p \text{ adj} = 2,90 \cdot 10^{-22}$), в то время как от второго триместра к третьему содержание данной piRNA росло, увеличилось содержание и других PNH: piR 000765, piR 020326, piR 020497, piR 001312, piR 015026 ($\log_2 > 3,13$, $p \text{ adj} < 1,74 \cdot 10^{-2}$). Данные различия могут быть связаны с развитием плаценты и повышением уровня содержания плацентарной фракции нуклеиновых кислот в крови беременной во время гестации.

После было проведено сравнение общего содержания piRNA в плазме и сыворотке. Было обнаружено, что в сыворотке значительно больше представлены следующие piRNA: piR 000765, piR 020326, piR 019825, piR 015026, piR 020497, piR 001312, piR 017716, piR 004153, ($\log_2 > 2,76$, $p \text{ adj} < 5,25 \cdot 10^{-3}$), и только одна молекула – piR 018849 – была больше представлена в плазме по сравнению с сывороткой ($\log_2 = -15,65$, $p \text{ adj} = 2,90 \cdot 10^{-22}$). Отличия в количестве прочтений piRNA между сывороткой и

плазмой согласуются с работами других авторов [12]. Сыворотка представляет собой более привлекательный тип биоматериала, так как количество piRNA больше, соответственно, затрат на секвенирование будет меньше, но в то же время профиль piRNA в плазме разнообразнее, что делает ее более информативной для отслеживания изменения уровня экспрессии. Различия в концентрации piRNA в сыворотке и плазме могут быть связаны с загрязнением тромбоцитами, эритроцитами или лейкоцитами, влиянием гемолиза или присутствием ингибиторов реакции обратной транскрипции [13]. Учитывая данный факт, необходимо отметить большое значение в динамической оценке биомаркеров в определенном типе биоматериала при проведении исследований и не сравнивать полученные данные из разного биоматериала между собой. Проведенное нами исследование по сбору различных типов биоматериала от одного пациента позволяет расширить потенциальные возможности будущих исследований [14].

Уровень экспрессии piRNA (количество прочтений после нормализации с помощью пакета DESeq2 R package) по триместрам беременности в плазме и сыворотке крови представлен на рисунке 1 и в таблице 2. Нужно отметить, что среди этих piRNA присутствуют почти все те молекулы, для которых были обнаружены статистически значимые отличия между триместрами беременности в плазме крови.

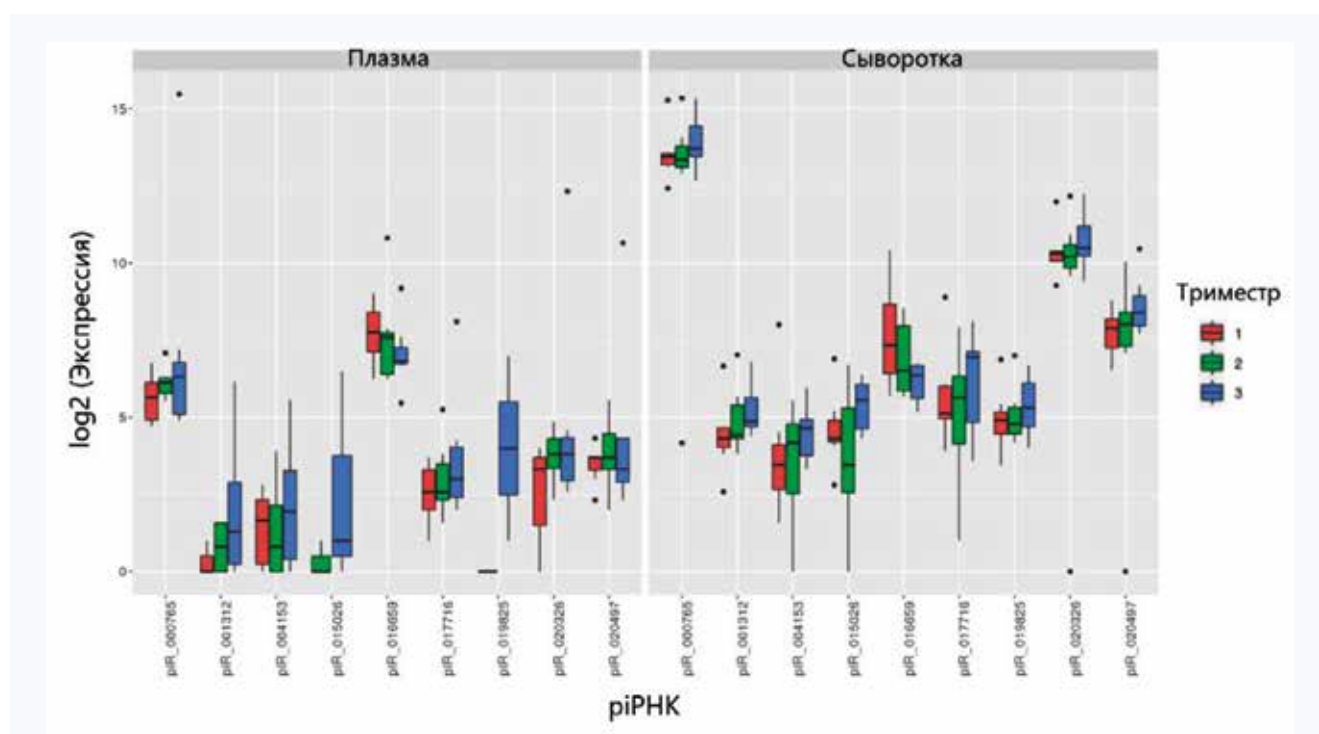


Рис. 1. Уровень piRNA в образцах сыворотки и плазмы на разных сроках гестации
Fig. 1. The piRNA levels in serum and plasma samples at different stages of gestation

Крайне интересными для дальнейших исследований являются следующие piRNA: piR 000765, piR 020326, piR 019825, piR 001312, piR 020497. piR 000765 – наиболее представленная PNH в обоих типах биологического материала. Более того, показано, что уровень данной piRNA меняется в плазме с первого по третий триместр. Извест-

но, что данная молекула может синтезироваться с tRNA (встроена в нее), ее экспрессия повышается при раке груди [15]. Известны и гены-мишени данной piR: *SCN2B*, *SH3TC2*, *SEMA6D*, *SLC16A4*, *SYNPO*, *TMT1*, *TSHZ2*, *TIFA*, *TRPM3*, *WFIKNN2*, *ZSCAN12*, *UBQLNL*, *APCDD1*, *CNR1*, *CES2*, которые регулируют Wnt-сигнальный путь.

Таблица 2. Уровень экспрессии рРНК по триместрам беременности в плазме и сыворотке крови**Table 2.** The level of piRNA expression by trimesters of pregnancy in plasma and serum

piRNA	Плазма Plasma			Сыворотка Serum		
	Первый триместр Trimester 1	Второй триместр Trimester 2	Третий триместр Trimester 3	Первый триместр Trimester 1	Второй триместр Trimester 2	Третий триместр Trimester 3
piR 000765	50 (30,5–70,5)	70 (55,5–77)	80 (34,5–114)	11206 (9306–11953,5)	10404 (8858–14399)	13333 (11309–22901)
piR 001312	0 (0–1)	1 (0–2)	2 (1–6,5)	20 (16,5–25)	20 (17–37)	29 (26–50,5)
piR 004153	2 (1–5)	1 (1–4)	3 (1–8,5)	11 (6,5–18)	18 (7–27,5)	25 (13,5–30,5)
piR 015026	0	0 (0–1)	0 (0–1,5)	20 (18,5–30,5)	11 (6–45)	47 (25–67)
piR 016659	217 (148–363)	192 (84,5–214)	113 (106,5–157,5)	162 (90,5–470)	91 (58–258,5)	82 (49,5–102)
piR 017716	6 (4–10)	6 (5–11,5)	8 (5,5–16,5)	35 (31–64)	50 (20,5–84,5)	124 (30–139,5)
piR 019825	0	0	0 (0–1)	30 (22–36,5)	25 (19,5–37)	40 (26–69)
piR 020326	10 (3–13)	14 (10,5–20)	14 (8–20,5)	1269 (1069,5–1325)	1182 (936–1578)	1445 (1201,5–2453,5)

piR 020326 также является одной из наиболее представленных РНК в сыворотке крови. Уровень ее меняется с первого по третий триместр. Показано, что она участвует в регуляции сигнального пути MAPK-киназы [16].

piR 019825 является низко представленной РНК. Однако именно ее уровень меняется во всех триместрах беременности в плазме крови. Являются ли эти данные точной закономерностью или артефактом, сказать сложно. В исследовании выявлено небольшое число прочтений, соответствующих данной piRNA. В других работах, напротив, показано, что данная piRNA встречается во многих биологических жидкостях [17]. В плазме она составляет 15–30% всех РНК данного класса. В моче ее количество достигает 50% [14]. piR 019825 ассоциирована с колоректальным раком (у женщин при колоректальном раке уровень данной piRNA в плазме крови выше, чем у мужчин) [18]. Кроме того, было выявлено, что у курильщиков piR 019825 в экзосомах, полученных из плазмы, имеет статистически значимо более высокий уровень, чем у некурящих [19]. Ее пониженный уровень в материнской плазме связывают с риском эмбриональных нарушений – хейлосхизисом (заячья губа) [6].

piR 001312 является одной из немногих РНК, которая начинает активно экспрессироваться в плазме крови в третьем триместре. Однако о роли данной РНК мало что известно.

Наиболее интересная piRNA – это piR 020497. Она является не только меняющейся от первого к третьему триместру беременности, но и, как было показано ранее, вносит существенный вклад в процессы имплантации [7, 20].

В нашем исследовании мы обнаружили 5 piRNA, участвующих в процессе развития беременности: piR 000765, piR 020326, piR 019825, piR 001312, piR 020497. Как было представлено, все они играют определенную роль в регуляции физиологических процессов, происходящих в том числе и при беременности [6, 7, 20]. piRNA наряду с уже более изученными miRNA могут стать крайне интересными биомаркерами различных осложнений беременности, но для этого необходимы дальнейшие исследования.

Заключение

Несмотря на то, что piRNA активно изучаются уже более 10 лет, сегодня имеется немного информации о роли данного класса малых некодирующих РНК в оценке риска многофакторных заболеваний. Более того, существуют лишь отрывочные сведения об особенностях экспрессии этих молекул при эмбриональном развитии человека. Мы полагаем, что настоящая пилотная работа создает определенный базис для понимания процессов экспрессии piRNA в плазме и сыворотке беременных женщин и может стать основой для поиска биомаркеров различных осложнений беременности.

Литература / References

- Watson C.N., Belli A., Di Pietro V. Small non-coding RNAs: New class of biomarkers and potential therapeutic targets in neurodegenerative disease. *Front. Genet.* 2019;10:364. DOI: 10.3389/fgene.2019.00364.
- Guarino E., Delli Poggi C., Grieco G.E., Cenci V., Ceccarelli E., Crisci I. et al. Circulating microRNAs as biomarkers of gestational diabetes mellitus: Updates and perspectives. *Int. J. Endocrinol.* 2018;2018:6380463. DOI: 10.1155/2018/6380463.
- Vashukova E.S., Glotov A.S., Fedotov P.V., Efimova O.A., Pakin V.S., Mozgovaya E.V. et al. Placental microRNA expression in pregnancies complicated by superimposed preeclampsia on chronic hypertension. *Mol. Med. Rep.* 2016;14(1):22–32. DOI: 10.3892/mmr.2016.5268.
- Hromadnikova I., Kottalova K., Ivankova K., Krofta L. First trimester screening of circulating C19MC microRNAs and the evaluation of their potential to predict the onset of preeclampsia and IUGR. *PLoS One.* 2017;12(2):e0171756. DOI: 10.1371/journal.pone.0171756.
- Rayford K.J., Cooley A., Rumph J.T., Arun A., Rachakonda G., Villalt F. et al. piRNAs as modulators of disease pathogenesis. *Int. J. Mol. Sci.* 2021;22(5):2373. DOI: 10.3390/ijms22052373.
- Jia S., Zhang Q., Wang Y., Wang Y., Liu D., He Y. et al. PIWI-interacting RNA sequencing profiles in maternal plasma-derived exosomes reveal novel non-invasive prenatal biomarkers for the early diagnosis of non-syndromic cleft lip and palate. *EBioMedicine.* 2021;65:103253. DOI: 10.1016/j.ebiom.2021.103253.
- Timofeeva A.V., Chagovets V.V., Drapkina Y.S., Makarova N.P., Kalinina E.A., Sukhikh G.T. Cell-free, embryo-specific sncRNA as a molecular biological bridge between patient fertility and IVF efficiency. *Int. J. Mol. Sci.* 2019;20(12):2912. DOI: 10.3390/ijms20122912.
- Жарикова А.А., Миронов А.А. PiRNA: биология и биоинформатика. *Молекулярная биология.* 2016;50(1):80–88. DOI: 10.7868/S0026898416010225.
- Zharikova A.A., Mironov A.A. PiRNAs: Biology and bioinformatics. *Molecular Biology.* 2016;50(1):69–76 (In Russ.). DOI: 10.7868/S0026898416010225.

9. Love M.I., Huber W., Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 2014;15(12):550. DOI: 10.1186/s13059-014-0550-8.
10. Benjamini Y., Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*. 1995;57(1):289–300. DOI: 10.2307/2346101.
11. Veneziano D., Nigita G., Ferro A. Computational approaches for the analysis of ncRNA through deep sequencing techniques. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2015;3:77. DOI: 10.3389/fbioe.2015.00077.
12. Yang X., Cheng Y., Lu Q., Wei J., Yang H., Gu M. Detection of stably expressed piRNAs in human blood. *Int. J. Clin. Exp. Med.* 2015;8(8):13353–13358.
13. Mompeón A., Ortega-Paz L., Vidal-Gómez X., Costa T.J. Disparate miRNA expression in serum and plasma of patients with acute myocardial infarction: a systematic and paired comparative analysis. *Sci. Rep.* 2020;10(1):5373. DOI: 10.1038/s41598-020-61507-z.
14. Илларионов Р.А., Косякова О.В., Васькова Е.С., Юркина Н.О., Баклейчева М.О., Долгова Ю.С. и др. Особенности создания коллекции образцов беременных женщин на разных сроках гестации для поиска ранних биомаркеров преждевременных родов. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2020;19(6):2708. DOI: 10.15829/1728-8800-2020-2708.
Illarionov R.A., Kosyakova O.V., Vashukova E.S., Yurkina N.O., Bakleicheva M.O., Dolgova Yu.S. et al. Collection of samples from women at different stages of pregnancy to search for early biomarkers of preterm birth. *Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2020;19(6):2708 (In Russ.). DOI: 10.15829/1728-8800-2020-2708.
15. Krishnan P., Ghosh S., Wang B., Heyns M., Li D., Mackey J.R. et al. Genome-wide profiling of transfer RNAs and their role as novel prognostic markers for breast cancer. *Sci. Rep.* 2016;6:32843. DOI: 10.1038/srep32843.
16. Wang A., Liu J., Zhuang X., Yu S., Zhu S., Liu Y. et al. Identification and comparison of piRNA expression profiles of exosomes derived from human stem cells from the apical papilla and bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.* 2020;29(8):511–520. DOI: 10.1089/scd.2019.0277.
17. El-Mogy M., Lam B., Haj-Ahmad T.A., McGowan S., Yu D., Nosal L. et al. Diversity and signature of small RNA in different bodily fluids using next generation sequencing. *BMC Genomics*. 2018;19(1):408. DOI: 10.1186/s12864-018-4785-8.
18. Yuan T., Huang X., Woodcock M., Du M., Dittmar R., Wang Y. et al. Plasma extracellular RNA profiles in healthy and cancer patients. *Sci. Rep.* 2016;6:19413. DOI: 10.1038/srep19413.
19. Singh K.P., Maremanda K.P., Li D., Rahman I. Exosomal microRNAs are novel circulating biomarkers in cigarette, waterpipe smokers, E-cigarette users and dual smokers. *BMC Med. Genomics*. 2020;13(1):128. DOI: 10.1186/s12920-020-00748-3.
20. Timofeeva A., Drapkina Y., Fedorov I., Chagovets V., Makarova N., Shamina M. et al. Small noncoding RNA signatures for determining the developmental potential of an embryo at the morula stage. *Int. J. Mol. Sci.* 2020;21(24):9399. DOI: 10.3390/ijms21249399.

Благодарности

Исследование проведено при поддержке гранта РНФ № 19-75-20033. Работа выполнена с использованием УНУ «Биоколлекция образцов пациентов с акушерскими, гинекологическими и репродуктивными заболеваниями» ФГБНУ «НИИ АГиР им. Д.О. Отта», часть задач исследования реализована с помощью инфраструктуры РЦ «Центр Биобанк» Научного парка Санкт-Петербургского государственного университета.

Информация о вкладе авторов

Глотов А.С., Козюлина П.Ю., Васькова Е.С. – дизайн исследования.
Глотов А.С., Козюлина П.Ю., Илларионов Р.А. – анализ данных, подготовка рисунков, написание статьи.
Пачулия О.В., Бутенко М.Г., Постникова Т.Б. – сбор биоматериала.
Илларионов Р.А., Юркина Н.О. – выделение малых РНК, подготовка библиотек, проверка качества библиотек.
Илларионов Р.А., Васькова Е.С. – секвенирование малых РНК.
Козюлина П.Ю. – биоинформатический анализ данных.
Беспалова О.Н. – редактирование статьи.
Все авторы дали окончательное согласие на подачу рукописи и согласились нести ответственность за все аспекты работы, ручаясь за их точность и безупречность.

Information on author contributions

Glotov A.S., Kozulina P.Yu., Vashukova E.S. – study design.
Glotov A.S., Kozulina P.Yu., Illarionov R.A. – data analysis, creation of figures, and writing the manuscript.
Pachuliia O.V., Butenko M.G., Postnikova T.B. – sampling of biomaterial.
Illarionov R.A., Yurkina N.O. – performance of small RNA isolation, library preparation, and quality control of samples.
Illarionov R.A., Vashukova E.S. – small RNA sequencing.
Kozulina P.Yu. – bioinformatical data analysis.
Bespalova O.N. – contribution to study concept and revision of the manuscript.
All authors have given their final consent to the submission of the manuscript and agreed to be responsible for all aspects of work, vouching for their accuracy and flawlessness.

Сведения об авторах

Глотов Андрей Сергеевич, д-р биол. наук, руководитель отдела геномной медицины, Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта; заведующий лабораторией биобанкинга и геномной медицины, Санкт-Петербургский государственный университет. ORCID 0000-0002-7465-4504.

E-mail: anglotov@mail.ru.

Козюлина Полина Юрьевна, биолог, Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта; младший научный сотрудник, Всероссийский НИИ сельскохозяйственной микробиологии. ORCID 0000-0001-8520-3445.

E-mail: polykoz@gmail.com.

Илларионов Роман Арионович, аспирант, Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет); специалист, РЦ «Центр Биобанк» Научного парка, Санкт-Петербургский государственный университет; младший научный сотрудник, лаборатория геномики и биоресурсных коллекций, Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта. ORCID 0000-0003-2711-748X.

E-mail: r.a.illarionov@gmail.com.

Information about the authors

Andrey S. Glotov, Dr. Sci. (Biol.), Head of the Department of Genomic Medicine, D. O. Ott Research Institute for Obstetrics, Gynecology, and Reproduction; Head of the Laboratory of Biobanking and Genomic Medicine, St. Petersburg State University. ORCID 0000-0002-7465-4504.

E-mail: anglotov@mail.ru.

Polina Yu. Kozulina, Biologist, D. O. Ott Research Institute for Obstetrics, Gynecology, and Reproduction; Junior Research Scientist, All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology. ORCID 0000-0001-8520-3445.

E-mail: polykoz@gmail.com.

Roman A. Illarionov, Postgraduate Student, St. Petersburg State Institute of Technology; Specialist, RC Center Biobank, Science Park, St. Petersburg State University; Junior Research Scientist, D. O. Ott Research Institute for Obstetrics, Gynecology, and Reproduction. ORCID 0000-0003-2711-748X.

E-mail: r.a.illarionov@gmail.com.

Elena S. Vashukova, Research Scientist, D. O. Ott Research Institute for Obstetrics, Gynecology, and Reproduction. ORCID 0000-0002-6996-8891.

E-mail: vi_lena@list.ru

Вашукова Елена Сергеевна, научный сотрудник, лаборатория геномики и биоресурсных коллекций, Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта. ORCID 0000-0002-6996-8891.

E-mail: vi_lena@list.ru.

Юркина Наталья Олеговна, младший научный сотрудник, лаборатория геномики и биоресурсных коллекций, Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта. ORCID 0000-0002-5515-5363.

E-mail: yurkina.natali1002@gmail.com.

Пачулия Ольга Владимировна, врач акушер-гинеколог, научный сотрудник, лаборатория геномики и биоресурсных коллекций, Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта. ORCID 0000-0003-4116-0222.

E-mail: for.olga.kosyakova@gmail.com.

Бутенко Мария Геннадьевна, клинический ординатор, Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта. ORCID 0000-0002-1404-371X.

E-mail: butenkomariabutenko@gmail.com.

Постникова Татьяна Борисовна, врач акушер-гинеколог, женская консультация, Родильный дом № 10; младший научный сотрудник, Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта. ORCID 0000-0002-1664-7103.

E-mail: ptb20@mail.ru.

Беспалова Олеся Николаевна, заместитель директора по научной работе, Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта. ORCID 0000-0002-6542-5953.

E-mail: sheggerra@mail.ru.

 **Готов Андрей Сергеевич**, e-mail: anglotov@mail.ru.

Natalia O. Yurkina, Junior Research Scientist, D. O. Ott Research Institute for Obstetrics, Gynecology, and Reproduction. ORCID 0000-0002-5515-5363.

E-mail: yurkina.natali1002@gmail.com.

Olga V. Pachulia, Obstetrician-Gynecologist, Research Scientist, Laboratory of Genomics and Bioresource Collection, D. O. Ott Research Institute for Obstetrics, Gynecology, and Reproduction. ORCID 0000-0003-4116-0222.

E-mail: for.olga.kosyakova@gmail.com.

Maria G. Butenko, Clinical Resident, D. O. Ott Research Institute for Obstetrics, Gynecology, and Reproduction. ORCID 0000-0002-1404-371X.

E-mail: butenkomariabutenko@gmail.com.

Tatyana B. Postnikova, Obstetrician-Gynecologist, Antenatal clinic, Maternity Hospital No. 10; Junior Research Scientist, D. O. Ott Research Institute for Obstetrics, Gynecology, and Reproduction. ORCID 0000-0002-1664-7103.

E-mail: ptb20@mail.ru.

Olesya N. Bepalova, Dr. Sci. (Med.), Deputy Director for Research, D. O. Ott Research Institute for Obstetrics, Gynecology, and Reproduction. ORCID 0000-0002-6542-5953.

E-mail: sheggerra@mail.ru.

 **Andrey S. Glotov**, e-mail: anglotov@mail.ru.

Received May 13, 2021

Поступила 13.05.2021