

Инвентаризация и контроль качества "Коллекции биообразцов от беременных женщин на разных сроках гестации для поиска ранних биомаркеров осложнений беременности"

Мальцева А. Р.¹, Илларионов Р. А.^{1,2}, Вашукова Е. С.¹, Пачулия О. В.¹, Постникова Т. Б.¹, Велижанина М. Е.², Рубель А. А.², Насыхова Ю. А.¹, Беспалова О. Н.¹, Глотов А. С.^{1,2}

¹ФГБНУ "НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д. О. Отта". Санкт-Петербург; ²ФГБОУ ВО "Санкт-Петербургский государственный университет". Санкт-Петербург, Россия

Цель. Проведение инвентаризации и контроля качества биообразцов "Коллекции биообразцов от беременных женщин на разных сроках гестации для поиска ранних биомаркеров осложнений беременности".

Материал и методы. В рамках настоящей работы использованы методы оценки прободготовки биообразцов, включающие выделение дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК)/рибонуклеиновой кислоты из разного биоматериала, белковый электрофорез в полиакриламидном геле и анализ базы данных.

Результаты. Проведен контроль качества биообразцов и инвентаризация коллекции (n=18390), подтвердившие высокую сохранность биоматериала вне зависимости от срока хранения. Средняя концентрация ДНК составила (69,96±6,56) нг/мкл, внеклеточной ДНК (вкДНК) — 0,20±0,02 нг/мкл, рибонуклеиновой кислоты — 38,16±5,69 нг/мкл. Показатели DNA Integrity Number (DIN) >9, RNA integrity number (RIN) >7, A260/280 >1,8 — для всех исследуемых образцов. Белковый форез продемонстрировал отсутствие деградациии белковых зон после длительного хранения. Количество ошибок, обнаруженных при инвентаризации — 84 (0,46% от всех записей в базе данных), доноров с неполной клинической информацией — 64 (15% от всех доноров коллекции).

Заключение. Продемонстрирована необходимость обязательно го исполнения стандартных операционных процедур при создании

и поддержании коллекции, с одной стороны, и периодической инвентаризации с оценкой качества биообразцов, с другой.

Ключевые слова: биобанкирование, беременность, биомаркеры осложнений беременности, биоресурсная коллекция.

Отношения и деятельность. Исследование поддержано грантом РНФ № 19-75-20033. Часть работ выполнена на базе РЦ "Центр Биобанк" Научного парка СПбГУ.

Поступила 18/09-2023

Рецензия получена 26/10-2023

Принята к публикации 20/11-2023



Для цитирования: Мальцева А. Р., Илларионов Р. А., Вашукова Е. С., Пачулия О. В., Постникова Т. Б., Велижанина М. Е., Рубель А. А., Насыхова Ю. А., Беспалова О. Н., Глотов А. С. Инвентаризация и контроль качества "Коллекции биообразцов от беременных женщин на разных сроках гестации для поиска ранних биомаркеров осложнений беременности". *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2023;22(11):3740. doi:10.15829/1728-8800-2023-3740. EDN CEXKVS

Inventory and quality control of biosample collection from pregnant women at different gestational ages to search for early biomarkers of pregnancy complications

Maltseva A. R.¹, Illarionov R. A.^{1,2}, Vashukova E. S.¹, Pachulia O. V.¹, Postnikova T. B.¹, Velizhanina M. E.², Rubel A. A.², Nasykhova Yu. A.¹, Bespalova O. N.¹, Glotov A. S.^{1,2}

¹D. O. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology. St. Petersburg; ²Saint-Petersburg State University. St. Petersburg, Russia

Aim. To conduct an inventory and quality control of biosample collection from pregnant women at different gestational ages to search for early biomarkers of pregnancy complications.

Material and methods. In this work, methods for assessing the sample preparation of biosamples were used, including the isolation

of deoxyribonucleic acid (DNA)/ribonucleic acid from various biomaterials, polyacrylamide gel electrophoresis of protein, and database analysis.

Results. Inventory and quality control of the collection (n=18390) was carried out, which confirmed the high safety of the biomaterial, regardless

*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):

e-mail: r.a.illarionov@gmail.com

[Мальцева А. Р. — лаборант-исследователь лаборатории геномики отдела геномной медицины им. В. С. Баранова, ORCID: 0000-0002-5647-6783, Илларионов Р. А.* — м.н.с. Биобанка "Генофонд" отдела геномной медицины им. В. С. Баранова, специалист РЦ "Центр Биобанк" Научного парка, ORCID: 0000-0003-2711-748X, Вашукова Е. С. — к.б.н., н.с. лаборатории геномики отдела геномной медицины им. В. С. Баранова, ORCID: 0000-0002-6996-8891, Пачулия О. В. — к.м.н., ученый секретарь, ORCID: 0000-0003-4116-0222, Постникова Т. Б. — м.н.с. отдела акушерства и перинатологии, ORCID: 0000-0002-8227-2629, Велижанина М. Е. — инженер-исследователь лаборатории Биологии амилоидов, ORCID: 0000-0002-9005-527X, Рубель А. А. — н.с., руководитель лаборатории Биологии амилоидов, ORCID: 0000-0001-6203-2006, Насыхова Ю. А. — к.б.н., зав. лабораторией геномики отдела геномной медицины им. В. С. Баранова, ORCID: 0000-0002-3543-4963, Беспалова О. Н. — д.м.н., зам. директора по научной работе, ORCID: 0000-0002-6542-5953, Глотов А. С. — д.б.н., зав. отдела геномной медицины им. В. С. Баранова, профессор кафедры генетики и биотехнологии, ORCID: 0000-0002-7465-4504].

of storage period. The mean concentration of DNA was $69,96 \pm 6,56$ ng/ μ l, extracellular DNA (ecDNA) — $0,20 \pm 0,02$ ng/ μ l, ribonucleic acid — $38,16 \pm 5,69$ ng/ μ l. DNA Integrity Number (DIN) >9, RNA integrity number (RIN) >7, A260/280 >1,8 were for all studied samples. Protein electrophoresis demonstrated no degradation of protein zones after long-term storage. The number of errors detected during the inventory was 84 (0,46% of all records in the database), while there were 64 donors with incomplete clinical information (15% of all donors in the collection).

Conclusion. The necessity of mandatory implementation of standard operating procedures when creating and maintaining a collection, on the one hand, and periodic inventory with biosample quality assessment, on the other, has been demonstrated.

Keywords: biobanking, pregnancy, biomarkers of pregnancy complications, bioresource collection.

Relationships and Activities. The study was supported by the Russian Science Foundation grant № 19-75-20033. Some of the work was carried out on the basis of the Biobank Center of the Research Park of St. Petersburg State University.

Maltseva A. R. ORCID: 0000-0002-5647-6783, Illarionov R. A.* ORCID: 0000-0003-2711-748X, Vashukova E. S. ORCID: 0000-0002-6996-8891,

Pachulia O.V. ORCID: 0000-0003-4116-0222, Postnikova T.B. ORCID: 0000-0002-8227-2629, Velizhanina M.E. ORCID: 0000-0002-9005-527X, Rubel A.A. ORCID: 0000-0001-6203-2006, Nasykhova Yu. A. ORCID: 0000-0002-3543-4963, Bespalova O.N. ORCID: 0000-0002-6542-5953, Glotov A.S. ORCID: 0000-0002-7465-4504.

*Corresponding author:
r.a.illarionov@gmail.com

Received: 18/09-2023

Revision Received: 26/10-2023

Accepted: 20/11-2023

For citation: Maltseva A. R., Illarionov R. A., Vashukova E. S., Pachulia O. V., Postnikova T. B., Velizhanina M. E., Rubel A. A., Nasykhova Yu. A., Bespalova O. N., Glotov A. S. Inventory and quality control of biosample collection from pregnant women at different gestational ages to search for early biomarkers of pregnancy complications. *Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2023;22(11):3740. doi:10.15829/1728-8800-2023-3740. EDN CEXKVS

вкДНК — внемклеточная дезоксирибонуклеиновая кислота, гДНК — геномная дезоксирибонуклеиновая кислота, ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота, РНК — рибонуклеиновая кислота, DIN — DNA Integrity Number (показатель целостности ДНК), RIN — RNA Integrity Number (показатель целостности РНК).

Ключевые моменты

Что известно о предмете исследования?

- Биобанки являются современной платформой, обеспечивающей доступ к высококачественному биоматериалу, стандартизованному на всех этапах получения образцов.
- Интегральными критериями, характеризующими биообразцы, являются "высокое качество" и наличие ассоциированных данных.

Что добавляют результаты исследования?

- При создании и поддержании биоресурсной коллекции необходимо обязательное исполнение стандартных операционных процедур.
- Необходима периодическая инвентаризация с оценкой качества образцов биоресурсной коллекции.

Key messages

What is already known about the subject?

- Biobanks are a modern platform that provides access to high-quality biomaterial, standardized at all sampling stages.
- Integral criteria characterizing biospecimens are "high quality" and the presence of related data.

What might this study add?

- When creating and maintaining a bioresource collection, standard operating procedures must be followed.
- Periodic inventory is required to assess the quality of biosamples.

Введение

Современные биобанки представляют собой передовую платформу, обеспечивающую доступ к высококачественным биообразцам, прошедшим стандартизированные процедуры на всех этапах жизненного цикла. Одним из преимуществ биобанков является возможность многократного использования аликвот этих образцов в разнообразных исследованиях и при клинических испытаниях [1].

Основным интегральным критерием, характеризующим биообразцы, является такое понятие как "высокое качество". Оно включает в себя не только стандарты получения, лабораторную обработку

и соблюдение оптимальных условий хранения биологического материала, но и регламентированный способ получения и хранения данных, ассоциированных с образцами.

Менеджмент качества, регулярно осуществляемый при биобанкировании, обеспечивает сбор и хранение проб с минимальным процентом ошибок и потерь. При этом он подразумевает регулярный скрининг коллекции на предмет наличия образцов, не соответствующих заявленным критериям качества. Одним из таких способов является инвентаризация.

Инвентаризация биобанка в широком смысле — это процесс учета и проверки наличия и каче-

ства образцов, хранящихся в биобанке. Инвентаризация может включать в себя оценку корректности указания в базе данных таких характеристик, как вид биологического материала, состояние пациента при получении образца, учреждение в котором был получен образец, даты сбора, имя специалиста, производящего забор биоматериала, номер пробы, первичное состояние образца и др. В процессе инвентаризации также может происходить проверка и обновление системы хранения и организации биобанка для обеспечения ее сохранности и удобства использования. Окончательным результатом инвентаризации можно считать полный и точный список всех биологических образцов, находящихся в биобанке, и наличие полноценной информации о каждом из них.

Непосредственный контроль качества биообразцов в первую очередь заключается в оценке пригодности образцов для реализации различных научных задач [2]. Способы оценки качества зависят от целей сбора биообразцов и проводимых на их основе исследований (геномных, протеомных, транскриптомных и др.). Итогом проведения процедуры по контролю качества является характеристика биообразцов по выбранным критериям. Так, к примеру, для молекулярно-генетических исследований важное значение имеют следующие показатели: концентрация нуклеиновых кислот, соотношение длин волн A260/A280, показатели целостности дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) и рибонуклеиновой кислоты (РНК) — DIN (DNA Integrity Number) и RIN (RNA Integrity Number), соответственно [3-5].

Начиная с 2019г, на базе биобанка отдела геномной медицины им. В.С. Баранова ФГБНУ "НИИ АГиР им. Д.О. Отта" началось формирование "Коллекции биообразцов от беременных женщин на разных сроках гестации для поиска ранних биомаркеров осложнений беременности" [6-8]. По состоянию на 15.09.2023г в коллекции находится 18390 биообразцов от 427 беременных женщин. Сбор биоматериала для коллекции осуществляется проспективно в 4-х временных точках (в I, II, III триместрах и после родоразрешения). От беременных женщин один раз в триместр производится забор материнской периферической крови (вакуумные пробирки с этилендиаминтетрауксусной кислотой (ЭДТА) 9 мл — 2 шт.; вакуумные пробирки с активатором свертывания крови — 1 шт.), мочи (не <40 мл); после родоразрешения забирается дополнительно участок плаценты (размер не <2×2×2 см) и пуповинная кровь (вакуумная пробирка с ЭДТА 9 мл — 1 шт.). В стандартном случае на каждую точку сбора приходится 20 биообразцов (6 аликвот цельной крови по 1 мл, 4 аликвоты плазмы крови по 1 мл, 6 аликвот сыворотки крови по 650 мкл, 4 аликвоты мочи по 4,5 мл) [6-8]. Сбор

идет на протяжении 4-х лет, коллекция постоянно пополняется. Вместе с тем на базе коллекции проводится обширный спектр научных исследований [6-8], что предполагает частичное использование собранных образцов. Отличительной особенностью коллекции является сбор образцов, а также ассоциированных клинических данных на разных сроках беременности от одной женщины. Эти факторы обусловили необходимость проведения инвентаризации коллекции и оценки качества собранных биообразцов.

В настоящей работе представлены результаты проверки наличия биообразцов, клинических данных, карты хранилищ, а также оценки их качества. В ходе работы обновлена карта криохранилища, определено состояние клинической и базы данных аликвот, добавлены недостающие сведения. Поскольку коллекция ориентирована на исследование молекулярно-генетических маркеров, то проведена проверка качества биообразцов на геномном, протеомном и транскриптомном уровнях.

Материал и методы

Образцы

В качестве материала для исследования использовали образцы плазмы и сыворотки крови, цельной крови и лейкоцитарной пленки. Случайным образом были отобраны биообразцы со сроком хранения 2, 3, 4 года (n=6 для каждого типа биоматериала в каждый год хранения).

Критерии включения женщин были следующими: возраст (25-35 лет), нормальный индекс массы тела (19-24 кг/м²), одноплодная беременность.

Критериями невключения были: тяжелые хронические заболевания (артериальная гипертензия, сердечно-сосудистые заболевания, почечная патология, сахарный диабет, гемотрансмиссивные инфекции (гепатиты, вирус иммунодефицита человека, антифосфолипидный синдром и др.); осложнения гестации (ранний токсикоз беременных, высокий риск хромосомных аномалий плода, врожденных патологий развития плода или преэклампсии по данным комбинированного первого скрининга); наличие осложнений поздних сроков беременности (гестационный сахарный диабет, преэклампсия, гепатоз, отслойка плаценты и др.), т.к. перечисленные заболевания могли повлиять на исследуемые показатели.

Исследование одобрено локальным этическим комитетом ФГБНУ "НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта" (Санкт-Петербург, Россия), протокол № 97 от 27 июня 2019г. Информированное согласие было подписано всеми женщинами до взятия биообразцов.

Процессинг биообразцов

Пробоподготовка образцов осуществлялась согласно стандартным операционным процедурам, описанным нами ранее [8]. Биообразцы цельной крови, плазмы, сыворотки и лейкоцитарной пленки хранились при температуре -80° С.

Инвентаризация коллекции

Инвентаризация коллекции проведена согласно следующему плану:

1. Проверка местонахождения криоштативов в хранилище, зафиксированных в базе. Обновление карты криохранилища.
2. Проверка наличия аликутов и добавление пометок об их отсутствии.
3. Редактирование ошибок в базе.
4. Проверка ассоциированных клинических данных в базе.
5. Сбор недостающих клинических данных и их добавление.
6. Исключение образцов при отсутствии данных.

Инвентаризация проводилась параллельно двумя сотрудниками биобанка для минимизации влияния человеческого фактора при проверке.

Выделение РНК

РНК экстрагировали из 10 мг лейкоцитарной пленки набором PureLink™ RNA Mini Kit (Invitrogen, США) в соответствии с инструкцией производителя. Для элюирования РНК использовали 50 мкл воды без рибонуклеаз.

Выделение внеклеточной ДНК (вкДНК)

Внеклеточную ДНК (вкДНК) экстрагировали из 300 мкл плазмы набором MGEasy Circulating DNA Isolation Kit (ВЛ, Китай) в соответствии с инструкцией производителя. Для ресуспендирования вкДНК использовали 30 мкл элюирующего буфера.

Выделение ДНК из клеток крови

ДНК экстрагировали из 400 мкл цельной крови солевым методом [9]. Полученную ДНК элюировали в 100 мкл воды без нуклеаз.

Белковый электрофорез в полиакриламидном геле

Образцы сыворотки, хранившиеся при температуре -80°C , размораживали на льду. После размораживания образцы тщательно перемешивали пипетированием. Сыворотку разбавляли в десять раз. Для этого к 10 мкл образца добавляли 90 мкл фосфатно-солевого буфера (рН 7,6) (137 мМ NaCl; 2,7 мМ KCl; 10 мМ Na_2HPO_4 ; 1,76 мМ KH_2PO_4), содержащего ингибиторы протеаз "Complete Tablets Mini" (Roche, США). К каждому образцу добавляли 34 мкл 4-кратного буфера для нанесения образцов, (100 мМ Трис-HCl (рН 6,8), 20% меркаптоэтанол, 10% додецилсульфат натрия (SDS), 0,2% бромфеноловый синий и 40% глицерин). Образцы инкубировали на водяной бане при температуре 95°C в течение 10 мин. В лунки 10%-го полиакриламидного геля наносили по 2 мкл каждой пробы и проводили электрофорез по стандартной методике [10]. После электрофореза полиакриламидный гель промывали в воде в течение 15 мин. Проводили окрашивание геля в растворе Кумасси (0,2% Кумасси G-250, 10% уксусная кислота, 40% этанол) в течение 2-4 ч при постоянном покачивании. Для отмывки несвязавшегося с белками красителя гель ополаскивали в воде и отмывали в растворе (10% уксусная кислота, 40% этанол) в течение 1 ч, со сменой раствора для отмывки через 30 мин и дважды через 15 мин.

Оценка качества биообразцов

Качество выделенных образцов геномной ДНК (гДНК) оценивали путем измерения концентрации ДНК на флуориметре "Qubit 2.0" (Invitrogen, США) и 1X dsDNA HS Assay Kit, соотношения длин волн A260/A280 — на спектрофотометре "Nanodrop 2000" (Thermo Scientific, США). Целостность ДНК (DIN) определяли с использованием автоматического капиллярного гель-электрофореза на приборе "2200 TapeStation Instrument" (Agilent Technologies, США) и Genomic DNA ScreenTape.

Таблица 1

Инвентаризация клинических данных

База клинических данных	Неполные клинические данные	
363 доноров	Образцы 64 доноров изъяты	11 доноров: неразвивающаяся беременность/выкидыш между 2 и 3 точкой (триместром)
		17 доноров: переезд в другую страну/регион без контактных данных
		3 донора: антенатальная гибель плода
		5 доноров: отказались предоставить данные по исходам беременности
		19 доноров: недоступны для связи
		9 доноров: отказались от продолжения участия в исследовании после сдачи 1 точки

Качество выделенных образцов вкДНК оценивали путем измерения концентрации вкДНК на флуориметре "Qubit 2.0" (Invitrogen, США) и 1X dsDNA HS Assay Kit. Целостность вкДНК определяли с использованием автоматического капиллярного гель-электрофореза на приборе "2200 TapeStation Instrument" (Agilent Technologies, США) и High Sensitivity DNA ScreenTape.

Качество выделенных образцов РНК оценивали путем измерения концентрации РНК на флуориметре "Qubit 2.0" (Invitrogen, США) и RNA High Sensitivity Assay Kit, оценки соотношения длин волн A260/A280, измеренных на спектрофотометре "Nanodrop 2000" (Thermo Scientific, США). Целостность РНК оценивали с помощью RIN с использованием автоматического капиллярного гель-электрофореза на приборе "2200 TapeStation Instrument" (Agilent Technologies, США) и RNA ScreenTape.

Фотофиксацию результатов белкового электрофореза проводили с использованием гель-документирующей системы ChemiDoc (BioRad, США), используя экран "Chemi".

Статистический анализ. Статистический анализ данных выполнен с использованием Statistica 10.0 (StatSoft, Inc., США). Достоверность различий определяли с помощью непараметрического рангового критерия Краскела-Уоллиса. Различия считали достоверными при $p < 0,05$. Непрерывные переменные представлены как среднее \pm стандартная ошибка ($M \pm SEM$).

Результаты

Инвентаризация

В результате инвентаризации была обновлена карта хранилища (расположение криоштативов в хранилищах), было проверено наличие аликутов ($n=18390$) в каждом из криоштативов и их расположение в штативе, также были исправлены ошибки в маркировке пробирок. Исправление ошибок проводилось согласно разработанным ранее стандартным операционным процедурам по пробоподготовке биообразцов, контролю качества биообразцов, хранению биообразцов и анализу данных [8]. В результате в базе данных было сделано 84 исправ-

Таблица 2

Средний выход гДНК 2019–2021гг

Годы	гДНК				A 260/280 (M±SEM)	
	С, нг/мкл (M±SEM)	р	DIN (M±SEM)	р		р
2019	62,94±8,50	0,31	9,46±0,108	0,08	1,89±0,004	0,62
2020	57,12±9,70		9,55±0,106		1,88±0,006	
2021	88,67±11,69		9,73±0,021		1,88±0,005	

Примечание: С — концентрация, гДНК — геномная ДНК, M±SEM — среднее ± стандартная ошибка.

Таблица 3
Средний выход вкДНК 2019–2021гг

Годы	вкДНК	
	С, нг/мкл (M±SEM)	р
2019	0,214±0,044	0,89
2020	0,190±0,032	
2021	0,205±0,037	

Примечание: С — концентрация, вкДНК — внеклеточная ДНК, M±SEM — среднее ± стандартная ошибка.

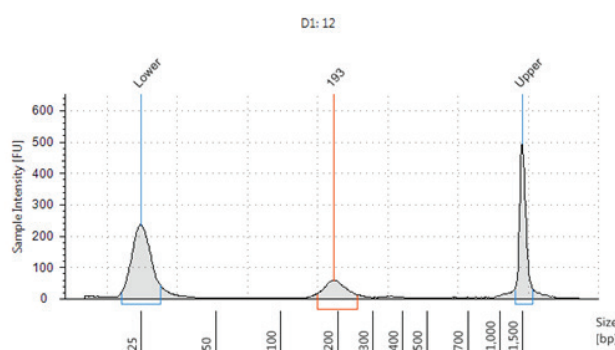


Рис. 1 Электрофореграмма вкДНК, выделенной из плазмы крови беременной, 2021г.

Примечание: вкДНК — внеклеточная ДНК.

ления найденных ошибок, а именно 4 в расположении криоштатива в хранилище, 43 в расположении криопробирки в криоштативе, 15 в маркировке пробирок, 22 в заполнении базы данных.

Была проведена проверка клинических данных, ассоциированных с биообразцами коллекции. В связи с тем, что сбор образцов происходит проспективно в 4-х временных точках (в I, II, III триместрах и после родоразрешения), есть вероятность отсутствия клинических данных во всех временных точках сбора, например, могут быть не указаны антропометрические показатели, информация о гинекологических и экстрагенитальных заболеваниях и т.д. [7]. В результате проверки были обнаружены неполные клинические данные у 64 пациенток из 427. Причины отсутствия данных: отказ от продолжения участия в исследовании, отказ от предоставления выписки после родоразрешения, переезд

в другой регион/страну без предоставления контактных данных (таблица 1).

Оценка качества ДНК

Средняя концентрация ДНК, выделенной из 400 мкл цельной крови для образцов 2019–2022гг, составляет от 57,12 до 88,67 нг/мкл. Среднее соотношение A260/280 за эти года варьируется от 1,88 до 1,89, а DIN от 9,46 до 9,73, что свидетельствует о высоком качестве ДНК (таблица 2). Корреляции между продолжительностью хранения и общей концентрацией или качеством выделенной ДНК (показателями A260/280 и DIN) обнаружено не было. Эти данные позволяют предположить, что образцы цельной крови в коллекции содержат ДНК, пригодную для проведения молекулярно-генетических исследований, а качество ДНК не зависит от срока хранения [3, 11, 12].

Оценка качества вкДНК

Количественный флуорометрический анализ является оптимальным вариантом для анализа образцов с невысокой концентрацией ДНК [13]. Не рекомендуется использовать образцы с концентрацией вкДНК плазмы <2 нг/мл [5]. В настоящем исследовании средняя концентрация вкДНК варьировалась от 0,190 до 0,214 нг/мкл. На электрофореграмме основной пик фрагментов вкДНК соответствуют 150–170 пар нуклеотидов (п.н.) (рисунок 1). Основываясь на полученных результатах, показанных в таблице 3, можно заключить, что срок хранения плазмы крови не влияет на качество вкДНК, образцы 2019г и 2022г можно использовать для исследований.

Оценка качества РНК

Образцы РНК определяются как "хорошие" или "умеренные" с соотношением A 260/280 от 1,98 до 2,04 при RIN ≥6,9 и от 2,05 до 2,08 при RIN ≥5 [4].

Результаты анализа образцов 2019г являются пограничными, в отличие от результатов последующих лет, но при этом находятся в пределах нормы (таблица 4).

Таким образом, биообразцы, входящие в коллекцию, обладают хорошим качеством вне зависимости от срока хранения [4].

Оценка качества белкового профиля

На рисунке 2 представлены результаты анализа образцов сыворотки при помощи электрофоре-

Средний выход РНК 2019-2021гг

Годы	РНК		RIN (M±SEM)		A 260/280 (M±SEM)	
	С, нг/мкл (M±SEM)	p		p		p
2019	28,44±3,82	0,30	7,34±0,02	0,71	1,95±0,01	0,19
2020	49,60±13,26		7,33±0,17		2,04±0,01	
2021	34,83±7,98		7,35±0,09		2,02±0,01	

Примечание: РНК — рибонуклеиновая кислота, С — концентрация, RIN — RNA integrity number (показатель целостности РНК), M±SEM — среднее±стандартная ошибка.

за в полиакриламидном геле. Окрашенные полосы соответствуют основным мажорным белкам, представленным в сыворотке. Из представленных данных на рисунке 2 видно, что во всех образцах, вне зависимости от периода хранения, видны основные белковые зоны, их количество и размеры не различаются. Признаков деградации белковых зон после длительного хранения не наблюдается.

Обсуждение

В современном биобанке невозможно обойтись без мер по повышению и обеспечению качества коллекций и предоставляемых услуг [2]. Одними из важных аспектов обеспечения качества в биобанке являются контроль качества биообразцов и инвентаризация биоресурсных коллекций, включая ассоциированные с образцами данные. Проведение контроля качества позволяет не только убедиться в пригодности тех или иных биообразцов для определенных исследований, но и добиться воспроизводимости результатов анализа [2]. В свою очередь, возможность определить местоположение биообразца в хранилище и наличие ассоциированных с ним данных в любое время является не менее важным параметром в определении качества биобанка. Для этого в рамках обеспечения качества должна проводиться периодическая инвентаризация биоресурсных коллекций.

"Коллекция биообразцов от беременных женщин на разных сроках гестации для поиска ранних биомаркеров осложнений беременности" является уникальной и ценной базой для медицины, фундаментальных и прикладных направлений. Исследования на основе коллекции позволяют изучать патогенетические механизмы различных гестационных осложнений, а также разрабатывать новые методы диагностики и терапевтических мероприятий в области акушерства и гинекологии [6-8].

В коллекции представлены образцы цельной крови, плазмы, сыворотки, лейкоцитарной пленки, мочи, плаценты, пуповинной крови, которые собираются в разные периоды беременности. Анализ этих образцов позволяет получить разнообразную информацию о состоянии здоровья матери и плода, метаболических процессах, генетических маркерах и биохимических параметрах [8, 14].

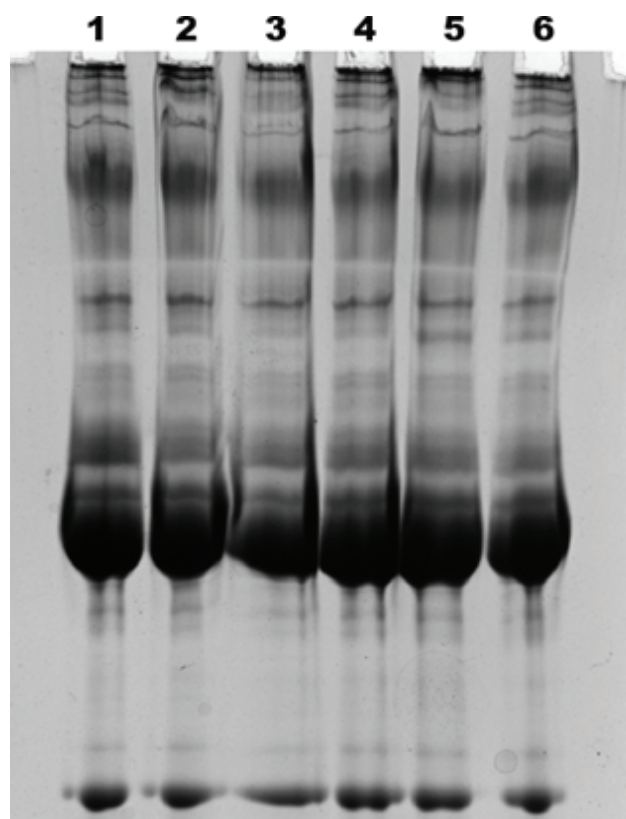


Рис. 2 Электрофореграмма белков из образцов сыворотки, хранившихся различное время при температуре -80°C .

Примечание: слева направо от наименьшего к наибольшему сроку хранения образца сыворотки: 1 — свежий образец; 2 — 2-3 мес. хранения; 3 — 3-6 мес. хранения; 4 — 4-2 года хранения; 5 — 5-3 года хранения; 6 — 6-4 года хранения.

Коллекция пополняется с 2019г по настоящее время. За этот период могли накопиться различные ошибки, связанные с ведением электронной базы коллекции и фактическим наличием биообразцов. Для выявления и устранения этих ошибок была проведена инвентаризация коллекции. В первую очередь проверяли соответствие базы данных коллекции фактическому наличию аликвот в криоштативах, ошибки в расположении криопробирок в криоштативах, отсутствие или опечатки в маркировке криопробирок, а также ошибки в заполнении базы данных (опечатки, отсутствие информации).

Все выявленные ошибки были связаны с человеческим фактором и могут быть обусловлены работой с большим количеством образцов. Полученные данные свидетельствуют о необходимости регулярного проведения инвентаризации для исключения преаналитических ошибок при формировании и использовании коллекции.

В ходе инвентаризации проведена оценка заполнения медицинской информации. Отсутствие или неполная клиническая характеристика образцов ограничивает их использование в исследованиях. Недостаточные клинические данные были обнаружены у 64 женщин, что составляет 15% от всех доноров коллекции. Образцы от этих женщин не подходят для поиска маркеров осложнений беременности, но могут быть использованы для тестирования новых методов исследования и оценки качества хранящихся образцов.

К сожалению, никаких рекомендаций по частоте проведения инвентаризации коллекций в биобанке нет, каждый биобанк принимает решение самостоятельно, основываясь на собственном опыте, размере коллекции или количества поступающих биообразцов.

Качество образцов в коллекции является ключевым фактором, гарантирующим возможность их использования в будущих исследованиях. Контроль качества позволяет минимизировать риски изменений в образцах в процессе длительного хранения, тем самым повышая достоверность результатов исследований, а также продлевая жизненный цикл коллекции. Текущие исследования, проводимые на базе коллекции, направлены на изучение геномных (ДНК), транскриптомных (РНК) и протеомных особенностей беременных женщин с различными осложнениями гестации. Поэтому для контроля качества образцов коллекции были выбраны показатели, характеризующие качество вкДНК и гДНК, РНК, белкового профиля. Оценивались следующие показатели ДНК: DIN, концентрация, A 260/280; вкДНК: концентрация; РНК: RIN, концентрация, A 260/280; деградация белковых зон.

К основным показателям качества гДНК относятся чистота (A260/280) и целостность (DIN). "Чистыми" являются образцы ДНК с соотношением A260/280 >1,8, в свою очередь ДНК считается высокоинтактной при значении DIN >8,5 [15]. Многие биобанки проводят свой контроль качества образцов ДНК: так, в норвежском популяционном биобанке HUNT Biobank (Норвегия) средняя концентрация ДНК составляет 50 нг/мкл, а соотношение A260/280 — 1,8, на основании тестирования 1255 образцов цельной крови¹. При контроле качества коллекции получены

средние значения показателей концентрации для гДНК, выделенной из цельной крови, >50 нг/мкл, A260/280 >1,8, DIN >9, что свидетельствует о высоком качестве собранных нами образцов. Таким образом, полученные результаты позволяют сделать вывод, что образцы коллекции могут быть использованы для любых типов исследований в области молекулярной генетики.

Как и в случае гДНК, одним из показателей пригодности вкДНК является ее концентрация [16]. Для оценки концентрации вкДНК нами был выбран метод флуориметрии, поскольку он является оптимальным для данного типа анализов и обладает высокой точностью измерений [13]. Как правило, для проведения молекулярно-генетических исследований необходимо не <1 нг вкДНК [13], все протестированные нами образцы соответствуют этому требованию, что указывает на их хорошее качество.

В настоящее время наибольшее распространение для оценки целостности РНК получил метод определения индекса RIN: образцы РНК со значениями RIN ≥7 считаются интактными, следовательно, имеют высокое качество и пригодны для применения различных методов оценки экспрессии генов (чипы, полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией, микрочипы микроРНК, секвенирование РНК). Значения RIN от 5 до 7 указывают на небольшую деградацию РНК, <4 — на высокий уровень деградации РНК, такие образцы подходят для исследования микроРНК или экспрессии определенного гена [14]. Важно отметить, что концентрация и целостность РНК могут зависеть от типа исходного биоматериала [14, 17]. Однако лишь в единичных публикациях представлены данные об этих параметрах в биобанках. Например, в Tumor Biobanks (Бельгия) был проведен контроль качества препаратов РНК, выделенных из опухолевых тканей, образцы со значениями RIN ≥7, 1,8 ≤ A260/280 ≤2,1 были определены как пригодные для всех транскриптомных исследований [17]. Образцы, взятые нами для проверки качества РНК, также имели RIN ≥7 и 1,8 ≤ A260/280 ≤2,1, что свидетельствует о возможности их применения в дальнейшей работе.

Согласно экспериментальным исследованиям протеомные маркеры обладают разной стабильностью [18], поэтому выбор метода для оценки качества образцов во многом зависит от целей исследования. К одному из показателей качества биообразцов относится белковый профиль, который может быть оценен с помощью электрофореза в полиакриламидном геле. В публикациях нет сведений об использовании этого метода для оценки качества образцов в биобанках, он не является специфичным для конкретного типа протеомных маркеров, однако может служить средством для предварительной оценки деградации белков в био-

¹ HUNT Extraction and concentration normalisation of DNA: NTNU. <https://www.ntnu.edu/hunt/hunt-dna-quality> (2 September 2023).

образце. В ходе проверки качества образцов сыворотки с разным сроком хранения нами не было обнаружено каких-либо изменений в их белковом профиле. Это косвенно свидетельствует об отсутствии деградации белков в образцах сыворотки крови, хранившихся при температуре -80°C в течение >4 лет.

Таким образом, результаты настоящей работы свидетельствуют о том, что образцы коллекции, вне зависимости от срока хранения обладают высоким качеством и могут быть использованы в различных типах исследований. Это было достигнуто благодаря регламентированию работ при создании коллекции: стандартизации всех проводимых процедур с биообразцами (сбор, обработка и хранение), своевременному техническому обслуживанию оборудования, обучению персонала, а также менеджменту качества. На данный момент отсутствуют международные и национальные рекомендации относительно периодичности проведения инвентаризации, т.к. во многом это зависит от индивидуальных характеристик и целей каждого биобанка. Основываясь на итогах проделанной работы, рекомендуем проводить инвентаризацию не реже одного раза в год или каждые 5000 образцов для исключения преаналитических ошибок при форми-

ровании коллекции. Полная и четкая база данных позволит ускорить процесс получения биообразцов с заданными параметрами для исследований, включая клиническую характеристику образцов.

Заключение

"Высокое качество" биообразцов является главным критерием оценки работы биобанка. Для его повышения необходимо выстраивать работу на основных принципах обеспечения качества, в т.ч. проводить контроль качества биообразцов и периодическую инвентаризацию биоресурсных коллекций.

Реализованный нами подход по оценке некоторых параметров образцов и проведенная инвентаризация "Коллекции биообразцов от беременных женщин на разных сроках гестации для поиска ранних биомаркеров осложнений беременности" может стать важным элементом по продвижению биобанкирования как основной базовой стратегии в поддержании качества проводимых исследований и клинических испытаний.

Отношения и деятельность. Исследование поддержано грантом РФФИ № 19-75-20033. Часть работ выполнена на базе РЦ "Центр Биобанк" Научного парка СПбГУ.

Литература/References

- Anisimov SV, Meshkov AN, Glotov AS, et al. National Association of Biobanks and Biobanking Specialists: New Community for Promoting Biobanking Ideas and Projects in Russia. *Biopreserv Biobank*. 2021;19(1):73-82. doi:10.1089/bio.2020.0049.
- Sivakova OV, Pokrovskaya MS, Efimova IA, et al. Quality control of serum and plasma samples for scientific research. *Profilakticheskaya Meditsina*. 2019;22(5):91-7. (In Russ.) Сивакова О.В., Покровская М.С., Ефимова И.А. и др. Контроль качества образцов сыворотки и плазмы крови для научных исследований. *Профилактическая медицина*. 2019;22(5): 91-7. doi:10.17116/profmed20192205191.
- Chen WC, Kerr R, May A, et al. The Integrity and Yield of Genomic DNA Isolated from Whole Blood Following Long-Term Storage at -30°C . *Biopreserv Biobank*. 2018;16(2):106-13. doi:10.1089/bio.2017.0050.
- Shah SG, Rashid M, Verma T, et al. Establishing a correlation between RIN and $A_{260/280}$ along with the multivariate evaluation of factors affecting the quality of RNA in cryopreserved cancer bio-specimen. *Cell Tissue Bank*. 2019;20(4):489-99. doi:10.1007/s10561-019-09782-7.
- Meddeb R, Pisareva E, Thierry AR. Guidelines for the Pre-analytical Conditions for Analyzing Circulating Cell-Free DNA. *Clin Chem*. 2019;65(5):623-33. doi:10.1373/clinchem. 2018.298323.
- Pachulia OV, Illarionov RA, Vashukova ES, et al. Quality management of biosampling and data collection from women at different stages of pregnancy for the search for early biomarkers of preterm birth: predicting errors and risk management. *Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2021;20(8):3107. (In Russ.) Пачулия О.В., Илларионов Р.А., Вашукова Е.С. и др. Менеджмент качества сбора биообразцов и ассоциированных с ними данных у беременных на разных сроках гестации для поиска ранних биомаркеров преждевременных родов: прогнозирование ошибок и управление рисками. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2021;20(8):3107. doi:10.15829/1728-8800-2021-3107.
- Pachulia OV, Illarionov RA, Vashukova ES, et al. Bioresource collection of biosamples from pregnant women at different gestational ages for the search for early biomarkers of pregnancy complications and potential for its use in research. *Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2022;21(11):3399. (In Russ.) Пачулия О.В., Илларионов Р.А., Вашукова Е.С. и др. Характеристика биоресурсной коллекции биообразцов от беременных женщин на разных сроках гестации для поиска ранних биомаркеров осложнений беременности и перспективы ее научного использования. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2022;21(11):3399. doi:10.15829/1728-8800-2022-3399.
- Illarionov RA, Kosyakova OV, Vashukova ES, et al. 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.) Илларионов Р.А., Косякова О.В., Вашукова Е.С. и др. 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.
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 1988;16(3):1215. doi:10.1093/nar/16.3.1215.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680-5. doi:10.1038/227680a0.
- Tang R, Han C, Yin R, et al. Quality Control of DNA Extracted from All-Cell Pellets After Cryopreservation for More Than 10 Years. *Biopreserv Biobank*. 2022;20(3):211-6. doi:10.1089/bio.2021.0052.

12. Dong L, Yoshizawa J, Li X. Nucleic Acid Isolation and Quality Control. *Methods Mol Biol.* 2019;1897:325-43. doi:10.1007/978-1-4939-8935-5_28.
13. Esteva-Socias M, Artiga MJ, Bahamonde O, et al. In search of an evidence-based strategy for quality assessment of human tissue samples: report of the tissue Biospecimen Research Working Group of the Spanish Biobank Network. *J Transl Med.* 2019;17(1):370. doi:10.1186/s12967-019-2124-8.
14. Liu Y, Gao H, Hu Y, Ding J, Ge M, Ye Q. Quality Control System in an Obstetrics and Gynecology Disease Biobank. *Biopreserv Biobank.* 2019;17(1):27-38. doi:10.1089/bio.2018.0056.
15. Brisco MJ, Latham S, Bartley PA, Morley AA. Incorporation of measurement of DNA integrity into qPCR assays. *Biotechniques.* 2010;49(6):893-7. doi:10.2144/000113567.
16. Kondratskaya VA, Pokrovskaya MS, Doludin YuV, et al. Influence of preanalytical variables on the quality of cell-free DNA. *Biobanking of cell-free DNA material. Cardiovascular Therapy and Prevention.* 2021;20(8):3114. (In Russ.) Кондрацкая В.А., Покровская М.С., Долудин Ю.В. и др. Влияние преаналитических переменных на качество внеклеточной ДНК. Биобанкирование материала для выделения внеклеточной ДНК. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика.* 2021;20(8):3114. doi:10.15829/1728-8800-2021-3114.
17. Craciun L, Spinette SA, Rassy M, et al. Tumor Banks: A Quality Control Scheme Proposal. *Front Med (Lausanne).* 2019;6:225. doi:10.3389/fmed.2019.00225.
18. Shen Q, Björkesten J, Galli J, et al. Strong impact on plasma protein profiles by precentrifugation delay but not by repeated freeze-thaw cycles, as analyzed using multiplex proximity extension assays. *Clin Chem Lab Med.* 2018;56(4):582-94. doi:10.1515/cclm-2017-0648.