

Особенности создания коллекции образцов беременных женщин на разных сроках гестации для поиска ранних биомаркеров преждевременных родов

Илларионов Р. А.^{1,2,3}, Косякова О. В.¹, Вашукова Е. С.¹, Юркина Н. О.¹, Баклейчева М. О.¹, Долгова Ю. С.⁴, Сушко Т. А.⁴, Еремеева Д. Р.⁴, Зайнулина М. С.⁴, Ярмолинская М. И.¹, Беспалова О. Н.¹, Глотов А. С.^{1,3}

¹ФГБНУ “НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д. О. Отта”. Санкт-Петербург;

²Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет).

Санкт-Петербург; ³Санкт-Петербургский государственный университет. Санкт-Петербург;

⁴СПБ ГБУЗ “Родильный дом № 6 им. В. Ф. Снегирева”. Санкт-Петербург, Россия

Цель. Создать коллекцию образцов беременных женщин на разных сроках гестации для поиска ранних биомаркеров преждевременных родов.

Материал и методы. С целью стандартизации процесса сбора образцов разработаны стандартные операционные процедуры, содержащие пошаговый алгоритм действий для каждого участника исследовательской группы на клиническом (сбор клинической информации, забор биологического материала) и лабораторном (транспортировка, пробоподготовка, хранение, контроль качества биообразцов) этапах получения образцов.

Результаты. По состоянию на 1 октября 2020г в коллекцию собраны образцы периферической крови от 182 женщин; во время беременности собирали цельную кровь, сыворотку, плазму, лейкоцитарную пленку и мочу, в родах — образцы плаценты и пуповинной крови. Получен широкий спектр клинико-анамнестической информации о каждой беременной, который включает данные о состоянии здоровья женщины, течения гестации, исходе беременности (при ее завершении). Создан электронный каталог, объединяющий информацию, ассоциированную с образцами (данные о клинических характеристиках и количестве аликвот каждого типа образца). Проведен контроль качества образцов коллекции (путем оценки качества ДНК и микроРНК), который показал соответствие, получаемых образцов критериям качества и их сохранность исходных характеристик при длительном хранении. На базе коллекции начато исследование по оценке уровня экспрессии микроРНК в различных типах биоматериала, с целью поиска ран-

них биомаркеров осложнений гестации, приводящих к преждевременным родам.

Заключение. Создание коллекции образцов беременных женщин является значимым заданием для будущих фундаментальных и прикладных исследований в различных областях биомедицины. Исследования на базе коллекции могут позволить углубленно изучить патогенетические механизмы различных гестационных осложнений, разработать новые методы их диагностики и лечения.

Ключевые слова: беременность, биобанк, биоресурсная коллекция, осложнения гестации, преждевременные роды.

Отношения и деятельность. Исследование поддержано грантом РНФ № 19-75-20033. Исследование выполнено в т.ч. на базе РЦ “Центр Биобанк” Научного парка СПбГУ.

Поступила 24/10-2020

Получена рецензия 13/11-2020

Принята к публикации 27/11-2020



Для цитирования: Илларионов Р. А., Косякова О. В., Вашукова Е. С., Юркина Н. О., Баклейчева М. О., Долгова Ю. С., Сушко Т. А., Еремеева Д. Р., Зайнулина М. С., Ярмолинская М. И., Беспалова О. Н., Глотов А. С. Особенности создания коллекции образцов беременных женщин на разных сроках гестации для поиска ранних биомаркеров преждевременных родов. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2020;19(6):2708. doi:10.15829/1728-8800-2020-2708

Collection of samples from women at different stages of pregnancy to search for early biomarkers of preterm birth

Illarionov R. A.^{1,2,3}, Kosyakova O. V.¹, Vashukova E. S.¹, Yurkina N. O.¹, Bakleicheva M. O.¹, Dolgova Yu. S.⁴, Sushko T. A.⁴, Eremeeva D. R.⁴, Zainulina M. S.⁴, Yarmolinskaya M. I.¹, Bepalova O. N.¹, Glotov A. S.^{1,3}

¹D. O. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology. St. Petersburg; ²Saint-Petersburg State Institute of Technology (Technical University). St. Petersburg; ³Saint-Petersburg State University. St. Petersburg; ⁴V.F. Snegirev Maternity Hospital № 6. Saint-Petersburg, Russia

Aim. To create a collection of samples from women at different stages of pregnancy to search for early biomarkers of preterm birth.

Material and methods. In order to standardize the sample collection, standard operation procedures have been developed with a step-by-

*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):

e-mail: anglotov@mail.ru, r.a.illarionov@gmail.com

Тел.: +7 (921) 332-53-80

[Илларионов Р. А.* — аспирант кафедры ТМС, специалист РЦ “Центр Биобанк” Научного парка, ORCID: 0000-0003-2711-748X, Косякова О. В. — врач акушер-гинеколог медико-генетического центра, ORCID: 0000-0003-4116-0222, Вашукова Е. С. — к.б.н., н.с. лаборатории Геномики с группой биоресурсной коллекции отдела геномной медицины, ORCID: 0000-0002-6996-8891, Юркина Н. О. — лаборант лаборатории Геномики с группой биоресурсной коллекции отдела геномной медицины, ORCID: 0000-0002-5515-5363, Баклейчева М. О. — м.н.с. отдела акушерства и перинатологии, ORCID: 0000-0002-0103-8583, Долгова Ю. С. — врач акушер-гинеколог 2 акушерского отделения патологии беременности, ORCID: 0000-0001-7516-530X, Сушко Т. А. — врач акушер-гинеколог 2 акушерского отделения патологии беременности, ORCID: 0000-0002-0180-7370, Еремеева Д. Р. — к.м.н., зав. 2 акушерского отделения патологии беременности, ORCID: 0000-0003-4512-9599, Зайнулина М. С. — д.м.н., профессор, главный врач, ORCID: 0000-0002-2622-5000, Ярмолинская М. И. — профессор РАН, д.м.н., профессор, руководитель отдела эндокринологии репродукции, руководитель центра “Диагностики и лечения эндометриоза”, профессор кафедры акушерства и гинекологии ГБОУ ВПО “Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова” Минздрава России, ORCID: 0000-0002-6551-4147, Беспалова О. Н. — д.м.н., заместитель директора по научной работе, ORCID: 0000-0002-6542-5953, Глотов А. С.* — д.б.н., руководитель отдела геномной медицины, зав. лабораторией биобанкинга и геномной медицины, ORCID: 0000-0002-7465-4504].

step protocol for each research member at the clinical (collection of medical data and biological material) and laboratory (transportation, sample preparation, storage, quality control) stages.

Results. As of October 1, 2020, the collection includes peripheral blood samples from 182 women. Whole blood, serum, plasma, buffy coat and urine were collected during pregnancy, and placenta and umbilical cord blood samples — during labor. Clinical and medical history data was obtained about each pregnant woman, which includes data on the woman's health status, the course and outcome of pregnancy. An electronic catalog has been created with information on samples (data on clinical characteristics and the number of aliquots of each sample type). The quality control (assessment of DNA and microRNA) was carried out, which showed the compliance of the obtained samples with the quality criteria and the preservation of initial characteristics during long-term storage. On the basis of collection, a study has begun to assess the level of microRNA expression in various types of biomaterial, in order to search for early biomarkers of premature birth.

Conclusion. The creation of a collection of samples from pregnant women is a significant groundwork for future fundamental and applied research in various fields of biomedicine. This collection may provide an in-depth study of the pathogenesis of various pregnancy complications and the development of new methods for their diagnosis and treatment.

Key words: pregnancy, biobank, bioresource collection, pregnancy complications, premature birth.

Relationships and Activities. The research was supported by the Russian Science Foundation grant № 19-75-20033. The research was

carried out on the basis of the Bio-Bank Center of the Research Park of St. Petersburg State University.

Illarionov R. A.* ORCID: 0000-0003-2711-748X, Kosyakova O. V. ORCID: 0000-0003-4116-0222, Vashukova E. S. ORCID: 0000-0002-6996-8891, Yurkina N. O. ORCID: 0000-0002-5515-5363, Bakleicheva M. O. ORCID: 0000-0002-0103-8583, Dolgova Yu. S. ORCID: 0000-0001-7516-530X, Sushko T. A. ORCID: 0000-0002-0180-7370, Eremeeva D. R. ORCID: 0000-0003-4512-9599, Zainulina M. S. ORCID: 0000-0002-2622-5000, Yarmolinskaya M. I. ORCID: 0000-0002-6551-4147, Bespalova O. N. ORCID: 0000-0002-6542-5953, Glotov A. S.* ORCID: 0000-0002-7465-4504.

*Corresponding author: anglotov@mail.ru, r.a.illarionov@gmail.com

Received: 24/10-2020

Revision Received: 13/11-2020

Accepted: 27/11-2020

For citation: Illarionov R. A., Kosyakova O. V., Vashukova E. S., Yurkina N. O., Bakleicheva M. O., Dolgova Yu. S., Sushko T. A., Eremeeva D. R., Zainulina M. S., Yarmolinskaya M. I., Bespalova O. N., Glotov A. S. Collection of samples from women at different stages of pregnancy to search for early biomarkers of preterm birth. *Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2020;19(6):2708. (In Russ.) doi:10.15829/1728-8800-2020-2708

ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота, МикроРНК — малые некодирующие молекулы рибонуклеиновой кислоты, ПР — преждевременные роды, РНК — рибонуклеиновая кислота, СОП — стандартная операционная процедура, ЭДТА — этилендиаминтетрауксусная кислота, ЭКО — экстракорпоральное оплодотворение.

Введение

В настоящее время вся мировая наука претерпевает глобальные изменения: происходит смена парадигм в подходах и методологиях проведения клинических и научных исследований. Одной из основ изменения концепций и шаблонов служит становление такого нового направления, как биобанкирование.

Биобанки уже сегодня являются современной базовой платформой, обеспечивающей доступ к высококачественному биоматериалу, стандартизованному на всех этапах получения образцов. Но основным преимуществом биобанков является возможность сохранения биоматериала для многократного применения в различных исследованиях. Особенно это важно и значимо при получении уникального биоматериала от сложных когорт исследуемых, к которым в первую очередь относятся беременные.

Включение беременных в научно-клинические исследования, как известно, является непростой задачей не только с практической стороны, но и с этической [1, 2]. К медицинским проблемам, с которыми сталкиваются исследователи, можно отнести необходимость обеспечения безопасности не только матери, но и плода, применение женщинами препаратов для профилактики и лечения гестационных осложнений (что может влиять на “чистоту” эксперимента), выход из исследования при

выявлении любых отклонений в состоянии матери и плода или при досрочном прерывании беременности [1].

С этической точки зрения — это невозможность предоставления гарантии об отсутствии не только ближайших, но отдаленных нежелательных последствий на развитие и здоровье ребенка, законодательно неурегулированный вопрос о “правовом статусе” плода, необходимость взаимодействовать не только с самой женщиной, но и ее родственниками, а также вовлеченным в процесс ведения беременности медицинским персоналом. Эти и другие сложности, а также потенциально серьезные последствия, объясняют нежелание исследовательского сообщества включать беременных женщин в клинические исследования [1, 2].

Тем не менее, беременность остается специфическим состоянием, при котором патологические события могут варьироваться от легких (ранний токсикоз) до жизнеугрожающих (преэклампсия), иметь отдаленные неблагоприятные последствия на жизнь и здоровье матери и ребенка (преждевременные роды), что требует применения действенных превентивных, диагностических и терапевтических вмешательств [3–5].

В то же время, ввиду неизученности, большое число методов прогнозирования и идентификации гестационных осложнений являются недостаточно

точными или применяются с поздних сроков гестации, что значительно снижает эффективность стратегий антенатального наблюдения [5]. Другой, хорошо известной проблемой, является применение беременными препаратов “off label”, в связи с отсутствием доказательной базы. Вопрос о безопасности данных препаратов для матери и плода остается открытым [2].

На сегодняшний день имеется очевидная потребность в научных исследованиях, включающих беременных женщин. Преодолеть часть ограничений и расширить возможности исследователей могут помочь проекты биобанкирования, позволяющие получить биологический материал от беременных женщин, стандартизованный по сбору, хранению и аналитической обработке, который возможно неоднократно применять в различных научных и клинических исследованиях, в т.ч. при разработке инновационных тест-систем и терапевтических методов [6].

Создаваемая биоресурсная коллекция образцов от беременных женщин на протяжении всей гестации (у одной и той же женщины биоматериал собирается в каждом триместре беременности и в родах) с получением данных о течении беременности, ее осложнениях и исходах, является уникальной и не имеет аналогов в России. Отличительной особенностью создания данной коллекции является современный взвешенный подход, включающий проспективный сбор биоматериала с соблюдением стандартов на преаналитическом, аналитическом и постаналитическом этапах, получение широкого спектра клиничко-анамнестических данных на протяжении всей беременности, ведение документации, разработанной в соответствии с законодательством РФ. Коллекция образцов создается на базе биобанка лаборатории геномики с группой биоресурсных коллекций отдела геномной медицины ФГБНУ “НИИ АГиР им. Д. О. Отта” с учетом предыдущего опыта создания биоресурсных коллекций. На данном этапе в лаборатории уже имеются коллекции образцов пациентов с акушерско-гинекологическими патологиями, моногенными заболеваниями, заболеваниями сердечно-сосудистой, нервной, эндокринной систем и др. (~20 тыс. образцов).

В рамках настоящего проекта помимо сбора самой коллекции, предполагается изучение образцов на уровне протеома (совокупности белков организма), а также транскриптома — совокупности всех кодирующих РНК, считываемых с ДНК, на всех этапах беременности, что может позволить пересмотреть имеющиеся представления о механизмах реализации патологических состояний в течение гестации и выявить ранние биомаркеры осложнений беременности, в т.ч. приводящих к преждевременным родам (ПР).

ПР остаются как серьезной медицинской, так и социальной и экономической проблемой. В настоящее время ПР являются наиболее частой причиной инвалидизации и гибели детей в возрасте до 5 лет, а их частота не имеет тенденции к снижению. Применяемые меры профилактики и лечения малоэффективны, что в первую очередь связывают с недостатками методов прогнозирования (невысокая прогностическая точность) и несвоевременным выявлением (применение диагностических тестов на поздних сроках) угрожающих ПР [3, 5]. Идентификация ранних биомаркеров осложнений может помочь клиницистам стратифицировать риски реализации осложнений, приводящих к ПР, на ранних этапах их развития, что позволит предпринимать наиболее действенные превентивные меры.

Материал и методы

Исследование предполагает сбор биообразцов от 300 беременных женщин на протяжении всей беременности (образцы собираются от одной женщины в каждом триместре и в родах — 4 “точки”). Дизайн исследования представлен на рисунке 1.

Критерии отбора участников в исследование

Критерии включения: беременные женщины в возрасте от 18 лет на сроке 9-12 нед. гестации, проживающие в Северо-Западном регионе России (возможность получить биоматериал на всех этапах исследования).

Критерии не включения: беременные <18 лет, инфекционные заболевания (вирус иммунодефицита человека, гепатит, сифилис и др.), суррогатное материнство.

Обработка алгоритма сбора образцов

До начала сбора коллекции был разработан алгоритм сбора образцов, включающий пошаговые инструкции для каждого участника исследовательской группы (клинический и лабораторный персонал). Алгоритм представлен на рисунке 2.

Для клинического этапа сбора биоматериала были разработаны:

- документация (информированное согласие, карта участника исследования, информационное письмо и информационный лист для участника исследования);
- стандартные операционные процедуры (СОП) получения биоматериала;



Рис. 1 Дизайн исследования.



Рис. 2 Алгоритм создания коллекции.

— электронный каталог (электронная база данных участников исследования).

Для лабораторного этапа были разработаны СОП для процессов:

- пробоподготовки биообразцов,
- контроля качества биообразцов,
- хранения биообразцов,
- анализа данных.

Разработка документации. Согласно требованиям к проведению научных исследований разработаны информированное согласие участника исследования, карта клинических данных, информационное письмо и информационный лист для участника исследования в соответствии нормативно-правовыми актами (Федеральный закон “О персональных данных” от 27.07.2006 № 152-ФЗ, Федеральный закон “О биомедицинских клеточных продуктах” от 23.06.2016 № 180-ФЗ) и ГОСТ Р ИСО 14155-2014 “Клинические исследования. Надлежащая клиническая практика”. Предоставляемые пациенту документы содержат полную информацию о целях и задачах исследования, его этапах, возможных рисках, преимуществах участия в исследовании, возможности его прекращения, условиях конфиденциальности, данные о возможных вариантах применения полученных результатов, для реализации научно-исследовательских задач.

Соответствие разработанных документов имеющимся нормам и требованиям, дизайн исследования одобрены этическим комитетом при ФГБНУ “НИИ АГиР им. Д. О. Отта” (протокол № 97 от 27.06.2019).

Разработка СОП забора биоматериала. С целью стандартизации технологического процесса на преаналитическом этапе получения образцов (внелабораторной части) разработаны СОП, включающие информацию о процедуре сбора биообразцов (маркировка образцов, необходимое число пробирок и их состав), о положении пациента при взятии биоматериала, об условиях, температуре и длительности хранения полученного материала до передачи в лабораторию, об условиях и температуре

транспортировки образцов в лабораторию с указанием ответственного персонала на каждом из этапов.

Разработка СОП лабораторного этапа. С целью стандартизации технологического процесса на лабораторном этапе были разработаны СОП, включающие пошаговую инструкцию по пробоподготовке, контролю качества образцов, информацию об условиях и температуре хранения образцов, стандарты сбора и анализа ассоциированных данных.

Разработка электронного каталога. Электронный каталог разработан в виде базы данных, объединяющей информацию об образцах, полученных клиническим и лабораторным персоналом (клинико-анамнестические данные, полученные от участника исследования, информация о количестве аликвот каждого типа образца).

Сбор образцов для биоресурсной коллекции

Базы исследования. Сбор образцов для коллекции производится на базе ФГБНУ “НИИ АГиР им. Д. О. Отта” и партнерских клинических организаций (медицинские учреждения г. Санкт-Петербурга, с которыми заключены договоры о сотрудничестве). С целью эффективного взаимодействия партнеры обеспечиваются методической поддержкой, расходными материалами, логистическим обеспечением и имеют доступ к результатам исследования. Помимо научного, клинический интерес врачей партнерских организаций к участию беременных в исследовании, заключается в получении результатов генетического тестирования на риск реализации наследственной тромбофилии или артериальной гипертензии, выполняемое в рамках проекта. В определенных случаях получаемые данные служат основой для изменения дальнейшей стратегии ведения беременности у участниц исследования.

Сбор клинических данных. Заполнение документации и сбор клинической информации осуществляется медицинским персоналом (врачами акушерами-гинекологами). Анамнестические данные, данные о течении настоящей беременности, ее осложнениях и исходах занос-

сятся в специально разработанные для исследования карты участников (бумажный носитель для дублирования информации и дополнительной ее защиты от утраты). Стандартно получаемая информация от участниц исследования, представлена в таблице 1.

Информация о пациентках деперсонализируется (кодируется уникальными номерами) и вносится в электронный каталог (базу данных). Все персональные данные (на бумажных и электронных носителях) защищены и хранятся в каталогах с ограниченным доступом.

Сбор биоматериала. Сбор биоматериала осуществляется согласно разработанным СОП. От беременных женщин один раз в триместр и в родах производится забор следующих типов биоматериала:

- **Материнская периферическая кровь** (вакуумные пробирки с этилендиаминтетрауксусной кислотой (ЭДТА) 9 мл — 2 шт.; вакуумные пробирки с активатором свертывания крови 9 мл — 1 шт.);

- **Моча** (не менее 40 мл);

- **Плацента** (участок ткани размером не менее 2×2 см);

- **Пуповинная кровь** (вакуумная пробирка с ЭДТА 9 мл — 1 шт.).

После взятия биоматериала контейнеры маркируются с указанием времени забора и хранятся в холодильной камере (+4° С) не >2 ч до передачи лабораторному персоналу для пробоподготовки. Первичные контейнеры кодируются медицинским персоналом с указанием оригинального идентификационного номера пациентки для защиты персональных данных.

Транспортировка, обработка и хранение образцов

Транспортировка. Первичные контейнеры транспортируются в лабораторию согласно СОП в термоконтейнере с хладоэлементами при температуре от +4 до +8° С. В журнале передачи биоматериала фиксируется время

получения и доставки биоматериала с указанием лиц, ответственных за передачу и получение биоматериала.

Обработка. Обработка биоматериала производится согласно СОП. Методы обработки и условия хранения образцов представлены в таблице 2. Коллекцию составляют следующие типы образцов:

- **Периферическая кровь**

- Цельная кровь (4 аликвоты по 0,9 мл; 2 аликвоты по 4,5 мл со стабилизатором крови для РНК),

- Сыворотка крови (6 аликвот по 0,7 мл),

- Плазма крови (4 аликвоты по 0,9 мл),

- Лейкоцитарная пленка.

- **Моча** (4 аликвоты по 4,5 мл).

- **Плацента** (1 аликвота ткани, 3 аликвоты ворсинки хориона).

- **Пуповинная кровь** (4 аликвоты по 0,9 мл; 2 аликвоты по 4,5 мл со стабилизатором крови для РНК).

Хранение. Согласно СОП, хранение производится в криопробирках с индивидуальным штрих-кодированием в криохранилищах биобанка лаборатории, а также на базе РЦ “Центр Биобанк” Научного парка СПбГУ, где используется автоматическая система хранения LiCONiC (-80° С), система хранения в парах жидкого азота Biosafe (-80° С).

Контроль качества образцов

Для оценки соответствия получаемых образцов критериям качества, их сохранности с исходными характеристиками при длительном хранении был проведен контроль качества собранных в коллекции образцов.

Контроль качества хранимых образцов был осуществлен путем оценки качества производных образцов для секвенирования: ДНК и библиотек микроРНК (малые некодирующие молекулы РНК). Для контрольных исследований ДНК были отобраны образцы цельной крови (“аликвоты без повторного замораживания”) от 6-ти пациенток непосредственно после сбора образцов (“свежая аликвота”), после

Таблица 1

Клинико-anamnestические данные, получаемые от пациенток в течение беременности

Категории показателей	Типы показателей	Показатели
Возраст и антропометрические показатели	ИМТ до беременности	Возраст
		Дефицит массы тела (<18,5 кг/м ²)
		Избыток массы тела (25-30 кг/м ²)
		Ожирение (>30 кг/м ²)
	Прибавка массы тела при беременности	Недостаточная прибавка (<9 кг)
		Избыточная прибавка (>12 кг)
Акушерский анамнез	Паритет родов	Первородящая
		Повторнородящая
	Невынашивание в анамнезе	Неразвивающаяся беременность
		Самопроизвольный выкидыш
Искусственное прерывание беременности	Преждевременные роды	
	Искусственный аборт (до 12 нед.)	
Гинекологический анамнез	Гинекологические заболевания	Прерывание беременности по медицинским показаниям (после 12 нед.)
		Наружный генитальный эндометриоз
		Миома матки
		Хронический эндометрит
	Гинекологические операции	Хронический аднексит
		ДЭК шейки матки
		Внутриматочные вмешательства (выскабливание полости матки, лечебная гистероскопия)

Таблица 1. Продолжение

Категории показателей	Типы показателей	Показатели
Соматический анамнез	Сахарный диабет	Сахарный диабет 1 типа
		Сахарный диабет 2 типа
	АГ	Гипертоническая болезнь
		Вторичная АГ
	Наследственно обусловленные гемостазиопатии	Наследственная тромбофилия высокого риска осложнений
	Инфекционно-воспалительные заболевания мочеполовой системы	Бактериурия бессимптомная
Инфекция мочевыводящих путей (неуточненной локализации)		
Хронический цистит		
Хронический пиелонефрит		
Заболевания дыхательной системы	Обострение при беременности	
	Бронхиальная астма	
Способ наступления беременности	ВРТ	Индукция овуляции (спонтанная беременность)
		Беременность в результате ЭКО
Осложнения ранних сроков гестации	Угрожающий выкидыш раннего срока	Угрожающий выкидыш без ретрохориальной гематомы
		Угрожающий выкидыш с формированием ретрохориальной гематомы
Материнские осложнения при гестации	Гестационные гипертензивные состояния	Вызванные беременностью отеки
		Гестационная АГ без значительной протеинурии
		Преэклампсия умеренная
		Преэклампсия тяжелая
	ГСД	ГСД, диетотерапия
		ГСД, инсулинотерапия
ИЦН и методы ее коррекции	ИЦН	
	Циркляж шейки матки	
	Акушерский пессарий	
Гестационные заболевания печени	Гепатоз беременных	
Фетальные осложнения при гестации	Специфические осложнения многоплодной гестации	Задержка внутриутробного развития плода
		Задержка внутриутробного развития одного или обоих плодов (при многоплодной беременности)
	Инвазивные процедуры при беременности	Аntenатальная гибель одного плода (при многоплодной беременности)
		Трансабдоминальная хорионбиопсия
	Трансабдоминальная плацентобиопсия	
	Гемодинамические нарушения обоих плодов	

Примечание: АГ — артериальная гипертония, ВРТ — вспомогательные репродуктивные технологии, ГСД — гестационный сахарный диабет, ДЭК — диатермоэлектрокоагуляция, ИМТ — индекс массы тела, ИЦН — истмико-цервикальная недостаточность, ЭКО — экстракорпоральное оплодотворение.

хранения в течение 1 мес., 6 мес. и 12 мес. Для определения качества библиотек микроРНК были выбраны образцы, полученные из свежей плазмы крови и после хранения в течение 3 мес. от одной пациентки.

Качество выделенных образцов ДНК было оценено путем измерения концентрации ДНК на флуориметре “Qubit 2.0” (Invitrogen), соотношения длин волн A260/A280 — на спектрофотометре “Nanodrop 2000C” (Thermo Scientific). Целостность ДНК была определена с использованием автоматического капиллярного гель-электрофореза на приборе “2200 TapeStation Instrument” (Agilent Technologies).

Контроль качества библиотек микроРНК был проведен путем определения длины фрагмента с использованием автоматического капиллярного гель-электрофореза на приборе “2200 TapeStation Instrument” (Agilent Technologies).

Результаты

На сегодняшний день исследование не завершено и сбор образцов в коллекцию продолжается. По состоянию на 1 октября 2020г коллекция состоит из образцов от 182 беременных женщин.

От всех женщин был получен биоматериал в I триместре, от 94 — во II триместре, от 54 — в III триместре беременности. От 22 женщин биоматериал был получен при родоразрешении. Продолжается сбор биоматериала и клинических данных от 112 женщин (беременность прогрессирует). Спонтанно беременность прервалась у 7 женщин (до 22 нед. гестации — срока преждевременных родов). По своему желанию 27 беременных отказались от дальнейшего участия в исследовании.

Сбор биоматериала

Источник образца	Метод обработки	Условия хранения	Тип образца
Материнская периферическая кровь (дородовая)	Центрифугирование, 1600 g, +4° C; центрифугирование 2500 g, +4° C	Замораживание при -80° C	Плазма
Материнская периферическая кровь (дородовая)	Центрифугирование, 1600 g, +4° C; буфер для лизиса эритроцитов; фосфатный буфер; реагент для стабилизации РНК в тканях “RNALater”	Хранение при +4° C на ночь, далее замораживание при -80° C	Лейкоцитарная пленка
Материнская периферическая кровь (дородовая)	Центрифугирование, 3000 g, +4° C	Замораживание при -80° C	Сыворотка
Материнская периферическая кровь (дородовая)	—	Замораживание при -80° C	Цельная кровь
Материнская периферическая кровь (дородовая)	Реагент для стабилизации РНК в тканях “RNALater”	Хранение при комнатной температуре 18-25° C в течение 24-72 ч, далее хранение в морозильной камере холодильника при -20° C в течение 24 ч, затем замораживание при -80° C	Цельная кровь с “RNALater”
Моча (дородовая)	Центрифугирование, 3000 g, +4° C	Замораживание при -80° C	Моча
Моча (дородовая)	Центрифугирование, 3000 g, +4° C; фосфатный буфер	Замораживание при -80° C	Осадок клеток
Пуповинная кровь (во время родов)	—	Замораживание при -80° C	Цельная кровь
Пуповинная кровь (во время родов)	Реагент для стабилизации РНК в тканях “RNALater”	Хранение при комнатной температуре 18-25° C в течение 24-72 ч, далее хранение в морозильной камере холодильника при -20° C в течение 24 ч, затем замораживание при -80° C	Цельная кровь с “RNALater”
Плацента	Реагент для стабилизации РНК в тканях “RNALater”	В парах азота при -18° C	Замороженная ткань с “RNALater”

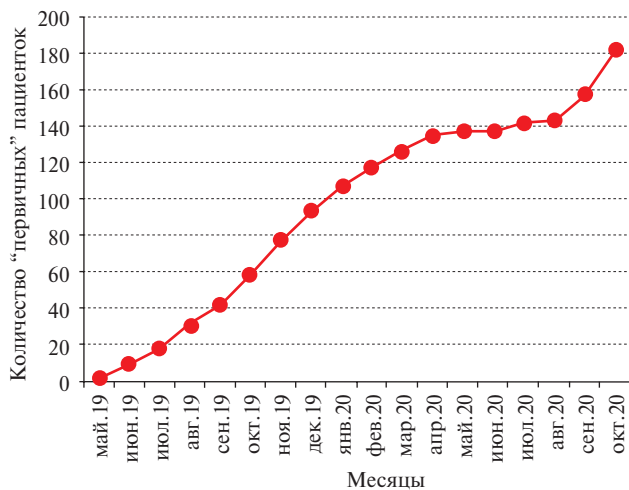


Рис. 3 Прирост коллекции (число беременных, участвующих в исследовании).

Средний ежемесячный прирост в коллекцию составляет 12 «первичных» образцов. В период пандемии (COVID-19) в связи с необходимостью соблюдения противоэпидемических мероприятий сбор биоматериала «упал» до 2-4 «первичных» образцов в месяц (рисунок 3). С целью повышения притока участников в исследование были предприняты организационные мероприятия, а именно

расширено количество партнерских клинических организаций — баз сбора биоматериала. Предпринятые меры позволили вернуть темп прироста образцов в коллекцию на исходный уровень, который на данный момент является стабильным.

На данном этапе уже очевидно, что коллекция является уникальной. Однако полноценно охарактеризовать ее в настоящее время не представляется возможным ввиду незаконченности исследований и недостатка данных об исходах беременностей. Тем не менее, полученные на данном этапе результаты являются значимыми. Собранные образцы и данные позволили уже сейчас инициировать на базе коллекции различные исследовательские проекты. В частности, стартовало исследование по оценке изменения уровня экспрессии микроРНК в различных типах биоматериала, полученного от женщин на различных этапах беременности. Полученные в ходе формирования коллекции клинико-анамнестические данные пациенток — участниц исследования (представлены в таблице 1) о возрасте, акушерско-гинекологическом анамнезе (привычное невынашивание беременности), соматических патологиях (сахарный диабет 1 типа), способе наступления настоящей беременности — экстракорпоральное оплодотворение (ЭКО), осложнениях ранних сроков беременности (угрожающий

Контроль качества ДНК

Срок, мес.	Концентрация ДНК (M±m), г/мкл	Соотношение A260/A280 (M±m)	Число целостности ДНК (M±m)
0	118±48	1,9±0,1	9,5±0,1
1	123±37	1,9±0,1	9,4±0,4
6	101±24	1,9±0,1	9,3±0,2
12	124±41	1,9±0,1	9,3±0,3

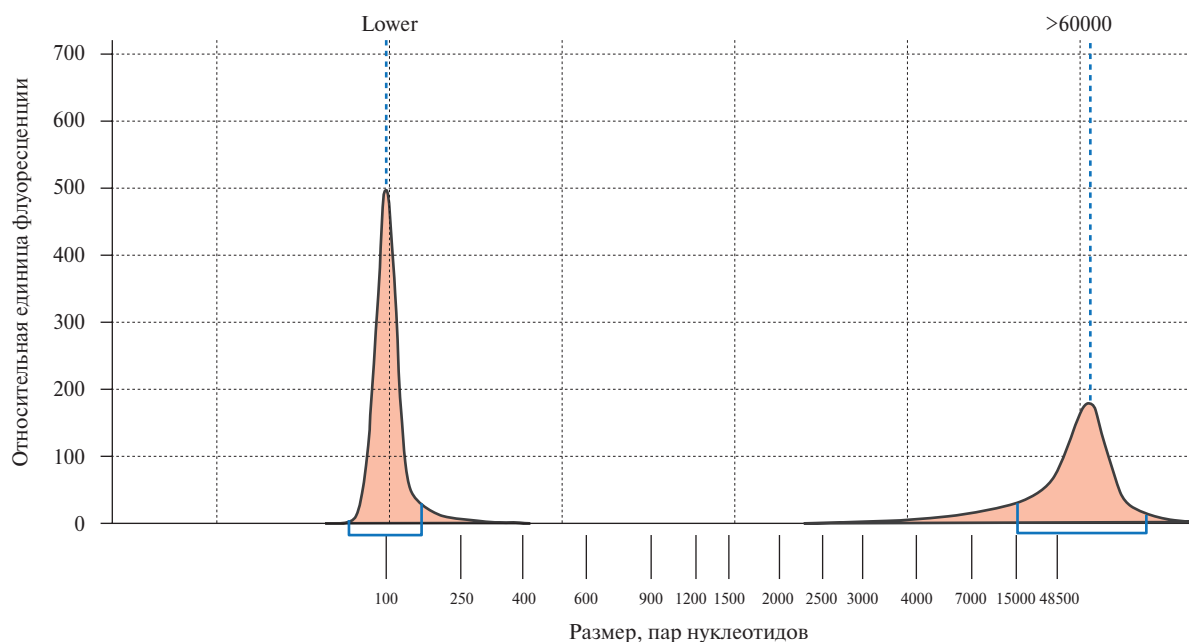


Рис. 4 Электрофореграмма геномной ДНК (образец 1.2.4).

выкидыш с ретрохориальной гематомой), материнских осложнениях (артериальная гипертензия беременных) и фетальных осложнениях гестации (задержка внутриутробного развития плода) позволяют интерпретировать получаемые данные в соответствии с имеющимися клиническими характеристиками. В свою очередь стандартизация сбора образцов на всех этапах создания коллекции обеспечивает высокую достоверность и воспроизводимость получаемых результатов.

Проведенный контроль качества образцов коллекции показал соответствие характеристик образцов всем предъявляемым требованиям. Средние значения концентраций, соотношения A260/A280 и целостности образцов ДНК 6 пациенток на разных сроках хранения (таблица 3) были в пределах нормальных значений. Оценка целостности ДНК на системе капиллярного электрофореза “2200 Tape Station Instrument” (Agilent Technologies) (рисунок 4), показала отсутствие фрагментов деградированной ДНК. Качество библиотек микроРНК двух образцов, выделенных из свежей плазмы крови и из плазмы после 3 мес. хранения, также оценивали на системе капиллярного электрофореза (рисунок 5). Их качество соответствовало рекомендованным значениям: длине фрагмента (~180 пар нуклеоти-

дов) и концентрации (>5 нг/мкл). В дальнейшем планируется проверять качество биообразцов после более длительного хранения. Данные параметры демонстрируют высокое качество получаемого материала и его стабильность при долгосрочном хранении (до 12 мес. по ДНК и до 3 мес. по микроРНК), что обеспечивает возможность использования образцов коллекции в дальнейших исследованиях.

Обсуждение

На современном этапе биобанки стали одним из самых ценных ресурсов в биомедицинских исследованиях, поскольку биобанк обеспечивает стандартизацию на всех этапах получения биоматериала и сбора информации, ассоциированной с образцами. Наиболее значимым преимуществом биобанкирования образцов, является возможность их неоднократного применения в различных научных и клинических исследованиях. Создание коллекции биообразцов от беременных женщин является важным его направлением.

Организация сбора биоматериала от женщин на протяжении всей беременности и в родах является крайне сложным процессом, ввиду специфических особенностей включения беременных

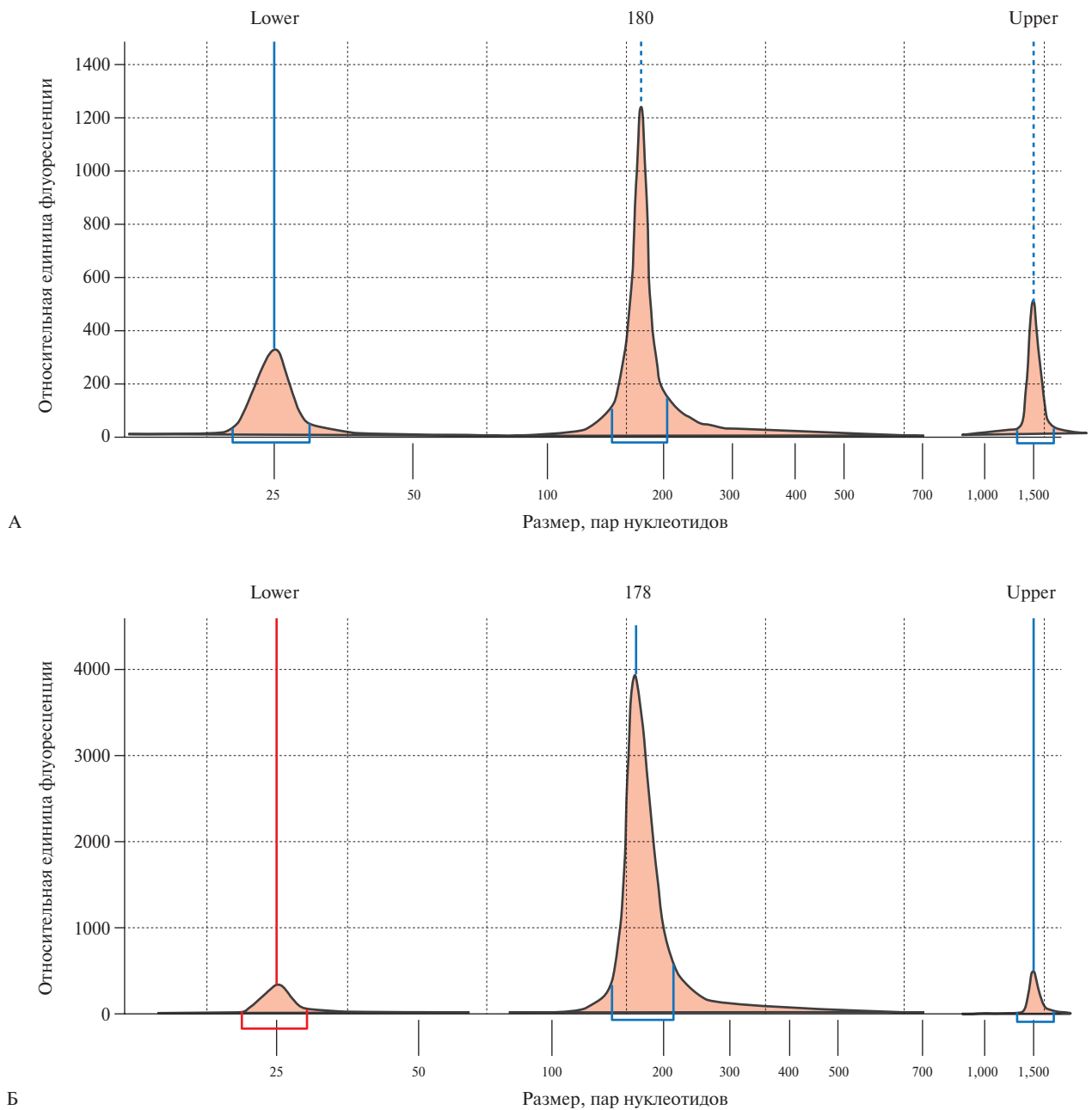


Рис. 5 Электрофореграмма библиотек микроРНК (А — свежий образец плазмы, Б — после хранения 3 мес.).

в научные исследования и непрогнозируемости ситуаций, связанных с течением беременности и ее осложнениями (зачастую требующими госпитализации в стационар с целью их коррекции или досрочного прерывания беременности по показаниям со стороны матери и плода) и невозможности предугадать срок, время и способ родоразрешения, а также медицинское учреждение, в которое может быть направлена женщина с началом родовой деятельности. Перечисленные факторы обусловили недостаточные темпы прироста коллекции по сравнению с планируемыми исходно при разработке дизайна проекта. Кроме того, в период сбора коллекции исследовательской группе пришлось стол-

кнуться с обстоятельствами непреодолимой силы (пандемия COVID-19). В связи с необходимостью соблюдения противоэпидемических мероприятий, в первую очередь для обеспечения безопасности беременных женщин и их плодов, процесс привлечения пациенток в исследование и повторной сдачи биоматериала его участницами был приостановлен. В настоящее время темп прироста образцов в коллекцию стабилизирован за счет принятия организационных мер по включению в исследование партнерских организаций, что расширило возможности привлечения участников.

Тем не менее собранные уже на сегодняшний день образцы и широкий спектр клинических

данных о возрасте, акушерско-гинекологическом анамнезе, соматических патологиях, материнских и фетальных осложнениях при беременности является достаточным для планирования и инициации научных исследований на базе коллекции. Информация о полученных образцах продолжает пополняться данными о течении и исходах беременности, состоянии новорожденных. Также рассматривается вопрос о дальнейшем получении данных катамнеза рожденных детей, что может являться перспективой для последующих исследовательских проектов.

Наиболее важным критерием, гарантирующим возможность использования образцов коллекции в будущих исследованиях, является качество сохраняемых образцов. Невоспроизводимость результатов, как известно, является основной проблемой перехода научных исследований в клиническую практику. Контроль качества образцов коллекции минимизирует риски возникновения изменений в образцах в течение длительного хранения, что позволяет повысить уровень достоверности результатов исследований [6].

Текущие исследования, проводимые на базе коллекции, направлены на изучение геномных (ДНК) и транскриптомных (микроРНК) особенностей беременных женщин с различными осложнениями гестации. В связи с этим на данном этапе для контроля качества образцов коллекции были выбраны показатели, характеризующие качество ДНК и микроРНК. Анализ полученных данных позволил убедиться в том, что на всех стадиях преаналитического этапа не были допущены ошибки и качество сохраняемых образцов позволяет проводить достоверные исследования.

Предполагается использование коллекции для решения широкого спектра научных задач (не только для изучения ДНК и микроРНК), поэтому в дальнейшем планируется оценить образцы на качество РНК (целостность и концентрация РНК),

биохимические показатели, сохранность пролиферативного потенциала клеток плаценты в условиях *in vitro* после длительного хранения. Таким образом, коллекция, включающая разнообразные образцы высокого качества, расширит возможности их применения в фундаментальных и прикладных исследованиях в различных областях биомедицины.

Заключение

Создание коллекции биообразцов от беременных женщин является стратегически значимым заданием для будущих научных клинических исследований. Биообразцы коллекции могут послужить важным субстратом для экспериментального изучения препаратов для беременных женщин, что позволит максимально изучить вопросы безопасности их применения и расширить возможности клинических исследований. Подробная “отработка” препаратов *in vitro* может позволить переломить ситуацию “невовлечения” беременных в клинические исследования. Получение доказательной базы позволит внести в инструкции разрешение о применении препаратов при беременности и защитить врачей от последствий назначения препаратов “off label”.

Разработка на базе коллекции инновационных тест-систем прогнозирования реализации гестационных осложнений позволит значимо улучшить их идентификацию и диагностику. Новые данные дадут возможность использовать персонализированный подход к ведению каждой беременной с учетом выявляемых индивидуальных особенностей женщины и течения ее гестации, что позволит снизить частоту осложнений беременности и улучшить перинатальные исходы.

Отношения и деятельность. Исследование поддержано грантом РФФ № 19-75-20033. Исследование выполнено в т.ч. на базе РЦ “Центр Биобанк” Научного парка СПбГУ.

Литература/References

1. Payne P. Including Pregnant Women in Clinical Research: Practical Guidance for Institutional Review Boards. *Ethics Hum Res.* 2019;41(6):35-40. doi:10.1002/eahr.500036.
2. González-Duarte A, Zambrano-González E, Medina-Franco H, et al. II. The research ethics involving vulnerable groups. *Rev Invest Clin.* 2019;71(4):217-25. doi:10.24875/RIC.19002812.
3. Sakharova ES, Keshishian ES, Alyamovskaya GA. Premature birth problem in modern stage of medical science development. Part 1. *Rossiyskiy Vestnik Perinatologii i Pediatrii (Russian Bulletin of Perinatology and Pediatrics).* 2017;62(3):15-9. (In Russ.) Сахарова Е. С., Кешишян Е. С., Алямовская Г. А. Недоношенность как медико-социальная проблема здравоохранения. Часть 1. *Российский вестник перинатологии и педиатрии.* 2017;62(3):15-9. doi:10.21508/1027-4065-2017-62-3-15-19.
4. Leon LJ, Solanky N, Stalman SE, et al. A new biological and clinical resource for research into pregnancy complications: The Baby Bio Bank. *Placenta.* 2016;46:31-37. doi:10.1016/j.placenta.2016.08.085.
5. Kosyakova OV, Bespalova ON. Challenges and prospects of preterm birth prediction in multiple pregnancies. *Journal of Obstetrics and Women's Diseases.* 2018;67(4):48-59. (In Russ.) Косякова О. В., Беспалова О. Н. Сложности и перспективы прогнозирования преждевременных родов при многоплодной беременности. *Журнал акушерства и женских болезней.* 2018;67(4):48-59. doi:10.17816/JOWD67448-59.
6. Liu Y, Gao H, Hu Y, et al. Quality Control System in an Obstetrics and Gynecology Disease Biobank. *Biopreserv Biobank.* 2019;17(1):27-38. doi:10.1089/bio.2018.0056.