

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

Tervete rasedate naiste kehavedelikest eraldatud mikroRNA-de profiil

Bakalaureusetöö

12 EAP

Galina Belova

Juhendaja MSc Rain Inno

Kaasjuhendajad MSc Timo Tõnis Sikka

PhD Maris Laan

TARTU 2020

INFOLEHT

„Tervete rasedate naiste kehavedelikest eraldatud mikroRNA-de profiil“

MikroRNA-de (miRNA-de) peamine eesmärk on reguleerida post-transkriptsiooniliselt geenide ekspressiooni kas translatsiooni inhibeerimise või mRNA degradeerimise kaudu. Erinevate kudede poolt produtseeritud ekstratsellulaarsed miRNA-d on leitavad kehavedelikes ning nende muutuva ekspressiooni tõttu saab neid kasutada mitteinvasiivsete biomarkeritena haiguste detekteerimisel. Platsenta kui rasedusaegne organ ekspresseerib samuti kindlas koguses miRNA-sid, mille ekspressioonitasemeid on võimalik jälgida ema vereringest. Hiljuti märkimisväärset panust mitteinvasiivsete biomarkerite väljatöötamisse on avaldanud uriinis ringlevad miRNA-d. Seetõttu antud bakalaureusetöö eesmärk on leida, kas tervete rasedate uriinis on olemas platsenta-spetsiifilised miRNA-d, mille kaudu oleks võimalik tulevikus mitteinvasiivselt tuvastada rasedusega kaasnevaid komplikatsioone.

Märksõnad: biomarker, mikroRNA, platsenta, uriin

CERCS kood: B220 Geneetika, tsütogeneetika; B790 Kliiniline geneetika

“Profile of microRNAs isolated from body fluids of healthy pregnant women”

Short non-coding RNAs, known as microRNAs (miRNAs), regulate gene expression at posttranscriptional level either by inhibiting the translation or degrading target mRNA. Extracellular miRNAs produced by various human tissues are found in numerous body fluids. As a result of being irregularly expressed, miRNAs can potentially be used as non-invasive biomarkers to detect different diseases. Developing and functioning only during pregnancy, placenta also expresses a certain amount of miRNAs with altered expression levels, which can be observed in mother's bloodstream. Urinary miRNAs have recently made a remarkable change in the application of non-invasive biomarkers, for instance the ability to identify kidney diseases. The aim of research of this bachelor's thesis is to discover urinary placenta-specific miRNAs, through which pregnancy and its complications can be detected by non-invasive methods in the future.

Keywords: biomarker, microRNA, placenta, urine

CERCS code: B220 Genetics, cytogenetics; B790 Clinical genetics

SISUKORD

SISUKORD	3
KASUTATUD LÜHENDID	5
SISSEJUHATUS	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	7
1.1. MikroRNA-d	7
1.1.1. MikroRNA-de sünteesirada	7
1.1.2. MikroRNA-de funktsioonid.....	9
1.1.3. MikroRNA-d kudedes ja kehavedelikes.....	10
1.1.3.1. Seerum	11
1.1.3.2. Uriin	12
1.1.4. MikroRNA-d kui biomarkerid	14
1.1.4.1. MikroRNA-de potentsiaal meditsiinis	14
1.1.4.2. Biomarkeri iseloomustus.....	14
1.1.4.3. MikroRNA-de kui biomarkeritega kaasnevad probleemid	15
1.2. Platsenta	15
1.2.1. Platsenta moodustumine.....	15
1.2.2. Platsenta areng ja küpsemine	18
1.2.3. Platsenta funktsioonid	18
1.3. Platsenta mikroRNA-d ja rasedus	19
1.3.1. Platsenta-spetsiifilised mikroRNA-d ja nende düsregulatsioon	19
1.3.2. Platsentaga seotud mikroRNA-de detekteerimine kehavedelikes	21
2. EKPERIMENTAALOSA	23
2.1. Töö eesmärk.....	23
2.2. Materjalid ja meetodika	24
2.2.1. Valimi kirjeldus.....	24
2.2.2. Proovide totaalse RNA eraldamine	26
2.2.2.1. Totaalse RNA eraldamine platsenta proovidest	27
2.2.2.2. Totaalse RNA eraldamine seerumi proovidest.....	27
2.2.2.3. Totaalse RNA eraldamine uriini proovidest.....	27
2.2.3. Uuritavad proovid	28
2.2.4. MikroRNA sekveneerimine.....	28

2.2.5. Andmete analüüs ja visualiseerimine	29
2.3. Tulemused	29
2.3.1. Eraldatud totaalse RNA kogused ja puhtus	29
2.3.2. Sekveneerimisest tuvastatud mikroRNA-d	30
2.3.3. Seerumis ja uriinis tuvastatavate platsenta-spetsiifiliste mikroRNA-de kirjeldus.....	32
2.4. Arutelu	35
2.4.1. Totaalse RNA eraldamise ja saadud tulemuste analüüs	35
2.4.2. Uriinist tuvastatavate platsenta-spetsiifiliste mikroRNA-de nimekirja koostamine....	36
2.4.3. Uriinis ringlevate mikroRNA-de profiili unikaalsus.....	37
2.4.4. Välja valitud mikroRNA-de ekspressioonide võrdlus rühmade järgi	37
2.4.5. Raseduse tuvastamine platsenta-spetsiifiliste mikroRNA-de abil	38
2.4.6. Tulevikuplaan	39
KOKKUVÕTE	40
SUMMARY	41
KASUTATUD KIRJANDUS	43
KASUTATUD VEEBIAADRESSID	54
LISAD	55
LIHTLITSENTS.....	57

KASUTATUD LÜHENDID

Ago	Argonaut valk
C14MC	Kromosoom 14 miRNA klaster (<i>chromosome 14 miRNA cluster</i>)
C19MC	Kromosoom 19 miRNA klaster (<i>chromosome 19 miRNA cluster</i>)
CPM	<i>Counts per million</i>
DGCR8	<i>DiGeorge syndrome chromosomal region 8</i>
EXP5	Tuuma ekspordifaktor eksportiin-5
Happy Pregnancy	Inimese viljakuse ja rasedusega seotud uute mitteinvasiivsete biomarkerite väljatöötamine (<i>Development of novel non-invasive biomarkers for fertility and healthy pregnancy</i>)
miRISC	MikroRNA-indutseeritud vaigistav kompleks (<i>miRNA induced silencing complex</i>)
miRNA	MikroRNA
NGS	Järgmise põlvkonna sekveneerimine
PCa	Eesnäärmevähk (<i>prostate cancer</i>)
PE	Preeklampsia
pri-miRNA	Primaarne mikroRNA
pre-miRNA	Prekursor mikroRNA
qPCR	Kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon
RISC	RNA indukseeritud vaigistav kompleks (<i>RNA induced silencing complex</i>)
RPM	Lugemid miljoni kohta (<i>reads per million</i>)
UMI	Ainulaadsed molekulaarindeksid (<i>unique molecular indices</i>)
UTR	Mittetransleeritav järjestus (<i>untranslated region</i>)

SISSEJUHATUS

MikroRNA-d (miRNA-d) on lühikesed mittekodeerivad RNA-d, mille kaudu reguleeritakse geeni ekspressiooni post-transkriptsioonilisel tasemel kas translatsiooni inhibeerimise või mRNA degradeerimise kaudu (Khan *et al.*, 2019). Paljud miRNA-d jäävad stabiilsetena ekstratsellulaarsete vesiikulite kujul, mis tähendab, et nende ekspressiooni saab määrata inimese kudedes ja kehavedelikes (Cava *et al.*, 2019; Salloum-Asfar *et al.*, 2019). Tänu uriinis kui inimorganismist iseeneslikult erituvas biomaterjalis muutuva ekspressioonimustriga miRNA-de olemasolule, on viimati täheldatud nende olulisus neeruhaiguste diagnoosimises, mistõttu uriinis ringlevad miRNA-d on pakutud välja kui potentsiaalsed mitteinvasiivsed biomarkerid (Juracek ja Slaby, 2020).

Platsenta on rasedusele iseloomulik organ, mille peamine funktsioon on lootele vajalikke toitainete tagamine tema arenguks ja kasvuks (Knöfler *et al.*, 2019). Nagu teiste inimese organite puhul, toimub ka platsentas kindlate miRNA-de regulatsioon, mis kuuluvad enamasti C14MC ja C19MC klastritesse (Cai *et al.*, 2017). Platsenta-spetsiifiliste miRNA-de ekspressioonimuster väljaspool platsentat (nt ema vereringes) märkimisväärselt erineb otse platsentas oleva ekspressioonitasemest (Donker *et al.*, 2012; Ura *et al.*, 2014). Uriinis ringlevate platsentaga seotud miRNA-de kohta varasemad andmed puuduvad.

Antud bakalaureusetöö kirjanduse ülevaates kirjeldatakse miRNA-sid, nende ekspressioonimustrit erinevates kehavedelikes nagu seerum ja uriin, ning vaadeldakse lähemalt miRNA-de omadust funktsioneerida kui biomarkerid. Lisaks antakse põhjalik ülevaade platsenta moodustumisest ning platsentale iseloomulikust transkriptomist (sh miRNA-dest), mida on võimalik leida ema verest, aga millel on olemas ka potentsiaal tuvastada neid uriinis. Üldesmärgiks on leida uriinis ringlevaid platsenta-spetsiifilisi miRNA-sid, mida tulevikus saaks kasutada potentsiaalsete biomarkeritena raseduskomplatsioonide tuvastamiseks mitteinvasiivselt. Antud töö raames oli eesmärgi saavutamiseks teostatud esimene etapp, kus autori poolt olid uuritud tervete rasedate proovides miRNA-de profiilid, et tuvastada nende seast platsenta-spetsiifilisi miRNA-sid.

Käesolev bakalaureusetöö on tehtud Tartu Ülikooli bio- ja siirdemeditsiini instituudis inimese geneetika uurimisgrupis.

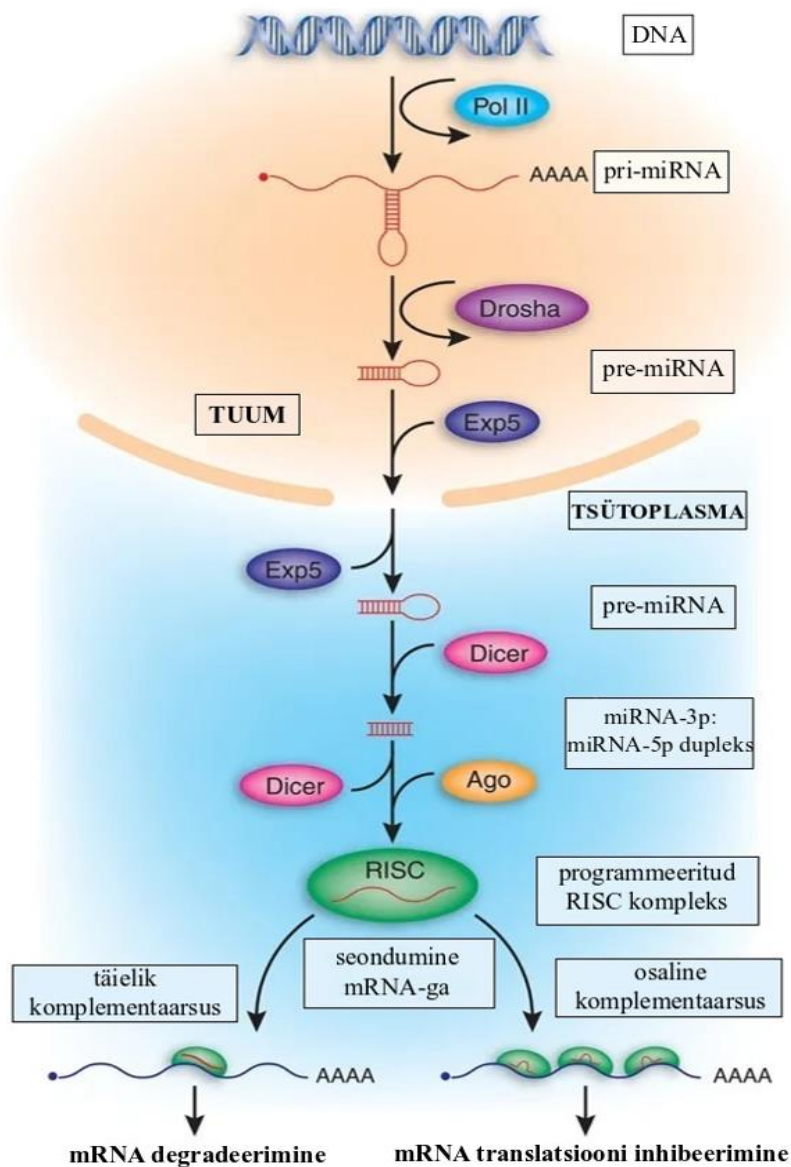
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. MikroRNA-d

Mikro-ribonukleiinhapped (miRNA-d) on väikesed (umbes 20-22 nt pikad) üksikahelalised RNA molekulid, mille põhifunktsiooniks on paljude bioloogiliste protsesside reguleerimine, täpsemalt RNA molekulide vaigistamine kas mRNA degradeerimise või mRNA-sihtmärkide translatsiooni inhibeerimisega (Khan *et al.*, 2019). Iga aastaga leitakse erinevates organismides juurde tuhandeid uusi miRNA-sid ning miRBase põhjal on tänaseks tuvastatud inimeses üle 2500 funktsioneeriva miRNA (Khan *et al.*, 2019; <http://mirbase.org/textsearch.shtml?q=hsa>).

1.1.1. MikroRNA-de sünteesirada

miRNA-de süntees algab tuumast, kus miRNA geenid on transkribeeritud RNA polümeraas II poolt primaarseteks transkriptideks, mida nimetatakse pri-miRNA-deks (Joonis 1). pri-miRNA-dele on iseloomulikud juuksenõelstruktuurid ning üksikahelalised RNA segmendid 3' ja 5' otsades (Khan *et al.*, 2019). Mikroprotsessor-kompleks, kuhu kuuluvad kaksikahelaline RNAas III endonukleaas Drosha ja valk DGCR8 (*DiGeorge syndrome chromosomal region 8*) (samuti teatud kui Pasha), tunneb ära pri-miRNA-sid ja lõikab neid juuksenõela tüve otsast 60-110 nt pikkusteks prekursor miRNA-deks (pre-miRNA) (Khan *et al.*, 2019; Treiber *et al.*, 2019). Täiendavad ribosomaalsed valgud (DDX5, DDX17, Lin28B, QKI, MeCP2) võivad mikroprotsessor-kompleksi funktsioneerimist kas soodustada või peatada. Seejärel transporditakse pre-miRNA-d tuumast tsütoplasmasse läbi tuuma ekspordi faktori eksportiini 5 (EXP5). EXP5 on võimeline funktsioneerima ainult GTP siduva tuumavalgu RAN-GTP olemasolul. EXP5, RAN-GTP ja pre-miRNA moodustavad transportkompleksi, mis edasi liigub tuumapooridest läbi. See omakorda kutsub esile RAN-GTP hüdrolyüüsi, mille tulemusena jääb pre-miRNA tsütoplasmas transportkompleksist vaba (Khan *et al.*, 2019).



Joonis 1. miRNA-de sünteesirada. RNA polümeraas II (Pol II) transkribeerib tuumas DNA-d primaarseks miRNA-ks. Drosha lõikab pri-miRNA-d 60-110 nt pikkuseks prekursor-miRNA-ks, mida transpordib tuumast tsütoplasmasse eksporditiin 5 (EXP5). Dicer viib tsütoplasmas läbi miRNA-3p:miRNA-5p dupleks moodustamist. miRNA dupleks laadimine Ago valkudele indutseerib RISC kompleksi tekkimist, mis seondub ühe ahelaga miRNA dupleksis. RISC kompleks aitab miRNA-l seonduda sihtmärk-mRNA-ga ja mRNA saatus sõltub miRNA ja sihtmärk mRNA komplementaarsusest (Cullen, 2006 järgi).

pre-miRNA püütakse tsütoplasmas kinni ja lõigatakse miRNA-miRNA dupleksiks RNA endonukleasiga Dicer (Cretoiu *et al.*, 2016). RNA indutseeritud vaigistava kompleksi (*RNA induced silencing complex*, RISC) moodustamine toimub kaheetapiliselt. Esialgu laaditakse miRNA-de dupleks Argonaut (Ago) valkudele ja tekib pre-RISC kompleks. Seejärel valitakse,

milline miRNA ahelatest saab küpseks miRNA-ks dupleksi lahti keerutamisel helikaasiga Ago2 (Khan *et al.*, 2019). miRNA-de dupleksis on 2 ahelat: 5p ja 3p ahelad. 5p ahel saab alguse pre-miRNA 5' otsast, 3p ahel on moodustatud 3' otsast. Mõlemad ahelad saavad kinnituda Ago valgu külge. Tavaliselt ahel, mis omab nõrgemat stabiilsust või uratsiili 5' otsas, saab küpseks miRNA-ks ning stabiilsema 5' otsaga teine ahel lagundatakse (Khan *et al.* 2019; O'Brien *et al.*, 2018).

RISC kompleks aitab küpsele üheaahelalisele miRNA-le seonduda sihtmärk-mRNA komplementaarsuse alusel (Michlewski ja Cáceres, 2019). miRNA toime sihtmärk-mRNA-le sõltub nendevahelise paardumise astmest. Kui sihtmärk-mRNA ja miRNA seonduvad 3' mittetransleeritava regiooniga (UTR, *untranslated region*) ja on täielikult komplementaarsed, siis mRNA degradeeritakse ja vastupidiselt, kui seondumine toimub 5' UTR otsas ning komplementaarsus on vaid osaline, siis mRNA translatsiooni repressioonitakse (O'Brien *et al.*, 2018).

1.1.2. MikroRNA-de funktsioonid

Peamise funktsiooni täitmiseks seondub miRNA sihtmärk-mRNA-le läbi 3' UTR spetsiifilisi järjestusi. Küpsenud miRNA funktsioneerib koos Ago valkudega, mille tagajärjel vormib miRNA-indutseeritud vaigistav kompleks (miRISC). miRISC aitab kaasa translatsiooni inhibeerimisele ning sihtmärk mRNA lagundamisele (Gebert ja MacRae, 2019). Sihtmärk-mRNA lagundamise rajas induktseerib miRNA deadenülaaside seondumist sihtmärk-mRNA-le, kus deadenülaasid lagundavad polü-A-saba. Peale deadenüleerimist soodustab miRISC kompleks spetsiifiliste faktorite seondumist sihtmärk-mRNA-le, mis põhjustavad „mütsi“ eemaldamist (*decapping*) ning lõpuks läbib sihtmärk-mRNA 5'-3' eksonukleasid degradeerimist (Iwakawa ja Tomari, 2015). miRNA-de poolt põhjustatud translatsiooni inhibitsioon aga toimub ilma sihtmärk-mRNA arvukuse muutmata (Eulalio *et al.*, 2008). Nii on näidatud, et polü-A-saba eemaldamine sihtmärk-mRNA-lt ei mõjuta miRISC'i sõltuva translatsiooni tõkestamist (Catalanotto *et al.*, 2016).

miRNA-de küpsemine on nii ajaliselt kui ka ruumiliselt väga reguleeritud protsess. Juhul kui miRNA-de biosünteesi käigus tekivad esile düsregulatsioonid, siis need hakkavad mõjutama miRNA-de ekspressioonitasemeid. miRNA-de ekspressioonimustri kõrvalekalle tekkimise tagajärjeks on geeniekspressiooni muutus, mis võib potentsiaalselt viia erinevate haiguste

arenemiseni. Kõige enam on sellist protsessi kirjeldatud vähkide puhul. (Neudecker *et al.*, 2016)

miRNA-d on olulised loomade normaalses arengus ja osalevad mitmes bioloogilistes protsessides, reguleerides rakkude diferentseerumist, arengut ja homoöstaasi (Khan *et al.*, 2019; O'Brien *et al.*, 2018). Lisaks on käsitletud ka miRNA-de osalemine rakk-rakk interaktsioonis, epigeneetilistes modifikatsioonides ja inimeste haigustes (Saliminejad *et al.*, 2019).

1.1.3. MikroRNA-d kudedes ja kehavedelikes

Landgraf *et al.* aastal 2007 olid esimesed, kes näitasid miRNA-de esinemise profiili erinevates inimese kudedes. Nende uuringus oli esitatud 26 organist pärit 340 miRNA-d (Landgraf *et al.*, 2007). Aastal 2016 täiendasid Ludwig ja tema kolleegid Landgraf'i *et al.* poolt tehtud uuringu ja saadi 61 erinevast koest 1997 küpsenud miRNA-d (Ludwig *et al.*, 2016). 2019. aastal olid lähemalt uuritud koespetsiifilised miRNA-d ning selgus, et kokku 30 organis esines 95 koespetsiifilist miRNA-d. 30 koe hulka kuulusid aju, kusepõis, neerud, maks, kopsud, munasari, eesnääre, munand jt, kusjuures viimane sisaldas kõige rohkem koespetsiifilisi miRNA-sid (n=25). Rasvkoe, rinna, kõhunäärme, südame, mao ja emaka iseloomulikke koespetsiifilisi miRNA-sid pole leitud (Cava *et al.*, 2019).

Koespetsiifiliste miRNA-de düsregulatsiooni põhjal on võimalik tuvastada patoloogilisi seisundeid, näiteks hsa-miR-195 on iseloomulik rinnavähi korral (Cui *et al.*, 2019; Ortiz-Quintero, 2016). Koespetsiifiliste miRNA-de kliiniline kasutamine on aga piiratud, kuna analüüsiks nõutakse koebiopsiat, mis on problemaatiline ja võib ohustada patsiendi elu. Tänu miRNA-de omadusele vabaneda haigestunud koest on tänapäeval võimalik koebiopsiate tegemist vähendada (Agrawal *et al.*, 2018; Scott, 2017).

On teada, et suurem osa miRNA-sid paikneb rakulistes mikrokeskkondades ehk intratsellulaarselt, kuid esineb ka rakuväliseid ehk ringlevaid ehk ekstratsellulaarseid miRNA-sid. Tavaliselt leidub ekstratsellulaarseid miRNA-sid sellistes kehavedelikes nagu plasma, seerum, liikvor, rinnapiim, uriin, sülg, pisarad, seemnevedelik jt. (Salloum-Asfar *et al.*, 2019)

miRNA-d väljuvad rakust paljude sekretsiooniradade abil. miRNA-d võib leida apoptootilistes kudedes, kõrge tihedusega lipoproteiini osakestes või vabalt liikuva kompleksina koos Ago valkudega (Makarova *et al.*, 2016). Kõige tavalisemalt toimivad ekstratsellulaarsete miRNA-

de kandjatena rakuvälised vesiikulid, mis moodustuvad peaaegu kõikidest rakutüüpidest. Rakuvälised vesiikulid eksisteerivad kahel kujul – mikrovesiikulite ja eksosoomidena. Mikrovesiikulid (100–1000 nm) moodustuvad plasma membraani väljapoolse pungumise teel. Eksosoomid on palju väiksemad (30-100 nm) ja tekivad tänu multivesikulaarsete kehade eksotsütoosile. Kuigi enamik miRNA-sid on kirjeldatud just eksosoomidena, on mõlemad rakuvälised vesiikulite tüübid väga tugevad ja resistentsed RNAasi, kõrge temperatuuri ja pH suhtes – selle tagab vesiikulite bilipiidne kiht, mis kaitseb miRNA-sid degradatsiooni eest (Makarova *et al.*, 2016; Zhao *et al.*, 2019). See on üks põhjustest, miks tänapäeval vaadeldakse ekstratsellulaarseid miRNA-sid kui mitmete haiguste tuvastamise potentsiaalsed biomarkerid (Mori *et al.*, 2019; Salloum-Asfar *et al.*, 2019).

Nagu rakusisesed miRNA-d, osalevad ka ekstratsellulaarsed miRNA-d füsioloogilistes ja patoloogilistes protsessides ning seetõttu on nende ekspressioonimustrid kehavedelikes väga tihedalt seotud erinevate haigustega (Zhao *et al.*, 2019). Näiteks hsa-miR-223 on II tüüpi suhkrutõbe põdevatel patsientidel veres alaekspresseeritud, kuid arteroskleroosiga patsientidel on antud miRNA üleekspresseeritud (Mori *et al.*, 2019). Ekstratsellulaarsete miRNA-de uurimisel kehavedelikes tuleb silmas pidada, et kõik kehavedelikud erinevad üksteistest miRNA-de poolest. Nii on näidatud, et inimese veri on kõige rikkam miRNA-de suhtes, samal ajal kui uriin, liikvor ja kopsukelme vedelik on miRNA-de vaesed kehavedelikud (Syed ja Deiuliis, 2019; Weber *et al.*, 2010).

1.1.3.1. Seerum

Suurem osa uuringutes on ringlevate miRNA-de tuvastamiseks kasutatud just vereplasma, mitte vereseerum, kuna verehüübimise protsessis on suur tõenäosus, et RNA molekulide vabastamise tõttu muutub tõeline ringlevate miRNA-de profiil. Siiski on aga täheldatud, et vereseerumi totaalse RNA kontsentratsioon on palju kõrgem võrreldes vereplasmaga, mistõttu arvatakse, et vereseerum on parem kehavedelik ringlevate miRNA-de tuvastamiseks (Cui *et al.*, 2019; Felekkis ja Papanephytou, 2020).

Seerumi miRNA-de leidmise hetkest on paljud uuringud näidanud, et seerumi miRNA-de düsreguleeritud tasemed korreleeruvad mitmesuguste haiguste seisunditega (Tabel 1), samal ajal kui tervetel isikutel jääb seerumi miRNA-de ekspressiooniprofiil pidevaks (Ortiz-Quintero, 2016). Seerumi miRNA-de muutuva profiili järgi on võimalik tuvastada eesnäärme- ja rinnavähke (Guo *et al.*, 2018; Mohammadi Torbati *et al.*, 2019), kardiovaskulaarseid (Çakmak

ja Demir, 2020) kui ka neurodegeneratiivseid haigusi (Madadi *et al.*, 2020). Lisaks on uuritud rasedust mõjutavaid seerumi miRNA-sid. Näiteks hsa-miR-135b esineb kõrgema ekspressiooniga rasedatel naistel kui mitterasedatel (Montagnana *et al.*, 2019). Seerumi hsa-miR-628-3p ja -5p on mõlemad üleekspressioneeritud varases raseduses, mis hiljem panustavad preeklampsia arengusse (Martinez-Fierro *et al.*, 2019).

Tabel 1. Seerumis ringlevate düsreguleeritud miRNA-de näited ja nende allikad.

miRNA	Ekspressioon	Allikas	Viide
hsa-miR-106b	Alaekspresseeritud	Alzheimeri tõbi	Madadi <i>et al.</i> , 2020
hsa-miR-34a	Üleekspresseeritud	Munasarjavähk	Maeda <i>et al.</i> , 2020
hsa-miR-484	Alaekspresseeritud	Munasarjavähk	Zhang <i>et al.</i> , 2020b
hsa-miR-20a, hsa-miR-21, hsa-miR-148a-3p, hsa-miR-375	Üleekspresseeritud	PCa	Stuopelyte <i>et al.</i> , 2016a; Stuopelytè <i>et al.</i> 2016; Mohammadi Torbati <i>et al.</i> , 2019
hsa-miR-19a, hsa-miR-19b, hsa-miR-130a-3p, hsa-miR-150-5p	Alaekspresseeritud	PCa	Stuopelytè <i>et al.</i> , 2016b; Paunescu <i>et al.</i> , 2019
hsa-miR-25-3p, hsa-miR-1915-3p	Üleekspresseeritud	Rinnavähk	Guo <i>et al.</i> , 2018; Savari <i>et al.</i> , 2020
hsa-miR-455-3p, hsa-miR-518b, hsa-miR-4719, hsa-miR-6757-3p	Alaekspresseeritud	Rinnavähk	Guo <i>et al.</i> , 2018; Ritter <i>et al.</i> , 2020
hsa-miR-22-3p, hsa-miR-320	Üleekspresseeritud	Endometriosis	Zhang <i>et al.</i> , 2020a
hsa-miR-195-5p	Üleekspresseeritud	Gestatsioonidiabeet	Wang <i>et al.</i> , 2020
hsa-miR-628-3p, hsa-miR-628-5p	Üleekspresseeritud	PE	Martinez-Fierro <i>et al.</i> , 2019

PCa: eesnäärmevähk; PE: preeklampsia

1.1.3.2. Uriin

Uriin on üsna kiiresti muutuv biomaterjal, aga samas on võimeline peegeldama nii kuseteede haiguste kui ka eesnäärmevähi progresseerumist (Stuopelytè *et al.*, 2016b). Tänu mitteinvasiivsele proovi kogumisele ja kergele ligipääsule, on tänapäeval uriini miRNA-d kaasatud nii vähi kui ka neeruhaiguste uuringutesse (Juracek ja Slaby, 2020).

Vaatamata uriinis ringlevate miRNA-de vähesele arvukusele, on leitud mõnede miRNA-de puhul ka varieeruvaid ekspressioonitasemeid (Tabel 2). miRNA-sid sisaldavad ja uriinis

ringlevad ekstratsellulaarsed vesiikulid tulenevad peamiselt kuseteedest või neerutuubulite epiteelrakkudest, mistõttu miRNA-de profiili abil on võimalik tuvastada neeruhaigusi (Juracek ja Slaby, 2020; Sun ja Lerman, 2019). On tõestatud, et uriinis ringlevad hsa-miRNA-16, hsa-miRNA-21, hsa-miRNA-24 ja hsa-miRNA-200c on üleekspressioonitud akuutse neerupuudulikkuse korral (Khalid *et al.*, 2019; Sonoda *et al.*, 2019).

Tabel 2. Uriinis tuvastatud düsreguleeritud miRNA-de näited ja nende allikad.

miRNA	Ekspressioon	Allikas	Viide
hsa-miR-10b, hsa-miR-34b, hsa-miR-19b1-5p, hsa-miR-210-3p	Üleekspressioonitud	BCa	Güllü Amuran <i>et al.</i> , 2020; Nekoohesh <i>et al.</i> , 2018
hsa-miR-139-5p	Alaekspressioonitud	BCa	Güllü Amuran <i>et al.</i> , 2020
hsa-miR-19a, hsa-miR-107, hsa-miR-141-3p, hsa-miR-196b, hsa-miR-205-5p, hsa-miR-375	Üleekspressioonitud	PCa	Ghorbanmehr <i>et al.</i> , 2019; Stuopelyte <i>et al.</i> , 2016a; Stuopelyte <i>et al.</i> , 2016b
hsa-miR-19b, hsa-miR-150, hsa-miR-328	Alaekspressioonitud	PCa	Stuopelyte <i>et al.</i> , 2016b
hsa-miR-218, hsa-miR-424	Üleekspressioonitud	I tüüpi diabeet	Kong <i>et al.</i> , 2019
hsa-miR-146a	Alaekspressioonitud	Albuminuuria	Perez-Hernandez <i>et al.</i> , 2018
hsa-miR-29b, hsa-miR-126, hsa-miR-155	Üleekspressioonitud	Diabeetiline nefropaatia	Beltrami <i>et al.</i> , 2018
hsa-miR-27b-3p, hsa-miR-1228-3p	Alaekspressioonitud	Diabeetiline nefropaatia	Conserva <i>et al.</i> , 2019
hsa-miR-328-3p	Alaekspressioonitud	Progressiivne neeruvähk	Di Meo <i>et al.</i> , 2020

BCa: kusepõievähk; PCa: eesnäärmevähk

2016. aastal Styopelyte *et al.* avaldasid artiklis, et eesnäärmevähi (PCa, *prostate cancer*) korral esinevad miRNA-de muutuvad ekspresioonitasemed eesnäärme koes ja uriinis. PCa patsientidel oli leitud eesnäärme koes üleekspressioonitud hsa-miRNA-375, mille kõrged tasemed olid samuti ekspresseeritud uriinis. Lisaks oli hsa-miR-95 kõrge kontsentratsioon leitud ägeda PCa korral eesnäärme koes, samal ajal kui uriinis oli hsa-miR-95 ekspresseeruvus madal. Mõlemad miRNA-d võiksid anda panust PCa detekteerimisse. (Stuopelyte *et al.*, 2016a)

1.1.4. MikroRNA-d kui biomarkerid

1.1.4.1. MikroRNA-de potentsiaal meditsiinis

Alates miRNA-de avastamise hetkest on uuritud nende märkimisväärset diagnoosimise võimalust, kuna miRNA-de muutuv ekspressioonimuster kindlates kudedes ning kehavedelikes tugevalt korreleerub inimhaigustega (Bonneau *et al.*, 2019; Neudecker *et al.*, 2016). Tänu rohkusele ja säilivusele kehavedelikes on miRNA-sid hakatud rakendama kliinilistes uuringutes (Neudecker *et al.*, 2016). Arusaam, et kehavedelikes ringlevate miRNA-de kättesaamine on palju kergem ja ei nõua invasiivseid meetodeid, on muutunud meditsiini valdkonda. Lisaks on tänapäeval rakendatud palju biotehnoloogilisi meetodeid, mille kaudu saab ekstratsellulaarseid miRNA-sid lihtsasti ära tunda (Zhong *et al.*, 2019). Eelnimetatud omadused teevad miRNA-dest potentsiaalsed biomarkerid, mille kasutamine kliinilises praktikas on aina laiemaks muutunud (Mori *et al.*, 2019). Viimasel ajal on hakatud suuremat tähelepanu pöörama kehavedelikes ringlevatel miRNA-del kui biomarkeritel põhinevale erinevate vähkide (Cui *et al.*, 2019), neurodegeneratiivsete haiguste (Madadi *et al.*, 2020), kardiovaskulaarsete haiguste (Krzywińska *et al.*, 2020) kui ka rasedustüsistuste diagnoosimisele (Hromadnikova *et al.*, 2017; Vashukova *et al.*, 2020).

1.1.4.2. Biomarkeri iseloomustus

Bioloogiline marker ehk biomarker kujutab endast näitajat, mis omab võimet mõõta biokeemilisi või molekulaarseid muutusi rakkudes, kudedes või kehavedelikes (Aronson ja Ferner, 2017). Kliiniliste biomarkerite abil on võimalik teha kindlaks patoloogiliste protsesside olemasolu organismis kui ka ennustada selle haiguse progresseeruvust (Califf, 2018). Selleks, et tänapäeval saaks biomarkerit personaliseeritud meditsiinis kasutada, peab tal olema mitmeid tunnusi: spetsiifilisus kindla haiguse või koe/kehavedeliku suhtes, lihtne käsitlemine ning võime analüüsida selle mitteinvasiivsete meetoditega. Lisaks tuleb biomarkerit kindlasti tuvastada enne, kui kliinilised sümptomid esile tulevad, sest nii on võimalik ennetada patoloogiliste protsesside arengut (Condrat *et al.*, 2020).

miRNA-sid kui biomarkereid on esimest korda mainitud 2008. aasta vähiuuringutes (Lawrie *et al.*, 2008). Alates sellest hetkest hakati miRNA-sid biomarkeritena rakendama ka teiste haiguste puhul. Näiteks on leitud kõrged hsa-miR-1, hsa-miR-133a ja hsa-miR-499 tasemed patsientide vereplasmas akuutse müokardi infarkti korral. Plasmas ja seerumis ringlevad alaekspresseeritud hsa-miR-107, hsa-miR-298 ja hsa-miR-328 ning ülesreguleeritud hsa-miR-

9, hsa-miR-125b ja hsa-miR-155 viitavad Alzheimeri tõve tekkimisele (Condrat *et al.*, 2020). Teadlased on teinud sammu edasi ning praegusel hetkel on ka uriinist võimalik leida haiguste seoselisi miRNA-sid. Nii on leitud, et diabeetilise nefropaatia korral on uriinis olemas nii alaku kui ka üleekspresseeritavad miRNA-d (Beltrami *et al.*, 2018; Conserva *et al.*, 2019).

1.1.4.3. MikroRNA-de kui biomarkeritega kaasnevad probleemid

On oluline tähele panna, et mõningatel olukordadel piisab vaid ühest miRNA-st, selleks et määrata tervise seisundit ja haigust detekteerida, samal ajal kui teiste juhtumite korral oleks vaja kõigi miRNA-de profiili (Hanna *et al.*, 2019; Kim, 2015). See teeb miRNA-de kasutamise väljakutset pakkuvaks, kuna erinevad kehavedelikud sisaldavad erinevat miRNA-de hulka (Kim, 2015). Peamiseks miRNA-de kui biomarkerite kasutamise probleemiks on selliste miRNA-de avastamine, mida saab rakendada hulgaliselt paljude patsientide seas (Condrat *et al.*, 2020). Kuna miRNA-de kogus on üliväike ja järjepideva ekspressiooniga miRNA-sid on üsna vähe, siis on oluline kätte saada proov suuremas koguses ning vähendada vigu miRNA-de protsessimise ja tuvastamise käigus (Condrat *et al.*, 2020; Kim, 2015).

1.2. Platsenta

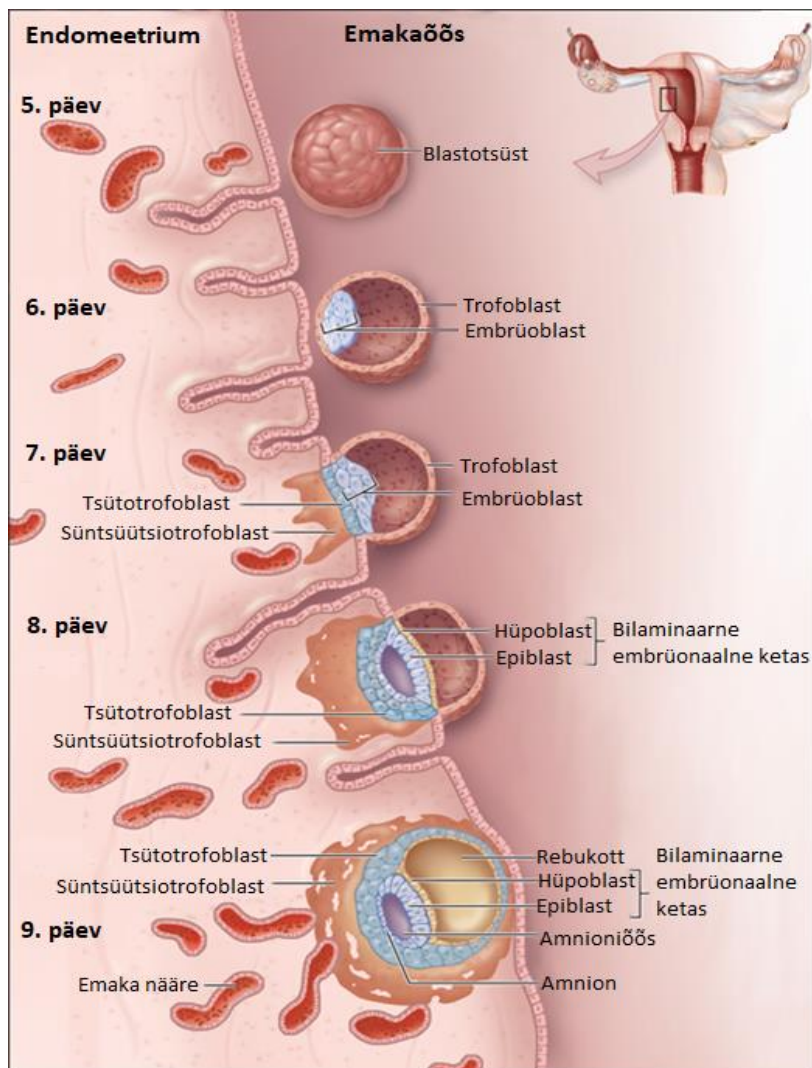
Embrüo arenemise peamiseks tingimuseks on kontakti loomine emaga platsenta kaudu. Platsenta on lühiajaline mitmefunktsionaalne organ, mis tagab kasvava embrüo ja ema vahelist kontakti kogu raseduse vältel. Selle aja jooksul käitub platsenta kui seede-, eritus-, immuun- ja hingeteedesüsteemid, varustades embrüot hapniku ja toitainetega ning eemaldades moodustunud jääkaineid. Platsenta aktiivne tööprotsess mõjutab ka ema metabolismi. Ema vereringesse sekreteeritakse tõhusalt hormone, mis soodustavad emapoolset raseduse säilitamist. (Knöfler *et al.*, 2019; Staud ja Karahoda, 2018)

1.2.1. Platsenta moodustumine

Kogu loote elu on otseses sõltuvuses platsenta korrektsest moodustumisest, sest platsenta mõjutab nii loote sünnikaalu, neuroloogilist arengut kui ka hõlbustab terviseprobleemide ennustamist täiskasvanueas (Miao *et al.*, 2017).

Viljastatud munarakk diferentseerub 4-5 päeva peale viljastumist blastotsüstiks, mis koosneb trofoektodermist ja sisemisest rakumassist (Cunningham *et al.*, 2018). Sisemisest rakumassist areneb edasi embrüo ning trofoektoderm panustab trofoblastide arengusse, millest hiljem moodustub platsenta epiteelkate (Burton ja Fowden, 2015; Mescher, 2018).

Blastotsüst hakkab emaka vastuvõtlikku endomeetriumis sisse tungima 7. päeval pärast munaraku viljastumist (Mescher, 2018) (Joonis 2). Edukas implantatsioon hõlmab endas 3 etappi: apositsiooni, adhesiooni ja invasiooni. Apositsiooni käigus endomeetriumi pinnal kujunevad sõrmetaolised pinopoodid, mille kaudu tekib esmane kokkupuude endomeetriumi ja blastotsüsti vahel. Samal ajal endomeetriumi näärmetest sekreteeritavad proteaasid põhjustavad blastotsüsti ümbritseva *zona pellucida* taandarengut, mis omakorda panustab blastotsüsti sissetungimisse (Davidson ja Coward, 2016; Kibble ja Halsey, 2015). Adhesiooni faasis blastotsüsti ja endomeetriumi epiteelrakkude vaheline kontakt tugevneb (Cunningham *et al.*, 2018). Invasiooni käigus jõuavad trofoblastirakud endomeetriumi epiteeli alusmembraanini ning annavad aluse emaka spiraalarteri ümberkorraldamisele (Kim ja Kim, 2017). Implantatsiooni jooksul läbib endomeetrium rida muutusi, mida nimetatakse detsiidua reaktsiooniks. Detsiidua reaktsiooni käigus endomeetrium tiheneb, tekivad platsenta membraanid ehk detsiidua. Detsiidua peamiseks ülesandeks peetakse trofoblastide sissetungimise ennetamist väljaspoolt endomeetriumi (Mescher, 2018).



Joonis 2. Embrüo implanteerumine endomeetriumis. Blastotsüst hakkab sisenema emaka pinda umbes 7. päeval peale viljastumist. Implantatsiooni alustamiseks seovad blastotsüsti trofoblastirakud glükoproteiine endomeetriumi pinnal. 8. päeval hakkavad trofoblastirakud diferentseeruma sisemiseks ja välimiseks kihideks – vastavalt tsütotrofoblasti- ja süntsüüsiotrofoblastikihideks. 9. päevaks on blastotsüst täielikult implanteerunud emaka endomeetriumis ja edasised diferentseerumised põhjustavad lakuunide teket, mille kaudu toimub embrüo varustamine hapniku ja toitainetega (Mescher, 2018 järgi).

Blastotsüsti trofoblastirakud diferentseeruvad implantatsiooni viimasel etapil kaheks rakukihiks – mitmetuumalisteks sisemisteks tsütotrofoblastideks ja ühetuumalisteks välimisteks süntsüüsiotrofoblastideks. Sisemine rakumass koos süntsüüsiotrofoblastidega tungivad emaka epiteeli lõpuni välja ja sellega lõpeb embrüo implantatsioon (Kibble ja Halsey, 2015).

Pärast implantatsiooni muutuvad tsütotrofoblastirakud hatulisteks ning hatuvälisteks trofoblastideks. Hatulised trofoblastid annavad alust mitmeid kordi hargnenute koorioni hattude arenemisele, mis moodustavad suurema osa platsentast. Koorioni hattude abil toimub loote ja emapoolse vere vaheldumine, millega saab loode kätte vajalikke toitaineid (Cunningham *et al.*, 2018; Mescher, 2018). Hatuvälised trofoblastid süvenevad emakasse kuni jõuavad müomeetriumi välja (Burton ja Jauniaux, 2015). Lõhkudes detsiiduas olevaid veresooni, tekitavad hatuvälised trofoblastid vohamise tõttu hattude vahe ruumi. Hattude vahe ruum jaotab alles vorminud platsentat loote- ja emapoolteks, mida nimetatakse vastavalt koorioni- ja basaalplaatideks (Burton ja Fowden, 2015; Cunningham *et al.*, 2018). Samuti osalevad hatuvälised trofoblastid emaka spiraalarteri remodelleerimises, mis tekitab platsentale iseloomuliku madala takistusega verevoolu esimese trimestri käigus (Cunningham *et al.*, 2018; Knöfler *et al.*, 2019).

1.2.2. Platsenta areng ja küpsemine

Küpsenud platsentat iseloomustab õhuke süntsüüsiotrofoblastirakkude kiht kui ka tsütotrofoblastide arvukuse vähesus, mille tõttu loote veresooned ulatuvad rohkem pinna peale (Cunningham *et al.*, 2018). Süntsüüsiotrofoblastide ühildumine tsütotrofoblastidega toob endaga kaasa 16. rasedusnädalaks tsütotrofoblastide täieliku kaotamist. Raseduse jooksul süntsüüsiotrofoblastirakkude kiht järjepidevalt uueneb, mis toob endaga kaasa ekstratsellulaarsete vesiikulite eraldamist (Cunningham *et al.*, 2018; Ji *et al.*, 2013). Kui varases raseduses alles tekkinud hattude vahel paikneb avar vahe ruum, siis küpsenud platsentas hattude strooma muutub palju tihedamaks ja rakud paiknevad üksteise kõrval. Tänu nendele omadustele on küpsenud platsenta võimeline tagama lootele täiusliku toitainete vahetust (Cunningham *et al.*, 2018).

Esimesel trimestril areneb platsenta palju kiiremini kui embrüo, kuid alates 17. rasedusnädalast on mõlemad platsenta ja loode umbes sama kaaluga. Raseduse edenemisega pakseneb platsenta 1 mm nädalas. Viimaste rasedusnädalate jooksul platsenta kasv aeglustub. Raseduse lõpuks platsenta paksus ei ületa 40 mm ning kaalub umbes 500 g. (Cunningham *et al.*, 2018)

1.2.3. Platsenta funktsioonid

Platsenta omab tähtsat rolli ema ja loote vahelises koostoimes. Platsenta varustab embrüot vee, süsivesikute, aminohapete, lipiidide, vitamiinide ning mineraalidega, samal ajal eemaldades süsihappegaasi ja teisi jääkaineid (Gude *et al.*, 2004; Kapila ja Chaudhry, 2019). Selline

ainevahetus saab toimuda nii aktiivsete kui ka passiivsete mehhanismide abil (Flick ja Kahn, 2019; Kibble ja Halsey, 2015).

Embrüo vajab oma erilist mikrokeskkonda, mis oleks ema sugu- ja stresshormoonide vaba, kuna isegi väikesed molekulid võivad läbida platsentat lihtdifusiooni teel. Selle vastu on platsental arenenud välja kaitsemehhanism, milleks on platsentat moodustavatel süntsüüsiotrofoblastide pinnal olevad ensüümid ja transporterid, mis suruvad maha väliskeskkonna saasteainete toimet (Burton ja Fowden, 2015; Gude *et al.*, 2004). Samuti tegutseb platsenta kui barjäär paljude mikroobsete nakkuste vastu, mis on võimalik tänu makrofaagide olemasolule koorioni hattudes (Kapila ja Chaudhry, 2019).

Olles endokriinne organ, vabastab platsenta steroid- ja peptiidhormoone, reguleerides nii raseduse alles jäämist kui ka ema füsioloogilisi muutusi (Burton ja Fowden, 2015; Kapila ja Chaudhry, 2019). Kui varases raseduses sekreteeritavad hormoonid põhjustavad toidu- ja energiavajaduste kasvamist, siis raseduse lõppemisel kasutatakse need varud loote kasvu toetamiseks (Burton ja Fowden, 2015). Loote ja platsenta omavaheline koostoime on peamiseks steroidhormooni allikaks, mis aitab kontrollida nii loote emakasisest kasvu kui ka elutähtsate elundite küpsemist (Flick ja Kahn, 2019).

Kui platsenta ei täida oma peamisi funktsiooni korrektselt, siis tegemist on platsenta puudulikkusega. Kehv hapniku ja toitainete kui ka vere ülekandmine lootele võib omakorda põhjustada tõsisemaid raseduskomplikatsioone, nagu loote kasvupeetus (Gagnon, 2003). Defektne platsentatsiooni sügavus on peamine põhjus, mis tekitab platsenta funktsioneerimises takistusi ning sellega on seostatud alles raseduse lõpus ilmuvat preeklampsiat (Peres *et al.*, 2018). Sellised emapoolsed riskifaktorid nagu vanus, ebatervislik eluviis ja kardiovaskulaarsed haigused võivad samuti raseduskomplikatsioonide teket soodustada (Cuffe *et al.*, 2017).

1.3. Platsenta mikroRNA-d ja rasedus

1.3.1. Platsenta-spetsiifilised mikroRNA-d ja nende düsregulatsioon

Platsenta ekspresseerib mRNA-sid ja miRNA-sid sisaldavat transkriptoomi, mis eristab teda teistest organitest (Cox *et al.*, 2015). Platsentale iseloomulikud miRNA-d tavaliselt paiknevad ühel kromosoomil klastritena, mis tähendab, et nende ekspressioon toimub üheaegselt, kuna need omavad ühist promotorit (Cai *et al.*, 2017; Cox *et al.*, 2015). Normaalse platsenta transkriptoomi puhul esineb esimese ja kolmanda trimestrite ning miRNA ekspressiooni

vaheline seos, kus raseduse lõppfaasis on leitud üleekspressioonina nende miRNA-de klastrid, mille arvukus raseduse alguses oli madal ja vastupidi (Cox *et al.*, 2015; Gu *et al.*, 2013).

Kromosoom 19 miRNA klaster (C19MC) on teadaolev suurim primaatspetsiifiline miRNA-de klaster, mille kõige kõrgemat ekspressiooni on täheldatud platsenta puhul, aga tegelikult on C19MC miRNA-de mõnevõrra madalamaid ekspressioonitasemeid tuvastatud ka ajus ja testistes (Fu *et al.*, 2013; Sadovsky *et al.*, 2015). C19MC ekspresseeritakse isapoolselt alleelilt, mida aktiveeritakse arenguetaapi kriitilisel ajahetkel (Fu *et al.*, 2013; Morales-Prieto *et al.*, 2013; Mouillet *et al.*, 2015). Asetsedes samuti 19. kromosoomil, esineb miR-371-3 klastril C19MC-ga sarnane ekspressioonimuster, mis on iseloomulik platsentale (Fu *et al.*, 2013; Morales-Prieto *et al.*, 2013).

Primaatide spetsiifiliste miRNA-de klastrite hulka kuulub ka kromosoom 14 miRNA klaster (C14MC). Antud klatri miRNA-d näitavad kõrgemat ekspressioonimustrit platsentas, samal ajal kui ka teistes kudedes on mingil määral ekspresseeruvust leitud (Fu *et al.*, 2013; Sadovsky *et al.*, 2015). Võrreldes C19MC-ga kodeerivad antud klatri emapoolsed geenid. C14MC miRNA-de tase on tavaliselt kõige kõrgem trofoblastides esimesel trimestril, samal ajal kui C19MC miRNA-de tasemed on esimese trimestri jooksul märkimisväärselt madalad (Fu *et al.*, 2013). Kõigi kolme platsenta-spetsiifiliste miRNA-de klastrite ekspressioon muutub sõltuvalt gestatsiooniajast, tänu millele võiksid ema plasmas leiduvad platsenta-spetsiifilised miRNA-d olla kasulikud biomarkerid raseduse tuvastamiseks (Morales-Prieto *et al.*, 2013).

Paljud uuringud on näidanud, et miRNA-d kui signaalmolekulid mõjutavad korrektset platsenta moodustumist ning osalevad trofoblastide diferentseerumises, migreerumises, sissetungimises, jagunemises, apoptoosis kui ka angiogeneesis (Hayder *et al.*, 2018). Näiteks C19MC kuuluvad hsa-miR-515-5p, hsa-miR-518f, hsa-miR-519c-3p, hsa-miR-519e-5p on märkimisväärselt alaekspressiooniga tsütotrofoblastide diferentseerumises süntsüüsiotrofoblastideks (Hayder *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2016). hsa-miR-520c osaleb platsenta ja ema vahelises signaliseerumises. Hatuvälistes trofoblastides madalal tasemel ekspresseeruv hsa-miR-520c-3p soodustab hatuväliste trofoblastide sisse tungimist ja reguleerib nende migreerumist (Takahashi *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2019a).

Platsenta-spetsiifiliste miRNA-de düsregulatsiooni hakati seostama erinevate rasedustüsistustega, sh preeklampsiaga (PE). Preeklampsia haigetel on platsentast täheldatud platsenta-spetsiifiliste klastrite C14MC ja C19MC miRNA-de üle- kui ka alaekspressiooni

(Tabel 3) (Fu *et al.*, 2013; Morales-Prieto *et al.*, 2013). Näiteks üleekspresseeritud hsa-miR-520 ja hsa-miR-1233 ning alareguleeritud hsa-miR-144 on juba märgatavad varases raseduses (Barchitta *et al.*, 2017). Lisaks on leitud, et platsentas kõrgelt ekspresseeritavad hsa-miR-431, hsa-miR-518a-5p ja hsa-miR-124 ning alareguleeritud hsa-miR-544 ja hsa-miR-3942 viitavad varajaselt tekkivale preeklampsiale (Lykoudi *et al.*, 2018).

Tabel 3. Näited üle- ja alaekspresseeritud miRNA-dest preeklampsia platsentades

Üleekspresseeritud	Viide	Alaekspresseeritud	Viide
hsa-miR-496, hsa-miR-885-5p	Cretoiu <i>et al.</i> , 2016	hsa-miR-181, hsa-miR-483-5p	Cretoiu <i>et al.</i> , 2016
hsa-miR-124, hsa-miR-431, hsa-miR-518a-5p	Lykoudi <i>et al.</i> , 2018	hsa-miR-544, hsa-miR-3942	Lykoudi <i>et al.</i> , 2018
hsa-miR-193b-3p, hsa-miR-210-5p	Awamleh <i>et al.</i> , 2019	hsa-miR-15b, hsa-miR-195, hsa-miR-424	Gunel <i>et al.</i> , 2020; Tang <i>et al.</i> , 2019
hsa-miR-30a-3p, hsa-miR-181a-5p	Huang <i>et al.</i> , 2019; Niu <i>et al.</i> , 2018	hsa-miR-376c, hsa-miR-441	Yang <i>et al.</i> , 2019b
hsa-miR-15, hsa-miR-17, hsa-miR-20a, hsa-miR-21, hsa-miR-325	Cai <i>et al.</i> , 2017	hsa-miR-126	Cai <i>et al.</i> , 2017
hsa-miR-517a-3p, hsa-miR-518c-3p, hsa-miR-518f-3p	Anton <i>et al.</i> , 2015; Hu ja Zhang, 2019; Zhang <i>et al.</i> , 2016	hsa-miR-515-5p, hsa-miR-517a-5p, hsa-miR-518b, hsa-miR-519d, hsa-miR-520a-5p, hsa-miR-524-5p	Hromadnikova <i>et al.</i> , 2015
hsa-miR-16, hsa-miR-20b, hsa-miR-21, hsa-miR-29b, hsa-miR-517c, hsa-miR-675	Fu <i>et al.</i> , 2013	hsa-miR-18b, hsa-miR-144, hsa-miR-377, hsa-miR-378a-5p, hsa-miR-411, hsa-miR-625	Fu <i>et al.</i> , 2013

1.3.2. Platsentaga seotud mikroRNA-de detekteerimine kehavedelikes

miRNA-sid, mida tuvastatakse väljaspoolt platsentat, aga ikkagi omavad platsentalist päritolu, nimetatakse platsenta seolisteks miRNA-deks. Normaalse raseduse korral on näidatud, et enamik C19MC klastrit moodustavad miRNA-d on võimalik detekteerida emapoolses

vereringes (Donker *et al.*, 2012). Selle põhjuseks on platsentas olevad süntsüütsiitrofoblastirakud, mis on võimelised vabastama ema vereringesüsteemi miRNA-sid sisaldavaid ekstratsellulaarseid vesiikuleid (Ouyang *et al.*, 2014).

Platsenta-spetsiifilised hsa-miR-517a, hsa-miR-518b, hsa-miR-518e, hsa-miR-524 kui ka hsa-miR-141 ja hsa-miR-424 on palju kõrgemini ekspresseeritud rasedate vereplasmas kui mitterasedatel naistel (Mouillet *et al.*, 2010). Lisaks oli näidatud, et kui normaalse raseduse korral on platsentas hsa-miRNA-518b kõrgelt ekspresseeritud (Donker *et al.*, 2012), siis tegelikult vereseerumis on antud miRNA madala ekspressioonitasemega (Ura *et al.*, 2014). Antud tulemused viitavad sellele, et platsentaga seotud miRNA-d võiksid olla potentsiaalsed biomarkerid raseduse tuvastamiseks. Ainsaks takistuseks on aga fakt, et platsentast sekreteeritavaid rakuväliseid vesiikuleid on vereplasmas üldiselt vähe (3%), võrreldes teistest rakkudest vabastatavate ekstratsellulaarsete vesiikulite kogusega (90%) (Familar *et al.*, 2017).

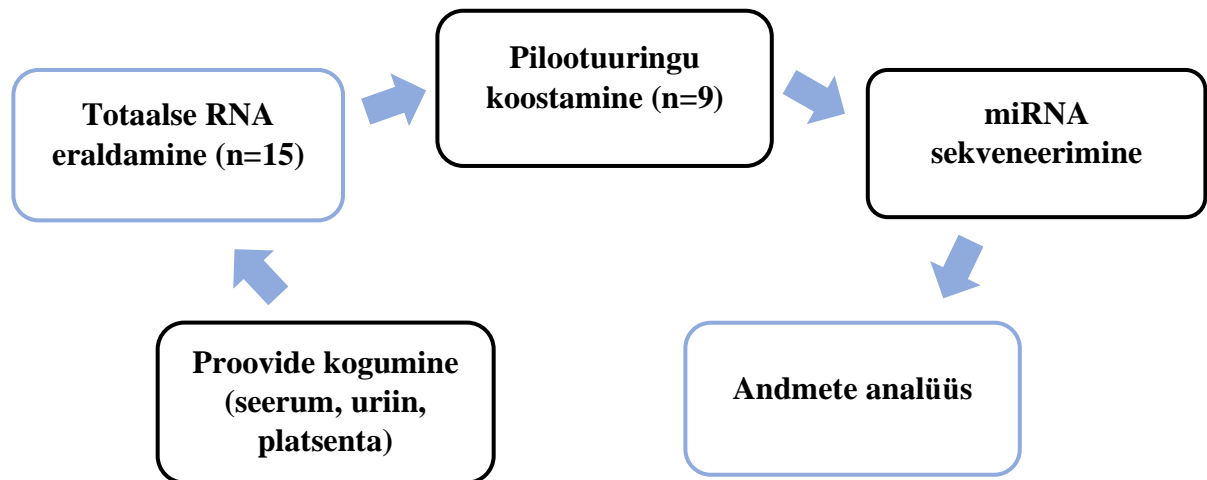
Paljud uuringud on demonstreerinud, et osa platsentaga seotud miRNA-sid on sekreteeritavad ema vereringesse muutuva regulatsiooniga, tänu millele on võimalik tuvastada raseduskomplikatsioone (Fu *et al.*, 2013). Nii olid ema vereplasmast leitud platsenta-spetsiifilised hsa-miR-517-5p, hsa-miR-520a-5p ja hsa-miR-525-5p alaekspresseerituna PE korral (Li *et al.*, 2020). Seerumis ülesreguleerituna ringlevad hsa-miR-26a, hsa-miR-130b ja hsa-miR-103 mõjutavad samuti PE väljaarenemist (Barchitta *et al.*, 2017). Lisaks nendele miRNA-dele oli varases raseduses leitud seerumis hsa-miR-628-3p ja hsa-miR-628-5p kõrge tasemed naistel, kellel hiljem arenes välja PE (Martinez-Fierro *et al.*, 2019). Enam uuritud hsa-miR-210 ja hsa-miR-155 on mõlemad tugevalt üleekspresseeritud nii PE platsentades kui ka seerumis, mistõttu neid on võimalik kasutada potentsiaalsete biomarkeritena PE tuvastamiseks (Bounds *et al.*, 2017; Gan *et al.*, 2017). Tänu miRNA-de omadusele ringleda ekstratsellulaarsete vesiikulite kujul, siis on ka uriinist proovitud otsida PE seoselisi miRNA-sid. Nii oli leitud, et kuigi uriinis olevate hsa-miR-210 ja hsa-miR-155 ekspressioonid ei erine kontrollgrupist, siis on täheldatud, et need on positiivselt korreleeritud ööpäevase uriinivalguga, mida võiks kasutada neerukahjustuse hindamiseks PE korral (Gan *et al.*, 2017).

2. EKPERIMENTAALOSA

2.1. Töö eesmärk

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärkideks on:

- 1) anda põhjalik kirjandusülevaade miRNA-de rollist platsenta funktsioneerimisel ning miRNA-de kasutamisest kui potentsiaalsete biomarkeritena;
- 2) tuvastada platsentas ekspresseeruvad ning seerumi ja uriini proovides detekteeritavad miRNA-d sekveneerimise meetodil normaalsete raseduste korral;
- 3) leida erinevused ja sarnasused platsenta, seerumi ja uriini proovides tuvastatavate miRNA-de vahel.



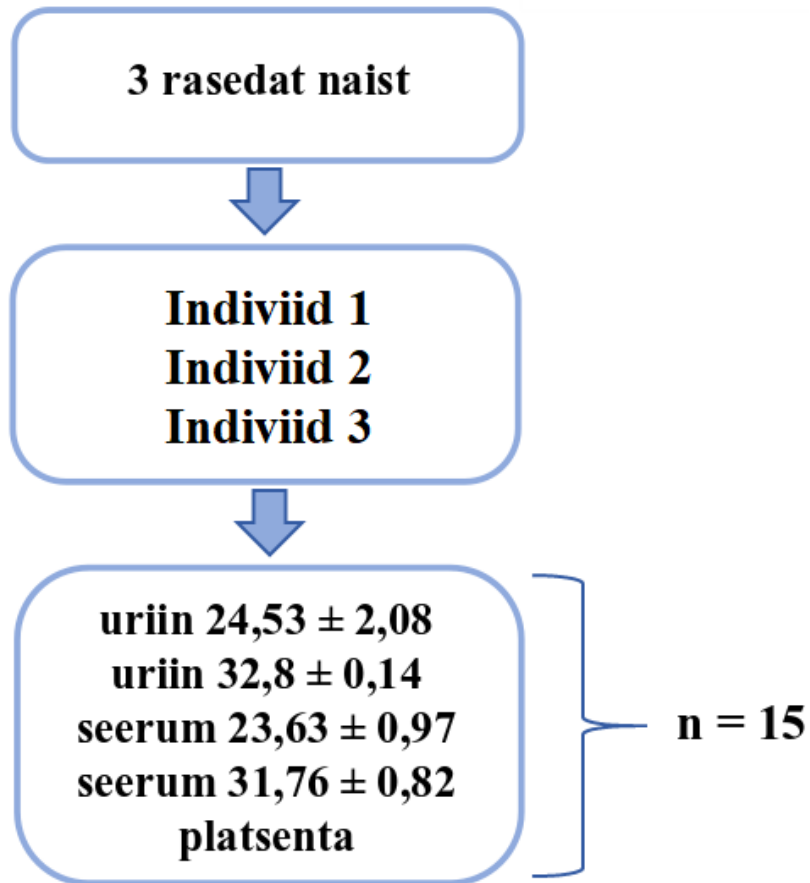
Joonis 3. Töövoo kirjeldus. Käesoleva bakalaureusetöö eksperimentaalsena eesmärkide saavutamiseks olid kaasatud Happy Pregnancy projekti raames kogutud rasedate naiste proovid, sh platsenta, seerum ja uriin. Proove koguti Tartu Ülikooli Kliinikumi poolt aastatel 2012-2015. Platsentast, seerumist ja uriinist (n=15) totaalse RNA eraldamine oli läbi viidud autori poolt inimese geneetika uurimisgrupi laboris. Proovidest saadud totaalse RNA-de põhjal oli koostatud pilootuuring, kuhu kuulus 9 proovist eraldatud totaalsed RNA-d. Edasi oli teostatud eraldatud totaalse RNA (n=9), sh ka miRNA, sekveneerimine QIAGEN'i (Hilden, Saksamaa) ettevõtte poolt. Saadud sekveneerimistulemused olid analüüsitud autori poolt. Antud bakalaureusetöö raames on autori osalemine eksperimentaalsena etappides märgistatud siniste kastidega.

2.2. Materjalid ja meetodika

2.2.1. Valimi kirjeldus

Antud töös oli kasutatud Happy Pregnancy uuringu proovid. Happy Pregnancy (inimese viljakuse ja rasedusega seotud uute mitteinvasiivsete biomarkerite väljatöötamine, *development of novel non-invasive biomarkers for fertility and healthy pregnancy*) uuring oli läbi viidud aastatel 2012-2015 professor Maris Laane koordineerimisel. Platsenta, seerumi ja uriini proovid olid kogutud rasedatelt naistelt dots. Kristiina Rulli poolt Tartu Ülikooli Kliinikumis. Uuringu raames osalesid need rasedad naised, kellel esines soov uuringus osa võtta. Uuringu läbiviimiseks oli saadud eetikakomitee load 221/T-6, 17.12.2012; 286/M-18, 15.10.2018. Antud bakalaureusetöö valimisse valitud seerumi ja uriiniproovid pärinesid kõrvalekalleteta raseduse ja sünnitusega naistelt. Uriini proovid olid võetud hommikusest uriinist ning vere proovid koguti rutiinse arsti visiidi jooksul.

Käesolevas töös oli kasutatud 3 indiviidi proovid, igalt naiselt oli võetud kaks seerumi, kaks uriini ja üks platsenta proov (n=15). Kaks seerumi ja kaks uriini proovi koguti erinevatel ajahetkedel raseduse jooksul, teise trimestri lõpus ja kolmanda trimestri keskel. Täpsemad proovide võtmisajad gestatsiooninädalates on kujutatud Joonisel 4. Antud töös kasutatud valimi kirjeldus on toodud välja keskväärtuse ja standardhälve kujul (Tabel 4).



Joonis 4. Proovide kogumine erinevatel ajahetkedel raseduse jooksul. Antud töös oli kasutatud 3 tervete rasedate (indiviid 1, 2, 3) proovid. Igalt naiselt võeti 5 proovi: kaks seerumi, kaks uriini ja üks platsenta koe proov. Kokku saadi 15 proovi. Proovide võtmisajad on esitatud vormis keskväärtus ± standardhälve (gestatsiooniaeg nädalates).

Tabel 4. Antud töös kasutatud valimi kirjeldus

	Indiviidid (n=3)
Emad	
Vanus (a)	25,2 ± 1,9
Pikkus (cm)	168,0 ± 6,2
Raseduseelne kaal (kg)	64,7 ± 6,7
Kaaluiive (kg)	13,5 ± 3,9
KMI	23,0 ± 2,7
Varasemad rasedused (n)	1
Gestatsiooniaeg (päev)	283,3 ± 3,8
Gestatsiooniaeg (nädal)	40,7 ± 0,5
Enneaegne sünnitamine	0
Sünnitusviis (V / K)	(3 / 0)
Sünnituse kestus (min)	462,3 ± 154,6
Vastsündinud	
Sünnikaal (g)	3646,0 ± 575,4
Sünnipikkus (cm)	51,5 ± 2,1
Pea ümbermõõt (cm)	34,5 ± 0,7
Rinna ümbermõõt (cm)	33,0 ± 2,8
Platsenta kaal (g)	546,7 ± 138,7
Sugu (N / M)	(1 / 2)

Andmed on esitatud vormis keskvärtus ± standardhälve. KMI: kehamassi indeks; V: vaginaalne; K: keisrilõige

2.2.2. Proovide totaalse RNA eraldamine

Käesolevas töös 15 proovist totaalse RNA eraldamiseks kasutasin *miRNeasy Mini Kit*'i (QIAGEN, Hilden, Saksamaa). Antud komplekt võimaldab totaalse RNA eraldamist (sh miRNA) inimeste ning loomade kõikidest kudedest ja rakkudest. Totaalse RNA eraldamiseks kasutasin *miRNeasy Mini Kit*'i poolt loodud *Quick-Start* protokoll.

2.2.2.1. Totaalse RNA eraldamine platsenta proovidest

Platsenta proovist lõigati skalpelliga 0,02 g koetükk, mida seejärel pandi 1,5 ml tuubi, kuhu lisati 700 µl QIAzoli reagenti. Platsentast saadud koetükk peenestati *TissueRuptor* (QIAGEN, Saksamaa) rootor-staator homogenisaatoriga. Homogeniseerimine toimus 3 minuti jooksul. Tuubi hoiti 5 minutit toatemperatuuril. Järgnevalt lisati proovile 140 µl kloroformi, seejärel segu segati *vortex*'il 15 sekundit. Järgnes toatemperatuuril hoidmine 3 minuti jooksul. Edasi toimus tsentrifuugimine 15 minutiks 12 000 x g 4°C juures. Peale tsentrifuugimist eemaldati pealt vesifaas, mille ligikaudne kogus oli 350 µl, ning tõsteti uude tuubi. Edasine totaalse RNA puhastamine ja elueerimine viidi läbi *miRNeasy Mini Kit*'i poolt loodud *Quick-Start* protokollil põhjal. Totaalset RNA-d elueeriti 20 µl RNAasivaba veega ning kontsentratsiooni ja puhtust mõõdeti NanoDrop 2000 spektrofotomeetriga (ThermoFisher, USA). Platsentast eraldatud RNA-d jäid -80°C juures külmikusse hoiustamiseks.

2.2.2.2. Totaalse RNA eraldamine seerumi proovidest

Totaalse RNA eraldamiseks võeti 100 µl seerumit. Seerumi kogusele lisati 5-kordne QIAzol reagenti kogus (500 µl) ning segati korralikult *vortex*'il 1 minut. Tuub hoiti samuti toatemperatuuri juures 5 minutit. Seejärel lisati seerumi prooviga võrdne kogus kloroformi (100 µl). Seerumi ja kloroformi segu segati *vortex*'il 15 sekundit. Seejärel hoiti tuub taas toatemperatuuril 3 minutit. Järgnes 15-minutiline tsentrifuugimine 12 000 x g 4°C juures. Tsentrifugimise lõpetamisel eemaldati pealt vesifaas, mille ligikaudne kogus oli 350 µl, ning tõsteti uude tuubi. Edasine totaalse RNA puhastamine ja elueerimine viidi läbi *miRNeasy Mini Kit*'i poolt loodud protokollil põhjal. Totaalset RNA-d elueeriti 20 µl RNAasivaba veega ning totaalse RNA kontsentratsiooni ja puhtust mõõdeti NanoDrop 2000 spektrofotomeetriga (ThermoFisher, USA). Seerumist eraldatud RNA-d jäid samuti -80°C juures külmikusse hoiustamiseks.

2.2.2.3. Totaalse RNA eraldamine uriini proovidest

Võeti 200 µl uriini proovi. Näidisproovi uriini RNA eraldamisel selgus, et protokoll vajab lisaetappi. Metoodika arendamisel tuli välja, et uriinist eraldatav ja totaalset RNA-d sisaldav vesifaas vajus allapoole, mis tekitas RNA kogumisel raskusi. Seega otsustasin enne QIAzoli reagenti lisamist proovi korralikult madalatel pööretel (1000 x g) läbi tsentrifuugida, nii et uriinis olevad valgud sadeneks tuubi põhja. Uriini proovid olid tõstetud uude tuubi ilma sadet puudutamata. Peale tsentrifuugimist oli uriinile lisatud 5-kordne QIAzol reagenti kogus (1 ml).

Proovi segati korralikult *vortex*'il 1 minut. Seejärel tuubi hoiti 5 minutit toatemperatuuril. Järgmisena lisati uriiniga võrdne kogus kloroformi (200 µl). Uriini ja kloroformi segu segati *vortex*'il 15 sekundit. Järgnevalt hoiti tuubi toatemperatuuri juures 3 minutit. Tsentrifugeeriti 15 minuti jooksul 12 000 x g 4°C juures. Peale tsentrifugeerimist eemaldati pealt vesifaas (350 µl) ning tõsteti uude tuubi. Edasine totaalse RNA puhastamine ja elueerimine viidi läbi *miRNeasy Mini Kit*'i poolt loodud protokolliga põhjal. Totaalset RNA-d elueeriti 20 µl RNAasivaba veega ning totaalse RNA kontsentratsiooni ja puhtust mõõdeti NanoDrop 2000 spektrofotomeetriga (ThermoFisher, USA). Uriinist eraldatud RNA-d jäid samuti -80°C juures külmikusse hoiustamiseks.

2.2.3. Uuritavad proovid

Antud bakalaureusetöö raames oli otsustatud teha pilootuuring. Uuritavate proovide hulka kuulusid igalt uuritavalt naiselt üks platsenta (n=3), üks seerumi (n=3) ja üks uriiniproov (n=3). Analüüsitud seerumi ja uriini proovid koguti vastavalt $31,76 \pm 0,82$ ja $32,8 \pm 0,14$ gestatsiooninädalatel.

2.2.4. MikroRNA sekveneerimine

Platsenta, seerumi ja uriini proovidest (n=9) eraldatud totaalsed RNA-d olid saadetud Rain Inno poolt QIAGEN'i ettevõttesse miRNA sekveneerimiseks (Hilden, Saksamaa). QIAGEN ettevõttes tehakse miRNA-de sekveneerimist järgmise põlvkonna sekveneerimise (NGS, *next generation sequencing*) põhjal. NGS omab palju eeliseid kvantitatiivse polümeraasi ahelreaktsiooni (qPCR, *quantitative polymerase chain reaction*) ees, näiteks kõrge tundlikkuse tõttu on võimalik detekteerida palju rohkem uusi miRNA-sid eelkõige madala kontsentratsiooniga proovidest. Minimaalne totaalse RNA kogus miRNA sekveneerimisreaktsiooni läbiviimiseks on 1 ng.

QIAGEN'i poolt kasutatav totaalse RNA sekveneerimise meetod põhineb miRNA-de raamatukogu loomisel *QIASEq miRNA Library* komplektiga. Küpsenud miRNA-de 3' ja 5' otsadesse ligeeruvad adapterid, mille kaudu saavutatakse universaalset cDNA sünteesimist ning sellest tulenevalt ka parimat miRNA-de sekveneerimisraamatukogu. miRNA-de 3' otsa liitunud pöördtranskriptsiooni praimer sisaldab ainulaadseid molekulaarindekseid (UMI, *unique molecular indices*), mis sisenevad iga miRNA molekulisse. QIAGEN kasutab UMI'dena 12 juhusliku aluspaari. UMI-de loendamise kaudu saab peale sekveneerimist sekundaarses andmeanalüüsis läbi viia diferentsiaalse ekspressioonianalüüsi. miRNA-de

sekvenerimisraamatukogu oli sekveneeritud kasutades Ion Torrent NGS tehnoloogiat (ThermoFisher, USA).

2.2.5. Andmete analüüs ja visualiseerimine

QIAGEN'i poolt sekveneeritud miRNA-d joondati nende poolt miRbase v22 järgi. Lugemite arvud edastati kui CPM-id (*counts per million*). Saadud lugemite väärtuste analüüsimiseks ning visualiseerimiseks kasutasin programmeerimiskeele R'i (v3.6.3) põhjal töötavaid pakette VennDiagram (v1.6.20) ja ggplot2 (v.3.3.0).

Hindamaks miRNAde ekspressiooni kudedes rakendasin IMOTA andmebaasi (kasutatud 15.04.20) (Saarland Ülikool, Saksamaa), mis hõlmab endas andmeid 20 000 miRNA-de kohta ja nende ekspresseeruvusest 23 koes (Palmieri *et al.*, 2018). Lisaks oli kasutusel ka R'i paketti miRmine (v1.8.0), mis samuti sisaldab andmeid inimeste miRNA-de ekspresseeruvustest rakuliinides, kehavedelikes ning normaalsetes kui ka haigestunud kudedes. miRmine andmebaasis on miRNA-de ekspressioonid esitatud kujul lugemid miljoni kohta (*reads per million*, RPM) (Panwar *et al.*, 2017).

2.3. Tulemused

2.3.1. Eraldatud totaalse RNA kogused ja puhtus

Peale totaalse RNA-de eraldamist platsenta koe, seerumi ja uriini proovidest mõõtsin nende kogus (ng/μl) ja puhtus (A260/A280) NanoDrop 2000 spektrofotomeetriga (ThermoFisher, USA) (Tabel 5). Antud etapp oli oluline läbi viia, kuna eraldatud totaalse RNA kogusest sõltus, millise meetodi põhjal hakkab toimuma edasine miRNA-de sekveneerimine. Saadud mõõtmiste põhjal selgus, et kui seerumi ja uriini totaalse RNA kogused (ng/μl) on märkimisväärselt madalad (vastavalt $8,83 \pm 3,83$ ng/μl ja $7,47 \pm 3,06$ ng/μl), siis platsentast eraldatud RNA kogus on vastupidiselt kõrge ($119,60 \pm 64,09$ ng/μl). Võttes arvesse eraldatud totaalse RNA-de neeldumise suhet 260 nm ja 280 nm juures, mis puhta RNA korral on ~1,8, siis platsentast eraldatud totaalne RNA oli palju puhtam ($2,04 \pm 0,04$ A260/A280 suhe) kui seerumi ja uriini proovidest saadud RNA (vastavalt $1,37 \pm 0,06$ ja $1,35 \pm 0,9$).

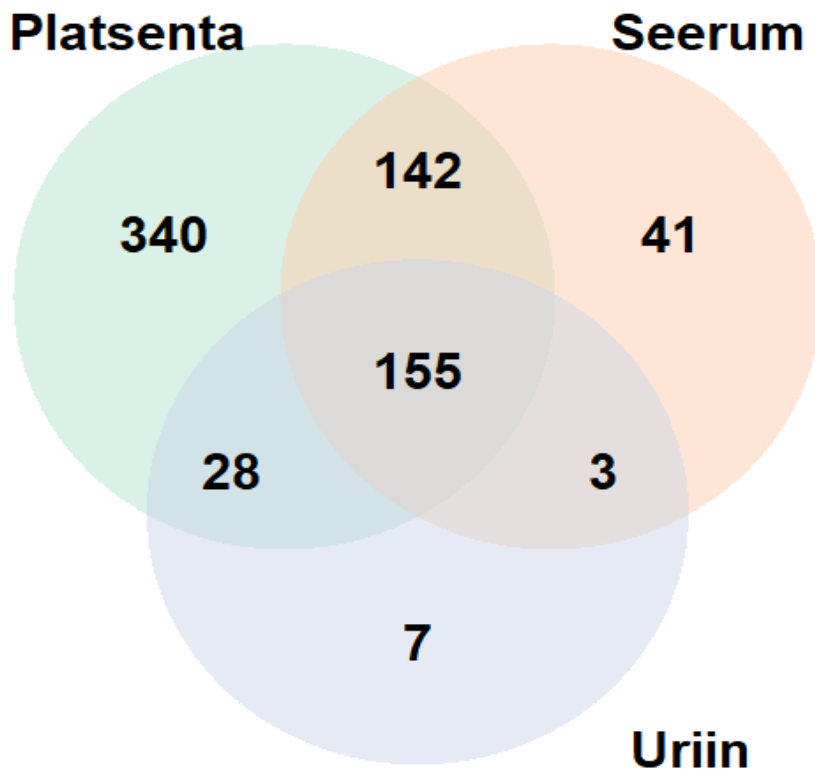
Tabel 5. Eraldatud totaalse RNA kogused ja puhtus platsenta koest, seerumi ja uriini proovidest.

Indiviid	Proovid	Kogus (ng/μl)	Puhtus (A260/A280)
1	Platsenta	191,3	2,08
	Seerum	8,3	1,33
	Uriin	8,6	1,45
2	Platsenta	67,9	2,01
	Seerum	12,9	1,43
	Uriin	9,8	1,32
3	Platsenta	99,6	2,03
	Seerum	5,3	1,34
	Uriin	4,0	1,28

2.3.2. Sekveneerimisest tuvastatud mikroRNA-d

Saadud miRNA-de sekveneerimise tulemused sisaldasid iga proovi kohta 3 erinevat ekspressiooni mõõtmist CPM-ide kujul. Platsenta koe, seerumi ja uriini proovide (n=9) jaoks arvutasin välja miRNA-de ekspressiooni CPM-de mediaanid ja keskmised. Selle põhjal olid välistatud need miRNA-d, mille CPM oli väiksem kui 2,5. Varasemalt on uurimisrühmas avaldatud sekveneerimise andmestikus kasutatud ekspressiooni piirmääraks 50 lugemit, mis antud valimis oleks 2,5 CPM. Antud välistamise kaudu oli tulemuseks saadud, et 2633 võimalikust miRNA-st oli platsenta koes ekspresseerunud 665 miRNA-d. Seerumis ja uriinis üle 2,5 CPM ekspresseerunud miRNA-sid oli vastavalt 341 ja 193.

Platsentas, seerumis ja uriinis ekspresseeruvate miRNA-de (CPM > 2,5) nimekirjade alusel tegin Venn diagrammi (Joonis 5), mis näitab, kui palju ühiseid miRNA-sid on antud platsenta, seerumi ja uriini proovide puhul võimalik tuvastada ning lisaks ka iga proovi kohta unikaalsete miRNA-de arvu.

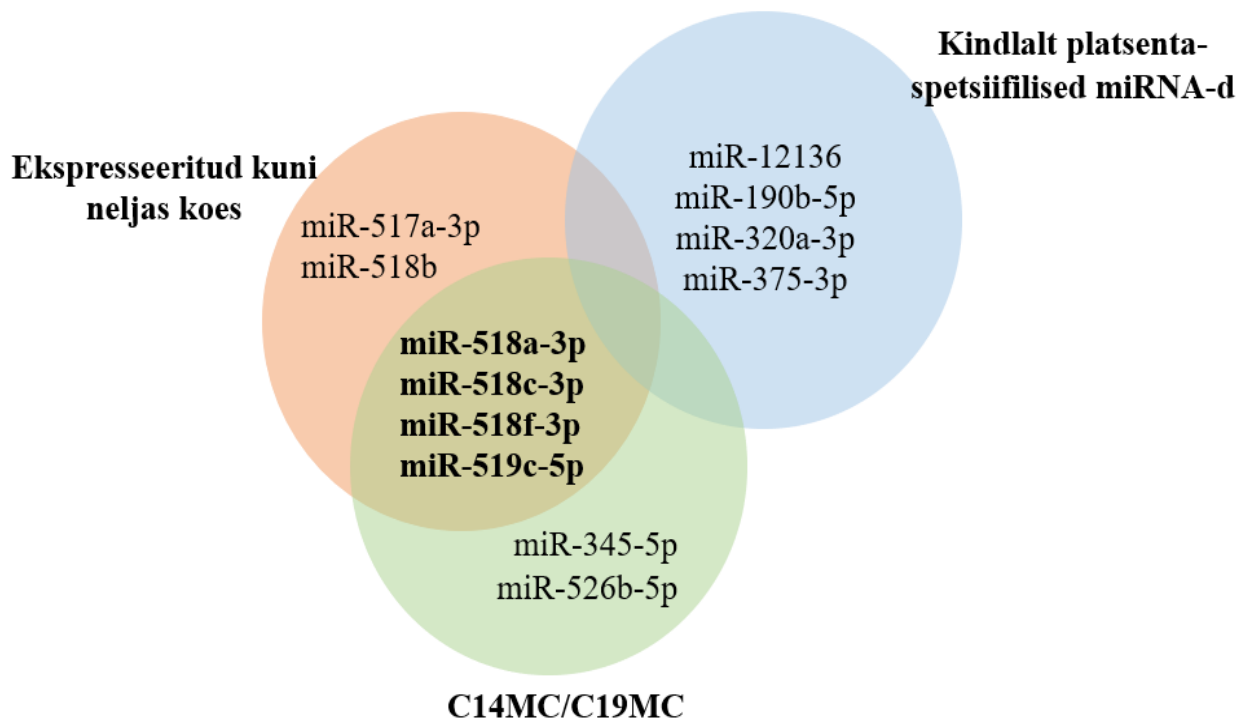


Joonis 5. Venn diagramm ekspresseeritud miRNA-de (CPM > 2,5) arvu jaotuvusest platsenta, seerumi ja uriini proovide vahel. Joonisel on toodud välja nii erinevate proovide vahel ühiste miRNA-de arv kui ka proovides olevate unikaalsete miRNA-de kogus. Platsenta, seerumi ja uriini proovides on ekspresseeritud 155 ühist miRNA-d.

Edasises andmete filtreerimises oli suuremat tähelepanu pööratud kindlalt platsentas ekspresseerunud 665-le miRNA-le (CPM > 2,5), mille ekspressioon on samuti tuvastatav nii seerumi kui ka uriini proovides (CPM > 2,5). Platsentas ja seerumis on tuvastatavad 142 samasugust miRNA-d, samal ajal kui platsenta ja uriini proovides 28. Kõigis kolmes proovis oli ekspresseerunud 155 ühist miRNA-d.

Kasutades kudede spetsiifiliste kirjeldavaid miRNA-de ekspressioone IMOTA ja miRmine andmebaase, olid välja toodud uriinis tuvastatavad platsenta-spetsiifilised miRNA-d (Joonis 6). IMOTA ja miRmine andmebaaside põhjal peaksid miRNA-d olema kudedes keskmise või kõrge tasemetega. Edasi olid välja valitud miRNA-d saavutanud hinnangu vastavalt nende ekspressioonimustrile erinevates kudedes. Kindlalt platsenta-spetsiifiliste miRNA-de ekspressioon esines kas ainult platsentas (IMOTA ja miRmine järgi) või kui andmebaasides ekspressiooniandmed puudusid, aga antud töös kasutatud proovide (n=9) sekveneerimisel oli

ekspressioon tuvastatud. Peale platsentat veel kuni neljas koes tuvastatavad miRNA-de ekspressioonid (IMOTA ja miRmine andmebaaside järgi) olid platsenta ekspressiooniga võrreldes samasugune või madalam. C14MC/C19MC moodustasid antud klastritesse kuuluvad miRNA-d, mille kõige kõrgem ekspressioon on märgatav eelkõige platsenta koes. Lõpliku platsenta-spetsiifiliste miRNA-de nimekirja moodustavad 12 miRNA-d.



Joonis 6. Platsentas ekspresseeruvate miRNA-de klasterdus. Joonisel on toodud miRNA-d (n=12), mis on tuvastatavad nii platsentas, seerumis kui uriinis (CPM > 2,5). miRNA-d klasterduvad kolme rühma: kindlalt platsenta-spetsiifilised, ekspresseeritud kuni neljas koes, C14MC/C19MC klastrisse kuuluvad.

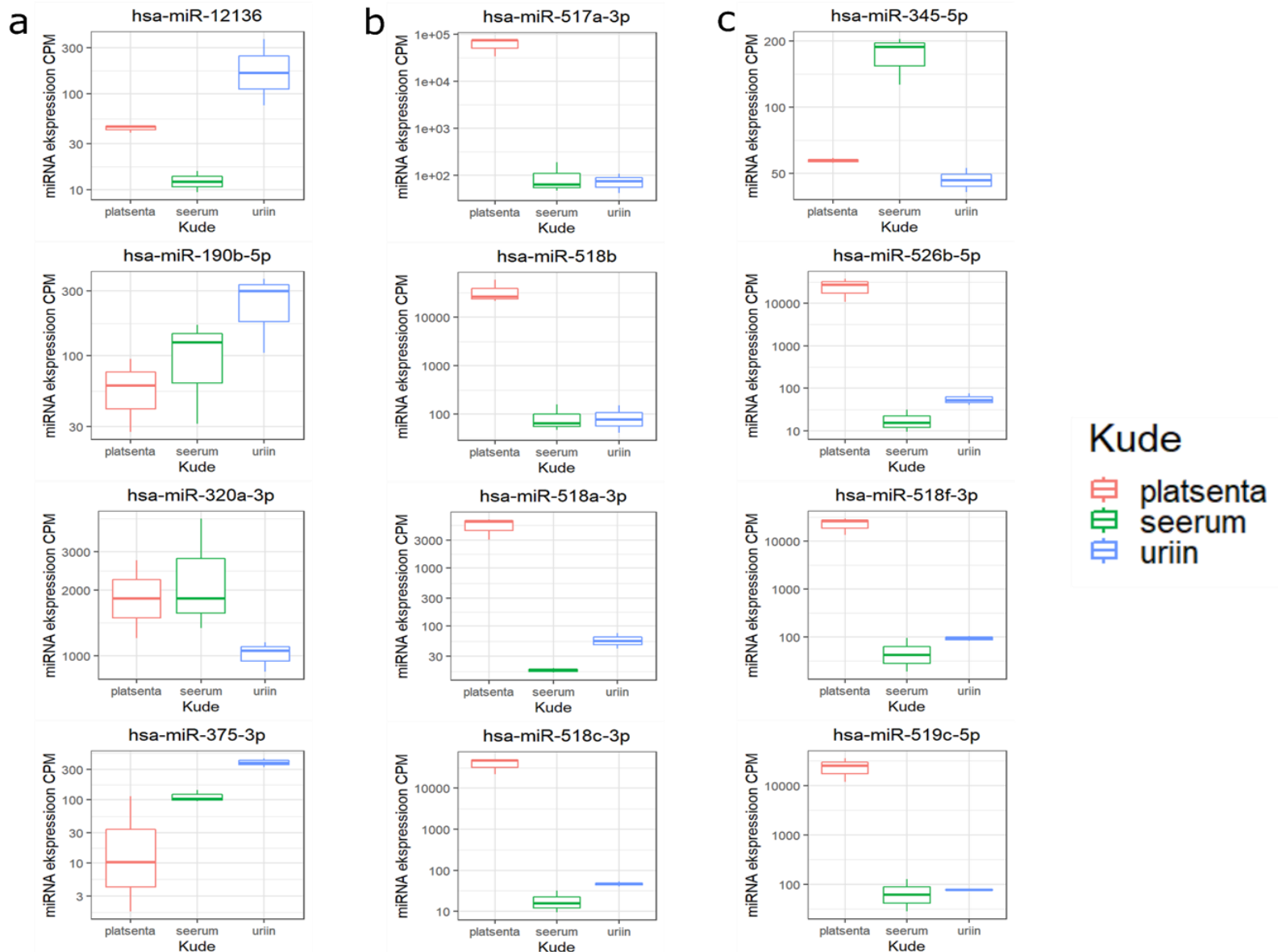
2.3.3. Seerumis ja uriinis tuvastatavate platsenta-spetsiifiliste mikroRNA-de kirjeldus

12 platsenta-spetsiifilise miRNA ekspressioonid platsenta koe, seerumi ja uriini proovides (n=9) koos keskmiste ja ekspressioonivahemikutega on toodud välja eraldi vastavalt Lisades 1, 2 ja 3.

Platsenta-spetsiifiliste 12 miRNA ekspressioonid (CPM), mis esinesid tervetelt rasedatelt võetud platsenta koes, seerumis ja uriinis (n=9), on toodud eraldi välja Joonisel 7. C19MC/C14MC klastritelt ko-ekspresseeruvate 7 miRNA-de puhul (hsa-miR-517a-3p, hsa-miR-518a-3p, hsa-miR-518b, hsa-miR-518c-3p, hsa-miR-518f-3p, hsa-miR-519c-5p, hsa-miR-526b-5p) esineb sarnane ekspressioonimuster, kus kõige kõrgem ekspresseeruvus on

täheldatud platsenta koes. Antud tulemus näitab, et need miRNA-d on halvad platsenta barjääri läbistajad.

miRNA-de hsa-miR-12136, hsa-miR-190b-5p ja hsa-miR-375-3p ekspressioonitasemed platsentas on palju madalamad kui seerumis või uriinis, viidates sellele, et antud miRNA-d ei kuulu platsenta-spetsiifiliste miRNA-de hulka, kuigi varasemalt pole nende ekspressiooni teistes kudedes tuvastatud. Lisaks hsa-miR-345-5p, mille ekspressioon on platsentast madalamal tasemel tuvastatud ka muudes organites ning kuulub C14MC miRNA-de hulka, ei pruugi olla piisavalt platsenta-spetsiifiline. Ainuke miRNA, mille ekspressiooni pole varem üheski teises koes tuvastatud IMOTA ja miRmine andmebaaside kohaselt ning on platsentas kõige kõrgema ekspressiooniga, on hsa-miR-320a-3p.



Joonis 7. Karpdiagrammid platsenta-spetsiifiliste miRNA-de (n=12) ekspressioonist platsentas, seerumis ja uriinis. (a) Kindlalt platsenta-spetsiifilised; (b) Ekspresseerunud kuni neljas koes, kõrgeim platsentas; (c) C14MC/C19MC.

2.4. Arutelu

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks oli leida, kas rasedate naiste uriinis leidub ekstratsellulaarseid platsenta-spetsiifilisi miRNA-sid, mida saaks kasutada tulevikus potentsiaalsete mitteinvasiivsete biomarkeritena rasedusega seotud komplikatsioonide tuvastamiseks. Antud eesmärgi saavutamiseks olid esmasel etapil võetud kolmelt tervelt naiselt platsenta, seerumi ja uriini proovid (n=9), mis olid kogutud Happy Pregnancy uuringu raames (aastatel 2012-2015) professor Maris Laane koordineerimisel. Proovidest oli autori poolt eraldatud totaalne RNA. Edasi oli analüüsimise jaoks teostatud järgmise põlvkonna sekveneerimine (NGS) (QIAGEN, Saksamaa). Saadud sekveneerimise tulemuste põhjal võrdles autor platsenta, seerumi ja uriini proovides tuvastatavaid miRNA-sid.

2.4.1. Totaalse RNA eraldamise ja saadud tulemuste analüüs

Totaalse RNA eraldamine uriini proovidest *miRNeasy Mini* komplekti kuuluva protokolliga järgi osutus keeruliseks, kuna totaalset RNA-d sisaldav vesifaas vajus tuubi põhja, siis kui protokolliga järgi peaks olema kõige pindmises kiht. Üks võimalik põhjus, mis seisab antud probleemi taga, on uriini eripära. Uriin sisaldab erinevas kontsentratsioonis lahustunud mineraale, mis võivad eraldamiseks kasutatavate kemikaalide tööd häirida. Lisaks sellele on normaalse uriiniseite koosseisus täheldatud ka väheses koguses punaseid ja valgeid verelibleid, lümfotsüüte kui ka kuseteid vooderdavaid epiteelrakke (Ringsrud, 2001). Need rakud satuvad uriini neerudest ja kuseteedest liikumisel, seega on neil rakkudel teine päritolu, mistõttu totaalset RNA eraldamisel oli vaja nendest lahti saada. Tekkinud probleemi lahendamiseks oli otsustatud enne *miRNeasy Mini* komplekti kuuluvate reagentide lisamist tsentrifuugida uriini proovid madalatel pöõretel (1000 x g). Antud modifikatsiooni jälgimise tulemusena oli vesifaasi asukoht muutunud õigeks.

Uuritavatest proovidest (n=9) saadud totaalsete RNA-de kogused ja puhtused (Tabel 5) omavad iseloomulikku mustrit, nimelt platsentadest eraldatud totaalset RNA kogused on keskmiselt 10 korda suuremad kui seerumist ja uriinist saadud totaalset RNA-d. Lisaks on platsentadest eraldatud totaalset RNA neeldumissuhte A260/A280 väärtus keskmiselt 2,04, mis on eraldatud RNA jaoks väga hea ja viitab sellele, et tegemist on puhtama saagisega. Kokkuvõtteks saab väita, et kui seerum ja uriin on totaalset RNA, sh miRNA, suhtes vaesed kehavedelikud, siis platsenta kude on miRNA-de suhtes rikas.

Seerumiproove on varasemalt kasutatud miRNA-de profiili hindamiseks erinevate haigusjuhtude nagu eesnäärmevähki (Mohammadi Torbati *et al.*, 2019) ning kardiovaskulaarsete haiguste (Çakmak ja Demir, 2020) korral. Käesoleva bakalaureusetöö põhjal on võimalik väita, et uriini ja seerumi miRNA-de profiilid nii kontsentratsiooni kui ka tuvastatavate miRNA-de osas on küllaltki sarnased. Näiteks esimese indiviidi puhul seerumi ja uriini proovide kontsentratsioonid on vastavalt 8,3 ja 8,6 ng/μl ning enamik kuni neljas koes ekspresseeritud ja C14MC/C19MC moodustavaid platsenta-spetsiifilisi miRNA-sid on seerumis ja uriinis ekspresseeritud sarnases vahemikus (10-100 CPM). See annab rohkem tõendust, et uriini põhised biomarkerite hindamise testid võiksid olla hea alternatiiv vereseerumi omadele.

2.4.2. Uriinist tuvastatavate platsenta-spetsiifiliste mikroRNA-de nimekirja koostamine

665 platsentas ekspresseerunud miRNA-st filtreerisin välja 12 miRNA-d (CPM > 2,5) (Joonis 6), mille ekspressioon oli samuti leitav seerumi ja uriini proovidest (CPM > 2,5), seega moodustavad antud miRNA-d uriinist tuvastatavate miRNA-de nimekirja. Kuna antud bakalaureusetöö eksperimentaalosa raames uurisin ainult tervete rasedate proovid, siis platsenta-spetsiifiliste miRNA-de nimekiri oli piiratud 12-ga. Samas aga saadud miRNA-de nimekiri ei ole ammendatud, sest raseduskomplikatsioonide korral (nt preeklampsia) võivad miRNA-de ekspressioonitasemed olla nii kõrged, et need on tuvastatavad nii seerumis kui ka uriinis. Varasemates uuringutes oli näidatud, et hsa-miR-26a, -130b ja -103 omavad seerumis kõrget ekspressiooni preeklampsia korral (Barchitta *et al.*, 2017) ning varases raseduses kõrge ekspressioonitasemetega hsa-miR-628-3p ja -5p leidmisel, oli hiljem avastatud PE (Martinez-Fierro *et al.*, 2019). Uriini miRNA-sid, mis omaksid otsest seost preeklampsia diagnoosiga, praegu veel teada ei ole.

Varasemast kirjandusest on teada, et antud töös välja valitud miRNA-d omavad enamasti kõrgemaid ekspressioonitasemeid just tervetel rasedatel naistel võrreldes mitterasedatega. Sellisteks on näiteks hsa-miR-320a-3p, -345-5p, -518a-3p, -518b ja -518c-3p, kusjuures viimased kolm miRNA-d on pärit 19. kromosoomist ning omavad kõrgemat ekspressiooni nii vereplasmas kui ka seerumis (Gu *et al.*, 2013; Menon *et al.*, 2019; Vashukova *et al.*, 2020). Lisaks on märgatud muutuv ekspressioon mõningate platsenta-spetsiifiliste miRNA-de seast PE korral. Hsa-miR-518c-3p ja hsa-miR-518f-3p puhul on platsentas täheldatud kõrge ekspressioon PE korral, siis kui hsa-miR-518b on alaekspresseeritud (Hromadnikova *et al.*, 2015; Hu ja Zhang, 2019; Zhang *et al.*, 2016). Muutuvat miRNA ekspressiooni on kirjeldatud ka vereplasmas, kus hsa-miR-320a-3p on üleekspresseeritud (Zhong *et al.*, 2019). Iseloomulikku ekspressioonimustrit omab hsa-miR-517a-

3p, sest antud miRNA on ülesreguleeritud preeklampilistes platsentades, aga plasmas näitab madalamat ekspressioonitasemet (Anton *et al.*, 2015; Fallen *et al.*, 2018).

2.4.3. Uriinis ringlevate mikroRNA-de profiili unikaalsus

Vaadates lähemalt, kuidas 12 platsenta-spetsiifilist miRNA-d on ekspresseeritud platsentas (Lisa 1), seerumis (Lisa 2) ja uriinis (Lisa 3) kolme indiviidi puhul, siis võib väita, et uriinis olev miRNA-de profiil on unikaalne iga indiviidi jaoks, sest ainult 5 miRNA-d (hsa-miR-12136, -190b-5p, -320a-3p, -517a-3p ja -526b-5p) esines kõigis kolmes indiviidis välja valitud 12 miRNA-st. Ülejäänud miRNA-d esinesid ainult kahes juhuslikus proovis kolmest. Antud tulemus võib olla tingitud nähtusest, et erinevatel indiviididel toimub varieeruva kiirusega vedelikvahetus, mis on otseselt seotud vere ja uriiniga. Kui võrrelda vere koosseisu uriiniga, siis koostise poolest on veri palju stabiilsem ning seda tagab vereringe. Vereringe kaudu liigub veri mööda kopsu ja neerude, hoides oma komponentide koostist tasakaalus reguleeriva mehhanismi abil, mis tähendab, et ka miRNA-d on erinevate indiviidide vahel samasugused (<https://www.britannica.com/science/blood-biochemistry>). Uriini koostis on aga alati ebastabiilne, sest jääkainete ja vee kontsentratsioonid alati muutuvad ja sellest tulenevalt ka indiviidide vahel võivad miRNA-de ekspressioonid varieeruda (<https://www.britannica.com/science/urine>). Sellest tulenevalt peaks suuremat tähelepanu pöörama tuvastatavate miRNA-de ekspressioonide suhetele, mis võivad olla püsivamad kui miRNA-de absoluutkontsentratsioonid.

2.4.4. Välja valitud mikroRNA-de ekspressioonide võrdlus rühmade järgi

Platsenta-spetsiifiliste miRNA-de (n=12) ekspressioonid platsentas, seerumis ja uriinis (Joonis 7) omavad iga rühma kohta omapärast ekspressioonimustrit. Kindlalt platsenta-spetsiifiliste miRNA-de hulka kuuluvad hsa-miR-190b-5p ja hsa-miR-375-3p on palju madalamalt ekspresseeritud platsenta koes, kui võrrelda seerumi ja uriini ekspressioonidega. Uriinis oleva hsa-miR-12136 ekspressioonitase on kõrge, siis kui seerumis on alaekspresseeritud. Platsentas keskmise ekspresseeruvusega hsa-miR-320a-3p on leitav seerumis samal tasemel, kuid uriinis on alaekspresseeritud. Kui miRNA-de ekspressioon on platsentas palju madalam kui kehavedelikes, siis tähendab see, et platsenta ei ole peamine organ, millest miRNA-d ekspresseeritakse, vaid on olemas mingi muu allikas. Tavaliselt võivad seerumi miRNA-d olla pärit maksast ning uriini miRNA-d seostatakse neerude patoloogiliste seisunditega (Zhou *et al.*, 2016).

Kõik kuni neljas koes ekspresseeritud miRNA-d jälgivad samasugust ekspressioonimustrit: hsa-miR-518b ja -518a-3p on 100 korda ning hsa-miR-518c-3p ja -517a-3p on peaaegu 1000 korda

kõrgema ekspressiooniga platsenta koes kui seerumis ja uriinis. Hsa-miR-518f-3p, -519c-5p ja -526b-3p, mis kuuluvad C14MC/C19MC klastrite alla, on samuti üleekspressseeritud platsentas, seerumis ja uriinis aga alaekspressseeritud, v.a hsa-miR-345-5p, mis on platsentas küll madala ekspressiooniga, kuid omab kõrgeid tasemeid seerumis. Lähtudes erinevates proovides saadud ekspressioonimustritest, võib eeldada, et tegelikult platsentas üleekspressseerunud miRNA-d on tõelised platsenta-spetsiifilised ning nende ekspressiooni madalad tasemed kehavedelikes näitavad, et platsenta barjäärist tuleb läbi madal fraktsioon, seega tõenäosus tuvastada selliseid miRNA-sid väljaspoolt platsentat on madal normaalse raseduse korral.

2.4.5. Raseduse tuvastamine platsenta-spetsiifiliste mikroRNA-de abil

Analüüsid antud bakalaureusetöös saadud tulemusi saab tõendada, et kuigi käesolevas töös kindlalt platsenta-spetsiifilisteks rühmitatud miRNA-d olid IMOTA ja miRmine andmebaaside põhjal ekspresseeritud ainult platsentas, siis tegelikult antud töös tehtud analüüsi põhjal oli nende ekspressioon platsentades üsna madal, mistõttu ei saa neid tõelisteks platsenta-spetsiifilisteks miRNA-deks nimetada. Hsa-miR-12136, 190b-5p ja -375-3p olid küll seerumis ja/või uriinis platsentaga võrreldes kõrgemalt ekspresseeritud, aga kokkuvõtvalt need miRNA-d on suurema tõenäosusega pärit mingist teisest organist. Mis puudutab kuni neljas koes ekspresseeritavaid ja C14MC/C19MC rühma alla kuuluvaid miRNA-sid, siis nende puhul saab kindlalt väita, et hsa-miR-517a-3p, -518a-3p, -518b, -518c-3p, -518f-3p, -519c-5p ning -526b-5p on tõelised platsenta-spetsiifilised miRNA-d, kuna nende ekspressioon platsentas on kõrge, samas aga ei läbi nad platsenta barjääri nii hästi, et olla samal ekspressioonitasemel platsentaga seerumis ja/või uriinis, mistõttu nende tuvastamine uriinis võib olla raskendatud. Sellele tulemusele tuginedes peaks tõenäoliselt tulevikus rasedusega seotud komplikatsioonide tuvastamiseks kasutama mitme erineva miRNA ekspressioonitaseme infot, et nende põhjal luua ennustusmodel.

Hsa-miR-320a-3p oli platsenta-spetsiifilistest ainus miRNA, mille ekspressioon oli platsentas keskmisel tasemel (1207,43 – 2734,29 CPM). Nagu eespool toodud varase kirjanduse näitel, on ka antud töös hsa-miR-320a-3p üleekspressseeritud rasedate naiste seerumis. Uriinis on ekspressioon madalam, aga sellegi poolest valitud 12 platsenta-spetsiifilisest miRNA-st on hsa-miR-320a-3p ainus, mille ekspressioon uriinis ulatub 1000 CPM-ni. Võttes arvesse antud miRNA-le omapärast ekspressioonimustrit, võib eeldada, et platsenta-spetsiifiline hsa-miR-320-3p on potentsiaalne mitteinvasiivne biomarker raseduse tuvastamiseks.

Tänapäeval enamasti tuvastatakse rasedust läbi koorionigonadotropiini taset veres ja uriinis, mis on üsna kiire ja odav meetod, samas aga ei võimalda koorionigonadotropiin määrata rasedusega kaasnevat komplikatsiooni (Morse *et al.*, 2018). Selle vastu on veres leitud palju düsreguleeritud miRNA-sid, mille kaudu saab näiteks preeklampsiat detekteerida (Yang *et al.*, 2020). Lähtudes faktist, et uriin on iseeneslikult erituv kehavedelik ja selles ringlevate platsenta-spetsiifiliste miRNA-de kaudu saab tõenäoliselt nii rasedust kui ka raseduskomplikatsiooni detekteerida mitteinvasiivselt, siis see teeb tulevikus miRNA-sid kliinilistes uuringutes palju eelistatumateks.

2.4.6. Tulevikuplaan

Kokkuvõtteks kinnitab käesolev töö, et platsentas ekspresseeruvad miRNA-d on võimalik tuvastada rasedate naiste seerumist ning lisaks annab uusi teadmisi miRNA profiili kohta rasedate naiste uriinis, mida eelnevalt ei ole veel uuritud. Praegusel hetkel pole aga teostatud töö põhjal veel võimalik täpselt öelda, milliste miRNA-de kaudu oleks võimalik raseduse kulgemisel mitteinvasiivselt jälgida rasedusega seotud komplikatsioonide tekkimist. Tänu antud töös teostatud analüüsile, kus olid selgeks tehtud potentsiaalsed platsentast pärit miRNA-d, on tulevikus palju lihtsam tuvastada platsenta-spetsiifilisi miRNA-sid, mis on seotud otseselt raseduskomplikatsioonidega, näiteks PE-ga. Seega on ka järgmise etapina plaanis sekveneerida PE gruppi kuuluvaid platsenta, seerumi ja uriini proove ning võrrelda omavahel antud töös saadud miRNA-de ekspressiooni PE korral olevate miRNA-de ekspressiooniga. Selline tulevikuplaan võiks eeldatavasti anda ka järgmise miRNA-de nimekirja, kus vaadeldakse uriinis ringlevaid platsenta-spetsiifilisi miRNA-sid juba PE diagnoosimise jaoks. Kuna käesolevas töös platsenta-spetsiifiliste miRNA-de (n=12) kohta on varasemast kirjandusest antud ka ülevaade nende seosest PE-ga, kus täpsemalt platsenta-spetsiifiliste miRNA-de hulka kuuluvad hsa-miR-571a-3p, -518b, -518c-3p ja -518f-3p on düsreguleeritud PE korral (Tabel 3), siis on ka mõistlikum edasi jätkata tööd PE gruppi kuuluvate proovidega.

KOKKUVÕTE

Käesoleva bakalaureusetöö raames oli kirjanduse põhjal antud ülevaade miRNA-dest ja nende omadusest säilida kehavedelikes ja funktsioneerida kui biomarkerid. Lisaks oli kirjanduse ülevaates käsitletud platsenta ja selle areng ning platsenta-spetsiifilised miRNA-d ja nende olemasolu kehavedelikes.

Töö üldine eesmärk oli leida raseduskomplikatsioonidega naiste uriinist platsenta-spetsiifilisi miRNA-sid, mis tulevikus võiksid panustada rasedusega seotud komplikatsioonide tuvastamisse mitteinvasiivsete meetmetega. Antud eesmärgi saavutamiseks oli autori poolt teostatud esimene osa tööst, mis seisnes totaalse RNA (sh miRNA) eraldamises 2012-2015 aastatel kogutud tervetelt rasedatelt platsenta, seerumi ja uriini proovidest. Seejärel teostati eraldatud miRNA-de sekveneerimist uue põlvkonna sekveneerimise (NGS) meetodi põhjal (QIAGEN, Saksamaa).

Sekveneerimise tulemuste põhjal oli välja valitud 12 platsenta-spetsiifilist miRNA-d, mille ekspressioon oli tuvastatav nii platsenta, seerumi kui ka uriini proovides (CPM > 2,5). Tuginedes miRNA-de andmebaasidele (IMOTA ja miRmine) olid 12 miRNA-d klasterdatud kolme rühma: kindlalt platsenta-spetsiifilised, kuni neljas koes ekspresseeritud ning C14MC/C19MC miRNA-d.

Tulemuste analüüsimisel selgus, et kindlalt platsenta-spetsiifiliste miRNA-de hulka kuuluvad hsa-miR-190b-5p, -375-3p ja -12136 on platsentas madalalt ekspresseeritud ja seega ei ole platsenta-spetsiifilised miRNA-d. Platsentas kõrgelt ekspresseeritud, kuid seerumis ja uriinis alareguleeritud hsa-miR-517a-3p, -518a-3p, -518b, -518c-3p, -518f-3p, -519c-5p ja -526b-5p ei läbi platsenta barjääri, mistõttu kuuluvad antud miRNA-d tõeliste platsenta-spetsiifiliste miRNA-de hulka. Võttes arvesse, et hsa-miR-320a-3p oli keskmise ekspressiooniga platsentas ja võrreldes ülejäänud 12 platsenta-spetsiifilise miRNA-ga kõige kõrgema ekspressioonitasemega uriinis, siis võib eeldada, et hsa-miR-320a-3p on potentsiaalne mitteinvasiivne biomarker raseduse tuvastamiseks.

Antud töö kinnitab, et platsenta-spetsiifilisi miRNA-sid on võimalik tuvastada seerumis ja annab hea ülevaate uriinis ringlevate platsenta-spetsiifiliste miRNA-de profiilidest, mida varem pole veel tehtud. Kuna antud töö raames olid autori poolt uuritud ainult tervete rasedate proovid ja nende miRNA-de profiilid, siis tulevikus on plaanitud uurida ka raseduskomplikatsioonidega naiste platsenta, seerumi ja uriini proovid, et leida eelkõige uriinis platsenta-spetsiifiliste miRNA-de ekspressiooniprofiili, mis võiks anda panust potentsiaalsete mitteinvasiivsete biomarkerite arendamisse raseduskomplikatsioonide tuvastamiseks.

Profile of microRNAs isolated from body fluids of healthy pregnant women

Galina Belova

SUMMARY

MicroRNAs (miRNAs) are short non-coding RNAs, which function as gene expression regulators at posttranscriptional level either by degrading mRNA or suppressing mRNA translation. Many miRNAs are expressed as constant extracellular vesicles so they can be observed in human tissues and body fluids. miRNAs with altered expression can be also found in spontaneously excreted body fluid like urine. These miRNAs had a noticeable impact in developing non-invasive biomarkers as it was shown that kidney diseases can be diagnosed by analysing expression of urinary miRNAs.

Placenta and its developing process through the entire pregnancy was also included into this bachelor's thesis. Consisting mainly of tissues, placenta expresses a certain amount of altered and specific miRNAs that can affect the formation of placenta. Placenta-related miRNAs show different expression patterns not only in placenta tissue but also in mother's bloodstream. There is no previous data available about urinary placenta-related miRNAs.

The overall goal was to observe urinary placenta-specific miRNAs that could be used as potential non-invasive biomarkers to detect pregnancy related complications in the future. To achieve this goal, the experimental part of this bachelor's thesis was focused on finding placenta-specific miRNAs in urine of healthy pregnant women. Firstly, it was necessary to extract total RNAs (including miRNAs) from placenta, serum and urine samples of pregnant women. These samples were collected as part of Happy Pregnancy project in the years 2012-2015. The next step was to perform miRNA sequencing using next generation sequencing technology (QIAGEN, Germany).

Among the miRNA sequencing results, 12 placenta-specific miRNAs with expression above 2.5 CPM in placenta, serum and urine samples were selected. Based on miRNA databases (IMOTA and miRmine), 12 miRNAs were clustered into three groups: firmly placenta-specific, expressed in up to four tissues, and C14MC/C19MC miRNAs. Analysis of the results revealed that hsa-miR-190b-5p, -375-3p, and -12136, which belonged to the firmly placenta-specific miRNAs, were in fact low expressed in placenta tissue and thus are not related to the placenta-specific miRNAs. hsa-miR-517a-3p, -518a-3p, -518b, -518c-3p, -518f-3p, -519c-5p, and -526b-5p showed high expression in placenta but were downregulated in serum and urine. Given that these miRNAs do

not cross the placental barrier, and therefore are true placenta-specific miRNAs. Hsa-miR-320a-3p with moderate expression in placenta and the highest expression level in urine compared to the other 12 placenta-specific miRNAs can be a potential non-invasive biomarker for pregnancy.

This bachelor thesis confirms that placenta-specific miRNAs can be detected in serum, but also provides a good overview of urinary placenta-specific miRNA profile, which was not previously done before. As only samples from healthy pregnant women and their miRNA profiles were studied by the author, it is planned to examine placental, serum and urine samples from women with pregnancy complications in the future to also find the expression profile of urinary placenta-specific miRNAs. This finding could contribute to the development of potential non-invasive biomarkers for the detection of pregnancy complications.

KASUTATUD KIRJANDUS

Agrawal, S., Tapmeier, T. T., Rahmioglu, N., Kirtley, S., Zondervan, K. T., ja Becker, C. M. (2018). The miRNA Mirage: How Close Are We to Finding a Non-Invasive Diagnostic Biomarker in Endometriosis? A Systematic Review. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(2).

Anton, L., Olarerin-George, A. O., Hogenesch, J. B., ja Elovitz, M. A. (2015). Placental Expression of miR-517a/b and miR-517c Contributes to Trophoblast Dysfunction and Preeclampsia. *PLOS ONE*, *10*(3), e0122707.

Aronson, J.K., ja Ferner, R.E. (2017). Biomarkers - A General Review, p. 9.23.1-9.23.17. In S. J. Enna, M. Williams, R. Frechette, T. Kenakin, P. McGonigle, ja B. Ruggeri (ed.), *Current Protocols in Pharmacology*, Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.

Awamleh, Z., Gloor, G. B., ja Han, V. K. M. (2019). Placental microRNAs in pregnancies with early onset intrauterine growth restriction and preeclampsia: Potential impact on gene expression and pathophysiology. *BMC Medical Genomics*, *12*(1), 91.

Barchitta, M., Maugeri, A., Quattrocchi, A., Agrifoglio, O., ja Agodi, A. (2017). The Role of MiRNAs as Biomarkers for Pregnancy Outcomes: A Comprehensive Review. *International Journal of Genomics*, *2017*, 1–11.

Beltrami, C., Simpson, K., Jesky, M., ... Bowen, T. (2018). Association of Elevated Urinary miR-126, miR-155, and miR-29b with Diabetic Kidney Disease. *The American Journal of Pathology*, *188*(9), 1982–1992.

Bonneau, E., Neveu, B., Kostantin, E., Tsongalis, G.J., ja De Guire, V. (2019). How Close Are MiRNAs from Clinical Practice? A Perspective on the Diagnostic and Therapeutic Market. *EJIFCC*, *30*, 114–127.

Bounds, K.R., Chiasson, V.L., Pan, L.J., Gupta, S., ja Chatterjee, P. (2017). MicroRNAs: New Players in the Pathobiology of Preeclampsia. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, *4*, 60.

Burton, G.J. ja Fowden, A.L. (2015). The Placenta: A Multifaceted, Transient Organ. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *370*, 20140066.

Burton, G.J., ja Jauniaux, E. (2015). What Is the Placenta? *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, *213*, S6.e1-S6.e4.

- Çakmak, H. A., ja Demir, M. (2020). MicroRNA and Cardiovascular Diseases. *Balkan Medical Journal*.
- Cai, M., Kolluru, G.K., ja Ahmed, A. (2017). Small Molecule, Big Prospects: MicroRNA in Pregnancy and Its Complications. *Journal of Pregnancy*, 2017, 1–15.
- Califf, R. M. (2018). Biomarker definitions and their applications. *Experimental Biology and Medicine*, 243(3), 213–221.
- Catalanotto, C., Cogoni, C., ja Zardo, G. (2016). MicroRNA in Control of Gene Expression: An Overview of Nuclear Functions. *International Journal of Molecular Sciences*, 17, 1712.
- Cava, C., Bertoli, G., ja Castiglioni, I. (2019). Portrait of Tissue-Specific Coexpression Networks of Noncoding RNAs (miRNA and lncRNA) and mRNAs in Normal Tissues. *Computational and Mathematical Methods in Medicine*, 2019, 1–14.
- Condrat, E. C., Thompson, D. C., Barbu, M. G., Bugnar, O. L., Boboc, A., Cretoiu, D., Suciu, N., Cretoiu, S. M., ja Voinea, S. C. (2020). miRNAs as Biomarkers in Disease: Latest Findings Regarding Their Role in Diagnosis and Prognosis. *Cells*, 9(2), 276.
- Conserva, F., Barozzino, M., Pesce, F., ... Gesualdo, L. (2019). Urinary miRNA-27b-3p and miRNA-1228-3p correlate with the progression of Kidney Fibrosis in Diabetic Nephropathy. *Scientific Reports*, 9(1), 11357.
- Cox, B., Leavey, K., Nosi, U., Wong, F., ja Kingdom, J. (2015). Placental Transcriptome in Development and Pathology: Expression, Function, and Methods of Analysis. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 213, S138–S151.
- Cretoiu, D., Xu, J., Xiao, J., Suciu, N., ja Cretoiu, S. M. (2016). Circulating MicroRNAs as Potential Molecular Biomarkers in Pathophysiological Evolution of Pregnancy. *Disease Markers*, 2016, 3851054.
- Cuffe, J.S.M., Holland, O., Salomon, C., Rice, G.E., ja Perkins, A.V. (2017). Review: Placental Derived Biomarkers of Pregnancy Disorders. *Placenta*, 54, 104–110.
- Cui, M., Wang, H., Yao, X., Zhang, D., Xie, Y., Cui, R., ja Zhang, X. (2019). Circulating MicroRNAs in Cancer: Potential and Challenge. *Frontiers in Genetics*, 10.
- Cullen, B.R. (2006). Viruses and MicroRNAs. *Nature Genetics*, 38, S25–S30.

- Cunningham, F.G., Leveno, K.J., Bloom, S.L., Dashe, J.S., Hoffman, B.L., Casey, B.M. ja Spong, C.Y. (2018). *Implantation and Placental Development*. Williams Obstetrics, 25th ed., McGraw-Hill Education, New York, NY.
- Davidson, L.M., ja Coward, K. (2016). Molecular Mechanisms of Membrane Interaction at Implantation: Molecular Mechanisms of Membrane Interaction at Implantation. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews*, *108*, 19–32.
- Di Meo, A., Brown, M. D., Finelli, A., Jewett, M. A. S., Diamandis, E. P., ja Yousef, G. M. (2020). Prognostic urinary miRNAs for the assessment of small renal masses. *Clinical Biochemistry*, *75*, 15–22.
- Donker, R. B., Mouillet, J. F., Chu, T., Hubel, C. A., Stolz, D. B., Morelli, A. E., ja Sadovsky, Y. (2012). The expression profile of C19MC microRNAs in primary human trophoblast cells and exosomes. *Molecular Human Reproduction*, *18*(8), 417–424.
- Eulalio, A., Huntzinger, E., ja Izaurralde, E. (2008). Getting to the Root of MiRNA-Mediated Gene Silencing. *Cell*, *132*, 9–14.
- Fallen, S., Baxter, D., Wu, X., Kim, T.-K., Shynlova, O., Lee, M. Y., Scherler, K., Lye, S., Hood, L., ja Wang, K. (2018). Extracellular vesicle RNAs reflect placenta dysfunction and are a biomarker source for preterm labour. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *22*(5), 2760–2773.
- Familiari, M., Cronqvist, T., Masoumi, Z., ja Hansson, S. R. (2017). Placenta-derived extracellular vesicles: Their cargo and possible functions. *Reproduction, Fertility and Development*, *29*(3), 433.
- Felekis, K., ja Papanephytous, C. (2020). Challenges in Using Circulating Micro-RNAs as Biomarkers for Cardiovascular Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(2), 561.
- Flick, A.A., ja Kahn, D.A. (2019). Maternal Physiology During Pregnancy & Fetal & Early Neonatal Physiology. In: DeCherney, A.H., Nathan, L., Laufer, N. and Roman, A.S., Eds., *Current Diagnosis & Treatment: Obstetrics & Gynecology*, 12th ed., McGraw-Hill Education, New York, NY.
- Fu, G., Brkić, J., Hayder, H., ja Peng, C. (2013). MicroRNAs in Human Placental Development and Pregnancy Complications. *International Journal of Molecular Sciences*, *14*, 5519–5544.

- Gagnon, R. (2003). Placental insufficiency and its consequences. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, *110*, S99–S107.
- Gan, L., Liu, Z., Wei, M., Chen, Y., Yang, X., Chen, L., ja Xiao, X. (2017). MiR-210 and MiR-155 as Potential Diagnostic Markers for Pre-Eclampsia Pregnancies: *Medicine*, *96*, e7515.
- Gebert, L.F.R., ja MacRae, I.J. (2019). Regulation of MicroRNA Function in Animals. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *20*, 21–37.
- Ghorbanmehr, N., Gharbi, S., Korsching, E., Tavallaei, M., Einollahi, B., ja Mowla, S. J. (2019). MiR-21-5p, miR-141-3p, and miR-205-5p levels in urine-promising biomarkers for the identification of prostate and bladder cancer. *The Prostate*, *79*(1), 88–95.
- Gu, Y., Sun, J., Groome, L. J., ja Wang, Y. (2013). Differential miRNA expression profiles between the first and third trimester human placentas. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, *304*(8), E836–E843.
- Gude, N.M., Roberts, C.T., Kalionis, B., ja King, R.G. (2004). Growth and Function of the Normal Human Placenta. *Thrombosis Research*, *114*, 397–407.
- Gunel, T., Kamali, N., Hosseini, M. K., Gumusoglu, E., Benian, A., ja Aydinli, K. (2020). Regulatory effect of miR-195 in the placental dysfunction of preeclampsia. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, *33*(6), 901–908.
- Guo, J., Liu, C., Wang, W., Liu, Y., He, H., Chen, C., Xiang, R., ja Luo, Y. (2018). Identification of serum miR-1915-3p and miR-455-3p as biomarkers for breast cancer. *PloS One*, *13*(7), e0200716.
- Güllü Amuran, G., Tinay, I., Filinte, D., Ilgin, C., Peker Eyüboğlu, I., ja Akkiprik, M. (2020). Urinary micro-RNA expressions and protein concentrations may differentiate bladder cancer patients from healthy controls. *International Urology and Nephrology*, *52*(3), 461–468.
- Hanna, J., Hossain, G. S., ja Kocerha, J. (2019). The Potential for microRNA Therapeutics and Clinical Research. *Frontiers in Genetics*, *10*, 478.
- Hayder, H., O'Brien, J., Nadeem, U., ja Peng, C. (2018). MicroRNAs: Crucial regulators of placental development. *Reproduction*, *155*(6), R259–R271.

- Hromadnikova, I., Kotlabova, K., Ivankova, K., ja Krofta, L. (2017). First Trimester Screening of Circulating C19MC MicroRNAs and the Evaluation of Their Potential to Predict the Onset of Preeclampsia and IUGR. Afink, G.B., Ed., PLOS ONE, 12, e0171756.
- Hromadnikova, I., Kotlabova, K., Ondrackova, M., Pirkova, P., Kestlerova, A., Novotna, V., Hympanova, L., ja Krofta, L. (2015). Expression Profile of C19MC microRNAs in Placental Tissue in Pregnancy-Related Complications. DNA and Cell Biology, 34(6), 437–457.
- Hu, ja Zhang. (2019). MicroRNAs in Uteroplacental Vascular Dysfunction. Cells, 8(11), 1344.
- Huang, X., Wu, L., Zhang, G., Tang, R., ja Zhou, X. (2019). Elevated MicroRNA-181a-5p Contributes to Trophoblast Dysfunction and Preeclampsia. Reproductive Sciences, 26(8), 1121–1129.
- Iwakawa, H., ja Tomari, Y. (2015). The Functions of MicroRNAs: MRNA Decay and Translational Repression. Trends in Cell Biology, 25, 651–665.
- Ji, L., Brkić, J., Liu, M., Fu, G., Peng, C., ja Wang, Y.-L. (2013). Placental trophoblast cell differentiation: Physiological regulation and pathological relevance to preeclampsia. Molecular Aspects of Medicine, 34(5), 981–1023.
- Juracek, J., ja Slaby, O. (2020). Urinary MicroRNAs as Emerging Class of Noninvasive Biomarkers. Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.), 2115, 221–247.
- Khalid, U., Newbury, L. J., Simpson, K., Jenkins, R. H., Bowen, T., Bates, L., Sheerin, N. S., Chavez, R., ja Fraser, D. J. (2019). A urinary microRNA panel that is an early predictive biomarker of delayed graft function following kidney transplantation. Scientific Reports, 9(1), 3584.
- Khan, S., Ayub, H., Khan, T., ja Wahid, F. (2019). MicroRNA biogenesis, gene silencing mechanisms and role in breast, ovarian and prostate cancer. Biochimie, 167, 12–24.
- Kibble, J.D., ja Halsey, C.R. (2015). Reproductive Physiology. Medical Physiology: The Big Picture, McGraw-Hill Education, New York, NY.
- Kim, Y.-K. (2015). Extracellular microRNAs as Biomarkers in Human Disease. Chonnam Medical Journal, 51(2), 51.
- Kim, S.-M., ja Kim, J.-S. (2017). A Review of Mechanisms of Implantation. Development & Reproduction, 21(4), 351–359.

- Knöfler, M., Haider, S., Saleh, L., Pollheimer, J., Gamage, T. K. J. B., ja James, J. (2019). Human Placenta and Trophoblast Development: Key Molecular Mechanisms and Model Systems. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *76* (18): 3479–96.
- Kong, Q., Guo, X., Guo, Z., ja Su, T. (2019). Urinary Exosome miR-424 and miR-218 as Biomarkers for Type 1 Diabetes in Children. *Clinical Laboratory*, *65*.
- Krzywińska, O., Bracha, M., Jeanniere, C., Recchia, E., Kędziora Kornatowska, K., ja Kozakiewicz, M. (2020). Meta-Analysis of the Potential Role of miRNA-21 in Cardiovascular System Function Monitoring. *BioMed Research International*, Hindawi.
- Landgraf, P., Rusu, M., Sheridan R., ... Tuschl, T. (2007). A Mammalian MicroRNA Expression Atlas Based on Small RNA Library Sequencing. *Cell*, *129*, 1401–1414.
- Lawrie, C. H., Gal, S., Dunlop, H. M., ... Harris, A. L. (2008). Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *British Journal of Haematology*, *141*(5), 672–675.
- Li, H., Ouyang, Y., Sadovsky, E., Parks, W. T., Chu, T., ja Sadovsky, Y. (2020). Unique microRNA Signals in Plasma Exosomes from Pregnancies Complicated by Preeclampsia. *Hypertension*, *75*(3), 762–771.
- Ludwig, N., Leidinger, P., Becker K., ... Keller, A. (2016). Distribution of MiRNA Expression across Human Tissues. *Nucleic Acids Research*, *44*, 3865–3877.
- Lykoudi, A., Kolialexi, A., Lambrou, G. I., Braoudaki, M., Siristatidis, C., Papaioanou, G. K., Tzetis, M., Mavrou, A., ja Papantoniou, N. (2018). Dysregulated placental microRNAs in Early and Late onset Preeclampsia. *Placenta*, *61*, 24–32.
- Madadi, S., Saidijam, M., Yavari, B., ja Soleimani, M. (2020). Downregulation of serum miR-106b: A potential biomarker for Alzheimer disease. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 1–5.
- Maeda, K., Sasaki, H., Ueda, S., ... Ohmichi, M. (2020). Serum exosomal microRNA-34a as a potential biomarker in epithelial ovarian cancer. *Journal of Ovarian Research*, *13*(1), 47.
- Makarova, J. A., Shkurnikov, M. U., Wicklein, D., Lange, T., Samatov, T. R., Turchinovich, A. A., ja Tonevitsky, A. G. (2016). Intracellular and extracellular microRNA: An update on localization and biological role. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry*, *51*(3–4), 33–49.

- Martinez-Fierro, M. L., Carrillo-Arriaga, J. G., Luevano, M., Lugo-Trampe, A., Delgado-Enciso, I., Rodriguez-Sanchez, I. P., ja Garza-Veloz, I. (2019). Serum levels of miR-628-3p and miR-628-5p during the early pregnancy are increased in women who subsequently develop preeclampsia. *Pregnancy Hypertension*, *16*, 120–125.
- Menon, R., Debnath, C., Lai, A., Guanzon, D., Bhatnagar, S., Kshetrapal, P. K., Sheller-Miller, S., Salomon, C., ja The Garbhini Study Team. (2019). Circulating Exosomal miRNA Profile During Term and Preterm Birth Pregnancies: A Longitudinal Study. *Endocrinology*, *160*(2), 249–275.
- Mescher, A.L. (2018). The Female Reproductive System. *Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas*, 15th ed., McGraw-Hill Education, New York, NY.
- Miao, H., Mistelbauer, G., Karimov, A., ... Groller, M.E. (2017). Placenta Maps: In Utero Placental Health Assessment of the Human Fetus. *IEEE Transactions on Visualization and Computer Graphics*, *23*, 1612–1623.
- Michlewski, G., ja Cáceres, J. F. (2019). Post-transcriptional control of miRNA biogenesis. *RNA*, *25*(1), 1–16.
- Mohammadi Torbati, P., Asadi, F., ja Fard-Esfahani, P. (2019). Circulating miR-20a and miR-26a as Biomarkers in Prostate Cancer. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP*, *20*(5), 1453–1456.
- Montagnana, M., Benati, M., Tagetti, A., ... Lippi, G. (2019). Evaluation of circ_100219 and miR-135b in serum and exosomes of healthy pregnant women. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, 1–6.
- Morales-Prieto, D.M., Ospina-Prieto, S., Chaiwangyen, W., Schoenleben, M., ja Markert, U.R. (2013). Pregnancy-associated miRNA-clusters. *Journal of Reproductive Immunology*, *97*, 51–61.
- Mori, M. A., Ludwig, R. G., Garcia-Martin, R., Brandão, B. B., ja Kahn, C. R. (2019). Extracellular miRNAs: From Biomarkers to Mediators of Physiology and Disease. *Cell Metabolism*, *30*(4), 656–673.
- Morse, J. E., Calvert, S. B., Jurkowski, C., Tassinari, M., Sewell, C. A., ja Myers, E. R. (2018). Evidence-based pregnancy testing in clinical trials: Recommendations from a multi-stakeholder development process. *PLoS ONE*, *13*(9).

- Mouillet, J.-F., Chu, T., Hubel, C. A., Nelson, D. M., Parks, W. T., & Sadovsky, Y. (2010). The levels of hypoxia-regulated microRNAs in plasma of pregnant women with fetal growth restriction. *Placenta*, *31*(9), 781–784.
- Mouillet, J.-F., Ouyang, Y., Coyne, C.B., ja Sadovsky, Y. (2015). MicroRNAs in Placental Health and Disease. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, *213*, S163–S172.
- Nekoohesh, L., Modarressi, M.H., Mowla, S.J., ... Ghafouri-Fard, S. (2018). Expression Profile of MiRNAs in Urine Samples of Bladder Cancer Patients. *Biomarkers in Medicine*, *12*, 1311–1321.
- Neudecker, V., Brodsky, K. S., Kreth, S., Ginde, A. A., ja Eltzschig, H. K. (2016). Emerging Roles for MicroRNAs in Perioperative Medicine: *Anesthesiology*, *124*(2), 489–506.
- Niu, Z., Han, T., Sun, X., Luan, L., Gou, W., ja Zhu, X. (2018). MicroRNA-30a-3p is overexpressed in the placentas of patients with preeclampsia and affects trophoblast invasion and apoptosis by its effects on IGF-1. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, *218*(2), 249.e1-249.e12.
- O'Brien, J., Hayder, H., Zayed, Y., ja Peng, C. (2018). Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Frontiers in Endocrinology*, *9*, 402.
- Ortiz-Quintero, B. (2016). Cell-Free MicroRNAs in Blood and Other Body Fluids, as Cancer Biomarkers. *Cell Proliferation*, *49*, 281–303.
- Ouyang, Y., Mouillet, J.-F., Coyne, C. B., ja Sadovsky, Y. (2014). Review: Placenta-specific microRNAs in exosomes – Good things come in nano-packages. *Placenta*, *35*, S69–S73.
- Palmieri, V., Backes, C., Ludwig, N., Fehlmann, T., Kern, F., Meese, E., ja Keller, A. (2018). IMOTA: An interactive multi-omics tissue atlas for the analysis of human miRNA–target interactions. *Nucleic Acids Research*, *46*(D1), D770–D775.
- Panwar, B., Omenn, G. S., ja Guan, Y. (2017). miRmine: A Database of Human miRNA Expression Profiles. *Bioinformatics*, btx019.
- Paunescu, I.A., Bardan, R., Marcu, A., ... Marian, C. (2019). Biomarker Potential of Plasma MicroRNA-150-5p in Prostate Cancer. *Medicina*, *55*, 564.

- Peres, G.M., Mariana, M., ja Cairrão, E. (2018). Pre-Eclampsia and Eclampsia: An Update on the Pharmacological Treatment Applied in Portugal. *Journal of Cardiovascular Development and Disease*, 5.
- Perez-Hernandez, J., Olivares, D., Forner, M. J., Ortega, A., Solaz, E., Martinez, F., Chaves, F. J., Redon, J., ja Cortes, R. (2018). Urinary exosome miR-146a is a potential marker of albuminuria in essential hypertension. *Journal of Translational Medicine*, 16(1), 228.
- Ringsrud, K. M. (2001). Cells in the Urine Sediment. *Laboratory Medicine*, 32(3), 153–155.
- Ritter, A., Hirschfeld, M., Berner, K., ... Erbes, T. (2020). Discovery of potential serum and urine-based microRNA as minimally-invasive biomarkers for breast and gynecological cancer. *Cancer Biomarkers*, 27(2), 225–242.
- Sadovsky, Y., Mouillet, J.-F., Ouyang, Y., Bayer, A., ja Coyne, C. B. (2015). The Function of TrophomiRs and Other MicroRNAs in the Human Placenta. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 5(8), a023036.
- Saliminejad, K., Khorram Khorshid, H. R., Soleymani Fard, S., ja Ghaffari, S. H. (2019). An overview of microRNAs: Biology, functions, therapeutics, and analysis methods. *Journal of Cellular Physiology*, 234(5), 5451–5465.
- Salloum-Asfar, S., Satheesh, N. J., ja Abdulla, S. A. (2019). Circulating miRNAs, Small but Promising Biomarkers for Autism Spectrum Disorder. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 12.
- Savari, B., Boozarpour, S., Tahmasebi-Birgani, M., Sabouri, H., & Hosseini, S. M. (2020). Overexpression of microRNA-21 in the Serum of Breast Cancer Patients. *MicroRNA (Sharīqah, United Arab Emirates)*, 9(1), 58–63.
- Scott, H. (2017). Extracellular microRNAs as messengers in the central and peripheral nervous system. *Neuronal Signaling*, 1(4).
- Sonoda, H., Lee, B. R., Park, K.-H., Nihalani, D., Yoon, J.-H., Ikeda, M., ja Kwon, S.-H. (2019). MiRNA profiling of urinary exosomes to assess the progression of acute kidney injury. *Scientific Reports*, 9(1), 4692.
- Staud, F., ja Karahoda, R. (2018). Trophoblast: The Central Unit of Fetal Growth, Protection and Programming. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 105: 35–40.

- Stuopelyte, K., Daniunaite, K., Bakavicius, A., Lazutka, J.R., Jankevicius, F., ja Jarmalaite, S. (2016a). The Utility of Urine-Circulating MiRNAs for Detection of Prostate Cancer. *British Journal of Cancer*, *115*, 707–715.
- Stuopelytė, K., Daniūnaitė, K., Jankevičius, F., ja Jarmalaitė, S. (2016b). Detection of miRNAs in urine of prostate cancer patients. *Medicina*, *52*, 116–124.
- Sun, I. O., ja Lerman, L. O. (2019). Urinary microRNA in kidney disease: Utility and roles. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, *316*(5), F785–F793.
- Syed, R. M., ja Deiuliis, J. A. (2019). Role of MicroRNAs in Metabolic Diseases. *MicroRNAs in Diseases and Disorders*, *2*, 36–75.
- Takahashi, H., Ohkuchi, A., Kuwata, T., Usui, R., Baba, Y., Suzuki, H., Chaw Kyi, T. T., Matsubara, S., Saito, S., ja Takizawa, T. (2017). Endogenous and exogenous miR-520c-3p modulates CD44-mediated extravillous trophoblast invasion. *Placenta*, *50*, 25–31.
- Tang, Q., Gui, J., Wu, X., ja Wu, W. (2019). Downregulation of miR-424 in placenta is associated with severe preeclampsia. *Pregnancy Hypertension*, *17*, 109–112.
- Treiber, T., Treiber, N., ja Meister, G. (2019). Regulation of microRNA biogenesis and its crosstalk with other cellular pathways. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *20*(1), 5–20.
- Ura, B., Feriotto, G., Monasta, L., Bilel, S., Zweyer, M., ja Celeghini, C. (2014). Potential role of circulating microRNAs as early markers of preeclampsia. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology*, *53*(2), 232–234.
- Vashukova, E. S., Glotov, A. S., ja Baranov, V. S. (2020). MicroRNAs Associated with Preeclampsia. *Russian Journal of Genetics*, *56*(1), 1–16.
- Wang, J., Pan, Y., Dai, F., Wang, F., Qiu, H., ja Huang, X. (2020). Serum miR-195-5p is upregulated in gestational diabetes mellitus. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, e23325.
- Weber, J.A., Baxter, D.H., Zhang, S., Huang, D.Y., How Huang, K., Jen Lee, M., Galas, D.J., ja Wang, K. (2010). The MicroRNA Spectrum in 12 Body Fluids. *Clinical Chemistry*, *56*, 1733–1741.
- Yang, C., Song, G., ja Lim, W. (2019a). Effects of extracellular vesicles on placentation and pregnancy disorders. *Reproduction*, *158*(5), R189–R196.

- Yang, H., Ma, Q., Wang, Y., ja Tang, Z. (2020). Clinical application of exosomes and circulating microRNAs in the diagnosis of pregnancy complications and foetal abnormalities. *Journal of Translational Medicine*, *18*(1), 32.
- Yang, H., Zhang, H., Meng, F., Han, S., ja Zhang, M. (2019b). Differential expression of microRNA-411 and 376c is associated with hypertension in pregnancy. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, *52*(4), e7546.
- Zhang, L., Li, H., Yuan, M., Li, D., Sun, C., ja Wang, G. (2020a). Serum Exosomal MicroRNAs as Potential Circulating Biomarkers for Endometriosis. *Disease Markers*, 2020, 2456340.
- Zhang, M., Muralimanoharan, S., Wortman, A. C., ja Mendelson, C. R. (2016). Primate-specific miR-515 family members inhibit key genes in human trophoblast differentiation and are upregulated in preeclampsia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *113*(45), E7069–E7076.
- Zhang, W., Su, X., Li, S., Liu, Z., Wang, Q., ja Zeng, H. (2020b). Low serum exosomal miR-484 expression predicts unfavorable prognosis in ovarian cancer. *Cancer Biomarkers: Section A of Disease Markers*, *27*(4), 485–491.
- Zhao, C., Sun, X., ja Li, L. (2019). Biogenesis and function of extracellular miRNAs. *ExRNA*, *1*(1), 38.
- Zhong, Y., Zhu, F., ja Ding, Y. (2019). Differential microRNA expression profile in the plasma of preeclampsia and normal pregnancies. *Experimental and Therapeutic Medicine*.
- Zhou, M., Hara, H., Dai, Y., Mou, L., Cooper, D. K. C., Wu, C., ja Cai, Z. (2016). Circulating Organ-Specific MicroRNAs Serve as Biomarkers in Organ-Specific Diseases: Implications for Organ Allo- and Xeno-Transplantation. *International Journal of Molecular Sciences*, *17*(8).

KASUTATUD VEEBIAADRESSID

Kapila, V., ja Chaudhry K. (2019). *Physiology, Placenta*. Kasutatud 28.01.2020

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538332/>

miRbase: the microRNA database (v.22.1). Kasutatud 28.02.2020

<http://mirbase.org/textsearch.shtml?q=hsa>

IMOTA database. Kasutatud 15.04.2020

<https://ccb-web.cs.uni-saarland.de/imota/mit/>

Uriini koostis. Kasutatud 29.04.2020

<https://www.britannica.com/science/urine>

Vere koostis. Kasutatud 29.04.2020

<https://www.britannica.com/science/blood-biochemistry>

LISAD

Lisa 1

Tabel 6. MikroRNA-de ekspressioon (CPM) platsenta koe proovides

miRNA-d	Platsenta-1 (CPM)	Platsenta-2 (CPM)	Platsenta-3 (CPM)	Keskmine (CPM)	Vahemik (CPM)
hsa-miR-12136	45,64	46,73	39,13	43,83	39,13 – 46,73
hsa-miR-190b-5p	60,51	27,38	94,98	60,96	27,38 – 94,98
hsa-miR-320a-3p	1832,82	1207,43	2734,29	1924,85	1207,43 – 2734,29
hsa-miR-345-5p	55,90	58,79	56,99	57,22	55,90 – 58,79
hsa-miR-375-3p	10,26	112,55	1,70	41,50	1,70 – 112,55
hsa-miR-517a-3p	76730,85	34328,19	76768,30	62609,11	34328,19 – 76768,30
hsa-miR-518a-3p	6893,32	3074,11	6401,66	5456,36	3074,11 – 6893,32
hsa-miR-518b	59355,51	21687,57	26339,82	35794,30	21687,57 – 59355,51
hsa-miR-518c-3p	51122,19	21938,81	47825,74	40295,58	21938,81 – 51122,19
hsa-miR-518f-3p	29905,83	13659,87	26222,16	23262,62	13659,87 – 29905,83
hsa-miR-519c-5p	25224,56	11845,96	35848,89	24306,47	11845,96 – 35848,89
hsa-miR-526b-5p	27625,58	10775,95	37984,67	25462,07	10775,95 – 37984,67

Lisa 2

Tabel 7. MikroRNA-de ekspressioon (CPM) seerumi proovides

miRNA-d	Seerum-1 (CPM)	Seerum-2 (CPM)	Seerum-3 (CPM)	Keskmine (CPM)	Vahemik (CPM)
hsa-miR-12136	0,00	9,40	15,69	8,36	0,00 – 15,69
hsa-miR-190b-5p	31,56	169,19	125,49	108,74	31,56 – 169,19
hsa-miR-320a-3p	1830,20	1344,08	4251,01	2475,10	1344,08 – 4251,01
hsa-miR-345-5p	126,22	187,98	203,92	172,71	126,22 – 203,92
hsa-miR-375-5p	94,67	103,39	141,18	113,08	94,67 – 141,18
hsa-miR-517a-3p	189,33	47,00	62,75	99,69	47,00 – 189,33
hsa-miR-518a-3p	0,00	18,80	15,69	11,49	0,00 – 18,80
hsa-miR-518b	157,78	65,79	47,06	90,21	47,06 – 157,78
hsa-miR-518c-3p	31,56	9,40	15,69	18,88	9,40 – 31,56
hsa-miR-518f-3p	94,67	18,80	0,00	37,82	0,00 – 94,67
hsa-miR-519c-5p	126,22	28,20	62,75	72,39	28,20 – 126,22
hsa-miR-526b-5p	31,56	9,40	15,69	18,88	9,40 – 31,56

Lisa 3

Tabel 8. MikroRNA-de ekspressioon (CPM) uriini proovides

miRNA-d	Uriin-1 (CPM)	Uriin-2 (CPM)	Uriin-3 (CPM)	Keskmine (CPM)	Vahemik (CPM)
hsa-miR-12136	75,34	164,33	369,48	203,05	75,34 – 369,48
hsa-miR-190b-5p	301,37	369,73	105,57	258,89	105,57 – 369,73
hsa-miR-320a-3p	1054,80	1150,28	844,53	1016,54	844,53 – 1150,28
hsa-miR-345-5p	0,00	41,08	52,78	31,29	0,00 – 52,78
hsa-miR-375-5p	452,06	328,65	0,00	260,24	0,00 – 452,06
hsa-miR-517a-3p	75,34	41,08	105,57	74,00	41,08 – 105,57
hsa-miR-518a-3p	75,34	41,08	0,00	38,81	0,00 – 75,34
hsa-miR-518b	150,69	41,08	0,00	63,92	0,00 – 150,69
hsa-miR-518c-3p	0,00	41,08	52,78	31,29	0,00 – 52,78
hsa-miR-518f-3p	0,00	82,16	105,57	62,58	0,00 – 105,57
hsa-miR-519c-5p	75,34	82,16	0,00	52,50	0,00 – 82,16
hsa-miR-526b-5p	75,34	41,08	52,78	56,40	41,08 – 75,34

LIHTLITSENTS

Mina, Galina Belova,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose „Tervete rasedate naiste kehavedelikest eraldatud mikroRNA-de profiil“, mille juhendajad on Rain Inno, Timo Tõnis Sikka ja Maris Laan, reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 3.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Galina Belova

08.06.2020