© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 618.3-06:616.12-008.331+616.8-009.24]-07

Мурашко А.В., Симонова М.С., Горюнова А.Г., Чебанов Д.К., Абрамов А.А., Чаплыгин Е.Ю.

ИССЛЕДОВАНИЕ УРОВНЕЙ МИКРОРНК В ПЛАЗМЕ КРОВИ У БЕРЕМЕННЫХ ЖЕНЩИН С ГЕСТАЦИОННОЙ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ, ПРЕЭКЛАМПСИЕЙ И СИНДРОМОМ ЗАДЕРЖКИ РОСТА ПЛОДА

ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский университет), Клиника акушерства и гинекологии им. В.Ф. Снегирёва, 119045, г. Москва

Для корреспонденции: Мурашко Андрей Владимирович, д-р мед. наук, проф., зав. отделением патологии беременности № 1 Клиники акушерства и гинекологии им. В.Ф. Снегирёва, проф. кафедры акушерства и гинекологии № 1 ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России, e-mail: murashkoa@mail.ru

МикроРНК представляют собой небольшие некодирующие РНК (20–24 нуклеотида), которые регулируют экспрессию генов посредством посттранскрипционной репрессии или деградации матричной РНК. Роль микроРНК во время беременности в настоящее время мало изучена. Некоторые исследования идентифицировали профиль микроРНК, связанный с беременностью, так как он присутствовал в плаценте и материнской крови в течение всей беременности. В данном исследовании мы сравнили индивидуальные уровни экспрессии 10 микроРНК в образцах материнской периферической крови и в дальнейшем оценили их связь с неблагоприятными исходами беременности, включающими преэклампсию, гестационную артериальную гипертензию и синдром задержки роста плода.
МикроРНК могут использоваться как неинвазивный биомаркер для выявления неблагоприятных акушерских исходов и с потенциальной терапевтической целью профилактики или лечения патологии беременности. Необходимо проведение дальнейших исследований с большим размером выборки в разных популяциях для подтверждения наших результатов.

Ключевые слова: гестационная артериальная гипертензия; преэклампсия; синдром задержки роста плода; беременность; микроРНК.

***Для цитирования**:* Мурашко А.В., Симонова М.С., Горюнова А.Г., Чебанов Д.К., Абрамов А.А., Чаплыгин Е.Ю. Исследование уровней микроРНК в плазме крови у беременных женщин с гестационной артериальной гипертензией, преэклампсией и синдромом задержки роста плода. *Архив акушерства и гинекологии им. В.Ф. Снегирёва.* 2018; 5(2): 88-92. DOI http://dx.doi.org/10.18821/2313-8726-2018-5-2-88-92

Murashko A.V., Simonova M.S., Goryunova A.G., Chebanov D.K., Abramov A.A., Chaplygin E.Yu.

INVESTIGATION OF MICRORNA LEVELS IN BLOOD PLASMA IN PREGNANT WOMEN WITH GESTATIONAL ARTERIAL HYPERTENSION, PREECLAMPSIA, AND FETAL GROWTH RETARDATION SYNDROME

I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, V.F. Snegirev Clinic of Obstetrics and Gynecology, Moscow, 119045, Russian Federation

MicroRNAs are small non-coding RNAs (20–24 nucleotides) that regulate gene expression through post-transcriptional repression or degradation of the template RNA. The role of microRNA during pregnancy is currently poorly understood. Some studies have identified a microRNA profile associated with pregnancy since it was present in the placenta and maternal blood throughout pregnancy. In this study, we compared individual expression levels of 10 microRNAs in the maternal peripheral blood samples and further estimated their association with adverse pregnancy outcomes including preeclampsia, gestational arterial hypertension, and fetal growth retardation syndrome. MicroRNAs can be used as a non-invasive biomarker to identify an adverse obstetric outcome and with the potent therapeutic target for the prevention or treatment of pathology of pregnancy. Further research with a large sample size in different populations is needed to confirm our results.

Keywords: gestational arterial hypertension; preeclampsia; fetal growth retardation syndrome; pregnancy; microRNA.

For citation: Murashko A.V., Simonova M.S., Goryunova A.G., Chebanov D.K., Abramov A.A., Chaplygin E.Yu. Investigation of microRNA levels in blood plasma in pregnant women with gestational arterial hypertension, preeclampsia, and fetal growth retardation syndrome. *V.F. Snegirev Archives of Obstetrics and Gynecology, Russian journal*. 2018; 5(2): 88-92 (In Russ.). DOI: http://dx.doi.org/10.18821/2313-8726-2018-5-2-88-92

***For correspondence**:* Andrey V. Murashko, MD, PhD, DSci., Professor, Head of the Department of pathology of pregnancy of the V.F. Snegirev Clinic of Obstetrics and Gynecology of the I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, 119045, Russian Federation; researcher of the Department of Obstetrics and Gynecology No 1 of the I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, 119991, Russian Federation. E-mail: murashkoa@mail.ru

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.
Acknowledgment. The study had no sponsorship.

Received 26.03.2018
Accepted 31.05.2018

Введение

МикроРНК представляют собой небольшие некодирующие РНК (20–24 нуклеотида), которые регулируют экспрессию генов посредством посттранскрипционной репрессии или деградации матричной РНК. МикроРНК являются ключевым эволюционным компонентом генетической регуляции. Большинство микроРНК многофункциональны и играют важнейшую роль в разнообразии клеточной и физиологической деятельности, такой как клеточный рост, дифференцировка, апоптоз,

миграция и инвазия. Известно, что их экспрессивная дисрегуляция играет роль в развитии многих заболеваний, включая раковые и метаболические.

Роль микроРНК во время беременности в настоящее время мало изучена. Некоторые исследователи идентифицировали несколько микроРНК, связанных с беременностью, так как они присутствовали в плаценте и материнской крови в течение всей беременности. Их биологическая роль может различаться в зависимости от ткани. Считается, что некоторые специфические плацентарные микроРНК ассоциированы с имплантацией эмбриона, привычным невынашиванием, а также с развитием плаценты. Другие микроРНК, циркулирующие в материнской крови, связаны с неблагоприятными исходами беременности, такими как внематочная беременность, гестационный сахарный диабет, гестационная артериальная гипертензия (ГАГ), синдром задержки роста плода (СЗРП) и преэклампсия (ПЭ).

В нескольких работах описана связь аномальной экспрессии микроРНК с осложнениями течения беременности.

В данном исследовании мы сравнили индивидуальные уровни экспрессии 10 микроРНК в образцах материнской периферической крови и в дальнейшем оценили их связь с неблагоприятными исходами беременности, включающими преэклампсию, гестационную артериальную гипертензию и синдром задержки роста плода. Модель дифференциальной экспрессии микроРНК может быть полезна для будущей клинической диагностики и дифференцировки терапевтического подхода.

Цель исследования заключалась в выявлении новых маркеров осложнённого течения беременности на основе изучения экспрессии 10 микроРНК, которые согласно литературным данным вовлечены в процессы развития пренатальных патологий, в образцах материнской крови, чтобы определить взаимоотношения между этими специфическими микроРНК и в дальнейшем оценить связь между микроРНК и неблагоприятными акушерскими исходами.

Материал и методы

В исследовании использовали образцы материнской периферической крови, взятой у 52 женщин. Контрольную (1-ю) группу составили 13 беременных женщин с физиологически протекающей беременностью, 2-ю группу – 11 беременных женщин с диагнозом преэклампсии (ПЭ), 3-ю группу – 22 беременные женщины с гестационной артериальной гипертензией (ГАГ), и 4-ю группу – 6 беременных женщин с диагнозом синдрома задержки роста плода (СЗРП). Частота операции кесарева сечения в контрольной группе составила 35%, в группе с ПЭ – 81%, с ГАГ – 51,9% и в группе с СЗРП – 47,4%. Масса плода, масса плаценты и оценка новорождённого по шкале Апгар связаны с гестационным сроком беременности. Данное исследование проведено для изучения уровней экспрессии микроРНК в периферической крови у пациенток в вышеуказанных четырёх группах (табл. 1).

Образцы материнской крови собирали сразу после госпитализации и помещали в пробирки, содержащие этилендиаминтетрауксусную кислоту (ЭДТА).

Выделение микроРНК и количественная ПЦР в реальном времени (qRT-PCR)

Для получения бесклеточной плазмы из образцов крови матери образцы цельной крови объемом 4 мл дважды центрифугировали при 1200g в течение 10 мин при комнатной температуре. Полученный таким образом супернатант, состоящий из плазмы крови без эритроцитарной массы, прочих клеток крови и крупных фрагментов молекул нуклеиновых кислот, отбирали и переносили в чистую пробирку. Все образцы замораживали при -80ºС. В дальнейшем все образцы одновременно размораживали и использовали для дальнейшей обработки.

Таблица 1

Клиническая характеристика групп пациенток

Клинические данные	1-я группа, контрольная (*n* = 13)	2-я группа, пациентки с ПЭ (*n* = 11)	3-я группа, пациентки с ГАГ (*n* = 22)	4-я группа, пациентки с СЗРП (*n* = 6)
Материнский возраст, годы	31,33 ± 4,35	33,83 ± 5,76	32,04 ± 5,17	31,68 ± 7,30
Срок беременности во время родов, нед	38,87 ± 1,00	36,84 ± 2,31	34,73 ± 2,05	36,87 ± 3,01
Кесарево сечение, %	35	80	51,9	47,4
ИМТ женщины	26,47 ± 3,55	29,10 ± 5,60	26,04 ± 4,46	24,67 ± 3,16
Вес ребенка при рождении, г	3192 ± 300	2622 ± 700	2835 ± 200	2173 ± 600
Пол ребенка, %				
мужской	50	50	52	42
женский	50	50	48	58
Оценка по шкале Апгар на 1-й минуте, баллы	8,64 ± 0,71	8,06 ± 1,16	8,07 ± 1,12	7,94 ± 1,18
Оценка по шкале Апгар на 5-й минуте, баллы	9,83 ± 0,43	9,47 ± 0,88	9,16 ± 0,75	9,44 ± 0,89

V.F. Snegirev Archives of Obstetrics and Gynecology. 2018, 5(2)
DOI http://dx.doi.org/10.18821/2313-8726-2018-5-2-88-92

Выделение экзосом из плазмы проводили по стандартному протоколу на наборе miRCURY Exosome Isolation Kit – Serum and Plasma, после чего выделяли микроРНК на наборе miRCURY RNA Isolation Kit – Biofluids. Выделенную микроРНК сразу же подвергали обратной транскрипции обработкой при помощи обратной транскриптазы на наборе Universal cDNA Synthesis Kit II. Таким образом микроРНК полностью переводят в кДНК, которую замораживают при -20ºС или берут для проведения ПЦР с детекцией в режиме реального времени на наборе Exi-LENT SYBR Green Master Mix Kit с праймерами на специфические микроРНК.

Визуальное сравнение групп осуществляли с помощью квартильного анализа. Оценку достоверности различий проводили с использованием непараметрического критерия Манна–Уитни. Уровни экспрессии микроРНК у пациентов контрольной группы сравнивали с показателями пациентов в каждой группе.

Результаты

Мы проанализировали уровни экспрессии 10 микроРНК (рисунок): микроРНК-7a, микроРНК-126, микроРНК-21, микроРНК-24, микроРНК-7d, микроРНК-18a, микроРНК-103, микроРНК-106a, микроРНК-125a и микроРНК-342 в образцах крови у пациенток контрольной группы и групп пациенток с ПЭ, ГАГ и СЗРП для изучения роли микроРНК в развитии акушерских осложнений.

Результаты исследования показали, что уровни некоторых микроРНК у пациенток в контрольной группе снижены и достоверно различаются ($p < 0,05$) с таковыми в группах сравнения (табл. 2, отмечены серым цветом).

Обсуждение

Проведённое исследование показало, что экспрессия микроРНК в крови у беременных женщин различалась и различия ассоциировались с неблагоприятными исходами беременности (преэклампсией, гестационной артериальной гипертензией и синдромом задержки роста плода).

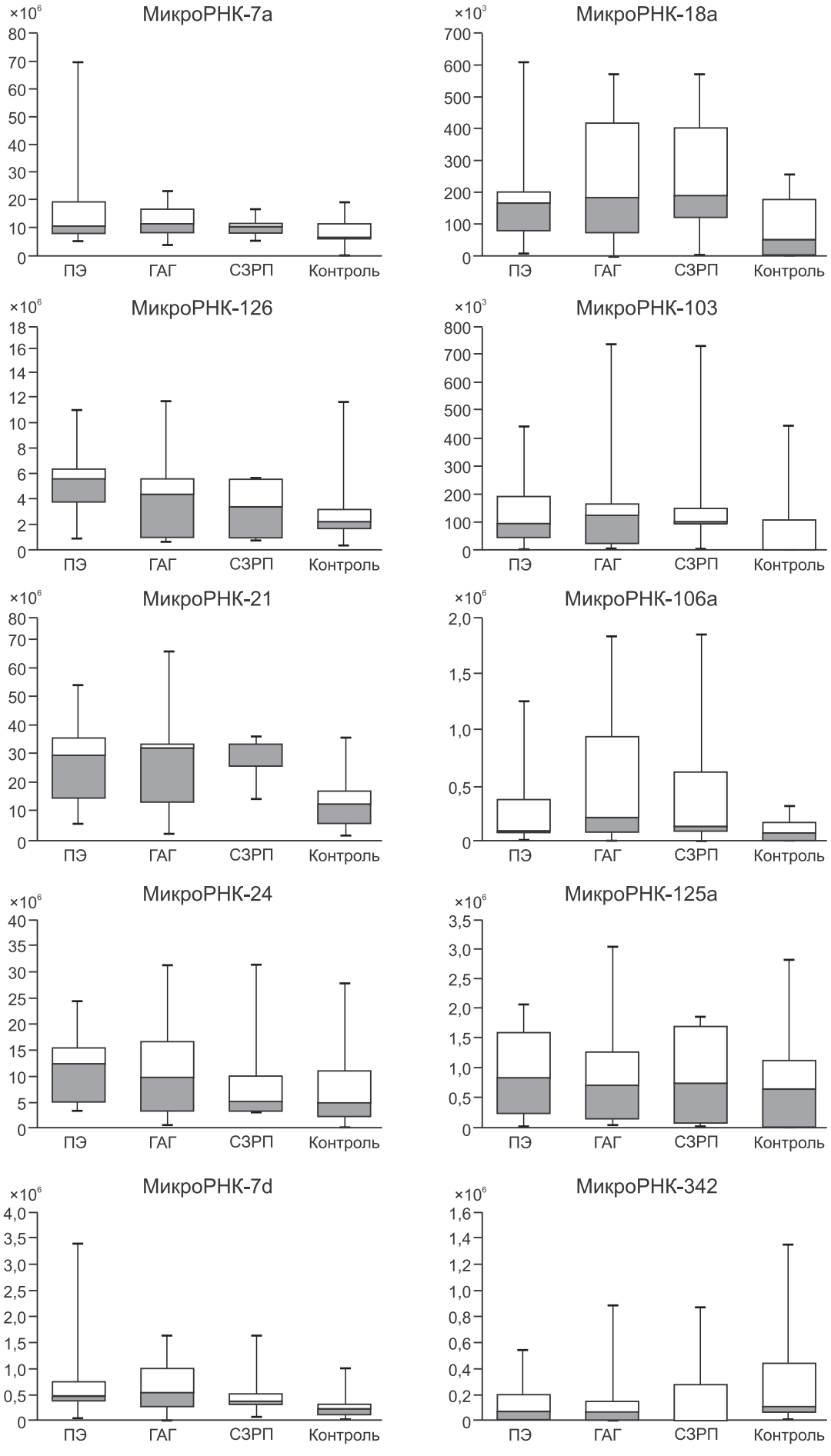
Роль одной специфической микроРНК в различных клетках или тканях может быть различной, также как одна матричная РНК (мРНК) может быть целью различных микроРНК, и одна микроРНК может регулировать несколько мРНК. Оценивая роль микроРНК в неблагоприятных исходах беременности, в большинстве исследований авторы изучали один тип образца (плацента или материнская кровь), и только в некоторых изучались оба. Некоторые микроРНК плаценты и материнской плазмы показали сходные аберрантные профили экспрессии при осложнённой беременности. В другом исследовании также сообщалось о дифференциальных моделях экспрессии микроРНК в материнском кровообращении и плаценте. J. Mouillet и соавт. доказали, что уровни микроРНК, которые они проанализировали (12 микроРНК), увеличились в 1,84 раза в крови у беременных женщин с диагнозом СЗРП, но уменьшились на 24% в образцах плаценты по сравнению с их значениями у женщин с неосложнённой беременностью. Типы клеток, проанализированные в плаценте, включают синцитиотрофобласты/цитотрофобласты, мезенхимальные клетки, клетки Хофбауэра, фибробласты и эмбриональные сосудистые клетки; в то же время клеточное происхождение микроРНК, обнаруженных в плазме крови матери или плода, намного сложнее. Циркулирующие микроРНК могут пассивно высвобождать повреждённые клетки (при некрозе или апоптозе), их могут активно секретировать клетки (экзосомы) или они находятся непосредственно в комплексе со связывающими белками (РНК-связывающими белками, липопротеинами). Профиль экспрессии микроРНК специфичен для клеток и тканей, и состав, по-видимому, сильно отличается от соответствующих донорных клеток после перехода в другую среду. Несмотря на различное происхождение циркулирующей микроРНК в плазме матери и плода, в большинстве исследований основное внимание уделялось плацентарным трофобластам и материнским/фетальным эндотелиальным клеткам.

В плаценте, где происходит эмбрионально-материнское взаимодействие, фетальный синцитиотрофобласт имеет прямой контакт с материнской кровью посредством спиральных артерий. Влияние микроРНК, циркулирующих в крови плода, на исход беременности могло бы происходить через эту взаимосвязь. Очень небольшое количество эмбриональных клеток, бесклеточного компонента плода и экзосом, полученных из плаценты, можно обнаружить в материнском кровообращении с начала беременности, и эти вещества, полученные из эмбриона или плаценты, могут переносить микроРНК или другие молекулы в отдалённые органы-мишени материнского организма и влиять на здоровье матери. В свою очередь, здоровье матери во время беременности также оказывает непосредственное влияние на внутриутробную биологическую функцию плода.

Таблица 2

Различия в уровнях микроРНК в плазме крови у пациенток контрольной группы и групп сравнения

МикроРНК	1-я группа, контрольная (n = 13)	2-я группа, пациентки с ПЭ (n = 11)	3-я группа, пациентки с ГАГ (n = 22)	4-я группа, пациентки с СЗРП (n = 6)
21	Снижен	Повышен	Повышен	Повышен
126	Снижен	Повышен	Повышен	Повышен
18a	Снижен	Повышен	Повышен	Повышен
103	Снижен	Повышен	Повышен	Повышен
24	Снижен	Повышен	Повышен	
7a	Снижен	Повышен	Повышен	Повышен
7d	Снижен	Повышен	Повышен	Повышен
106a	Снижен		Повышен	Повышен
342	Повышен	Снижен	Снижен	Снижен



Уровень экспрессии микроРНК в образцах крови пациенток в группах с ПЭ, ГАГ, СЗРП и в контрольной группе (белым цветом обозначен 25-й квартиль, серым – 75-й квартиль).

V.F. Snegirev Archives of Obstetrics and Gynecology. 2018, 5(2)
DOI http://dx.doi.org/10.18821/2313-8726-2018-5-2-88-92
Original papers

В нескольких исследованиях показано, что инородные вещества из трофобласта, бесклеточная ДНК плода, экзосомы, полученные из плаценты, и эмбриональные эндотелиальные клетки могут предрасполагать к неблагоприятным материнским и фетальным исходам, таким как ПЭ, ГАГ, гестационный сахарный диабет и СЗРП. Учитывая, что микроРНК из материнской плазмы и плаценты участвуют в различных фундаментальных биологических процессах, микроРНК эмбрионального происхождения должны оказывать значительное влияние на беременность матери и регулирование роста и развития плода/новорождённого. Кроме того, содержание крови в пуповине может варьировать в зависимости от материнского или плодового состояния (кислород, значение pH, питательные вещества) и в зависимости от источника пуповинной крови.

Более 500 микроРНК экспрессируются в плаценте человека, и они, как предполагается, регулируют развитие плаценты и функции клеток трофобласта, такие как пролиферация трофобластов, дифференцировка, апоптоз, инвазия и ангиогенез. Известно, что некоторые микроРНК связаны с неправильной плацентацией и осложнёнными беременностями, а аберрантная экспрессия в плаценте или материнской крови некоторых микроРНК, таких как miR-210 и miR-518b, связана как с ПЭ, так и с СЗРП. В нашем исследовании микроРНК-21 и микроРНК-7a в крови матери также связаны с ПЭ и СЗРП. Учитывая, что уровни некоторых микроРНК могут меняться по мере прогрессирования беременности, мы скорректировали этот фактор, и на основании полученных результатов сделали тот же вывод, что уровень микроРНК-21 и микроРНК-7a коррелирует со сроком беременности. Экспрессия микроРНК-21 и микроРНК-7a в крови матери также связана с этими двумя осложнениями (ПЭ и СЗРП), что позволяет предположить, что эти две микроРНК могут участвовать в патофизиологии болезни, и далее доказывать, что эти два связанных с беременностью расстройства могут иметь сходные механизмы.

Различия в экспрессии одной специфической микроРНК можно было бы отнести к разнообразию компонентов исследования (разные этнические группы, предметы исследования, сроки беременности, методы анализа и т. д.). В данном исследовании есть некоторые ограничения. Во-первых, точный эффект микроРНК в каждом индивидуальном неблагоприятном акушерском исходе не установлен. Второе ограничение – относительно небольшой размер каждой скомпрометированной группы беременных. Третьим ограничением является выбор внутреннего контроля, который может быть субоптимальным эталонным геном. Хотя в наших данных не было значимой разницы значений между группой контроля и группой выбора, некоторые исследования показали нестабильность эталонного гена во время циклов замораживания и оттаивания. В настоящем исследовании мы получили предварительные, но многообещающие данные, а в будущих исследованиях можно будет основываться на наших результатах, чтобы исследовать патофизиологию основных нарушений беременности или применять эти микроРНК в клинической практике.

Выводы

МикроРНК в образцах крови, изученных в данном исследовании, экспрессировались дифференциально. Показано, что профили экспрессии микроРНК в материнской крови связаны с преэклампсией, гестационной артериальной гипертензией и синдромом задержки роста плода. Для того, чтобы микроРНК стали неинвазивным биомаркером для неблагоприятных акушерских исходов и потенциальной терапевтической целью профилактики или лечения патологий беременности, необходимы дальнейшие исследования с бóльшим размером выборки в разных популяциях для подтверждения наших результатов.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Chen K., Rajewsky N. The evolution of gene regulation by transcription factors and microRNAs. *Nat. Rev.Genet.* 2007; 8: 93-103.
2. D'angelo B., Benedetti E., Cimini A., Giordano A. MicroRNAs: a puzzling tool in cancer diagnostics andtherapy. *Anticancer Res.* 2016; 36: 5571-5.
3. Meydan C., Shenhar-Tsarfaty S., Soreq H. MicroRNA regulators of anxiety and metabolic disorders. *Trends Mol. Med.* 2016; 22: 798-812.
4. Chim S.S., Shing T.K., Hung E.C., Leung T.Y., Lau T.K., Chiu R.W., Lo Y.M. Detection and characterization of placental microRNAs in maternal plasma. *Clin. Chem.* 2008; 54: 482-90.
5. Morales-Prieto D.M., Chaiwangyen W., Ospina-Prieto S., Schneider U., Herrmann J., Gruhn B., Markert U.R. MicroRNA expression profiles of trophoblastic cells. *Placenta.* 2012; 33: 725-34.
6. Galliano D., Pellicer A. MicroRNA and implantation. *Fertil. and Steril.* 2014; 101: 1531-44.
7. Morales P., Markert U.R. MicroRNAs in pregnancy. *J. Reprod. Immunol.* 2011; 88: 106-11.
8. Miura K., Hasegawa Y., Abe S., Higashijima A., Miura S., Mishima H. et al. Clinical applications of analysis of plasma circulating complete hydatidiform mole pregnancy-associated miRNAs in gestational trophoblastic neoplasia: A preliminary investigation. *Placenta.* 2014; 35: 787-99.
9. Krek A., Grün D., Poy M.N., Wolf R., Rosenberg L., Epstein E.J. et al. Combinatorial microRNA target predictions. *Nat. Genet.* 2005*;* 37: 495-500.
10. Pineles B.L., Romero R., Montenegro D., Tarca A.L., Han Y.M., Kim Y.M. et al. Distinct subsets of microRNAs are expressed differentially in the human placentas of patients with preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2007; 196: 261.e1-e6.
11. Mouillet J.F., Chu T., Hubel C.A., Nelson D.M., Parks W.T., Sadovsky Y. The levels of hypoxia-regulated microRNAs in plasma of pregnant women with fetal growth restriction. *Placenta.* 2010; 31: 781-94.
12. Salomon C., Guanzon D., Scholz-Romero K., Longo S., Correa P., Illanes S.E., Rice G.E. Placental exosomes as early biomarker of preeclampsia – potential role of exosomal microRNAs across gestation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2017; 102(9): 3182-94.
13. Abdel Halim R.M., Ramadan D.I., Zeyada R., Nasr A.S., Mandour I.A. Circulating maternal total cell-free DNA, cell-free fetal DNA and Soluble Endoglin Levels in Preeclampsia: Predictors of Adverse Fetal Outcome? A Cohort Study. *Mol. Diagn. Ther.* 2016; 20: 135-49.
14. Fu G., Brkic´J., Hayder H., Peng C. MicroRNAs in human placental development and pregnancy complications. *Int. J. Mol. Sci.* 2013; 14: 5519.
15. Mouillet J.F., Chu T., Sadovsky Y. Expression patterns of placental microRNAs. *Birth. Defects Res. A Clin. Mol. Teratol.* 2011; 91 (8): 737-43.

Поступила 26.03.2018
Принята к печати 31.05.2018