

УРОВЕНЬ микроРНК MIR-374 ПОВЫШАЕТСЯ В КЛЕТКАХ BEWO B30 ПРИ ГИПОКСИИ

Е. Н. Князев^{1,2,3} ✉, С. Ю. Пауль^{2,4}¹ Институт биоорганической химии имени М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова, Москва, Россия² Национальный исследовательский университет «Высшая школа экономики», Москва, Россия³ Центр трансляционных технологий, Москва, Россия⁴ Троицкий инженерный центр, Москва, Россия

Воздействие гипоксии на клетки трофобласта в процессе формирования плаценты человека может приводить к развитию ряда патологий беременности, таких как преэклампсия и задержка роста плода. Патогенез данных состояний не до конца раскрыт и может быть связан с изменением экспрессии в трофобласте ряда генов и регуляторных молекул, включая микроРНК. Целью данного исследования было изучить профили микроРНК и экспрессии соответствующих генов-мишеней в модели гипоксии трофобласта. Моделирование трофобласта проводили с использованием клеточной линии хориокарциномы человека BeWo b30. В качестве индукторов гипоксического ответа использовали хлорид кобальта (CoCl₂) и производное оксихинолина. Анализировали уровень мРНК и микроРНК с помощью секвенирования следующего поколения (NGS) с подтверждением экспрессии отдельных генов ПЦР. Анализировали вторичную структуру мРНК гена-мишени значимо изменившихся микроРНК и возможную конкуренцию за места связывания. Изменение экспрессии ключевых генов ответа на гипоксию подтвердило релевантность CoCl₂ и производного оксихинолина в качестве индукторов гипоксии. Выявлено повышение уровня микроРНК семейства miR-374 при индукции гипоксического пути в модели трофобласта. Наблюдаемые изменения сопровождались снижением экспрессии мРНК гена *FOXM1*, которая служит мишенью для hsa-miR-374a-5p и hsa-miR-374b-5p. Данные микроРНК могут конкурировать за места связывания в мРНК *FOXM1* с hsa-miR-21-5p. Участие гена *FOXM1* в регуляции инвазивного потенциала клеток позволяет предположить роль микроРНК miR-374 и *FOXM1* в патогенезе нарушения инвазии трофобласта при формировании плаценты как предпосылки к развитию задержки роста плода и преэклампсии.

Ключевые слова: плацента, хориокарцинома, BeWo, гипоксия, кобальт, оксихинолин, *FOXM1*, микроРНК, miR-374a-5p, miR-374b-5p

Финансирование: исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 19-74-00145).

Вклад авторов: Е. Н. Князев — анализ литературы, планирование исследования, сбор и интерпретация данных, подготовка рукописи; С. Ю. Пауль — анализ литературы, анализ данных, подготовка рукописи.

Соблюдение этических стандартов: работа выполнена с соблюдением этических принципов и требований Хельсинкской декларации Всемирной медицинской организации и последующих ее пересмотров.

✉ **Для корреспонденции:** Евгений Николаевич Князев
ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10, г. Москва, 117437; knyazevevg@gmail.com

Статья получена: 20.04.2021 **Статья принята к печати:** 28.04.2021 **Опубликована онлайн:** 30.04.2021

DOI: 10.24075/vrgmu.2021.021

LEVELS OF MIR-374 INCREASE IN BEWO B30 CELLS EXPOSED TO HYPOXIA

Knyazev EN^{1,2,3} ✉, Paul SYu^{2,4}¹ Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Moscow² National Research University Higher School of Economics, Moscow³ Translational Technology Center, Moscow⁴ Troitsk Research and Development Center, Moscow

In humans, trophoblast hypoxia during placental development can be a cause of serious pregnancy complications, such as preeclampsia and fetal growth restriction. The pathogenesis of these conditions is not fully clear and may be associated with changed expression of some genes and regulatory molecules, including miRNA, in trophoblast cells. The aim of this study was to analyze miRNA profiles and measure the expression of their target genes in a model of trophoblast hypoxia. Human choriocarcinoma BeWo b30 cells were used as a trophoblast model. Hypoxia was induced by cobalt chloride (CoCl₂) and an oxyquinoline derivative. mRNA and miRNA expression profiles were evaluated by means of next generation sequencing (NGS); the expression of individual genes was analyzed by PCR. We studied the secondary structure of mRNAs of target genes for those miRNAs whose expression had changed significantly and analyzed potential competition between these miRNAs for the binding site. The observed changes in the expression of the key genes involved in the response to hypoxia confirmed the feasibility of using CoCl₂ and the oxyquinoline derivative as hypoxia inducers. The analysis revealed an increase in miR-374 levels following the activation of the hypoxia pathway in our trophoblast model. The changes were accompanied by a reduction in *FOXM1* mRNA expression; this mRNA is a target for hsa-miR-374a-5p and hsa-miR-374b-5p, which can compete with hsa-miR-21-5p for the binding sites on *FOXM1* mRNA. The involvement of *FOXM1* in the regulation of the invasive cell potential suggests the role of miR-374 and *FOXM1* in the pathogenesis of disrupted trophoblast invasion during placental development as predisposing for fetal growth restriction and preeclampsia.

Keywords: placenta, choriocarcinoma, BeWo, hypoxia, cobalt, oxyquinoline, *FOXM1*, microRNA, miR-374a-5p, miR-374b-5p

Funding: This work was supported by the Russian Science Foundation (Grant № 19-74-00145).

Author contribution: Knyazev EN analyzed the literature, planned the study, collected and interpreted the obtained data, and wrote the manuscript; Paul SYu analyzed the literature and the obtained data and wrote the manuscript.

Compliance with ethical standards: the study complied with the Declaration of Helsinki.

✉ **Correspondence should be addressed:** Evgeny N. Knyazev
Miklouho-Maclay, 16/10, Moscow, 117437; knyazevevg@gmail.com

Received: 20.04.2021 **Accepted:** 28.04.2021 **Published online:** 30.04.2021

DOI: 10.24075/brsmu.2021.021

Поддержание гомеостаза при развитии плода — необходимое условие нормального протекания беременности. Замещение эндотелия спиральных артерий матки клетками трофобласта делает сосуды нечувствительными к системным регуляторам тонуса, что обеспечивает постоянный приток крови к плаценте и плоду. Воспаление и тяжелая гипоксия нарушают инвазию трофобласта в сосуды [1]. Этот процесс считают одной из основных причин развития преэклампсии, серьезного осложнения беременности. МикроРНК, выделяемые трофобластом при гипоксии, могут быть как маркером развивающейся преэклампсии, так и звеном патогенеза этой патологии за счет регуляции экспрессии генов-мишеней [2–4].

Для исследования трофобласта *in vitro* используют клеточные линии хориокарциномы человека, в частности, клеточную линию BeWo b30. Данные клетки не подвержены контактному торможению, могут образовывать состоятельный клеточный барьер, а также обладают высокой подвижностью [5], что позволяет использовать их для моделирования как ворсинчатого, так и вневорсинчатого трофобласта. Использование микрофлюидных устройств позволяет приблизить модель к реальным условиям в организме [6, 7].

Активация сигнального пути гипоксии связана с запуском транскрипции генов-мишеней индуцируемого гипоксией фактора (HIF). Одной из классических моделей химической активации гипоксии является воздействие на клетки хлоридом кобальта (II), который приводит к повышению уровня HIF в клетке [8]. Производные 8-оксихинолина (ПО) тоже способны активировать путь гипоксии за счет стабилизации HIF в клетке [9]. Воздействие ПО на клетки BeWo b30 имитирует эффекты гипоксии в трофобласте [10].

Целью данного исследования было изучить профили микроРНК и экспрессии соответствующих генов-мишеней в модели гипоксии трофобласта.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клеточная линия BeWo b30 была любезно предоставлена профессором С. Albrecht (Бернский Университет, Швейцария) с разрешения профессора А. Schwartz (Университет Вашингтона в Сент-Луисе, США). Клетки выращивали в шестилучных планшетах (Corning; США) с площадью культивирования 9,6 см² в среде Gibco DMEM, high glucose (Thermo Fisher Scientific; США) с добавлением 10% Gibco FBS One Shot (Thermo Fisher Scientific; США), 1% Gibco MEM NEAA (100X) и 1% Gibco Pen Strep (100X). При заполнении 80% культуральной поверхности клетки помещали в свежую среду без добавления химических индукторов гипоксии либо с 5 мкМ ПО 4896-3212 (Центр высоких технологий «ХимПар»; Россия) или 300 мкМ Cobalt (II) chloride (Sigma-Aldrich; США). Спустя 24 ч клетки лизировали в Qiazol Lysis Reagent (Qiagen; Германия) с последующим выделением РНК набором реагентов miRNeasy Mini Kit (Qiagen; Германия) методом фенол-хлороформной экстракции [11] и оценкой концентрации РНК на спектрофотометре NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific; США) и качества РНК на автоматизированной системе электрофореза Experion (Bio-Rad; США) по значению RNA Quality Index (RQI), которое составляло не менее 9 для всех образцов.

Подготовку библиотек для секвенирования следующего поколения (NGS) производили с помощью наборов NEBNext Multiplex Small RNA Library Prep Kit for Illumina (New England

Biolabs; США) для коротких РНК и Illumina Stranded mRNA Library Prep Kit (Illumina; США) для мРНК. NGS производили с помощью системы NextSeq 500 (Illumina; США).

Для анализа экспрессии отдельных генов проводили обратную транскрипцию 500 нг тотальной РНК набором MMLV RT Kit («Евроген»; Россия) с последующей ПЦР в реальном времени реагентами qPCRmix-HS SYBR («Евроген»; Россия). Для поиска дифференциально представленных мРНК и микроРНК в клетках BeWo b30 в контрольных условиях и при имитации гипоксии применяли *t*-критерий Стьюдента с поправкой Бенджамини-Хохберга на множественность сравнений путем расчета значений False Discovery Rate (FDR). Анализ дифференциальной экспрессии производили с использованием DESeq2 v1.28.1 [12]. Различия в экспрессии высокопредставленных микроРНК и мРНК считали достоверными при $FDR-p < 0,05$ и кратности отличий в \log_2 -шкале более 0,4 [13].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Анализ исследований, оценивавших эффект гипоксии на транскриптом различных клеток, позволил выявить ряд ключевых генов, участвующих в ответе на гипоксию [14]. Экспрессия данных генов при воздействии ПО и CoCl_2 на клетки BeWo b30 была определена по данным секвенирования (табл. 1). Экспрессия всех указанных генов изменялась достоверно ($p < 0,05$), кроме генов *CDKN1A* и *ENO1* при воздействии ПО и *SLC2A1* и *TMEM45A* при воздействии CoCl_2 . Стоит отметить, что экспрессия гена *EPO*, кодирующего эритропоэтин, снижалась при воздействии кобальта, в то время как при реальной гипоксии его экспрессия повышается [14], как и при действии ПО.

Для подтверждения результатов секвенирования и активации ядра гипоксии с помощью ПЦР была проведена оценка экспрессии генов *BNIP3*, *SLC2A3*, *PDK1* и *VEGFA* в клетках BeWo b30; в качестве референсных генов использовали *ACTB* и *GUSB*. Результаты подтвердили активацию экспрессии указанных генов (табл. 2).

Среди высокоэкспрессированных микроРНК, на которые приходится более 95% всех микроРНК в клетках BeWo b30, были определены микроРНК, уровень которых достоверно изменился при химической индукции гипоксии. При воздействии ПО произошло изменение уровня семи микроРНК (табл. 3), а при воздействии CoCl_2 — 16 микроРНК (табл. 4), при этом общими в этих списках были две микроРНК — *hsa-miR-374a-5p* и *hsa-miR-374b-5p*.

Был проведен анализ экспрессии мишеней микроРНК *hsa-miR-374a-5p* и *hsa-miR-374b-5p* в клетках при воздействии ПО и CoCl_2 . Ранее было показано, что *hsa-miR-374b-5p* может регулировать экспрессию *FOXM1* в клеточной линии рака шейки матки SiHa [15]. В клетках BeWo b30 было выявлено достоверное снижение экспрессии гена *FOXM1* в 1,7 раза при действии ПО и в 2,6 раза при действии CoCl_2 . Поскольку было показано, что микроРНК *hsa-miR-21-5p* тоже может вызывать снижение экспрессии *FOXM1* [16], был проведен анализ сид-регионов *hsa-miR-21-5p*, *hsa-miR-374a-5p* и *hsa-miR-374b-5p*, который выявил, что все три микроРНК имеют по одному месту связывания в 3'-нетранслируемой области мРНК *FOXM1* (рис.).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ответ клеток на гипоксию может различаться, что выражается в активации различных генов и в разной

Таблица 1. Экспрессия ключевых генов ответа на гипоксию в клетках BeWo b30 по данным секвенирования

Ген	Кратность изменения экспрессии в log ₂ -шкале	
	При действии ПО	При действии CoCl ₂
<i>DDIT4</i>	3,5	3,6
<i>KDM3A</i>	1,8	3,6
<i>BNIP3</i>	2,3	3,3
<i>NDRG1</i>	3,4	3,2
<i>SLC2A3</i>	3,1	2,8
<i>BHLHE40</i>	2,8	2,6
<i>P4HA1</i>	2,9	2,5
<i>PDK1</i>	1,7	2,3
<i>ANKRD37</i>	3,2	2
<i>VEGFA</i>	1,6	1,9
<i>ERO1A</i>	1,7	1,9
<i>ALDOC</i>	4,4	1,8
<i>CDKN1A</i>	0,6*	1,3
<i>STC2</i>	1,3	1,1
<i>ENO1</i>	0,6*	1
<i>SLC2A1</i>	1,4	0,7*
<i>TMEM45A</i>	2	0,1*
<i>EPO</i>	1,4	-1,5

Примечание: * — FDR-p > 0,05; для остальных генов FDR-p < 0,05.

степени выраженности данных изменений. Ранее был проведен анализ целого ряда исследований с целью выявить ключевые гены, активация которых происходила во всех клетках, подвергавшихся воздействию гипоксии [14]. Повышение экспрессии данных генов происходило и в клетках BeWo b30 в нашем исследовании при воздействии ПО и CoCl₂, что может свидетельствовать об активации пути HIF. Показано, что в клетках BeWo под воздействием CoCl₂ происходит повышение экспрессии транспортера глюкозы GLUT1, закодированного в гене *SLC2A1* [17–19], что совпадает с нашими наблюдениями. Интересно, что экспрессия гена *EPO*, кодирующего эритропоэтин, уменьшалась при действии CoCl₂ на клетки BeWo b30, в то время как при реальной гипоксии его экспрессия повышается [14], как и при действии ПО в нашем исследовании. Показано, что HIF способен напрямую повышать экспрессию гена *EPO* в клетках BeWo [20]. В другом исследовании уровень экспрессии *EPO* в клетках BeWo был недетектируемым, что не позволило оценить влияние CoCl₂ и гипоксии на его экспрессию [21]. Кобальт стимулирует увеличение экспрессии эритропоэтина в почках [22]. Экспрессия *EPO* находится под контролем HIF-2α, и хотя кобальт вызывает индукцию как HIF-1α, так и HIF-2α, однако на клеточных линиях рака печени Huh7 и HepG2 было показано отсутствие повышения экспрессии *EPO* при действии CoCl₂ [23]. Вероятно, экспрессия этого гена может зависеть не только от активации

сигнального пути HIF, но и от других тканеспецифических факторов.

Воздействие гипоксии на клетки трофобласта может приводить к выделению целого ряда молекул, включая ассоциированные с гипоксией микроРНК [24]. Выделяемые клетками микроРНК могут влиять на окружающие клетки, а изменение уровня данных микроРНК в различных условиях может определять степень выраженности влияния, однако для этого концентрация микроРНК в клетке-продуценте должна быть достаточно высокой. В связи с этим нами были отобраны 10% микроРНК с наибольшим уровнем в клетках BeWo b30, после чего определены микроРНК, уровень которых достоверно изменился при действии ПО или CoCl₂. Интересно, что из достоверно изменившихся семи микроРНК для ПО и 16 микроРНК для CoCl₂ совпадали только две микроРНК — *hsa-miR-374a-5p* и *hsa-miR-374b-5p*. Последние закодированы в X-хромосоме в интронах гена *FTX*, кодирующего длинную некодирующую РНК, которая участвует в инактивации X-хромосомы. Семейство *miR-374* участвует в регуляции клеточной пролиферации и дифференцировки, процессов развития организма и канцерогенеза [25]. МикроРНК *hsa-miR-374a-5p* и *hsa-miR-374b-5p* имеют очень схожую последовательность, при этом сид-регион этих молекул совпадает, что предполагает регуляцию одних и тех же генов-мишеней. Уровень *hsa-miR-374a-5p* был повышен в крови матерей, дети которых родились преждевременно

Таблица 2. Экспрессия ключевых генов ответа на гипоксию в клетках BeWo b30 по данным ПЦР

Ген	Линейная кратность изменения экспрессии*	
	При действии ПО	При действии CoCl ₂
<i>BNIP3</i>	3,7	4
<i>SLC2A3</i>	2,2	3,6
<i>PDK1</i>	1,7	2,4
<i>VEGFA</i>	1,6	3,1

Примечание: * — FDR-p < 0,05.

Таблица 3. МикроРНК, уровень которых достоверно изменился при воздействии ПО

МикроРНК	Кратность изменения в \log_2 -шкале	FDR- p
hsa-miR-96-5p	10,5	$1,8 \times 10^{-3}$
hsa-miR-21-5p	10,4	$2,7 \times 10^{-2}$
hsa-miR-429	10,5	$4,2 \times 10^{-4}$
hsa-miR-374b-5p	10,5	$6,6 \times 10^{-3}$
hsa-miR-374a-5p	10,5	$1,4 \times 10^{-3}$
hsa-miR-26b-5p	10,6	$8,0 \times 10^{-8}$
hsa-miR-181a-2-3p	10,7	$3,8 \times 10^{-7}$

[26] или с низкой массой для своего гестационного возраста [27], что может указывать на возможную связь с гипоксией и патологией плаценты. Известно, что при гипоксии метаболизм в клетках ворсинчатого трофобласта смещается от аэробного к анаэробному, а это позволяет снизить потребление кислорода, но повышает потребление глюкозы. В результате к плоду через плаценту поступает больше кислорода, но меньше питательных веществ, что и может приводить к задержке роста плода или преждевременным родам [28]. Аналогичный эффект был обнаружен и в клетках BeWo b30 при воздействии другого ПО [10].

Среди мишеней микроРНК hsa-miR-374a-5p и hsa-miR-374b-5p был выявлен ген *FOXM1*, кодирующий транскрипционный фактор. Уровень мРНК этого гена в клетках BeWo b30 понижался при воздействии как ПО, так и CoCl_2 . Ранее было показано, что микроРНК hsa-miR-21-5p также может вызывать снижение экспрессии *FOXM1* и снижать пролиферацию клеток хориокарциномы HTR8/SVneo, при этом при преэклампсии в ткани плаценты тоже был повышен уровень hsa-miR-21-5p и снижена экспрессия *FOXM1* [16]. Эти данные хорошо согласуются с полученными в нашем исследовании. Вместе с тем значимое повышение уровня hsa-miR-21-5p в клетках BeWo b30 происходило только при воздействии ПО, но не CoCl_2 , что позволяет предполагать роль hsa-miR-374a-5p и hsa-miR-374b-5p в регуляции экспрессии *FOXM1* в данной модели. Близкое расположение мест связывания предполагает конкуренцию микроРНК hsa-miR-21-5p с hsa-miR-374a-5p и hsa-miR-374b-5p по пространственному

принципу, поскольку для одновременного взаимодействия комплекса белков-аргонатов с этими микроРНК необходимо создать значительное пространственное напряжение в цепи мРНК-мишени (см. рис.).

Возможно, снижение инвазии клеток трофобласта в стенку матки и сосуды матери при патогенезе преэклампсии может быть обусловлено снижением экспрессии гена *FOXM1* под влиянием микроРНК hsa-miR-374b-5p, что было показано ранее для клеточной линии рака шейки матки SiHa [15]. При уровне кислорода 3%, имитирующем физиологическую гипоксию трофобласта, экспрессия *FOXM1* в клетках хориокарциномы JEG-3 была высокой, однако при дальнейшем снижении уровня кислорода выражено падала. Нокдаун гена *FOXM1* приводил к снижению миграционной активности JEG-3, а культуральная среда от таких клеток снижала ангиогенез в культуре эндотелиальных клеток (HUVEC) [29].

ВЫВОДЫ

Полученные результаты свидетельствуют, что воздействие производных оксиминолина и хлорида кобальта (II) на клетки BeWo b30 может служить моделью гипоксии трофобласта плаценты, что подтверждается активацией ключевых генов ответа на гипоксию. Вместе с тем ответ этих клеток на гипоксию в виде изменения экспрессии микроРНК значимо различается для двух вариантов химической индукции гипоксии. Общим для воздействия кобальта и производного оксиминолина является увеличение экспрессии микроРНК семейства miR-374,

Таблица 4. МикроРНК, уровень которых достоверно изменился при воздействии CoCl_2

МикроРНК	Кратность изменения в \log_2 -шкале	FDR- p
hsa-miR-1260b	10,7	$9,8 \times 10^{-9}$
hsa-miR-4521	10,7	$1,6 \times 10^{-11}$
hsa-miR-148a-3p	10,7	$8,5 \times 10^{-8}$
hsa-miR-425-5p	10,5	$4,1 \times 10^{-12}$
hsa-miR-378i	10,5	$6,6 \times 10^{-10}$
hsa-miR-32-5p	10,4	$2,5 \times 10^{-4}$
hsa-miR-151a-3p	10,4	$2,1 \times 10^{-5}$
hsa-miR-200a-3p	10,4	$2,5 \times 10^{-5}$
hsa-miR-126-3p	10,4	$4,0 \times 10^{-7}$
hsa-miR-484	10,4	$9,5 \times 10^{-8}$
hsa-miR-181a-5p	10,5	$5,2 \times 10^{-11}$
hsa-miR-25-3p	10,5	$7,8 \times 10^{-11}$
hsa-miR-27a-3p	10,5	$1,2 \times 10^{-12}$
hsa-miR-320a-3p	10,5	$7,0 \times 10^{-11}$
hsa-miR-374a-5p	10,6	$6,1 \times 10^{-6}$
hsa-miR-374b-5p	10,6	$5,1 \times 10^{-7}$

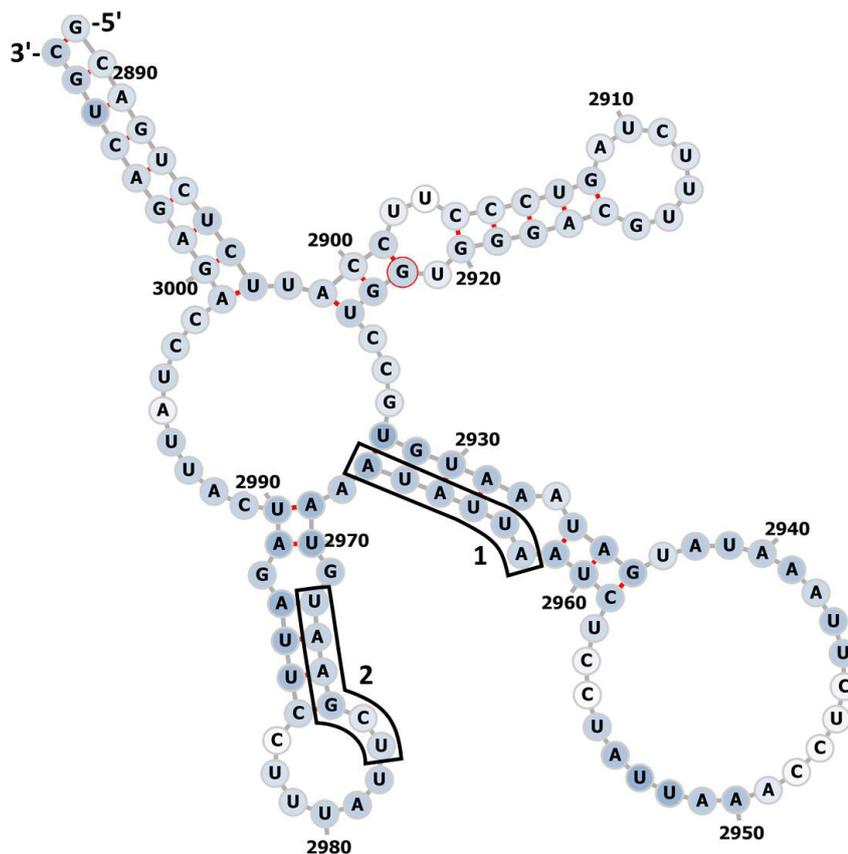


Рис. Расположение мест связывания микроРНК в фрагменте 3'-нетранслируемой области мРНК *FOXM1* (транскрипционный вариант 2). Порядковые номера нуклеотидов указаны четырехзначными числами. 1 — место связывания hsa-miR-374a-5p и hsa-miR-374b-5p; 2 — место связывания hsa-miR-21-5p

что может указывать на их роль в гипоксическом ответе. Наблюдаемое при этом снижение экспрессии *FOXM1*, гена-мишени этих микроРНК, позволяет предположить роль

микроРНК miR-374 и *FOXM1* в патогенезе нарушения инвазии трофобласта при формировании плаценты как предпосылки к развитию задержки роста плода и преэклампсии.

Литература

- Yang C, Song G, Lim W. Effects of extracellular vesicles on placentation and pregnancy disorders. *Reproduction*. 2019; 158 (5): R189–96. DOI: 10.1530/REP-19-0147.
- Li H, Ouyang Y, Sadvovsky E, Parks WT, Chu T, Sadvovsky Y. Unique microRNA Signals in Plasma Exosomes from Pregnancies Complicated by Preeclampsia. *Hypertension*. 2020; 75 (3): 762–71. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.119.14081.
- Makarova J, Turchinovich A, Shkurnikov M, Tonevitsky A. Extracellular miRNAs and Cell–Cell Communication: Problems and Prospects. *Trends Biochem Sci*. 2021. DOI: 10.1016/j.tibs.2021.01.007.
- Makarova JA, Maltseva DV, Galatenko VV, Abbasi A, Maximenko DG, Grigoriev AI, et al. Exercise immunology meets miRNAs. *Exerc Immunol Rev*. 2014; 20: 135–64.
- Nikulin SV, Knyazev EN, Gerasimenko TN, Shilin SA, Gazizov IN, Zakharova GS, et al. Impedance Spectroscopy and Transcriptome Analysis of Choriocarcinoma BeWo b30 as a Model of Human Placenta. *Mol Biol*. 2019; 53 (3): 411–8. DOI: 10.1134/S0026893319030130.
- Nikulin SV, Knyazev EN, Gerasimenko TN, Shilin SA, Gazizov IN, Zakharova GS, et al. Non-Invasive Evaluation of Extracellular Matrix Formation in the Intestinal Epithelium. *Bull Exp Biol Med*. 2018; 166 (1): 35–8. DOI: 10.1007/s10517-018-4283-7.
- Samatov TR, Shkurnikov MU, Tonevitskaya SA, Tonevitsky AG. Modelling the metastatic cascade by in vitro microfluidic platforms. *Prog Histochem Cytochem*. 2015; 49 (4): 21–9. DOI: 10.1016/j.proghi.2015.01.001.
- Muñoz-Sánchez J, Cháñez-Cárdenas ME. The use of cobalt chloride as a chemical hypoxia model. *J Appl Toxicol*. 2019; 39 (4): 556–70. DOI: 10.1002/jat.3749.
- Poloznikov AA, Khristichenko AY, Smirnova NA, Hushpulia DM, Gaisina IN, Osipyants AI, et al. Structural optimization of adaptaquin, a HIF prolyl hydroxylase inhibitor. *Russ Chem Bull*. 2019; 68 (1): 168–73. DOI: 10.1007/s11172-019-2433-3.
- Knyazev EN, Zakharova GS, Astakhova LA, Tsypina IM, Tonevitsky AG, Sukhikh GT. Metabolic Reprogramming of Trophoblast Cells in Response to Hypoxia. *Bull Exp Biol Med*. 2019; 166 (3): 321–5. DOI: 10.1007/s10517-019-04342-1.
- Shkurnikov MY, Makarova YA, Knyazev EN, Fomicheva KA, Nyushko KM, Saribekyan EK, et al. Profile of microRNA in Blood Plasma of Healthy Humans. *Bull Exp Biol Med*. 2016; 160 (5): 632–4. DOI: 10.1007/s10517-016-3235-3.
- Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol*. 2014; 15 (12): 550. DOI: 10.1186/s13059-014-0550-8.
- Yang W, Rosenstiel P, Schulenburg H. aFold – using polynomial uncertainty modelling for differential gene expression estimation from RNA sequencing data. *BMC Genomics*. 2019; 20 (1): 364. DOI: 10.1186/s12864-019-5686-1.
- Benita Y, Kikuchi H, Smith AD, Zhang MQ, Chung DC, Xavier RJ. An integrative genomics approach identifies Hypoxia Inducible Factor-1 (HIF-1)-target genes that form the core response to hypoxia. *Nucleic Acids Res*. 2009; 37 (14): 4587–602. DOI: 10.1093/nar/gkp425.
- Xia N, Tan W-F, Peng Q-Z, Cai H-N. MiR-374b reduces cell proliferation and cell invasion of cervical cancer through regulating FOXM1. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2019; 23 (2): 513–21. DOI:

- 10.26355/eurrev_201901_16863.
16. Zhou F, Sun Y, Gao Q, Wang H. microRNA-21 regulates the proliferation of placental cells via FOXM1 in preeclampsia. *Exp Ther Med.* 2020; 20 (3): 1871–8. DOI: 10.3892/etm.2020.8930.
 17. Baumann MU, Zamudio S, Illsley NP. Hypoxic upregulation of glucose transporters in BeWo choriocarcinoma cells is mediated by hypoxia-inducible factor-1. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007; 293 (1): C477–85. DOI: 10.1152/ajpcell.00075.2007.
 18. Francois LN, Gorczyca L, Du J, Bircsak KM, Yen E, Wen X, et al. Down-regulation of the placental BCRP/ABCG2 transporter in response to hypoxia signaling. *Placenta.* 2017; 51: 57–63. DOI: 10.1016/j.placenta.2017.01.125.
 19. Hayashi M, Sakata M, Takeda T, Yamamoto T, Okamoto Y, Sawada K, et al. Induction of glucose transporter 1 expression through hypoxia-inducible factor 1alpha under hypoxic conditions in trophoblast-derived cells. *J Endocrinol.* 2004; 183 (1): 145–54. DOI: 10.1677/joe.1.05599.
 20. Fukasawa M, Tsuchiya T, Takayama E, Shinomiya N, Uyeda K, Sakakibara R, et al. Identification and characterization of the hypoxia-responsive element of the human placental 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene. *J Biochem.* 2004; 136 (3): 273–7. DOI: 10.1093/jb/mvh137.
 21. Gleadle JM, Ebert BL, Firth JD, Ratcliffe PJ. Regulation of angiogenic growth factor expression by hypoxia, transition metals, and chelating agents. *Am J Physiol.* 1995; 268 (6 Pt 1): C1362–8. DOI: 10.1152/ajpcell.1995.268.6.C1362.
 22. Hoffmeister T, Schwenke D, Wachsmuth N, Krug O, Thevis M, Byrnes WC, et al. Erythropoietic effects of low-dose cobalt application. *Drug Test Anal.* 2019; 11 (2): 200–7. DOI: 10.1002/dta.2478.
 23. Befani C, Mylonis I, Gkotinakou I-M, Georgoulas P, Hu C-J, Simos G, et al. Cobalt stimulates HIF-1-dependent but inhibits HIF-2-dependent gene expression in liver cancer cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 2013; 45 (11): 2359–68. DOI: 10.1016/j.biocel.2013.07.025.
 24. Youssef HMG, Marei ES. Association of MicroRNA-210 and MicroRNA-155 with severity of preeclampsia. *Pregnancy Hypertens.* 2019; 17: 49–53. DOI: 10.1016/j.preghy.2019.05.010.
 25. Bian H, Zhou Y, Zhou D, Zhang Y, Shang D, Qi J. The latest progress on miR-374 and its functional implications in physiological and pathological processes. *J Cell Mol Med.* 2019; 23 (5): 3063–76. DOI: 10.1111/jcmm.14219.
 26. Cook J, Bennett PR, Kim SH, Teoh TG, Sykes L, Kindinger LM, et al. First Trimester Circulating MicroRNA Biomarkers Predictive of Subsequent Preterm Delivery and Cervical Shortening. *Sci Rep.* 2019; 9 (1): 5861. DOI: 10.1038/s41598-019-42166-1.
 27. Kim SH, MacIntyre DA, Binkhamis R, Cook J, Sykes L, Bennett PR, et al. Maternal plasma miRNAs as potential biomarkers for detecting risk of small-for-gestational-age births. *EBioMedicine.* 2020; 62: 103145. DOI: 10.1016/j.ebiom.2020.103145.
 28. Illsley NP, Caniggia I, Zamudio S. Placental metabolic reprogramming: do changes in the mix of energy-generating substrates modulate fetal growth? *Int J Dev Biol.* 2010; 54 (2–3): 409–19. DOI: 10.1387/ijdb.082798ni.
 29. Monteiro LJ, Cubillos S, Sanchez M, Acuña-Gallardo S, Venegas P, Herrera V, et al. Reduced FOXM1 Expression Limits Trophoblast Migration and Angiogenesis and Is Associated With Preeclampsia. *Reprod Sci.* 2019; 26 (5): 580–90. DOI: 10.1177/1933719118778798.

References

1. Yang C, Song G, Lim W. Effects of extracellular vesicles on placentation and pregnancy disorders. *Reproduction.* 2019; 158 (5): R189–96. DOI: 10.1530/REP-19-0147.
2. Li H, Ouyang Y, Sadovsky E, Parks WT, Chu T, Sadovsky Y. Unique microRNA Signals in Plasma Exosomes from Pregnancies Complicated by Preeclampsia. *Hypertension.* 2020; 75 (3): 762–71. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.119.14081.
3. Makarova J, Turchinovich A, Shkurnikov M, Tonevitsky A. Extracellular miRNAs and Cell–Cell Communication: Problems and Prospects. *Trends Biochem Sci.* 2021. DOI: 10.1016/j.tibs.2021.01.007.
4. Makarova JA, Maltseva DV, Galatenko VV, Abbasi A, Maximenko DG, Grigoriev AI, et al. Exercise immunology meets MiRNAs. *Exerc Immunol Rev.* 2014; 20: 135–64.
5. Nikulin SV, Knyazev EN, Gerasimenko TN, Shilin SA, Gazizov IN, Zakharova GS, et al. Impedance Spectroscopy and Transcriptome Analysis of Choriocarcinoma BeWo b30 as a Model of Human Placenta. *Mol Biol.* 2019; 53 (3): 411–8. DOI: 10.1134/S0026893319030130.
6. Nikulin SV, Knyazev EN, Gerasimenko TN, Shilin SA, Gazizov IN, Zakharova GS, et al. Non-Invasive Evaluation of Extracellular Matrix Formation in the Intestinal Epithelium. *Bull Exp Biol Med.* 2018; 166 (1): 35–8. DOI: 10.1007/s10517-018-4283-7.
7. Samatov TR, Shkurnikov MU, Tonevitskaya SA, Tonevitsky AG. Modelling the metastatic cascade by in vitro microfluidic platforms. *Prog Histochem Cytochem.* 2015; 49 (4): 21–9. DOI: 10.1016/j.proghi.2015.01.001.
8. Muñoz-Sánchez J, Cháñez-Cárdenas ME. The use of cobalt chloride as a chemical hypoxia model. *J Appl Toxicol.* 2019; 39 (4): 556–70. DOI: 10.1002/jat.3749.
9. Poloznikov AA, Khristichenko AY, Smirnova NA, Hushpuliyan DM, Gaisina IN, Osipyants AI, et al. Structural optimization of adaptaquin, a HIF prolyl hydroxylase inhibitor. *Russ Chem Bull.* 2019; 68 (1): 168–73. DOI: 10.1007/s11172-019-2433-3.
10. Knyazev EN, Zakharova GS, Astakhova LA, Tsykina IM, Tonevitsky AG, Sukhikh GT. Metabolic Reprogramming of Trophoblast Cells in Response to Hypoxia. *Bull Exp Biol Med.* 2019; 166 (3): 321–5. DOI: 10.1007/s10517-019-04342-1.
11. Shkurnikov MY, Makarova YA, Knyazev EN, Fomicheva KA, Nyushko KM, Saribekyan EK, et al. Profile of microRNA in Blood Plasma of Healthy Humans. *Bull Exp Biol Med.* 2016; 160 (5): 632–4. DOI: 10.1007/s10517-016-3235-3.
12. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 2014; 15 (12): 550. DOI: 10.1186/s13059-014-0550-8.
13. Yang W, Rosenstiel P, Schulenburg H. aFold – using polynomial uncertainty modelling for differential gene expression estimation from RNA sequencing data. *BMC Genomics.* 2019; 20 (1): 364. DOI: 10.1186/s12864-019-5686-1.
14. Benita Y, Kikuchi H, Smith AD, Zhang MQ, Chung DC, Xavier RJ. An integrative genomics approach identifies Hypoxia Inducible Factor-1 (HIF-1)-target genes that form the core response to hypoxia. *Nucleic Acids Res.* 2009; 37 (14): 4587–602. DOI: 10.1093/nar/gkp425.
15. Xia N, Tan W-F, Peng Q-Z, Cai H-N. MiR-374b reduces cell proliferation and cell invasion of cervical cancer through regulating FOXM1. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2019; 23 (2): 513–21. DOI: 10.26355/eurrev_201901_16863.
16. Zhou F, Sun Y, Gao Q, Wang H. microRNA-21 regulates the proliferation of placental cells via FOXM1 in preeclampsia. *Exp Ther Med.* 2020; 20 (3): 1871–8. DOI: 10.3892/etm.2020.8930.
17. Baumann MU, Zamudio S, Illsley NP. Hypoxic upregulation of glucose transporters in BeWo choriocarcinoma cells is mediated by hypoxia-inducible factor-1. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007; 293 (1): C477–85. DOI: 10.1152/ajpcell.00075.2007.
18. Francois LN, Gorczyca L, Du J, Bircsak KM, Yen E, Wen X, et al. Down-regulation of the placental BCRP/ABCG2 transporter in response to hypoxia signaling. *Placenta.* 2017; 51: 57–63. DOI: 10.1016/j.placenta.2017.01.125.
19. Hayashi M, Sakata M, Takeda T, Yamamoto T, Okamoto Y, Sawada K, et al. Induction of glucose transporter 1 expression through hypoxia-inducible factor 1alpha under hypoxic conditions in trophoblast-derived cells. *J Endocrinol.* 2004; 183 (1): 145–54. DOI: 10.1677/joe.1.05599.
20. Fukasawa M, Tsuchiya T, Takayama E, Shinomiya N, Uyeda K, Sakakibara R, et al. Identification and characterization of the hypoxia-responsive element of the human placental 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene. *J Biochem.* 2004; 136 (3): 273–7. DOI: 10.1093/jb/mvh137.

21. Gleadle JM, Ebert BL, Firth JD, Ratcliffe PJ. Regulation of angiogenic growth factor expression by hypoxia, transition metals, and chelating agents. *Am J Physiol.* 1995; 268 (6 Pt 1): C1362–8. DOI: 10.1152/ajpcell.1995.268.6.C1362.
22. Hoffmeister T, Schwenke D, Wachsmuth N, Krug O, Thevis M, Byrnes WC, et al. Erythropoietic effects of low-dose cobalt application. *Drug Test Anal.* 2019; 11 (2): 200–7. DOI: 10.1002/dta.2478.
23. Befani C, Mylonis I, Gkotinakou I-M, Georgoulas P, Hu C-J, Simos G, et al. Cobalt stimulates HIF-1-dependent but inhibits HIF-2-dependent gene expression in liver cancer cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 2013; 45 (11): 2359–68. DOI: 10.1016/j.biocel.2013.07.025.
24. Youssef HMG, Marei ES. Association of MicroRNA-210 and MicroRNA-155 with severity of preeclampsia. *Pregnancy Hypertens.* 2019; 17: 49–53. DOI: 10.1016/j.preghy.2019.05.010.
25. Bian H, Zhou Y, Zhou D, Zhang Y, Shang D, Qi J. The latest progress on miR-374 and its functional implications in physiological and pathological processes. *J Cell Mol Med.* 2019; 23 (5): 3063–76. DOI: 10.1111/jcmm.14219.
26. Cook J, Bennett PR, Kim SH, Teoh TG, Sykes L, Kindinger LM, et al. First Trimester Circulating MicroRNA Biomarkers Predictive of Subsequent Preterm Delivery and Cervical Shortening. *Sci Rep.* 2019; 9 (1): 5861. DOI: 10.1038/s41598-019-42166-1.
27. Kim SH, MacIntyre DA, Binkhamis R, Cook J, Sykes L, Bennett PR, et al. Maternal plasma miRNAs as potential biomarkers for detecting risk of small-for-gestational-age births. *EBioMedicine.* 2020; 62: 103145. DOI: 10.1016/j.ebiom.2020.103145.
28. Illsley NP, Caniggia I, Zamudio S. Placental metabolic reprogramming: do changes in the mix of energy-generating substrates modulate fetal growth? *Int J Dev Biol.* 2010; 54 (2–3): 409–19. DOI: 10.1387/ijdb.082798ni.
29. Monteiro LJ, Cubillos S, Sanchez M, Acuña-Gallardo S, Venegas P, Herrera V, et al. Reduced FOXM1 Expression Limits Trophoblast Migration and Angiogenesis and Is Associated With Preeclampsia. *Reprod Sci.* 2019; 26 (5): 580–90. DOI: 10.1177/1933719118778798.