

<https://doi.org/10.47529/2223-2524.2021.4.1>

УДК 577.21

Тип статьи: обзор литературы / Articles review



Преаналитические особенности определения циркулирующих микроРНК как новых специфических биомаркеров реакции организма на физическую нагрузку

П.В. Постников^{1,*}, И.В. Пронина^{1,2}

¹ *Национальная антидопинговая лаборатория (институт) Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова (НАДЛ МГУ), Москва, Россия*

² *ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», Москва, Россия*

РЕЗЮМЕ

МикроРНК — малые некодирующие одноцепочечные РНК, длиной от 18 до 25 нуклеотидов, которые регулируют экспрессию генов на посттранскрипционном уровне посредством специфического связывания с мРНК-мишенью, приводящего к ее деградации. В последние десятилетия разработка технологий определения профилей экспрессии микроРНК стала важной частью исследовательских проектов, а роль микроРНК в качестве потенциальных высокоинформативных молекулярных биомаркеров различных физиологических и патологических процессов в организме активно изучается научным сообществом. В частности, физическая активность является важным модифицирующим фактором для циркулирующих микроРНК. В отличие от классических биохимических показателей крови, которые могут изменяться с течением времени в зависимости от температуры и условий хранения образца, микроРНК остаются стабильными при хранении и даже при многократных циклах замораживания-оттаивания, что делает их привлекательной и легкодоступной мишенью для обнаружения. Тем не менее определение профиля экспрессии микроРНК в клинической практике все еще является затруднительным из-за высокой неоднородности аналитических процедур, используемых для испытаний. В спортивной медицине особо важным является преаналитический этап, так как часто условия отбора биопроб не стандартизированы и могут влиять на результат анализа. В данном обзоре показана роль микроРНК в качестве новых чувствительных биомаркеров эффективности тренировочного процесса и регуляторов реакции организма в ответ на физическую активность, а также рассмотрены некоторые преаналитические аспекты анализа профилей экспрессии микроРНК.

Ключевые слова: физическая активность, спортсмены, микроРНК, биомаркеры, преаналитический этап

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Постников П.В., Пронина И.В. Преаналитические особенности определения циркулирующих микроРНК как новых специфических биомаркеров реакции организма на физическую нагрузку. *Спортивная медицина: наука и практика*. 2021;11(4):90–103. <https://doi.org/10.47529/2223-2524.2021.4.1>

Поступила в редакцию: 18.10.2021

Принята к публикации: 25.11.2021

Online first: 25.12.2021

Опубликована: 30.12.2021

*Автор, ответственный за переписку

Preanalytical features of the determination of circulating microRNAs as new specific biomarkers of the body's response to physical activity

Pavel V. Postnikov^{1,*}, Irina V. Pronina^{1,2}

¹ *National anti-doping laboratory (Institute) of Moscow State University named after M.V. Lomonosov (NADL MSU), Moscow, Russia*

² *Federal State Budgetary Scientific Institution "Institute of General Pathology and Pathophysiology", Moscow, Russia*

ABSTRACT

MicroRNAs are small non-coding single-stranded RNAs, 18 to 25 nucleotides long, they regulate gene expression at the post-transcriptional level through specific binding to the target mRNA, leading to its degradation. In recent decades, the development of technologies for determining the expression profiles of miRNAs has become an important part of research projects, and the role of miRNAs as potential highly informative molecular

biomarkers of various physiological and pathological processes in the body is actively explored by the scientific community. In particular, physical activity is an important modifying factor for circulating miRNAs. Unlike classical blood biochemical parameters, which can change over time depending on the temperature and storage conditions of the sample, microRNAs remain stable during storage and even after multiple freeze-thaw cycles, which makes them an attractive and easily accessible target for detection. However, the determination of the microRNA expression profile in clinical practice is still difficult due to the high heterogeneity of analytical procedures used for testing. In sports medicine, the preanalytical stage is especially important, since often the conditions for sampling are not standardized and can affect the analysis result. This review shows the role of miRNAs as new sensitive biomarkers of the effectiveness of the training process and regulators of the body's response to physical activity, and also discusses some preanalytical aspects of the analysis of miRNA expression profiles.

Keywords: physical activity, athletes, microRNA, biomarkers, preanalytical stage

Conflict of interests: the authors declare no conflict of interests.

For citation: Postnikov P.V., Pronina I.V. Preanalytical features of the determination of circulating microRNAs as new specific biomarkers of the body's response to physical activity. *Sportivnaya meditsina: nauka i praktika (Sports medicine: research and practice)*. 2021;11(4):90–103. (In Russ.). <https://doi.org/10.47529/2223-2524.2021.4.1>

Received: 18 October 2021

Accepted: 25 November 2021

Online first: 25 December 2021

Published: 30 December 2021

*Corresponding author

МикроРНК являются тонкими посттранскрипционными регуляторами экспрессии генов в сложной сети клеточных процессов. Несмотря на то что сами микроРНК образуются внутри клетки, они высвобождаются во внеклеточное пространство в виде микровезикул (экзосом) или связываются с липопротеинами высокой плотности, или с комплексами рибонуклеопротеидов с белком аргонауте 2 (Ago2), или нуклеофосмином и затем попадают непосредственно в биологические жидкости организма: плазму, спинномозговую жидкость, мочу, слюну [1, 2]. В многочисленных исследованиях сообщается о потенциальной роли циркулирующих микроРНК в качестве биомаркеров при различных заболеваниях и состояниях [3–10]. Изменения профиля экспрессии этих малых некодирующих РНК могут выступать в качестве ранней реакции организма на физиологический или патологический раздражитель, будучи даже более чувствительными, чем канонические биохимические маркеры. Биологические функции микроРНК пока еще полностью не изучены, однако опубликованные данные говорят о том, что они действуют как сигнальные молекулы, ответственные за реализацию процессов ангиогенеза [11], воспаления [12, 13], дифференциации клеток [14], роста [15], ответа на физическую нагрузку [16–18] и состояние гипоксии [19, 20]. В отдельных публикациях даже рассматривается эндокринная роль циркулирующих микроРНК [21]. Учитывая их чувствительность к физической активности, в ряде исследовательских работ циркулирующие микроРНК были предложены в качестве специфических показателей реакции организма на различные схемы тренировок или возможной оценке их эффективности. Однако существует критическая проблема воспроизводимости анализа профиля микроРНК, связанная не только с самими методами определения, но и в значительной части с различиями в преаналитических этапах. Требуется более развернутое систематическое исследование влияния отдельных преаналитических переменных, таких как выбор

матрицы (например, плазма или сыворотка), условия отбора и хранения образцов, контаминация, условия центрифугирования и др. [5, 22], на определяемые уровни микроРНК в крови.

Цель исследования: обобщение основных имеющихся знаний о преаналитическом управлении биологическим образцом наряду с неоспоримой важностью оценки уровней циркулирующих микроРНК как специфических регуляторов ответа на физическую активность и эффективности тренировочного процесса, что может заложить основы персонализированного подхода к определению результативности спортсменов.

1. Биогенез и физиологическая роль микроРНК

МикроРНК — это малые некодирующие молекулы РНК, играющие одну из ключевых ролей в регуляции экспрессии генов. Впервые микроРНК была обнаружена в 1993 году, когда Амброс обнаружил у *C. elegans* небольшую однонитевую РНК lin-4, выполняющую регуляторные функции. Ученые выяснили, что lin-4 регулирует экспрессию гена lin-14 посредством антисмыслового РНК-РНК взаимодействия [23]. Регуляторные системы на основе этих одноцепочечных РНК существуют как у позвоночных, так и у беспозвоночных животных [24], растений [25] и вирусов [26]. Впечатляющий рост числа исследований в области микроРНК в последние годы привел к созданию универсальной базы данных микроРНК (www.mirbase.org). На сегодняшний момент в этой базе собраны сведения о более чем 28 000 различных микроРНК, имеющих универсальную номенклатуру, с приведенными нуклеотидными последовательностями, предсказанными генами-мишенями, регуляцию которых та или иная молекула осуществляет, и ссылки на первоисточники [27].

В организме человека обнаружено более 2675 микроРНК. Кодированные последовательности микроРНК широко распространены по всему геному, за исключением Y-хромосомы, где их сравнительно мало [28, 29].

Последовательности ДНК, кодирующие микроРНК, могут быть расположены в некодирующих областях, внутри интронов и в нетранслируемой области (UTR) генов, кодирующих белок; они эпигенетически регулируются метилированием и деацетилизацией, как это происходит с классическими генами [30]. Последовательности ДНК, кодирующие микроРНК, транскрибируются РНК-полимеразой II в первичный транскрипт, называемый пре-микроРНК. Внутри ядра фермент Droscha расщепляет фрагменты, фланкирующие область стволовой петли, создавая пре-микроРНК, которая затем экспортируется в цитоплазму с помощью белка экспортина 5, где фермент Dicer высвобождает двухцепочечную зрелую микроРНК. Одна цепь дуплекса обычно разрушается (звездчатая цепь), в то время как другая цепь встраивается в РНК-индуцированный комплекс сайленсинга (RISC), ферментный комплекс, содержащий белок аргонауте 2 (Ago2). В некоторых случаях звездчатая цепь также генерирует зрелую микроРНК: в этом случае две микроРНК, происходящие из одной и той же цепи, называются одним и тем же именем, но разными суффиксами -3p и -5p, в зависимости от молекулярного окончания, из которого они генерируются. Комплекс RISC связывает зрелую микроРНК, которая затем переходит на мРНК-мишень (рис. 1).

Пре-микроРНК синтезируется в ядре клетки и проходит первичный процессинг комплексом белков Droscha и DGCR8. Полученная пре-микроРНК длиной 70–120 нуклеотидов при помощи белка экспортина 5 выходит

в цитоплазму, где с помощью белка Dicer проходит дальнейший процессинг с образованием зрелой микроРНК и комплементарной ей «звездчатой» цепи, которая чаще всего деградирует. Зрелая микроРНК в составе рибонуклеопротеинового комплекса RISC взаимодействует с матричной РНК-мишенью, вызывая ее деградацию или ингибирование трансляции.

Обычно нуклеотиды в положениях 2–7 (называемые «затравочной областью») являются наиболее важными для ассоциации с транскриптами-мишенями. Взаимодействие микроРНК-мРНК вызывает деградацию мРНК и, следовательно, ингибирование трансляции, реже ингибирование трансляции без разрушения мРНК. Одна микроРНК способна регулировать сотни генов [31], но верно и обратное: один ген может регулироваться несколькими микроРНК.

Фундаментальная роль регуляторной системы на основе микроРНК была продемонстрирована нокаутом Dicer-1 у мышей, который, как было установлено, приводил к летальному исходу на ранних эмбриональных стадиях [32]. Более того, было показано, что несколько микроРНК выполняют важные функции в регуляции и дифференцировке человеческих эмбриональных стволовых клеток даже на первых стадиях эмбрионального развития [33]. Важность аппарата микроРНК была также продемонстрирована с помощью условного нокаута Dicer в эмбриональных стволовых клетках мышей, что привело к дефектам пролиферации, вызванным отсутствием зрелых микроРНК [34].

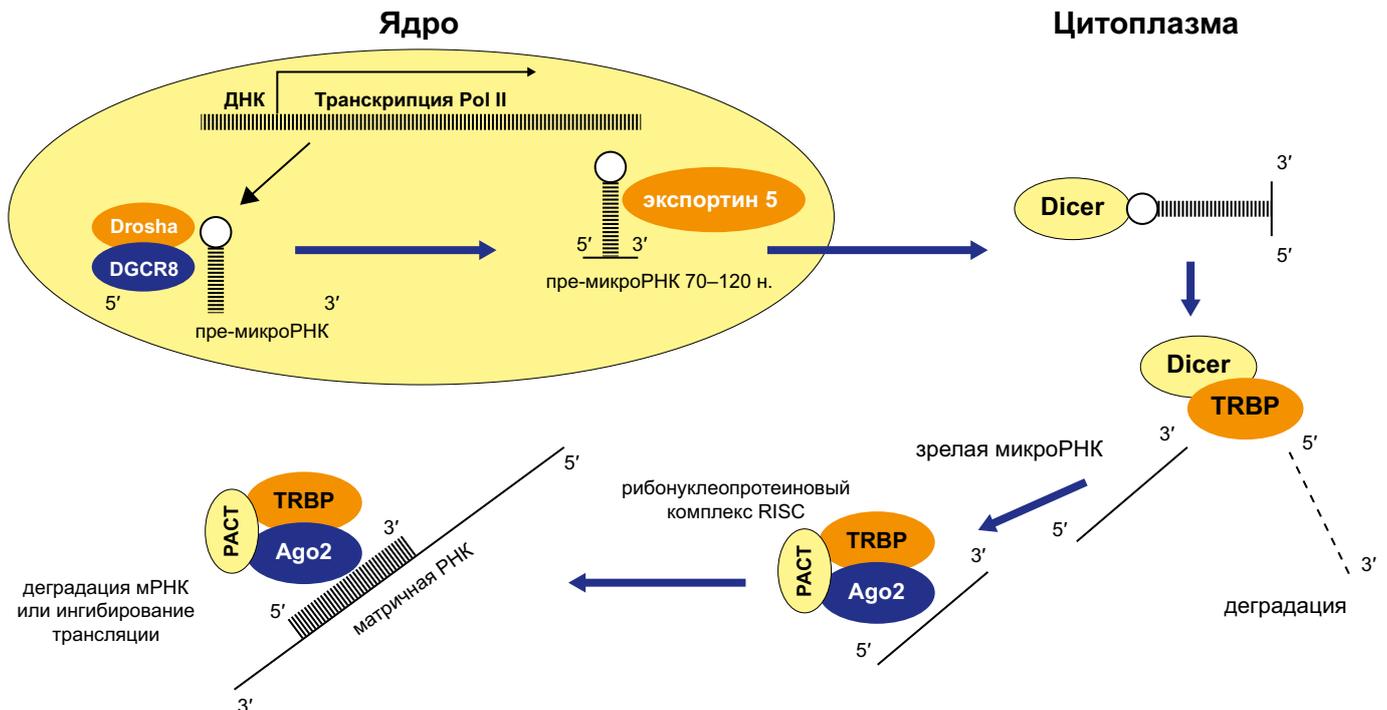


Рис. 1. Схема биогенеза микроРНК
Fig. 1. Scheme of microRNA biogenesis

МикроРНК являются плеiotропными факторами, непосредственно участвующими в регуляции экспрессии генов, позволяющими определять сложные генные сети, управляющие всеми клеточными функциями.

2. МикроРНК как биомаркеры

На основе статьи Morrow и соавт., опубликованной в 2007 году и посвященной проблеме диагностики сердечно-сосудистых заболеваний, критериями оценки пользы новых биомаркеров являются: 1) возможность их измерения в клинических условиях; 2) проведение подтверждающего анализа в нескольких исследованиях; 3) прямое влияние на постановку диагноза или медицинское заключение [35].

Рассмотрим степень соответствия микроРНК этим критериям.

Критерий измеримости в клинических условиях удовлетворен, поскольку биологические образцы для определения микроРНК можно собирать минимально инвазивно или неинвазивно — это кровь (в том числе, сыворотка и плазма), моча, спинномозговая жидкость, слюна. Анализ вышеприведенных биологических жидкостей можно легко проводить в клинических диагностических лабораториях так же, как и создавать их хранилища для дальнейших исследований. Это особенно полезно в случае изучения состояний, поражающих ткани, которые труднодоступны для биопсии (например, кости) [36].

Выполнение двух других критериев пока ещё затруднено.

В настоящее время сложно выполнить валидацию методов определения уровня экспрессии микроРНК, в основном, из-за отсутствия аналитической стандартизации. Сравнительное исследование количественной оценки внутриклеточных и циркулирующих микроРНК с помощью нескольких ПЦР-платформ и секвенирования следующего поколения продемонстрировало удивительно низкое соответствие между профилями микроРНК, которые были названы дифференциально экспрессируемыми, каждой платформой [37]. Таким образом, при разработке новых потенциальных биомаркеров на основе микроРНК аналитические платформы и протоколы должны оставаться неизменными на протяжении всего периода разработки (от их обнаружения и проверки и до клинических испытаний) и переход на окончательную коммерческую платформу, вероятно, потребует дополнительных валидаций [38].

Другой большой проблемой является тот факт, что большинство данных об экспрессии микроРНК в биожидкостях представляют собой относительные, а не абсолютные значения измеряемого количества на стандартный объем. Это влияет не только на сопоставимость данных между разными лабораториями, но и на сопоставимость данных между разными исследованиями в одной лаборатории.

Среди занимающихся изучением профилей экспрессии микроРНК исследователей нет единого мнения о том, могут ли априори определенные контрольные (референсные) гены использоваться для нормализации данных [36, 38]. Существует понятие тканеспецифичности референсных генов. Некоторые исследователи предпочитают использовать в качестве референсного гена вносимый на определенном этапе внутренний контроль — синтезированный олигонуклеотид с последовательностью, не встречающейся у человека.

Наконец, возможность влияния профиля экспрессии микроРНК на постановку диагноза все еще не полностью установлена из-за неопределенности значения этих молекул и изменения их экспрессии в тех или иных патологических процессах. Образ жизни и болезни: привычки, циркадный ритм, сопутствующие заболевания — вызывают межличностные различия уровней микроРНК в кровотоке, что может ограничивать их клиническую применимость в качестве биомаркеров.

В настоящее время определено, что пол не является основным фактором вариаций уровней циркулирующих микроРНК [39], а физическая активность [17, 18], курение [40], диеты (посредством модуляции липопротеина высокой плотности ЛПВП, носителя микроРНК) [41] и циркадный ритм [42] оказывают значимое влияние на уровни и амплитуду изменений специфических циркулирующих микроРНК. Более того, на уровни циркулирующих микроРНК влияет функция почек (общий уровень циркулирующих микроРНК снижается у пациентов с хроническим заболеванием почек [43]), в то время как зависимость от функциональности печени пока неизвестна [36]. Следовательно, исследования, сфокусированные на циркулирующих микроРНК, требуют четкого определения времени сбора образцов, критериев включения и исключения пациентов, учитывающих самые разнообразные факторы (скорость клубочковой фильтрации, ночное голодание, определенная диета), чтобы свести к минимуму их влияние [36].

Аномальная экспрессия отдельных микроРНК или их семейств была обнаружена при нескольких заболеваниях, включая рак, сердечно-сосудистые заболевания, воспалительные и аутоиммунные заболевания, а также при многих других [44, 45]. Экспрессия микроРНК изменяется в опухолях по сравнению с нормальной тканью, и некоторые из них могут быть использованы в качестве молекулярных маркеров специфической неоплазии [46]. Профиль экспрессии микроРНК (miRNome) имеет большой диагностический потенциал, поскольку он может быть специфичным для любого заболевания или любого физиологического изменения. Несмотря на накопление знаний по участию микроРНК в физиологических и патофизиологических процессах, их использование в клинической практике крайне ограничено. В настоящее время продолжают исследования роли микроРНК как регуляторов в различных сигнальных путях в клетке.

Реализация использования микроРНК как биомаркеров, помимо оптимизации аналитических методов, влечет за собой огромные усилия по стандартизации операционных процедур для их правильного определения [47], а также систематическую оценку чувствительности методов к преаналитическим факторам — факторам образа жизни, — чтобы определить надежный протокол для последующих клинических исследований.

3. МикроРНК и физические нагрузки

Физическая активность — один из наиболее эффективных способов в долгосрочной перспективе улучшения качества жизни, учитывая ее положительное влияние на сердечно-сосудистую, когнитивную и иммунную функции, процессы костного и энергетического обмена [48].

Физические упражнения благодаря механической стимуляции и метаболической активации модулируют экспрессию генов, кодирующих как структурные, так и функциональные белки [49] в скелетных и сердечных мышечных волокнах. Многие из продуктов экспрессии этих генов обнаруживаются в кровотоке ввиду усиления окислительных процессов и, как следствие, повышения проницаемости мембран миоцитов, гибели миофибрилл в результате физиологического обновления или повреждения и т.д. и могут использоваться в качестве потенциальных маркеров мышечной активности или повреждения [50]. Помимо белков сокращающиеся или поврежденные миоциты высвобождают в кровоток и другие биологически активные молекулы, в том числе микроРНК. В научных исследованиях циркулирующие микроРНК являются новыми маркерами молекулярных механизмов адаптации организма к физическим нагрузкам [16–18]. В нескольких исследованиях были идентифицированы группы микроРНК, специфичных для скелетных и сердечной мышц, в их числе miR-1, miR-133a, miR-206, miR-208a, miR-208b и miR-499, которые регулируют такие биологические процессы в мышцах, как рост, развитие, метаболическая адаптация и восстановление. У здоровых людей они присутствуют в очень низких количествах, а их повышенный уровень в кровотоке может использоваться в качестве биомаркера для определения эффективности тренировочных схем, специально разработанных для улучшения конкретных функций, а также для ранней диагностики аномального ответа организма на высокую тренировочную нагрузку или заболевания сердца (например, инфаркт миокарда и какие-либо патологии органа) [51–53].

Baggish и соавт. [16] проанализировали циркулирующие микроРНК в плазме крови молодых здоровых спортсменов до и после 90 дней интенсивных тренировок по академической гребле, ориентированных на выносливость. Авторы обнаружили корреляцию между пиковыми уровнями miR-146a и максимальными объемами относительного потребления кислорода на кг массы тела (VO_{2max}). Повышение уровня циркулирующей miR-146a

после упражнений на выносливость также было продемонстрировано Wardle [54]. Baggish и др. [16] смогли обнаружить прямую корреляцию между изменениями в экспрессии miR-20a до и после тренировки и относительным увеличением максимального потребления кислорода, вызванным тренировкой, указывая тем самым, что изменения концентрации микроРНК действительно могут служить маркерами для адаптации к тренировке [55].

В нескольких исследованиях продемонстрирована повышенная регуляция циркулирующих miR-1 и miR-133a в ответ на единожды выполняемый комплекс физических упражнений и длительный цикл тренировок, независимо от типа упражнений — на выносливость или на силу (сопротивление) [56, 57]. Поскольку эти две микроРНК специфичны для мышечных клеток, то вполне вероятно, что они могут высвобождаться за счет сокращения скелетных мышц или обновления мышечных волокон.

В других исследованиях в зависимости от участника эксперимента, типа физической нагрузки, ее продолжительности и интенсивности изменяется экспрессия широкого спектра микроРНК [58, 59].

Обнаружено, что уровни экспрессии miR-21, miR-221, miR-222 и miR-146a, принимающих непосредственное участие в процессах воспаления, ангиогенеза, ответа на гипоксию и дифференцировке мышц [16], временно увеличивались после интенсивных тренировок, требующих выносливости, состоящих из циклических тестов при максимальном потреблении кислорода (VO_{2max}). В некоторых работах, напротив, отмечалось значительное уменьшение уровней miR-146a и miR-221 в сыворотке после того же типа тренировок [60, 61].

В частности, уровень miR-486, активно экспрессируемой в скелетных мышцах и тканях сердечной мышцы, заметно снижается после цикла упражнений на велотренажере при показателе аэробной выносливости VO_{2max} около 70 % в течение 60 минут и возвращается к исходным уровням в течение 24 часов. Кроме того, была обнаружена достоверная корреляция циркулирующей miR-486 с VO_{2max} , указывая на зависимость уровней экспрессии вышеупомянутой микроРНК от аэробной производительности у здоровых людей [60].

После марафонского забега были значительно увеличены уровни циркулирующих miR-1, miR-133a, miR-206, miR-208a и miR-499; все эти микроРНК связаны с дифференцировкой и функционированием мышечных клеток. Было выявлено, что увеличение уровня этих микроРНК может быть связано с усилением процессов деструкции тканей и индукцией апоптоза клеток в качестве прямого механического ответа на устойчивую сократительную активность (микроразрывы мышц) или с усилением внутриклеточного процессинга предшественников микроРНК, приводящим к их секреции из клетки, как метаболический ответ непрерывно активируемых миофибрилл [62, 63]. Yin и соавт. [17] также показали,

что бег на длинные дистанции (8 км) изменяет уровни мышечно-специфических miR-1, miR-133a и их корреляцию с другими биомаркерами: лактатом, миоглобином, тропонином. Было отмечено, что уровни hsa-miR-1-3p, hsa-miR-133a-3p, hsa-miR-133b значительно увеличиваются сразу после забега, а концентрация hsa-miR-133a-3p продолжает повышаться даже спустя 24 часа после. Кроме того, изменение содержания hsa-miR-1-3p и hsa-miR-133a-3p в кровотоке коррелировало с уровнями миоглобина.

С другой стороны, в исследовании Moogen и соавт. [62] 1 час циклического теста при 65 % VO_{2max} не повлиял на уровни циркулирующих микроРНК. Однако в том же исследовании авторы обнаружили корреляцию между уровнями miR-1, miR-133a, miR-206 и аэробной способностью спортсмена, предполагая их возможную роль в качестве биомаркеров в этом контексте.

С другой стороны, пока еще остается неизученным, как изменяются уровни циркулирующих микроРНК при хронических физических нагрузках. У выступающих профессиональных спортсменов уровень miR-20a, опосредующей ангиогенез, в плазме был значительно выше после 3-месячного периода непрерывных тренировок, тогда как в период отдыха он коррелировал с VO_{2max} спортсмена; эти данные предполагают возможную роль miR-20a как биомаркера кардиореспираторной выносливости [16]. В том же исследовании было показано, что ни одна из микроРНК, уровень которых изменялся под влиянием разовой интенсивной тренировки на велотренажере, не меняла экспрессию под влиянием длительного тренировочного процесса [16]. С другой стороны, в исследовании Aoi и соавт. после разовой интенсивной тренировки на велотренажере при 70 % VO_{2max} в течение 60 минут концентрация miR-486 в сыворотке снижалась так же, как при длительном тренировочном процессе (3 дня в неделю в течение 4 недель) [60].

В большинстве исследований изучается влияние физических упражнений на экспрессию циркулирующих микроРНК скелетных мышц, однако встречаются сообщения и о влиянии физической нагрузки на изменение профилей других тканеспецифичных микроРНК. Radom-Aizik и соавт. [64] изучили изменения профилей экспрессии микроРНК, выделенных из мононуклеарных клеток периферической крови двадцати молодых людей до и после одного сеанса интенсивных физических нагрузок, а именно десяти 2-минутных циклов с 1-минутным перерывом между ними на велотренажере с эргометром с постоянной среднецикловой скоростью. При анализе на микрочипах они наблюдали изменения в 34 микроРНК, многие из которых участвуют в воспалительных процессах, например, miR-125b, let-7e (подавление экспрессии) и miR-132 (возрастание экспрессии) в регуляции toll-подобных рецепторов (TLRs) моноцитов; miR-181 (повышение экспрессии) в регуляции функций Т-клеток; miR-31 (понижение экспрессии) участвует в регуляторных функциях Т-лимфоцитов;

miR-21 (повышение экспрессии) в снижении метилирования ДНК в CD4⁺ Т-клеток; miR-125a-5p (понижение экспрессии) и miR-132 (повышение экспрессии) играют роль в заболеваниях, естественное течение которых изменяется в результате физических упражнений (например, системная красная волчанка, ревматоидный артрит) [64]. Интересно, Drummond и соавт. изучили, как анаболические стимулы (упражнения на выносливость при принятии 20 г раствора незаменимых аминокислот, обогащенного лейцином) резко изменяют профиль микроРНК в скелетной мускулатуре (в образцах мышечной биопсии) у пожилых людей по сравнению с молодыми испытуемыми. Следует отметить, что в данной работе изучались уровни предшественников микроРНК, а не сами зрелые микроРНК. Авторы обнаружили, что исходная экспрессия pri-miR-1-1, pri-miR-1-2, pri-miR-133a-1 и pri-miR-133a-2 повышена у пожилых людей в сравнении с молодыми людьми. По сравнению с исходными значениями уровни микроРНК снижались через 6 часов после тренировки только у молодых добровольцев, тогда как pri-miRNA-206 индуцировалась нагрузками как у пожилых, так и у молодых испытуемых [65].

Известно, что физическая активность влияет на метаболизм костей, и ее влияние зависит от типа, интенсивности и продолжительности нагрузки, т.е. от разных схем тренировок [66]. Некоторые связанные с обменом энергии гормоны, такие как миокины, адипокины и нейротрансмиттеры, также участвуют в тонкой регуляции обмена костной ткани [48], причем новые данные показывают, что многочисленные микроРНК модулируют образование и резорбцию костей, воздействуя на регуляторы остеогенной дифференциации [67]. Изменения уровней экспрессии микроРНК могут быть связаны с метаболическими болезнями костей и риском переломов, направленное изменение их экспрессии может играть потенциальную терапевтическую роль [68]. О влиянии физических нагрузок на экспрессию микроРНК, связанных с обменом костной ткани и риском переломов, известно мало. Недавно было продемонстрировано, что 8-недельная схема повторяющихся спринтерских тренировок с высокой интенсивностью приводит к подавлению уровней циркулирующих miR-23a-3p, miR-100-5p и miR-125b-5p [69], которые связаны с риском переломов [70, 71].

В статье Rullman и соавт. описывается влияние 21-дневного постельного режима на экспрессию микроРНК в скелетных мышцах (биопсия бралась из латеральной вены) у 13 здоровых мужчин. Это представляет особый интерес для космонавтов, участвующих в длительных космических полетах в условиях микрогравитации. Из 4000 проанализированных микроРНК 16 были активированы, а 3 — подавлены при постельном режиме, все они так или иначе участвуют в реакции клеток / мышечных волокон скелетных мышц на механическую нагрузку [72].

Интересно, что экспрессия двух представителей семейства miR-15 увеличивается при постельном режиме, как и у пациентов с диабетом типа II [73]. Было высказано предположение, что эти микроРНК участвуют в развитии инсулинорезистентности и экспрессии рецептора инсулина [74]. Инсулинорезистентность в большинстве случаев остаётся не распознанной до возникновения метаболических нарушений, поэтому обнаружение микроРНК-маркеров данного состояния является весьма актуальным. Два представителя семейства miR-25 и семейство miR-199 (miR-199a-3p и miR-199b-3p), экспрессия которых была активирована в результате эксперимента, тоже имеют связь с диабетом, но в случае диабета их экспрессия подавляется [73, 75]. Семейство miR-199 участвует в синтезе или деградации белков скелетных мышц и может быть связано с зависимой от постельного режима мышечной атрофией [72]. Семейство miR-25 в основном имеет гены-мишени, связанные с метаболизмом кальция (SERCA, ATP2A2) и ангиогенезом (VEGF, CD31 и Tie2), ингибирование экспрессии этих микроРНК увеличивает сократимость сердца [76]. После 12 недель регулярных тренировок, ориентированных на выносливость, уровни циркулирующих микроРНК семейства miR-25 снижаются [61].

Хотя вышеприведенные данные нуждаются в дальнейшем подтверждении, сложная сеть различных изменений профиля микроРНК в крови и тканях демонстрирует, что эти малые молекулы играют ключевую роль в регуляции физиологического ответа на различные физические нагрузки [77].

4. Важность преаналитической фазы в спортивной медицине

При считывании аналитических результатов важно учитывать изменчивость параметра у одного и того же индивидуума (суточную, сезонную и др.), а также изменчивость параметра между индивидуумами [78]. Вариативность экспрессии микроРНК еще до конца не изучена и не стандартизирована. Разными методами с разной чувствительностью исследователи получают широкий диапазон трудно сопоставимых результатов в абсолютном выражении. Более того, сопоставимость результатов еще более затрудняется из-за отсутствия общепризнанного механизма обработки данных, который можно было бы использовать для нормализации данных, как обсуждалось выше [79].

Ошибки в преаналитической фазе приводят к основной части неверных лабораторных результатов [80–82]. В спортивной медицине преаналитические проблемы ощущаются еще больше, чем в обычной лабораторной медицине. Помимо вопросов, связанных с идентификацией образцов [83, 84], собранных вне стационара, физическая активность, сама по себе является преаналитической переменной, причем прочно связанной с другими переменными, возможно, влияющими на анализируемые показатели, такими как напряженность тренировки,

диета (или голодание [85]) и состояние гидратации/дегидратации организма спортсмена [86].

Процедура флеботомии сама по себе является источником вариаций, особенно при ее проведении вне медицинских кабинетов, как часто бывает при взятии крови у спортсменов. В такой ситуации простые действия, на которые часто не обращают внимание при взятии проб, могут серьезно модифицировать аналитический выход. Например, Lima-Oliveira и соавт. продемонстрировали, что сжатый или расслабленный кулак во время взятия крови приводили к изменению концентраций 8 из 26 аналитов, которые в основном связаны с сокращением мышц (электролиты, мышечные ферменты) и гемолизом (свободный гемоглобин) [87].

Гемолиз остается значимым фактором при выполнении исследований в пробах крови и вне зависимости от причины возникновения является основным критерием отбраковки образцов для проведения исследования в клинической лабораторной диагностике. При гемолизе из разрушенных эритроцитов в плазму попадают внутриклеточные микроРНК, которые смещают профиль обнаруживаемых при исследовании свободно циркулирующих микроРНК [88].

Даже наложение жгута должно быть стандартизировано, как указано в документе [89]. Он вызывает венозный стазис, который способствует выходу водной фракции, диффузных ионов и низкомолекулярных веществ из сосуда. Концентрация различных аналитов в крови увеличивается на пунктированном участке, что искажает результат анализа [90]. Часто недооцениваются другие фундаментальные источники варибельности результатов: выбор анализируемой матрицы (сыворотка, плазма или цельная кровь), время между взятием крови и первичной обработкой образца (центрифугированием для получения сыворотки или плазмы), длительность и температура хранения образца — многие из этих параметров требуют валидации согласно техническим документам WADA [91]. Задержка в первичной обработке образца (например, отделение плазмы от клеток крови) может быть фундаментальной переменной при определении нестабильных соединений [92, 93] и причиной незаметного глазу частичного гемолиза, а выбор матрицы для определения аналита может повлиять на выход более стабильных маркеров [94, 95].

Технический прогресс и увеличивающиеся знания о роли микроРНК в организме делают их возможными инструментами будущего для использования в антидопинговых целях [96]. Примером использования в допинг-контроле может быть определение профиля микроРНК как части биологического паспорта спортсмена, при чтении которого необходимо учитывать повседневную жизнь спортсмена [97, 98], возможные (и очень многие) модифицирующие факторы, зависящие от конкретного субъекта и образа жизни, как упоминалось выше. Все это следует учитывать при определении микроРНК, присутствующих в пробах крови в очень низких концентрациях [77].

5. Особенности определения циркулирующих микроРНК

Как уже было сказано выше, одной из ключевых особенностей биомаркеров должна быть относительная доступность и минимальная инвазивность при отборе образца для определения данного биомаркера.

Присутствующие практически во всех жидкостях организма (в крови, в слюне, в моче и др.) микроРНК полностью удовлетворяют этому требованию. Тем не менее, в отличие от тканей и клеток, различные биологические жидкости содержат микроРНК в более низких концентрациях [99].

Циркулирующие микроРНК имеют разное происхождение: они могут высвобождаться из разрушенных клеток, могут активно секретироваться в макро-везикулах или в ассоциации с РНК-связывающим белком и липопротеинами высокой плотности (ЛПВП). Циркулирующие микроРНК также могут быть связаны с другими РНК-связывающими белками, такими как Ago2 и нуклеофозмин-1 (NPM-1) [100]. С макро-везикулами ассоциирована меньшая часть циркулирующих микроРНК, большая часть (до 90 %) связана с Ago2 и образует комплекс Ago2-miRNA, который обладает высокой устойчивостью к протеазам [101, 102]. Концентрация микроРНК в плазме оценивалась с помощью количественной ПЦР в различных исследованиях, результаты которых сильно различаются. Nefzawy и соавт. обнаружили концентрации от 1 до 10 мкг/л [103], в то время как Weber и соавт. сообщали о 308 мкг/л в той же матрице [1]. Важно отметить, что эта изменчивость считается физиологической у здоровых людей [104, 105]. Следовательно, любые контролируемые и неконтролируемые вариации во взятии и обработке образцов крови будут влиять на результаты анализа экспрессии микроРНК [106].

Флеботомия сама по себе является потенциальной причиной попадания в пробирку для забора крови микроРНК из клеток эндотелия сосудов и тканей, окружающих сосуды [105, 106]. Загрязнению способствуют игла для взятия крови, точнее клетки, присутствующие в кожной пробке в игле [105] и гемолиз [107]. Поскольку концентрация микроРНК в клетках в несколько раз выше, чем свободно циркулирующих в крови, сигнал, полученный от контаминантов, может легко увеличивать или маскировать сигнал, исходящий от циркулирующих микроРНК. Кроме того, микроРНК может высвобождаться тромбоцитами во время коагуляции [107, 108]. В этом последнем случае использование отношения ΔCT miR-23a-to-miR-451 может быть полезным для проверки событий микрогемолиза, так как ранее было показано, что уровень обнаруживаемой miR-23a практически не меняется в гемолизной плазме/сыворотке, в то время как miR-451 специфична для эритроцитов, и ее уровень в пробе с гемолизом значительно возрастает [109].

Выбор правильной матрицы последующего анализа образцов с помощью обратной транскрипции и ПЦР является сложной задачей при поиске новых биомаркеров, и с практической точки зрения, имеет очень важные последствия для конечного результата, т.е. аналитического выхода [110, 111].

Chen и соавт. продемонстрировали, что микроРНК в сыворотке стабильны, определение уровней их экспрессии возможно и сами уровни экспрессии микроРНК приблизительно одинаковы среди индивидуумов одного и того же вида [39], в то время как Mitchell и соавт. продемонстрировали аналогичные результаты при анализе циркулирующих микроРНК в плазме [104]. При анализе экспрессии микроРНК в плазме крайне важным является выбор антикоагулянта (гепарин, калиевые соли этилендиаминотетрауксусной кислоты (K2/K3 EDTA), цитрат натрия или фторид натрия/оксалат калия (NaF/КОх)) для сбора образцов. Поскольку гепарин [112, 113], как и цитрат, мешает ферментативной активности полимеразы в анализах на основе ПЦР, оба они не рекомендуются для количественного определения микроРНК [36]. ЭДТА является лучшим антикоагулянтом для профилирования микроРНК в исследованиях на основе ПЦР [114]. Плазма, собранная в пробирки с NaF/КОх, считается подходящей альтернативой ЭДТА-плазме, но в ней могут быть детектированы избыточные микроРНК [115]. В одной из работ Kim и его коллеги сравнили пробирки Vacutainer (Becton Dickinson, Inc.), содержащие ЭДТА, гепарин, цитрат натрия, NaF/КОх или не содержащие антикоагулянт (сыворотка), и измерили содержание микроРНК с помощью количественной ПЦР. Плазма с гепарином показала самые низкие уровни miR-16 и miR-223, однако обработка гепариной плазмой иногда улучшала результаты. В сыворотке и ЭДТА-плазме miR-16 обнаруживалась на сопоставимых уровнях, которые были немного выше уровней в плазме с гепарином, в то время как в цитратной и в NaF/КОх-плазме выход был значительно выше. Напротив, miR-223 была обнаружена в более высоких концентрациях в ЭДТА и цитратной плазме и в ещё больших в NaF/КОх-плазме. Очень интересно, что при добавлении фторида натрия и оксалата калия к замороженным образцам, сыворотки или плазмы с ЭДТА, уровни miR-16 удваивались в плазме с ЭДТА и утраивались в сыворотке [115]. Сводная информация об обнаружении микроРНК в различных матрицах образцов представлена в таблице 1.

Ранее считалось, что микроРНК стабильнее, чем мРНК, поскольку не подвергаются эндогенной деградации РНКазами благодаря небольшой длине [104]. Более поздние наблюдения продемонстрировали восприимчивость синтетических микроРНК к расщеплению РНКазами, а их относительная стабильность была приписана инкапсуляции в везикулы, покрытые мембраной (например, экзосомы). Однако ещё позже было выяснено, что только небольшое количество циркулирующих микроРНК связано с экзосомами, в основном

Таблица 1

Влияние матрицы образца на определение циркулирующих микроРНК (взято из статьи [116])

Table 1

Influence of the sample matrix on the determination of circulating microRNAs (taken from [116])

Матрица образца	Влияние на микроРНК	Ссылка
Плазма / ЭДТА	ЭДТА — лучший антикоагулянт для профилирования микроРНК с помощью ПЦР. Обнаружены самые высокие концентрации miR-223 в сравнении с другими матрицами	[114] [115]
Плазма / гепарин	Гепарин мешает работе ферментов (ДНК-полимеразе) в методах на основе ПЦР. Самые низкие уровни miR-16 и miR-223	[36] [115]
Плазма с NaF/КОх	Подходящая альтернатива ЭДТА, но может приводить к избыточному (ложному) определению микроРНК	[115]
Плазма с цитратом Na	Цитрат Na снижает ферментативную активность ДНК-полимеразы в методах анализа на основе ПЦР	[36]
Сыворотка	Результаты стабильны и воспроизводимы	[39]

же они связаны с рибонуклеопротеидным комплексом Ago2 [101]. Было высказано предположение, что именно этот комплекс обеспечивает определенную степень защиты микроРНК [117]. Однако, несмотря на защиту, обеспечиваемую ассоциацией с белками, стабильность циркулирующих микроРНК все же зависит от условий хранения [77].

После отбора проб циркулирующие микроРНК проявляют относительную стабильность в биологических жидкостях до 24 часов при комнатной температуре [104]. Это делает их использование выгодным в спортивной медицине, когда пробы, собранные в полевых условиях, должны быть доставлены в лабораторию и проанализированы максимум в течение 60 часов согласно рекомендациям ВАДА для антидопингового тестирования [91]. Более того, воздействие растворов с низким и высоким рН, повторяющиеся циклы замораживания и оттаивания, по-видимому, не ставят под угрозу стабильность микроРНК в сыворотке [39]. Однако поскольку, с одной стороны, количество вновь обнаруженных микроРНК постоянно растет, а с другой стороны, только ограниченное количество микроРНК было протестировано на их стабильность, рекомендуется минимизировать преаналитические отклонения от установленных стандартов [106].

Время до центрифугирования, а также скорость центрифугирования критически влияют на конечную концентрацию микроРНК в образцах ЭДТА-плазмы, так как это может вызвать контаминацию микроРНК, выходящими из тромбоцитов [106]. В этом контексте анализ экспрессии микроРНК в сыворотке менее чувствителен к вариациям предварительной обработки [36].

Наконец, надлежащее хранение при низкой температуре (т.е. ниже -70°C) позволяет сохранять высокое качество образцов и получать надежные данные даже из ретроспективных исследований, продолжающихся десятилетия [114].

6. Высота над уровнем моря

Тренировки в условиях среднегорья и высокогорья широко используются элитными спортсменами, тренерами и спортивными организациями как один из ключевых компонентов тренировочных схем. Основная концепция их заключается в том, что гипоксия, возникающая в условиях разреженного воздуха высокогорья, стимулирует выработку эритроцитов за счет индукции синтеза гормона эритропоэтина (ЭПО) и, таким образом, увеличивает общую кислородную емкость крови.

Влияние гипоксии на экспрессию микроРНК продемонстрировано как *in vitro*, так и *in vivo*. Например, в клеточной линии НТ-29 карциномы толстой кишки человека гипоксия влияла на модуляцию 53 микроРНК из 640 протестированных, из которых у 28 экспрессия была активирована, а у 25 подавлена. Десять из этих микроРНК были известны как реагирующие на гипоксию (т.е. miR-23a, miR-23b, miR-27b, miR-30d, miR-191, miR-210, miR-213, miR-155, miR-200a, miR-181b) [118].

У четырех альпинистов, участвовавших в экспедиции на гору Шишабангма в Центральных Гималаях (8027 м), отбирали кровь для изучения динамических изменений профилей микроРНК на четырех различных этапах восхождения [119]. В результате исследований была отмечена активация экспрессии ряда микроРНК miR-629, miR-1308, miR-124 и miR-320c, а miR-33b, miR-301a, miR-142-3p, miR-21* и, напротив, зафиксировано снижение экспрессии miR-487b на экстремальной высоте по сравнению с уровнем этих микроРНК на меньших высотах. Принимая во внимание большое количество и высокую значимость генов-мишеней, miR-124, miR-320b/c/d, miR-340 и miR-142-3p, по всей видимости, являются важными регуляторами генных сетей, участвующих в усилении дифференцировки и созревании эритроцитов из гемопоэтических стволовых клеток, функционировании рибосом, создании цитоскелета и процессах защиты от патогенов. В соответствии с их регулирующей ролью

микроРНК преимущественно нацелены на факторы транскрипции, а не непосредственно на гены, указывая тем самым, что они могут регулировать экспрессию генов косвенно в ответ на гипоксию, возникающую на экстремальной высоте [119].

Yan и соавт. [120] сравнивали профили циркулирующих микроРНК среди коренных тибетцев, адаптированных к жизни на высоте (около 3560 м), мигрантов из числа народности хань, позднее прибывших в Тибет, и китайцев из числа хань, живущих на равнине. В результате было идентифицировано 172 микроРНК, дифференциально экспрессирующихся у тибетской и китайской хань (105 активированы и 67 подавлены). Также были обнаружены значительные изменения в экспрессии микроРНК у тибетцев и китайцев-хань. Восемь из этих микроРНК были достоверно связаны с гипоксией, другие — с продукцией фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), сигнальными путями, участвующими в продукции ЭПО и мегакариоцитопозе.

К сожалению, пока не опубликовано никаких исследований, связанных с влиянием высоты на профиль экспрессии микроРНК у профессиональных спортсменов или их связи с возможными изменениями производительности в спорте в условиях высокогорья.

Состав и количество циркулирующих микроРНК в значительной степени зависят от физической активности, и, следовательно, они могут использоваться для мониторинга реакции на определенные режимы тренировочной нагрузки в качестве маркеров производительности или диагностических инструментов раннего выявления патофизиологических состояний. На данный момент эти возможные приложения являются очевидными, но еще не применимыми, поскольку из-за

относительной новизны этой области опубликованные исследования все еще дают сравнительно общий обзор того, как микроРНК реагируют на определяемое состояние или вмешательство.

Важно отметить, что стандартизированные протоколы для выделения и количественного определения циркулирующих микроРНК отсутствуют, что делает сравнения результатов между различными научными работами чрезвычайно трудоемкими. Переменные на преаналитическом этапе, такие как использование плазмы с различными антикоагулянтами, время с момента предыдущей тренировки, диета, условия тренировок, еще больше усложняют эту ситуацию, особенно у спортсменов. В нашей статье подчеркивается важность всестороннего учета преаналитических факторов, используемых при публикации результатов исследований микроРНК для того чтобы другие могли воспроизводить те же эксперименты и валидировать свои результаты, а также необходимо учитывать высокую вариабельность результатов внутри и между анализами при количественном определении циркулирующих микроРНК. Кроме того, когда мы говорим об исследованиях, проводимых на спортсменах, в них часто принимает участие лишь их ограниченное количество. Необходимы дополнительные крупномасштабные исследования для выявления связи между изменением уровней циркулирующих микроРНК в ответ на физические нагрузки, учитывая влияние типа нагрузки, ее продолжительности, интенсивности и результативности конкретной схемы тренировок. Если в ближайшее время будут открыты лежащие в основе этой связи молекулярные механизмы, это откроет дверь к новым, более эффективным персонализированным стратегиям контроля и управления тренировочным процессом.

Вклад авторов:

Постников Павел Викторович — утверждение финальной версии статьи, написание текста статьи, сбор и анализ литературных данных, редактирование статьи.

Пронина Ирина Валерьевна — написание текста статьи, сбор и анализ литературных данных, редактирование статьи и рисунков

Authors' contributions:

Pavel V. Postnikov — approval of the final version of the article, text preparation, collection and analysis of literature data, editing

Irina V. Pronina — text preparation, collection and analysis of literature data, article and pictures editing

References

1. Weber J.A., Baxter D.H., Zhang S., Huang D.Y., Huang K.H., Lee M.J., Galas D.J., Wang K. The micro RNA spectrum in 12 body fluids. *Clin. Chem.* 2010;56(11):1733–1741. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2010.147405>
2. Liang H., Gong F., Zhang S., Zhang C.Y., Zen K., Chen X. The origin, function, and diagnostic potential of extracellular microRNAs in human body fluids. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA.* 2014; 5(2): 285–300. <https://doi.org/10.1002/wrna.1208>
3. Fazmin I. T., Achercouk Z., Edling C. E., Said A., Jeevaratnam K. Circulating microRNA as a Biomarker for Coronary Artery Disease. *Biomolecules.* 2020;10(10):1354. <https://doi.org/10.3390/biom10101354>
4. Mumford S.L., Towler B.P., Pashler A.L., Gilleard O., Martin Y., Newbury S.F. Circulating MicroRNA Biomarkers in Melano-

ma: Tools and Challenges in Personalised Medicine. *Biomolecules.* 2018;8(2):21. <https://doi.org/10.3390/biom8020021>

5. Butz H., Patócs A. MicroRNAs in endocrine tumors. *EJIF-CC.* 2019;30(2):146–164.

6. do Amaral A.E., Cisilotto J., Creczynski-Pasa T.B., de Lucca Schiavon L. Circulating miRNAs in nontumoral liver diseases. *Pharmacol. Res.* 2018;128:274–287. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2017.10.002>

7. Felekis K., Papaneophytou C. Challenges in Using Circulating Micro-RNAs as Biomarkers for Cardiovascular Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* 2020;21(2):561. <https://doi.org/10.3390/ijms21020561>

8. Hüttenhofer A., Mayer G. Circulating miRNAs as biomarkers of kidney disease. *Clin. Kidney J.* 2017;10(1):27–29. <https://doi.org/10.1093/ckj/sfw075>

9. Grillari J., Mäkitie R. E., Kocijan R., Haschka J., Vázquez D.C., Semmelrock E., Hackl M. Circulating miRNAs in bone health

and disease. *Bone*. 2021;145:115787. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2020.115787>

10. **Xie F, Liu Y.-L., Chen X.-Y., Li Q., Zhong J., Dai B.-Y., Shao X.-F., Wu G.-B.** Role of MicroRNA, LncRNA, and Exosomes in the Progression of Osteoarthritis: A Review of Recent Literature. *Orthop. Surg.* 2020;12(3):708–716. <https://doi.org/10.1111/os.12690>

11. **Tiwari A., Mukherjee B., Dixit M.** MicroRNA Key to Angiogenesis Regulation: MiRNA Biology and Therapy. *Curr. Cancer Drug Targets*. 2018;18(3):266–277. <https://doi.org/10.2174/1568009617666170630142725>

12. **Mahesh G., Biswas R.** MicroRNA–155: A Master Regulator of Inflammation. *J. Interferon. Cytokine Res.* 2019;39(6):321–330. <https://doi.org/10.1089/jir.2018.0155>

13. **Kamity R., Sharma S., Hanna N.** MicroRNA–Mediated Control of Inflammation and Tolerance in Pregnancy. *Front Immunol.* 2019;10:718. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00718>

14. **Pfaff N., Moritz T., Thum T., Cantz T.** miRNAs involved in the generation, maintenance, and differentiation of pluripotent cells. *J. Mol. Med.* 2012;90(7):747–752. <https://doi.org/10.1007/s00109-012-0922-z>

15. **Cheng A.M., Byrom M.W., Shelton J., Ford L.P.** Antisense inhibition of human miRNAs and indications for an involvement of miRNA in cell growth and apoptosis. *Nucleic Acids Res.* 2005;33(4):1290–1297. <https://doi.org/10.1093/nar/gki200>

16. **Baggish A.L., Hale A., Weiner R.B., Lewis G.D., Systrom D., Wang F., Wang T.J., Chan S.Y.** Dynamic regulation of circulating microRNA during acute exhaustive exercise and sustained aerobic exercise training. *J. Physiol.* 2011;589(Pt 16):3983–3994. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.213363>

17. **Yin X., Cui S., Li X., Li W., Lu Q.J., Jiang X.H., Wang H., Chen X., Ma J.Z.** Regulation of Circulatory Muscle–specific MicroRNA during 8 km Run. *Int. J. Sports Med.* 2020; 41(9):582–588. <https://doi.org/10.1055/a-1145-3595>

18. **Caria A.C.I., Nonaka C.K. V., Pereira C.S., Soares M.B.P., Macambira S. G., de Freitas Souza B. S.** Exercise Training–Induced Changes in MicroRNAs: Beneficial Regulatory Effects in Hypertension, Type 2 Diabetes, and Obesity. *Int. J. Mol. Sci.* 2018;19(11):3608. <https://doi.org/10.3390/ijms19113608>

19. **Bandara K.V., Michael M.Z., Gleadle J.M.** MicroRNA Biogenesis in Hypoxia. *Microna*. 2017;6(2):80–96. <https://doi.org/10.2174/2211536606666170313114821>

20. **Crosby M.E., Devlin C.M., Glazer P.M., Calin G.A., Ivan M.** Emerging roles of microRNAs in the molecular responses to hypoxia. *Curr. Pharm. Des.* 2009;15(33):3861–3866. <https://doi.org/10.2174/138161209789649367>

21. **Zhao J., Florentin J., Tai Y.-Y., Torrino S., Ohayon L., Brzoska T., et al.** Long Range Endocrine Delivery of Circulating miR–210 to Endothelium Promotes Pulmonary Hypertension. *Circ. Res.* 2020;127(5):677–692. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.119.316398>

22. **Binderup H.G., Madsen J.S., Heegaard N.H.H., Houliand K., Andersen R.F., Brasen C.L.** Quantification of microRNA levels in plasma — Impact of preanalytical and analytical conditions. *PLoS One*. 2018;13(7):e0201069. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201069>

23. **Lee R.C., Feinbaum R.L., Ambros V.** The C. elegans heterochronic gene lin–4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin–14. *Cell*. 1993;75(5):843–854. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90529-y](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90529-y)

24. **Lagos-Quintana M., Rauhut R., Lendeckel W., Tuschl T.** Identification of novel genes coding for small expressed RNAs.

Science. 2001;294(5543):853–858. <https://doi.org/10.1126/science.1064921>

25. **Reinhart B.J., Weinstein E.G., Rhoades M.W., Bartel B., Bartel D.P.** MicroRNAs in plants. *Genes Dev.* 2002;16(13):1616–1626. <https://doi.org/10.1101/gad.1004402>

26. **Grundhoff A., Sullivan C.S.** Virus–encoded microRNAs. *Virology*. 2011;411(2):325–343. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2011.01.002>

27. **Griffiths-Jones S., Grocock R.J., van Dongen S., Bateman A., Enright A.J.** miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res.* 2006;34:140–144. <https://doi.org/10.1093/nar/gkj112>

28. **Kim V.N., Nam J.W.** Genomics of microRNA. *Trends Genet.* 2006;22(3):165–173. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2006.01.003>

29. **Ghorai A., Ghosh U.** miRNA gene counts in chromosomes vary widely in a species and biogenesis of miRNA largely depends on transcription or post–transcriptional processing of coding genes. *Front. Genet.* 2014;5:100. <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00100>

30. **Lujambio A., Calin G.A., Villanueva A., Ropero S., Sanchez-Cespedes M., Blanco D., et al.** A microRNA DNA methylation signature for human cancer metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2008;105(36):13556–13561. <https://doi.org/10.1073/pnas.0803055105>

31. **Hammond S.M.** An overview of microRNAs. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2015;87:3–14. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.05.001>

32. **Bernstein E., Kim S.Y., Carmell M.A., Murchison E.P., Alcorn H., Li M.Z., et al.** Dicer is essential for mouse development. *Nat. Genet.* 2003;35(3):215–217. <https://doi.org/10.1038/ng1253>

33. **Suh M.R., Lee Y., Kim J.Y., Kim S.K., Moon S.H., Lee J.Y., et al.** Human embryonic stem cells express a unique set of microRNAs. *Dev. Biol.* 2004;270(2):488–498. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.02.019>

34. **Murchison E.P., Partridge J.F., Tam O.H., Cheloufi S., Hannon G.J.** Characterization of Dicer-deficient murine embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2005;102(34):12135–12140. <https://doi.org/10.1073/pnas.0505479102>

35. **Morrow D.A., de Lemos J.A.** Benchmarks for the assessment of novel cardiovascular biomarkers. *Circulation*. 2007;115(8):949–952. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.683110>

36. **Hackl M., Heilmeier U., Weilner S., Grillari J.** Circulating microRNAs as novel biomarkers for bone diseases — complex signatures for multifactorial diseases? *Mol. Cell. Endocrinol.* 2016;432:83–95. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2015.10.015>

37. **Mestdagh P., Hartmann N., Baeriswyl L., Andreasen D., Bernard N., Chen C., et al.** Evaluation of quantitative miRNA expression platforms in the microRNA quality control (miRQC) study. *Nat. Methods*. 2014;11(8):809–815. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3014>

38. **Nelson P.T., Wang W.X., Wilfred B.R., Tang G.** Technical variables in high throughput miRNA expression profiling: much work remains to be done. *Biochim. Biophys. Acta*. 2008;1779(11):758–765. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2008.03.012>

39. **Chen X., Ba Y., Ma L., Cai X., Yin Y., Wang K., et al.** Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res.* 2008;18(10):997–1006. <https://doi.org/10.1038/cr.2008.282>

40. **Takahashi K., Yokota S., Tatum N., Fukami T., Yokoi T., Nakajima M.** Cigarette smoking substantially alters plasma microRNA profiles in healthy subjects. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2013;272(1):154–160. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2013.05.018>

41. **Witwer K.W.** XenomiRs and miRNA homeostasis in health and disease: evidence that diet and dietary miRNAs direct-

- ly and indirectly influence circulating miRNA profiles. *RNA Biol.* 2012;9(9):1147–1154. <https://doi.org/10.4161/rna.21619>
42. **Shende V.R., Goldrick M.M., Ramani S., Earnest D.J.** Expression and rhythmic modulation of circulating microRNAs targeting the clock gene *Bmal1* in mice. *PLoS One.* 2011;6(7):e22586. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022586>
 43. **Neal C.S., Michael M.Z., Pimlott L.K., Yong T.Y., Li J.Y., Gleadle J.M.** Circulating microRNA expression is reduced in chronic kidney disease. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2011;26(11):3794–3802. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfr485>
 44. **Wang J., Chen J., Sen S.** MicroRNA as biomarkers and diagnostics. *J. Cell. Physiol.* 2016;231(1):25–30. <https://doi.org/10.1002/jcp.25056>
 45. **Ardekani A.M., Naeini M.M.** The role of microRNAs in human diseases. *Avicenna J. Med. Biotechnol.* 2010;2(4):161–179.
 46. **Lu J., Getz G., Miska E.A., Alvarez-Saavedra E., Lamb J., Peck D., Sweet-Cordero A., Ebert B. L., Mak R. H., Ferrando A. A., Downing J. R., Jacks T., Horvitz H. R., Golub T. R.** MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature.* 2005;435(7043):834–838. <https://doi.org/10.1038/nature03702>
 47. **Butz H., Patocs A.** Technical aspects related to the analysis of circulating microRNAs. In: *Circulating microRNAs in disease diagnostics and their potential biological relevance.* Basel: Springer; 2015, p. 51–71. https://doi.org/10.1007/978-3-0348-0955-9_3
 48. **Lombardi G., Sanchis-Gomar F., Perego S., Sansoni V., Banfi G.** Implications of exercise-induced adipo-myokines in bone metabolism. *Endocrine.* 2016;54(2):284–305. <https://doi.org/10.1007/s12020-015-0834-0>
 49. **Russell A.P., Hesselink M.K., Lo S.K., Schrauwen P.** Regulation of metabolic transcriptional co-activators and transcription factors with acute exercise. *FASEB J.* 2005;19(8):986–988. <https://doi.org/10.1096/fj.04-3168fje>
 50. **Banfi G., Colombini A., Lombardi G., Lubkowska A.** Metabolic markers in sports medicine. *Adv. Clin. Chem.* 2012;56:1–54. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-394317-0.00015-7>
 51. **Güller I., Russell A.P.** MicroRNAs in skeletal muscle: their role and regulation in development, disease and function. *J. Physiol.* 2010;588(Pt 21):4075–4087. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.194175>
 52. **Ai J., Zhang R., Li Y., Pu J., Lu Y., Jiao J.** Circulating microRNA-1 as a potential novel biomarker for acute myocardial infarction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2010;391(1):73–77. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.11.005>
 53. **McCarthy J.J., Esser K.A.** MicroRNA-1 and microRNA-133a expression are decreased during skeletal muscle hypertrophy. *J. Appl. Physiol.* 2007;102(1):306–313. <https://doi.org/10.1152/jap-physiol.00932.2006>
 54. **Wardle S.L., Bailey M.E.S., Kilikevicius A., Malkova D., Wilson R.H., Venckunas T., Moran C.N.** Plasma microRNA levels differ between endurance and strength athletes. *PLoS One.* 2015;10(4):e0122107. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122107>
 55. **Widmann M., Nieß A.M., Munz B.** Physical Exercise and Epigenetic Modifications in Skeletal Muscle. *Sports Med.* 2019;49(4):509–523. <https://doi.org/10.1007/s40279-019-01070-4>
 56. **Polakovičová M., Musil P., Laczó E., Hamar D., Kyselovič J.** Circulating MicroRNAs as Potential Biomarkers of Exercise Response. *Int. J. Mol. Sci.* 2016;17(10):1553. <https://doi.org/10.3390/ijms17101553>
 57. **Silva G.J.J., Bye A., El Azzouzi H., Wisløff U.** MicroRNAs as Important Regulators of Exercise Adaptation. *Prog. Cardiovasc. Dis.* 2017;60(1):130–151. <https://doi.org/10.1016/j.pcad.2017.06.003>
 58. **Xu T., Liu Q., Yao J., Dai Y., Wang H., Xiao J.** Circulating microRNAs in response to exercise. *Scand. J. Med. Sci. Sports.* 2015;25(2):149–154. <https://doi.org/10.1111/sms.12421>
 59. **Russell A.P., Lamon S.** Exercise, skeletal muscle and circulating microRNAs. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 2015;135:471–496. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2015.07.018>
 60. **Aoi W., Ichikawa H., Mune K., Tanimura Y., Mizushima K., Naito Y., Yoshikawa T.** Muscle enriched microRNA miR-486 decreases in circulation in response to exercise in young men. *Front. Physiol.* 2013;4:80. <https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00080>
 61. **Nielsen S., Akerstrom T., Rinnov A., Yfanti C., Scheele C., Pedersen B.K., Laye M.J.** The miRNA plasma signature in response to acute aerobic exercise and endurance training. *PLoS One.* 2014;9(2):e87308. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087308>
 62. **Mooren F.C., Viereck J., Kruger K., Thum T.** Circulating microRNAs as potential biomarkers of aerobic exercise capacity. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2014;306(4):H557–H563. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00711.2013>
 63. **Baggish A.L., Park J., Min P.K., Isaacs S., Parker B.A., Thompson P.D., et al.** Rapid upregulation and clearance of distinct circulating microRNAs after prolonged aerobic exercise. *J. Appl. Physiol.* 2014;116(5):522–531. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.01141.2013>
 64. **Radom-Aizik S., Zaldivar Jr F., Leu S.Y., Adams G.R., Oliver S., Cooper D.M.** Effects of exercise on microRNA expression in young males peripheral blood mononuclear cells. *Clin. Transl. Sci.* 2012;5(1):32–38. <https://doi.org/10.1111/j.1752-8062.2011.00384.x>
 65. **Drummond M.J., McCarthy J.J., Fry C.S., Esser K.A., Rasmussen B.B.** Aging differentially affects human skeletal muscle microRNA expression at rest and after an anabolic stimulus of resistance exercise and essential amino acids. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2008;295(6):E1333–E1340. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.90562.2008>
 66. **Xu J., Lombardi G., Jiao W., Banfi G.** Effects of exercise on bone status in female subjects, from young girls to postmenopausal women: an overview of systematic reviews and meta-analyses. *Sports Med.* 2016;46(8):1165–1182. <https://doi.org/10.1007/s40279-016-0494-0>
 67. **Qi Z., Liu W., Lu J.** The mechanisms underlying the beneficial effects of exercise on bone remodeling: roles of bone-derived cytokines and microRNAs. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 2016;122(2):131–139. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2016.05.010>
 68. **Gamez B., Rodriguez-Carballo E., Ventura F.** MicroRNAs and post-transcriptional regulation of skeletal development. *J. Mol. Endocrinol.* 2014;52(3):R179–R197. <https://doi.org/10.1530/JME-13-0294>
 69. **Lombardi G., Sansoni V., Perego S., Vernillo G., Bonzanni M., Merati G.** Bone specific circulating miRNA profile changes over an 8-week repeated sprint training protocol. *Endocr. Abstr.* 2016;41:GP31. <https://doi.org/10.1530/endoabs.41.GP31>
 70. **Chen J., Qiu M., Dou C., Cao Z., Dong S.** MicroRNAs in bone balance and osteoporosis. *Drug Dev. Res.* 2015;76(5):235–245. <https://doi.org/10.1002/ddr.21260>
 71. **Seeliger C., Karpinski K., Haug A.T., Vester H., Schmitt A., Bauer J.S., van Griensven M.** Five freely circulating miRNAs and bone tissue miRNAs are associated with osteoporotic fractures. *J. Bone Miner. Res.* 2014;29(8):1718–1728. <https://doi.org/10.1002/jbmr.2175>
 72. **Rullman E., Mekjavic I.B., Fischer H., Eiken O.** PlanHab (planetary habitat simulation): the combined and separate effects of

21 days bed rest and hypoxic confinement on human skeletal muscle miRNA expression. *Physiol. Rep.* 2016;4(8):e12753. <https://doi.org/10.14814/phy2.12753>

73. **Bork-Jensen J., Scheele C., Christophersen D.V., Nilsson E., Friedrichsen M., Fernandez-Twinn D.S., et al.** Glucose tolerance is associated with differential expression of microRNAs in skeletal muscle: results from studies of twins with and without type 2 diabetes. *Diabetologia.* 2015;58(2):363–373. <https://doi.org/10.1007/s00125-014-3434-2>

74. **Alibegovic A.C., Sonne M.P., Hojbjerg L., Bork-Jensen J., Jacobsen S., Nilsson E., et al.** Insulin resistance induced by physical inactivity is associated with multiple transcriptional changes in skeletal muscle in young men. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2010;299(5):E752–E763. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00590.2009>

75. **Gallagher I.J., Scheele C., Keller P., Nielsen A.R., Remenyi J., Fischer C.P., et al.** Integration of microRNA changes in vivo identifies novel molecular features of muscle insulin resistance in type 2 diabetes. *Genome Med.* 2010;2(2):9. <https://doi.org/10.1186/gm130>

76. **Wahlquist C., Jeong D., Rojas-Munoz A., Kho C., Lee A., Mitsuyama S., et al.** Inhibition of miR-25 improves cardiac contractility in the failing heart. *Nature.* 2014;508(7497):531–535. <https://doi.org/10.1038/nature13073>

77. **Becker N., Lockwood C.M.** Pre-analytical variables in miRNA analysis. *Clin. Biochem.* 2013;46(10-11):861–868. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2013.02.015>

78. **Lombardi G., Lanteri P., Colombini A., Banfi G.** Blood biochemical markers of bone turnover: pre-analytical and technical aspects of sample collection and handling. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2012;50(5):771–789. <https://doi.org/10.1515/cclm-2011-0614>

79. **Mestdagh P., Van Vlierberghe P., DeWeer A., Muth D., Westermann F., Speleman F., Vandesompele J.** A novel and universal method for microRNA RT-qPCR data normalization. *Genome Biol.* 2009;10(6):R64. <https://doi.org/10.1186/gb-2009-10-6-r64>

80. **Bonini P., Plebani M., Ceriotti F., Rubboli F.** Errors in laboratory medicine. *Clin. Chem.* 2002;48(5):691–698.

81. **Lippi G., Guidi G.C., Mattiuzzi C., Plebani M.** Preanalytical variability: the darkside of the moon in laboratory testing. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2006;44(4):358–365. <https://doi.org/10.1515/CCLM.2006.073>

82. **Kavsak P.A.** What is in that sample? A pertinent question when assessing quality for patient laboratory results and beyond. *Clin. Biochem.* 2015;48(7-8):465–466. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2015.04.010>

83. **van Dongen-Lases E.C., Cornes M.P., Grankvist K., Ibarz M., Kristensen G.B., Lippi G., et al.** Patient identification and tube labelling — a call for harmonization. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2016;54(7):1141–1145. <https://doi.org/10.1515/cclm-2015-1089>

84. **Lippi G., Chance J.J., Church S., Dazzi P., Fontana R., Giavarina D., et al.** Preanalytical quality improvement: from dream to reality. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2011;49(7):1113–1126. <https://doi.org/10.1515/CCLM.2011.600>

85. **Supak-Smolcic V., Antoncic D., Ozanic D., Vladilo I., Bilic-Zulle L.** Influence of a prolonged fasting and mild activity on routine laboratory tests. *Clin. Biochem.* 2015;48(1-2):85–88. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2014.10.005>

86. **Banfi G., Dolci A.** Preanalytical phase of sport biochemistry and haematology. *J. Sports Med. Phys. Fitness.* 2003;43(2):223–230.

87. **Lima-Oliveira G., Guidi G.C., Salvagno G.L., Brocco G., Danese E., Lippi G.** Estimation of the imprecision on clinical

chemistry testing due to fist clenching and maintenance during venipuncture. *Clin. Biochem.* 2016;49(18):1364–1367. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2016.07.007>

88. **Bahtiyar N., Yoldas A., Abbak Y., Dariyerli N., Toplan S.** Erythroid microRNA and oxidant status alterations in l-thyroxine-induced hyperthyroid rats: effects of selenium supplementation. *Minerva Endocrinol. (Torino).* 2021;46(1):107–115. <https://doi.org/10.23736/S2724-6507.20.03154-5>

89. Quality Venipuncture Quick Guide Standard by Clinical and Laboratory Standards Institute [Internet]. Available from: https://www.techstreet.com/standards/clsi-h03-a6-quick-guide?product_id=1732666#jumps

90. **Lima-Oliveira G., Lippi G., Salvagno G.L., Montagnana M., Picheth G., Guidi G.C.** The effective reduction of tourniquet application time after minor modification of the CLSI H03–A6 blood collection procedure. *Biochem. Med.* 2013;23(3):308–315. <https://doi.org/10.11613/bm.2013.037>

91. WADA, The world anti-doping code: athlete biological passport operating guidelines and compilation of required elements [Internet]. Available from: https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/guidelines_abp_v8_final.pdf

92. **Lombardi G., Perego S., Luzi L., Banfi G.** A four-season molecule: osteocalcin. Updates in its physiological roles. *Endocrine.* 2015;48(2):394–404. <https://doi.org/10.1007/s12020-014-0401-0>

93. **Lanteri P., Lombardi G., Colombini A., Banfi G.** Vitamin D in exercise: physiologic and analytical concerns. *Clin. Chim. Acta.* 2013;415:45–53. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2012.09.004>

94. **Lombardi G., Banfi G.** Effects of sample matrix and storage conditions on fulllengthvisfat in measurement in blood. *Clin. Chim. Acta.* 2015;440:140–142. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2014.11.006>

95. **Lanteri P., Lombardi G., Colombini A., Grasso D., Banfi G.** Stability of osteopontin in plasma and serum. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2012;50(11):1979–1984. <https://doi.org/10.1515/cclm-2012-0177>

96. **Segura J., Lundby C.** Blood doping: potential of blood and urine sampling to detect autologous transfusion. *Br. J. Sports Med.* 2014;48(10):837–841. <https://doi.org/10.1136/bjsports-2014-093601>

97. **Lombardi G., Colombini A., Lanteri P., Banfi G.** Reticulocytes in sports medicine: an update. *Adv. Clin. Chem.* 2013;59:125–153. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-405211-6.00005-x>

98. **Banfi G., Lombardi G., Colombini A., Lippi G.** Analytical variability in sport hematology: its importance in an antidoping setting. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2011;49(5):779–782. <https://doi.org/10.1515/CCLM.2011.125>

99. **Jarry J., Schadendorf D., Greenwood C., Spatz A., van Kempen L.C.** The validity of circulating microRNAs in oncology: five years of challenges and contradictions. *Mol. Oncol.* 2014;8(4):819–829. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2014.02.009>

100. **Chen X., Liang H., Zhang J., Zen K., Zhang C.Y.** Secreted microRNAs: a new form of intercellular communication. *Trends Cell Biol.* 2012;22(3):125–132. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2011.12.001>

101. **Arroyo J.D., Chevillet J.R., Kroh E.M., Ruf I.K., Pritchard C.C., Gibson D.F.** Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2011;108(12):5003–5008. <https://doi.org/10.1073/pnas.1019055108>

102. **Li L., Zhu D., Huang L., Zhang J., Bian Z., Chen X., et al.** Argonaute 2 complexes selectively protect the circulating microRNAs in cell-secreted microvesicles. *PLoS One.* 2012;7(10):e46957. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046957>

103. El-Hefnawy T., Raja S., Kelly L., Bigbee W.L., Kirkwood J.M., Luketich J.D. Characterization of amplifiable, circulating RNA in plasma and its potential as a tool for cancer diagnostics. *Clin. Chem.* 2004;50(3):564–573. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2003.028506>
104. Mitchell P.S., Parkin R.K., Kroh E.M., Fritz B.R., Wyman S.K., Pogosova-Agadjanian E.L., et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2008;105(30):10513–10518. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804549105>
105. Kroh E.M., Parkin R.K., Mitchell P.S., Tewari M. Analysis of circulating microRNA biomarkers in plasma and serum using quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR). *Methods.* 2010;50(4):298–301. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2010.01.032>
106. Cheng H.H., Yi H.S., Kim Y., Kroh E.M., Chien J.W., Eaton K.D., et al. Plasma processing conditions substantially influence circulating microRNA biomarker levels. *PLoS One.* 2013;8(6):e64795. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064795>
107. Kirschner M.B., Kao S.C., Edelman J.J., Armstrong N.J., Valley M.P., van Zandwijk N., Reid G. Haemolysis during sample preparation alters microRNA content of plasma. *PLoS One.* 2011;6(9):e24145. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024145>
108. Willeit P., Zampetaki A., Dudek K., Kaudewitz D., King A., Kirkby N.S., et al. Circulating microRNAs as novel biomarkers for platelet activation. *Circ. Res.* 2013;112(4):595–600. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.300539>
109. Blondal T., Jensby Nielsen S., Baker A., Andreasen D., Mouritzen P., Wrang Teilm M., Dahlsveen I.K. Assessing sample and miRNA profile quality in serum and plasma or other biofluids. *Methods.* 2013;59(1):S1–S6. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2012.09.015>
110. Livesey J.H., Ellis M.J., Evans M.J. Pre-analytical requirements. *Clin. Biochem. Rev.* 2008;29(1):S11–S15.
111. Kavsak P.A., Hammett-Stabler C.A. Clinical biochemistry year in review — the clinical “good”, the analytical “bad”, and the “ugly” laboratory practices. *Clin. Biochem.* 2014;47(18):255–256. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2014.11.015>
112. Boeckel J.N., Thome C.E., Leistner D., Zeiher A.M., Fichtlscherer S., Dimmeler S. Heparin selectively affects the quantification of microRNAs in human blood samples. *Clin. Chem.* 2013;59(7):1125–1127. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2012.199505>
113. Garcia M.E., Blanco J.L., Caballero J., Gargallo-Viola D. Anticoagulants interfere with PCR used to diagnose invasive aspergillosis. *J. Clin. Microbiol.* 2002;40(4):1567–1568. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.4.1567-1568.2002>
114. Zampetaki A., Mayr M. Analytical challenges and technical limitations in assessing circulating miRNAs. *Thromb. Haemost.* 2012;108(4):592–598. <https://doi.org/10.1160/TH12-02-0097>
115. Kim D.J., Linnstaedt S., Palma J., Park J.C., Ntrivalas E., Kwak-Kim J.Y., et al. Plasma components affect accuracy of circulating cancer-related microRNA quantitation. *J. Mol. Diagn.* 2012;14(1):71–80. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2011.09.002>
116. Lombardi G., Perego S., Sansoni V., Banfi G. Circulating miRNA as fine regulators of the physiological responses to physical activity: Pre-analytical warnings for a novel class of biomarkers. *Clin. Biochem.* 2016;49(18):1331–1339. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2016.09.017>
117. Turchinovich A., Weiz L., Langheinz A., Burwinkel B. Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic Acids Res.* 2011;39(16):7223–7233. <https://doi.org/10.1093/nar/krk254>
118. Guimbellot J.S., Erickson S.W., Mehta T., Wen H., Page G.P., Sorscher E.J., Hong J. S. Correlation of microRNA levels during hypoxia with predicted target mRNAs through genome-wide microarray analysis. *BMC Med. Genet.* 2009;2:15. <https://doi.org/10.1186/1755-8794-2-15>
119. Chen F., Zhang W., Liang Y., Huang J., Li K., Green C.D., et al. Transcriptome and network changes in climbers at extreme altitudes. *PLoS One.* 2012;7(2):e31645. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031645>
120. Yan Y., Shi Y., Wang C., Guo P., Wang J., Zhang C.Y., Zhang C. Influence of a high altitude hypoxic environment on human plasma microRNA profiles. *Sci. Rep.* 2015;5:15156. <https://doi.org/10.1038/srep15156>

Информация об авторах:

Постников Павел Викторович, к.х.н., начальник отдела допингового контроля Национальной антидопинговой лаборатории (института) Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова (НАДЛ МГУ), 105005, Россия, Москва, Елизаветинский пер., 10, стр. 1. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3424-0582> (postnikov@dopingtest.ru)

Пронина Ирина Валерьевна, к.б.н., главный специалист отдела допингового контроля Национальной антидопинговой лаборатории (института) Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова (НАДЛ МГУ), 105005, Россия, Москва, Елизаветинский пер., 10, стр. 1; старший научный сотрудник лаборатории патогеномики и транскриптомики ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», 125315, Россия, Москва, ул. Балтийская, 8. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0423-7801> (pronina@dopingtest.ru)

Information about the authors:

Pavel V. Postnikov, Ph.D. (chemistry), the Head of Doping control Department of the National anti-doping laboratory (Institute) of Moscow State University named after M.V. Lomonosov (NADL MSU), 10, bulding 1, Elizavetinsky per., Moscow, 105005, Russia, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3424-0582> (postnikov@dopingtest.ru)

Irina V. Pronina, Ph.D. (biology), the main specialist of Doping control Department of the National anti-doping laboratory (Institute) of Moscow State University named after M.V. Lomonosov (NADL MSU), 10, bulding 1, Elizavetinsky per. Moscow, 105005, Russia, senior scientist of pathogenomic and transcriptomic Laboratory of the Federal State Budgetary Scientific Institution “Institute of General Pathology and Pathophysiology”, 8, Baltiyskaya str., Moscow, 125315, Russia, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0423-7801> (pronina@dopingtest.ru)

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author