

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ

НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ТЕРАПИИ И ПРОФИЛАКТИЧЕСКОЙ  
МЕДИЦИНЫ - ФИЛИАЛ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО НАУЧНОГО  
УЧРЕЖДЕНИЯ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ И  
ГЕНЕТИКИ СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»  
(НИИТПМ – ФИЛИАЛ ИЦИГ СО РАН)

УДК616-01  
№госрегистрации  
AAAA-A17-117110270088-0  
Инв.№08

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор ИЦИГ СО РАН  
доктор биологических наук  
академик

Н.А. Колчанов

28.12.2017



ОТЧЕТ  
О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

Программа фундаментальных научных исследований  
государственных академий наук на 2013–2020 годы

65. Физиология и фундаментальная медицина

КОЛЛЕКЦИЯ БИОМАТЕРИАЛА (ДНК, СЫВОРОТКА КРОВИ) ПОПУЛЯЦИИ  
Г. НОВОСИБИРСКА В ВОЗРАСТЕ 14-70 ЛЕТ И БИОМАТЕРИАЛА (ДНК, СЫВОРОТКА  
КРОВИ, ГОМОГЕНАТЫ АТЕРОСКЛЕРОТИЧЕСКИХ БЛЯШЕК) МУЖЧИН  
С КОРОНАРНЫМ АТЕРОСКЛЕРОЗОМ, С СОПРЯЖЕННЫМИ БАЗАМИ ДАННЫХ,  
СОДЕРЖАЩИМИ АНТРОПОЛОГИЧЕСКУЮ, КЛИНИЧЕСКУЮ, КЛИНИКО-  
ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ ИНФОРМАЦИЮ, РЕЗУЛЬТАТЫ ГЕНЕТИЧЕСКИХ  
И БИОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ  
(заключительный)

Номер проекта в ИСГЗ ФАНО 0324-2017-0048

Протокол Ученого совета  
№ 23 от 25.12.2017

Научный руководитель  
д-р. мед. наук, проф.,  
академик РАН

  
\_\_\_\_\_ подпись,  
25.12.2017 дата

М.И. Воевода


Новосибирск–2017

## СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

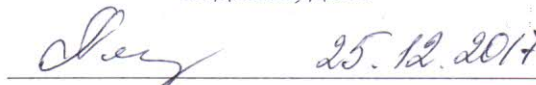
Руководитель темы  
д-р мед. наук, член-корр.  
РАН

 25.12.2017 Ю.И. Рагино  
подпись, дата

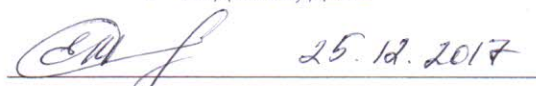
Исполнители темы  
ст. н. с., д-р биол. наук

 25.12.2017 Е.В. Каштанова  
подпись, дата

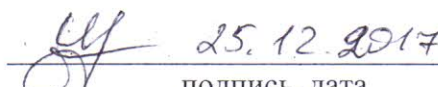
ст. н. с., канд. биол. наук

 25.12.2017 Я.В. Полонская  
подпись, дата

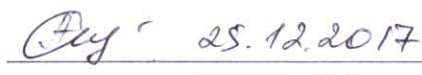
ст. н. с., канд. биол. наук

 25.12.2017 Е.М. Стахнева  
подпись, дата

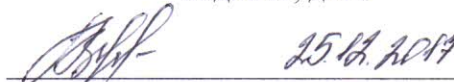
м. н. с.

 25.12.2017 В.С. Шрамко  
подпись, дата

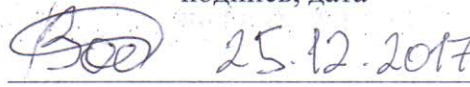
м.н.с., канд. мед. наук

 25.12.2017 А.А. Иванова  
подпись, дата

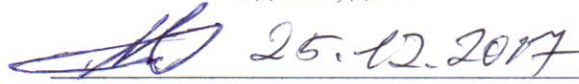
ст. н. с.

 25.12.2017 Л.В. Щербакова  
подпись, дата

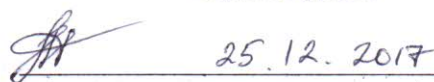
м. н. с.

 25.12.2017 Д.М. Воевода  
подпись, дата


в.н.с., д-р мед. наук

 25.12.2017 В.Н. Максимов  
подпись, дата

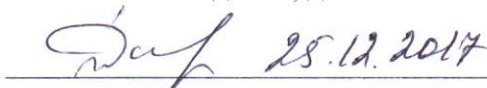
д-р мед. наук

 25.12.2017 А.М. Чернявский  
подпись, дата

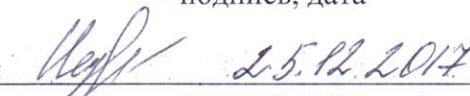
врач

 25.12.2017 А.В. Кургузов  
подпись, дата

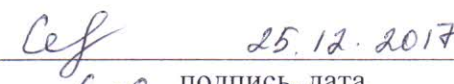
в.н.с., д-р мед. наук

 25.12.2017 Д.В. Денисова  
подпись, дата

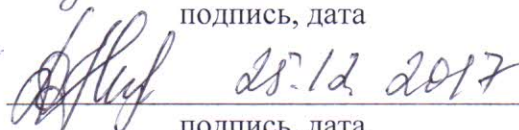
н.с.

 25.12.2017 Д.Е. Иваношук  
подпись, дата

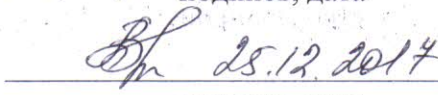
медсестра

 25.12.2017 Е.С.Сергеева  
подпись, дата

бухгалтер

 25.12.2017 Д.М. Мякшина  
подпись, дата

уч. секретарь, канд. мед.  
наук

 25.12.2017 Л.Г. Завьялова  
подпись, дата

м.н.с.

Сай 25.12.2017  
подпись, дата

Е.В. Садовский

санитарка

Молова 25.12.2017  
подпись, дата

М.Г. Колупаева

нормоконтролер

Завьялова 25.12.2017  
подпись, дата

Л.Г. Завьялова



## РЕФЕРАТ

Отчет 47 с., 1 ч., 6 рис., 6 табл., 7 источников, 7 прил.

### СЫВОРОТКА КРОВИ, ПОПУЛЯЦИЯ, АТЕРОСКЛЕРОТИЧЕСКИЕ БЛЯШКИ, КОРОНАРНЫЙ АТЕРОСКЛЕРОЗ, ДНК, КОЛЛЕКЦИЯ БИОМАТЕРИАЛА ЧЕЛОВЕКА

Объект исследования – биоресурсная коллекция «Коллекция биоматериала (ДНК, сыворотка крови) популяции г. Новосибирска в возрасте 14-70 лет и биоматериала (ДНК, сыворотка крови, гомогенаты атеросклеротических бляшек) мужчин с коронарным атеросклерозом, с сопряженными базами данных, содержащими антропологическую, клиническую, клинико-функциональную информации, результаты генетических и биохимических исследований».

Цель работы – поддержание и развитие биоресурсной коллекции НИИТПМ.

Результаты. В рамках выполнения государственного задания были проведены следующие работы:

- 1) Создан технологический паспорт коллекции биоматериала человека НИИТПМ содержащий: а) описан полный набор ключевых стандартных операционных процедур (СОПов), обеспечивающих развитие и поддержание коллекционного фонда; б) Научно-техническое обоснование смет стандартных операционных процедур коллекции НИИТПМ.
- 2) Сформирована документация технологического паспорта коллекции, размещена на интернет-сайте коллекции. 3) Экспериментально верифицирован СОП: (а) выполнены полные циклы работ по получению образцов биологического материала человека (сыворотка крови, ДНК крови, гомогенаты атеросклеротических бляшек человека); (б) выполнены полные циклы работ по криоархивированию и хранению биологических материалов человека; (в) отработан полный цикл работ по температурному контролю криоархивирования; (г) Выполнен контроль качества и поддержания единиц хранения биологических материалов человека; (д) Отработан полный цикл работ по выделению ДНК, измерению концентрации ДНК; (е) Выполнен полный цикл работ по идентификации и характеристики биологического материала человека. 4) Записаны результаты верификации СОПов в компьютерной базе биоматериала человека НИИТПМ. 5) Разработан формат унифицированного описания образцов материала из коллекции биологического материала НИИТПМ в компьютерной базе данных этой коллекции. 6) Проведена первичная инвентаризация коллекции биоматериалов человека НИИТПМ с записью информации в электронную базу данных данной коллекции. 7) Отправлены в печать в рецензируемых журналах (Scopus, WoS) две публикации, подготовленные по итогам выполнения дополнительного госзадания (одна из них опубликована). 8) Календарный план работ по

выполнению дополнительного государственного задания. 9) Отчет о работе, проделанной в рамках дополнительного государственного задания, подготовлен и размещен на интернет-сайте коллекции НИИТПМ с указанием ссылки на номер заключенного с ФАНО России соглашения на выполнение дополнительного государственного задания.

Прогнозные предположения о развитии объекта исследования: в дальнейшем планируются работы по поддержанию и расширению коллекции.

## СОДЕРЖАНИЕ

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ	7
ВВЕДЕНИЕ	8
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ	11
1 Общая информация о коллекции	11
2 Краткая информация о проделанной работе в рамках дополнительного государственного задания	12
3 Регистрация в государственных информационных системах и финансирование	12
4 Результаты, полученные в рамках дополнительного государственного задания	13
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	21
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	22
ПРИЛОЖЕНИЕ А. Библиографический список публикаций, полученных в результате выполнения научно-исследовательской работы	23
ПРИЛОЖЕНИЕ Б Стандартная операционная процедура «Получение образцов биологического материала (сыворотки крови / ДНК крови, гомогенаты атеросклеротических бляшек) для исследований»	25
ПРИЛОЖЕНИЕ В Стандартная операционная процедура «Криоархивирование и хранение биологических материалов человека (сыворотка крови, ДНК крови, гомогенаты атеросклеротических бляшек)»	31
ПРИЛОЖЕНИЕ Г Стандартная операционная процедура «Контроль температуры в холодильниках и морозильных камерах»	35
ПРИЛОЖЕНИЕ Д Стандартная операционная процедура «Контроль качества и поддержка единиц хранения биологических материалов»	37
ПРИЛОЖЕНИЕ Е Стандартная операционная процедура «Экстракция ДНК из крови»	41
ПРИЛОЖЕНИЕ Ж Стандартная операционная процедура «Идентификация и характеристика биологического материала человека»	46

## ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИБС – ишемическая болезнь сердца

СОП – стандартная операционная процедура

ТЕ буфер – Трис-ЭДТА буфер

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

## ВВЕДЕНИЕ

Согласно статистике, каждый 13-й гражданин в РФ страдает сердечно-сосудистой патологией, и среди причин смертности от болезней системы кровообращения, формирующих ее структуру, главенствует ишемическая болезнь сердца (55,7 %) [1]. Заболеваемость ишемической болезнью сердца (ИБС) по Новосибирской области составляет более 35 человек на 1000 взрослого населения [2]. На основании многочисленных эпидемиологических, клинических и лабораторных исследований показано, что развитие коронарного атеросклероза сопряжено с образом жизни, наличием некоторых особенностей обмена веществ и патологических состояний, которые в совокупности определяют как факторы риска развития ишемической болезни сердца. Классическими факторами риска ИБС остаются: возраст, пол, гиперхолестеринемия, курение, артериальная гипертензия, ожирение, сахарный диабет, отягощенная наследственность. Вероятность развития ИБС повышается при комбинации двух, трех и более перечисленных факторов. Актуальность изучения факторов и биологических маркеров ключевых патофизиологических механизмов развития сердечно-сосудистых заболеваний в Западно-Сибирском регионе определена особыми климато-географическими условиями, особенностями питания и крайне высокой распространенностью факторов риска ИБС, поэтому востребовано получение новых данных в области изучения риска осложнений заболевания и повышения эффективности его ранней диагностики [3]. Сердечно-сосудистый риск – вероятность развития того или иного неблагоприятного события со стороны сердечно-сосудистой системы (включая смерть от сердечно-сосудистого заболевания или осложнения) в течение определенного периода времени (например, в течение ближайших 10 лет) [4]. Стратификация риска в диагностике ИБС производится на основании клинических данных, результатов стресс-тестов, оценки функционирования желудочков сердца, результатов коронарной ангиографии и других параметров [5–7].

В связи с этим создание «Коллекции биоматериала (ДНК, сыворотка крови) популяции г. Новосибирска в возрасте 14-70 лет и мужчин с коронарным атеросклерозом, с сопряженными базами данных, содержащими антропологическую, клиническую, клинико-функциональную информации, результаты генетических и биохимических исследований», направлено на изучение факторов риска развития сердечно-сосудистых заболеваний, что в свою очередь позволит улучшить выполнение мероприятий по ранней диагностике и вторичной профилактике ишемической болезни сердца (ИБС). Поддержание и развитие коллекционного фонда необходимо для изучения молекулярно-биологических и популяционных закономерностей формирования хронических неинфекционных заболеваний

и их особенностей у населения Сибири, разработки научных основ их профилактики, диагностики и лечения.

Для эффективного использования биологического материала (ДНК, сыворотка крови, гомогенаты атеросклеротических бляшек) человека в проведении фундаментальных, прикладных и поисковых биомедицинских научных исследований необходимо иметь общедоступные коллекции биоматериала.

«Коллекция биоматериала (ДНК, сыворотка крови) популяции г. Новосибирска в возрасте 14-70 лет и биоматериала (ДНК, сыворотка крови, гомогенаты атеросклеротических бляшек) мужчин с коронарным атеросклерозом, с сопряженными базами данных, содержащими антропологическую, клиническую, клинико-функциональную информации, результаты генетических и биохимических исследований» НИИТПМ дает возможность использования биологического материала человека (ДНК, сыворотка крови, гомогенаты атеросклеротических бляшек) для научных исследований широкому кругу пользователей.

Цель работы – поддержание и развитие коллекционного фонда

Задачи:

1) Разработать технологический паспорт коллекции биоматериала человека НИИТПМ, содержащий: а) описание полного набора ключевых стандартных операционных процедур (СОП), обеспечивающих развитие и поддержание коллекционного фонда; б) научно-техническое обоснование смет стандартных операционных процедур коллекции НИИТПМ.

2) Сформировать документацию технологического паспорта коллекции и разместить на интернет-сайте коллекции НИИТПМ.

3) Экспериментально верифицирован СОП: а) выполнены полные циклы работ по получению образцов биологического материала человека (сыворотка крови – 1500 образцов, ДНК крови – 1500 образцов, гомогенаты атеросклеротических бляшек человека -100 образцов); б) выполнены полные циклы работ по криоархивированию и хранению биологических материалов человека (сыворотка крови – 1500 образцов, ДНК крови – 1500 образцов, гомогенаты атеросклеротических бляшек человека -100 образцов); в) отработан полный цикл работ по температурному контролю криоархивирования г) Выполнен контроль качества и поддержания единиц хранения биологических материалов человека (количество образцов хранения, на которых осуществлена экспериментальная верификация: 200 образцов ДНК, 200 образцов сыворотки крови, 20 гомогенатов бляшек); д) Отработан полный цикл работ по выделению ДНК, измерению концентрации ДНК, количества ДНК (1500 образцов); е) Выполнен полный цикл работ по идентификации и характеристики биологического материала человека (сыворотки/плазмы крови, ДНК крови, гомогенатов

атеросклеротических бляшек человека). Количество образцов хранения, на которых осуществлена экспериментальная верификация: 100 образцов ДНК, 100 образцов сыворотки крови, 10 гомогенатов бляшек.

4) Записать результаты верификации СОПов в компьютерной базе биоматериала человека НИИТПМ.

5) Разработать формат унифицированного описания образцов материала из коллекции биологического материала НИИТПМ в компьютерной базе данных этой коллекции.

6) Провести первичную инвентаризацию коллекции биоматериалов человека НИИТПМ всех видов материалов: ДНК человека (7900 образцов), сыворотки крови человека (8900), гомогенатов атеросклеротических бляшек (400 образцов), с записью информации в электронную базу данных данной коллекции.

7) Подготовить две рукописи статей в рецензируемых журналах (Scopus, WoS), на основе материалов коллекции, одна из которых должна быть принята в печать

8) Сформировать календарный план работ по выполнению дополнительного государственного задания.

9) Разместить отчет о проделанной работе в рамках дополнительного государственного задания на интернет-сайте коллекции НИИТПМ с указанием ссылки на номер заключенного с ФАНО России соглашения на выполнение дополнительного государственного задания.

В целом, поставленные цели и задачи дают необходимую базу для функционирования коллекции биоматериалов человека.

Настоящий отчет является заключительным по теме «Коллекция биоматериала (ДНК, сыворотка крови) популяции г. Новосибирска в возрасте 14-70 лет и биоматериала (ДНК, сыворотка крови, гомогенаты атеросклеротических бляшек) мужчин с коронарным атеросклерозом, с сопряженными базами данных, содержащими антропологическую, клиническую, клинико-функциональную информации, результаты генетических и биохимических исследований» за 2017 год.

## ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

### 1 Общая информация о коллекции

1.1 Название коллекции: Коллекция биоматериала (ДНК, сыворотка крови) популяции г. Новосибирска в возрасте 14-70 лет и биоматериала (ДНК, сыворотка крови, гомогенаты атеросклеротических бляшек) мужчин с коронарным атеросклерозом, с сопряженными базами данных, содержащими антропологическую, клиническую, клинико-функциональную информации, результаты генетических и биохимических исследований.

1.2 Наименование организации ФАНО России – держателя коллекции (если организация прошла реорганизацию в 2017г, то указать старое и новое название): Старое название: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины, № 541

Новое название: Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины - филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (НИИТПМ – филиал ИЦиГ СО РАН), № 324 (04)

1.3 Регистрационный номер биоресурсной коллекции в информационной системе «Парус» ФАНО России: 324 (04)

1.4 Направление ФНИ: 65. Физиология и фундаментальная медицина.

1.5 Руководитель коллекции, поддерживающий коллекцию: Воевода Михаил Иванович, руководитель НИИТПМ – филиал ИЦиГ, д.м.н., Академик РАН, [mvoevoda@ya.ru](mailto:mvoevoda@ya.ru), тел. (383)2642516, сот. тел. 89139505088

1.6 Назначение коллекции: коллекционный фонд создан с целью изучения молекулярно-биологических, популяционных закономерностей формирования хронических неинфекционных заболеваний и их особенностей у населения Сибири. Наличие в коллекции биоматериала (ДНК, сыворотка крови, гомогенаты атеросклеротических бляшек) пациентов с коронарным атеросклерозом позволяет осуществлять широкий спектр биомедицинских и фундаментальных исследований направленных на разработку новых подходов к оценке риска острых коронарных событий и прогноза течения заболевания.

1.7 Регистрация коллекции в перечне ЦКП/УНУ «Современная исследовательская инфраструктура Российской Федерации»: Есть.

1.8 Наименование, реестровый номер и адрес ЦКП/УНУ на сайте [http://www.ckp-  
rf.ru](http://www.ckp-rf.ru): Коллекция биоматериала (ДНК, сыворотка крови) популяции г. Новосибирска в возрасте 14-70 лет и биоматериала (ДНК, сыворотка крови, гомогенаты атеросклеротических бляшек) мужчин с коронарным атеросклерозом, с сопряженными базами данных,

содержащими антропологическую, клиническую, клинико-функциональную информации, результаты генетических и биохимических исследований" <http://www.ckp-rf.ru/ckp/505959/>,

1.9 Дата образования коллекции: 2017.

1.10 Отражение коллекционной деятельности в Уставе организации: *Нет*

1.11 Положение о коллекции, утвержденное на Ученом совете организации (выписка из протокола №5 от 28 июня 2016г. заседания Ученого совета).

1.12 Адрес WEB-сайта организации, на котором представлена информация о коллекции: <http://www.iimed.ru/nauchnaya-deyatelnost/dokumentyi>

2 Краткая информация о проделанной работе в рамках дополнительного госзадания

2.1 Текст Отчета представлен на:

а) WEB-сайте организации: <http://iimed.ru/nauchnaya-deyatelnost/dokumentyi.html>

б) Информационном портале БРК: <http://brk.forge.ssc.ru/kollekcii/kollekcii-biomaterialov-cheloveka/kollekciya-biomateriala-dnk-syvorotka-krovi-populyacii-g>.

2.2 Содержание основных результатов работы по дополнительному госзаданию в соответствии с ПФНИ ГАН: поиск новых специфических молекулярно-биологических, иммунологических, протеомных и иных маркеров для совершенствования прижизненной (кровь и другие биообразцы, биопсийный и операционный материал) и посмертной диагностики заболеваний. На основе результатов исследования пациентов с ишемической болезнью сердца и коронарным атеросклерозом в сравнении с популяционной выборкой (без ИБС) разработан калькулятор для лабораторной диагностики риска развития коронарного атеросклероза и ИБС, включающий значимые биохимические показатели, характеризующие основные патогенетические звенья коронарного атеросклероза.

3 Регистрация в государственных информационных системах и финансирование

3.1 Регистрационный номер дополнительного госзадания по БРК в информационной системе «Парус» ФАНО России: 0324-2017-0048

3.2 Регистрационный номер дополнительного госзадания по БРК в информационной системе ЦИТИС: АААА-А17-117110270088-0

3.3 Отчет по дополнительному госзаданию 0324-2017-0048 подготовлен и загружен в систему Парус 31.01.2018.

3.4 Отчет по дополнительному госзаданию (АААА-А17-117110270088-0) подготовлен и загружен в систему ЦИТИС 31.01.2018.

3.5 Объём финансирования, выделенного на выполнение ДГЗ из средств ФАНО России в 2017 году: 5100 тыс. рублей, Соглашение № 007-03-397/3 от 09.11.2017.

3.6 Объём финансирования, выделенного на приобретение крупного оборудования из средств ФАНО России в 2017 г. (свыше 500 000 руб.).

4 Результаты, полученные в рамках дополнительного государственного задания

4.1 Создан технологический паспорт коллекции биоматериала человека НИИТПМ»

Разработан технологический паспорт коллекции биоматериала человека НИИТПМ, содержащий:

а) описание полного набора ключевых стандартных операционных процедур (СОП), обеспечивающих развитие и поддержание коллекционного фонда; СОПы находятся в Приложениях Б–Ж, ниже приведены их названия:

- Приложение Б Стандартная операционная процедура «Получение образцов биологического материала (сыворотки крови / ДНК крови, гомогенаты атеросклеротических бляшек) для исследований».

- Приложение В Стандартная операционная процедура «Криоархивирование и хранение биологических материалов человека (сыворотка крови, ДНК крови, гомогенаты атеросклеротических бляшек)».

- Приложение Г Стандартная операционная процедура «Контроль температуры в холодильниках и морозильных камерах».

- Приложение Д Стандартная операционная процедура «Контроль качества и поддержка единиц хранения биологических материалов».

- Приложение Е Стандартная операционная процедура «Экстракция ДНК из крови».

- Приложение Ж Стандартная операционная процедура «Идентификация и характеристика биологического материала человека».

б) научно-техническое обоснование смет стандартных операционных процедур коллекции НИИТПМ.

Для обоснования смет стандартных операционных процедур и расчета общей стоимости работ, обеспечивающих развитие и поддержание коллекции биоматериала человека НИИТПМ, были собраны данные об оплате труда, приобретении материалов, расходах на содержание оборудования, коммунальных и иных затратах, необходимых для выполнения работ по перечисленным ниже направлениям деятельности коллекции:

- Выполнение стандартных операционных процедур (СОП);
- Общее содержание коллекции.

Собранные данные были использованы для расчета стоимости выполнения б СОП, величины накладных расходов на содержание коллекции и необходимого годового объема финансирования.

Расчеты проводились в соответствии моделью и методикой оценки, разработанными ИЦиГ СО РАН в рамках выполнения дополнительного государственного задания по теме: «Разработка модели финансового управления сохранением и рациональным использованием биоресурсов в рамках функционирования биоресурсных научных коллекций» [http://www.biores.cytogen.ru/brc\\_finance/report](http://www.biores.cytogen.ru/brc_finance/report). Полный набор данных представлен на портале «Биоресурсные коллекции ФАНО России» [http://www.biores.cytogen.ru/brc\\_finance/collections/60](http://www.biores.cytogen.ru/brc_finance/collections/60).

Итоговый объем требуемого годового финансирования коллекции рассчитан на основе предполагаемого плана работ и составил 5582741,18 руб., из которых 4567860,01 руб. запланированы для выполнения работ по содержанию и развитию коллекции, 1014881,18 руб. запланированы для обеспечения накладных расходов на работу коллекции.

4.2 Сформирована документация технологического паспорта коллекции и размещена на интернет-сайте коллекции НИИТПМ: <http://iimed.ru/nauchnaya-deyatelnost/dokumentyi.html>

#### 4.3 Экспериментально верифицирован СОП

Была проведена процедура экспериментальной верификации стандартных операционных процедур:

а) Выполнены полные циклы работ по получению образцов биологического материала человека (сыворотка крови – 1500 образцов, ДНК крови – 1500 образцов, гомогенаты атеросклеротических бляшек человека - 100 образцов). Полное название СОП: «Получение образцов биологического материала (сыворотки крови / ДНК крови, гомогенаты атеросклеротических бляшек) для исследований» (Приложение Б);

б) Выполнены полные циклы работ по криоархивированию и хранению биологических материалов человека - сыворотка крови – 1500 образцов, ДНК крови – 1500 образцов, гомогенаты атеросклеротических бляшек человека -100 образцов (рисунок 1). Полное название СОП: «Криоархивирование и хранение биологических материалов человека (сыворотка крови, ДНК крови, гомогенаты атеросклеротических бляшек)» (Приложение В).



Рисунок 1 – Криоархивирование и хранение биологического материала человека

в) Отработан полный цикл работ по температурному контролю криоархивирования. Полное название СОП: «Контроль температуры в холодильниках и морозильных камерах» (Приложение Г).

г) Выполнен контроль качества и поддержания единиц хранения биологических материалов человека (количество образцов хранения, на которых осуществлена экспериментальная верификация: 200 образцов ДНК, 200 образцов сыворотки крови, 20 гомогенатов бляшек). Полное название СОП: «Контроль качества и поддержка единиц хранения биологических материалов» (Приложение Д).

Верификация стандартной операционной процедуры «Контроль качества и поддержка единиц хранения биологических материалов» проводилась на сыворотке и гомогенатах бляшек. В качестве исследуемого материала были взяты образцы сыворотки и гомогенатов, для которых ранее было определено содержание С-реактивного белка (СРБ). Также, в условиях лаборатории, была получена сливная сыворотка и сливные гомогенаты для проведения верификации и дальнейшего контроля качества хранения биоматериала согласно СОП 4. На первом этапе верификации было определено содержание СРБ во всех образцах, и определена концентрация СРБ в мг/л в сливной сыворотке и гомогенатах. Спустя три месяца был проведён второй этап верификации, для чего в этих же образцах и в сливных сыворотке и гомогенате снова определили концентрацию СРБ. Отклонение исходных данных от общего среднего составило 2,81%, первого этапа 1,79%, второго – 1,15%. В результате среднее значение извлечения составило 100,04%. Среднее значение отклонения -1,92% (<5%). Таким образом статистически достоверной разницы между исходными результатами и показателями первого и второго этапа верификации выявлено не было (рисунок 2), показатели СРБ оказались стабильными в течении длительного времени, что говорит о возможности использования данного маркера в качестве контроля сохранности биологического материала.

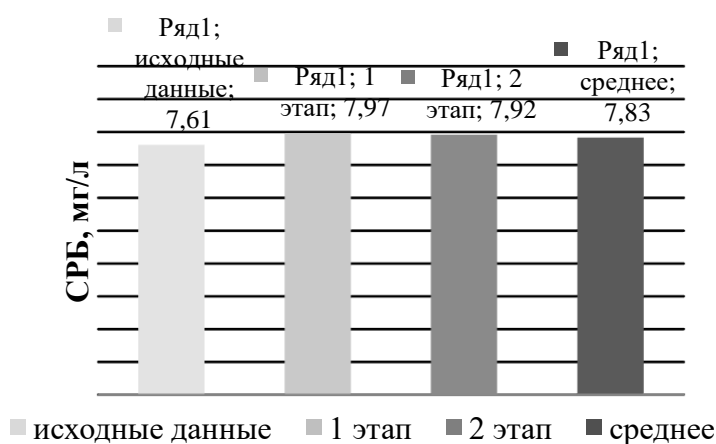


Рисунок 2 – Концентрация СРБ на разных этапах верификации

Верификация стандартной операционной процедуры «Контроль качества и поддержка единиц хранения биологических материалов» проводилась на образцах ДНК (СОП 5). В качестве исследуемого материала были взяты образцы ДНК, для которых ранее была определена концентрация. Была выполнена пробная реал-тайм ПЦР с праймерами на ген бэта-гемоглобина (HBB). Все проверенные образцы ДНК оказались реакционноспособными.

д) Отработан полный цикл работ по выделению ДНК, измерению концентрации ДНК, количества ДНК (1500 образцов). Полное название СОП: «Экстракция ДНК из крови» (Приложение Е).

е) Выполнен полный цикл работ по идентификации и характеристики биологического материала человека (сыворотки/плазмы крови, ДНК крови, гомогенатов атеросклеротических бляшек человека). Количество образцов хранения, на которых осуществлена экспериментальная верификация: 100 образцов ДНК, 100 образцов сыворотки крови, 10 гомогенатов бляшек. Полное название СОП: «Идентификация и характеристика биологического материала человека» (Приложение Ж).

4.4 Записаны результаты верификации СОПов в компьютерной базе биоматериала человека НИИТПМ.

4.5 Разработан формат унифицированного описания образцов материала из коллекции биологического материала НИИТПМ в компьютерной базе данных этой коллекции.

Разработан формат унифицированного описания данных образцов материала из коллекции биологического материала НИИТПМ в компьютерной базе данных этой коллекции, включающий данные о пациентах (рисунок 3), биологический материал которых включен в коллекционный фонд биоматериалов человека НИИТПМ. Ключевые параметры данных о пациенте: идентификационный номер, пол, дата рождения, дата поступления на обследование, объем талии, объем бедер, рост, вес, индекс массы тела, систолическое артериальное давление, диастолическое артериальное давление, частота сердечных сокращений, уровень общего холестерина, триглицеридов, липопротеинов высокой плотности, липопротеинов низкой плотности, глюкозы).

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
1	id n	дата рождения	дата поступления	пол	возраст	вес	рост	объем талии	объем бедер	ОХС	ХС ЛВП	ТГ	ХС ЛНП	глюкоза
2	1	25.01.1947	11.10.2011	1	64	72	171							
3	2	23.12.1962	17.10.2011	1	49	103	175	120	117	213		34	131	152,8
4	3	08.03.1958	17.10.2011	1	53	91	165	103	98					5,37
5	4	28.01.1955	19.10.2011	1	56	95	179	110	105	185		40	110	123
6	5	12.03.1937	19.10.2011	1	74	75	170	118	112	152		39	64	100,2
7	6	28.09.1973	19.10.2011	1	38	55	161	80	82	174,5		50	79,5	108,6
8	7	27.04.1952	26.10.2011	1	59	115	186	113	110	214,5		30	231,5	138,2
9	8	07.05.1935	07.11.2011	1	76	76	161	98	101	143		34	115,5	85,9
10	9	01.07.1948	01.11.2011	1	63	76	165	90	88	228,5		31	479,5	101,6
11	10	12.01.1945	14.11.2011	1	66	76	180	82	90	260		41	151,5	188,7
12	11		30.11.2011	1	67			98	94	203		31	156	140,8
13	12	07.01.1947	05.12.2011	1	64	72	167	105	95	284		42	139	214,2
14	13	28.10.1965	07.11.20011	1	46	126	189	118	115	184		41	98	123,4
15	14	02.08.1946	01.12.2011	1	65	65	172	109	98					4,8
16	15	14.06.1949	11.12.2011	1	62	75	172	100	105	218		39	127	153,6
17	16	18.02.1958	15.12.2011	1	53	68	170	100	103	168		39	173	94,4
18	17	25.11.1950	16.12.2011	1	61	113	179	115	105	239		48	171	156,8
19	18	12.04.1935	06.12.2011	1	76	66	160	100	102	305		51	130	228
20	19	23.05.1950	21.12.20011	1	61	83	179	85	90	268		52	143	187,4
21	20	02.06.1939	15.01.2012	1	72	108	163	105	110	160		38	179	86,2
22	21	20.09.1954	11.01.2012	1	57	88	172	88	85	204		40	96	144,8
23	22	14.12.1952	13.01.2012	1	59	92	165	100	105	243		12		10,68
24	23	09.12.1959	18.01.2012	1	52	78	180	96	92	302		30	179	236,2
25	24	01.02.1961	17.05.2012	1	51	84	174	94	90	240		31	150	179
26	25	07.06.1953	23.01.2012	1	59	78	174	90	88	171		28	117	119,6
27	26	16.11.1932	25.01.2012	1	80	67	162	88	82	269		30	188	201,4
28	27	25.10.1942	30.01.2012	1	70	105	171	102	98	138		33	128	79,4
29	28													5,3
30	29	14.02.1970	30.02.2012	1	42	92	196	102	96	140		38	135	75
31	30	25.03.1952	20.02.2012	1	59	70	180	98	94	267		66	98	181,4
32	31	08.06.1974	24.02.2012	1	38	91	176	98	96					6,35
33	32	17.06.1949	12.03.2012	1	63	130	180	102	98	234		46	173	153,4
34	33	12.04.1941	16.03.2012	1	71	70	162	88	86	128		31	57	85,6
35	34	10.05.1958	04.04.2012	1	54	92	170	96	92	230		37	151	162,8
36	35	15.07.1957	03.05.2012	1	55	95	167	94	90	185		32	94	134,2
37	36	20.08.1957	04.05.2012	1	55	88	171	96	90	132		23	144	80,2

Рисунок 3 – Скриншот фрагмента таблицы электронной базы данных коллекции биоматериала НИИТПМ

Описание образцов материала из коллекции биологического материала в компьютерной базе данных находится в формате файла Excel.

4.6 Проведена первичная инвентаризация коллекции биоматериалов человека НИИТПМ (рисунок 4) всех видов материалов: ДНК человека (7900 образцов), сыворотки крови человека (8900), гомогенатов атеросклеротических бляшек (400 образцов), с записью информации в электронную базу данных данной коллекции.

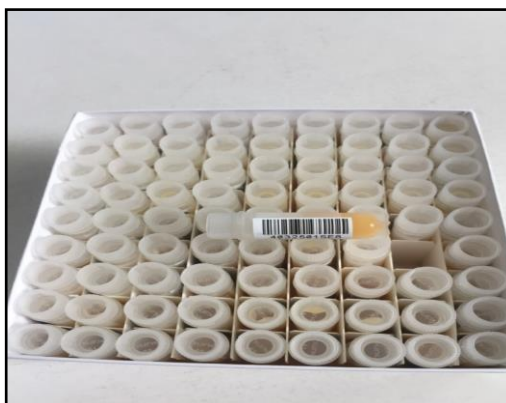


Рисунок 4 – Этикетка со штрих-кодом, содержащим индивидуальный номер и тип образца

4.7 Отправлены в печать в рецензируемые журналы (Scopus, WoS) две публикации, подготовленные по итогам выполнения дополнительного госзадания.

В соответствии с дополнительным государственным заданием на основе материалов коллекции подготовлены две рукописи статей в рецензируемых журналах (Scopus, WoS), одна из которых опубликована: Яковина И.Н., Баннова Н.А., Каштанова Е.В., Полонская Я.В., Рагино Ю.И. Новые методы и модели оценки риска развития ишемической болезни сердца. Анализ риска здоровью. 2017;3:40-47. DOI 10.21668/health.risk/2017.3.05, вторая статья (Polonskaya Y.V., Kashtanova E.V., Striukova E.V., Volkov A.M. , Murashov I.S., Chernyavsky A.M., Ragino Y.I. Dynamics of changes in concentration of inflammatory and destructive biomarkers at various stages of atherosclerotic plaque development) направлена в редакцию журнала Atherosclerosis издательство Elsevier (Приложение А).

4.8 Сформирован календарный план работ по выполнению дополнительного государственного задания.

Подготовлен календарный план работ по выполнению дополнительного государственного задания:

- Регистрация дополнительного госзадания в системе ПАРУС (Ученый секретарь Института), 25.07.2017;

- Регистрация дополнительного госзадания в системе ЦИТИС (Ученый секретарь Института), начать регистрацию следует одновременно с ПАРУСом, окончание примерно через месяц;

- Подготовка Календарного плана работ по выполнению дополнительного государственного задания, 28.07.2017;

- Формирование технологического паспорта Коллекции биоматериалов человека НИИТПМ – филиал ИЦиГ СО РАН. Описание полного набора ключевых стандартных операционных процедур (СОП), обеспечивающих развитие и поддержание Коллекции биоматериалов человека НИИТПМ – филиал ИЦиГ СО РАН, 1.09.2017;

- Формирование смет и их научно-технического обоснования для стандартных операционных процедур Коллекции биоматериалов человека НИИТПМ – филиал ИЦиГ СО РАН, 14.09.2017;

- Размещение технологического паспорта Коллекции биоматериалов человека НИИТПМ – филиал ИЦиГ СО РАН на интернет-сайте НИИТПМ – филиал ИЦиГ СО РАН, 15.09.2017;

- Выполнение первого этапа экспериментальной верификации СОПов Коллекции биоматериалов человека НИИТПМ – филиал ИЦиГ СО РАН, включая: СОП по получению образцов биологического материала человека, верифицированный на 1500 образцах сыворотки крови, 1500 образцах ДНК крови, 100 образцах гомогенатов атеросклеротических бляшек человека; СОП по криоархивированию и хранению биологических материалов

человека, верифицированный на 1500 образцах сыворотки крови, 1500 образцах ДНК крови, 100 образцах гомогенатов атеросклеротических бляшек человека; СОП по температурному контролю криоархивирования, верифицирован на 1 морозильной камере на  $-70^{\circ}\text{C}$ , 28.09.2017;

- Запись результатов первого этапа верификации СОПов в электронную базу Коллекции биоматериалов человека НИИТПМ – филиал ИЦиГ СО РАН, 28.09.2017;

- Промежуточный отчет о проделанной работе, 29.09.2017;

- Подготовка первой запланированной публикации на основе материалов коллекции и направление в рецензируемые журналы (Scopus, WoS), 15.10.2017;

- Выполнение второго этапа экспериментальной верификации СОПов Коллекции биоматериалов человека НИИТПМ – филиал ИЦиГ СО РАН, включая: СОП по контролю качества и поддержания единиц хранения биологических материалов человека, верифицированный на 200 образцах ДНК, 200 образцах сыворотки крови, 20 гомогенатах бляшек; СОП по выделению ДНК, измерению концентрации ДНК, количества ДНК, верифицированный на 1500 образцах; СОП по идентификации и характеристике биологического материала человека, верифицированный на 100 образцах ДНК, 100 образцах сыворотки крови, 10 гомогенатах бляшек, 15.12.2017;

- Запись результатов второго этапа верификации СОПов в электронную базу Коллекции биоматериалов человека НИИТПМ – филиал ИЦиГ СО РАН, 15.12.2017;

- Пополнение электронного каталога Коллекции биоматериалов человека НИИТПМ – филиал ИЦиГ СО РАН информацией о 1500 образцах сыворотки крови, 1500 образцах ДНК крови, 100 образцах гомогенатов атеросклеротических бляшек человека, охарактеризованных согласно перечню СОП Коллекции биоматериалов человека НИИТПМ – филиал ИЦиГ СО РАН, 15.12.2017;

- Проведение регистрации Коллекции биоматериалов человека НИИТПМ – филиал ИЦиГ СО РАН на электронном ресурсе Сетевого центра Коллекций биоматериалов человека ФАНО России, 15.12.2017;

- Подготовка второй запланированной публикации на основе материалов коллекции и направление в рецензируемые журналы (Scopus, WoS), 20.12.2017;

- Отправка в печать первой публикации в рецензируемые журналы (Scopus, WoS), 20.12.2017;

- Подготовка итогового отчета о проделанной работе в рамках дополнительного государственного задания, 25.12.2017;

- Размещение отчета о проделанной работе в рамках дополнительного государственного задания на интернет-сайте Коллекции биоматериалов человека НИИТПМ

– филиал ИЦиГ СО РАН с указанием ссылки на номер заключенного с ФАНО России соглашения на выполнение дополнительного государственного задания, 29.12.2017;

- Предоставление итогового отчета в Рабочую группу БРК, 29.12.2017;

- Утверждение итогового отчета по дополнительному госзаданию, оформленного по ГОСТУ на заседании Ученого совета Института, 31.12.2017;

- Отправка итогового отчета по дополнительному госзаданию руководителю соответствующей экспертной группы для анализа соответствия результатов и для формирования общего отчета по направлению, 3.01.2018;

- Совместно с планово-финансовой службой института ответственный исполнитель должен подготовить финансовый отчет по дополнительному госзаданию для ФАНО (Форма будет предоставлена позднее), 20.01.2018;

- Итоговый отчет по ДГЗ должен быть выложен в систему ПАРУС не позднее 5.02.2018;

- Итоговый отчет по ДГЗ должен быть зарегистрирован в Системе ЦИТИС (Ученый секретарь Института) по окончанию проекта.

4.9 Отчет о проделанной работе в рамках дополнительного государственного задания размещен на интернет-сайте коллекции НИИТПМ с указанием ссылки на номер заключенного с ФАНО России соглашения на выполнение дополнительного государственного задания: <http://iimed.ru/nauchnaya-deyatelnost/dokumentyi.html>

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

«Коллекция биоматериала (ДНК, сыворотка крови) популяции г. Новосибирска в возрасте 14-70 лет и биоматериала (ДНК, сыворотка крови, гомогенаты атеросклеротических бляшек) мужчин с коронарным атеросклерозом, с сопряженными базами данных, содержащими антропологическую, клиническую, клинико-функциональную информации, результаты генетических и биохимических исследований» является уникальной по количеству биообразцов сыворотки и ДНК популяции и количеству биообразцов сыворотки крови, ДНК и гомогенатов атеросклеротических бляшек мужчин с коронарным атеросклерозом. Представленная работа направлена на расширение биоресурсной коллекции и на экспериментальную верификацию методик поддержания коллекции. В рамках работы создан технологический паспорт коллекции, включающий в себя описание полного набора ключевых СОПов и научно-техническое обоснование смет СОПов коллекции. Проведена экспериментальная верификация ключевых СОПов, разработан формат унифицированного описания образцов материала в компьютерной базе данных о коллекции, проведена первичная инвентаризация коллекции, требуемые документы размещены на интернет-сайте коллекции (<http://www.iimed.ru/nauchnaya-deyatelnost/dokumentyi>). По результатам подготовлены публикации в журналы, входящие в базы данных Scopus и WoS.

Таким образом, проведенная в рамках государственного задания работа позволяет решать на базе коллекции биоматериалов человека задачи в проведении фундаментальных, прикладных и поисковых биомедицинских научных исследований, обеспечивая биологическим материалом пользователей России.

Поставленные задачи выполнены в полном объеме.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1 Бокерия Л.А., Гудкова Р.Г. Болезни системы кровообращения и сердечно-сосудистая хирургия в Российской Федерации. Состояние и проблемы // Аналитический вестник. 2015. 44(597). 9-18.
- 2 Развитие здравоохранения НСО на 2013–2020 годы: отчеты о реализации государственной программы [Электронный ресурс]. – URL: <http://www.zdrav.nso.ru/page/2372>
- 3 Современные взгляды на этиологию и диагностику ишемической болезни сердца / Р.Т. Дидигова, А.М. Инарокова, М.Я. Имагожева, М.Н. Мамедов // Лечебное дело. 2011. 4. 11–17.
- 4 European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: full text. Fourth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and other societies on cardiovascular disease prevention in clinical practice (constituted by representatives of nine societies and by invited experts) / I. Graham [et al] // Eur. J. Cardiovasc. Prev. Rehabil. 2007. 2. 1–113.
- 5 Скрининг сердечно-сосудистого риска у бессимптомных пациентов / J.S. Berger, C.O. Jordan, D. Lloyd-Jones, R.S. Blumenthal // Рациональная фармакотерапия в кардиологии. 2010. 6(3). 381–390.
- 6 Ge Y., Wang T.J. Identifying novel biomarkers for cardiovascular disease risk prediction // J. Intern. Med. 2012. 272(5). 430–439.
- 7 Risk stratification in cardiovascular disease primary prevention – scoring systems, novel markers, and imaging techniques /F. Zannad, G. De Backer, I. Graham [et al] // Fundam. Clin. Pharmacol. 2012. 26(2). 163–174.

## ПРИЛОЖЕНИЕ А

### Библиографический список публикаций, полученных в результате выполнения научно-исследовательской работы

1 Яковина И.Н., Баннова Н.А., Каштанова Е.В., Полонская Я.В., Рагино Ю.И. Новые методы и модели оценки риска развития ишемической болезни сердца. Анализ риска здоровью. 2017;3:40-47. DOI 10.21668/health.risk/2017.3.05 Страницы первая и с разделом «Исследование поддержано программой развития биоресурсных коллекций ФАНО» статьи представлены на рисунке А.1.

2 Polonskaya Y.V., Kashtanova E.V., Striukova E.V., Volkov A.M., Murashov I.S., Chernyavsky A.M., Ragino Y.I. Dynamics of changes in concentration of inflammatory and destructive biomarkers at various stages of atherosclerotic plaque development.

Статья направлена 27.11.2017 в журнал Atherosclerosis издательство Elsevier. Скриншот, подтверждающий статус статьи, представлен на рисунке А.2.

И.Н. Яковина, Н.А. Баннова, Е.В. Каштанова, Я.В. Полонская, Ю.И. Рагино

UDC 615.47: 616-072.7  
DOI: 10.21668/health.risk/2017.3.05

#### НОВЫЕ МЕТОДЫ И МОДЕЛИ ОЦЕНКИ РИСКА РАЗВИТИЯ ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ СЕРДЦА

И.Н. Яковина<sup>1</sup>, Н.А. Баннова<sup>1</sup>, Е.В. Каштанова<sup>1</sup>, Я.В. Полонская<sup>1</sup>, Ю.И. Рагино<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Новосибирский государственный технический университет, Россия, 630073, г. Новосибирск, пр-т Карла Маркса, 20

<sup>2</sup>Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины, Россия, 630089, г. Новосибирск, ул. Бориса Богаткова, 175/1

Разрабатывается решение задачи разработки и реализации в практической деятельности нового метода оценки риска развития ишемической болезни сердца. В основу метода положены разработанный лабораторно-диагностический комплекс, включающий окислительные, липидно-липидогенные, воспалительные и метаболические биохимические показатели; систему логико-математических моделей для получения численной оценки риска и прогнозный модуль, позволяющий выявлять рост и анализ результатов. Основные модели выстроены в виде иерархии, в которой было исследовано 172 пациента с ишемической болезнью сердца (ИБС) на фоне коронарной атеросклероза, коронарографические данные коронарографии, и 167 пациентов без ИБС. В программу обследования включены: демографические и социальные данные; опрос о привычке курения и употреблении алкоголя, биохимический опрос; история хронических заболеваний и употребление лекарственных препаратов; лабораторный опрос; антропометрия. Углубленное измерение артериального давления, спирометрия, запись электрокардиограммы с расшифровкой по Минусинскому коду. У всех пациентов определены биохимические показатели. Уточнена задача разработки модели и модели для оценки риска развития ИБС на основании окислительных, воспалительных и липидных биомаркеров. Выявлены разработаны системы логико-математических моделей, которая представляет собой иерархическую схему обработки лабораторных показателей, уточняющая специфику разнородных данных. Системы моделей являются универсальной, специфичной биохимической моделью и позволяют биохимическими показателями. Разработанный прогнозный модуль (математизатор) позволяет сразу на основании данных лабораторных исследований получить результаты, характеризующий численной риск развития коронарного атеросклероза и ИБС у пациентов, а также выделить группы пациентов и их особенности от условной группы «норма» и профилактической помощи.

**Ключевые слова:** оценка риска, ишемическая болезнь сердца, лабораторно-диагностический комплекс, биохимические показатели, логико-математическая модель, прогнозный модуль, опрос по Ризу.

Согласно статистике, каждый 13-й гражданин в РФ страдает сердечно-сосудистой патологией, и среди причин смертности от болезней системы кровообращения, формирующих ее структуру, главенствует ишемическая болезнь сердца (ИБС) [1]. Заболеваемость ишемической болезнью сердца (ИБС) по Новосибирской области

составляет более 35 человек на 1000 взрослого населения [6]. В связи с этим работой, направленной на улучшение диагностики и назначение мероприятий по своевременной диагностике и вторичной профилактике ишемической болезни сердца (ИБС), имеет особое значение в стратегии оказания медицинской помощи больным кардио-

© Яковина И.Н., Баннова Н.А., Каштанова Е.В., Полонская Я.В., Рагино Ю.И., 2017  
Яковина Ирина Николаевна – кандидат технических наук, доцент кафедры вычислительной техники, руководитель студенческого конструкторского бюро «Робототехника и искусственный интеллект» (e-mail: irina.nik@mail.com, тел.: 8 (383) 346-11-53).

Баннова Наталья Александровна – инженер студенческого конструкторского бюро «Робототехника и искусственный интеллект» (e-mail: natan@mail.com, тел.: 8 (383) 346-28-01).

Каштанова Елена Владимировна – доктор биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории клинических биологических и гормональных исследований терапевтических заболеваний (e-mail: galina@mail.ru, тел.: 8 (383) 267-97-55, 8 (383) 211-75-03).

Полонская Яна Владимировна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории клинических биологических и гормональных исследований терапевтических заболеваний (e-mail: galina@mail.ru, тел.: 8 (383) 267-97-55, 8 (383) 211-75-03).

Рагино Юлия Игоревна – член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук, заместитель директора по научной работе, руководитель лаборатории клинических биологических и гормональных исследований терапевтических заболеваний (e-mail: ragino@mail.ru, тел.: 8 (383) 267-97-55, 8 (383) 211-75-03).

40

Анализ риска здоровью. 2017. № 3

Новые методы и модели оценки риска развития ишемической болезни сердца

12. Шайлова И.Н., Стешевский П.С. Алгоритмы формирования диагностических решений // Актуальные проблемы электронного приборостроения АПЭП-2010: материалы VIII Международной конференции. – Новосибирск, 2010. – Т. 5. – С. 122–127.

13. Between risk charts and imaging: how should we stratify cardiovascular risk in clinical practice? / G.F. Marelli, F. D'Ascenzo, P. Faggiano [et al] // Eur. Heart J. Cardiovasc. Imaging. – 2013. – Vol. 14, No 5. – P. 401–416.

14. Estimation of ten-year risk of fatal cardiovascular disease in Europe: the SCORE project / R.M. Conroy, K. Pyörälä, A.P. Fitzgerald, S. Sans, A. Menotti, G. De Backer, D. De Bacquer, P. Ducimetière, P. Jouanolle, U. Keil, I. Njølstad, R.G. Ogston, T. Thomsson, H. Tunstall-Pedoe, A. Verstraal, H. Wedel, P. Whitecap, L. Wilhelmsen, I.M. Graham // Eur. Heart J. – 2003. – Vol. 24, No 11. – P. 987–1003.

15. European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: full text. Fourth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and other societies on cardiovascular disease prevention in clinical practice (constituted by representatives of nine societies and by invited experts) / I. Graham [et al] // Eur. J. Cardiovasc. Prev. Rehabil. – 2007. – No 2. – P. 1–13.

16. Ge Y., Wang T.J. Identifying novel biomarkers for cardiovascular disease risk prediction // J. Intern. Med. – 2012. – Vol. 272, No 5. – P. 430–439.

17. Relationship of osteonectin level with inflammatory, oxidative and lipid biomarkers in blood in coronary atherosclerosis and its complication / Yu. Ragino, E. Kashtanova, A. Chernyavskiy, Ya. Polonskaya, M. Voevoda // Abstr. XIII HUPO World Congress. – Madrid, 2014. – P. 207.

18. Risk stratification in cardiovascular disease primary prevention – scoring systems, novel markers, and imaging techniques // Zansad, G. De Backer, I. Graham [et al] // Fundam. Clin. Pharmacol. – 2012. – Vol. 26, No 2. – P. 163–174.

Новые методы и модели оценки риска развития ишемической болезни сердца / И.Н. Яковина, Н.А. Баннова, Е.В. Каштанова, Я.В. Полонская, Ю.И. Рагино // Анализ риска здоровью. – 2017. – № 3. – С. 40–47. DOI: 10.21668/health.risk/2017.3.05

Исследование поддержано программой развития биоресурсных коллекций ФАНО

UDC 615.47: 616-072.7  
DOI: 10.21668/health.risk/2017.3.05.eng

#### NEW TECHNIQUES AND MODELS FOR ASSESSING ISCHEMIC HEART DISEASE RISKS

I.N. Yakovina<sup>1</sup>, N.A. Bannova<sup>1</sup>, E.V. Kashtanova<sup>1</sup>, Ya.V. Polonskaya<sup>1</sup>, Yu.I. Ragino<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Novosibirsk State Technical University, 20, K. Marksa Avenue, Novosibirsk, 630073, Russian Federation

<sup>2</sup>Scientific Research Institute for Therapy and Preventive Medicine, 175/1 Borisa Bogatkova str., Novosibirsk 630089 Russian Federation

The paper focuses on tasks of creating and implementing a new technique aimed at assessing ischemic heart diseases risk. The techniques is based on a laboratory-diagnostic complex which includes oxidative, lipid-lipidogenic, inflammatory and metabolic biochemical parameters; a system of logic-mathematic models used for obtaining numeric risk assessments; and a program module which allows to calculate and analyze the results. We verified our models in the course of our research which included 172 patients suffering from ischemic heart diseases (IHD) combined with coronary atherosclerosis verified by coronary arteriography and 167 patients who didn't have ischemic heart diseases. Our research program included demographic and social data, questioning on tobacco and alcohol addition, questioning about dietary habits.

© Yakovina I.N., Bannova N.A., Kashtanova E.V., Polonskaya Ya.V., Ragino Yu.I., 2017  
Irina N. Yakovina – Candidate of Technical Sciences, Associate Professor at Computer Engineering Department, Head of «Robotics and Artificial Intelligence students' construction office» (e-mail: irina.nik@mail.com, tel.: +7 (383) 346-11-53).

Natalya A. Bannova – an engineer at «Robotics and Artificial Intelligence students' construction office» (e-mail: genneta@mail.com, tel.: +7 (383) 346-28-01).

Elena V. Kashtanova – Doctor of Biological Sciences, senior researcher at Laboratory for Clinical Biochemical and Hormonal Research of therapeutic diseases (e-mail: ragino@mail.ru, tel.: +7 (383) 267-97-55, +7 (383) 211-75-03).

Yana V. Polonskaya – Candidate of Biological Sciences, senior researcher at Laboratory for Clinical Biochemical and Hormonal Research of therapeutic diseases (e-mail: ragino@mail.ru, tel.: +7 (383) 267-97-55, +7 (383) 211-75-03).

Yulya I. Ragino – A Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Doctor of Medical Sciences, Deputy Director at Scientific Research Institute for Therapy and Preventive Medicine responsible for research, Head of Laboratory for Clinical Biochemical and Hormonal Research of therapeutic diseases (e-mail: ragino@mail.ru, tel.: +7 (383) 267-97-55, 8 (383) 211-75-03).

Анализ риска здоровью. 2017. № 3

45

Рисунок А.1 – Страницы первая и с разделом «Исследование поддержано программой развития биоресурсных коллекций ФАНО» статьи «Новые методы и модели оценки риска развития ишемической болезни сердца.»

Dear Miss Striukova,

Your submission entitled "Dynamics of changes in concentration of inflammatory and destructive biomarkers at various stages of atherosclerotic plaque development" has been assigned the following manuscript number: ATH-D-17-01315.

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to EES as an author. The URL is <https://ees.elsevier.com/ath/>.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Atherosclerosis

Рисунок А.2 – Подтверждение статуса статьи «Dynamics of changes in concentration of inflammatory and destructive biomarkers at various stages of atherosclerotic plaque development»

## ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Стандартная операционная процедура «Получение образцов биологического материала (сыворотки крови / ДНК крови, гомогенаты атеросклеротических бляшек) для исследований»

Составлено: Е.В. Каштанова, д.б.н., ст.н.с.

Содержание и назначение: определяет протокол получения крови и материала эндартериоэктомии из коронарных артерий, для получения гомогенатов атеросклеротических бляшек.

Местонахождение: НИИТПМ – филиал ИЦиГ СО РАН

Пересмотр через: 6 месяцев

Стандартная операционная процедура (СОП) «Получение образцов биологического материала (сыворотки крови / ДНК крови, гомогенаты атеросклеротических бляшек) для исследований» разработана в качестве стандарта для обеспечения качественного процесса получения и доставки биоматериала для коллекции «Коллекция биоматериала (ДНК, сыворотка крови) популяции г. Новосибирска в возрасте 14-70 лет и биоматериала (ДНК, сыворотка крови, гомогенаты атеросклеротических бляшек) мужчин с коронарным атеросклерозом, с сопряженными базами данных, содержащими антропологическую, клиническую, клинико-функциональную информации, результаты генетических и биохимических исследований» НИИТПМ.

Цель разработки стандартной операционной процедуры состоит в формировании этапов получения биологического материала (крови для экстракции ДНК и получения сыворотки, материала эндартериоэктомии из коронарных артерий для дальнейшего приготовления гомогенатов атеросклеротических бляшек) и его доставке в лабораторию.

В ходе работы мы руководствовались: правилами лабораторной практики (Приложение к Приказу Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 23 августа 2010 г. № 708н) и ГОСТ Р 53434-2009. Принципы надлежащей лабораторной практики. М.: Стандартинформ. – 2010. – 12 с.

Все работы, проводимые в условиях лаборатории должны вестись в соответствии с правилами пожарной безопасности и охраны труда. При работе обеспечиваются условия, предотвращающие заражение персонала инфекционными агентами из первичного биоматериала.

Все оборудование проходит процедуру калибровки сотрудниками лаборатории с периодичностью и с использованием методов, как это указано производителем. Все

расходные материалы и реактивы должны иметь соответствующие сертификаты качества и храниться соответственно спецификации.

Контроль выполнения пунктов протокола возлагается на Руководителя работ. Ответственность за выполнение данной процедуры несут все сотрудники, участвующие в исследовании.

Перечень необходимого оборудования и расходных материалов для выполнения стандартной операционной процедуры представлен в таблице Б.1.

Таблица Б.1 - Перечень необходимого оборудования и расходных материалов

	Наименование	Примечания
1	Вакуумная система сбора крови: - одноразовый держатель для игл - игла	- одноразовый держатель для игл BD Vacutainer (фирма Becton Dickinson International, США) - игла черная 22Gx1 1/2" BD Vacutainer (фирма Becton Dickinson International, США)
2	Вакуумные пробирки	Вакуумная пробирка для клинических исследований сыворотки с активатором образования сгустка стандартные
3	Перчатки медицинские	Стерильные хирургические перчатки латексные, неопудренные, с нитриловым покрытием.
4	Емкость для сбора колюще-режущих медицинских отходов	Применяется в процедурных кабинетах и лабораториях
5	Наконечники универсальные для дозаторов	Наконечник полимерный одноразовый к дозаторам пипеточным объемом 1000 мкл, Термо Фишер Сайнтифик, Россия
6	Пробирки микроцентрифужные типа Эппендорф	Микроцентрифужные пробирки градуированные объемом 1,5 мл, Axugen, США
7	Раствор NaCl 0,9%	Изотонический (физиологический) 0,9% раствор с содержанием натрия хлорида – 9 г, воды дистиллированной – до 1 л
8	Фосфатно-солевой буфер	Фосфатный буфер, PBS, pH 7,2 – 7,6, 1 табл на 200 мл
9	Гомогенизатор автоматический	Гомогенизатор пестиковый, мощный, Schuett Homgen, включая охлаждающий сосуд, универсальный зажим и адаптер
10	Авт. пипетка 100-1000 мкл	Автоматическая пипетка 100-1000 мкл Thermo, Россия
11	Центрифуга	Лабораторная центрифуга CM-6MT для пробирок и вакутейнеров, ELMI, Латвия

Продолжение таблицы Б.1

12	Спиртовая салфетка для инъекций	Салфетка для инъекций из бумажного текстилеподобного материала стерильная «М.К. Асептика» спиртовая (70% этиловый спирт)
13	Криопробирка 1.8 мл	Криопробирка предназначена для транспортировки и хранения замороженного биологического материала, Thermo Scientific Nunc

Возможна замена лабораторного оборудования и расходных материалов на аналогичные, других производителей.

Получение биоматериала

1. Сыворотка крови / ДНК крови

1.1 Требования к предварительной подготовке пациентов для обследования

За один день до сдачи крови желательно избегать физических нагрузок, приема алкоголя и существенных изменений в питании и режиме дня. За один день до сдачи крови не рекомендуется употреблять пищу с высоким содержанием жиров

Взятие образца крови у пациента необходимо производить натощак, в утренние часы, не ранее 12 часов после последнего приема пищи. При несоблюдении этого требования полученная сыворотка крови может содержать большое количество жировых частиц - хиломикронов. Гиперлипидемичная (содержащая жировые включения) сыворотка крови будет непрозрачной, мутной (хилезной); выраженным проявлением гиперлипидемии сыворотки является ее «молочный» вид. Присутствие большого числа частиц жира, как правило, влияет на течение проводимых биохимических реакций, молекулярно-генетические исследования.

Забор крови проводится из локтевой вены. Утренний приём лекарств должен проводиться только после взятия крови!

1.2 Используемое оборудование и способы его применения

Для осуществления прокола вены используются наборы комплектующих для взятия крови в пробирки с плотно прилегающей пробкой и вакуумом внутри (вакутейнеры).

1.3 Подготовительный этап

Подготовить необходимое для процедуры взятия крови оборудование и расходные материалы. Двустороннюю иглу извлекают из общей упаковки и навинчивают (или закрепляют с помощью пластикового запирающего устройства) на адаптер для взятия крови.

После сборки снаружи адаптера располагается закрытая предохранительным пластиковым колпачком стерильная игла; для осуществления прокола вены колпачок снимают.

Выбор вены осуществляется при сжатом кулаке пациента. Наложить жгут. Время наложения жгута не должно превышать 2 мин, чтобы не допустить стаза крови. Предполагаемое место пункции вены дезинфицируют 70% раствором этилового спирта.

#### 1.4 Взятие венозной крови

Выполнить прокол кожи, удерживая держатель с навинченной иглой между большим и указательным пальцами правой руки. Как только игла окажется в вене, переместить держатель с иглой в левую руку. Правой рукой вставить пробирку со стороны ее крышки в держатель.

Большим пальцем правой руки надавить на дно пробирки, удерживая при этом ободок держателя указательным и средним пальцами. Под действием вакуума кровь самостоятельно начнет набираться в пробирку.

Вставить следующую пробирку в держатель и повторяют все манипуляции.

#### 1.5 После окончания взятия венозной крови

Снять пробирку с внутренней иглы адаптера. Продолжая удерживать держатель левой рукой, правой рукой ослабить жгут.

По завершении получения всех проб от пациента внешнюю иглу извлечь из вены пациента, надеть на нее защитный пластиковый колпачок. В момент удаления иглы приложить тампон к месту венепункции и/или наложить давящую повязку на место венепункции.

Использованную иглу поместить в безопасную емкость для использованных материалов.

Не встряхивать пробирку: резкое смешивание может вызвать пенообразование и гемолиз.

#### 1.6 Маркировка образцов биологического материала

Данные о пациенте вносятся в рабочий журнал. Пробирки с кровью подписывают в присутствии пациента (до или после взятия крови) маркером по стеклу/пластику или ручкой на бумажной этикетке пробирки.

#### 1.7 Доставка образцов биологического материала в лабораторию для исследования

Доставку образцов с биологическим материалом из процедурных кабинетов в лабораторию производят процедурные медсестры; при этом пробирки должны быть укупорены пластиковыми крышками и размещены в штативе в транспортном контейнере отдельно от направлений на исследование.

#### 1.8 Регистрация образцов биологического материала

Поступивший в лабораторию биологический материал в тот же день в соответствии с видом и категорией исследования регистрируют в рабочих журналах лаборатории. Научные

сотрудники отвечают за своевременность, соответствие и полноту сведений, вносимых в регистрационные журналы лабораторных исследований.

#### 1.9 Подготовка образцов сыворотки крови к криоархивированию и хранению

В лаборатории образцы крови подвергают предварительной обработке. Пробирки с венозной кровью, в которых сформирован кровяной сгусток, сразу подвергают центрифугированию в настольной лабораторной центрифуге в течение 10 минут при скорости вращения ротора 3000 оборотов в минуту.

Венозную кровь без сгустка сначала отстаивают при комнатной температуре (+20 °С) в течение 30 минут до полного образования сгустка.

#### 2. Гомогенаты атеросклеротических бляшек

Гомогенаты ткани используют в научных исследованиях. Целью гомогенизации является разрушение тканевой структуры клеточных стенок и/или мембран. Выбор метода разрушения клеточной структуры и среды суспендирования зависит от ткани, а также от целей исследования.

2.1 Интраоперационно под визуальным контролем хирурга проводится забор материала эндартериэктомии из коронарных артерий, который затем визуально продольно и поперечно разделяется для биохимических и морфологических исследований. Полученные фрагменты биоматериала помещаются в отдельные пробирки типа Эппендорф, подписываются маркером и помещаются в холодильник при температуре -20 °С.

Ткань (послеоперационный материал) для морфологического исследования доставляют в лабораторию специально упакованной с соответствующей маркировкой в термосумках. Гистологическое исследование образцов проводится в «СФБМИЦ им. академика Е.Н. Мешалкина», результаты вносятся в протокол гистологического исследования операционного материала, забранного при энтартериэктомии из коронарных артерий.

Заполненные протоколы передаются в лабораторию НИИТПМ, ответственную за хранение биоматериала. Результаты гистологических исследований вносятся в базу данных биокolleкции НИИТПМ.

2.2 Ткань для гомогенизации (послеоперационный материал) доставляют в лабораторию специально упакованной с соответствующей маркировкой в термосумках.

2.3 Все процедуры, связанные с гомогенизацией, проводят на холоде.

Гомогенизация проводится с использованием фосфатно-солевого буфера и NaCl 0,9 % и автоматического гомогенизатора. Приготовленный гомогенат аликвотируют в криопробирки или пробирки Эппендорф с помощью пипеточного дозатора.

При подготовке СОП «Получение образцов биологического материала (сыворотки крови / ДНК крови, гомогенаты атеросклеротических бляшек) для исследований» использованы следующие источники:

1 Технологии лабораторные клинические. Обеспечение качества клинических лабораторных исследований. ГОСТ Р 53079.4-2008 Часть 4. Правила ведения преаналитического этапа. М.: Стандартинформ. 2009. 64.

## ПРИЛОЖЕНИЕ В

### Стандартная операционная процедура «Криоархивирование и хранение биологических материалов человека (сыворотка крови, ДНК крови, гомогенаты атеросклеротических бляшек)»

Составлено: Е.В. Каштанова, д.б.н., ст.н.с.

Содержание и назначение: определяет протокол хранения биоматериала (сыворотка крови, ДНК крови, кровь для экстракции ДНК, гомогенаты атеросклеротических бляшек)

Местонахождение: НИИТПМ – филиал ИЦиГ СО РАН

Пересмотр через: 6 месяцев

Стандартная операционная процедура (СОП) «Криоархивирование и хранение биологических материалов человека (сыворотка крови, ДНК крови, гомогенаты атеросклеротических бляшек)» разработана в качестве стандарта для обеспечения качественного процесса хранения биоматериала для коллекции «Коллекция биоматериала (ДНК, сыворотка крови) популяции г. Новосибирска в возрасте 14-70 лет и биоматериала (ДНК, сыворотка крови, гомогенаты атеросклеротических бляшек) мужчин с коронарным атеросклерозом, с сопряженными базами данных, содержащими антропологическую, клиническую, клинико-функциональную информации, результаты генетических и биохимических исследований» НИИТПМ.

Цель разработки стандартной операционной процедуры состоит в разработке этапов фасовки и хранения биологического материала (крови для экстракции ДНК, сыворотки, гомогенатов атеросклеротических бляшек).

В ходе работы мы руководствовались: правилами лабораторной практики (Приложение к Приказу Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 23 августа 2010 г. № 708н) и ГОСТ Р 53434-2009. Принципы надлежащей лабораторной практики. М.: Стандартинформ. – 2010. – 12 с.

Все работы, проводимые в условиях лаборатории должны вестись в соответствии с правилами пожарной безопасности и охраны труда. При работе обеспечиваются условия, предотвращающие заражение персонала инфекционными агентами из первичного биоматериала.

Все оборудование проходит процедуру калибровки сотрудниками лаборатории с периодичностью и с использованием методов, как это указано производителем. Все расходные материалы и реактивы должны иметь соответствующие сертификаты качества и храниться соответственно спецификации.

Контроль выполнения пунктов протокола возлагается на Руководителя работ. Ответственность за выполнение данной процедуры несут все сотрудники, участвующие в исследовании.

Перечень необходимого оборудования и расходных материалов для выполнения стандартной операционной процедуры представлен в таблице В.1.

Таблица В.1 - Перечень необходимого оборудования и расходных материалов

	Наименование	Примечания
1	Криобокс с разделением на 81 ячейку	Криобокс высотой 56 мм, с разделением на 81 ячейку. Интервал температур: -196С до 121С. Размер бокса: 134 мм x 134 мм x 51 мм.
2	Этикетки прямоугольные, 19,05 x 6,35	Этикетки PTL-10-423, прямоугольные, 19,05 x 6,35, 750 эт./рул., Brady, США
3	Этикетки прямоугольные, 25,4 x 12,7	Этикетки THT-59-492-10, прямоугольные, 25,4 x 12,7, 10000 эт./рул., Brady, США
4	Бокс для хранения ДНК	Бокс для хранения ДНК, Storage Box 10x10,140 x 150 x 55 mm
5	Криопробирка 1.8 мл	Криопробирка предназначена для транспортировки и хранения замороженного биологического материала, <u>Thermo Scientific Nunc</u>
6	Наконечники универсальные для дозаторов	Наконечник полимерный одноразовый к дозаторам пипеточным объемом 1000 мкл, голубые, Термо Фишер Сайнтифик, Россия
7	Цветные вкладыши	CRYOCOLORCODE BLUE, CRYOCOLORCODE GREEN, Thermo Scientific
8	Морозильная камера	Морозильная камера ATLANT, Россия
9	Принтер ВВР12	Принтер ВВР12 300dpi, стационарный, до 2500 этикеток в день, с держателем рулонов, с резаком. Brady, США
10	Морозильная камера на -70 °С	Морозильник Sanyo, вертикальный, низкотемпературный, Япония
11	Компьютер	ПО LabelMark 6 Pro, Brady

Возможна замена лабораторного оборудования и расходных материалов на аналогичные, других производителей.

1. После центрифугирования образцов крови научный сотрудник производит фасовку сыворотки крови и маркировку вторичных лабораторных криопробирок или пробирок Эппендорф, используемых для хранения сыворотки крови. С помощью

пипеточного дозатора, индивидуальными сменными наконечниками сыворотку крови из первичных пробирок переносят во вторичные пластиковые криопробирки с цветным вкладышем (емкостью 1,5 или 1,8 мл) или пробирки Эппендорф (емкостью 0,6 или 1,5 мл).

2. Приготовленный гомогенат аликвотируют в пробирки Эппендорф с помощью пипеточного дозатора и индивидуальных одноразовых наконечников.

3. На каждую пробирку приклеивают этикетку со штрих-кодом. Штрих-код формируют заранее, в него входит индивидуальный номер биологического образца (ID) и тип образца (SEили G).

4. Для исследований ДНК крови служит сгусток крови. На каждый вакутейнер приклеивают этикетку со штрих-кодом, содержащим индивидуальный номер и тип образца. По мере необходимости производится выделение ДНК. Образец с ДНК помещается в отдельную пробирку, которая маркируется штрих-кодом.

5. Пробирки с образцами биологического материала должны быть плотно закупорены, маркированы и поставлены в криобоксы с соответствующей маркировкой.

Вакутейнеры со сгустками крови должны быть промаркированы и поставлены в штативы с соответствующей маркировкой.

6. Хранения биологического материала

6.1 Хранения биологического материала (сыворотки крови и гомогенатов) в течение длительных сроков производят путем замораживание образцов биологического материала в специальных низкотемпературных холодильниках при низких температурах — минус 70-80 °С (срок хранения образцов при таких температурах не лимитируется).

6.2 Хранение образцов ДНК

ДНК в растворе 95% раствора спирта можно хранить при -20 °С длительное время без снижения ее качества.

Возможно временно хранить ДНК в растворе 95% спирта при температуре +4 °С без значительного снижения ее качества.

ДНК в спиртовом растворе устойчива к температуре и позволяет транспортировку при комнатной температуре.

Образцы ДНК, растворенной в растворе ТЕ необходимо хранить длительное время при температуре -80 °С.

При работе с ДНК возможно временно хранить образцы ДНК, растворенной в растворе ТЕ при температуре +4 °С без значительного снижения ее качества.

Однако в случае необходимости повторного помещения на длительное хранение необходимо осадить образцы ДНК раствором 95% спирта следующим образом. Добавить

95% спирт этиловый объемом минимум вдвое превышающие объем образца ДНК. Аккуратно перевернуть 3-4 раза пробирку с образцом.

Нерекомендовано многократно замораживать – размораживать образцы ДНК, растворенной в ТЕ. Рекомендуется, при необходимости аликвотировать образец ДНК для работы и для последующего длительного хранения.

7. Все данные об образце вносятся в электронную базу данных.

При подготовке СОП «Криоархивирование и хранение биологических материалов человека (сыворотка крови, ДНК крови, гомогенаты атеросклеротических бляшек)» использованы следующие источники:

1 Технологии лабораторные клинические. Обеспечение качества клинических лабораторных исследований. ГОСТ Р 53079.4-2008 Часть 4. Правила ведения преаналитического этапа. М.: Стандартинформ. 2009. 64.

## ПРИЛОЖЕНИЕ Г

### Стандартная операционная процедура «Контроль температуры в холодильниках и морозильных камерах»

Составлено: Е.В. Каштанова, д.б.н., ст.н.с.

Содержание и назначение: определяет протокол контроля температуры в холодильниках и морозильных камерах.

Местонахождение: НИИТПМ – филиал ИЦиГ СО РАН

Пересмотр через: 6 месяцев

Стандартная операционная процедура (СОП) «Контроль температуры в холодильниках и морозильных камерах» разработана в качестве стандарта для обеспечения качественного хранения биоматериала в морозильных камерах для коллекции «Коллекция биоматериала (ДНК, сыворотка крови) популяции г. Новосибирска в возрасте 14-70 лет и биоматериала (ДНК, сыворотка крови, гомогенаты атеросклеротических бляшек) мужчин с коронарным атеросклерозом, с сопряженными базами данных, содержащими антропологическую, клиническую, клинико-функциональную информации, результаты генетических и биохимических исследований» НИИТПМ.

Цель разработки стандартной операционной процедуры состоит в разработке этапов контроля температуры в холодильниках и морозильных камерах, предназначенных для хранения биологического материала (крови для экстракции ДНК, ДНК крови, сыворотки крови, гомогенатов атеросклеротических бляшек).

Все работы, проводимые в условиях лаборатории должны вестись в соответствии с правилами пожарной безопасности и охраны труда. При работе обеспечиваются условия, предотвращающие заражение персонала инфекционными агентами из первичного биоматериала.

Все оборудование проходит процедуру калибровки сотрудниками лаборатории с периодичностью и с использованием методов, как это указано производителем. Все расходные материалы и реактивы должны иметь соответствующие сертификаты качества и храниться соответственно спецификации.

Контроль выполнения пунктов протокола возлагается на Руководителя работ. Ответственность за выполнение данной процедуры несут все сотрудники, участвующие в исследовании.

Перечень необходимого оборудования и расходных материалов для выполнения стандартной операционной процедуры представлен в таблице Г.1.

Таблица Г.1 – Перечень необходимого оборудования и расходных материалов

	Наименование	Примечания
1	Термометр	Предназначен для измерения температуры внутри холодильных и морозильных камер
2	Журнал	Для записи показаний термометров и дисплея низкотемпературного холодильника, и 2 раза в сутки.

1. Все холодильники и морозильные камеры должны быть пронумерованы. Температура в холодильной камере должна быть выдержана в пределах плюс 4-6 °С, а в морозильной камере бытового холодильника минус 18-20 °С. Контроль температуры осуществляется с помощью термометров. Ответственный за соблюдение температурного режима в холодильнике – младший научный сотрудник.

2. Температура в низкотемпературных морозильных камерах должна быть выдержана в пределах минус 70-80 °С. Контроль температуры осуществляется при помощи встроенного термометра (экран дисплея на холодильнике). На все низкотемпературные камеры должен быть температурный журнал, где записывают показания дисплея соответствующего низкотемпературного холодильника 2 раза в сутки. Ответственный за соблюдение температурного режима в холодильнике – младший научный сотрудник.

3. При срабатывании режима «ALARM» и повышении температурных значений дежурный по институту сообщает об аварийной ситуации заведующему лабораторией и инженеру.

4. Прибывшие сотрудники должны в короткие сроки, не допуская размораживания, перенести биологический материал из сломанного низкотемпературного холодильника в резервный.

## ПРИЛОЖЕНИЕ Д

### Стандартная операционная процедура «Контроль качества и поддержка единиц хранения биологических материалов»

Составлено: Е.В. Каштанова, д.б.н., ст.н.с.

Содержание и назначение: определяет протокол контроля качества хранения биологического материала

Местонахождение: НИИТПМ – филиал ИЦиГ СО РАН

Пересмотр через: 6 месяцев

Стандартная операционная процедура (СОП) «Контроль качества и поддержка единиц хранения биологических материалов» разработана в качестве стандарта для обеспечения контроля качества хранения биоматериала для коллекции «Коллекция биоматериала (ДНК, сыворотка крови) популяции г. Новосибирска в возрасте 14-70 лет и биоматериала (ДНК, сыворотка крови, гомогенаты атеросклеротических бляшек) мужчин с коронарным атеросклерозом, с сопряженными базами данных, содержащими антропологическую, клиническую, клинико-функциональную информации, результаты генетических и биохимических исследований» НИИТПМ.

Цель разработки стандартной операционной процедуры состоит в подборе методов, позволяющих оценить качество хранения биологического материала коллекции.

В ходе работы мы руководствовались: правилами лабораторной практики (Приложение к Приказу Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 23 августа 2010 г. № 708н) и ГОСТ Р 53434-2009. Принципы надлежащей лабораторной практики. М.: Стандартиформ. – 2010. – 12 с.

Все работы, проводимые в условиях лаборатории должны вестись в соответствии с правилами пожарной безопасности и охраны труда. При работе обеспечиваются условия, предотвращающие заражение персонала инфекционными агентами из первичного биоматериала.

Все оборудование проходит процедуру калибровки сотрудниками лаборатории с периодичностью и с использованием методов, как это указано производителем. Все расходные материалы и реактивы должны иметь соответствующие сертификаты качества и храниться соответственно спецификации.

Контроль выполнения пунктов протокола возлагается на Руководителя работ. Ответственность за выполнение данной процедуры несут все сотрудники, участвующие в исследовании.

Перечень необходимого оборудования и расходных материалов для выполнения стандартной операционной процедуры представлен в таблице Д.1.

Таблица Д.1 – Перечень необходимого оборудования и расходных материалов

	Наименование	Примечания
1	Набор для определения вчСРБ, ИФА	hsCRP ELISA, иммуноферментный тест для количественного определения С-реактивного белка в сыворотке крови человека Biomerica, США
2	Наконечники универсальные для дозаторов	Наконечник полимерный одноразовый к дозаторам пипеточным объемом 1000 мкл, голубые, Термо Фишер Сайнтифик, Россия
3	Наконечники универсальные для дозаторов	Наконечник полимерный одноразовый к дозаторам пипеточным объемом 0,5-250 мкл, Термо Фишер Сайнтифик, Россия
4	Пробирки микроцентрифужные типа Эппендорф	Микроцентрифужные пробирки градуированные объемом 1,5 мл, Ахуген, США
5	Плашка для ПЦР	Плашка для ПЦР на 96 лунки короткая юбка, Ахуген, США
6	Пленка для плашки ПЦР	Пленка для плашки ПЦР, полимерная прозрачная, термостойкая, клейкая, Ахуген, США
7	Реакционная смесь для ПЦР	Смесь для ПЦР БиоМастер Таq ПЦР-Color 2x, Диаэм
8	Анализатор Multiscan EX	Планшетный фотометр MULTISKAN EX Thermo, Финляндия
9	Дозатор на 1,0 мл	Автоматическая пипетка 100-1000 мкл Tacta, Thermo
10	Дозатор на 0,1-0,3 мл	Автоматическая пипетка 100-300 мкл Tacta, Thermo
11	Шейкер медицинский	Шейкер медицинский серии S, модель ST-3 предназначен для перемешивания жидкостей при поддержании заданной температуры в иммунологических планшетах, <u>ELMI Ltd.</u>
12	Микропланшетный промыватель	Микропланшетный промыватель Wellwash, Thermo Scientific, Россия
13	Мини-центрифуга-вортекс	Мини-центрифуга-вортекс Микроспин FV-2400, Латвия
14	Дистиллятор ДЭ-10	Аквадистиллятор ДЭ-10М предназначен для производства дистиллированной воды, Россия
15	УФО-бокс	
16	Спектрофотометр	Спектрофотометр автоматический Epoch многофункциональный, BioTek (США).
17	Принтер	Принтер hp Laserjet 1010

Продолжение таблицы Д.1

18	Амплификатор для РТ-ПЦР	Амплификатор для РТ-ПЦР
19	Таймер-секундомер RST	Таймер-секундомер RST, можно устанавливать 4 таймера одновременно.

Возможна замена лабораторного оборудования и расходных материалов на аналогичные, других производителей.

Контроль качества и поддержка единиц хранения биологических материалов (сыворотки крови и гомогенатов) осуществляется на сливной сыворотке и сливном гомогенате.

1. При закладке на хранение биологического материала (сыворотка, гомогенаты) в течение длительных сроков в каждый криобокс вкладывают по 3 (три) пластиковых пробирки (эппендорфа) сливной сыворотки и сливной гомогенат соответственно. Пробирки со сливным материалом находятся в последних трех ячейках криобокса.

2. При хранения биологического материала длительное время осуществляется контроль качества биологического материала. Один раз в полгода сотрудники лаборатории выполняют на сливном материале иммуноферментный анализ (ИФА), определение С-реактивного протеина с использованием стандартных тест систем.

2.1 Процедура проведения анализа

2.1.1 Все реагенты должны достичь комнатной температуры (+18-25 °С) перед использованием.

2.1.2 Образцы сыворотки пациентов и контрольные сыворотки должны быть разведены в 100 раз перед использованием. Для этого готовят серию микроцентрифужных пробирок на 1.5 мл – и смешивают в них по 5мкл образцов сыворотки пациента или контрольной сыворотки и 495 мкл буфера для разведения образцов. Стандарты не разводить.

2.1.3 Поместить требуемое количество стрипов в держатель.

2.1.4 Добавить по 10 мкл каждого не разведенного CRP стандарт, разведенного образца или разведенного контроля в соответствующие ячейки.

2.1.5 Добавить по 100 мкл конъюгата CRP/фермент в каждую лунку.

2.1.6 Тщательно перемешать в течение 30 секунд. Очень важно перемешать полностью.

2.1.7 Инкубировать 45 минут при комнатной температуре +18-25 °С.

2.1.8 Полностью удалить содержимое ячеек в емкость для сбора отходов, промыть лунки микропланшета дистиллированной водой 5 раз на микропланшетном промывателе Wellwash.

2.1.9 Ударьте несколько раз микропланшет над фильтровальной бумагой до полного удаления оставшихся капель воды.

2.1.10 Добавить по 100 мкл раствора субстрата тетраметилбензидина в каждую лунку. Аккуратно перемешать в течение 5 секунд.

2.1.11 Инкубировать 20 минут при комнатной температуре.

2.1.12 Остановить реакцию добавлением 100 мкл стоп-раствора в каждую лунку.

2.1.13 Аккуратно перемешать в течение 30 секунд. Считать оптическую плотность при длине волны 450 нм на планшетном фотометре MULTISKAN EX в течение 15 минут.

3. Данные анализа заносят в журнал «Контроль качества биологического материала».

4. Перед закладкой на хранение образцов ДНК производится измерение концентрации и оценка качества (чистоты) по соотношению белок/ДНК каждого образца и эта информация заносится в базу данных. При выдаче аликвоты образца ДНК рассчитывается её объём исходя из необходимого для исследования количества ДНК и её концентрации. Реакционная способность ДНК проверяется путём постановки пробной ПЦР перед началом исследования. Для оценки степени фрагментации ДНК будет использоваться электрофорез в полиакриламидном или агарозном гелях.

При подготовке СОП «Контроль качества и поддержка единиц хранения биологических материалов» использованы следующие источники:

1 Cray C, Rodriguez M, Zaias J, Altman NH. Effects of storage temperature and time on clinical biochemical parameters from rat serum. // J Am Assoc Lab Anim Sci. 2009. 48(2). 202-4.

2 Иванова С.В., Кирпиченок Л.Н. Флуоресценция, протеолитическая и ингибиторная активность сыворотки крови при хранении и размораживании. // Медико-биологические проблемы жизнедеятельности. 2010. 1(3). 36-41.

3 Фалько О.В., Землянских Н.Г., Липина О.В., Прокопюк О.С. Модификация белков сыворотки плацентарной крови под влиянием низких температур. // Биомедицинская химия. 2013. 59(2). 219-234.

4 Контрольные материалы и критерии качества <http://biokhimija.ru/control-kachestva/kriterii-kachestva>

5 Ребриков Д.В., Саматов Г.А., Трофимов Д.Ю., Семёнов П.А., Савилова А.М., Кофиади И.А., Абрамов Д.Д. Название: ПЦР "в реальном времени" // БИНОМ. Лаборатория знаний. 2009. 223.

## ПРИЛОЖЕНИЕ Е

### Стандартная операционная процедура «Экстракция ДНК из крови»

Составлено: В.Н. Максимов, д.м.н., в.н.с.

Содержание и назначение: определяет протокол выделения ДНК из крови.

Местонахождение: НИИТПМ – филиал ИЦиГ СО РАН

Пересмотр через: 6 месяцев

Стандартная операционная процедура (СОП) «Экстракция ДНК из крови» разработана в качестве стандарта для выделения ДНК из крови коллекции «Коллекция биоматериала (ДНК, сыворотка крови) популяции г. Новосибирска в возрасте 14-70 лет и биоматериала (ДНК, сыворотка крови, гомогенаты атеросклеротических бляшек) мужчин с коронарным атеросклерозом, с сопряженными базами данных, содержащими антропологическую, клиническую, клинико-функциональную информации, результаты генетических и биохимических исследований» НИИТПМ.

Цель разработки стандартной операционной процедуры состоит в разработке этапов экстракция ДНК из крови.

Все работы, проводимые в условиях лаборатории должны вестись в соответствии с правилами пожарной безопасности и охраны труда. При работе обеспечиваются условия, предотвращающие заражение персонала инфекционными агентами из первичного биоматериала.

Все оборудование проходит процедуру калибровки сотрудниками лаборатории с периодичностью и с использованием методов, как это указано производителем. Все расходные материалы и реактивы должны иметь соответствующие сертификаты качества и храниться соответственно спецификации.

Контроль выполнения пунктов протокола возлагается на Руководителя работ. Ответственность за выполнение данной процедуры несут все сотрудники, участвующие в исследовании.

Перечень необходимого оборудования и расходных материалов для выполнения стандартной операционной процедуры представлен в таблице Е.1.

Таблица – Е.1 Перечень необходимого оборудования и расходных материалов

	Наименование	Примечания
1	Авт. пипетка 1-10 мкл	Автоматическая пипетка 1-10 мкл Pipetman P10G
2	Авт. пипетка 10-100 мкл	Автоматическая пипетка 10-100 мкл Pipetman P100L

Продолжение таблицы Е.1

3	Авт. пипетка 100-1000 мкл	Автоматическая пипетка 100-1000 мкл Pipetman L P1000L
4	Термостат твердотельный	Термостат твердотельный с таймером ТТ-2 "Термит"
5	Гельдокументирующая система	Гельдокументирующая система Infiniti VX2 1120/Blue X-Press Vilber Lourmat
6	Спектрофотометр	Спектрофотометр автоматический Epoch многофункциональный, BioTek (США).
7	Вертикальная камера для электрофореза	Вертикальная камера для электрофореза VE-20(Россия)
8	Дистиллятор из нерж.стали	Лабораторный аквадистиллятор из нержавеющей стали GFL-2004, Германия
9	Микроцентрифуга-вортекс	Лабораторная микроцентрифуга-вортекс Микроспин FV-2400, BioSan, Латвия
10	Многофункциональный планшет	Многофункциональный планшет TAKE3предназначен для быстрого измерения образцов ДНК и РНК, а также количественного исследования белка.
11	Морозильник Саратов-104	Морозильник Саратов-104 (МКШ-300), Россия
12	Центрифуга	Лабораторная центрифуга CM-6MT для пробирок и вакутейнеров, ELMI, Латвия
13	Центрифуга	Центрифуга для микропробирок MiniSpin, Латвия
14	Мешалка магнитная	Мешалка магнитная MSH-300 с подогревом, Biosan, Латвия
15	Весы	Лабораторные весы PA213C (Ohaus), предназначены для взвешивания образцов с максимальной массой 210 г
16	Микроцентрифужные пробирки типа Эппендорф	Микроцентрифужные пробирки градуированные объемом 0,6 мл (Axugen, США),
17	Пробирки, 10 мл	Пробирки цилиндрические, круглодонные, из полипропилена
18	Микроцентрифужные пробирки типа Эппендорф	Микроцентрифужные пробирки градуированные объемом 1,5 мл, Axugen
19	SDS	Натрий додецилсульфат (SDS), 85,0 %, Pharm grade, Panreac
20	Фенол	осч, Россия
21	Изопропиловый спирт	осч, Россия
22	Трис	Трис(гидроксиметил)аминометан, (Trizma base SigmaUltra)
23	Протениаза	Протеаза из Aspergillus saitoi (Sigma P2143), 25 g
24	Хлороформ	осч, Россия
25	Этиловый спирт	Медицинский. Россия

Возможна замена лабораторного оборудования и расходных материалов на аналогичные, других производителей.

Перед проведением выделения ДНК из крови необходимо приготовить основные растворы:

Буфер А: 0.01 M Tris-HCl pH 7.5,	20мл 1M Tris-HCl, pH=7,5	}	2 л
10 mM NaCl,	4мл 5M NaCl		
3 mM MgCl <sub>2</sub>	6мл 1M MgCl <sub>2</sub>		
Буфер В: 0.05M Tris-HCl, pH=8.0	5мл 1M Tris-HCl, pH=8.0	}	100 мл
100 mM NaCl,	2мл 5M NaCl		
10 mM EDTA	2мл 0,5M EDTA		

2× протеиназа (40 мг протеиназы растворить в 1 мл бидистиллированной воды или 60мг в 1,5мл) – 2 часа при +37 °С;

Смесь фенол-хлороформ (1:1);

Хлороформ (480 мл хлороформа добавить 20 мл изоамилового спирта).

Выделение ДНК из крови (1 день)

1. Для проведения работы необходимо приготовить 5% раствор хлорамина, фильтровальную бумагу, перчатки, спирт, вату, штативы для пробирок.

2. Штатив с вакуумными пробирками замороженной крови поставить на рабочий стол и оставить их на 60 мин при комнатной температуре до полного размораживания крови. Не допускается ставить пробирки с кровью рядом с нагревательными приборами, под прямыми лучами солнца. Переписать в журнал номера с пробирок под определенным номером, подписать порядковый номер на пробирке и на крышках. Перенести кровь в гомогенизатор, добавить при необходимости небольшое количество буфера А, хорошо растереть, слить пробу в пробирку для центрифугирования.

3. В пробирки объемом 10мл с кровью долить буфер А ~ за 1,5 см до верха, закрыть пробирку крышкой, перемешать.

4. Центрифугирование 25 мин. при 4000 об./мин.

5. Слить надосадочную жидкость в хлорамина (осадок должен быть на дне), добавить в каждую пробирку буфер А, закрыть крышкой, хорошо перемешать.

6. Центрифугирование 20 мин. при 4000 об./мин. Повторить пункты 2.5. и 2.6. 2-3 раза.

7. Слить надосадочную жидкость в хлорамина.

8. Добавить к осадку: а) 1900 мкл буфера В; б) 50 мкл 20% SDS; в) 80 мкл 2× протеиназы (40 мг/ml).

9. Хорошо разбить осадок на шейкере и закрыть пробирки крышками.

10. Штатив с пробирками помещаем в термостат при температуре +56 °С на ночь для лизиса.

Произвести уборку рабочего места с применением дезинфицирующих средств. Использованные пробирки, наконечники для дозаторов и медицинские перчатки, помещаются в биологически безопасный контейнер с дезинфицирующим раствором. Обработать рабочую поверхность 70% спиртом и протереть одноразовым полотенцем. Включить УФ бактерицидную лампу на 10 минут.

Выделение ДНК из крови (2 день)

11. Приготовить: раствор щелочи и порошка в воде, фильтровальную бумагу, новые пробирки 10 мл, новые наконечники, емкость «слив фенола» (туда фенол, фенол-хлороформ), емкость «слив органики» (туда изопропиловый спирт, хлороформ).

12. Добавить в каждую пробирку по 400 мкл 5М NaCl (1:5 V) не более 1М в смеси.

13. Добавить по 3 мл фенола, закрыть пробирки, перемешать до однородной массы.

14. Центрифугирование 25 мин. при 4000об./мин.

15. Отобрать пипеткой верхнюю водную фазу в отдельную подписанную пробирку (по возможности не захватывая интерфазу), фенол – в слив, пробирку – в раствор щелочи.

16. Добавить по 3 мл смеси фенол-хлороформ (1:1), закрыть пробирки, перемешать до однородной массы.

17. Центрифугирование 20 мин. при 4000 об./мин.

18. Отобрать пипеткой верхнюю водную фазу в отдельную подписанную пробирку (по возможности не захватывая интерфазу), фенол-хлороформ – в слив, пробирку – в раствор щелочи (если интерфаза рыхлая – еще раз экстракция смесью фенол-хлороформ).

19. Добавить по 3 мл хлороформа, закрыть пробирки, перемешать до однородной массы.

20. Центрифугирование 10 мин. при 4000 об./мин.

21. В подписанные новые 10 мл пробирки добавить по 2.5 мл изопропилового спирта, затем верхнюю фазу (хлороформ – в слив). Аккуратно перемешать (встряхиванием) до образования клубочка.

22. Поставить в морозильную камеру (–20 °С) на 1 час.

23. Центрифугирование 15 мин. при 4000 об./мин.

24. Изопропиловый спирт – в слив; промыть (от соли) 3 раза 75% этиловым спиртом (добавить по 3 мл, центрифугирование 10-15 мин. при 4000 об./мин, этанол – слить в раковину).

25. Слить этиловый спирт; открытую пробирку сушить при комнатной температуре (ночь) или при +56 °С до высыхания.

26. Растворить осадок в 600 мкл ddH<sub>2</sub>O и оставить на сутки при +4 °С; затем перемешать на шейкере и перенести в 1,5 мл пробирку.

27. Полученные образцы маркируют согласно СОП2. Хранить при температуре не выше –20 °С.

При подготовке СОП «Экстракция ДНК из крови» использованы следующие источники:

1 К. Смит, С. Калко, Ч. Кантор. Пульс-электрофорез и методы работы с большими молекулами ДНК // Анализ генома / Под ред. К. Дейвиса; пер. с англ. М.: Мир. 1990. 58–94.

## ПРИЛОЖЕНИЕ Ж

### Стандартная операционная процедура «Идентификация и характеристика биологического материала человека»

Составлено: Е.В. Каштанова, д.б.н., ст.н.с.

Содержание и назначение: определяет протокол по идентификации и характеристике биологического материала человека

Местонахождение: НИИТПМ – филиал ИЦиГ СО РАН

Пересмотр через: 6 месяцев

Стандартная операционная процедура (СОП) «Идентификация и характеристика биологического материала человека» разработана в качестве стандарта для обеспечения быстрой идентификации биоматериала коллекции «Коллекция биоматериала (ДНК, сыворотка крови) популяции г. Новосибирска в возрасте 14-70 лет и биоматериала (ДНК, сыворотка крови, гомогенаты атеросклеротических бляшек) мужчин с коронарным атеросклерозом, с сопряженными базами данных, содержащими антропологическую, клиническую, клинико-функциональную информации, результаты генетических и биохимических исследований» НИИТПМ.

Цель разработки стандартной операционной процедуры состоит в получении быстрой информации о криоархивированном материале коллекции.

Все работы, проводимые в условиях лаборатории должны вестись в соответствии с правилами пожарной безопасности и охраны труда. При работе обеспечиваются условия, предотвращающие заражение персонала инфекционными агентами из первичного биоматериала.

Все оборудование проходит процедуру калибровки сотрудниками лаборатории с периодичностью и с использованием методов, как это указано производителем.

Контроль выполнения пунктов протокола возлагается на Руководителя работ. Ответственность за выполнение данной процедуры несут все сотрудники, участвующие в исследовании.

Перечень необходимого оборудования и расходных материалов для выполнения стандартной операционной процедуры представлен в таблице Ж.1.

Таблица Ж.1 – Перечень необходимого оборудования

	Наименование	Примечания
1	Сканер штрих-кода	Ручной сканер штриховых кодов, 2D
2	Компьютер	ПО LabelMark 6 Pro, Brady

Возможна замена лабораторного оборудования на аналогичные, других производителей.

1. Каждая пробирка промаркирована индивидуальным номером, соответствующим определенному типу биологического образца. При идентификации биологического материала человека необходимо сканером считать штрих-код с пробирки с биологическим материалом (сыворотка, гомогенат ткани, ДНК).

2. Определить положение идентификационного номера в базе данных.