

Министерство образования и науки Российской Федерации
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ТОМСКИЙ ПОЛИТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»



Институт физики высоких технологий
 Направление подготовки 19.04.01. Биотехнология
 Кафедра биотехнологии и органической химии

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Тема работы
Анализ методов выделения ДНК для определения микробиотического сообщества в различных биологических средах

УДК 577.113/602.6

Студент

Группа	ФИО	Подпись	Дата
4ДМ41	Майрамбекова Махабат Майрамбековна		02.06.16

Руководитель

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент	Першина А.Г.	к.б.н., доцент		02.06.16

КОНСУЛЬТАНТЫ:

По разделу «Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение»

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Ассистент	Грахова Е.А.			27.05.16

По разделу «Социальная ответственность»

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Профессор кафедры ЭБЖ ИНК	Ахмеджанов Р.Р.	д.б.н., профессор		16.05.16

ДОПУСТИТЬ К ЗАЩИТЕ:

Зав. кафедрой	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Профессор	Краснокутская Е.А.	д.х.н., профессор		02.06.16

Томск – 2016

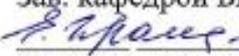
Планируемые результаты обучения
по ООП 19.04.01 «Биотехнология» (магистр)
профиль «Биотехнология»

Код результата	Результат обучения (выпускник должен быть готов)
<i>Профессиональные компетенции</i>	
P1	Профессионально эксплуатировать современные биотехнологические производства, обеспечивая их высокую эффективность и безопасность
P2	Разрабатывать и внедрять новые биотехнологические процессы и оборудование в рамках проектирования новых и усовершенствования действующих производств
P3	Проводить теоретические и экспериментальные исследования в различных областях прикладной биотехнологии
<i>Универсальные компетенции</i>	
P4	Ставить и решать задачи инженерного анализа для создания инновационных биотехнологических процессов и продуктов
P5	Эффективно организовывать и участвовать в работе коллективов, в том числе международных, демонстрировать ответственность за результаты инженерной деятельности
P6	Демонстрировать глубокие знания социальных, этических и правовых аспектов инновационной инженерной деятельности, компетентность в вопросах устойчивого развития
P7	Постоянно повышать интеллектуальный и общекультурный уровень и профессиональную квалификацию, способствовать обучению персонала

Министерство образования и науки Российской Федерации
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ТОМСКИЙ ПОЛИТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»



Институт физики высоких технологий
 Направление подготовки (специальность) 19.04.01. Биотехнология
 Кафедра биотехнологии и органической химии

УТВЕРЖДАЮ:
 Зав. кафедрой БИОХ
 Краснокутская Е.А.
 (Подпись) (Дата) (Ф.И.О.)

ЗАДАНИЕ
на выполнение выпускной квалификационной работы

В форме:

магистерской диссертации

(бакалаврской работы, дипломного проекта/работы, магистерской диссертации)

Студенту:

Группа	ФИО
4ДМ41	Майрамбекова Махабат Майрамбековна

Тема работы:

Анализ методов выделения ДНК для определения микробиотического сообщества в различных биологических средах
--

Утверждена приказом директора (дата, номер)	№3085/с от 25.04.2016 г.
---	--------------------------

Срок сдачи студентом выполненной работы:	06.06.2016 г.
--	---------------

ТЕХНИЧЕСКОЕ ЗАДАНИЕ:

<p>Исходные данные к работе</p> <p><i>(наименование объекта исследования или проектирования; производительность или нагрузка; режим работы (непрерывный, периодический, циклический и т. д.); вид сырья или материал изделия; требования к продукту, изделию или процессу; особые требования к особенностям функционирования (эксплуатации) объекта или изделия в плане безопасности эксплуатации, влияния на окружающую среду, энергозатратам; экономический анализ и т. д.).</i></p>	<p>Объектом исследования являются биологические образцы мокроты, орофарингеальных мазков больных хронической обструктивной болезнью легких.</p>
---	---

<p>Перечень подлежащих исследованию, проектированию и разработке вопросов</p> <p><i>(аналитический обзор по литературным источникам с целью выяснения достижений мировой науки техники в рассматриваемой области; постановка задачи исследования, проектирования, конструирования; содержание процедуры исследования, проектирования, конструирования; обсуждение результатов выполненной работы; наименование дополнительных разделов, подлежащих разработке; заключение по работе).</i></p>	<p>Определение состава микробиотического сообщества в различном биологическом материале больных ХОБЛ (Обзор литературы) Объект и методы исследования Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение Социальная ответственность Результаты проведенного исследования Выводы</p>
--	--

<p>Перечень графического материала</p> <p><i>(с точным указанием обязательных чертежей)</i></p>	
--	--

Консультанты по разделам выпускной квалификационной работы

Раздел	Консультант
«Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение»	Грахова Е.А.
«Социальная ответственность»	Ахмеджанов Р.Р.
«Methods of the study microbial communities»	Сумцова О.В.

Названия разделов, которые должны быть написаны на русском и иностранном языках:

Раздел «Методы изучения микробиотического сообщества»

Дата выдачи задания на выполнение выпускной квалификационной работы по линейному графику	14.03.2016
--	------------

Задание выдал руководитель:

Должность	ФИО	Учебная степень, звание	Подпись	Дата
Доцент	Першина А.Г.	к.б.н., доцент		15.02.16

Задание принял к исполнению студент:

Группа	ФИО	Подпись	Дата
4ДМ41	Майрамбекова Махабат Майрамбековна		16.02.16

**ЗАДАНИЕ ДЛЯ РАЗДЕЛА
«ФИНАНСОВЫЙ МЕНЕДЖМЕНТ, РЕСУРСОЭФФЕКТИВНОСТЬ И
РЕСУРСОСБЕРЕЖЕНИЕ»**

Студенту:

Группа	ФИО
4ДМ41	Майрамбекова Махабат Майрамбековна

Институт	ИФВТ	Кафедра	БИОХ
Уровень образования	Магистратура	Направление/специальность	Биотехнология

Исходные данные к разделу «Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение»:

1. <i>Стоимость ресурсов научного исследования (НИ): материально-технических, энергетических, финансовых, информационных и человеческих</i>	При проведении исследования используется база лабораторий ЦНИЛ СибГМУ; в исследовании задействованы 2 человека: студент-исполнитель и научный руководитель.
2. <i>Нормы и нормативы расходования ресурсов</i>	В соответствии с ГОСТ 14.322-83 «Нормирование расхода материалов» и ГОСТ Р 51541-99 «Энергосбережение. Энергетическая эффективность»
3. <i>Используемая система налогообложения, ставки налогов, отчислений, дисконтирования и кредитования</i>	Отчисления по страховым взносам – 30% от ФОТ

Перечень вопросов, подлежащих исследованию, проектированию и разработке:

1. <i>Оценка коммерческого потенциала, перспективности и альтернатив проведения НИ с позиции ресурсоэффективности и ресурсосбережения</i>	Определение концепции проекта, анализ основных критериев сравнения, экспертная оценка эффективности, SWOT-анализ
2. <i>Планирование и формирование бюджета научных исследований</i>	Определение трудоемкости выполнения работ, разработка графика проведения НИ, расчет материальных затрат НИ
3. <i>Определение ресурсной (ресурсосберегающей), финансовой, бюджетной, социальной и экономической эффективности исследования</i>	Оценка сравнительной эффективности исследования, определение перспективности, целесообразности научного исследования с точки зрения ресурсоэффективности.

Перечень графического материала (с точным указанием обязательных чертежей):

1. <i>Оценка конкурентоспособности технических решений</i>
2. <i>Матрица SWOT</i>
3. <i>Альтернативы проведения НИ</i>
4. <i>График проведения и бюджет НИ</i>

Дата выдачи задания для раздела по линейному графику	
--	--

Задание выдал консультант:

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Ассистент	Грахова Е.А.			29.04.16

Задание принял к исполнению студент:

Группа	ФИО	Подпись	Дата
4ДМ41	Майрамбекова Махабат Майрамбековна		29.04.16

**ЗАДАНИЕ ДЛЯ РАЗДЕЛА
«СОЦИАЛЬНАЯ ОТВЕТСТВЕННОСТЬ»**

Студенту:

Группа	ФИО
4ДМ41	Майрамбекова Махабат Майрамбековна

Институт	ИФВТ	Кафедра	БИОХ
Уровень образования	Магистратура	Направление/специальность	Биотехнология

Исходные данные к разделу «Социальная ответственность»:

1. Характеристика объекта исследования (вещество, материал, прибор, алгоритм, методика, рабочая зона) и области его применения	<p><i>Объект исследования - образцы мокроты, орофарингеальной мазки и фекалий у пациентов, больных ХОБЛ, а также здоровых людей.</i></p> <p><i>Рабочая зона - молекулярно-биологическая лаборатория</i></p> <p><i>Область применения - медицина</i></p>
--	---

Перечень вопросов, подлежащих исследованию, проектированию и разработке:

<p>1. Производственная безопасность</p> <p>1.1. Анализ выявленных вредных факторов при разработке и эксплуатации проектируемого решения в следующей последовательности:</p> <ul style="list-style-type: none"> - физико-химическая природа вредности, её связь с разрабатываемой темой; - действие фактора на организм человека; - приведение допустимых норм с необходимой размерностью (со ссылкой на соответствующий нормативно-технический документ); - предлагаемые средства защиты; - (сначала коллективной защиты, затем – индивидуальные защитные средства). <p>1.2. Анализ выявленных опасных факторов при разработке и эксплуатации проектируемого решения в следующей последовательности:</p> <ul style="list-style-type: none"> - механические опасности (источники, средства защиты); - термические опасности (источники, средства защиты); - электробезопасность (в т.ч. статическое электричество, молниезащита – источники, средства защиты); - пожаровзрывобезопасность (причины, профилактические мероприятия, первичные средства пожаротушения). 	<p><i>1.1. Выявление вредных факторов в молекулярно-биологической лаборатории (при разработке и эксплуатации научного исследования:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - вредные вещества, освещение, производственный шум; - физико-химическая природа вредности веществ и их связь с разрабатываемой темой; - действие вредных веществ на организм (этанол, изопропанол, бромистый этидий, додецилсульфат натрия); - предлагаемые средства защиты для работы в молекулярно-биологической лаборатории: 1. коллективная защита - работа под вытяжным шкафом; 2. индивидуальные средства защиты - одноразовые перчатки, халат; <p><i>1.2. Выявление опасных факторов при разработке и эксплуатации научного исследования:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - микроклиматические условия - биологический фактор (биологический материал- образцы мокроты, орофарингеальной мазки и кши); - термическая опасность (оборудования с повышенной или пониженной температурой); - электробезопасность (наличие химически активной и органической среды, разрушающей изоляцию и токоведущие части электрооборудования); - пожаровзрывоопасность (оборудования, работающие под давлением и наличие легковоспламеняющихся жидкостей);
<p>2. Экологическая безопасность:</p> <ul style="list-style-type: none"> - анализ воздействия объекта на атмосферу (выбросы); - анализ воздействия объекта на гидросферу (сбросы); - анализ воздействия объекта на литосферу 	<ul style="list-style-type: none"> - вредные вещества, которые выделяются или используются во время эксперимента через вентиляционную систему; - химическое и биологическое загрязнение водотоков в результате удаления биологических, неорганических и органических отходов в канализационную сеть;

<p>(отходы);</p> <ul style="list-style-type: none"> - разработать решения по обеспечению экологической безопасности со ссылками на НТД по охране окружающей среды. 	<ul style="list-style-type: none"> - твердые отходы (биоматериал) класса Б; - разработаны решения по обеспечению экологической безопасности
<p>3. Безопасность в чрезвычайных ситуациях:</p> <ul style="list-style-type: none"> - перечень возможных ЧС при разработке и эксплуатации проектируемого решения; - выбор наиболее типичной ЧС; - разработка превентивных мер по предупреждению ЧС; - разработка действий в результате возникшей ЧС и мер по ликвидации её последствий. 	<ul style="list-style-type: none"> - перечень возможных ЧС при разработке и эксплуатации проектируемого решения- пожар, взрыв, разрушения зданий в результате разрядов атмосферного электричества, ураган, землетрясения; - разработка действий в результате возникшей ЧС и мер по ликвидации её последствий: <ol style="list-style-type: none"> 1. использование огнетушителя, песка, асбестового одеяла 2. в случае стихийных бедствий отключение воды и электричества 3. организационная эвакуация работающих;
<p>4. Правовые и организационные вопросы обеспечения безопасности:</p> <ul style="list-style-type: none"> - специальные (характерные при эксплуатации объекта исследования, проектируемой рабочей зоны) правовые нормы трудового законодательства; - организационные мероприятия при компоновке рабочей зоны. 	<ul style="list-style-type: none"> - "Трудовой кодекс Российской Федерации" от 30.12.2001 N 197-ФЗ (ред. от 31.12.2014) - организационные мероприятия при компоновке рабочей зоны: технический перерыв, проветривание, полная изоляция от производственных источников шума и вибрации.

Дата выдачи задания для раздела по линейному графику

Задание выдал консультант:

Должность	ФИО	Учебная степень, звание	Подпись	Дата
Профессор кафедры ЭБЖ ИНК	Ахмеджанов Р.Р.	д.б.н., профессор		28.04.16

Задание принял к исполнению студент:

Группа	ФИО	Подпись	Дата
4ДМ41	Майрамбекова Махабат Майрамбековна		29.04.16

РЕФЕРАТ

Выпускная квалификационная работа содержит 9 рис., 31 табл., 67 источников, 4 прил.

Ключевые слова: микробиотическое сообщество, хроническая обструктивная болезнь легких, выделение ДНК, секвенирование, пробоподготовка мокроты.

Объектом исследования являются биологические образцы мокроты, орофарингеальных мазков больных хронической обструктивной болезнью легких.

Цель работы – выбрать метод пробоподготовки образцов мокроты и орофарингеальных мазков для выделения ДНК, предназначенной для определения таксономического состава в образцах с использованием технологии секвенирования нового поколения.

В процессе исследования проводили: сбор уникальной коллекции ДНК образцов, выделение ДНК из биологических образцов, электрофорез в агарозном геле, секвенирование на приборе Miseq и биоинформатический анализ данных.

В результате исследования выбран оптимальный метод пробоподготовки мокроты для дальнейшего выделения ДНК, а также определен таксономический состав в образцах мокроты и орофарингеальных мазков больных хронической обструктивной болезнью легких.

Область применения: медицина

Экономическая эффективность/значимость работы - проведены расчеты финансового менеджмента, ресурсоэффективности и ресурсосбережения, которые показали, что исследование является экономически обоснованным.

Полученные данные будут использованы при разработке набора реагентов для определения микробиотического сообщества у больных хронической обструктивной болезнью легких с использованием технологии высокопроизводительного секвенирования.

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота

дНТФ – дезоксирибонуклеотиды

ОТЕ - операционная таксономическая единица

п.н. – пара нуклеотидов

РНК - рибонуклеиновая кислота

ОФВ - объем форсированного выдоха

ТАЕ – трис-ацетатный электродный буфер

ТЭЛА - тромбоэмболия лёгочной артерии

ХОБЛ – хроническая обструктивная болезнь легких

ФВД – функции внешнего дыхания

ФЖЕЛ - форсированная жизненная емкость легких

GOLD (GLOBAL INITIATIVE FOR CHRONIC OBSTRUCTIVE LUNG DISEASE) – глобальная инициатива по Хронической Обструктивной Болезни Легких

EDTA - этилендиаминтетрауксусная кислота

DDT – дихлордифенилтрихлорметилэтан

NALC - N-ацетил-L-цистеин

NGS (next generation sequence) – секвенирование нового поколения

SDS - додецилсульфат натрия

Tris – гидроксиметил аминометан

16s рРНК – РНК малой субъединицы бактериальной рибосомы

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	12
1. Определение состава микробиотического сообщества в различном биологическом материале больных ХОБЛ (Обзор литературы)	14
1.1. Хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ)	14
1.2. Микробиотическое сообщество и его основные представители	17
1.3. Методы изучения микробиотического сообщества	19
1.4. Методы выделения бактериальной ДНК из биологических материалов	27
2. Объект и методы исследования	35
2.1. Объект исследования	35
2.2. Методы исследования	36
2.3. Методика качественной оценки выделенной ДНК	43
3. Результаты проведенного исследования	45
3.1. Результаты по подбору методов пробоподготовки мокроты для выделения ДНК	45
3.2. Оценка качества выделенной ДНК	46
3.3. Получение информации о видовом составе микробиоты образцов мокроты и орофарингеальных мазков	48
3.4. Характеристика таксономического состава образцов мокроты	48
3.5. Характеристика таксономического состава образцов орофарингеальных мазков	49
4. Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение	53
4.1. Инициация научного исследования	53
4.2. Планирование научного исследования	57

4.3.	Бюджет научного исследования	67
4.4.	Определение ресурсной (ресурсоберегающей), экономической эффективности исследования	74
5.	Социальная ответственность	79
5.1.	Производственная безопасность	80
5.2.	Экологическая безопасность	90
5.3.	Безопасность в чрезвычайных ситуациях	91
5.4.	Правовые и организационные мероприятия обеспечения безопасности	93
	Выводы	95
	Список публикаций	97
	Список использованных источников	98
	Приложение А Methods of the study microbial communities	
	Приложение Б Представленность бактериальных родов в метагеноме мокроты пациентов с ХОБЛ	
	Приложение В Представленность бактериальных родов в метагеноме орофарингеального мазка пациентов с ХОБЛ	
	Приложение Г Контрольные события научного исследования и результаты	
	CD-диск	

ВВЕДЕНИЕ

Организм человека представляет сложную систему, симбиотически взаимодействующую населяющими его микроорганизмами, в совокупности именуемыми микробиотой. Микробиота – сообщество микроорганизмов, которые населяют различные органы и системы, одним из которых являются дыхательные пути. Популяции микроорганизмов играют важную роль в поддержании организма человека, в том числе участвуя в пищеварении, регуляции иммунитета, защите от патогенов и т.д. Изменения ее качественного и количественного состава приводят к различным заболеваниям органов дыхания, включая хронические обструктивные заболевания легких. В настоящее время роль микробиотических сообществ дыхательных путей в развитии и прогрессировании бронхообструктивных заболеваний остается неопределенной. Поэтому изучение состава сообщества микроорганизмов человека является необходимым шагом для оценки роли микроорганизмов в развитии болезней легких.

Первым шагом в изучении сообществ микроорганизмов является определение их видового состава. На данный момент наиболее используемыми методами изучения микробного сообщества являются культуральный метод и современные методы, основанные на сравнении нуклеотидной последовательности, т.е. секвенирование образцов. Каждый из перечисленных методов имеет свои недостатки и достоинства. Выбор того или иного метода основан прежде всего на таких характеристиках, как стоимость, продолжительность и трудоемкость анализа.

С помощью культуральных методов возможно выявить только 1-10% бактерий, кроме того культивирование является длительным процессом. Разработка новых молекулярных методов количественного анализа и секвенирования привела к появлению новых подходов и преодолению ограничений культуральных методов. Использование технологии высокопроизводительного секвенирования может дать более полную оценку

состава, а соответственно, и роли микробиотического сообщества в патогенезе хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ).

В настоящее время есть данные о том, что метод выделения может вносить существенный вклад в представленность микроорганизмов при использовании технологии высокопроизводительного секвенирования. Различные типы биологического материала содержат собственный набор примесей (ингибиторов), которые могут оставаться после выделения в образце ДНК и негативно влиять на последующие этапы секвенирования. Поэтому для каждого типа образцов необходимо разрабатывать специальные методы пробоподготовки для выделения ДНК.

Целью данной работы было выбрать метод пробоподготовки образцов мокроты и орофарингиальных мазков для выделения ДНК, предназначенной для определения таксономического состава в образцах с использованием технологии секвенирования нового поколения.

Задачи исследования

1. Создать коллекцию биологического материала: мокрота и орофарингеальные мазки больных ХОБЛ.
2. В
выбрать оптимальный метод пробоподготовки для выделения ДНК из образцов мокроты, полученных от больных ХОБЛ.
3. Провести выделение ДНК из образцов мокроты и орофарингиальных мазков больных ХОБЛ и определить состав микробиотического сообщества с использованием технологии высокопроизводительного секвенирования.

Методы исследования

1. Пробоподготовка образцов биоматериала (мокрота)
2. Выделение ДНК
3. Электрофорез ДНК в агарозном геле
4. Секвенирование на приборе Miseq Illumina.
5. Биоинформационный анализ и статистическая обработка данных

Научная новизна исследования.

1. Разработана и оптимизирована методика выделения ДНК из мокроты, больных ХОБЛ.
2. Проанализирован состав микробиоты орофарингеального мазка и мокроты у больных ХОБЛ сибирского региона.

Практическая значимость.

Разработанная методика по выделению ДНК из мокроты может быть внедрена и использована в клинической практике для идентификации состава микробиотического сообщества мокроты с использованием молекулярно-генетических методов.

Апробация работы

Результаты данного исследования были представлены на Международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых «Химия и химическая технология в XXI веке» имени профессора Л.П. Кулёва, посвященной 120-летию Томского политехнического университета.

1 Определение состава микробиотического сообщества в различном биологическом материале больных ХОБЛ (Обзор литературы)

1.1 Хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ)

Хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ)- распространенное заболевание, которое характеризуется устойчивым нарушением движения воздушного потока из легких. Длительное время ХОБЛ считали собирательным понятием, которое включает в себя хронический обструктивный бронхит (ХОБ), первичную эмфизему легких, бронхиальную астму (БА), муковисцидоз, облитерирующий бронхиолит. Но такой обобщенный подход затруднял эпидемиологические исследования, разработку диагностических критериев, так как в каждом конкретном случае они были разными. В результате, благодаря работе экспертов GOLD, окончательное определение термина «ХОБЛ» нашло широкое применение во всем мире [1]. Несмотря на морфологическую и клиническую гетерогенность ХОБЛ, общей характерной чертой при данном заболевании является воспаление в малых дыхательных путях, которое усиливается при прогрессировании болезни.

Основными симптомами ХОБЛ являются хронический кашель, мокрота, которая появляется при кашле и одышка. Хронический кашель и выделение мокроты могут наблюдаться в течение многих лет до развития ограничения скорости воздушного потока [2].

ХОБЛ является одной из причин заболеваемости и смертности по всему миру, которая ведет к значительному, все возрастающему экономическому и социальному ущербу [3]. Несмотря на то, что при легких и острых обострениях ХОБЛ может регулироваться и стоимость лекарств составляет в среднем около 70000 рублей на одного пациента, при тяжелых обострениях, требуется госпитализация, и стоимость лечения может составлять несколько сот тысяч рублей на одного пациента. В большинстве случаев четверть больных ХОБЛ умирают в течение года после поступления в больницу, 15 % умирают в течение трех месяцев после госпитализации [4].

Как отмечалось, ХОБЛ, являясь одной из ведущих причин инвалидизации и смертности во всем мире, представляет значимую медицинскую и социальную проблему. ХОБЛ широко распространена как в индустриальных городах, так и в сельских районах. Установлено, что распространенность ХОБЛ в мире составляет среди мужчин 54 % и женщин 32 % во всех возрастных группах [5].

В последние годы в России были выполнены несколько исследований, цель которых состояла в уточнении истинной распространенности ХОБЛ. Эти исследования показали, что ХОБЛ отмечается примерно у 8 % населения старше 18 лет, а среди лиц старше 30 лет распространенность этого заболевания достигает 14,5 % [6]. По данным официальной статистики число больных ХОБЛ составляет около 11-16 миллионов человек [3]. Стоит отметить, что во всем мире с каждым годом распространенность ХОБЛ лишь увеличивается, и к 2030 году по прогнозам ХОБЛ станет третьей причиной смертности в мире [7].

В начале 50-х годов по результатам исследований Флетчер и Пето табакокурение считалось главной причиной риска развития ХОБЛ [8]. В последнее десятилетие, особенно последние 5 лет, по результатам растущего числа опубликованных исследований было выдвинуто предположение, что существуют и другие факторы риска, кроме курения, такие, как: воздействие профессиональных вредностей (пыль, химические поллютанты, пары кислот и щелочей), атмосферное и домашнее загрязнение воздуха, плохое питание, наследственная предрасположенность [9].

Вполне вероятно, что существуют несколько причин для обострения ХОБЛ. Тем не менее, инфекции, вызванные бактериями и вирусами, связаны с большинством случаев обострений (-80%).

Патогенез. Воспаление в дыхательных путях у пациентов с ХОБЛ выглядит как патологически усиленный нормальный воспалительный ответ дыхательных путей на длительно воздействующие раздражающие факторы. В результате окислительного стресса и избытка протеиназ в легочной ткани

происходит дальнейшее усиление воспалительного процесса в легких. В совокупности все эти механизмы приводят к характерным патоморфологическим изменениям, в том числе и к изменению бактериальной колонизации легких, в том числе заселение потенциально патогенными бактериями [10]. Потенциально патогенные бактерии присутствуют в стабильном состоянии ХОБЛ примерно в 25-35% случаев. Вдыхание сигаретного дыма и других вредных частиц, таких как дым в результате сжигания биоорганического топлива приводит к ухудшению состояния и воспалению легких с последующими изменениями в микробиоме легких. Такой патологический воспалительный ответ может вызывать разрушение паренхимы и нарушение работы нормальных защитных и восстановительных механизмов. Большая часть бактерий находится в тесной связи с тканью легких и обычно обитает на стенках дыхательных путей, образуя сообщества в виде биопленок. Наиболее частым видом бактерий при ХОБЛ является *H. influenza*, на поздних стадиях заболевания – *Pseudomonas spp.*, *Klebsiella spp* [11].

Диагностика ХОБЛ. ХОБЛ можно предполагать у каждого человека, у которого имеются кашель, избыточная продукция мокроты и/или одышка при условии существования в анамнезе факторов риска развития болезни (курение и табачный дым, промышленная пыль и химикаты, дым домашних отопительных приборов и гарь от приготовления пищи). При клиническом обследовании определяются удлиненная фаза выдоха в дыхательном цикле, при перкуссии над легкими - легочный звук с коробочным оттенком, при аускультации легких - ослабленное везикулярное дыхание или жесткое, рассеянные сухие хрипы. Приведенные признаки не являются диагностически значимыми в отдельности, но наличие нескольких из них повышает вероятность заболевания. В установлении диагноза ХОБЛ наиболее важными и определяющим являются результаты ФВД. Обязательный признак - снижение ИФВ₁/ФЖЕЛ < 70 %. Этот показатель постоянен для всех стадий заболевания и служит наиболее ранним признаком ограничения скорости воздушного потока даже при сохранении ОФВ₁ > 80 %. В процессе обследования больного

необходимо исключить другие заболевания - бронхиальную недостаточность левого желудочка (отек легкого), ТЭЛА, обструкцию верхних дыхательных путей, рак легкого, туберкулез, пневмоторакс, проявляющиеся бронхообструктивным синдромом [12].

Таким образом, диагностика ХОБЛ осуществляется на основании следующих данных:

- 1) наличия факторов риска;
- 2) клинических признаков, ранними из которых являются кашель и экспираторная одышка;
- 3) неуклонно прогрессирующего нарушения бронхиальной проходимости по данным ФВД;
- 4) исключения других заболеваний, которые могут привести к появлению аналогичных ХОБЛ симптомов.

Формулировка развернутого клинического диагноза ХОБЛ включает тяжесть течения заболевания: легкое (I стадия), среднетяжелое (II стадия), тяжелое (III стадия) и крайне тяжелое (IV стадия); фазу процесса - обострение или ремиссия; наличие осложнений (дыхательная недостаточность, легочное сердце, недостаточность кровообращения). При тяжелом течении заболевания рекомендуется указывать клиническую форму ХОБЛ (эмфизематозная, бронхитическая, смешанная) [13].

1.2 Микробиотическое сообщество и его основные представители

В самых простых терминах «микробиота» может определяться, как ассоциация микробов, связанная с особым контекстом. Микробиота представляет собой сообщество микроорганизмов, которые населяют различные органы и системы: желудочно-кишечный тракт, поверхности кожи и дыхательные пути. Эти микроорганизмы могут быть представлены бактериями, вирусами и грибами, в большей степени исследованы бактерии. Например,

микробы, которые находятся в носоглотке здоровых людей могут упоминаться, как здоровая нософоренгиальная микробиота. В отличие от микробиологического подхода, целью которого как правило является определение отдельных болезнетворные микроорганизмы, анализ микробиоты характеризует все бактериальное сообщество с точки зрения его качественного состава. Бактерии анализируют в совокупности с грибами и вирусами [14].

Микробиота человека различается между индивидами, а также между различными частями тела. Известно, что ротовая микробиота вовлечена в воспалительные процессы в верхних и нижних респираторных путях, которые также могут приводить к атопическим заболеваниям, таким как аллергический ринит и бронхиальная астма. Ротоглотка постоянно подвергается воздействиям микроорганизмов, попадающих в нее при дыхании и глотании, включая содержащиеся в слюне. Микробиота ротовой полости может быть компонентом, запускающим обострение при таких состояниях, как бронхиальная астма и ХОБЛ [15].

Хотя исследование нормальной человеческой микробиоты находится все еще на ранней стадии, большинство исследований показывает, что органы и ткани человека не стерильны и богато населены различными микроорганизмами. Определение биогеографии бактериальных сообществ, а также их количественная и видовая идентификация в среде обитания (тело человека) являются одним из приоритетных направлений для понимания взаимоотношений между бактериями и организмом-хозяином в норме и при развитии патологии. В том числе, является необходимым шагом для оценки роли микроорганизмов в развитии болезней легких, например, ХОБЛ [16]. Большинство исследований, проведенных до настоящего времени указывают на то, что бактериальное разнообразие микробиотических сообществ зависит от климата, экологии, воздействия других людей и даже домашних животных [14].

Нормальный микробиом здоровых верхних дыхательных путей, включающий рот, нос, носоглотку и ротоглотку таит в себе чрезвычайно разнообразное бактериальное сообщество. Ротовая полость плотно заселена

сложным микробным сообществом, которая состоит в основном из бактериальных групп, принадлежащих к типам *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*. На уровне родов *Streptococcus*, *Gemella*, *Granulicatella*, *Veillonella*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Neisseria* являются одними из наиболее многочисленных и широко распространенных составляющих [11].

По данным исследователей, микробиота легких является сложной системой. За прошлые два десятилетия была хорошо изучена роль определенных микробных разновидностей в патогенезе ХОБЛ. Несмотря на некоторые продолжающиеся дебаты, текущие данные указывают на то, что бактериальное сообщество играет большую роль в патогенезе ХОБЛ [17].

При ХОБЛ наиболее важными болезнетворными микроорганизмами являются *H. Influenzae*, *P. Aeruginosa* и приблизительно 50 % обострений связаны именно с этими микроорганизмами. В период обострения они находятся в дыхательных путях, способствуют хроническому воспалению и приводят к прогрессированию ХОБЛ [18].

В ранее проведенных исследованиях с использованием культуральных методов было доказано, что доминирующими микроорганизмами в обострении ХОБЛ и наиболее вероятными возбудителями являются *H. Influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* и *Moraxella catarrhalis*, реже выделяются *Haemophilus parainfluenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* и представители семейства *Enterobacteriaceae* [19, 20].

Истинное разнообразие бактериального сообщества стало понятно после появления молекулярно-генетических методов. Для исследования сообществ организмов, обитающих в различных биологических средах, в последние годы обращаются к «мета»- исследованиям, т.е. секвенированию образцов, которые основаны на сравнении нуклеотидной последовательности различных генов.

1.3 Методы изучения микробиотического сообщества

На данный момент наиболее широко используемыми методами изучения микробного сообщества являются культуральный метод и современные

молекулярные методы, основанные на сравнении нуклеотидной последовательности, т.е. секвенирование образцов. Каждый из перечисленных методов имеет свои недостатки и достоинства. Выбор того или иного метода основан прежде всего на таких характеристиках, как стоимость, продолжительность и трудоемкость анализа.

1.3.1 Культуральные методы исследования

Традиционные культуральные методы широко используются для характеристики бактериального сообщества при ХОБЛ. Тем не менее, эти методы имеют ряд ограничений и их может быть недостаточно, чтобы должным образом изучить микробное сообщество и роль отдельных видов микроорганизмов в патогенезе ХОБЛ. Культуральные методы являются трудоемкими и отнимают много времени (обычно порядка 1-2 недель). Образцы, полученные от пациентов с ХОБЛ, как правило, культивируются аэробно, таким образом, исключая анаэробы, при 37°C в течение 48 часов в 3 -4 различных чашках для посева, чтобы определить основные патогенные бактерии, связанные с респираторными заболеваниями. Хотя использование различных методических приемов позволяет идентифицировать широкий спектр бактерий, существует высокая вероятность пропуска в популяции потенциально важных групп, которые требуют сложных условий роста. Например, бактерии, которые требуют более длительного времени роста или анаэробные условия. Так, атипичные бактерии, такие как *S.pneumonia*, *M.pneumoniae* трудно выделить культурально, в то время как они, как правило, связаны с инфекцией дыхательных путей [21].

Таким образом, серьезной проблемой при исследовании заболевания ХОБЛ, является выявление роли бактерий, которые сложно выделить с использованием культуральных методов. При хронической бактериальной колонизации в стабильном состоянии, необходимы чувствительные методы для обнаружения изменений в бактериальном сообществе в течение болезни. Более

того, необходимо учитывать, что в популяции больных ХОБЛ, существует широкая изменчивость микроорганизмов и значительное перекрытие в бактериальной нише среди микроорганизмов, выявляемых при стабильном и обостренном состояниях. Поэтому поперечные исследования имеют ограниченную ценность, а в идеале продольные исследования необходимы для выявления изменений внутри отдельных лиц между стабильным и нестабильным состояниями [22].

Низкая чувствительность культуральных методов была доказана исследованиями, в которых сравнили этот подход с молекулярными методами. Считается, что с помощью культурального метода возможно выявить только 1-10 % бактерий.

Таким образом, разработка новых молекулярных методов количественного анализа и секвенирования привела к появлению новых подходов позволяющих преодолеть ограничения культуральных методов. Использование молекулярно-биологических методов, таких, как секвенирование нового поколения, может дать более полную оценку роли микробиотического сообщества в патогенезе ХОБЛ.

1.3.2 Современные методы изучения микробиотических сообществ

Набор различных методов, которые позволяют установить исходную нуклеотидную последовательность интересующего фрагмента ДНК или целого генома, называется «секвенированием». Такие исследования позволяют обнаружить ранее неизвестные некультивируемые микроорганизмы, описать их свойства и функции и получить более общую картину того, что происходит в той или иной среде. Основным результатом секвенирования является таксономический анализ микробиотического сообщества [23]. Методы высокопроизводительного секвенирования имеют большое значение и широко используются для видовой идентификации бактерий различных видов. С

помощью определения нуклеотидной последовательности различных генов можно идентифицировать генетически важные участки ДНК.

Современные методы секвенирования изначально были ориентированы на то, чтобы увеличить производительность и быстроту исследований, и называются NGS-секвенированием или секвенированием нового поколения. Для метагеномного секвенирования используют такие технологии, которые входят в группу подходов NGS-секвенирования и предложены различными фирмами (Roche, Illumina, Life Technologies), направленные на получение нуклеотидных последовательностей целых геномов различных организмов. Основные этапы процесса подготовки ДНК к секвенированию одинаковы для всех методов. Наиболее распространенные платформы секвенирования и их основные параметры перечислены в таблице 1.1.

Таблица 1.1 - Основные платформы секвенирования и их ключевые характеристики (адаптировано из [24]).

Платформа	Длительность запуска, ч	Длина ридов, п.н.	Выход одного запуска, млн. п.н.
Roche			
454 FLX+	18-20	700	900
454 FLX Titanium	10	400	500
454 GS	10	400	50
Illumina			
GAIIx	14	2 × 150	96000
HiSeq 2000	8	2 × 100	400000
HiSeq 2000 V3	10	2 × 150	< 600000
MiSeq	1	2 × 150	1000
Life Technologies			
SOLiD 4	12	50 × 35	71000
SOLiD 5500xl	8	75 × 35 библиотека спаренных концов; 60 × 60 парная библиотека	155000

С появлением каждой новой платформы адаптировались существующие и разрабатывались новые алгоритмы для анализа метагеномных данных в соответствии с новым форматом выходных данных [24]. В настоящее время широко используются платформы Miseq и SOLID, которые были созданы на основе проверенных технологий компаний Illumina и Life Technologies. Данные методы секвенирования ориентированы на снижение цены и увеличение пропускной способности прибора. При этом уменьшается длина считываемого фрагмента нуклеиновой кислоты.

1.3.2.1 Ампликонное секвенирование участка ДНК на платформе MiSeq

Секвенирование на платформе Miseq или «секвенирование путем синтеза» первоначально было разработано учеными Ш. Баласубраманияном и Д. Кленерманом в Кэмбриджском университете [25].

Персональная система Illumina Miseq предназначена для осуществления высокопроизводительного секвенирования большого количества нуклеотидных последовательностей геномов живых организмов [26]. Miseq имеет высокую пропускную способность и позволяет быстро осуществить генетический анализ до 96 образцов в мультиплексе за 8 часов, позволяя проводить быстрое чтение нуклеотидных последовательностей для последующей характеристики состава микробных сообществ, используя 16s рРНК (РНК малой субъединицы бактериальной рибосомы) последовательности генов ампликона. Данная платформа генерирует до 1,6 Гб информации со скоростью 60 Мб/час [27].

В основе принципа работы метода Illumina лежит параллельное секвенирование миллионов одноцепочечных фрагментов ДНК.

На первом этапе для получения клональных кластеров, библиотеки нужно подвергнуть мостиковой амплификации непосредственно внутри ячейки. В данной технологии секвенирования используются терминированные дНТФ (дезоксирибонуклеотиды: А, G, C, T), которые комплементарно

встраиваются в растущую вторую цепь, а также блокируют дальнейшую полимеризацию. В каждую растущую цепь ДНК-копии с помощью полимеразы присоединяется только один нуклеотид, помеченный собственным флуорофором, который можно обнаружить с помощью высокочувствительной CCD-камеры. Обработка лазером приводит флуорофор в возбужденное состояние. При секвенировании используется только один флуоресцентный цвет, так как каждое из четырех оснований должно быть добавлено в отдельном цикле синтеза ДНК. Число циклов соответствует длине чтения. После добавления всех четырех дНТФ к матрице, каждый фрагмент оказывается окружен группой идентичных молекул- «кластеров», после чего регистрируется флуоресценция в каждом кластере и терминированные нуклеотиды удаляются. Этот химический процесс является обратимым. Каждый нуклеотид кодируется разным цветом и полученные данные преобразуются с помощью программного обеспечения в нуклеотидную последовательность. В результате, полная первичная структура нуклеиновой кислоты определяется с точностью более 99,99 %. Поскольку одиночные основания добавляются ко всем матрицам равномерно, в процессе секвенирования синтезируются ДНК-последовательности одинаковой длины [28].

С помощью MiSeq возможно осуществлять полноценное парноконцевое секвенирование с длиной фрагмента 600 пар оснований и производительностью более 15 миллиардов пар оснований за один запуск. Технология секвенирования Illumina обеспечивает высокую воспроизводимость результатов и высокое качество данных. Данные, полученных с помощью платформы Illumina (MiSeq) имеют более низкую частоту ошибки (<0,4%), чем у других платформ секвенирования. Ошибки в основном генерируются в триплетах богатых С, главным образом GGCGGG. Не найдено никаких доказательств ошибки, если триплет после GGC богат АТ [29].

Платформа MiSeq является секвенатором нового поколения. В одном инструменте находится все необходимое оборудование для осуществления анализа последовательности ДНК: модуль для генерации кластеров, модуль для

парноконцевого секвенирования и модуль для анализа и хранения полученных данных. Технические характеристики секвенатора MiSeq приведены в таблице 1.2.

Ключевой особенностью этой платформы для секвенирования является скорость. Уменьшение времени работы дает явные преимущества.

Таблица 1.2 - Технические характеристики MiSeq

1	2
Максимальная производительность за один запуск	15 миллиардов пар оснований
Максимальная длина считываемого фрагмента при парноконцевом чтении	600 пар оснований (2x300 п.о.)
Максимальная длина считываемого фрагмента при одноконцевом чтении	300 пар оснований
Максимальное количество чтений при парноконцевом запуске	50 миллионов
Максимальное количество чтений при одноконцевом запуске	25 миллионов
Качество получаемых сырых данных (до обработки)	99,999%
Максимальное количество образцов за один запуск	96
Максимальное количество ампликонов на один образец	1536
Максимальное количество ампликонов за один полный запуск	147 456
Минимальное количество геномной ДНК для анализа	1 нг (при использовании наборов реагентов NexteraXT Sample Preparation Kit)
Минимальные временные затраты на подготовку библиотеки ДНК к секвенированию	90 мин (при использовании наборов реагентов NexteraXT Sample Preparation Kit)

Минимальное время, необходимое на проведение исследования от образца к результату	8 часов (при использовании наборов реагентов NexteraXT Sample Preparation Kit, при запуске в режиме 1x36 пар оснований)
---	---

1.3.2.2 Секвенирование последовательности по гену 16s рРНК

Появление технологий высокопроизводительного секвенирования с длиной прочтения в несколько сотен нуклеотидов позволили использовать NGS для анализа микробных сообществ по гену 16s рРНК без этапа клонирования, что позволяет ускорить и удешевить исследование. Ген, кодирующий 16s субъединицу рРНК, хорошо подходит для бактериальной идентификации и наиболее широко используется для количественного определения и оценки микробиотического разнообразия и филогенетического соотношения в экологических исследованиях. За последние десять лет наблюдался экспоненциальный рост утвержденных видов бактерий в количестве от 1,791 до 8,168 на основе методов гена 16s [30].

Ген 16s субъединицы рибосомы имеет все существенные критерии, необходимые для сравнительного филогенетического анализа между прокариотами. Во-первых, как компонент клеточного синтеза белка, он является универсальным и повсеместно распространен среди всех бактерий. Во-вторых, как один из основных информационных генов, кодирующих клеточную функцию, считается необходимым для поддержания жизни. Полагается, что большинство 16s регионов будут устойчивы к горизонтальному переносу генов, в противном случае они могут поставить под угрозу структурную и функциональную целостность гена, который является жизненно-важным для бактерий. В-третьих, медленная эволюционная скорость и функциональное ограничение на домене 16s рРНК означает, что эта последовательность гена характеризуется участками высоко консервативных областей, чередующимися с вайабельными участками, обеспечивая широкий

филогенетический диапазон для сравнительного анализа. Наконец, ген 16s рРНК имеет длину 1540 п.н., который делает его очень удобным для исследования с помощью методов ПЦР, амплификации и секвенирования.

Бактериальный ген 16s рРНК состоит из девяти гипервариабельных участков (V1-V9), которые дают широкий спектр вариаций последовательностей среди бактериальных групп и могут быть использованы для целенаправленного создания праймеров и гибридизационных зондов, позволяющих охарактеризовать образцы на разных уровнях таксономической специфичности (Рис. 1.1). Эти гипервариабельные участки располагаются по бокам сохраненных нуклеотидных последовательностей и праймеры, к данным последовательностям, используют для проведения подсчета и профилирования смешанных бактериальных сообществ [31].

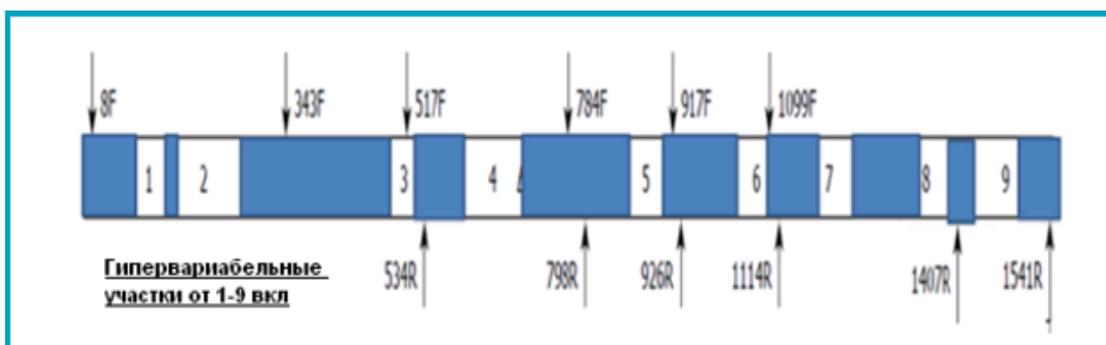


Рисунок 1.1 - Основная структура гена 16s рРНК (адаптировано из [31])

Девять гипервариабельных участков (1-9), соответствующих нуклеотидам 69-99, 137-242, 433-497, 576-682, 822-879, 986-1043, 1117-1173, 1243-1294 и 1435-1465 для V7 до V9 соответственно. Синим цветом обозначены гипервариабельные участки, а белым – консервативные участки гена 16s рРНК. Верхние стрелки показывают области, комплементарные прямым праймерам (F), нижние стрелки - обратным праймерам (R) для регионов целевых консервативных участков 16s рДНК.

При проведении качественной оценки микробиоты, помимо разной эффективности амплификации, возникает дополнительная сложность, обусловленная варьированием копийности гена 16s рРНК от 2 до 15 копий на гаплоидный геном. Причем копийность может отличаться даже для

микроорганизмов, относящихся к одному виду. Оценка представленности различных видов с учетом числа копий гена 16s рРНК, копияность которых постоянна, может улучшить точность получаемых результатов [32].

1.4 Методы выделения бактериальной ДНК из биологических материалов

1.3.3 Пробоподготовка биоматериала

Любое исследование с применением секвенирования начинается с выделения ДНК.

Выделение ДНК – это важный подготовительный этап для большинства молекулярно-генетических методов исследования. В настоящее время есть данные о том, что выявляемость различных видов микроорганизмов с использованием технологии высокопроизводительного секвенирования генов 16s рРНК очень сильно зависит от эффективности выделения ДНК [33]. Источником ДНК может служить любой биологический материал. Большое внимание уделяется процедуре сбора и формирования коллекций образцов для исследования. Для каждого образца используются индивидуальные инструменты и стерильные одноразовые контейнеры для хранения. Это необходимо для предотвращения перекрестной контаминации одного образца генетическим материалом другого. Образцы хранятся в замороженном состоянии до использования.

Как ранее известно, нуклеиновые кислоты образуют комплексы с белками, образуя так называемые – нуклеопротеины, содержащиеся во всех клетках животных, бактерий, вирусов, растений. Нуклеиновые кислоты обладают сильно выраженными кислыми свойствами (обусловленными фосфатными остатками в их составе) и при физиологических значениях рН несут отрицательный заряд. Этим объясняется одно из важных свойств ДНК – способность к взаимодействию по типу ионной связи с основными белками (гистонами), ионами металлов (преимущественно с Mg^{2+}), а также с

полиаминами (спермин, спермидин) и путресцином [34]. Поэтому для выделения ДНК из комплекса с белками необходимо, прежде всего, разрушить эти сильные и многочисленные электростатические связи между положительно заряженными молекулами белков и отрицательно заряженными молекулами нуклеиновых кислот.

К настоящему времени разработано множество методов выделения ДНК. Следует учитывать, что метод выделения ДНК выбирается в зависимости от поставленных задач. При выборе метода учитывается приоритет предъявляемых к нему требований, таких как: высокий выход целевой ДНК, быстрота метода и высокое качество продукта. Чувствительность методов высокопроизводительного секвенирования в значительной степени зависит от эффективности выделения ДНК из биологического материала. Однако, в процессе выделения ДНК из таких биологических материалов, как, например, мокрота, возникают трудности, обусловленные специфическим набором примесей (ингибиторов), негативно влияющих на последующие этапы секвенирования. Недостаток информации об особенностях различных методов пробоподготовки и отсутствие четких утвержденных требований к характеристикам наборов для выделения ДНК затрудняет выбор методики для решения конкретной задачи [33]. В свою очередь, эффективность выделения ДНК из мокроты существенно зависит от способа пробоподготовки, обеспечивающей разжижение материала и повышение степени гомогенизации. Поэтому для выделения ДНК предназначенной для последующего высокопроизводительного секвенирования одним из важных моментов является этап пробоподготовки.

1.3.4 Особенности пробоподготовки мокроты

Мокрота у больных ХОБЛ может содержать сгустки фибрина, плотные комочки, состоящие из обызвествленных эластических волокон, кристаллы холестерина и жиров, остатки пищи и др. Из воспалительного экссудата и распада лейкоцитов в мокроте появляются белки. Реологические свойства

мокроты обусловлены, как правило, содержанием органических веществ, что принято связывать с особенностями гликопротеидов, входящих в состав муцинов, вырабатываемых клетками бронхиального дерева [35].

Муцины - группы высокомолекулярных гликопротеинов позвоночных, содержащих преимущественно О-связанные олигосахариды и секретируемых в качестве компонентов внеклеточного матрикса эпителиальными клетками. Структурные особенности секреторных муцинов прямо связаны с их защитными функциями. В муциновом геле олигосахаридные цепи способствуют увеличению вязкости не только в силу своего размера, но и за счет взаимодействия с другими молекулами. Подобные муциновые сети обеспечивают эффективную защиту от протеаз для чувствительных к ним участков молекул муцинов, которые оказываются "спрятанными" внутри сети, в недоступных для протеаз районах. Так же в мокроте постоянно присутствуют ингибиторы протеаз: α 1-антитрипсин в свободной форме и в комплексе с протеолитическими ферментами лейкоцитов, α 2-макроглобулин, антихимотрипсин и низкомолекулярные ингибиторы с широким спектром антипротеазной активности. Комплекс ингибиторов протеаз трахеобронхиального секрета предотвращает действие протеолитических ферментов бактериального, лейкоцитарного и макрофагального происхождения, освобождающихся в процессе воспаления. Поэтому для успешного лизирования бактериальных клеток с последующим осаждением бактериальной ДНК важна пробоподготовка, включающая в себя эффективное разжижение мокроты и повышение степени гомогенизации образцов. В качестве агентов для разжижения мокроты используют N-ацетил-L-цистеин (NALC), sputasol (Oxoid, UK), DDT (дихлордифенил трихлорметилэтан) и др.

N-ацетил-L-цистеин (NALC) - муколитический и антиоксидантный реагент. Он является разжижающим агентом за счет ослабления дисульфидных связей в белках и действует в качестве предшественника восстановленного глутатиона. Из-за способности снижать силу дисульфидных связей N-ацетил-L-

цистеин, как и другие тиоловые агенты, широко используются для снижения вязкости мокроты и эластичности слизи [36].

Другим перспективным агентом снижающим вязкость мокроты является Sputasol, содержащий 0,1 М раствор дитиотреитола. Было установлено, что дитиотреитол является наиболее эффективным из группы агентов для разжижения мокроты, содержащих сульфгидрильную группу [37].

DDT (дихлордифенилтрихлорметилэтан) является восстанавливающим агентом, разрушающим слизистые гликопротеины и используется для разжижения и гомогенизирования мокроты. DDT действует на мокроту за счет уменьшения перекрестных сшивок дисульфидных связей мукопротеина [38]. В настоящее время очень часто используется в качестве разжижающего агента для мокроты, так как он не влияет на морфологию и на рост патогенных микроорганизмов в ней.

Так же в одном из вариантов пробоподготовки мокроты с реагентом Sputasol (Oxoid, UK) были использованы ферменты, позволяющие лизировать клеточные стенки бактерий, такие как лизоцим, мутанолизин и лизостафин.

Лизостафин представляет собой фермент, обладающий противомикробной активностью и принадлежащий к классу антимикробных пептидов и белков, известных как бактериоцины. Лизостафин является глицилглициновой эндопептидазой, который способен специфически расщеплять сшивающие пентаглициновые мостики в клеточной стенке стафилококков [39].

Лизоцим обладает гидролитической активностью и способностью специфически расщеплять β -1,4- гликозидные связи между N-ацетилглюкозамином N-ацетилмурамовой кислотой в бактериальном пептидогликане. Пептидогликан является уникальным компонентом бактериальной клеточной стенки, который обеспечивает структурную прочность и защищает осмотически чувствительный протопласт. Таким образом, разрушение пептидогликанов приводит к фатальным последствиям для бактерий и лизису клеток [40].

Мутанолизин обеспечивает мягкий лизис клеток. Мутанолизин это N – ацетилмурамидаза массой 23 кД, как лизоцим, является муралитическим ферментом, который расщепляет N – ацетилмурамил-β- (1-4)- N – ацетилглюкозамин связи в полимерах пептидогликана бактериальной клеточной стенки . Его карбоксильные концевые группы участвуют в распознавании и связывании уникальных полимеров входящих в состав клеточной стенки бактерий. Например, многие бактерии имеют O-ацетилированный пептидогликан, в том числе некоторых важных для человека ассоциированных бактерий, таких как *Neisseria gonorrhoeae*, *Proteus mirabilis* и *S. Aureus*. Эти бактерии чувствительны к мутанолизину. Мутанолизин также имеет литическую активность в отношении некоторых видов стрептококков и лактобактерий [41].

1.4.3 Выделение ДНК

Основными этапами методов выделения ДНК являются: лизис клеточных структур, очистка ДНК от примесей и концентрирование.

Процедура лизиса может включать механическое разрушение (измельчение с помощью пестика, гомогенизатора, применение ультразвука и др.), воздействие температурой (кипячение, замораживание-оттаивание), химическими веществами (использование детергентов, хаотропных агентов, высоких концентраций солей и др.) и обработку гидролитическими ферментами (лизоцим, трипсин, протеиназа К) [42].

В нашей работе для лизис клеток был выбран лизирующий раствор, содержащий:

- хлорид натрия, 500 mM, обеспечивающий разрушение за счет высокой концентрации соли;
- трис(гидроксиметил)аминометан, 500 mM (также известный, как Tris),
- этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA), 50 mM, которая связывается с ионами металлов и разрушает клеточную стенку бактерий,

- додецилсульфат натрия (SDS), 4% - высокомолекулярный детергент, вызывающий денатурацию белкового компонента.

Додецилсульфат натрия (SDS) - анионный детергент, являющийся очень эффективным поверхностно-активным веществом для растворения белков. Он разрушает нековалентные связи белков, таким образом вызывая их денатурацию, что приводит к потере их нативной конформации и функции. SDS связывается с белком в весовом соотношении 1,4:1 (один SDS-анион на две аминокислоты), маскирует заряд белка, в результате чего все белки в образце приобретают отрицательный заряд независимо от их изоэлектрической точки (pI). Анионные детергенты в буферных растворах дезорганизуют двухслойные липидные образования мембран и солюбилизируют белки, тем самым разрушая липидно-белковые комплексы мембран, в том числе ядерных, при этом ДНК экстрагируется в буфер, т.е. переходит в раствор. Додецилсульфат натрия осаждает белки и полисахариды как нерастворимый комплекс. Как правило, для полного лизиса клеток в присутствии SDS, образец должен быть гомогенизирован. Ионные детергенты могут изменять некоторые свойства в буферных растворах с переменной ионной силой (например, критическая мицеллярная концентрация (КМК) падает до 0,5 от 8 ммоль при увеличении концентрации NaCl от 0 до 500 ммоль). При оптимальной концентрации соли NaCl детергент образует нерастворимый комплекс с ДНК [43].

Этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА) - хелатный агент, связывающий ионы металлов (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{3+}). При обработке ЭДТА происходит дезактивация металл-зависимых ферментов, в том числе разрушающих ДНК. В частности ДНКазы, коферментом которой является магний. При связывании магния с ЭДТА снижается активность имеющихся ДНКаз.

На этапе лизиса образец биоматериала инкубируется с лизирующим буфером при температуре ($\approx 70^{\circ}C$), в процессе чего происходит деструкция клеточных мембран, вирусных оболочек и других биополимерных комплексов

и высвобождение нуклеиновой кислоты. При последующем центрифугировании нерастворимые компоненты осаждаются на дне пробирки, а супернатант (надосадочная жидкость) содержит ДНК [44].

Для повышения эффективности лизиса используются также цирконий-силикатные шарики или бусины размером 0,1 мм и 0,5 мм, которые повышают эффективность гомогенизации образца и разрушения бактериальной клеточной стенки [45].

После завершения этапа лизиса и удаления клеточного дебриса проводится центрифугирование, при котором образуется осадок. Супернатант, содержащий примеси, удаляется, а осадок, содержащий ДНК и остаточные количества солей и белков, последовательно промывается раствором хаотропной соли и двумя объемами 96 % этилового спирта. Роль соли в протоколе экстракции состоит в том, что её положительно заряженные ионы нейтрализуют отрицательный заряд на сахаро-фосфатном скелете ДНК, приводя к снижению растворимости последней в воде. В водном растворе электростатическое притяжение положительно заряженных ионов и отрицательно заряженных фосфатных групп подчиняется закону Кулона и зависит от диэлектрической константы раствора. Вода имеет большую диэлектрическую константу, что затрудняет взаимодействие ионов, тогда как этанол с гораздо более низкой диэлектрической константой способствует взаимодействию положительно заряженного иона и фосфатной группы, что приводит к выпадению ДНК в осадок. Этот процесс называется спиртовым осаждением ДНК.

Для осаждения используют следующие соли: аммония ацетат (AcNH_4) в концентрации не менее 2,0 М, лития хлорид (LiCl) – не менее 0,8 М, натрия хлорид (NaCl) – не менее 0,2 М или натрия ацетат (NaAc) – не менее 0,3 М. Наибольшее распространение нашло использование этилового и изопропилового спиртов для осаждения ДНК. Преципитация (осаждение) ДНК происходит при концентрации этилового спирта в препарате 70 % и выше, а изопропилового спирта – 40 % и выше. При низких концентрациях ДНК в

образце дополнительно используют соосадители (тРНК, гликоген и др.). После центрифугирования, образовавшийся осадок дополнительно промывают 70-80 % этанолом для удаления остатков солей. Следует отметить, что при осаждении ДНК спиртами происходит преципитация белков, фосфатов, ЭДТА и других веществ [46].

После осаждения спиртом ДНК отделяется от раствора центрифугированием. Осадок, содержащий целевую ДНК, отмывается 80 % этиловым спиртом с последующим центрифугированием. После удаления супернатанта осадок подсушивается и растворяется в воде, либо в ТЕ-буфере (10 мМ Tris-HCl, pH 8,0, 1 мМ ЭДТА).

Очистка ДНК от примесей в большинстве случаев сопряжена с концентрированием. Используют различные физико-химические лабораторные методы: фильтрование, экстракция органическими растворителями (фенол, хлороформ и др.), преципитация спиртами или полиэтиленгликолем, центрифугирование, электрофорез, хроматография и др. Для получения препаратов содержащих только ДНК или РНК применяют нуклеазы (РНКазы или ДНКазы) или системы, селективно связывающие нуклеиновые кислоты. Выбор наиболее подходящей методики выделения и очистки ДНК зависит от поставленных задач и основывается на следующих критериях: источник ДНК, вид нуклеиновой кислоты, требуемое количество и чистота конечного продукта ДНК [47].

Выделенная ДНК является материалом для дальнейшего исследования методом ПЦР в режиме реального времени, электрофореза в агарозном геле, для высокопроизводительного секвенирования.

2 Объект и методы исследования

2.1 Объект исследования

На основании информированного согласия пациентов для проведения исследования были созданы коллекции образцов микробиоты дыхательных путей (156 образцов мокроты, 328 орофарингеальных мазков) больных ХОБЛ

для дальнейшего выделения бактериальной ДНК. Сбор образцов производился на территории Томской области на базе ОГАУЗ «Городская клиническая больница №3». Образцы собирались в одноразовую стерильную лабораторную посуду, чтобы избежать попадания в них чужеродных микроорганизмов. Каждому образцу был присвоен уникальный номер. Все биологические образцы хранились при -80°C .

2.1.1 Материалы

Для лизиса бактериальной клеточной стенки был использован лизирующий буфер (500 mM NaCl, 500 mM TrisHCl pH 8, 50 mM EDTA, 4% SDS). Образцы двукратно гомогенизировали на бисерной мельнице MiniBead Beater (BioSpec Products, USA). Выделение ДНК проводилось методом спиртового осаждения (96 % этиловым спиртом для образцов мокроты и изопропиловым спиртом (марки ХЧ) для орофарингеальных мазков).

2.1.2 Материально – техническое оснащение

В процессе выполнения работ по выделению ДНК из образцов орофарингеального мазка, мокроты для проведения последующего секвенирования были использовано следующее оборудование:

1. Центрифуга MiniSpin Plus (Eppendorf) для микропробирок;
2. Пробирки типа Эппендорф (объемом 1,5 мл, 2 мл)
3. Автоматические дозаторы переменного объема (0,5-10 мкл, 10-50 мкл, 100-1000 мкл)
4. Центрифуга Sigma 3K с охлаждением (ротор 12154) Ц
5. Генератор POORKKA45A Л
6. Источник питания BioRad И

7.	И
сточник питания Mini MP-250;	
8.	С
пектрофотометр ND- 2000 С NanoDrop;	
9.	Т
вердотельный термостат (BioScan)	
10.	
Вортекс (BioScan)	
11.	Г
омогенизатор MiniBeadBeater -16;	
12.	М
орозильник вертикальный (Sanyo).	
13.	С
истема очистки воды Direct Q S Milipore;	
14.	В
есы аналитические Adventurer;	
15.	К
амера для горизонтального электрофореза BioRad ;	
16.	С
истема гельдокументации G:BOX (Syngene).	

2.2 Методы исследования

2.1.3 Методика выделения бактериальной ДНК из биологических материалов

Выделение ДНК из образцов мокроты и орофарингеальных мазков проводили на базе Центральной научно-исследовательской лаборатории (ЦНИЛ) СибГМУ. Процедуру выделения ДНК выполняли в несколько последовательных этапов. Перед проведением выделения все замороженные

образцы микробиоты, которые хранили при температуре -80°C , инкубировали при комнатной температуре в течение 30 минут.

2.1.3.1 Пробоподготовка мокроты для выделения бактериальной ДНК

Для выделения ДНК из образцов мокроты была поставлена задача разработать и сравнить несколько методик пробоподготовки, позволяющих провести последующее определение микробиотического сообщества с помощью технологий высокопроизводительного секвенирования. Мокрота собиралась от 10 пациентов, больных ХОБЛ, после чего был приготовлен микс из десяти образцов мокроты, который использовали для дальнейшего анализа. Приготовленный микс хранили при -80°C . Исследовали 4 метода пробоподготовки с дальнейшим выделением ДНК (Табл. 2.3). В каждой методике использовали одну контрольную и одну холостую пробу (не содержащую ДНК).

Таблица 2.3 – Методы пробоподготовки

№	Методы пробоподготовки	Номер образцов
	1% раствор NALC (N-ацетил-L-цистеин, NAC) в PBS: мокрота = 1:1	Sp 20
		Sp 21
	2,5% раствор NALC в PBS : мокрота = 1:1	Sp 23
		Sp 24
	sputasol: мокрота = 1:1	Sp 26
		Sp 27
	sputasol: мокрота = 1:1+ мутанолизин (100 ед/мл), лизоцим (30 ед/мл), лизостафин (1000 ед/мл)	Sp 29
		Sp 30
	1% DDT на 0,9% NaCl: мокрота = 1:1	Sp 32
		Sp 33

Метод 1 включал обработку мокроты N-ацетил-L-цистеином в фосфатно-солевом буфере (PBS) в концентрации 1% и 2,5%.

В пробирку с закручивающейся крышкой отобрали 1 мл мокроты стерильными наконечниками (отрезали кончик у носика для автоматической пипетки, чтобы мокрота набралась). Добавляли к мокроте по 1 мл 1% и 2,5% N-ацетил-L-цистеина в PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, pH 7,4) и тщательно вортиксировали 20 сек до гомогенного состояния. Затем пробирки помещались в ротор (шейкер Bio RS – 24, BioScan) и перемешивали в течение 15 мин 100 об/мин при комнатной температуре. После встряхивания пробирки инкубировали 30 минут при 37°C. После чего центрифугировали (микроцентрифуга MiniSpin, Eppendorf) при 13000 g в течение 10 минут. Затем образовавшийся супернатант аккуратно отбирали и проводил дальнейшее выделение ДНК из осадка.

Метод 2 заключался в обработке мокроты реагентом Sputasol (Oxoid) (0,1 M раствор дитиотреитола).

В пробирку с закручивающейся крышкой, подходящую для гомогенизатора MiniBeadBeater отбирали стерильными наконечниками по 1 мл мокроты. Добавляли к мокроте по 1 мл Sputasol (Oxoid) и тщательно вортиксировали 20 сек до перехода в гомогенное состояние. Затем пробирки помещали в ротор встряхивателя (шейкер Bio RS – 24 BioScan) и инкубировали в течение 15 мин при 100 об/мин и комнатной температуре. После встряхивания пробирки центрифугировали 15 минут при 13000 g. Удаляли образовавшийся супернатант и проводили дальнейшее выделение ДНК из осадка.

Метод 3 включал обработку мокроты с Sputasol (Oxoid) в комбинации с ферментами: мутанолизин, лизоцим и лизостафин в равных концентрациях.

В пробирку с закручивающейся крышкой, подходящую для гомогенизатора MiniBeadBeater отбирали стерильными отрезанными наконечником по 1 мл мокроты. Затем к мокроте добавляли 1 мл Sputasol (Oxoid), вортиксировали 20 сек и встряхивали на шейкере Bio RS – 24 BioScan при 100 об/мин в течение 15 минут. После встряхивания пробирки центрифугировали при 13000 g 15 минут (микроцентрифуга MiniSpin,

Eppendorf). Полученный супернатант удаляли и к осадку добавляли 1 мл мутанолизина (100 ед/мл), 5 мкл лизоцима (30 ед/мл) и 1 мл лизостафина (1000 ед/мл). Затем пробирку помещали в ротор встряхивателя (шейкер Bio RS – 24 BioScan) и перемешивали в течение 15 мин на при 100 об/мини комнатной температуре. Инкубировали в термостате (BioScan) при 37 °С в течение 30 минут. После инкубации пробирки центрифугировали при 13000 g 15 мин. Образовавшийся супернатант удаляли и проводили дальнейшее выделение ДНК из осадка.

Метод 4 включал обработку мокроты 1% DDT (дихлордифенилтрихлорметилэтан), растворенным в 0,9 % NaCl.

В пробирку с закручивающейся крышкой, подходящую для гомогенизатора MiniBeadBeater отбирали стерильными отрезанными наконечниками по 1 мл мокроты и добавляли 1% DDT (дихлордифенилтрихлорметилэтан), растворенный в 0,9% NaCl в количестве 1 мл. Пробирку с образцом помещали в ротор встряхивателя (шейкер Bio RS – 24 BioScan) и инкубировали в течение 15 мин при 100 об/мин при комнатной температуре. Инкубировали в термостате (BioScan) при 37 °С в течение 30 минут. Затем центрифугировали при 10000 g 10 минут, после чего удаляли полученный супернатант и проводили дальнейшее выделение ДНК из осадка.

2.1.3.2 Методика выделения ДНК из мокроты

Перед проведением выделения ДНК все образцы мокроты, хранящиеся при температуре -80⁰С инкубировали при комнатной температуре в течение 30-40 минут. Далее в пробирку с закручивающейся крышкой, подходящую для гомогенизатора MiniBeadBeater отбирали стерильными наконечниками по 1 мл мокроты (отрезали кончик у носика для автоматической пипетки, чтобы мокрота набралась). Добавляли к мокроте по 1 мл Sputasol (Oxoid) и тщательно вортексировали 20 сек до гомогенного состояния. Затем пробирки помещали в ротор встряхивателя (шейкер Bio RS – 24 BioScan) и перемешивались в течение 15 мин при 100 об/мин и комнатной температуре. После встряхивания

пробирки центрифугировали 15 минут при 13000 g. Удаляли образовавшийся супернатант.

К осадку добавляли 300 мг бусин silica-zir (BioSpec Products, США) диаметром 0,1 мм и бусины silica-zir (BioSpec Products, США) диаметром 0,5 мм по 100 мг к каждому образцу. К образцам с бусинами добавляли теплый лизирующий буфер (500 mM NaCl, 500 mM Tris HCl pH=8, 50 mM EDTA, 4% SDS) в количестве 1,2 мл и вортексировали до гомогенного состояния. Затем образцы гомогенизировали с помощью MiniBeadBeater (BioSpec Products, США) в течение трех минут. Полученные образцы инкубировали при 70 °C в течение 15 минут и центрифугировали при 14000 g 20 минут. Отобирали образовавшийся супернатант в новую пробирку и помещали на лед. К осадку добавляли лизирующий буфер в объеме 1,2 мл, после чего повторяли процедуру гомогенизации с использованием MiniBeadBeater.

К двум полученным фракциям отобранного супернатанта добавляли 2 объема 96% этанола и 1/10 объема ацетата натрия 3 M. Инкубировали при 20 °C 1 час. Образцы центрифугировали при 14000 об/мин в течение 20 минут, после чего отбрасывали надосадочную жидкость, осадок промывали два раза в 500 мкл 80% этилового спирта, подсушивали при комнатной температуре в течение 30 минут и ресуспендировали в 400 мкл TE-буфера. Пробирку с образцами ДНК инкубировали при 37°C в течение 30 минут. Затем центрифугировали при 14000 об/мин 15 минут, после чего отбирали супернатант в новую пробирку, а осадок выбрасывали. К образцам добавляли 1 мкл раствора РНКазы А (5 мг/мл) и инкубировали при 37°C в течение 1 часа. Образцы хранили при +4°C в течение 1 дня, при более длительном сроке хранили при -20°C.

2.1.4 Методика выделения бактериальной ДНК из орофарингеальных мазков

Процедуру выделения ДНК из орофарингеальных мазков выполнял и в несколько последовательных этапов. Перед проведением экстракции замороженные образцы мазка со слизистой ротоглотки, хранившиеся при

температуре -80°C , инкубировали при комнатной температуре в течение 30 минут. Далее ватный тампон, содержащий пробу, аккуратно извлекли из пробирки, срезали стерильными ножницами и помещали в пробирку объемом 2 см³. В пробирку добавили 300 мг бусин silica-zir (BioSpec Products, США) диаметром 0,1 мм и бусины silica-zir (BioSpec Products, США) диаметром 0,5 мм по 100 мг к каждому образцу. К образцам с бусинами добавили лизирующий буфер (500 mM NaCl, 500 mM Tris HCl, pH 8, 50 mM EDTA, 4% SDS) в количестве 800 мкл и вортексировали до гомогенного состояния. Затем образцы гомогенизировали с помощью MiniBeadBeater (BioSpec Products, США) в течение трех минут. Полученные образцы инкубировали при 70°C в течение 15 минут и центрифугировали при 14000 щб/мин 10 минут. Полученный супернатант переносили в чистую пробирку, в которую добавляли 800 мкл изопропанола, аккуратно перемешивали переворачиванием и инкубировали при -20°C 1 час.

Образцы центрифугировали при 14000 об/мин при $+4^{\circ}\text{C}$ в течение 20 минут, после чего отбрасывали надосадочную жидкость. К осадку добавляли 300 мкл 70% этилового спирта и перемешивали. Центрифугировали при 14000 об/мин при $+4^{\circ}\text{C}$ 5 минут и аккуратно убрали супернатант. Этот процесс повторяли два раза. Пробирку с осадком подсушивали с открытой крышкой при комнатной температуре под тягой в течение 15-20 минут и ресуспендировали в 100 мкл TE-буфера. К растворенным образцам ДНК добавляли 1 мкл раствора РНКазы А (5 мг/мл) и инкубировали при 37°C в течение 1 часа. Образцы хранили при $+4^{\circ}\text{C}$ в течение 1 дня, при более длительном сроке хранили при -20°C .

2.1.4.1 Методика проведения секвенирования на платформе MiSeq

Определение состава микробиотического сообщества было проведено с использованием технологии высокопроизводительного секвенирования 16S

pРНК. Образцы ДНК, выделенной из образцов микробиоты орофарингеальных мазков и мокроты, разводили в 10-500 раз. Проводили ПЦР с использованием специфических праймеров: А (TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGC AG) иБ(GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC), обеспечивающих амплификацию гипервариабельных участков V3/V4 16S pРНК и содержащих участки, соответствующие универсальным адаптерам Illumina. Известно, что для метагеномных исследований с использованием универсальных праймеров большую проблему представляет контаминация, источником которой может являться вода, ДНК-полимераза и другие реагенты, используемые при выделении ДНК и постановке ПЦР. Поэтому ставили отрицательный контроль – проводили ПЦР с добавлением вместо ДНК образца равного объема воды. Использовали следующий температурный режим проведения ПЦР: начальная денатурация 95°C 3 минуты; и далее 25 циклов: денатурация 95°C 30 секунд, отжиг 55°C 30 секунд, элонгация 72°C 30 секунд; конечная элонгация 72°C 5 минут. Затем ПЦР-продукты очищали и проводили второй раунд ПЦР с праймерами, содержащими баркоды (метка, уникальная для каждого образца) из набора Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter) в соответствии с протоколом. Использовали следующий температурный режим проведения ПЦР: начальная денатурация 95°C 3 минуты; и далее 8 циклов: денатурация 95°C 30 секунд, отжиг 55°C 30 секунд, элонгация 72°C 30 секунд; конечная элонгация 72°C 5 минут. Затем ПЦР-продукты очищали с использованием бусин Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter) в соответствии с протоколом, измеряли концентрацию на флуориметре Qubit (Invitrogen, США), с использованием набора Quant-iT™ dsDNA High-Sensitivity Assay Kit. Очищенные ампликоны смешивали эквимолярно в соответствии с полученными концентрациями. Качество приготовленной для сиквенса библиотеки оценивали на приборе Bioanalyzer 2100 (Agilent) с использованием набора Agilent DNA 1000 Kit.

Дальнейшую подготовку образца к секвенированию и секвенирование пулированного образца осуществляли с использованием набора MiSeq Reagent Kit v2 (300 циклов) на приборе MiSeq (Illumina, США) согласно рекомендациям производителя.

2.1.4.2 Методика проведения биоинформационного анализа

Анализ прочтений полученных при секвенировании 16S РНК был выполнен в Qiime pipeline версия 1.7.1. Был использован наиболее широко распространенный подход к таксономической классификации, который опирается на базовое понятие операционной таксономической единицы (ОТЕ). Прочтения гена 16S рРНК, полученные с секвенатора, сравнивали с референсной базой данных GreenGenes версии 13.5. Учитывались те последовательности генов 16S рРНК, которые совпадали с одной из позиций базы данных на не менее чем 97%. Далее все учтенные последовательности подвергали кластеризации по заданному порогу сходства в 97%. Для каждого такого кластера выбиралась титульная последовательность (представитель), для которой определялось таксономическое положение. Количество найденных в образце ОТЕ бактерий приравнивалось к числу последовательностей в соответствующем ей кластере. Затем найденные ОТЕ агрегировали по таксономическому признаку (классам, типам, отрядам, семействам, родам и видам) и отображали в виде графиков.

2.2 Методика качественной оценки выделенной ДНК.

2.2.1 Электрофорез в агарозном геле

Качественный метод оценки концентрации нуклеиновых кислот основан на проведении электрофоретического разделения в агарозном геле препарата ДНК и контрольного образца с известной концентрацией (например,

коммерческий маркер размерности ДНК). При этом для более точного определения количества ДНК используют стандартное разведение контрольного образца. После проведения электрофореза концентрацию препарата ДНК оценивают по яркости свечения полосы в ультрафиолетовом свете по сравнению с флуоресценцией контрольного образца с использованием специализированного программного обеспечения.

Электрофорез в агарозном геле проводили с целью количественной (ширина и яркость бенда) и качественной (при наличии деградации той или иной степени на дорожке появляется «шлейф» из фрагментов различной длины) оценки выделенной ДНК. Электрофорез выполняли с использованием источника тока BioRad, камеры для горизонтального электрофореза, системы гельдокументации G: Vox и маркеров длины ДНК (1Kb DNA Ladder, СибЭнзим, Россия).

Техника выполнения электрофореза: В термостойкую колбу на 200 мл добавляли навеску агарозы 1,6 г, 2 мл 50-кратного TAE буфера и 98 мл дистиллированной воды. Колбу ставили в микроволновую печь на две минуты до растворения агарозы. После остывания до 70°C добавляли 10 мкл 1 % бромистого этидия и аккуратно размешивали, чтобы избежать появления пузырьков. Готовый теплый раствор залили на подложку для геля и вертикально вставляли гребенку так, чтобы ее зубцы не доставали до дна примерно 1,5 мм. После того, как гель полностью застывал (становился из прозрачного мутновато-белым), аккуратно вытаскивали гребенку из застывшего геля и помещали его вместе с подложкой в электрофоретическую камеру, заполненную однократным TAE буфером (40 mM Трис-ацетат, 20 mM ледяная уксусная кислота, 1M ЭДТА, pH 7,6.).

К 9 мкл каждого образца исследуемой ДНК добавляли по 1 мкл красителя – бромфенолового синего. Заливали электрофоретическую камеру однократным раствором TAE – буфера, осторожно вносили по 10 мкл каждого образца в последовательно расположенные лунки, первую и последнюю лунки оставляли для внесения маркеров длин ДНК. Электрофорез проводили при

напряжении 10 В/см в течение 30 минут. Затем гель помещали в камеру геледокументирующей системы для оценки качества выделения ДНК.

3 Результаты проведенного исследования

3.1 Результаты по подбору методов пробоподготовки мокроты для выделения ДНК

В результате проведенного исследования с целью определения микробиотического сообщества были протестированы 4 метода пробоподготовки мокроты для выделения ДНК.

После выделения ДНК из мокроты с использованием различных методов образцы были проанализированы методом электрофореза. На электрофореграмме (Рис. 3.1) полосы ДНК, выделенные с реагентом Sputasol (метод 2) самые яркие и четкие, без шлейфа деградировавшей ДНК. В то время

как бенды ДНК, выделенные с реагентом Sputasol (Метод 3) и ферментами не имеют четкой границы и отличаются заметным шмером от деградировавшей ДНК. ДНК, выделенная с N- ацетил-L-цистеином (Метод 1) не имеет ярких и четких бендов, а ДНК, выделенная с ДДТ (Метод 4) не удовлетворяет требованию нативности (шмеры деградировавшей ДНК по яркости практически равны бендам).

Таким образом, для проведения высокопроизводительного секвенирования генов бактериальной 16S рРНК был выбран метод выделения ДНК, включающий обработку мокроты с реагентом Sputasol (Oxoid). Можно утверждать, что Sputasol (Oxoid), содержащий дитиотреитол, является наиболее эффективным агентом для разжижения мокроты, из всех исследованных нами композиций. В процессе выбора методики пробоподготовки было установлено, что дитиотреитол более эффективно снижал вязкость мокроты, чем другие реагенты.

Пригодность полученной данным методом ДНК была так же подтверждена тестовым секвенированием проб.

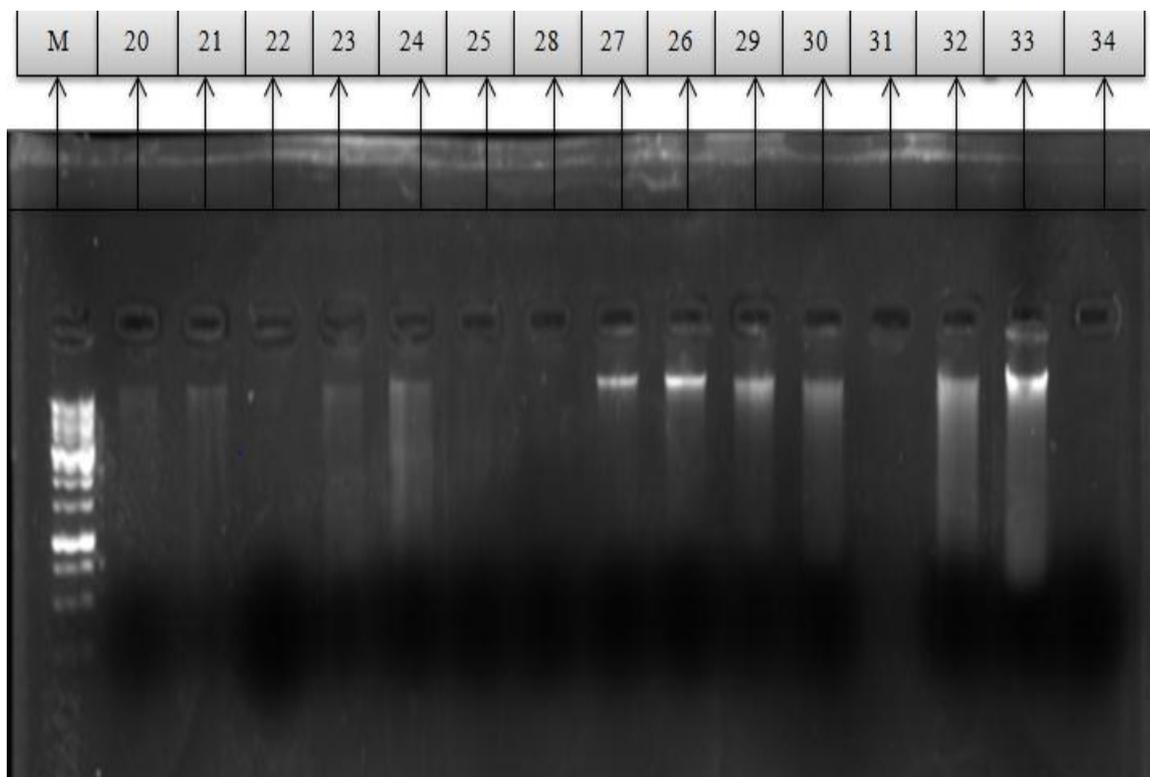


Рисунок 3.1 - Электрофореграмма образцов ДНК, выделенной из мокроты с использованием реагентов: М – маркер 1 Кб, № 20,21 – 1% NALC, № 22 – холостая проба, № 23,24 – 2,5 % NALC, № 25 - холостая проба, № 27,26 – sputasol, № 28 - холостая проба, № 29,30 – sputasol в комбинации с ферментами, № 31 - холостая проба, № 32,33- 1 % DDT на 0,9 % NaCl, № 34 - холостая проба.

3.2 Оценка качества выделенной ДНК

Нами было проведено выделение ДНК, для последующего анализа методом высокопроизводительного секвенирования, из 156 образцов мокроты и 328 образцов орофарингеальных мазков.

С целью оценки качества выделенной ДНК был проведен горизонтальный электрофорез в 1,5% агарозном геле с использованием ТАЕ-буфера. Исследование ДНК производилось непосредственно после ее выделения из биологического материала. В результате электрофореза было подтверждено присутствие ДНК в образцах мокроты и орофарингеального мазка, а так же оценена ее нативность и полимерность. На представленных электрофореграммах (Рис. 3.2, 3.3) можно видеть, что ДНК успешно выделена из всех образцов биоматериала, однако наблюдается варьирование количества выделенной ДНК. Это может быть обусловлено свойствами биоматериала, в частности исходной концентрацией гликопротеинов в образце, затрудняющих выделение ДНК.

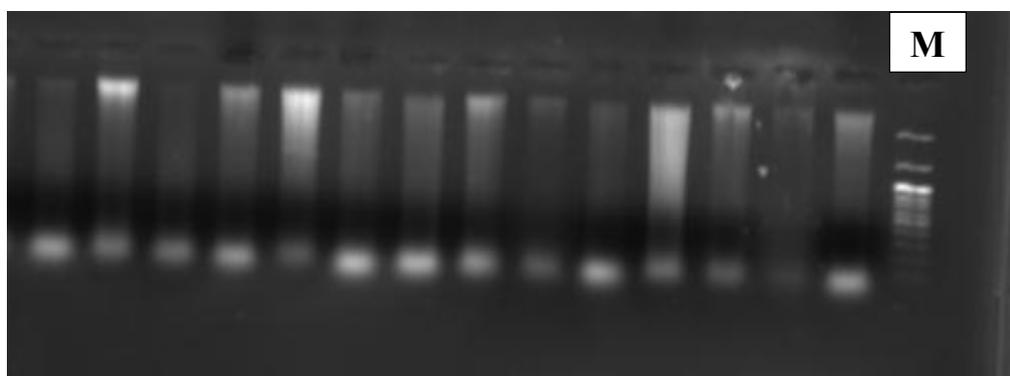


Рисунок 3.2 - Электрофореграмма образцов мокроты, М – маркер молекулярного веса

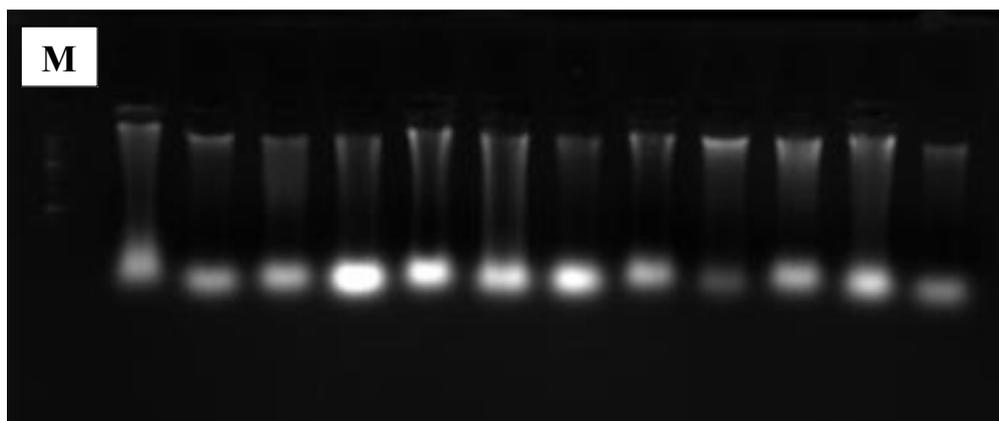


Рисунок 3.3 - Электрофореграмма образцов орофарингеальных мазков, М – маркер молекулярного веса

3.2 Получение информации о видовом составе микробиоты образцов мокроты и орофарингеальных мазков

Все образцы ДНК, выделенные из мокроты и орофарингеальных мазков, были подвергнуты секвенированию по последовательностям варибельного региона V3-V4 бактериальных генов 16S рРНК, на приборе Illumina MiSeq. Фильтрация ридов по качеству и их таксономическая классификация по байесовскому алгоритму против БД Greengenes V13.5 проведены с помощью программного обеспечения QIIME. Среднее число соотнесенных по таксономии ридов на образец составило 2151 ± 245 (среднее значение \pm стандартное отклонение (здесь и далее)).

Полученная таксономическая информация об образцах мокроты и орофарингеального мазка была преобразована и проанализирована при помощи статистического языка программирования R. Операционные таксономические единицы были классифицированы по таксономическим категориям: родам и типам. Информация представлена в виде круговой диаграммы (Приложение Б и В) и в таблицах 3.1, 3.2, 3.3.

3.3 Характеристика таксономического состава образцов мокроты.

В ходе исследования с помощью выбранного метода пробоподготовки с реагентом Sputasol (Oxoid) были выделены ДНК из образцов мокроты и определен таксономический состав в данных образцах. Анализируя результаты, представленные в таблице 3.1, преобладающими в микробиоте проанализированных образцов мокроты являлись представители родов *Streptococcus* (41,29%), *Haemophilus* (15,91%), *Prevotella* (6,84%), бактерии неопределенного рода (5,61 %), *Rothia* (4,46%), *Veillonella* (4,18%), также в биоматериале в небольшом количестве присутствовали представители родов *Moraxella*, *Granulicatella*, *Neisseria*, *Leptotrichia*. Информация по бактериальному составу образцов мокроты представлена в виде круговой диаграммы в Приложении Б.

Таблица 3.1 – Представленность бактериальных родов в метагеноме мокроты пациентов с ХОБЛ

Род	% представленности родов в метагеноме
<i>Streptococcus</i>	41,29%
<i>Haemophilus</i>	15,91%
<i>Prevotella</i>	6,84%
No_genus_assig	5,61%
<i>Rothia</i>	4,46%
<i>Veillonella</i>	4,18%
<i>Moraxella</i>	2,94%
<i>Granulicatella</i>	2,76%

Neisseria	2,14%
Leptotrichia	1,96%
Fusobacterium	1,27%
Actinobacillus	1,09%
Nevskia	1,05%
Porphyromonas	0,99%
Serratia	0,73%
Actinomyces	0,72%
Прочее	6,07%

3.4 Характеристика таксономического состава образцов орофарингеальных мазков

В результате исследования таксономического состава микробиоты орофарингеальной области у больных ХОБЛ выявлено, что в число наиболее представленных входят бактериальные роды *Streptococcus* (31,86%), *Prevotella* (15,30%) и *Veillonella* (12,67%) (Табл. 3.2), что хорошо согласуется с результатами зарубежных исследований по анализу респираторной микробиоты при ХОБЛ.

Таблица 3.2 – Представленность бактериальных родов в метагеноме орофарингеального мазка пациентов с ХОБЛ

Род	% представленности родов в метагеноме
Streptococcus	31,86%
Prevotella	15,30%
Veillonella	12,67%
No_genus_assig	6,26%
Haemophilus	3,70%
Leptotrichia	3,60%
Rothia	3,52%

Neisseria	3,23%
Fusobacterium	2,92%
Actinomyces	2,68%
Granulicatella	2,05%
Porphyromonas	1,81%
Actinobacillus	1,16%
[Prevotella]	1,14%
Campylobacter	0,93%
Lactobacillus	0,75%
Atopobium	0,69%
Gemella	0,55%
Прочее	5,17%

Считается, что в норме соотношение анаэробных и аэробных микроорганизмов в полости рта составляет 10:1. Бактерии с анаэробным типом дыхания составляют около 75% всей бактериальной флоры [48]. Полученные данные позволяют заключить, что наибольшую представленность в образцах мокроты и орофарингеальных мазков составляют бактерии рода *Streptococcus*. Стрептококки - гетерогенная группа грамположительных анаэробных бактерий. Этот род представлен более 20 видами бактерий. Различные стрептококки имеют экологически важное значение как часть нормальной микрофлоры человека, обитающей в ротовой полости и дыхательных путях, а некоторые из них могут также вызывать болезни, которые варьируются от легких до острых или даже до хронических. Стрептококковая колонизация является частой причиной заболеваний верхних дыхательных путей и одной из основных причин смерти. Кроме того, стрептококки могут способствовать развитию обострения заболеваний легких [49].

Одной из наиболее высоко представленных в микрофлоре пациентов с ХОБЛ групп бактерий являются представители рода *Haemophilus*. Данные

микроорганизмы являются грамтрицательными коккобациллами, которые имеют ультраструктурные особенности характерные и для других грамтрицательных бацилл. Их клеточные стенки содержат липоолигосахариды, которые напоминают липополисахариды грамтрицательных бацилл, но имеют более короткие боковые цепи. Род *Haemophilus* включает в себя ряд видов, которые могут быть разделены на инкапсулированные или типизируемые штаммы, из которых есть семь типов (от А до F), выделенных на основе антигенной структуры капсульного полисахарида, и некапсулированные или нетипизируемые штаммы. Нетипизируемые штаммы, например *Haemophilus influenzae*, является основным патогенным микроорганизмом, который колонизирует дыхательные пути человека и играет важную роль в хронической обструктивной болезни легких [50].

Prevotella – грамтрицательные анаэробные бактерии. Встречаются пигментированные и непигментированные виды. Представители этого рода являются частыми колонизаторами нижних и верхних дыхательных путей и вызывают инфекции дыхательных путей [17]. Таким образом, результаты показали значительное разнообразие микробного состава при ХОБЛ. Основными представителями во всех образцах являются семь бактериальных типов, но в качестве преобладающих таксонов могут быть выделены три основных типа *Firmicutes* (54,76%), *Proteobacteria* (26,76 %) и *Bacteroidetes* (8,80%). Обнаруженные таксоны представлены в таблице 3.3.

Таблица 3.3 – Представленность бактериальных типов в метагеноме мокроты пациентов с ХОБЛ

Тип	% представленности типов в метагеноме
Firmicutes	54,76%
Proteobacteria	26,76%
Bacteroidetes	8,80%

Actinobacteria	5,71%
Fusobacteria	3,33%
TM7	0,41%
Tenericutes	0,11%
Прочее	0,12%

4 ФИНАНСОВЫЙ МЕНЕДЖМЕНТ, РЕСУРСОЭФЕКТИВНОСТЬ И РЕСУРСОСБЕРЕЖЕНИЕ

В данной научно-исследовательской работе проводится анализ выбора методов выделения ДНК для определения микробиотического сообщества в различных биологических средах.

Целью данного раздела «Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение» является определение перспективности, целесообразности проведения научного исследования с точки зрения ресурсоэффективности.

В задачи раздела входит: определение концепции научного исследования (Инициация научного исследования), планирование научного исследования, расчет бюджета научного исследования, определение ресурсоэффективности научного исследования.

4.1 Инициация научного исследования (НИ)

Данное научное исследование направлено на разработку выбора методов выделения ДНК для определения микробиотического сообщества в различных биологических средах с использованием технологии высокопроизводительного секвенирования.

Основные цели и ожидаемые результаты научного исследования представлены на таблице 4.1.

Таблица 4.1 - Цели и результат научного исследования

Цели научного исследования:	Разработка методики выделения ДНК для определения микробиотического сообщества у больных ХОБЛ.
Ожидаемые результаты научного исследования:	а) литературный обзор б) пробоподготовка биологических образцов для выделения ДНК в) выделение бактериальной ДНК из биологических образцов г) выбор метода выделения бактериальной ДНК из мокроты у пациентов, больных ХОБЛ д) определение таксономического состава в биологических образцах
Требования к результату научного исследования:	Требование:
	Выделение бактериальной ДНК из биологических образцов должно проводиться без использования коммерческих наборов
	Выбранный метод выделения ДНК должен обеспечивать экстракцию бактериальной ДНК из мокроты человека
	Выделенная бактериальная ДНК должна быть пригодна для ампликонного метагеномного секвенирования

В таблице 4.2. представлены заинтересованные стороны научного исследования.

Таблица 4.2 - Заинтересованные стороны научного исследования

Заинтересованные стороны научного исследования	Ожидания заинтересованных сторон
Централизованные бактериологические лаборатории	Будут разработаны методики выделения бактериальной ДНК из биологических образцов
Учреждения высшего профессионального образования и науки	Будут разработаны технические требования и предложения по пробоподготовке биологических образцов

К выполнению научного исследования привлечены централизованные бактериологические лаборатории, а также образовательные учреждения:

- Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Томск (головной исполнитель);

- Федеральный научно-клинический центр Физико-химической медицины ФМБА, г. Москва;

4.1.1 Потенциальные потребители результатов исследования

Потенциальными потребителями результатов исследования могут быть централизованные бактериологические лаборатории, научно-исследовательские институты. Это связано с тем, что выявление бактерий, специфичных для ХОБЛ может оказаться полезными для создания новых подходов к диагностике, а также значительно расширит понимание патогенетических механизмов развития данного заболевания. Так же потенциальными потребителями могут быть различные базы данных, хранящие и предоставляющие информацию о последовательностях генов микроорганизмов. Новая информация о геномах секвенированных организмов, ассоциированных с ХОБЛ, поможет развитию других научных проектов.

4.1.2 Анализ конкурентных технических решений с позиции ресурсоэффективности и ресурсосбережения

Анализ конкурентных технических решений с позиции ресурсоэффективности и ресурсосбережения проводился сравнением эффективности научной разработки с разработкой, проводимой учеными Швейцарии (Табл.4.3).

Таблица 4.3 - Оценочная карта для сравнения конкурентных технических решений (разработок)

Критерии оценки	Вес критерия	Баллы		Конкурентоспособность	
		Б _ф	Б _{к1}	К _ф	К _{к1}
1	2	3	4	5	6
Технические критерии оценки ресурсоэффективности					
1.Использование высокотехнологичных методов молекулярной биологии	0,2	5	5	1	1
2. Модель исследования	0,1	5	4	0,5	0,4
3. Надежность	0,3	4	4	1,2	1,2
Экономические критерии оценки эффективности					
1.Конкурентоспособность продукта	0,2	5	4	1	0,8
2.Финансирование научной разработки	0,2	5	5	1	1
Итого	1			4,7	4,4

где Б_ф – научное исследование, которое реализовано в Центральной научно-исследовательской лаборатории (ЦНИЛ) г. Томск,

Б_{к1} – научное исследование, проводимое в университете Берн (Швейцария) на кафедре инфекционных болезней.

Анализ конкурентных технических решений определяется по формуле:

$$K = \sum V_i \cdot B_i, \quad (1)$$

где K – конкурентоспособность научной разработки или конкурента;

V_i – вес показателя (в долях единицы);

B_i – балл i-го показателя.

На основании анализа конкурентных технических решений с позиции ресурсоэффективности и ресурсосбережения с помощью оценочной карты был сделан SWOT- анализ [51], который представлен в таблице 4.4.

Таблица 4.4 - Матрица SWOT

Сильные стороны научного исследования:	Возможности
<ul style="list-style-type: none"> - Заявленная экономичность и энергоэффективность технологии. - Объект исследования. -Наличие необходимого оборудования. - Наличие бюджетного финансирования. - Квалифицированный персонал. 	<ul style="list-style-type: none"> - Использование инновационной инфраструктуры ТПУ - Использование инфраструктуры ЦНИЛ - Использование инфраструктуры 6 ЛПУ - Повышение стоимости конкурентных разработок
Слабые стороны научного исследования	Угрозы
<ul style="list-style-type: none"> - Высокая стоимость исследования -Большой срок поставок материалов и комплектующих, используемых при проведении научного исследования -Проблематичность транспортировки ДНК на секвенирование 	<ul style="list-style-type: none"> -Отсутствие спроса на новые технологии производства -Несвоевременное финансовое обеспечение научного исследования со стороны государства -Введение дополнительных государственных требований к сертификации продукции -Развитая конкуренция технологий производства

Вывод: Проанализировав основные критерии сравнения, можно сделать вывод, что разрабатываемое нами исследование определения микробиотического сообщества у больных ХОБЛ превосходит как в ресурсоэффективности, так и экономической активности результаты исследований ученых университета Берн. В качестве объекта исследования, выполненное учеными Швейцарии были выбраны пациенты, больные ХОБЛ, а также мыши, инициированные с ХОБЛ. В проведенном нами исследовании в качестве объекта участвовала группа индивидов, больных хронической обструктивной болезнью легких.

4.2 Планирование научного исследования

4.2.1 Организационная структура НИ

Планирование комплекса предполагаемых работ осуществляется в следующем порядке:

- определение структуры работ в рамках научного исследования;
- определение участников каждой работы;
- установление продолжительности работ;
- построение графика проведения научных исследований.

Для выполнения научных исследований формируется рабочая группа, в состав которой могут входить научные сотрудники и преподаватели, инженеры, техники и лаборанты, численность групп может варьироваться. По каждому виду запланированных работ устанавливается соответствующая должность исполнителей. Рабочая группа научного исследования и функции исполнителей указаны в таблице 4.5.

Таблица 4.5 - Рабочая группа научного исследования

№ пп	ФИО, основное место работы, должность	Роль в НИ	Функции
1	Салтыкова И.В., ЦНИЛ СибГМУ, научный сотрудник	Руководитель НИ	Ежедневное управление НИ, контроль за ходом работы НИ
2	Минобр науки РФ	Заказчик НИ	Финансирование НИ
3	ЗАО «Корпорация МетаСинтез»	Эксперт НИ	Анализ полученных результатов по установленным правилам и критериям
4	1. Дорофеева Ю.Б., ЦНИЛ СибГМУ, младший научный сотрудник 2. Майрамбекова М.М., ТПУ, БИОХ, магистрант	Исполнители по НИ	Пробоподготовка биоматериалов, выделение ДНК и т.д.

Для реализации научного исследования выбора методики для выделения ДНК необходимо реализовать ряд задач, связанных с научными и техническими проблемами. Основные решаемые задачи в данном исследовании указаны на рисунке 4.1.

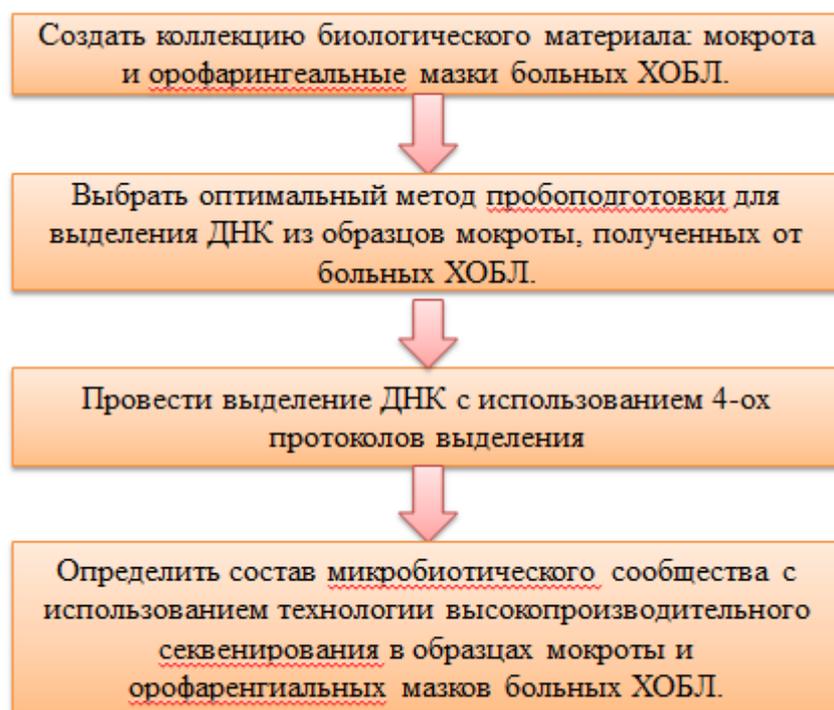


Рисунок 4.1 - Основные задачи научного исследования

Задачи исследования решаются на базе в Центральной научно-исследовательской лаборатории СибГМУ в г. Томск и в Научно-исследовательском институте физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства в г. Москва.

4.2.2 Ограничения и допущения НИ

Таблица 4.6 - Ограничения научного исследования

Фактор	Ограничения/допущения
3.1. Бюджет НИ	1664500,544 р.
3.1.1. Источник финансирования	ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014 – 2020 годы», соглашение от 27.07.14 г. № 14.604.21.0075.
3.2. Сроки НИ:	ГК № 16.604.21.0075, от 27.06.2014 г.
3.2.1. Дата утверждения плана НИ	27.06.2014 г.
3.2.2. Дата завершения НИ	27.06.2016 г.

4.2.3 План научного исследования

Для проведения детальной декомпозиции научно-исследовательской работы был составлен перечень основных этапов реализации исследования:

1. Разработка технического задания
2. Выбор направления исследований
3. Теоретические и экспериментальные исследования
4. Обобщение и оценка результатов

Порядок составления этапов и работ, распределение исполнителей по данным видам деятельности приведен в таблице 4.7. Таблица 4.7 - Перечень этапов, работ и распределение исполнителей

Основные этапы	№ ра б	Содержание работ	Должность исполнителя
Разработка технического задания НИ	1	Составление и утверждение технического задания	Руководитель
Выбор направления исследований	2	Подбор и изучение материалов по теме	Магистрант
	3	Выбор направления исследований	Руководитель
	4	Календарное планирование работ по теме	Руководитель, Магистрант

Продолжение			
Теоретические и экспериментальные исследования	5	Проведение теоретических расчетов и обоснований	Дипломник
	6	Построение макетов (моделей) и проведение экспериментов	Руководитель, Магистрант
	7	Набор коллекции биоматериала	Руководитель, Магистрант
	8	Пробоподготовка образцов	Магистрант
	9	Выделение ДНК из биологических образцов	Магистрант
	10	Определение концентрации и чистоты ДНК	Магистрант
	11	Секвенирование на платформе нового поколения	ФНКЦ Физико-Химической Медицины ФМБА, г. Москва
	12	Биоинформационный анализ	Руководитель, Магистрант
	13	Сопоставление результатов экспериментов с теоретическими исследованиями	Руководитель, Магистрант
Обобщение и оценка результатов	14	Оценка эффективности полученных результатов	Руководитель, Магистрант
	15	Определение целесообразности проведения ОКР	Руководитель

4.2.3.1 Определение трудоемкости выполнения работ

Трудовые затраты в большинстве случаев образуют основную часть стоимости разработки, поэтому важным моментом является определение трудоемкости работ каждого из участников научного исследования. Для

определения ожидаемого (среднего) значения трудоемкости $t_{ожі}$ используется следующая формула:

$$t_{ожі} = \frac{3t_{\min i} + 2t_{\max i}}{5}, \quad (1)$$

где $t_{ожі}$ – ожидаемая трудоемкость выполнения i -ой работы чел.-дн.;

$t_{\min i}$ – минимально возможная трудоемкость выполнения заданной i -ой работы (оптимистическая оценка: в предположении наиболее благоприятного стечения обстоятельств), чел.-дн.;

$t_{\max i}$ – максимально возможная трудоемкость выполнения заданной i -ой работы (пессимистическая оценка: в предположении наиболее неблагоприятного стечения обстоятельств), чел.-дн.

Определение продолжительности работ в рабочих днях производится по формуле:

$$T_{pi} = \frac{t_{ожі}}{Ч_i}, \quad (2)$$

где T_{pi} – продолжительность одной работы, раб. дн.;

$t_{ожі}$ – ожидаемая трудоемкость выполнения одной работы, чел.-дн.

$Ч_i$ – численность исполнителей, выполняющих одновременно одну и ту же работу на данном этапе, чел.

4.2.3.2 Разработка графика проведения научного исследования

Наиболее удобным и наглядным в данном случае является построение ленточного графика проведения научных работ в форме диаграммы Ганта.

Для удобства построения графика, длительность каждого из этапов работ из рабочих дней следует перевести в календарные дни. Для этого необходимо воспользоваться следующей формулой:

Формула для перевода рабочих дней в календарные:

$$T_{ki} = T_{pi} \cdot k_{\text{кал}}, \quad (3)$$

где T_{ki} – продолжительность выполнения i -й работы в календарных днях;

T_{pi} – продолжительность выполнения i -й работы в рабочих днях;

$k_{\text{кал}}$ – коэффициент календарности.

Формула для расчета коэффициента календарности:

$$k_{\text{кал}} = \frac{T_{\text{кал}}}{T_{\text{кал}} - T_{\text{вых}} - T_{\text{пр}}}, \quad (4)$$

где $T_{\text{кал}}$ – количество календарных дней в году;

$T_{\text{вых}}$ – количество выходных дней в году;

$T_{\text{пр}}$ – количество праздничных дней в году.

Расчет коэффициента календарности:

$$k_{\text{кал}} = \frac{365}{365 - 118 - 14} = 1,56$$

Все рассчитанные значения сведены в таблицу 4.8.

Таблица 4.8 - Временные показатели проведения научного исследования

Название работы	Трудоёмкость работ			Исполнители		Длительность работ в рабочих днях T_{pi}	Длительность работ в календарных днях T_{ki}
	t_{min} , чел-дни	t_{max} , чел-дни	$t_{\text{ожг}}$, чел-дни				
	Исп. 1	Исп. 1	Исп. 1	Исп. 1		Исп. 1	
Составление и утверждение технического задания	0,5	0,7	0,58	Р	-	0,58	0,86
Подбор и изучение материалов по теме	60	91	72,4	-	М	72,4	107,5

Продолжение

Выбор направления исследований	0,5	0,7	0,58	P	-	0,58	0,86
Календарное планирование работ по теме	0,3	0,5	0,38	P	M	0,19	0,28
Проведение теоретических расчетов и обоснований	7	10	8,2	-	M	8,2	12,2
Построение макетов (моделей) и проведение экспериментов	61	91	73	P	M	36,5	54,2
Набор коллекции биоматериала	78	100	86,8	P	M	43,4	64,5
Пробоподготовка образцов	70	90	78	-	M	115,8	128,9
Выделение ДНК из биологических образцов	6	8	6,8	P	M	3,4	5
Секвенирование	100	120	108	M Г У	-	108	160,4
Биоинформационный анализ	30	40	34	P	M	17	25,2
Сопоставление результатов экспериментов с теоретическими исследованиями	7	10	6,2	P	M	3,1	4,6
Оценка эффективности полученных результатов	1	2	1,4	P	M	0,7	1
Определение целесообразности проведения ОКР	0,5	0,7	0,58	P	-	0,58	0,86
Составление пояснительной записки (эксплуатационно-технической документации)	20	30	24	-	M	24	35,6
Итого:						106,03 324,69	

Таблица 4.10 - План управления коммуникациями

№ п / п	Какая информация передается	Кто передает информацию	Кому передается информация	Когда передает информацию
1.	Статус НИ	Руководитель НИ	Представителю заказчика	Ежеквартально (первая декада квартала)
2.	Обмен информацией о текущем состоянии НИ	Исполнитель НИ	Участникам НИ	Еженедельно (понедельник)
3.	Документы и информация по НИ	Ответственное лицо по направлению	Руководителю НИ	Не позже сроков графиков и к. точек
4.	О выполнении контрольной точки	Исполнитель НИ	Руководителю НИ	Не позже дня контрольного события по плану управления

4.2.4.1 План управления контрактами и поставками

Управление поставками и контрактами включает в себя процессы, требуемые для обеспечения поставки товаров и услуг извне, а также предусматривает администрирование всех контрактов на приобретение, основные требования к объекту продукта, заключенных сторонней организацией с исполняющей организацией и администрирование контрактных обязательств команды научного исследования. Данные по этому пункту сводятся в таблицах 4.11 и 4.12.

Таблица 4.11 - Требования к объектам контрактов

№	Объект контракта (продукт/услуга)	Требования к продукту/услуге	Требования к срокам поставки	Требования к поставщику/субподрядчику
1	Этанол	Должен быть изготовлен в соответствии с требованиями ГОСТ 18300-72 и зарегистрирован и разрешен к медицинскому применению	60 рабочих дней	Товарный вид, наличие всех необходимых маркировок, наклеек и количество содержащего в ней.
2	Кремниевые-циркониевые бусины Zirconia/Silica Beads		65 рабочих дней	Герметичная упаковка, чтобы избежать
3	Этилендиаминтетрауксусная кислота	Белый кристаллический порошок, хорошо растворимый в воде. По ГОСТу 113-04-146-84	60 рабочих дней	Упаковка и маркировка и сопровождаемый документ о качестве в соответствии с ГОСТ 3885 и ТУ Т113-04-146-84
4	Додецилсульфат натрия	Белый порошок	60 рабочих дней	ГСО 7348-96
5	N-ацетил-L-цистеин, NAC	Медицинский препарат	65 рабочих дней	
6	Sputasol	Препарат для разжижения мокроты	90 рабочих дней	

Таблица 4.12 - План закупок НИ

№	Закупаемые материалы/услуги	Количество	Поставщик
1	Кремниевое-циркониевые бусины Zirconia/Silica Beads	1 б	ООО «РУСХИМБИО»
2	Изопропанол	1 л	
3	N-ацетил-L-цистеин, NAC	50 г	
4	Этилендиаминтетрауксусная кислота ЭДТА	1	ООО «Компания Хеликон»
5	Sputasol	200 шт	ООО «БиоВитрум-Сибирь»

4.2.5 Реестр рисков научного исследования

Идентифицированные риски проекта включают в себя возможные неопределенные события, которые могут возникнуть в ходе научного исследования и вызвать последствия, которые повлекут за собой нежелательные эффекты. Информация по данному разделу сводится в таблице 4.13.

Таблица 4.13 - Реестр рисков

№	Риск	Потенциальное воздействие	Вероятность наступления (1-5)	Влияние риска (1-5)	Способы смягчения риска	Условия наступления
1	Несвоевременный срок поставки	Задержка реализации проекта	2	3	Соглашение договора о максимальном сроке поставки Резервирование	Возможно
2	Инфляция	Нехватка денежных средств	3	4	Создание достаточного резерва при формировании бюджета	Вполне возможно

Продолжение						
3	Перерасход средств	Кризис ликвидности	2	3	Резервирование средств	Вероятно
4	Рост цен на материальные закупки	Нехватка денежных средств	3	4	Соглашение о фиксированной цене	Маловероятно
5	Низкое качество изготовления комплектующих	Низкая результативность	2	2	Отказ	Маловероятно
6	Неисправность оборудования и спецтехники	Качество выполняемых работ	2	2	Контроль перед началом работы	Маловероятно
7	Опасность повреждения биообразцов при транспортировке	Переделывание	1	1	Соблюдение правил	Маловероятно

Вывод: Исходя из SWOT – анализа был разработан план научного исследования, который состоит из 4 основных этапов. На основании планирования научного исследования (НИ) была составлена рабочая группа НИ, распределены работы для исполнителей НИ, определена трудоемкость выполнения работ, план управления коммуникациями, контрактами и поставками и т.д.

4.3 Бюджет научного исследования

4.3.1 Расчет материальных затрат

Данный раздел включает стоимость всех материалов, используемых для выполнения научного исследования. Материальные затраты, необходимые для данного исследования занесены в таблицу 4.14.

Таблица 4.14 - Материальные затраты

Наименование	Единица измерения	Количество	Цена за ед., руб.	Затраты на материалы, (З _м), руб.
Натрия ацетат	1 кг	0,3	201,78	72,64
Этанол	1 л	1	900,00	1080,00
Изопропанол	2,5 л	0,5	3909,75	781,95
Кремниво-циркониевые бусины Zirconia/Silica Beads	1 кг	0,250	8932,00	2233,00
Этилендиаминтетрауксусная кислота	1 кг	0,1	4432,30	531,88
Додецилсульфат натрия	1 кг	0,1	3656,00	438,72
N-ацетил-L-цистеин, NAC	50 г	1	6064,11	6064,11
Sputasol	7,5 мл	30	32397,29	97191,87
Итого				108394,17

4.3.2 Расчет затрат на специальное оборудование для научных (экспериментальных) работ

Расчет затрат на специальное оборудование для научных (экспериментальных) работ включают все расходы, связанные с

приобретением оборудования, необходимого для проведения работ по теме.
Все расчеты сводятся в таблице 4.15.

Таблица 4.15 - Расчет бюджета

№ п / п	Наименован ие оборудован ия	Кол-во единиц оборуд ования, шт	Цена единицы оборудо вания, тыс.руб.	Общая стоимость оборудо вания, тыс.руб.	Сумма амортизаци онных отчислений
1	Пробирки Эппендорф 1,5 мл	500	0,00045	0,225	-
2	Пробирки Эппендорф 2,0 мл	300	0,00053	0,159	-
3	Наконечник и для дозаторов (0,1-200 мкл)	960	7,5	7,5	-
4	Наконечник и для дозаторов (200-1000 мк)	960	4,5	4,5	-
6	Дозаторы (Proline) 0,1- 2,5 мкл	1	4,57	4,57	-
Итого:					16,954

В процессе выполнения работ по выделению ДНК из образцов орофарингеального мазка и мокроты для проведения последующего секвенирования было задействовано оборудование, находящиеся на балансе ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России.

4.3.3 Основная заработная плата исполнителей темы

Раздел включает основную заработную плату работников, непосредственно занятых выполнением НИИ, (включая премии, доплаты) и дополнительную заработную плату:

$$Z_{зп} = Z_{осн} + Z_{доп}, \quad (5)$$

$$Z_{зп.руков.} = 226338,4 + 27106,6 = 253,499 \text{ (руб.)}$$

$$Z_{зп.дипл.} = 41615,28 + 5826,14 = 47441,42 \text{ (руб.)}$$

где $Z_{осн}$ – основная заработная плата;

$Z_{доп}$ – дополнительная заработная плата (12-20 % от $Z_{осн}$).

Основная заработная плата ($Z_{осн}$) руководителя (от СибГМУ) рассчитывается на основании отраслевой оплаты труда. Размер окладов определяется согласно в соответствии с занимаемыми должностями СибГМУ.

Формула по основной заработной плате:

$$Z_{осн} = Z_{дн} \cdot T_p, \quad (6)$$

$$Z_{осн.руков.} = 1230,1 \cdot 184 = 226338,4 \text{ (руб.)}$$

$$Z_{осн.дипл.} = 226,17 \cdot 184 = 41615,28 \text{ (руб.)}$$

где $Z_{осн}$ – основная заработная плата одного работника;

T_p – продолжительность работ, выполняемых научно-техническим работником, раб. дн.;

$Z_{дн}$ – среднедневная заработная плата работника, руб.

Среднедневная заработная плата рассчитывается по формуле:

$$Z_{дн} = \frac{Z_m \cdot M}{F_d}, \quad (7)$$

$$Z_{дн.руков.} = \frac{30888 \cdot 10,4}{261} = 1230,1 \text{ (руб.)}$$

$$Z_{дн.дипл.} = \frac{5850 \cdot 10,4}{269} = 226,17 \text{ (руб.)}$$

где Z_m – месячный должностной оклад работника, руб.;

M – количество месяцев работы без отпуска в течение года: при отпуске в 48 раб. дней $M=10,4$ месяца, 6-дневная неделя;

F_d – действительный годовой фонд рабочего времени научно-технического персонала, раб. дн.

Таблица 4.16 - Баланс рабочего времени

Показатели рабочего времени	Руководите ль	Магистр ант
Календарное число дней	365	365
Количество нерабочих дней	118	118
- выходные дни	14	14
- праздничные дни		
Потери рабочего времени		
- отпуск	48	35
- невыходы по болезни		
Действительный годовой фонд рабочего времени	261	269

Месячный должностной оклад работника:

$$Z_m = Z_{тс} \cdot (1 + k_{пр} + k_d) \cdot k_p, \quad (8)$$

$$Z_{м.руков.} = 13200 \cdot (1 + 0,3 + 0,5) \cdot 1,3 = 30888 \text{ (руб.)}$$

$$Z_{м.дипл.} = 3000 \cdot (1 + 0,3 + 0,2) \cdot 1,3 = 5850 \text{ (руб.)}$$

где $Z_{тс}$ – заработная плата по тарифной ставке, руб.;

$k_{пр}$ – премиальный коэффициент, равный 0,3 (т.е. 30% от $Z_{тс}$);

k_d – коэффициент доплат и надбавок составляет примерно 0,2 – 0,5 (в

НИИ и на промышленных предприятиях – за вредные условия: 15-20% от $Z_{тс}$);

k_p – районный коэффициент, равный 1,3 (для Томска).

Расчёт основной заработной платы приведён в табл. 23

Таблица 4.17 - Расчёт основной заработной платы

Исполнители	$Z_{тс}$, руб.	$k_{пр}$	$k_{д}$	$k_{р}$	$Z_{м}$, руб	$Z_{дн}$, руб.	$T_{р}$, раб. дн.	$Z_{осн}$, руб.
Руководитель	13200	0,3	0,5	1,3	30888	1230,1	184	226338
Мастрант	3000	0,3	0,2	1,3	5850	226,17	356	41615,2

Затраты по дополнительной заработной плате исполнителей темы учитывают величину предусмотренных Трудовым кодексом РФ доплат за отклонение от нормальных условий труда, а также выплат, связанных с обеспечением гарантий и компенсаций. Расчет дополнительной заработной платы:

$$Z_{доп} = k_{доп} \cdot Z_{осн} \quad (9)$$

$$Z_{доп,руков.} = 0,14 \cdot 226338,4 = 31687,4 \text{ (руб.)}$$

$$Z_{доп,дипл.} = 0,14 \cdot 41615,28 = 5826,14 \text{ (руб.)}$$

где $k_{доп}$ – коэффициент дополнительной заработной платы (0,12 – 0,15).

4.3.3.1 Отчисления во внебюджетные фонды (страховые отчисления)

В разделе отражаются обязательные отчисления по установленным законодательством Российской Федерации нормам органам государственного социального страхования (ФСС), пенсионного фонда (ПФ) и медицинского страхования (ФФОМС) от затрат на оплату труда работников. Величина отчислений во внебюджетные фонды:

$$Z_{внеб} = k_{внеб} \cdot (Z_{осн} + Z_{доп}), \quad (10)$$

$$Z_{\text{внеб.руков.}} = 0,271 \cdot (226338,4 + 31687,4) = 69925 \text{ (руб.)}$$

$$Z_{\text{внеб.руков.}} = 0,271 \cdot (41615,28 + 5826,14) = 12856,6 \text{ (руб.)}$$

где $k_{\text{внеб}}$ – коэффициент отчислений на уплату во внебюджетные фонды (пенсионный фонд, фонд обязательного медицинского страхования и пр.).

На 2014 г. в соответствии с Федеральным законом от 24.07.2009 №212-ФЗ установлен размер страховых взносов равный 30%. На основании пункта 1 ст.58 закона №212-ФЗ для учреждений осуществляющих образовательную и научную деятельность в 2014 году водится пониженная ставка – 27,1%. Отчисления во внебюджетные фонды представлены в таблице 4.18.

Таблица 4.18 - Отчисления во внебюджетные фонды

Исполнитель	Основная заработная плата, руб.	Дополнительная заработная плата, руб.
Руководитель	226338,4	31687,4
Студент-магистрант	41615,28	12856,6
Коэффициент отчислений во внебюджетные фонды	0,271	
		Итого: 84686,8

4.3.4.2 Контрагентные расходы

Контрагентные расходы включают затраты, связанные с выполнением реализации секвенирования по теме. Расходы составили 250 тыс. руб. для оплаты договора с ФНКЦ Физико-химической медицины ФМБА, г. Москва.

4.3.4.3 Накладные расходы

Накладные расходы учитывают прочие затраты организации, не попавшие в предыдущие статьи расходов: печать и ксерокопирование, оплата услуг связи, электроэнергии, почтовые расходы и т.д. Их величина определяется по формуле:

$$Z_{\text{накл}} = (\text{сумма статей } 1 \div 6) \cdot k_{\text{нр}}, \quad (11)$$

$Z_{\text{накл.}} = (76275,64 + 4930375,5 + 322956,80 + 45214,00 + 99774,30 + 250000,00) * 0,16 = 915935,40$ (руб.)

где $k_{\text{нр}}$ – коэффициент, учитывающий накладные расходы (16%).

Для определения производственной программы в стоимостном выражении был произведен расчет материальных затрат, специального оборудования для экспериментальных работ, фондов заработной платы по категориям работающих и общий плановый фонд заработной платы исполнителей данного научного исследования. Расчет основной заработной платы исполнителей составил 267953,68 рублей.

Таблица 4.19- Статья затрат

Статья затрат	Стоимость затрат, тыс. руб.
I. Приобретение основных средств	108411,124
1.1. Материальные затраты НИ	108394,17
1.2. Затраты на приобретение спецоборудования для научных работ	16,954
II. Пополнение оборотных средств	1556089,42
2.1. Затраты по основной заработной плате исполнителей темы	267953,68
2.2. Затраты по дополнительной заработной плате исполнителей темы	37513,54
2.1. ФОТ основных рабочих, включая взносы во внебюджетные фонды	84686,8
2.3. Контрагентные расходы	250000,00
2.4. Накладные расходы	915935,40
Всего	1664500,544

Вывод: Как видно из проведенного анализа бюджета НИ, сумма материальных затрат составила 108411,124 рублей, а затраты на специальное оборудование для экспериментальных работ равна 16,954 р. При этом нужно учесть, что в качестве специального оборудования на таблице 21 приведены

только дозаторы, наконечники и пробирки, т.к. в процессе выполнения работ по выделению ДНК орофарингеального мазка и мокроты для проведения последующего секвенирования было задействовано оборудование, находящиеся на балансе ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России.

4.4 Определение ресурсной (ресурсосберегающей), экономической эффективности исследования

4.4.1 Оценка сравнительной эффективности исследования

Определение эффективности происходит на основе расчета интегрального показателя эффективности научного исследования. Его нахождение связано с определением двух средневзвешенных величин: финансовой эффективности и ресурсоэффективности [52].

Интегральный финансовый показатель разработки определяется как:

$$I_{\text{финр}}^{\text{исп.}i} = \frac{\Phi_{pi}}{\Phi_{\text{max}}} = \frac{6640513,64}{7050000,00} = 0,94 \quad (12)$$

где $I_{\text{финр}}^{\text{исп.}i}$ – интегральный финансовый показатель разработки;

Φ_{pi} – стоимость i -го варианта исполнения;

Φ_{max} – максимальная стоимость исполнения научно-исследовательского проекта (в т.ч. аналоги).

Полученная величина интегрального финансового показателя разработки отражает соответствующее численное удешевление стоимости разработки в разгах.

Интегральный показатель ресурсоэффективности вариантов исполнения объекта исследования можно определить следующим образом:

$$I_{pi} = \sum a_i \cdot b_i, \quad (13)$$

где I_{pi} – интегральный показатель ресурсоэффективности для i -го варианта исполнения разработки;

a_i – весовой коэффициент i -го варианта исполнения разработки;

b_i^a, b_i^p – бальная оценка i -го варианта исполнения разработки, устанавливается экспертным путем по выбранной шкале оценивания;

n – число параметров сравнения.

Таблица 4.20 - Оценка характеристик вариантов исполнения научного исследования

Критерии	Весовой коэффициент параметра	Исп.1
1.Использование высокотехнологичных методов молекулярной биологии производительности труда пользователя	0,2	5
2. Модель исследования	0,1	5
3. Надежность	0,3	4
4. Конкурентоспособность продукта	0,2	5
5. Финансирование научной разработки	0,2	5
ИТОГО	0,2	5

$$I_{pi} = 0,2*5+0,1*5+0,3*4+0,2*5+0,2*5=4,7$$

Интегральный показатель эффективности вариантов исполнения

разработки ($I_{исп.i}$) определяется на основании интегрального показателя ресурсоэффективности и интегрального финансового показателя по формуле:

$$I_{исп.1} = \frac{I_{p-исп1}}{I_{финр}^{исп.1}} \quad (14)$$

$$I_{исп1} = \frac{4,7}{0,94} = 5$$

Сравнение интегрального показателя эффективности вариантов исполнения разработки позволит определить сравнительную эффективность

научного исследования и выбрать наиболее целесообразный вариант из предложенных. Сравнительная эффективность указаны в таблице 26.

Таблица 4.21 - Сравнительная эффективность разработки

№ п	Показатели	Разработка
1	Интегральный финансовый показатель разработки	0,9
2	Интегральный ресурсоэффективности разработки показатель	4,7
3	Интегральный показатель эффективности	5

Вывод: из приведенных расчетов выявлено, что данное научное исследование по интегральному показателю ресурсоэффективности вариантов является выгодным и превосходит аналоги.

Вывод по разделу «Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение»

В ходе разработки данной главы магистерской диссертации были решены следующие задачи:

1. Проведена оценка коммерческого потенциала и эффективности проведения научного исследования на примере SWOT-анализа. В процессе проведенного SWOT - анализа были определены следующие преимущества исследования: а) в связи с наличием всего необходимого для проведения исследования, результаты могут привести к разработке нового метода диагностики ХОБЛ, который будет обладать высокой конкурентоспособностью. б) результаты эксперимента будут иметь высокий спрос, если экономическое положение РФ будет более благоприятным.

Таким образом, можно сделать вывод, что разрабатываемое нами исследование превосходит как в ресурсоэффективности, так и в экономической активности результата. Вследствие этого фактора конкурентоспособность предлагаемого результата исследования увеличивается. Но важно отметить, что также существует большое количество нюансов в рамках исследования,

которые могут задержать эксперимент и снизить финансовую эффективность – это проведение исследования с участием высокотехнологичных методов молекулярной биологии. Отсутствие финансирования и незаинтересованность потенциальных потребителей в научной разработке является проблемой для дальнейшего ее развития.

2. Составлен план научного исследования, в котором разработан календарный план, определены контрольные события научного исследования (результаты каждого этапа представлены в приложении В). Было составлено 4 основных этапов реализации исследования, в котором общее содержание работ составило 16. Для построения таблицы временных показателей проведения НИ был рассчитан коэффициент календарности. С помощью данных показателей был разработан календарный - план график проведения НИ по теме. Для иллюстрации календарного плана была использована диаграмма Ганта, что указывает на целесообразность проведения данного исследования.

В результате проведенного планирования НИ была также произведена оценка рисков, которая является одним из важнейших моментов при создании научного исследования. На основе общих рисков НИ, приведенные в таблице 19 можно сделать вывод, что данное исследование не лишено вероятных препятствий. Оценка групп риска с наиболее высокими показателями наступления буден учтена на подготовительном этапе, чтобы снизить их отрицательное влияние на данное исследование в целом.

3. Рассчитан бюджет научного исследования. Как видно из проведенного анализа общая стоимость настоящего научного исследования 1664500,544 рублей и включает две составляющие:

- приобретение основных средств – 108411,124 тыс.руб.;
- пополнение оборотных средств – 1556089,42 тыс.руб.;

4. Определена целесообразность проведения научного исследования с точки зрения ресурсоэффективности, а также произведен расчет экономической эффективности и ресурсоэффективности данного исследования. Определение экономической эффективности был рассчитан на основе интегрального

показателя. Из приведенных расчетов выявлено, что данное научное исследование по интегральному показателю ресурсоэффективности вариантов является выгодным и превосходит аналоги.

Исходя из полученных результатов вышеприведенного экономического обоснования, ряд задач, поставленные для осуществления цели данного раздела «Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение» выполнены. В целом данное научное исследование является перспективным и целесообразным с точки зрения ресурсоэффективности.

Данное научное исследование является также экономически обоснованным и будет востребован централизованными бактериологическими лабораториями, а также учреждениями высшего профессионального образования и науки.

Список публикаций

1. Выбор оптимального метода с использованием технологии высокопроизводительного секвенирования: Международная научно-практическая конференция студентов и молодых ученых «Химия и химическая технология в XXI веке» имени профессора Л.П. Кулёва, посвященной 120-летию Томского политехнического университета.