Кардиоваскулярная терапия и профилактика. 2024;23(11):4193.
doi: 10.15829/1728-8800-2024-4193
ISSN 1728-8800 (Print)
ISSN 2619-0125 (Online)

Стратегии создания биоресурсных коллекций в акушерстве: опыт Биобанка "Генофонд"

Пачулия О. В.[1], Илларионов Р. А.[1], Вашукова Е. С.[1], Постникова Т. Б.[1], Мальцева А. Р.[1], Попова А. К.[1], Корнюшина Е. А.[1], Беспалова О. Н.[1,2], Глотов А. С.[1,2]

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

В статье освещен опыт Биобанка "Генофонд" ФГБНУ "НИИ АГиР им. Д. О. Отта" по созданию биоресурсных коллекций, представляющих стратегическое научное и практическое значение в области современного акушерства. Для создания различных типов коллекций впервые были сформулированы принципиально различающиеся стратегии биобанкирования образцов: "единовременное" и "лонгитюдное" (динамическое). Даны определения данным подходам, отмечены наиболее значимые преимущества и недостатки каждого из них. Приведены примеры пилотных исследований, проведенных на платформе биоресурсной коллекции, созданной с применением наиболее сложного подхода — "лонгитюдного" биобанкирования. Такой подход позволил на примере анализа микроРНК продемонстрировать возможности изучения закономерностей физиологических изменений при беременности на современном этапе, а также перспективы поиска ранних предикторов осложнений беременности.

Ключевые слова: биоресурсные коллекции, "лонгитюдное" банкирование, "единовременное" банкирование, беременность, физиология беременности, предикторы осложнений гестации.

Отношения и деятельность. Исследование поддержано грантом РНФ 197520033-П.

Поступила 16/09-2024
Рецензия получена 29/09-2024
Принята к публикации 09/10-2024

CC BY 4.0

Для цитирования: Пачулия О. В., Илларионов Р. А., Вашукова Е. С., Постникова Т. Б., Мальцева А. Р., Попова А. К., Корнюшина Е. А., Беспалова О. Н., Глотов А. С. Стратегии создания биоресурсных коллекций в акушерстве: опыт Биобанка "Генофонд". *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2024;23(11):4193. doi: 10.15829/1728-8800-2024-4193. EDN KDQVRN

Strategies for bioresource collection in obstetrics: the experience of the "Genofund" biobank

Pachulia O. V.[1], Illarionov R. A.[1], Vashukova E. S.[1], Postnikova T. B.[1], Maltseva A. R.[1], Popova A. K.[1], Kornyushina E. A.[1], Bespalova O. N.[1,2], Glotov A. S.[1,2]

[1]Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductolog. Saint Petersburg; [2]Saint Petersburg State University. Saint Petersburg, Russia

The article highlights the experience of the "Genofund" biobank of the Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology in bioresource collection in modern obstetrics. To create different types of collections, the following different biobanking strategies were formulated for the first time: cross-sectional and longitudinal (dynamic). Definitions are given for these approaches. The most significant advantages and disadvantages of each of them are noted. Examples of pilot studies conducted on the platform of a bioresource collection created using the complex longitudinal biobanking are given. This approach made it possible to demonstrate, using the example of microRNA analysis, the potential of studying the physiological changes during pregnancy at the present stage, as well as the prospects for finding early predictors of pregnancy complications.

Keywords: bioresource collections, longitudinal banking, cross-sectional banking, pregnancy, pregnancy physiology, pregnancy complications.

Relationships and Activities. The study was supported by the grant of the Russian Science Foundation 197520033-P.

Pachulia O. V. ORCID: 0000-0003-4116-0222, Illarionov R. A.* ORCID: 0000-0003-2711-748X, Vashukova E. S. ORCID: 0000-0002-6996-8891, Postnikova T. B. ORCID: 0000-0002-8227-2629, Maltseva A. R. ORCID: 0000-0002-5647-6783, Popova A. K. ORCID: 0009-0008-3512-2557, Kornyushina E. A. ORCID: 0009-0003-5918-2697, Bespalova O. N. ORCID: 0000-0002-6542-5953, Glotov A. S. ORCID: 0000-0002-7465-4504.

*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):
e-mail: r.a.illarionov@gmail.com

[Пачулия О. В. — к.м.н., ученый секретарь, ORCID: 0000-0003-4116-0222, 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, Постникова Т. Б. — м.н.с. отдела акушерства и перинатологии, ORCID: 0000-0002-8227-2629, Мальцева А. Р. — лаборант-исследователь Биобанка "Генофонд" отдела геномной медицины им. В. С. Баранова, ORCID: 0000-0002-5647-6783, Попова А. К. — лаборант-исследователь лаборатории геномики отдела геномной медицины им. В. С. Баранова, ORCID: 0009-0008-3512-2557, Корнюшина Е. А. — к.м.н., с.н.с. акушерского отделения патологии беременности, ORCID: 0009-0003-5918-2697, 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].

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

Received: 16/09-2024
Revision Received: 29/09-2024
Accepted: 09/10-2024

For citation: Pachulia O. V., Illarionov R. A., Vashukova E. S., Postnikova T. B., Maltseva A. R., Popova A. K., Kornyushina E. A., Bespalova O. N., Glotov A. S. Strategies for bioresource collection in obstetrics: the experience of the "Genofund" biobank. *Cardiovascular Therapy and Prevention.* 2024;23(11):4193. doi: 10.15829/1728-8800-2024-4193. EDN KDQVRN

ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота, микроРНК — малые некодирующие молекулы рибонуклеиновой кислоты, РНК — рибонуклеиновая кислота, СОП — стандартная операционная процедура.

Ключевые моменты

Что известно о предмете исследования?

- Исследования последних десятилетий в области акушерства крайне редко затрагивают физиологию беременности, а в основном сосредоточены на осложненном ее течении.
- Динамичность изменений при беременности за короткий ограниченный срок обуславливает невозможность единовременной (разовой) оценки состояния организма беременной, а определяет необходимость внедрения новой стратегии создания биоресурсных коллекций — "лонгитюдного" биобанкирования образцов.

Что добавляют результаты исследования?

- Сформулированы две принципиально различающиеся стратегии биобанкирования образцов: "единовременное" и "лонгитюдное" банкирование.
- Создание коллекций с применением стратегии "лонгитюдного" биобанкирования открывает возможность изучения закономерностей физиологических изменений при беременности и поиска ранних предикторов гестационных осложнений.

Key messages

What is already known about the subject?

- Obstetrics research in recent decades has rarely considered the physiology of pregnancy, but has mainly focused on complications.
- The dynamism of changes during pregnancy over a short-limited period of time makes it impossible to perform a cross-sectional assessment of a pregnant woman's body, and determines the need to implement a novel longitudinal biobanking strategy.

What might this study add?

- Two fundamentally different strategies for biobanking samples have been formulated as follows: cross-sectional and longitudinal banking.
- The collection creation using the longitudinal biobanking strategy makes it possible to study the patterns of physiological changes during pregnancy and search for early predictors of pregnancy complications.

Введение

Беременность является уникальным состоянием женщины, когда за ограниченный, короткий период времени происходит большое число выраженных изменений на всех уровнях биологической организации организма. Происходят значимые процессы, которые должны обеспечить адаптацию материнского организма к возросшим физическим и метаболическим потребностям во время беременности. В норме сердечно-сосудистая, дыхательная, гематологическая, мочевыделительная, желудочно-кишечная, эндокринная и другие системы претерпевают важные изменения, необходимые для развития плода и для того, чтобы мать и плод могли пережить роды [1].

Исследования последних десятилетий в области акушерства крайне редко затрагивают физиологию беременности, и в основном сосредоточены на осложненном ее течении. В то же время, критически важно изучение закономерностей прогрессирования беременности и развития плода на современном этапе, с учетом последних достижений биомедицинской науки, т.к. бóльшая часть представлений об условно "нормальной" беременности основывается на данных, полученных в прошлом столетии. В настоящее время научные исследования в акушерстве формулируются по "классическому" типу, и включают исследуемую группу — беременные с осложненным течением и контрольную группу, которая формируется из пациенток не с физиологическим течением беременности, а с отсутствием изучаемого состояния (осложнения) в конкретный отрезок времени (на момент включения в исследование) [2]. Ценность получаемых данных и необходимость внедрения других методологий при изучении вопросов акушерства требует отдельного обсуждения, но главное, что имеющиеся на сегодняшний день подходы не дают новых представлений о физиологии беременности.

Объективные ограничения исследований, направленных на изучение физиологии беременности, в первую очередь связаны с невозможностью

за короткий период времени включить большое число беременных с физиологическим течением, т.к. частота различных гестационных осложнений достаточно высока. Таким образом, для изменения научно-исследовательских подходов в акушерстве крайне важным является создание биоресурсных коллекций образцов здоровых беременных, нереализовавших гестационные осложнения на протяжении всего срока беременности и в послеродовом периоде [3].

Другие сложности, с которыми сталкиваются исследователи, — это динамичность изменений при беременности за короткий ограниченный срок, что обуславливает невозможность единовременной (разовой) оценки состояния организма беременной, а определяет необходимость внедрения новой стратегии создания биоресурсных коллекций — "лонгитюдного" (динамического) биобанкирования образцов: неоднократного сбора биообразцов у одного испытуемого в течение ограниченного исследователем времени с определением контрольных точек [4]. Такой подход является крайне важным не только для понимания физиологии беременности, но и для изучения патогенетических механизмов реализации осложнений беременности и поиска их ранних предикторов.

Как известно, беременность является специфическим состоянием, при котором патологические события могут варьироваться от легких до жизнеугрожающих, что требует применения действенных прогностических, диагностических и терапевтических вмешательств. В то же время, ввиду неизученности, большое число методов прогнозирования и идентификации гестационных осложнений являются недостаточно точными или применяются с поздних сроков гестации, что значимо снижает эффективность превентивных мер [5-7]. Большинство имеющихся предикторов являются малоэффективными, в связи с тем, что относятся к какому-либо одному звену патогенеза и не учитывают другой "сценарий" развития патологических событий. Новые возможности в отношении целостной оценки предрасполагающих факторов, открывают исследования на основе биоколлекций, созданных по принципу "лонгитюдного" биобанкирования. Наиболее значимым преимуществом формирования такого типа коллекций является возможность изучения на их платформе предикторов осложнений, предшествующих клиническим проявлениям, что крайне важно для своевременного принятия мер профилактики.

В настоящей статье представлен опыт Биобанка "Генофонд" ФГБНУ "НИИ АГиР им. Д. О. Отта" по созданию биоресурных коллекций, сформированных по принципу "лонгитюдного" биобанкирования, представляющих наибольший научный и практический интерес.

Особенности сбора биологических образцов

Для создания различных типов коллекций были сформулированы две принципиально различающиеся стратегии биобанкирования образцов: "единовременное" и "лонгитюдное" банкирование. Были даны определения для данных подходов, а также выделены по 2 подтипа каждого из подходов для уточнения деталей формата сбора биологических образцов:

— *Единовременное банкирование* — однократный сбор биообразцов, который может включать в себя *Ретроспективное (когортное) банкирование* — сбор биообразцов у когорты пациенток с установленным диагнозом и *Проспективное банкирование* — сбор биообразцов у группы пациенток до реализации исходов (осложнений/заболеваний);

— *Лонгитюдное банкирование* — сбор биообразцов в течение ограниченного исследователем времени (в течение беременности), которое может включать в себя *Динамическое банкирование* — сбор биообразцов на протяжении определенного исследователем ограниченного событием времени с определением контрольных точек (к примеру, сбор образцов у одной беременной в 1, 2, 3 триместре) и *Контрольное банкирование* — сбор биообразцов в контрольных точках до и после события, с определенным исследователем промежутком времени между точками (к примеру, сбор образцов до и после лечения).

Каждый из подходов формирования биоресурсных коллекций не лишен своих преимуществ и недостатков и должен применяться в зависимости от исследовательских целей, ресурсов и возможностей исследователей, когорты пациентов, образцы которых будут включены в биоколлекцию. К основным преимуществам "единовременного" биобанкирования можно отнести: возможность формирования больших биоколлекций образцов, быстрое наполнение коллекций, меньшая потеря ресурсов и данных, ассоциированных с образцами. К основным недостаткам данного подхода можно отнести: невозможность изучения динамических изменений, невозможность оценки биомаркеров на более ранних этапах. Относительно стратегии "лонгитюдного" банкирования, основным и главным преимуществом подхода является возможность поиска предикторов, предшествующих клиническим проявлениям заболевания, что принципиально важно для раннего принятия мер профилактики, а также для возможности изучения закономерностей физиологических и патологических изменений при беременности. К недостаткам такого типа банкирования можно отнести: длительность формирования коллекции, необходимость поддержки длительного контакта с исследуемым, большие затраты и потери ресурсов. В статье представлен опыт биобанка "Генофонд" в формировании биоресурсной коллекции

образцов беременных женщин по наиболее сложному принципу: "лонгитюдному" банкированию.

Формирование биоколлекции по принципу "лонгитюдного" банкирования

По состоянию на сегодняшний день биоколлекция образцов беременных, созданная по принципу "лонгитюдного" (динамического) биобанкирования включает образцы различного типа биоматериала от 360 беременных. Данное количество образцов в коллекции было сохранено после "выбраковки", которая осуществлена вследствие важного аспекта менеджмента качества биобанкирования образцов — инвентаризации [8].

Для создания коллекции от беременных женщин сбор биоматериала осуществляется в каждом триметре гестации в сроки проводимого скрининга на хромосомные патологии и врожденные пороки развития плода: I — триместр (11-14 нед.), II — триместр (19-21 нед.), III — триместр (30-34 нед.). После подписания информированного добровольного согласия собираются следующие типы биоматериала:

- Материнская периферическая кровь (вакуумные пробирки с этилендиаминтетрауксусной кислотой (ЭДТА) (фиолетовая крышка) 9 мл — 2 шт.; вакуумные пробирки с активатором свертывания крови и разделительным гелем (желтая крышка) 9 мл — 1 шт.);
- Моча (пластиковые контейнеры не <40 мл).

Все процедуры сбора материнской крови проводятся согласно стандартным операционным процедурам (СОПам) обученным медицинским персоналом в процедурном кабинете, моча собирается беременными самостоятельно, после проведения инструктажа исследователями. Сбор клинической информации осуществляется медицинским персоналом. Данные о течении и исходе беременности заносятся в специально разработанные для исследования карты участников. Вся информация о пациентках деперсонализируется и кодируется уникальными номерами. После получения биоматериала первичные контейнеры транспортируются в лабораторию в термоконтейнере с хладоэлементами при температуре от +4 до +8°С.

После пробоподготовки в условиях лаборатории, для дальнейшего хранения в биоколлекции, согласно разработанным СОПам, выделяются следующие типы образцов крови и ее компонентов:

— цельная кровь (4 аликвоты по 0,9 мл; 2 аликвоты по 4,5 мл со стабилизатором крови для рибонуклеиновой кислоты — РНК);

— сыворотка крови (6 аликвот по 0,7 мл);

— плазма крови (4 аликвоты по 0,9 мл);

— лейкоцитарная пленка.

В настоящее время коллекция содержит 15349 единиц хранения. Хранение происходит, согласно СОПам, в криопробирках с индивидуальным штрих-кодированием в криохранилищах биобанка "Генофонд": низкотемпературные морозильники Thermo Fisher Scientific™ серии TSX Ultra-Low (-80°С), система хранения в парах жидкого азота Biosafe (-180°С).

Для использования образцов коллекции в дальнейших исследованиях был проведен контроль качества хранимых образцов, который осуществляли путем оценки качества производных образцов (дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) и библиотек микрорибонуклеиновой кислоты (микроРНК) для секвенирования). Качество выделенных образцов ДНК оценивали путем измерения концентрации и соотношения длин волн А260/А280. Концентрацию всех образцов определяли на флуориметре "Qubit 2.0" (Invitrogen). Соотношения длин волн определяли на спектрофотометре "Nanodrop 2000C" (Thermo Scientific). Контроль качества библиотек микроРНК проводили с использованием автоматического капиллярного гель-электрофореза на приборе "2200 TapeStation Instrument" (Agilent Technologies).

Исследования на основе биоколлекции, созданной по принципу "лонгитюдного" банкирования

Динамические изменения биомаркеров при физиологической беременности. Для проведения данного пилотного исследования из биоресурсной коллекции были извлечены образцы плазмы и сыворотки крови 7 беременных женщин, полученных в ходе динамического сбора образцов в 3-х триместрах гестации. По данным медицинских карт об исходе беременности, после произошедших родов, у данных женщин в течение беременности и в послеродовом периоде не было диагностировано каких-либо гестационных осложнений.

Для оценки профиля микроРНК в парных образцах плазмы и сыворотки крови беременных были выделены 42 библиотеки малых РНК — по 21 для каждого типа биообразца. Высокопроизводительное секвенирование показало, что при динамической оценке в 3-м триместре процент считываний микроРНК в плазме и сыворотке снизился на треть по сравнению с 1-м и 2-м триместрами. Были обнаружены 2 микроРНК в плазме (hsa-miR-7853-5p и hsa-miR-200c-3p) и 10 микроРНК в сыворотке крови (hsa-miR-203a-5p, hsa-miR-495-3p, hsa-miR-4435), hsa-miR-340-5p, hsa-miR-4417, hsa-miR-1266-5p, hsa-miR-4494, hsa-miR-134-3p, hsa-miR-5008-5p и hsa-miR-6756-5p), которые продемонстрировали изменение уровня во время беременности (скорректированное значение $p<0,05$). Кроме того, были выявлены различия в 36 микроРНК между плазмой и сывороткой (скорректированное значение $p<0,05$), которые следует принимать во внимание при сравнении результатов исследований, проведенных с использованием разных типов биообразцов. Результаты были подтверждены анализом трех микроРНК с помощью ОТ-ПЦР (полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией) ($p<0,05$) [9].

Результаты данного исследования продемонстрировали, что профиль циркулирующей микроРНК в крови в норме подвержен динамическому изменению во время беременности. Полученные данные закладывают основу для дальнейшего изучения молекулярных механизмов, участвующих в регуляции беременности, и поиска биомаркеров нарушений течения беременности.

Динамические изменения биомаркеров при патологии беременности. Для проведения данного пилотного исследования из биоресурсной коллекции были извлечены образцы плазмы крови, полученные в 1-м и 2-м триместрах гестации у 13 беременных, которые в дальнейшем были выделены в группу высокого риска преждевременных родов, в связи с тем, что реализовали такое осложнение беременности, как истмико-цервикальная недостаточность (Международная классификация болезней, МКБ O34.3) — патологическое состояние перешейка и шейки матки во время беременности, при котором они не способны противостоять внутриматочному давлению и удерживать увеличивающийся плод в полости матки до своевременных родов. Для контроля были отобраны образцы плазмы крови, полученные в 1-м и 2-м триместрах у 11 беременных с физиологическим течением гестации.

С применением технологии высокопроизводительного секвенирования в 1-м триместре беременности в сравниваемых группах были обнаружены различия в уровнях 15 микроРНК (3 с повышенным уровнем экспрессии — hsa-miR-122-5p, hsa-miR-34a-5p, hsa-miR-34c-5p; 12 с пониженным уровнем экспрессии — hsa-miR- 487b-3p, hsa-miR-493-3p, hsa-miR-432-5p, hsa-miR-323b-3p, hsa-miR-369-3p, hsa-miR-134-5p, hsa-miR-431-5p, hsa-miR-485-5p, hsa-miR-382-5p, hsa-miR-369-5p, hsa-miR-485-3p, hsa-miR-127-3p) (log2(FC) ⩾1,5; FDR ⩽0,05). Было отмечено, что все микроРНК с пониженной регуляцией в 1-м триместре из плаценто-специфического кластера C14MC. Во 2-м триместре дифференциально экспрессируемых микроРНК обнаружено не было [10].

Результаты настоящего исследования продемонстрировали, что микроРНК могут рассматриваться в качестве потенциальных ранних предикторов осложнений беременности, выявление которых важно для их своевременной профилактики. Отсутствие различий во 2-м триместре беременности, с одной стороны может связано с естественными причинами (увеличение срока беременности, активное становление и функционирование плаценты), с другой стороны, — с началом терапевтических мероприятий при появлении начальных признаков истмико-цервикальной недостаточности.

Заключение

Результаты приведенных пилотных исследований открывают широкие научные перспективы в области акушерства, в первую очередь ввиду принципиально нового методологического подхода к проведению исследований. Планирование такого дизайна исследований возможно только на платформе биоресурсных коллекций образцов беременных женщин, созданных по принципу "лонгитюдного" (динамического) биобанкирования. Создание коллекций с применением новой стратегии открывает исследователям возможность изучения не только закономерностей физиологических изменений при беременности, но и поиска ранних предикторов гестационных осложнений, предшествующих их клиническим проявлениям.

Отношения и деятельность. Исследование поддержано грантом РНФ 197520033-П.

Литература/References

1. Tan EK, Tan EL. Alterations in physiology and anatomy during pregnancy. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol. 2013;27(6): 791-802. doi:10.1016/j.bpobgyn.2013.08.001.
2. Schreiber K, Graversgaard C, Hunt BJ, et al. Challenges of designing and conducting cohort studies and clinical trials in populations of pregnant people. Lancet Rheumatol. 2024;6(8): e560-72. doi:10.1016/S2665-9913(24)00118-8.
3. Gomez-Lopez N, Romero R, Hassan SS, et al. The Cellular Transcriptome in the Maternal Circulation During Normal Pregnancy: A Longitudinal Study. Front Immunol. 2019;10:2863. doi:10.3389/fimmu.2019.02863.
4. Chen J, Tian R, Zou Z, et al. Longitudinal study of multidimensional factors influencing maternal and offspring health outcomes: a study protocol. BMC Pregnancy Childbirth. 2023;23(1):466. doi:10.1186/s12884-023-05785-1.
5. Mavreli D, Theodora M, Kolialexi A. Known biomarkers for monitoring pregnancy complications. Expert Rev Mol Diagn. 2021; 21(11):1115-7. doi:10.1080/14737159.2021.1971078.
6. Lin W, Teng S-W, Lin T-Y, et al. Combinatorial Analysis of Circulating Biomarkers and Maternal Characteristics for Preeclampsia Prediction in the First and Third Trimesters in Asia. Diagnostics. 2022;12(7):1533. doi:10.3390/diagnostics12071533.
7. Liu Y, Li DY, Bolatai A, Wu N. Progress in Research on Biomarkers of Gestational Diabetes Mellitus and Preeclampsia. Diabetes Metab Syndr Obes. 2023;16:3807-15. doi:10.2147/DMSO.S433179.
8. Maltseva AR, Illarionov RA, Vashukova ES, et al. 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. (In Russ.) Мальцева А. Р., Илларионов Р. А., Вашукова Е. С. и др. 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.
9. Vashukova ES, Kozyulina PY, Illarionov RA, et al. High-Throughput Sequencing of Circulating MicroRNAs in Plasma and Serum during Pregnancy Progression. Life (Basel). 2021;11(10):1055. doi:10.3390/life11101055.
10. Illarionov RA, Pachuliia OV, Vashukova ES, et al. Plasma miRNA Profile in High Risk of Preterm Birth during Early and Mid-Pregnancy. Genes (Basel). 2022;13(11):2018. doi:10.3390/genes13112018.