

## НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЕ МЕТОДИКИ И ТЕХНОЛОГИИ, РЕАЛИЗУЕМЫЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ УНУ

### **Биобанкирование:**

- сбор образцов крови, тканей, культур клеток, нуклеиновых кислот и др.;
- аликвотирование биообразцов;
- криохраниение биообразцов (-80°C и -196°C).

### **Автоматическое и ручное выделение нуклеиновых кислот (ДНК и РНК) из любого биологического материала, включая:**

- цельную кровь;
- плазму крови;
- буккальный эпителий;
- различные ткани организма.

### **NGS-секвенирование:**

- секвенирование генома человека и других организмов;
- секвенирование экзона человека;
- секвенирование транскриптома (мРНК и микроРНК).

### **ПЦР-анализ:**

- PCR;
- RT-PCR;
- электрофорез.

### **Многопараметрическая проточная цитометрия:**

- анализ жизнеспособности клеток;
- фенотипирование лимфоцитов крови;
- типирование других клеток организма.

### **Работа с базами данных и коллекциями биообразцов:**

- предоставление информации о наличии биообразцов с определенными признаками;
- хранение медицинской и лабораторной информации о биообразцах;
- обмен сведениями о биообразцах между биобанками и медицинскими организациями.

### **1 – Биобанкирование**

Биобанкирование представляет собой процесс сбора, обработки, хранения и анализа биологических материалов, необходимых для научно-исследовательской и практической деятельности. Основная задача заключается во внедрении в клиническую практику инновационных диагностических инструментов и развитии персонализированного подхода в лечении различных заболеваний. Первичная обработка и хранение биообразцов осуществляется с использованием широкого спектра предназначенных для подобных манипуляций приборов: Боксов биологической безопасности 2 класса безопасности SC2-

4A1, ESCO, Боксов абактериальной воздушной среды с подставкой Ламинар С, Морозильников лабораторных DW 86L288, Haier и Sanyo MDF U333, Систем хранения биообразцов в парах жидкого азота, гомогенизаторов, холодильников и др. Полученная после анализа биоматериала информация хранится в созданных электронных базах данных и Регистрах пациентов с определенными заболеваниями.

## 2 – Выделение ДНК и РНК из биообразцов

- *Спектрофотометр Thermo Scientific NanoDrop 2000*

*Производитель:* Thermo Scientific, США.

*Сайт:* <http://www.nanodrop.com/Productnd2000overview.aspx>

Пробоподготовка и выделение нуклеиновых кислот из биообразцов производится с использованием специальных наборов для выделения ДНК (РНК).

Спектрофотометр для микрообъемов Thermo Scientific NanoDrop 2000 предназначен для определения спектра поглощения препарата в диапазоне длин волн 190-840 нм. Прибор с запатентованной системой удержания образца, позволяет проводить измерения в объемах 0,5-2,0 мкл, при этом измерение производится непосредственно в капле жидкости, без использования кювет. Предел детекции составляет 2нг/мкл (ДНК), при максимальной возможной концентрации 15000 нг/мкл (ДНК). Прибор производит измерения в растворах. Для точного измерения концентраций изучаемых веществ образцы должны быть очищены от примесей, поглощающих волны той же длины, что и искомые вещества.

*Основные характеристики:*

Минимальный размер образца	0,5 мкл
Количество образцов	1
Длина пути	1 мм (авто-подбор до 0,05 мм)
Источник света	Ксеноновая импульсная лампа
Тип детектора	2048-элементная линейная кремниевая ПЗС-матрица
Спектральный диапазон измерения	190 - 840 нм
Точность установки длины волны	1 нм
Спектральное разрешение	≤ 1,8 нм
Фотометрическая случайная ошибка	0,002 единиц оптической плотности
Фотометрическая систематическая ошибка	3%
Фотометрический диапазон измерения	0,04 - 300 (10мм эквивалент)
Предел детекции	2 нг/мкл (2нДНК)
Максимальная концентрация	15000 нг/мкл (2нДНК)
Время измерения	< 5 секунд
Управление с персонального компьютера	да
Специализированное программное обеспечение для обработки результатов измерений	да
Возможность создания в памяти пользовательских протоколов измерений	да

- *Автоматизированная система капиллярного электрофореза Fragment Analyzer (Advanced Analytical)*

Производитель: Advanced Analytical, США.

Сайт: <https://www.epfl.ch/research/facilities/gene-expression-core-facility/page-112636-en-html/page-112646-en-html/>

Система *Fragment Analyzer*™ - это прибор для капиллярного электрофореза, предназначенный для проведения автоматического высокоэффективного разделения и количественного анализа нуклеиновых кислот (ДНК / РНК), включая геномную ДНК, малые РНК, свободноциркулирующую ДНК, большие фрагменты ДНК и общую РНК, ПЦР-ампликоны, NGS-библиотеки.

*Fragment Analyzer*™ идеально подходит для рабочего процесса по контролю качества библиотек для секвенирования следующего поколения (NGS QC) и позволяет осуществлять:

- Контроль качества библиотек для NGS (100-6000 п.о.) и фрагментов ДНК (50 до 1500 п.о.)
- Качественный и количественный анализ библиотек для NGS с длинным прочтением (до 50 т.п.о.)
- Контроль качества гДНК для полногеномного секвенирования, метагеномики и анализа больших структурных вариантов (от 75 п.о. до 60 т.п.о.)
- Контроль качества мРНК, общей РНК и транскрибированной *in vitro* РНК для кПЛР, NGS, анализа микроматриц и Western Blot.

Приборы *Fragment Analyzer*™ является эффективным решением для анализа микросателлитов и других повторяющихся последовательностей ДНК, фрагментов рестрикции, ПЦР-ампликонов и т.д.

Особенности *Fragment Analyzer*™:

- Разделение до 96 образцов одновременно в течение 15 минут
- Получение четких фрагментов с разницей в размере до 3 п.о.
- Доступные капилляры различной длины - 22, 33, 55 см
- Автоматизированный анализ данных в простом программном обеспечении PROSize™

### 3 – NGS-секвенирование

*Система высокопроизводительного полногеномного секвенирования MiSeq Sequencing System, с дополнительными принадлежностями.*

Производитель: Illumina, США.

Сайт: <http://www.illumina.com/systems/miseq.html>

Прибор предназначен для осуществления высокопроизводительного секвенирования большого количества нуклеотидных последовательностей геномов живых организмов, в том числе человека (секвенирования ДНК).

*Основные характеристики:*

Illumina MiSeq Sequencing System мощная и эффективная высокопроизводительная система для секвенирования. Использование данного прибора позволяет быстро получить результаты высокого качества с большой длиной прочтения ДНК. В одном компактном

инструменте все необходимое оборудование для осуществления анализа последовательности ДНК: модуль для генерации кластеров, модуль для парноконцевого секвенирования и модуль для анализа и хранения полученных данных. Встроенный в прибор компьютер и программное обеспечение позволяют выполнять вторичный анализ данных секвенирования. Основные задачи: секвенирование de-novo и ресеквенирование малых геномов, метагеномные исследования, секвенирования целевых клинических панелей и клинических экзомов, определение профилей экспрессии активных генов и целевых групп генов. Одновременный анализ до 96 образцов за запуск. Эффективный анализ ампликонов: 384 ампликона на образец, 36 864 ампликона за запуск.

Длина читаемого фрагмента	Общее время, необходимое для амплификации кластеров и секвенирования	Производительность
2 x 25 п.н.	~4,5 часа	250 – 350 Мб
2 x 100 п.н.	~19 часов	1,0– 1,4 Gb
2 x 150 п.н.	~27 часов	1,5– 2,0 Gb
2 x 250 п.н.	~36 часов	6,0– 8,0 Gb
Количество кластеров	5,0– 7,0 миллионов высококлассных отфильтрованных кластеров при длине читаемого фрагмента 2 x 150 п.н. До 15,0 миллионов высококлассных отфильтрованных кластеров при длине читаемого фрагмента 2 x 250 п.н.	
Качество неотфильтрованных данных	>90% оснований качества Q30 при 2 x 25 п.н. >85% оснований качества Q30 при 2 x 100 п.н. >80% оснований качества Q30 при 2 x 150 п.н. >75% оснований качества Q30 при 2 x 250 п.н.	

#### 4 – ПЦР-анализ

*Амплификатор StepOne Plus Real-Time ПЦР система 96 лунок, 4 канала детекции*

*Производитель:* Applied Biosystems™ (Thermo Scientific), США

*Сайт:* <https://www.fishersci.com/shop/products/steponeplus-real-time-pcr-system-7/4376600>

Система ПЦР в режиме реального времени StepOnePlus™ представляет собой 96-луночный ПК-инструмент реального времени. Используя надежную светодиодную 4-цветную оптическую запись, система PCO в режиме реального времени StepOnePlus™ предназначена для предоставления точных количественных результатов ПЦР в реальном времени для различных применений геномных исследований.

Амплификатор в реальном времени StepOnePlus™ включает:

- Расширенное программное обеспечение и инструменты для выполнения широкого спектра геномных анализов;

- Чувствительная 4-цветная оптическая светодиодная система записи;
- Интуитивное и надежное программное обеспечение;
- Простая и гибкая настройка и использование инструментов.

Программное обеспечение StepOne™, входящее в состав системы StepOnePlus™ Real-Time PCR, работает в операционной системе Windows® XP и обеспечивает возможности управления инструментами, сбора данных и анализа данных. Чувствительная 4-х цветовая флуоресценция в системе ПЦР StepOnePlus™ в реальном времени может регистрировать флуоресценцию от FAM™ / SYBR® Green, VIC® / JOE™, NED™ / TAMRA™, и красителя ROX™. Эта экономичная, 4-цветная, 96-луночная система обеспечивает точные, количественные результаты ПЦР в реальном времени и сохраняет данные от всех фильтров в каждом прогоне, не завися от настройки компьютера или пластины. Она может различать 2 популяции от 5000 до 10000 копий шаблона теста TaqMan® с точностью 99,7%.

Система ПЦР в режиме реального времени StepOnePlus™ позволяет проводить:

- Анализ однонуклеотидных замен;
- Количественный анализ НК;
- Анализ экспрессии генов.

ПЦР-анализ в реальном времени может быть также проведен с использованием Амплификатора Corbett Research Qiagen Rotor Gene PG-6000 Real-Time PCR 5-PLEX + HRM. Термоциклер с детекцией результатов в режиме реального времени также используется для определения точечных мутаций, концентрации генетически-модифицированных ингредиентов, оценка уровня экспрессии генов.

## **5 – Многопараметрическая проточная цитометрия**

*Высокочувствительная система мультицветного анализа клеток, проточный цитометр MACSQuant Analyzer 10 Miltenyi Biotec*

*Производитель: Miltenyi Biotec, Германия*

*Сайт: <https://www.miltenyibiotec.com/US-en/products/macsquant-analyzer-10.html>*

MACSQuant® Analyzer 10 - универсальный и мощный прибор, соответствующий стандартам современной проточной цитометрии. Клеточный анализатор оборудован проточной кюветой и тремя лазерами, что делает возможным детекцию сигнала по двум каналам светорассеяния и семи каналам флуоресценции. Также анализатор обладает возможностью абсолютного подсчета клеток в образце (волюметрический метод). Прибор оснащен сканером штрих-кодов, роботизированным пробоотборником, системой визуальной сигнализации статуса прибора, сенсорным экраном, клавиатурой, круглосуточной системой удаленной поддержки пользователя (при наличии доступа в Интернет).

Области применения:

- Стандартное фенотипирование клеток крови;
- Высокопроизводительный анализ генотоксичности;
- Анализ эндогенных лигандов NKT-клеток;
- Магнитное обогащение антиген-специфичных CD4+ T-клеток;
- Анализ редких популяций клеток.

*Основные характеристики:*

<b>Оптика</b>		
	Лазеры	Разделены в пространстве 405 нм, 40 мВт 488 нм, 30 мВт 640 нм, 20 мВт
	Каналы детекции	«FSC: 488/10 нм SSC: 488/10 нм V1: 450/50 нм V2: 525/50 нм B1: 525/50 нм B2: 585/40 нм B3: 655–730 нм B4: 750 нм LP R1: 655–730 нм R2: 750 нм LP»
	Чувствительность и разрешение флуоресценции	MESFs (CV <5%): FITC <200 PE <100 APC <150
	Размеры проточной ячейки	200×250 мкм
	Детекторы флуоресценции	ФЭУ с оптимизированным спектром для каждого канала детекции
<b>Флюидика</b>		
	Минимальный объем отбираемой пробы [1]	1 мкл (25 мкл для волуметрических экспериментов)
	Объемная скорость потока образца	25, 50 или 100 мкл/мин на выбор или автоподстройка под заданную скорость сбора данных (500, 1000 или 2000 соб./с)
	Скорость сбора данных [2,3]	<25 мин на 96-луночный планшет (пробы по 5 мкл с лунки)
	Объем отбираемой пробы	1–450 мкл
	Максимальная скорость сбора данных	До 15,000 событий в секунду
<b>Обработка данных</b>		
	Анализ флуоресценции	Диапазон сигнала — 5 порядков, отображается в линейной, логарифмической и полулогарифмической (hlog) шкалах

	Формат файлов с данными	.mqd (внутренний формат), .fcs (совместим с версиями 2.0, 3.0, 3.1)
--	-------------------------	--

Совместно с MACSQuant Analyzer 10 для анализа клеток могут быть использованы:

- *Микропланшетный мультidetектор SpectraMax i3 Molecular Devices (США)*

Микропланшетный мультidetектор SpectraMax i3 является универсальной платформой для проведения анализов оптической плотности, флуоресценции и люминесценции в формате многолуночных микропланшет (6 – 1536 лунок). В дополнение к стандартным исследованиям система SpectraMax i3 позволяет проводить вестерн блот анализ, а также визуализировать живые клетки, оценивая показатели выживаемости и цитотоксичности в режиме реального времени.

- *Анализатор жизнеспособности клеток BioRad TC10 (США)*

Счётчик клеток TC10 позволяет проводить полуавтоматический подсчёт количества клеток. Инновационная технология автофокуса и улучшенный алгоритм подсчета позволяют получить точные и воспроизводимые результаты всего через 30 секунд после загрузки. Прибор работает со специализированными слайдами. Прибор способен дифференцировать живые и мёртвые клетки с использованием красителя трипанового синего и показывать соотношение их количеств.

## **6 – Работа с базами данных и коллекциями биообразцов**

В спектр работ по данному направлению входит предоставление информации о наличии в базах информации по анализу биообразцов с определенными признаками; хранение медицинской и лабораторной информации о биообразцах; обмен сведениями о биообразцах между биобанками и медицинскими организациями.

В созданных базах данных хранится информация о первичных результатах, полученных при реализации научно-исследовательских проектов (архивные данные NGS, PCR и др.). В разработанных Регистрах – обработанные (аннотированные) данные пациентов.

## Перечень имеющихся методик и методов прогнозирования УНУ

### Модели машинного обучения

<b>Модель</b>	<b>Метрики</b>
Прогнозирование развития ССЗ в течение 10 лет	ACCURACY 80% AUC 0,83
Прогнозирование смерти от ИБС и инсульта в течение 10 лет	ACCURACY 85% AUC 0,83
Прогнозирование осложнений у пациентов с сахарным диабетом 2 типа в течение 10 лет	ACCURACY 86-96% AUC 0,60-76
Прогнозирование потери зрения от диабетической ретинопатии в течение 4-х лет	ACCURACY 91% AUC 0,89
Прогнозирование летального исхода от ССЗ у пациентов с сахарным диабетом 2 типа в течение 7 лет	ACCURACY 70% AUC 0,71
Прогнозирование развития ССЗ у пациентов с сахарным диабетом 2 типа в течение 7 лет	ACCURACY 71-97% AUC 0,71-0,88
Модель предсказания хронических и острых заболеваний по жалобам пациентов (Симптомчекер)	PRECISION 0.78 RECALL 0.85
Прогнозирование обращения пациента за медицинской помощью в течение ближайших 12 месяцев	ACCURACY 78-85% AUC 0,86-0,89
Модель извлечения признаков объективных данных пациентов из медицинских записей	PRECISION 97% F1 98%
Модель извлечения признака "табакокурения" из текстов медицинских записей	PRECISION 88% F1 98%
Извлечение лабораторных признаков и их значений из медицинских записей	PRECISION 91% F1 89%
Извлечение симптомов COVID-19 из медицинских записей	PRECISION 93% F1 92%