

Инженерная школа новых производственных технологий
 Направление подготовки 19.03.01 Биотехнология, профиль Биотехнология
 Отделение школы (НОЦ) Н.М. Кижнера

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

Тема работы
Оценка влияния микробиоты пациентов с болезнью Паркинсона на экспрессионный профиль клеток нейробластомы в эксперименте <i>in vitro</i>

УДК 612.336.3:616.858:616-006

Студент

Группа	ФИО	Подпись	Дата
4Д51	Гридина Мария Вадимовна		10.06.2019

Руководитель ВКР

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент НОЦ Н.М. Кижнера	Штрыкова В.В.	к.х.н., доцент		10.06.2019

Консультант

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Научный сотрудник ЦНИЛ СибГМУ	Салтыкова И.В.	к.м.н.		3.06.19

КОНСУЛЬТАНТЫ ПО РАЗДЕЛАМ:

По разделу «Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение»

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент ОСГН ШБИП	Креницына З.В.	к.т.н., доцент		17.05.2019

По разделу «Социальная ответственность»

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Старший преподаватель ООД ШБИП	Скачкова Л.А.			30.05.19

ДОПУСТИТЬ К ЗАЩИТЕ:

Руководитель ООП	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Руководитель ООП 19.03.01 Биотехнология	Лесина Ю.А.	к.х.н.		10.06.19

*Планируемые результаты обучения
по ООП 19.03.01 «Биотехнология» (бакалавр)
профиль «Биотехнология»*

Код результата	Результат обучения (выпускник должен быть готов)
<i>Общекультурные компетенции</i>	
P1	Способность самостоятельно совершенствовать и развивать свой интеллектуальный, общекультурный и профессиональный уровень, добиваться нравственного и физического совершенствования своей личности
P2	Готовность к кооперации с коллегами для выполнения научно-исследовательских и научно-производственных работ, в том числе интернациональных; способность проявлять инициативу, личную ответственность; быть коммуникабельным.
P3	Демонстрировать понимание вопросов устойчивого развития современной цивилизации, безопасности и здравоохранения, юридических аспектов, ответственности за инженерную деятельность, влияние инженерных решений на социальный контекст и социальную среду
<i>Профессиональные компетенции</i>	
P4	Способность к овладению базовыми знаниями в области базовых естественных и технических наук, применение их в различных видах профессиональной деятельности
P5	Понимать сущность и значение информации в развитии современного информационного общества, быть готовым к использованию в профессиональной деятельности информационных и коммуникативных технологий
P6	Быть способным к планированию, проведению теоретических и экспериментальных исследований, обработке полученных результатов и представлению их в форме, адекватной задаче
P7	Быть способным к организационно-управленческой и инновационной деятельности в биофармацевтической области, демонстрировать знания для решения проблем устойчивого развития

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
 федеральное государственное автономное
 образовательное учреждение высшего образования
 «Национальный исследовательский Томский политехнический университет» (ТПУ)

Инженерная школа новых производственных технологий
 Направление подготовки 19.03.01 Биотехнология, профиль Биотехнология
 Научно-образовательный центр Н.М. Кижнера

УТВЕРЖДАЮ:
 Руководитель ООП

 (Подпись) (Дата) (Ф.И.О.)

ЗАДАНИЕ
на выполнение выпускной квалификационной работы

В форме:

бакалаврской работы

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

Студенту:

Группа	ФИО
4Д51	Гридиной Марии Вадимовне

Тема работы:

Оценка влияния микробиоты пациентов с болезнью Паркинсона на экспрессионный профиль клеток нейробластомы в эксперименте <i>in vitro</i>

Утверждена приказом директора (дата, номер)	1645/с от 01.03.2019 г.
---	-------------------------

Срок сдачи студентом выполненной работы:	05.06.2019 г.
--	---------------

ТЕХНИЧЕСКОЕ ЗАДАНИЕ:

Исходные данные к работе	<i>Объектом исследования является клеточная линия нейробластомы SH-SY5Y, стимулированная лизатами бактерий и тотальной микробиотой кишечника здоровых пациентов и пациентов с болезнью Паркинсона. Целью работы является оценить экспрессию патогенетически значимых для болезни Паркинсона генов, при воздействии микроорганизмами кишечника пациентов с</i>
---------------------------------	---

	<i>болезнью Паркинсона на клетки нейробластомы (in vitro модель нейронов).</i>
Перечень подлежащих исследованию, проектированию и разработке вопросов	<i>Перечень разделов, разработанных в данной работе:</i> 1. Литературный обзор 2. Объекты и методы исследования 3. Экспериментальная часть 4. Результаты и обсуждение 5. Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение 6. Социальная ответственность
Консультанты по разделам выпускной квалификационной работы	
Раздел	Консультант
Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение	Креницына З. В., доцент ОСГН ШБИП, к.х.н.
Социальная ответственность	Скачкова Л. А., старший преподаватель отделения общетехнических дисциплин ШБИП.

Дата выдачи задания на выполнение выпускной квалификационной работы по линейному графику	28.01.2019 г.
---	---------------

Задание выдал руководитель / консультант (при наличии):

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент НОЦ Н.М. Кижнера	Штрыкова В.В.	к.х.н.		
Научный сотрудник ЦНИЛ СибГМУ	Салтыкова И.В.	к.м.н.		

Задание принял к исполнению студент:

Группа	ФИО	Подпись	Дата
4Д51	Гридина Мария Вадимовна		

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

Студенту:

Группа	ФИО
4Д51	Гридиной Марии Вадимовне

Институт	физики высоких технологий	Отделение (НОЦ)	НОЦ Н.М. Кижнера
Уровень образования	бакалавр	Направление	19.03.01 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>	Общий бюджет НИИ составил 933061,3 руб., из них материально-технических затрат – 162800,6 руб.
2. <i>Нормы и нормативы расходования ресурсов</i>	Использованы нормы и нормативы по заработной плате исполнителей темы: коэффициент дополнительной заработной платы 12%, районный коэффициент для города Томска – 1,3. Использованы амортизационные отчисления на использованное оборудование.
3. <i>Используемая система налогообложения, ставки налогов, отчислений, дисконтирования и кредитования</i>	Ставка на отчисление во внебюджетные фонды для учреждений (27,1%). Коэффициент накладных расходов (16%).

Перечень вопросов, подлежащих исследованию, проектированию и разработке:

1. <i>Оценка коммерческого потенциала, перспективности и альтернатив проведения НИ с позиции ресурсоэффективности и ресурсосбережения</i>	Данное НИ является перспективным и имеет высокий коммерческий потенциал, так как в настоящее время нет аналогов исследования.
2. <i>Планирование и формирование бюджета научных исследований</i>	Было проведено планирование НИ с учетом работы всех исполнителей. Также проведен расчет бюджета научного исследования.
3. <i>Определение ресурсной (ресурсосберегающей), финансовой, бюджетной, социальной и экономической эффективности исследования</i>	Проведен анализ интегральных показателей эффективности.

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>
5. <i>Оценка ресурсной, финансовой и экономической эффективности НИ</i>

Дата выдачи задания для раздела по линейному графику	14.02.2019 г.
---	---------------

Задание выдал консультант:

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
доцент ОСГН ШБИП	Креницына Зоя Васильевна	к.т.н., доцент		

Задание принял к исполнению студент:

Группа	ФИО	Подпись	Дата
4Д51	Гридина Мария Вадимовна		

**ЗАДАНИЕ ДЛЯ РАЗДЕЛА
«СОЦИАЛЬНАЯ ОТВЕТСТВЕННОСТЬ»**

Студенту:

Группа	ФИО
4Д51	Гридиной Марии Вадимовне

Школа	ИШНПТ	Отделение (НОЦ)	НОЦ Н.М. Кижнера
Уровень образования	Бакалавр	Направление/специальность	19.03.01 Биотехнология

Тема ВКР:

Оценка влияния микробиоты пациентов с болезнью Паркинсона на экспрессионный профиль клеток нейробластомы в эксперименте <i>in vitro</i>	
Исходные данные к разделу «Социальная ответственность»:	
<p>1. Характеристика объекта исследования (вещество, материал, прибор, алгоритм, методика, рабочая зона) и области его применения</p>	<p>Объектом исследования является клеточная линия нейробластомы SH SY5Y, стимулированная лизатами бактерий и тотальной микробиотой кишечника здоровых пациентов и пациентов с болезнью Паркинсона. Проводится анализ экспрессионного профиля клеток. Область применения полученных результатов исследования – медицина. Рабочей зоной является ЦНИЛ СибГМУ.</p>
Перечень вопросов, подлежащих исследованию, проектированию и разработке:	
<p>1. 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. 	<p>-специальные: должностная инструкция работника;</p> <p>- организационные мероприятия по компоновке рабочей зоны</p> <p>- Трудовой кодекс Российской Федерации от 30.12.2001 N 197-ФЗ (ред. от 01.04.2019); ГОСТ 12.0.004-2015 Система стандартов безопасности труда (ССБТ). Организация обучения безопасности труда. Общие положения.</p>
<p>2. Производственная безопасность:</p> <p>2.1. Анализ выявленных вредных и опасных факторов</p> <p>2.2. Обоснование мероприятий по снижению воздействия</p>	<p>К вредным факторам производственной среды относятся:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Отклонение показателей микроклимата; - Превышение уровня шума; - Недостаточная освещенность рабочей зоны;

	<p>- Вредные вещества. К опасным факторам производственной среды относятся: - Биологический фактор; - Воздействие электрического тока.</p>
3. Экологическая безопасность:	<p>– анализ воздействия объекта на атмосферу: возможность попадания в атмосферу летучих веществ фенола, хлороформа, изопропилового спирта; – анализ воздействия объекта на гидросферу: возможность попадания жидких веществ и продуктов метаболизма клеток в канализацию (фенола, хлороформа, изопропилового спирта, культуральной среды); – анализ воздействия объекта на литосферу: загрязнение почвы расходными материалами при неправильной утилизации отходов (лабораторный пластик).</p>
4. Безопасность в чрезвычайных ситуациях:	<p>– возможные ЧС на рабочем месте: выход из строя системы энергоснабжения, возникновение эпидемии, обрушение зданий в результате землетрясения, урагана или пожара; – наиболее типичная ЧС: пожар</p>

Дата выдачи задания для раздела по линейному графику	14.02.2019 г.
--	---------------

Задание выдал консультант:

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Старший преподаватель ООД ШБИП	Скачкова Лариса Александровна			

Задание принял к исполнению студент:

Группа	ФИО	Подпись	Дата
4Д51	Гридина Мария Вадимовна		

РЕФЕРАТ

Выпускная квалификационная работа 96 с., 26 рис., 20 табл., 81 источник.

Ключевые слова: болезнь Паркинсона, микробиота кишечника, нейробластома человека, альфа – синуклеин, сокультивирование, экспрессия генов.

Объектом исследования является клеточная линия нейробластомы SH-SY5Y, стимулированная лизатами бактерий и тотальной микробиотой кишечника здоровых пациентов и пациентов с болезнью Паркинсона.

Цель работы - оценить экспрессию патогенетически значимых для болезни Паркинсона генов, при воздействии микроорганизмами кишечника пациентов с болезнью Паркинсона на клетки нейробластомы (*in vitro* модель нейронов).

В процессе исследования было проведено инкубирование нейробластомы с лизатами бактерий кишечника здоровых индивидов и пациентов с болезнью Паркинсона (БП), сокультивирование нейробластомы с тотальной микробиотой кишечника, полученной от здоровых индивидов и от пациентов с БП и с лабораторным штаммом *E. coli*. Оценивали влияние стимуляции на экспрессию вовлеченных в патогенез БП генов.

В результате исследования установлено, что при стимулировании лизатами бактерий экспрессия генов не изменялась. При этом сокультивирование с тотальной микробиотой пациентов с БП приводило к снижению экспрессии генов *HSPA8* и *SNAP25*. В то время как при стимулировании микробиотой здоровых пациентов и *E.coli* экспрессия генов не изменялась.

Область применения: медицина.

Экономическая эффективность/значимость работы: проведены расчеты финансового менеджмента, ресурсоэффективности и ресурсосбережения, которые показали, что исследование рентабельно.

В будущем планируется провести оценку жизнеспособности клеточной линии нейробластомы SH-SY5Y при сокультивировании с тотальной микробиотой кишечника, полученной от здоровых индивидов и от пациентов с БП, а также планируется разработать методику ранней диагностики болезни Паркинсона.

ОПРЕДЕЛЕНИЯ, СОКРАЩЕНИЯ, НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

БП – болезнь Паркинсона;

НМС – немоторные симптомы;

ПЦР – полимеразная цепная реакция;

ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в реальном времени;

тРНК – транспортная рибонуклеиновая кислота;

мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота;

кДНК – комплементарная ДНК;

п.о — пары оснований;

PBS – натрий-фосфатный буфер;

SNCA – ген, кодирующий белок α -синуклеин;

HPRT1 – ген, кодирующий белок гипоксантин - фосфорибозилтрансфераза 1;

HSPA8 – ген, кодирующий белок теплового шока;

SNAP25 – ген, кодирующий синаптосомно-ассоциированный белок, 25;

STX1A – ген, кодирующий белок синтаксин 1 А;

APP – ген, кодирующий белок предшественник бета-амилоида;

ТАЕ – трис-ацетатный-ЭДТА буфер.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	14
1. БОЛЕЗНЬ ПАРКИНСОНА: ХАРАКТЕРИСТИКА И ЭТИОЛОГИЯ. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР.....	17
1.1 Болезнь Паркинсона.....	17
1.2 Роль α -синуклеина при болезни Паркинсона	18
1.3 Генетические факторы при болезни Паркинсона.....	20
1.4 Роль микробиоты при болезни Паркинсона	22
2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	27
2.1 Объекты исследования.....	27
2.2 Сырье и материалы	27
2.3 Оборудование	28
3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	29
3.1 Выбор генов для эксперимента	29
3.2 Дизайн праймеров для эксперимента.....	30
3.3 Подбор условий амплификации для праймеров.....	31
3.4 Культивирование клеточной линии нейробластомы SH-SY5Y	35
3.5 Методика получения тотальной микробиоты кишечника здоровых и больных пациентов	36
3.6 Методика получения лизата бактерий кишечника здоровых и больных пациентов.....	37
3.7 Инкубирование клеточной линии нейробластомы SH-SY5Y с лизатами бактерий.....	37
3.8 Сокультивирование клеток нейробластомы с тотальной микробиотой кишечника здоровых индивидов и пациентов с БП.....	38
3.9 Выделение РНК из клеток SH-SY5Y	39
3.10 Спектрофотометрический метод оценки чистоты и качества выделения РНК	40
3.11 Синтез кДНК	40
3.12 Определение экспрессии мРНК генов методом ПЦР в реальном времени	41
3.13 Статистическая обработка данных.....	42

4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	43
4.1 Оценка экспрессии генов при инкубировании нейробластомы с лизатами бактерий кишечника здоровых индивидов и пациентов с БП в течение 48 часов	43
4.2 Оценка экспрессии генов при инкубировании нейробластомы с лизатами бактерий кишечника здоровых индивидов и пациентов с БП в течение 24 часов	46
4.3 Оценка экспрессии генов при сокультивировании нейробластомы с тотальной микробиотой кишечника, полученной от здоровых индивидов и от пациентов с БП	49
4.4 Обсуждение результатов.....	52
5. ФИНАНСОВЫЙ МЕНЕДЖМЕНТ, РЕСУРСОЭФФЕКТИВНОСТЬ И РЕСУРСОСБЕРЕЖЕНИЕ	54
5.1 Оценка коммерческого потенциала и перспективности проведения научных исследований с позиции ресурсоэффективности и ресурсосбережения	54
5.1.1 Потенциальные потребители результатов исследования.....	54
5.1.2 Анализ конкурентных технических решений.....	55
5.1.3 SWOT-анализ.....	56
5.2 Планирование научно-исследовательских работ	57
5.2.1 Структура работ в рамках научного исследования	57
5.2.2. Определение трудоемкости выполнения работ	58
5.2.3. Разработка графика проведения научного исследования	59
5.3 Бюджет научно-технического исследования (НТИ).....	63
5.3.1 Расчет материальных затрат НТИ	63
5.3.2 Расчет затрат на оборудование для научно-экспериментальных работ.....	65
5.3.3 Основная заработная плата исполнителей темы	66
5.3.4 Дополнительная заработная плата исполнителей темы.....	68
5.3.5 Отчисления во внебюджетные фонды	68
5.3.6 Накладные расходы.....	69
5.3.7 Формирование бюджета затрат научно-исследовательского проекта	69

5.4	Определение ресурсной (ресурсосберегающей), финансовой, бюджетной, социальной и экономической эффективности исследования ..	70
6.	СОЦИАЛЬНАЯ ОТВЕТСТВЕННОСТЬ	73
6.1	Правовые и организационные вопросы обеспечения безопасности	73
6.1.1	Специальные (характерные для проектируемой рабочей зоны) правовые нормы трудового законодательства	73
6.1.2	Организационные мероприятия при компоновке рабочей зоны	74
6.2	Производственная безопасность	75
6.2.1	Анализ вредных факторов производственной среды	76
6.2.1.1	Отклонение показателей микроклимата в помещении	76
6.2.1.2	Превышение уровня шума	76
6.2.1.3	Недостаточная освещенность рабочей зоны.....	77
6.2.1.4	Вредные вещества	78
6.2.2	Анализ опасных факторов производственной среды.....	80
6.2.2.1	Биологический фактор	80
6.2.2.2	Воздействие электрического тока	80
6.2.3	Обоснование мероприятий по снижению уровней воздействия опасных и вредных факторов на исследователя	81
6.3	Экологическая безопасность	82
6.3.1	Защита атмосферы.....	82
6.3.2	Защита гидросферы.....	82
6.3.3	Защита литосферы.....	83
6.4	Безопасность в чрезвычайных ситуациях	83
	ЗАКЛЮЧЕНИЕ	85
	СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ СТУДЕНТА	87
	СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	88

ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день, по данным ВОЗ, в России людей страдающих от болезни Паркинсона (БП) около 200 из каждых 100 тысяч – в равной степени, как мужчин, так и женщин, а также около 4 миллионов человек во всем мире [1]. Число больных значительно увеличивается с возрастом, но, не смотря на это, на данный момент БП заболевает каждый десятый человек до 50 лет и каждый двадцатый до 40 лет [2].

Болезнь Паркинсона - это прогрессирующее и неизлечимое нейродегенеративное заболевание, которое считается наиболее распространенным двигательным расстройством, характерным для лиц старшей возрастной группы.

БП заключается в поражении дофаминергических нейронов черной субстанции головного мозга, но основными материальными компонентами этого поражения являются агрегаты белка α -синуклеина. При этом заболевании происходит нарушение метаболизма этого белка, что связано с накоплением α -синуклеина в нейронах, и это приводит к образованию белковых комплексов, цитоплазматических телец Леви. Образование этих агрегатов в свою очередь может приводить к разрушению дофаминергических нейронов и нарушению моторных функций человека.

Было показано, что эти агрегаты раньше всего начинают появляться за 10-15 лет клинического дебюта в нейронах подслизистого слоя кишечника [3]. Столь раннее поражение кишечника позволяет по-новому взглянуть на этиологию болезни Паркинсона.

На сегодняшний день ученым так и не удалось дать полный ответ, чем обусловлена этиология БП. Однако недавние исследования показывают, что одним из пусковых факторов этого заболевания может служить микробиота кишечника человека [4].

Как было раньше показано, в том числе и сотрудниками ЦНИЛ СибГМУ, микробиота пациентов с БП отличается от микробиоты кишечника здоровых людей [5,6]. В связи с этим проводятся исследования, вносит ли

изменение микробиоты кишечника вклад в инициацию дегенеративных изменений нейронов кишечника или является последствием БП.

Изучение влияния микрофлоры кишечника пациентов с болезнью Паркинсона на клеточную линию нейробластомы позволит определить предпосылки заболевания и создать более обоснованную стратегию ранней диагностики.

Целью данной работы является оценка экспрессии патогенетически значимых для БП генов, при воздействии микроорганизмами кишечника пациентов с БП на клетки нейробластомы (*in vitro* модель нейронов).

Задачи исследования

1. Выбор вовлеченных в патогенез БП генов и дизайн праймеров для эксперимента;
2. Оценка экспрессии генов при инкубировании клеточной линии нейробластомы SH-SY5Y с лизатами бактерий кишечника здоровых индивидов и пациентов с БП;
3. Оценка экспрессии генов при сокультивировании клеток нейробластомы с тотальной микробиотой кишечника, полученной от здоровых индивидов и от пациентов с БП;
4. Расчет финансового менеджмента, ресурсоэффективности и ресурсосбережения и социальной ответственности.

Практическая значимость

Дальнейшее изучение экспрессии генов при стимулировании нейробластомы микробиотой пациентов с болезнью Паркинсона позволит выявить механизмы появления данного заболевания. Также полученные данные могут оказаться полезными при разработке методики ранней диагностики, профилактики и лечения болезни Паркинсона.

Апробация работы

Результаты данного исследования были представлены на Всероссийской итоговой 78-й студенческой научной конференции им. Н.И. Пирогова (Томск, 2019 г.). XVI Международной конференции студентов,

аспирантов и молодых ученых «Перспективы развития фундаментальных наук» (Томск, 2019 г.).

1. БОЛЕЗНЬ ПАРКИНСОНА: ХАРАКТЕРИСТИКА И ЭТИОЛОГИЯ.

ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1 Болезнь Паркинсона

Болезнь Паркинсона (БП) - это прогрессирующее и неизлечимое нейродегенеративное заболевание [7]. На сегодняшний день считается наиболее распространенным двигательным расстройством, которое поражает около 1-2 человек из 1000 во всем мире. Предполагается, что количество больных удвоится в последующие 2 десятилетия пропорционально увеличению стареющего населения [8]. Кроме того, БП является неизлечимой, поэтому уделяется большое внимание поиску решения этой всемирной проблемы и поиску этиологических факторов заболевания.

К сожалению, в Томской области исследованию болезни Паркинсона уделяется недостаточное внимание. Представленные в публикациях сведения и результаты являются отрывочными. В литературе о распространенности БП по Томской области представлены данные 2004 года, где сообщалось, что на 100000 населения пациентов с БП составляло 238 случаев [9]. Однако с каждым годом число людей страдающих от БП растет, особенно у людей после 60 лет, а также заболевание поражает каждого десятого человека до 50 лет и каждого двадцатого до 40 лет. Это говорит о том, что болезнь всё чаще встречается и у достаточно молодых людей.

Патогенез болезни Паркинсона связывают с рядом причин, таких как, поражение нейронов в результате действия токсинов, агрегация белков, окислительный стресс, а также нарушение регуляции функций митохондрий [10].

Сложность этиологии этого заболевания, а также сложность постановки диагноза на ранней стадии и наблюдение симптомов на поздней стадии, затрудняют процесс лечения БП [8]. Клиническая стадия сопровождается такими моторными симптомами, как мышечная ригидность, тремор, дискинезия, медлительность и нарушение походки. Также БП характеризуется наличием немоторных симптомов (НМС), таких как

деменция, депрессия, вегетативная и сенсорная дисфункция [8]. На данный момент уделяется большое внимание изучению именно НМС, которые можно рассматривать в качестве индикатора факторов риска, на ранних стадиях заболевания [8].

Было отмечено, что у 9-17% здоровых индивидов за 10-15 лет до возникновения моторных симптомов в периферической нервной системе появляются домоторные симптомы или слабовыраженные проявления паркинсонизма после нескольких месяцев проведения биопсии [11,12].

Было показано, что одно из наиболее ранних нарушений вегетативной функции обусловлено вовлечением в патологический процесс нейронов подслизистого слоя кишечника [3], клеток мейсснера и ауэрбахова сплетений [13]. У пациентов появляется урогенитальная дисфункция, нарушения желудочно-кишечного тракта, например, частые запоры, которые отличаются тяжестью и длительностью заболевания, нежели у здоровых индивидов [14,15]. Такие симптомы относят к возможным факторам риска болезни Паркинсона.

1.2 Роль α -синуклеина при болезни Паркинсона

Центральным аспектом патофизиологии болезни Паркинсона является прогрессирующая гибель дофаминергических нейронов среднего мозга и их аксональных проекций, но основные причины этой потери неясны [16]. При этом заболевании происходит нарушение метаболизма белка α -синуклеина, и его накопление в нейронах приводит к образованию агрегатов, цитоплазматических телец Леви, обладающих цитотоксическим эффектом [17].

α -синуклеин является небольшим белком (14 кДа) [18], который в основном локализуется в пресинаптической зоне нейронов и составляет до одного процента от всех белков в цитозоле [19]. α -синуклеин является членом семейства белков синуклеинов, вместе с бета (β) - и гамма (γ) - синуклеином. Эти белки имеют общую консенсусную последовательность

(КТКЕGV), которая повторяется примерно шесть раз на N-концевой части белка [20].

Функциональное назначение этого секретируемого нейронами белка остается до конца не изученным, предположительно он играет роль в развитии нервной системы, а именно участвует в поддержании запаса синаптических пузырьков в пресинаптических терминалях [18]. Также участвует в формировании нейрональной пластичности [21]. Не смотря на то, что α -синуклеин является по своей природе белком с «неправильной укладкой», он проявляет конформационную пластичность, принимая ряд структурных конформаций в различных условиях окружающей среды [22].

Помимо белка, размер которого составляет 140 аминокислот, существуют его сплайсинговые варианты, отличающиеся друг от друга количеством экзонов [23]. Профиль экспрессии вариантов сплайсинга отличается в разных областях мозга при нормальных и патологических состояниях [23]. Известно, что часть вариантов α -синуклеина обладают повышенной способностью к образованию малорастворимых агрегатов, компонентов телец Леви [23].

Путь агрегации α -синуклеина проходит через слияния мономеров в олигомеры через образование димеров. Олигомеры в конечном итоге превращаются в высокоупорядоченные амилоидные фибриллы с поперечным β -слоем (рис. 1). Нативно неструктурированный белок также может вначале образовывать некоторые неупорядоченные структуры, что приводит к образованию аморфных агрегатов [20].

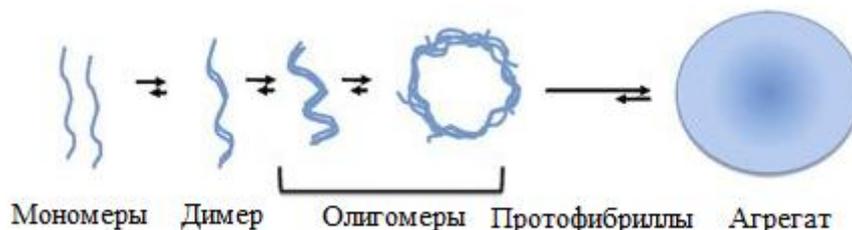


Рисунок 1 – Схематическое изображение процесса агрегации α -синуклеина [20]

Как уже отмечалось ранее, у пациентов с БП наблюдаются нарушения функции ЖКТ за 10-15 лет до клинического дебюта, что сопровождается образованием агрегатов α -синуклеина в нейронах подслизистого слоя кишечника. Также известно, что при БП происходит разрушение дофаминергических нейронов черной субстанции головного мозга, которая связана с нигростриатальным путем. Поэтому можно предположить, что распространение α -синуклеина происходит от периферии к центру, а само заболевание начинается с поражения нейронов желудочно-кишечного тракта [24]. При этом предполагается, что БП является прионоподобным заболеванием из-за некоторых сходств механизмов возникновения болезни, а роль прионного белка выполняет α -синуклеин [25,26]. Было показано, что α -синуклеин способен перемещаться от периферических частей к мозгу по нервной системе ретроградным аксональным транспортом и по блуждающему нерву [27,28]. При этом белок постепенно распространяется в области среднего мозга и может быть обнаружен в проекциях аксонов [27].

1.3 Генетические факторы при болезни Паркинсона

Большинство генов человека кодируют белки, которые выполняют самые разнообразные функции. Ген является основной физической и функциональной единицей наследственности, состоящий из ДНК. Другими словами, ген – это последовательность нуклеотидов, образующих часть хромосомы, порядок которых определяет порядок мономеров в молекуле полипептида или нуклеиновой кислоты, которую клетка может синтезировать [29]. Экспрессия гена – это процесс, с помощью которого информация гена используется для синтеза функционального продукта.

Предполагается, что на развитие болезни Паркинсона влияют такие факторы окружающей среды, как пестициды, например, паракват (N,N'-диметил-4,4'-дипиридила дихлорид), а также митохондриальные токсины, например, 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин [30]. Однако в качестве одного из этиологических факторов, опосредующих развитие болезни Паркинсона, рассматривают наследственный фон [31]. У 15%

пациентов в родословной есть родственники с болезнью Паркинсона, а 5-10% имеют моногенную форму заболевания с менделеевским наследованием [32]. На сегодняшний день обнаружено не менее 23 локусов и 19 генов, ассоциированных с заболеванием, но в различных исследованиях было выявлено гораздо больше локусов генетического риска и вариантов спорадического фенотипа БП [32].

В случае заболевания, наследуемого по моногенному типу, происходит мутация α -синуклеина [33]. α -синуклеин это белок, кодируемый геном *SNCA*, и экспрессирующийся преимущественно в нервной ткани [30]. Также известно, что при БП происходит изменение экспрессии генов ассоциированных с α -синуклеином, таких как *LRRK2* и *GBA* [34].

Экспрессия мутированного гена *LRRK2* индуцирует апоптотическую гибель клеток нейробластомы в эксперименте *in vitro*. Также экспрессия этого гена вызывает укорочение и упрощение дендритного дерева в культивируемых нейронах. [35]. Это частично обусловлено изменениями в макроаутофагии [36] и может быть предотвращено регуляцией протеинкиназы А - белка аутофагии LC3 [37].

Связь экспрессии мутированного гена *GBA* и БП на данный момент остается до конца неизученной. Исследования показывают, что изменения в этом гене могут способствовать неправильному расщеплению токсических веществ в нейронах, нарушая функцию лизосом. Альтернативно, изменения могут увеличить образование аномальных отложений белка. В результате токсичные вещества или белковые отложения могут накапливаться и убивать дофамин-продуцирующие нейроны. Недостаток дофамина приводит к двигательным нарушениям [38].

По данным некоторых полногеномных ассоциативных исследований наибольший интерес представляют полиморфизмы в генах белков иммунной системы, связанных с БП. Среди таких белков можно отметить *IL1R2*, *TLR9*, *HLA-DQA1*, *HLA-DRB6*, а также некоторые другие [34].

Мощным подходом для генерации новых гипотез относительно патогенеза БП является профилирование экспрессии всего генома или транскриптомика. Одной из целей высокопроизводительных исследований транскриптомики является измерение и сравнение профилей экспрессии генов двух или более образцов, чтобы обнаружить дифференциально экспрессируемые гены. Выявление чрезмерно представленных функциональных путей среди дифференциально экспрессируемых генов может выявить биологические основы, способствующие процессу болезни Паркинсона [33]. Такие функциональные пути включают убиквитин-протеасомную систему, путь аутофагии-лизосомы, митохондриальную функцию, окислительное фосфорилирование, нейровоспаление и апоптоз. Однако в настоящее время лежащий в основе механизм (ы), который управляет дисфункцией в этих путях остается в значительной степени неизвестным [33].

Однако существует гипотеза о том, что в качестве причины экспрессии патогенетически значимых для БП генов может служить измененная микробиота кишечника человека [4].

1.4 Роль микробиоты при болезни Паркинсона

В кишечнике человека обитает огромное количество бактерий, которые образуют сложное сообщество, называемое микробиотой. Микробиота человека состоит из широкого спектра бактерий, вирусов, грибов и других одноклеточных организмов, которые живут в организме [39]. Численность бактерий, населяющих кишечник, составляет около 1000 различных видов микроорганизмов [39].

Кишечная микробиота играет важную функциональную роль в иммунном ответе, нормальном функционировании ЖКТ, и поддержании здоровья человека [40]. Микробиота выполняет метаболическую функцию, необходимую для пищеварения; защитную от патогенных бактерий, а также кишечная микробиота является составной частью слизистой оболочки

кишечника [40]. Кроме того, микробиота может взаимодействовать с нервной системой человека. Это связано с рядом заболеваний, которые вызывают нарушение нормального баланса микробов [39].

Известно, что микробиота кишечника здоровых индивидов отличается от микробиоты пациентов с БП [5,6], поэтому уделяется большое внимание исследованиям в области метагеномики по изучению изменения микробиоты кишечника, как провоцирующего фактора нейродегенерации [41]. Так, при болезни Паркинсона нейродегенеративный процесс не ограничивается мозгом, а распространяется на периферическую нервную систему [24]. Таким образом, микрофлора кишечника может выступать как биомаркер развития БП [4,5,42].

Так, например, был проведен эксперимент по пересадке микробиоты кишечника от пациента с болезнью Паркинсона лабораторным мышам, которые были выращены в стерильных условиях и не имели своей микробиоты. Результаты данного исследования продемонстрировали появление симптомов, сходных с симптомами БП у мышей, подвергшихся фекальной трансплантации: моторный дефицит, активация микроглии и запуск агрегации α -синуклеина [43]. Микробиота кишечника может потенциально влиять как на запуск агрегации α -синуклеина, так и на некроз/апоптоз клеток нервной системы, приводящих к когнитивным нарушениям и двигательным расстройствам.

Вовлечение кишечника в заболевание было отмечено еще Джеймсом Паркинсоном, первооткрывателем болезни [44]. С тех пор проводят исследования, вносит ли изменение микробиоты кишечника вклад в инициацию дегенеративных изменений нейронов кишечника или является последствием БП.

В первом случае изменение микробиоты рассматривают как этиологический фактор, при этом бактерии способны запускать нейродегенерацию, характерную для БП [45]. Измененная микробиота может быть причиной хронических воспалений, также может вызывать

аутоиммунные реакции, которые вероятно запускают мисфолдинг α -синуклеина и служат одними из факторов повышающими экспрессию гена, кодирующего этот белок [46]. Предположительно α -синуклеин обладает антимикробной активностью, и его экспрессия изменяется при воздействии бактерий на нервную ткань [18]. Кроме того, известно, что порины, являющиеся основным классом белков наружных мембран грамотрицательных бактерий, индуцируют гибель клеток в клетках-мишенях, в которых митохондрии играют центральную роль. Поражение митохондрий также связывают с патогенезом болезни Паркинсона [47].

С другой стороны изменение микробиоты рассматривают как симптом при БП. При возникновении патологических изменений в периферических нейронных сетях в ЖКТ происходит нарушение работы кишечника, а именно секреции и перистальтической функции [48]. В результате этих нарушений может произойти изменение таксономического состава кишечной микрофлоры, что является возможным биомаркером развития БП [4,6].

Также имеет место быть смешанной модели развития болезни Паркинсона связанной с изменением микробиоты. Изначальная измененная микрофлора может служить триггером, вероятно запускающим нарушение фолдинга α -синуклеина. Это в свою очередь может привести к сбою нормального функционирования кишечника, куда относят дисбаланс местного иммунитета или снижение моторики. Нарушение физиологии кишечника может лишь стимулировать изменение таксономического состава кишечной микрофлоры, среди которых имеются провоспалительные бактерии, усиливающие развитие нейродегенерации.

Вдобавок патогенез болезни Паркинсона связывают с поражением нейронов под действием токсинов, продуцируемых патогенными формами цианобактерий, населяющих кишечник человека. В настоящее время токсин β -N-метиламино-L-аланин (ВМАО) цианобактерий предположительно является причиной бокового амиотрофического склероза, а также

паркинсонизма [49]. Производство этого токсина цианобактериями в сочетании с многочисленными механизмами нейротоксичности ВМАА, особенно для уязвимых групп моторных нейронов, значительно повысил интерес к исследованию воздействия этой небелковой аминокислоты как возможного фактора риска для развития болезни Паркинсона [49].

Одна из моделей развития заболевания предполагает индукцию окислительного стресса в нервной ткани [5]. Окислительный стресс это нарушение нормального окислительно-восстановительного состояния клеток, вызванное токсическими эффектами в результате образования пероксидов и свободных радикалов, которые повреждают все компоненты клетки, включая белки, липиды и ДНК. Предполагается, что БП инициируется в кишечнике через окислительный стресс, в результате которого происходит мисфолдинг α -синуклеина в слизистой оболочке сигмовидной кишки, что в свою очередь ведет к увеличению проницаемости кишечной стенки [5]. Результатом этого потенциально является проникновение бактерий в подслизистую оболочку кишечника, где они запускают неправильный фолдинг α -синуклеина. Предполагается, что кишечная гиперпроницаемость и воспаление у пациентов с БП является результатом изменений в составе микробиоты кишечника [5]. Потенциальным источником окислительного стресса может быть липополисахарид – эндотоксин, продуцируемый некоторыми бактериями.

Как отмечалось ранее микробиота здоровых индивидов и пациентов с БП отличается по таксономическому составу. У пациентов с БП наблюдается повышенное содержание провоспалительных протеобактерий рода *Ralstonia*, в то время как у здоровых людей преобладают противовоспалительные бактерии, продуцирующие бутират, из родов *Blautia*, *Coprococcus* и *Roseburia* [5]. Короткоцепочечные жирные кислоты, в том числе бутират, играют важную регулирующую роль в кишечной экосистеме для поддержания желудочно-кишечной функции и здоровья организма. Низкая численность бутират-продуцирующих бактерий может оказывать вредное воздействие на

толстую кишку, нарушая целостность кишечного барьера и иммунную функцию. Повышенная относительная представленность *Ralstonia* (*Proteobacteria*, класс *Betaproteobacteria*) в сообществе микробиоты, связанной со слизистой оболочкой при болезни Паркинсона, может способствовать нейровоспалению и иммунной активации у пациентов [5].

Подводя итог, можно сказать, что изучение этиологии болезни Паркинсона на сегодняшний день является одной из актуальных задач, решение которой позволит в будущем создать более обоснованную стратегию ранней диагностики и лечения заболевания.

2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Объекты исследования

Для исследования вклада микробиоты кишечника в развитие БП использовали клеточную линию нейробластомы SH-SY5Y. Для оценки влияния микробиоты пациентов с болезнью Паркинсона на экспрессионный профиль клеток нейробластомы в эксперименте *in vitro* использовали лизат бактерий и тотальную микробиоту кишечника здоровых индивидов и больных с БП. Обследование пациентов и включение их в исследование было проведено на базе клиники нервных болезней СибГМУ и ЦНИЛ СибГМУ.

2.2 Сырье и материалы

Для реализации исследования использовали следующие материалы: матрасы для культивирования клеток с поверхностью роста клеток 75 см² (SPL Life Science, Корея), с поверхностью роста клеток 25 см² (SPL Life Science, Корея); центрифужные пробирки на 15 мл, 50 мл (SPL Life Science, Корея); пипетки на 1 мл, 5 мл, 25 мл; пробирки типа «Эппендорф» (объемом 1,5мл и 2 мл, производитель GenFollower, Китай), микроцентрифужные пробирки типа «Эппендорф» (объемом 0,2 мл, производитель МиниМед, Россия); пробирки для ПЦР в стрипах (объемом 0,2 мл, производитель BIOplastics, Нидерланды); наконечники для автоматических дозаторов (10 мкл, 200 мкл, 1000 мкл, производитель Axygen Scientific Inc., США).

Для культивирования клеток была использована питательная среда DMEM/F12 (ПанЭко, Россия), Трипсин (ПанЭко, Россия), 1 кратный натрий-фосфатный буфер PBS (Sigma, США).

Для выделения РНК был использован Тризол (Life technologies, США), хлороформ (AmpliSens, Россия), изопропанол (Экос-1, Россия), этанол 80%, стерильная вода (DEPC – treated water, США). Характеристика используемых веществ указана в таблице 1.

Таблица 1 – Характеристика используемых веществ

Название вещества	Внешний вид	Брутто формула	M, г/моль	ρ , г/см ³	T пл., °C	T кип., °C
1	2	3	4	5	6	7
Хлороформ	Бесцветная жидкость	CHCl ₃	119,5	1,47	-63,3	61,2
Изопропанол	Бесцветная жидкость	C ₃ H ₇ OH	60,1	0,786	-89	82,5
Этанол	Бесцветная жидкость	C ₂ H ₅ OH	46	0,789	-117	78

Для проведения реакции обратной транскрипции использован набор реактивов MMLV RT kit, в состав которого входит:

- 1) Буфер для разведения MMLV ревертазы, 500 мкл (100 ед/мкл);
- 2) 5x буфер для синтеза первой цепи, 220 мкл;
- 3) DTT (20 мМ), 110 мкл;
- 4) Смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов dNTP (10 мМ каждого), 120 мкл;
- 5) Олиго(dT) праймер (20 мкМ), 50 мкл;
- 6) Стерильная вода свободная от РНКаз, 1,8 мл

Для проведения ПЦР реального времени был использован SYBR® Green PCR Master Mix, а также праймеры, необходимые для исследования: *HPRT1*, *SNCA*, *HSPA8*, *SNAP25*, *STX1A*, *APP* (Табл.2).

2.3 Оборудование

Для реализации исследования были использованы следующие приборы: автоматические дозаторы переменного объема (0,5-10 мкл, 100-1000 мкл) (Ленпипет), SANYO CO₂ инкубатор, микроскоп Микромед, центрифуга SIGMA 3-30KS, центрифуга NUVE R400, настольная центрифуга (Minispin), вортекс (BioSan), спектрофотометр (Thermo Scientific NanoDrop 2000), льдогенератор PORKKA, ПЦР амплификатор Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler, анализатор The LightCycler® 480 II Real-Time PCR System («Roche», Швейцария), холодильник низкотемпературный (Sanyo), холодильник STINOL, аналитические весы (Adventure), источник питания Эльф – 8 для электрофореза нуклеиновых кислот в агарозном геле, УФ трансиллюминатор Syngene G:BOX.

3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

3.1 Выбор генов для эксперимента

На основании данных литературы были подобраны 790 генов, экспрессия которых изменялась при болезни Паркинсона [7]. Затем, данные гены были проанализированы с использованием пакета Reactome [50] для ПО CytoScare 3.5.1 [51]. На основе перечня выбранных генов и базы сигнальных путей Reactome была составлена генная сеть, из которой был выбран подграф генов – прямых соседей гена α -синуклеина (рис. 2). Для дальнейшего анализа из этой подсети выбирали гены, продукты которых связаны с обменом α -синуклеина; гены, которые отвечают за укладку белков, а также за внутриклеточный транспорт.

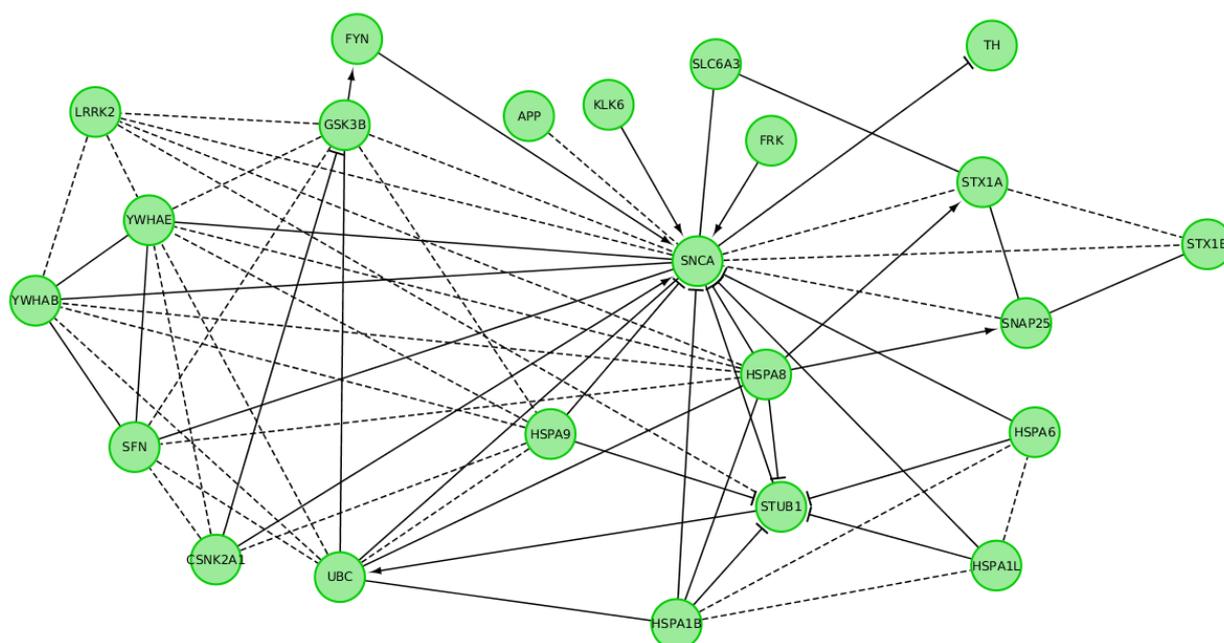


Рисунок 2 – сеть генов – прямых соседей α -синуклеина,

где

- — ассоциация;
- — активация;
- | — супрессия;
- - - - — предполагаемые взаимоотношения.

Ген *SNCA* участвует в формировании синаптических везикул для секреции дофамина, а также образует амилоиды – тельца Леви при болезни Паркинсона [52].

Ген *APP* кодирует белок-предшественник β -амилоида, который участвует в развитии нейронов, образовании и репарации синапсов, обеспечении синаптической пластичности. *APP* является антимикробным пептидом – компонентом врожденной иммунной системы человека. Предположительно этот ген играет важную роль в неспецифическом иммунном ответе в тканях головного мозга [53].

Ген *HSPA8* кодирует белок теплового шока. Белок – шаперон обеспечивает правильное сворачивание белков, а также повторное сворачивание неправильно свернутых белков [54].

Ген *SNAP25* кодирует мембранный белок, осуществляющий стыковку синаптической везикулы с пресинаптической мембраной нейрона и их слияние с последующим выбросом нейротрансмиттеров [55]. Белок, синтезируемый этим геном, участвует в приеме нейротоксинов, которые продуцируются некоторыми бактериями. После расщепления токсинов белок может образовывать непродуктивные комплексы, в результате чего повышается вероятность нарушения стыковки синаптической везикулы с пресинаптической мембраной нейрона и нейротрансмиссии. Изменение сигнала о двигательной активности из-за нарушения выброса нейротрансмиттеров ведёт к ослабеванию сокращения мышечных волокон [55].

Ген *STX1A* кодирует синтаксин, участвующий в стыковке синаптических пузырьков с пресинаптической плазматической мембраной [56].

3.2 Дизайн праймеров для эксперимента

Праймеры, использованные в данном исследовании, приведены в таблице 2.2. Для подбора необходимых праймеров использовали программу

по дизайну CLC Main Workbench, а также пользовались базой данных о нуклеотидах NCBI и NCBI BLAST (для поиска основного локального выравнивания).

Таблица 2 – последовательности праймеров, используемые для анализа ПЦР-РВ

Ген	Праймер	
<i>SNCA</i> NM_000345.3	Forward (прямой)	5'-GGGCAAGAATGAAGAAGG-3'
	Reverse (обратный)	5'-AGAAACTGGGAGCAAAGA-3'
<i>HSPA8</i> NM_006597.6	Forward (прямой)	5'-AGATAGGGTATAAGAGGCAGG-3'
	Reverse (обратный)	5'-CATGGTTGCTGGGGTGTA-3'
<i>SNAP25</i> NM_003081.4	Forward (прямой)	5'-ACTGGTTGAAGAGAGTAAAG-3'
	Reverse (обратный)	5'-CCTAGGTCCGTCAAATTC-3'
<i>STX1A</i> NM_004603.4	Forward (прямой)	5'-GGCGTCGTGATTAGTGAT-3'
	Reverse (обратный)	5'-CCTCCCATCTCCTTCATC-3'
<i>APP</i> NM_000484.4	Forward (прямой)	5'-CGAAGTTGAGCCTGTTGA-3'
	Reverse (обратный)	5'-CTTCTGCAAAGAACACCAA-3'
<i>HPTR1</i> NM_000194.3	Forward (прямой)	5'-CCCCGATGAGAAGACGAA-3'
	Reverse (обратный)	5'-CTGTGTCTTCCGGATCCT-3'

3.3 Подбор условий амплификации для праймеров

Подобраны условия для каждой пары праймеров, включенной в исследование с помощью проведения ПЦР реального времени. Оценивали эффективность проведения ПЦР для каждой из пар праймеров с использованием серийных разведений пула (смеси) всех образцов, включенных в исследование (далее пул образцов). О специфичности образованного продукта (ампликона) судили по кривым плавления, также проводили оценку полученных продуктов амплификации с использованием электрофореза.

Кривые плавления исследуемых генов приведены на рисунках 3-8.

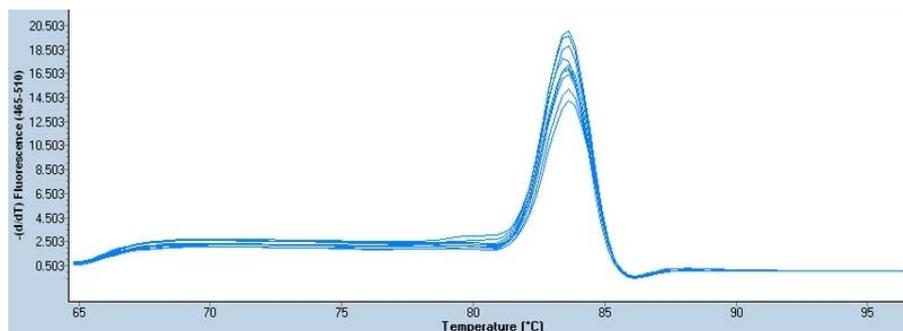


Рисунок 3 – кривые плавления ПЦР-продуктов для гена *SNCA*, полученных при амплификации пула образцов (последоваельные серийные разведения)

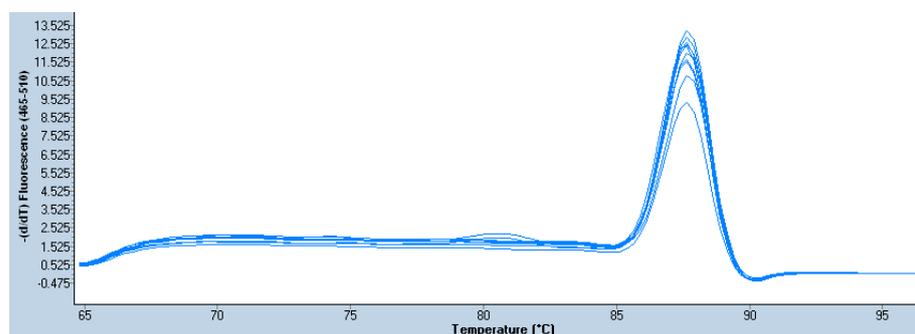


Рисунок 4 – кривые плавления ПЦР-продуктов для гена *HSPA8*, полученных при амплификации пула образцов (последоваельные серийные разведения)

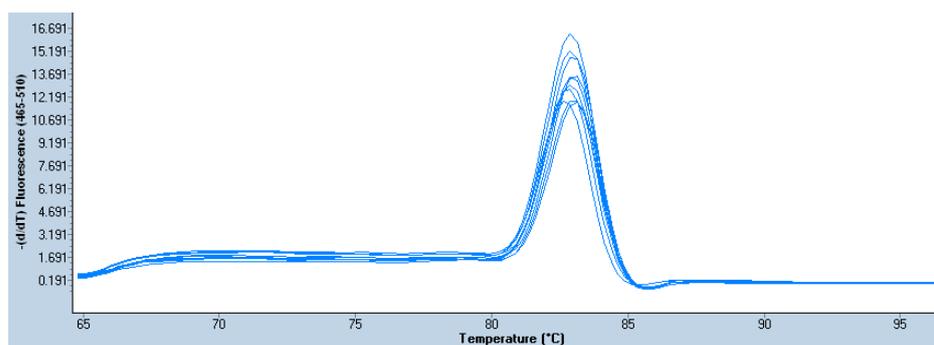


Рисунок 5 – кривые плавления ПЦР-продуктов для гена *SNAP25*, полученных при амплификации пула образцов (последоваельные серийные разведения)

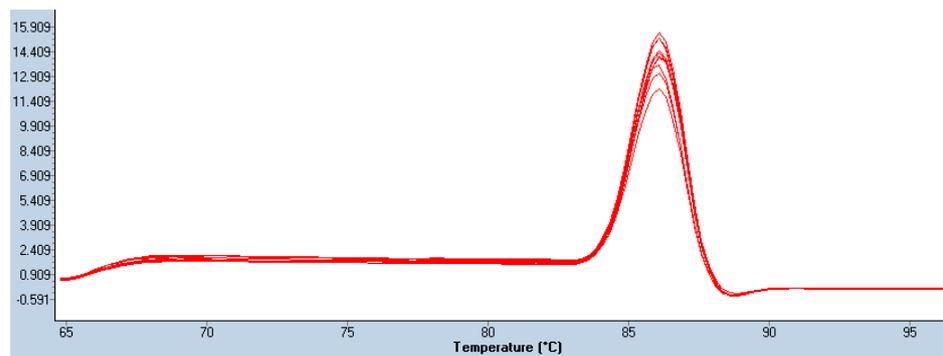


Рисунок 6 – кривые плавления ПЦР-продуктов для гена *STX1A*, полученных при амплификации пула образцов (последоваельные серийные разведения)

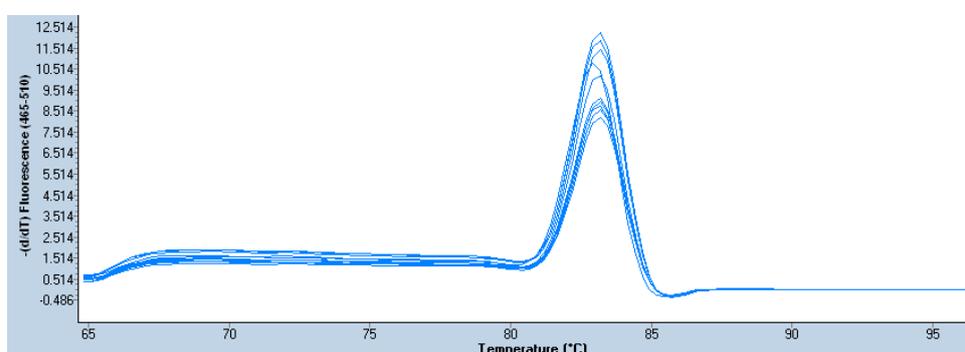


Рисунок 7 – кривые плавления ПЦР-продуктов для гена *APP*, полученных при амплификации пула образцов (последоваельные серийные разведения)

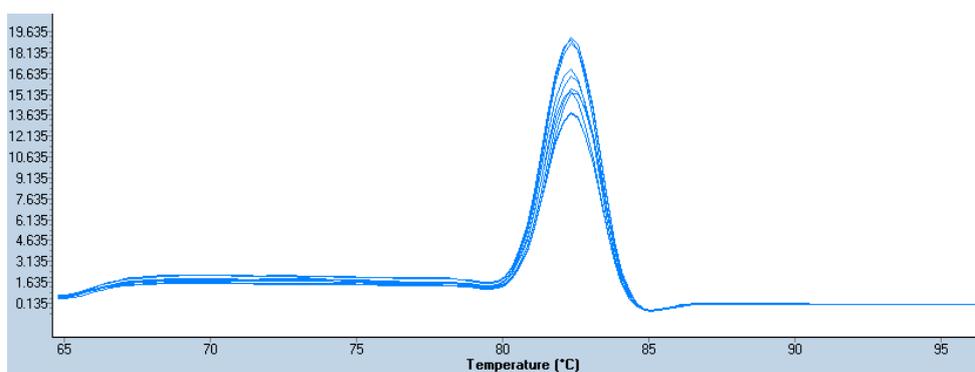


Рисунок 8 – кривые плавления ПЦР-продуктов для гена *HPRT1*, полученных при амплификации пула образцов (последоваельные серийные разведения)

Кривые плавления указывали на то, что в ходе ПЦР происходило образование ампликонов с одинаковой температурой плавления, что свидетельствовало об образовании специфичных продуктов амплификации.

Эффективность каждого гена (E) рассчитывали по формуле 2 [57].

$$C(T) = - (1/\log E) * \log P_0 + \log PC(T)/\log E \quad (1)$$

$$E = 10^{-1/k}, \quad (2)$$

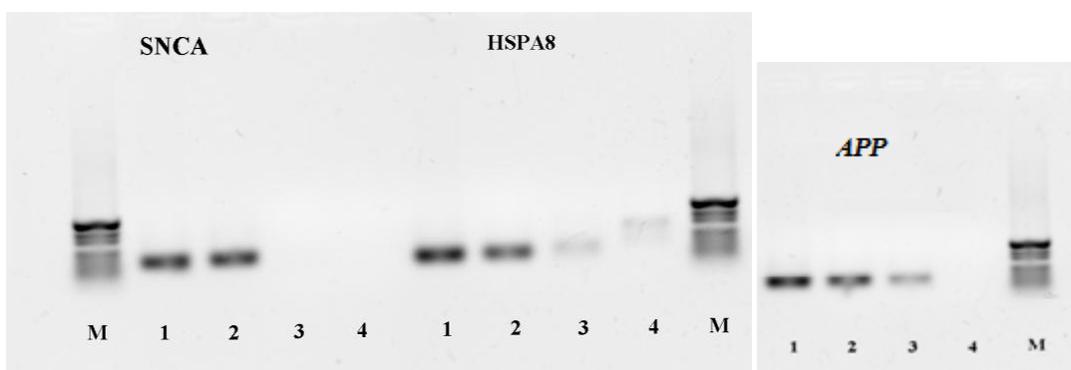
где k берется из уравнения прямой $C(T) = k \cdot \log P_0 + b$

Эффективность принимали в диапазоне от 1,8 до 2.

Для оценки экспрессии использовали пару праймеров, если эффективность проведения ПЦР с данной парой достигала значений не менее 1,8.

Далее проводили электрофоретический анализ полученных ампликонов в 1,2% агарозном геле с использованием красителя бромистого этидия. По результатам гель-электрофореза можно было установить, что в процессе ПЦР образовались ампликоны, размер которых соответствовал рассчитанному при дизайне праймеров, что свидетельствовало об образовании специфических продуктов амплификации.

Исходный образец кДНК был разведен в соответствии с соотношениями 1:3 и 1:27. Результаты гель – электрофореза отображены на рисунке 9.



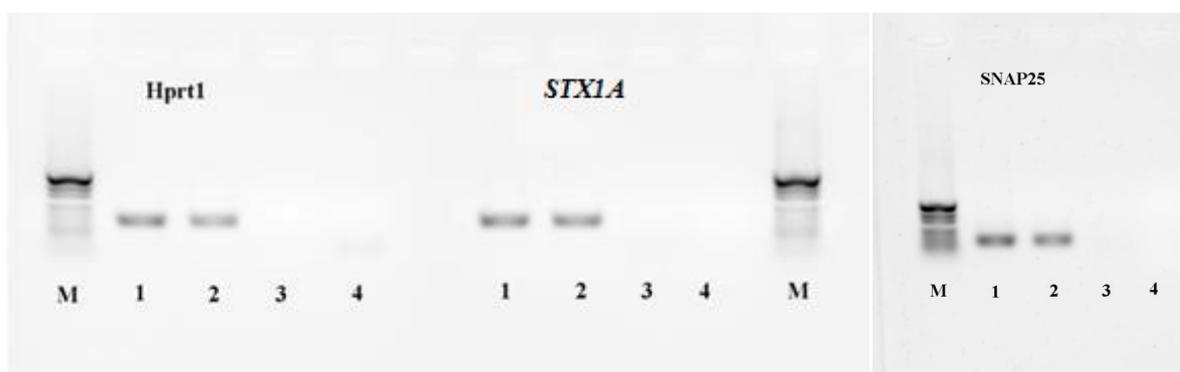


Рисунок 9 - Электрофореграмма в УФ ПЦР-продуктов в агарозном геле (ТАЕ, 1,2% агарозы), при нанесении 9 мкл реакционной смеси, где

- М – Маркер длин ДНК pUC19/Msp I, 0,5 мкг на дорожку;
- 1 – разведение исходного образца cDNA 1:3;
- 2 – разведение 1:27;
- 3 – negative control RNA (проверка контаминации DNA);
- 4 - negative control (H₂O)

3.4 Культивирование клеточной линии нейробластомы SH-SY5Y

Клеточная линия SH-SY5Y экспрессирует α -синуклеин и активно используется для исследования патогенетических аспектов и поиска новых подходов к терапии болезни Паркинсона [58].

Клетки SH-SY5Y, изображенные на рисунке 10, растут как смесь плавающих и прилипших клеток с множественными короткими тонкими клеточными отростками (нейритами) [59].

Питательная среда для культивирования содержала DMEM и F12 в соотношении 1:1. Полную среду получали при добавлении 10% FBS и 1% антибиотика, глутамина. Клетки снимали с поверхности матрасика в соответствии со следующим протоколом. Сливали питательную среду DMEM/F12 с плавающими клетками с малого матраса, промывали прилипшие клетки буферным раствором 1×PBS, после чего добавляли 0,05% трипсина-ЭДТА и ставили в CO₂ – инкубатор на 5 минут при 37°C. Инактивировали трипсин, добавив культуральную среду DMEM/F12, хорошо

ресуспендировали. Далее переносили клетки в пробирку на 15 мл и центрифугировали 7 минут при 1100 об/мин. Отбирали супернатант и сеяли клетки (1×10^6 клеток/мл) в свежей культуральной среде, инкубировали при 37°C в 5 % CO₂-инкубаторе.

В течение 3-4 дней клетки достигают конfluence 60-80% и могут быть использованы для дальнейших экспериментов [59].

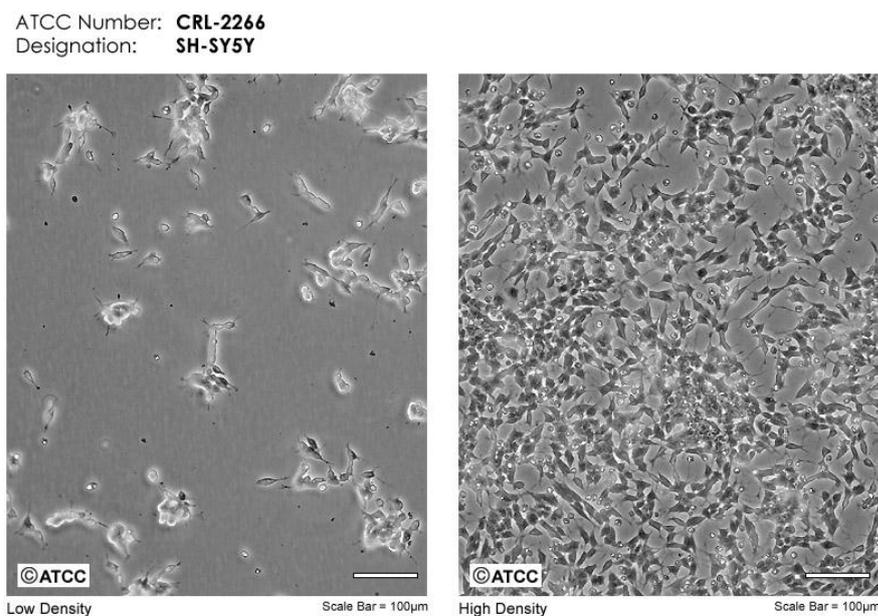


Рисунок 10 – микрофотография клеточной линии нейробластомы SH-SY5Y с низкой и высокой плотностью роста

3.5 Методика получения тотальной микробиоты кишечника здоровых и больных пациентов

Набор биоматериала проводили утром в пластиковые стерильные банки, затем доставляли в лабораторию, где материал обрабатывался сразу или максимум через 4 часа после забора. До обработки материал мог храниться не более 4х часов в холодильнике при температуре плюс 4°C. Тотальную микробиоту кишечника здоровых и больных пациентов получали в соответствии со следующим протоколом:

1 г фекалий перемешивали в 20 мл PBS с помощью ступки и пестика, фильтровали через стрейнер с порами 100 мкм, после чего центрифугировали 5 минут при 5000 об/мин. Надосадочную жидкость переливали в чистые

пробирки типа Falcon на 50 мл, доводили объем до 50 мл раствором PBS. Затем для осаждения бактериальных клеток центрифугировали 40 минут при 11000 об/мин. Надосадочную жидкость сливали, а осадок клеток ресуспендировали в 2 мл раствора PBS.

3.6 Методика получения лизата бактерий кишечника здоровых и больных пациентов

Пробирки с концентрированными бактериальными клетками в концентрации 10^9 кл/мл помещали в резервуар со льдом во избежание перегревания образца, затем бактериальные клетки разрушали ультразвуком с частотой 1,5 МГц 3 раза по 1 минуте с перерывом в 30 секунд. Далее полученный лизат дважды пропускали через бактериологический фильтр (0,22 мк, производитель Merck (Millipore)). Изначальная концентрация белка в лизате 100 нг/мл.

3.7 Инкубирование клеточной линии нейробластомы SH-SY5Y с лизатами бактерий

Производили подсчет клеток с помощью камеры Горяева и разводили таким образом, чтобы количество клеток на лунку было $3 \cdot 10^5$, клетки помещали в лунку 12-луночного планшета, инкубировали 24 часа в объеме 800 мкл среды.

Лизаты бактерий разводили в 100 раз таким образом, чтобы на 1 клетку нейробластомы приходилось лизата 100 клеток бактерий, и помещали в лунки 12-ти луночной плашки по 1 мл, как показано на рисунке 11.

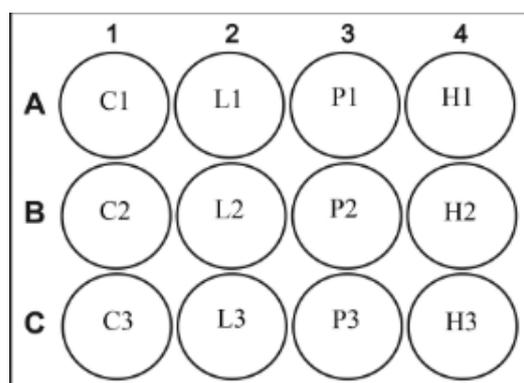


Рисунок 11 – схема проведения эксперимента при стимулировании нейробластомы лизатами бактерий,

где

C₁₋₃ – контрольный образец: питательная среда DMEM/F12+PBS;

L₁₋₃ – группа сравнения *E.coli*;

P₁₋₃ – лизат бактерий кишечника пациентов с БП;

H₁₋₃ – лизат бактерий кишечника здоровых пациентов.

Инкубировали клеточную линию нейробластомы SH-SY5Y (в течение 48 и 24 часов) с лизатами бактерий кишечника здоровых индивидов и пациентов с БП, в качестве группы сравнения использовали лизаты лабораторного штамма *Escherichia coli* (XL - BLUE).

3.8 Сокультивирование клеток нейробластомы с тотальной микробиотой кишечника здоровых индивидов и пациентов с БП

Для стимуляции клеток нейробластомы человека и анализа экспрессии генов были выбраны образцы тотальной микробиоты кишечника пациентов с болезнью Паркинсона. Сперва производили подсчет клеток нейробластомы с помощью камеры Горяева. При концентрации клеток нейробластомы $1 \cdot 10^6$ клетки разбавляли в 10 раз, для получения конечной концентрации $1 \cdot 10^5$ клетки. Клетки нейробластомы помещали в лунку 12-луночного планшета, затем инкубировали 24 часа в объеме 800 мкл среды.

Тотальную микробиоту развели до концентрации $1 \cdot 10^5$ таким образом, чтобы на 1 клетку нейробластомы приходилась 1 бактериальная клетка. Сокультивирование клеток нейробластомы с тотальной микробиотой

кишечника, полученной от здоровых индивидов и от пациентов с БП, и с лабораторным штаммом *E. coli*, проводили в течение 8 часов в 12-ти луночной планшете.

3.9 Выделение РНК из клеток SH-SY5Y

РНК выделяли из клеток SH-SY5Y фенол/хлороформной экстракцией [60].

Для начала отбирали среду, к адгезированным клеткам добавляли по 900 мкл TRIzol Reagent, тщательно пипетировали. Переносили образцы в подписанные пробирки на 1,5 мл. Центрифугировали клетки при 10170 об/мин и 4°C 8 минут для удаления клеточного дебриса. Далее переносили супернатант в чистые пробирки на 1,5 мл, в которые добавляли 0,2 мл хлороформа. Вortexировали каждую пробирку в течение 15 секунд и инкубировали при комнатной температуре в течение 2-3 минут. Центрифугировали образцы при 11000 об/мин и 4°C в течение 15 минут. После центрифугирования отбирали супернатант – водную фазу и переносили в новые пробирки. Далее добавляли по 0,5 мл изопропанола в каждую пробирку, 0,5 мкл соосадителя (Евроген) и перемешивали переворачиванием в течение нескольких секунд. Инкубировали при комнатной температуре в течение 10 минут. Затем центрифугировали при 11000 об/мин и 4°C 10 минут. Убирали надосадочную жидкость и добавляли 700 мкл 80% этилового спирта, перемешивали на вортексе, после чего центрифугировали 7 мин при 7500 об/мин при комнатной температуре. Промывание осадка спиртом осуществляли дважды. Удаляли максимально этиловый спирт и сушили образцы с открытыми крышками (до полного исчезновения запаха спирта). Добавляли 12 мкл свободной от РНКаз воды – (DEPC – обработанная вода), после чего измеряли концентрацию на спектрофотометре.

3.10 Спектрофотометрический метод оценки чистоты и качества выделения РНК

Оценку чистоты и качества РНК каждого образца осуществляли на спектрофотометре (Thermo Scientific NanoDrop 2000). Измеряли оптическую плотность в диапазоне длин волн 190-840 нм. Для проведения анализа наносили 2 мкл образца на неподвижный модуль прибора. Сверху на каплю опускали подвижный модуль, в результате образовывался столбик жидкости, где производилось измерение поглощения света [61].

Соотношение оптической плотности при 260/280 нм, которое используют для оценки чистоты ДНК и РНК, соответствовало значению $\sim 2,0$, что обычно считается «чистым» для РНК. Соотношение оптической плотности 260/230 нм используют как вторичную меру чистоты нуклеиновых кислот при контаминации солями. В нашем случае значения соотношений 260/230 находились в диапазоне 2,0-2,2, что соответствует норме.

Таким образом, образцы РНК были свободны от контаминации протеинами и солями и могли быть использованы для дальнейших молекулярно-биологических манипуляций. Для проведения исследования выделенную РНК разбавляли таким образом, чтобы её концентрация на реакцию составляла 700 нг.

3.11 Синтез кДНК

1. Готовили смеси в стерильных пробирках: 700 нг РНК матрицы на реакцию и 20 мМ Олиго(dT) праймера (общий объем смеси всегда должен был быть 9 мкл);

2. Аккуратно перемешивали смесь и сбрасывали капли со стенок на микроцентрифуге;

3. Помещали пробирки со смесью в амплификатор с греющейся крышкой на 2 мин при 70°C для расплавления вторичных структур РНК;

4. Переносили образцы в лед, предварительно сбросив капли реакционной смеси со стенок пробирки на микроцентрифуге;

5. Добавляли 11 мкл предварительно приготовленной смеси следующего состава:

- Стерильная вода, свободная от РНКаз - 1 мкл;
- 5x буфер для синтеза первой цепи - 4 мкл;
- смесь dNTP (10 mM каждого) - 2 мкл;
- DTT (20 mM) - 2 мкл;
- MMLV ревертаза – 2 мкл

Общий объем смеси должен был быть 11 мкл;

6. Аккуратно перемешивали смесь и сбрасывали капли со стенок на микроцентрифуге;

7. Инкубировали реакционную смесь в амплификаторе с греющейся крышкой 60 мин при 40°C. Останавливали реакцию путем нагрева до 70°C в течение 10 минут.

Синтезированную кДНК разбавляли в 5 раз для использования в полимеразной цепной реакции в реальном времени.

3.12 Определение экспрессии мРНК генов методом ПЦР в реальном времени

Реакцию ПЦР реального времени проводили в пробирках для ПЦР в стрипах с применением анализатора The LightCycler® 480 II Real-Time PCR System («Roche», Швейцария) с использованием готовой смеси qPCRmix-HS SYBR («Евроген», Россия).

Для начала готовили смеси, содержащие 1× SYBR Green qPCR mix, и по 0,1 мкМ прямых и обратных праймеров, используемых в нашем исследовании, в расчете на одну пробирку. К готовой ПЦР-смеси вносили по 2 мкл кДНК.

Условия для реакции выбраны следующие: 5 мин при 95°C – предварительная денатурация; 30 сек при 95°C - денатурации, 30 сек при 60°C - отжиг, 15 сек при 72°C 40 циклов – элонгация [62]. Каждый

эксперимент (ран) включал отрицательный контроль (вода), контроль присутствия ДНК контаминации (образцы РНК). Для оценки эффективности в каждом ране использовали кДНК общего пула образцов для каждого гена: *SNCA*, *HSPA8*, *SNAP25*, *STX1A*, *APP*.

Для проведения оценки уровня экспрессии генов и нормализации использовался дельта-дельта C_t ($\Delta\Delta C_t$) метод. Относительный уровень экспрессии исследуемого генов вычислялся, исходя из его эффективности ПЦР в реальном времени и разности (Δ) точек пересечения (C_t) неизвестного образца по сравнению с контрольным. Для каждого гена рассчитывалась величина «Fold change» = $2^{-\Delta\Delta C_t}$, которая отражает изменения уровня экспрессии от контрольного значения, где $\Delta\Delta C_t = C_{t(\text{исследуемого образца})} - C_{t(\text{контрольного образца})}$ и $\Delta C_t = C_{t(\text{исследуемого гена})} - C_{t(\text{референсного гена})}$ [63].

3.13 Статистическая обработка данных

Для установления различий уровня экспрессии генов использовался непараметрический критерий Краскела-Уоллиса и критерий Манна-Уитни. Уровень значимости был принят равным 0,05. Визуальное представление полученных данных было выполнено с использованием программы GraphPad Prism 7.

5. ФИНАНСОВЫЙ МЕНЕДЖМЕНТ, РЕСУРСОЭФФЕКТИВНОСТЬ И РЕСУРСОСБЕРЕЖЕНИЕ

5.1 Оценка коммерческого потенциала и перспективности проведения научных исследований с позиции ресурсоэффективности и ресурсосбережения

Болезнь Паркинсона является одной из самых распространенных нейродегенеративных заболеваний, которое на данный момент, к сожалению, не поддается ранней диагностики и лечению. Число больных значительно увеличивается с возрастом, не смотря на это, уже сегодня эта болезнь распространяется на все более молодое поколение.

Полученные данные о влиянии микробиоты кишечника пациентов с болезнью Паркинсона на клеточную линию нейробластомы помогут определить предпосылки заболевания, а также могут быть использованы как основа для разработки новых методов лечения и подходов к диагностике болезни Паркинсона. Данная разработка является перспективной и ресурсоэффективной.

5.1.1 Потенциальные потребители результатов исследования

В данной работе исследуется экспрессионный профиль клеток нейробластомы при стимулировании лизатами бактерий кишечника здоровых индивидов и пациентов с болезнью Паркинсона, а также тотальной микробиотой здоровых и больных пациентов. Результаты исследования могут помочь приблизиться к пониманию этиологии заболевания. Следовательно, потенциальными потребителями продукта исследования могут быть лаборатории, направленные на разработку новых методов диагностики заболевания, а также исследовательские институты, базирующиеся на изучении болезни Паркинсона.

5.1.2 Анализ конкурентных технических решений

Анализ конкурентных технических решений с позиции ресурсоэффективности и ресурсосбережения был проведен для сравнения эффективности научной разработки с разработкой, которая была проведена совместно учеными из США, Южной Кореи, Германии и Сингапура в Техасском университете в Остине, США.

Таблица 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	0,05	4	5	0,2	0,25
2. Модель исследования	0,1	5	5	0,5	0,5
3. Использование методики сокультивирования микробиоты с нейробластомой	0,3	5	0	1,5	0
4. Безопасность	0,15	5	4	0,75	0,6
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			4,95	3,15

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

Б_{к1} – научное исследование, проводимое в Техасском университете А&М в Остине, США.

Анализ конкурентных технических решений определяется по формуле:

$$K = \sum V_i \cdot B_i, \quad (3)$$

где K – конкурентоспособность научной разработки или конкурента;

V_i – вес показателя (в долях единицы);

B_i – балл i-го показателя.

Проанализировав основные критерии сравнения, можно сделать вывод, что разрабатываемое нами исследование влияния микробиоты пациентов с болезнью Паркинсона на экспрессионный профиль клеток нейробластомы превосходит как в ресурсоэффективности, так и экономической эффективности результаты научной группы Техасского университета A&M. Изучение влияние микрофлоры кишечника, как групп бактерий, так и отдельных видов, преобладающих у пациентов с болезнью Паркинсона на клеточной модели нейробластомы поможет определить предпосылки заболевания и разработать подходы к ранней диагностике.

5.1.3 SWOT-анализ

Был проведен комплексный анализ внешней и внутренней среды научно-исследовательского проекта с помощью SWOT-анализа. Были выявлены сильные и слабые стороны исследования, а также возможности и угрозы, которые приведены в таблице 4.

Таблица 4 - SWOT-анализ

	Сильные стороны научно-исследовательского проекта:	Слабые стороны научно-исследовательского проекта:
	С1. Перспективное исследование в науке и медицине С2. Наличие необходимого оборудования С3. Наличие бюджетного финансирования С4. Заявленная экономичность и энергоэффективность технологии С5. Квалифицированный персонал	Сл1. Длительный срок подготовки эксперимента Сл2. Возможная контаминация объекта исследования Сл3. Большой срок поставок объекта и материалов для проведения научного исследования Сл4. Высокая стоимость исследования
Возможности: В1. Использование инфраструктуры ТПУ В2. Использование инфраструктуры ЦНИЛ В3. Использование инфраструктуры СибГМУ В4. Повышение стоимости конкурентных разработок.	Результаты исследования позволят по-новому взглянуть на этиологию болезни Паркинсона и разработать подходы к ранней диагностике заболевания.	Проведение некоторых этапов на базе СибГМУ позволяет предотвратить контаминацию материалов, находящихся на базе ЦНИЛ.

Продолжение таблицы 4

<p>Угрозы: У1. Отсутствие спроса на новые технологии производства У2. Развитая конкуренция технологий производств У3. Введения дополнительных государственных требований к сертификации продукции</p>	<p>Результаты исследования будут иметь высокий спрос, т.к. до сих пор нет решения проблемы. Это в свою очередь может увеличить размеры финансирования проекта.</p>	<p>Стремительно развивающаяся во времени проблема, для которой проводится данное исследование, может увеличить спрос на технологию производства.</p>
---	--	--

В ходе проведения SWOT-анализа можно сделать следующие выводы: проблема, исследуемая в данном проекте, является перспективной, что повышает вероятность финансирования. В связи с широким распространением данного заболевания, нет угрозы снижения спроса на продукт исследования.

5.2 Планирование научно-исследовательских работ

5.2.1 Структура работ в рамках научного исследования

Для выполнения научного исследования была сформирована рабочая группа, в состав которой входили научные сотрудники, преподаватели, инженеры и лаборанты.

Порядок составления этапов и работ, распределение исполнителей по данным видам работ приведен в таблице 5.

Таблица 5 - Перечень этапов, работ и распределение исполнителей

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

Продолжение таблицы 5

Теоретические и экспериментальные исследования	5	Проведение теоретических расчетов и обоснований	Инженер	
	6	Построение макетов (моделей) и проведение экспериментов	Руководитель, инженер	
	7	Выбор генов и дизайн праймеров для эксперимента	Руководитель, инженер	
	8	Подбор условий амплификации для праймеров	Руководитель, инженер	
	9	Культивирование клеточной линии нейробластомы SH-SY5Y	Руководитель, инженер	
	10	Инкубирование клеточной линии нейробластомы SH-SY5Y с лизатами бактерий 48 часов	Руководитель, инженер	
	11	Инкубирование клеточной линии нейробластомы SH-SY5Y с лизатами бактерий 24 часа	Руководитель, инженер	
	12	Сокультивирование клеток нейробластомы с тотальной микробиотой кишечника здоровых индивидов и пациентов с БП	Руководитель, инженер	
	13	Выделение РНК из клеток SH-SY5Y и спектрофотометрический метод оценки чистоты и качества выделенной РНК	Инженер	
	14	Синтез кДНК	Инженер	
	15	Определение экспрессии мРНК генов методом ПЦР в реальном времени	Инженер	
		16	Сопоставление результатов экспериментов с теоретическими исследованиями	Руководитель, инженер
	Обобщение и оценка результатов	17	Оценка эффективности полученных результатов	Руководитель, инженер
	Оформление отчета по НИР	18	Составление пояснительной записки (эксплуатационно-технической документации)	Инженер

5.2.2. Определение трудоемкости выполнения работ

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

$$t_{ожі} = \frac{3t_{\min i} + 2t_{\max i}}{5}, \quad (4)$$

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

$t_{\min i}$ – минимально возможная трудоемкость выполнения заданной i -ой работы, чел.-дн.;

$t_{\max i}$ – максимально возможная трудоемкость выполнения заданной i -ой работы, чел.-дн.

Продолжительность каждой работы в рабочих днях определяется по формуле:

$$T_{pi} = \frac{t_{ожi}}{Ч_i}, \quad (5)$$

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

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

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

5.2.3. Разработка графика проведения научного исследования

Для построения горизонтального ленточного графика, диаграммы Ганта, на котором работы по теме представляются протяженными во времени отрезками, характеризующимися датами начала и окончания выполнения данных работ, пользуются формулой для перевода рабочих дней в календарные:

$$T_{ki} = T_{pi} \cdot k_{\text{кал}}, \quad (6)$$

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.

Коэффициент календарности определяется по следующей формуле:

$$k_{\text{кал}} = \frac{T_{\text{кал}}}{T_{\text{кал}} - T_{\text{вых}} - T_{\text{пр}}}, \quad (7)$$

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 для 6-ти дневной рабочей недели:

$$k_{\text{кал}} = \frac{365}{365 - 52 - 14} = 1,22 \quad (7)$$

Таблица 6 – Временные показатели проведения научного исследования

Название Работы (Этапы)	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	$t_{ожг}$, чел-дни			
Составление и утверждение технического задания	0,50	1,0	0,70	Руководитель (Р)	0,7	0,854
Подбор и изучение материалов по теме	10,00	15,00	12,00	Инженер (И)	12,00	14,64
Выбор направления исследований	1,00	3,00	1,8	Р	1,8	2,2
Календарное планирование работ по теме	0,50	1,00	0,70	Р	0,35	0,427
	0,50	1,00	0,70	И	0,35	0,427
Проведение теоретических расчетов	15,00	20,00	17,00	И	17,00	20,74
Построение макетов	0,50	1,00	0,70	Р	0,35	0,427
	0,50	1,00	0,70	И	0,35	0,427
Выбор генов и дизайн праймеров для эксперимента	15,00	20,00	17,00	Р	8,5	10,00
	15,00	20,00	17,00	И	8,5	10,00
Подбор условий амплификации для праймеров	10,00	12,00	10,8	Р	5,4	6,59
	10,00	12,00	10,8	И	5,4	6,59
Культивирование клеточной линии нейробластомы SH SY5Y	60,00	70,00	64,00	Р	32,00	39,04
	60,00	70,00	64,00	И	32,00	39,04
Инкубирование клеточной линии нейробластомы SH-SY5Y с лизатами бактерий 48 часов	2,00	6,00	3,2	Р	1,6	1,95
	2,00	6,00	3,2	И	1,6	1,95
Инкубирование клеточной линии нейробластомы SH-SY5Y с лизатами бактерий 24 часа	1,00	2,8	1,72	Р	0,86	1,05
	1,00	2,8	1,72	И	0,86	1,05

Продолжение таблицы 6

Сокультивирование клеток нейробластомы с тотальной микробиотой кишечника здоровых индивидов и пациентов с БП	0,3	1,56	0,49	Р	0,24	0,3
	0,3	1,56	0,49	И	0,24	0,3
Выделение РНК из клеток SH SY5Y и спектрофотометрический метод оценки чистоты и качества выделенной РНК	0,37	0,5	0,42	И	0,42	0,51
Синтез кДНК	0,25	0,4	0,31	И	0,31	0,38
Определение экспрессии мРНК генов методом ПЦР в реальном времени	10,00	12,00	10,8	И	10,8	13,18
Сопоставление результатов экспериментов с теоретическими исследованиями	2,00	4,00	2,8	Р	1,4	1,7
	2,00	4,00	2,8	И	1,4	1,7
Оценка эффективности полученных результатов	0,5	2,00	1,10	Р	0,55	0,67
	0,5	2,00	1,10	И	0,55	0,67
Составление пояснительной записки (эксплуатационно-технической документации)	50,00	60,00	54,00	И	54,00	65,88

Таблица 7 - Календарный план-график проведения НИОКР с октября по декабрь 2018 г. по теме

№	Вид работ	Исполнитель	T_{ki} кал. дн.	Продолжительность выполнения работ										
				Октябрь		Ноябрь			Декабрь					
				2	3	1	2	3	1	2	3			
1	Составление ТЗ	Р	0,854	▨										
2	Изучение материалов	И	14,64	■										
3	Выбор напр. исслед.	Р	2,2		▨									
4	Календарное планирование	Р	0,427		▨									
		И	0,427		■									
5	Проведение теорет. расчетов	И	20,74			■								
6	Построение макетов	Р	0,427							▨				
		И	0,427							■				
7	Выбор генов, дизайн праймеров	Р	10,00							▨				
		И	10,00							■				
8	Подбор условий амплификации для праймеров	Р	6,59								▨			
		И	6,59								■			
9	Культив. клеток	Р	39,04											
		И	39,04											
10	Инкубир. клеток с лизатами 48 часов	Р	1,95											
		И	1,95											
11	Инкубир. клеток с лизатами 24 часа	Р	1,05											
		И	1,05											
12	Сокульти.клеток с тот. микробиотой	Р	0,3											
		И	0,3											
13	Выдел.РНК из клеток	И	0,51											
14	Синтез кДНК	И	0,38											
15	Опред.экс. мРНК	И	13,18											

Таблица 8 - Календарный план-график проведения НИОКР с января по апрель 2019 г. по теме

№	Вид работ	Исполнители	T_{ki} , кал. дн	Продолжительность выполнения работ						
				фев.	март			апрель		
				3	1	2	3	1	2	3
16	Сопоставление результатов эксперим. с теоретич. исследований.	Р	1,7							
		И	1,7							
17	Оценка эффективности полученных результатов	Р	0,67							
		И	0,67							
18	Составление пояснительной записки	И	35,14							

 – Руководитель (Р)

 Инженер (И)

5.3 Бюджет научно-технического исследования (НТИ)

Для расчета бюджета научно – технического исследования влияния микробиоты пациентов с болезнью Паркинсона на экспрессионный профиль клеток нейробластомы в эксперименте *in vitro* использовали группы затрат по статьям, которые включают материальные затраты проекта, амортизационные отчисления за использованное оборудование, основную и дополнительную заработную плату исполнителей темы, отчисления во внебюджетные фонды и накладные расходы.

5.3.1 Расчет материальных затрат НТИ

Данная статья расходов включает стоимость всех материалов, которые были использованы при разработке проекта. Расчет материальных затрат вычисляется по следующей формуле:

$$Z_m = (1 + k_T) \cdot \sum_{i=1}^m C_i \cdot N_{расхi} , \quad (8)$$

где m – количество видов материальных ресурсов, потребляемых при выполнении научного исследования;

$N_{расхi}$ – количество материальных ресурсов i -го вида, планируемых к использованию при выполнении научного исследования (шт., кг, м, м² и т.д.);

C_i – цена приобретения единицы i -го вида потребляемых материальных ресурсов (руб./шт., руб./кг, руб./м, руб./м² и т.д.);

k_T – коэффициент, учитывающий транспортно-заготовительные расходы (15-25% от стоимости материалов).

Таблица 9 – Материальные затраты

Наименование	Единица измерения	Количество	Цена за ед., руб.	Затраты на материалы, (З _м), руб.
Культуральная среда	450 мл.	7 шт.	410,40	3303,72
Трипсин	400 мл.	2 шт.	348,90	802,47
Буфер PBS	100 мл.	4 шт.	2570,00	11822,00
Телячья сыворотка FBS	500 мл.	1 шт.	3600,00	4140,00
Антибиотик	10 мл.	1 шт.	167,20	192,28
Добавки	5 г.	7 уп.	11,05	88,95
Тризол	200 мл.	0,2	52 182,96	8453,64
Хлороформ	1 кг	0,1	150,00	17,25
Изопропанол	1 л.	0,2	430,00	98,9
Этанол	1 л.	0,5	900,00	517,5
Стерильная вода DEPC	50 мл.	0,1	2500,00	250,00
Соосадитель	100 мкл.	1,8	1650,00	34,155
Реактивы MMLV RT kit	1 шт.	1 уп.	3325,00	3823,75
SYBR® Green PCR Master Mix для ПЦР-РВ	10 шт.	1 уп.	8900,00	10235,00
ТАЕ	1 л.	0,02	5879,40	117,59
Агароза	100 г.	0,01	110,00	12,65
Бромистый этидий	10 мл	0,05	650,00	3,74
Матрасы д/культ.	5 шт.	10 уп.	589,00	6773,5
Культуральные планшеты 12-wp	1 шт.	3 уп.	89,60	309,12
Центрифужные пробирки 50 мл	25 шт.	2 уп.	460,00	1058,00
Центрифужные пробирки 15 мл	50 шт.	1 уп.	510,00	586,5
Серологические пипетки	200 шт.	1 уп.	4680,00	5382,00
Эппендорфы 1,5 мл	500 шт.	1 уп.	604,70	695,405
Эппендорфы 2 мл	500 шт.	1 уп.	604,70	695,405
Микроцентр. пробирки 200 мкл	500 шт.	1 уп.	604,70	695,405
Пробирки для ПЦР в стрипах	120 шт.	2 уп.	604,70	1390,81
Наконечники для дозаторов (0,1-200 мкл)	960 шт.	1 уп.	7500,00	8625,00

Продолжение таблицы 9

Наконечники для дозаторов (200-1000 мк)	960 шт.	1 уп.	4500,00	5175,00
ИТОГО:				75299,74

5.3.2 Расчет затрат на оборудование для научно-экспериментальных работ

В данную статью были включены все затраты, связанные с приобретением специального оборудования (приборов, контрольно-измерительной аппаратуры, стендов, устройств и механизмов). При приобретении спецоборудования необходимо учесть затраты по его доставке и монтажу в размере 15 % от его цены. Стоимость оборудования, используемого при выполнении конкретного научного проекта и имеющегося в данной научно-технической организации, учитывается в виде амортизационных отчислений.

Сумма амортизационных отчислений определяются по формуле:

$$E_{ам} = (\sum K_{об} \cdot N_{ам} \cdot T_{об}) / (365 \cdot 100), \quad (9)$$

где $K_{об}$ – стоимость единицы прибора или оборудования, руб.;

$N_{ам}$ – норма амортизации прибора или оборудования, %;

$T_{об}$ – время использования оборудования, дни.

Результаты расчетов амортизационных отчислений представлены в табл. 10

Таблица 10 - Расчет затрат на амортизационные расходы

№ п/п	Наименование оборудования	Кол-во единиц обор. шт.	Цена единицы оборудования, тыс.руб.	Кол-во дней работы оборуд., дней	Норма амортиз. оборуд., %	Сумма амортиз. отчислений, руб.
1	Холодильник (STINOL)	1	184	30	10,0	1512
2	Система высокой очистки воды (Simplicity)	1	267	23	13,0	2187,2

Продолжение таблицы 10

3	Автоматическая пипетка	6	7,850	26	10,0	55,92
4	Пайпет	2	4,875	30	10,0	80,14
5	СО ₂ -инкубатор	2	885,597	64	18,0	56775,26
6	Инвертированный микроскоп	1	275,900	30	18,0	2081,8
7	Центрифуга	2	27,250	15	12,3	275,49
8	Ламинарный бокс	2	342,850	30	18,0	10144,6
9	Центрифуга (Minispin)	1	114,14	3	15,0	140,72
10	Центрифуга–вортекс Biosan Микроспин FV-2400	2	15,48	16	15,0	203,57
11	Спектрофотометр	1	487,350	5	10,4	694,3
12	Льдогенератор PORKKA	1	4,571	20	18,0	45,08
13	ПЦР амплификатор	1	274,186	3	15,0	338,04
14	Анализатор The LightCycler	1	1,150,00	20	15,0	9583,33
15	Аналитические весы (Adventure)	1	46,140	8	12,0	121,35
16	Источник питания Эльф – 8	1	42,200	8	15,0	138,74
17	УФ трансиллюминатор	1	950,00	8	15,0	3123,29
Итого:			3,929,389			87500,83

5.3.3 Основная заработная плата исполнителей темы

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

$$Z_{зп} = Z_{осн} + Z_{доп}, \quad (10)$$

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

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

Основная заработная плата рассчитывается по следующей формуле:

$$Z_{\text{осн}} = Z_{\text{дн}} \cdot T_p, \quad (11)$$

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

T_p – продолжительность работ, выполняемых научно-техническим работником, раб. дн. (6);

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

Среднедневная заработная плата рассчитывается по формуле:

$$Z_{\text{дн}} = \frac{Z_m \cdot M}{F_d}, \quad (12)$$

где Z_m – месячный должностной оклад работника, руб.;

M – количество месяцев работы без отпуска в течение года:

при отпуске в 24 раб. $M=11,2$ месяца, 5-дневная неделя (инженер);

при отпуске в 48 раб. $M=10,4$ месяца, 6-дневная неделя (руководитель);

F_d – действительный годовой фонд рабочего времени научно-технического персонала, раб. дн. (табл. 11).

Таблица 11 – Баланс рабочего времени

Показатели рабочего времени	Руководитель	Инженер
Календарное число дней	365	365
Количество нерабочих дней		
– выходные дни	44	48
– праздничные дни	14	14
Потери рабочего времени		
– отпуск	56	28
– невыходы по болезни	0	0
Действительный годовой фонд рабочего времени	251	275

Месячный должностной оклад работника:

$$Z_m = Z_{\text{тс}} \cdot (1 + k_{\text{пр}} + k_d) \cdot k_p, \quad (13)$$

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

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

k_d – коэффициент доплат и надбавок составляет примерно 0,2 – 0,5 (в НИИ и на промышленных предприятиях – за расширение сфер

обслуживания, за профессиональное мастерство, за вредные условия: 15-20 % от $Z_{тс}$);

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

Расчёт основной заработной платы приведён в табл. 12.

Таблица 12 – Расчет основной заработной платы

Исполнители	Разряд	$Z_{тс}$, руб.	$k_{пр}$	k_d	k_p	Z_m , руб	$Z_{дн}$, руб.	T_p , раб. дн.	$Z_{осн}$, руб.
Руководитель	к.м.н	33664	0,3	0,2	1,3	65644,8	2719,94	53,75	146196,78
Инженер	студент	26300	0,3	0,2	1,3	51285,0	2088,7	145,78	304490,69
Итого									450687,47

*Данные взяты согласно «Положению об оплате труда» из планового финансового отдела ГПУ.

5.3.4 Дополнительная заработная плата исполнителей темы

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 ведется по следующей формуле:

$$Z_{доп} = k_{доп} \cdot Z_{осн} \quad (14)$$

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

$$Z_{доп.рук.} = 0,12 \cdot 146196,78 = 17543,61$$

$$Z_{инженера} = 0,12 \cdot 304490,69 = 36538,88$$

5.3.5 Отчисления во внебюджетные фонды

Величина отчислений во внебюджетные фонды определяется исходя из следующей формулы:

$$Z_{внеб} = k_{внеб} \cdot (Z_{осн} + Z_{доп}), \quad (15)$$

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

Отчисления во внебюджетные фонды представлены в таблице 13.

Таблица 13 – Отчисления во внебюджетные фонды

Исполнитель	Основная заработная плата, руб.	Дополнительная заработная плата, руб.
Руководитель проекта	146196,78	17543,61
Инженер (студент)	304490,69	36538,88
Коэффициент отчислений во внебюджетные фонды	0,271	
Итого:		136792,66

5.3.6 Накладные расходы

Накладные расходы учитывают прочие затраты организации, не попавшие в предыдущие статьи расходов: печать и ксерокопирование материалов исследования, электроэнергии и др. Их величина определяется по следующей формуле:

$$Z_{\text{накл}} = (\text{сумма статей } 1 \div 5) \cdot k_{\text{нр}}, \quad (16)$$

где $k_{\text{нр}}$ – коэффициент, учитывающий накладные расходы.

Величину коэффициента накладных расходов можно взять в размере 16%.

Таким образом, накладные расходы на данные НТИ составляют 128698,11 руб.

5.3.7 Формирование бюджета затрат научно-исследовательского проекта

Рассчитанная величина затрат научно-исследовательской работы является основой для формирования бюджета затрат проекта, который при формировании договора с заказчиком защищается научной организацией в качестве нижнего предела затрат на разработку научно-технической продукции.

Определение бюджета затрат на научно-исследовательский проект по каждому варианту исполнения приведен в табл. 14.

Таблица 14 – Расчет бюджета затрат НИИ

Наименование статьи	Сумма, руб.
Материальные затраты НИИ	75299,74
Амортизация специального оборудования	87500,83
Затраты по основной заработной плате исполнителей темы	450687,47
Затраты по дополнительной заработной плате исполнителей темы	54082,49
Отчисления во внебюджетные фонды	136792,66
Накладные расходы	128698,11
Итого бюджет затрат НИИ:	933061,3

5.4 Определение ресурсной (ресурсосберегающей), финансовой, бюджетной, социальной и экономической 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.

Интегральный финансовый показатель разработки определяется как:

$$I_{\text{финр}}^{\text{исп.}i} = \frac{\Phi_{pi}}{\Phi_{\text{max}}} = \frac{933061,3}{1250000} = 0,75, \quad (17)$$

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).

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

$$I_{pi} = \sum a_i \cdot b_i, \quad (18)$$

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.

Расчет интегрального показателя приведен в таблице 15.

Таблица 15 – Сравнительная оценка характеристик вариантов исполнения проекта

Критерии \ Объект исследования	Весовой коэффициент параметра	Текущий проект
1. Использование высокотехнологичных методов молекулярной биологии	0,1	4
2. Модель исследования	0,3	5
3. Трудоемкость	0,05	4
4. Безопасность	0,15	5
5. Конкурентоспособность продукта	0,2	5
6. Финансирование научной разработки	0,2	5
ИТОГО	1	28

$$I_{т.п.} = 0,1 \cdot 4 + 0,3 \cdot 5 + 0,05 \cdot 4 + 0,15 \cdot 5 + 0,2 \cdot 5 + 0,2 \cdot 5 = 4,85$$

Интегральный показатель эффективности вариантов исполнения разработки ($I_{испн.}$) определяется на основании интегрального показателя ресурсоэффективности и интегрального финансового показателя по формуле:

$$I_{т.п.} = \frac{I_{т.п.}}{I_{финр}} = \frac{4,85}{0,75} = 6,47, \quad (19)$$

Таблица 16 – Сравнительная эффективность разработки

№ п/п	Показатели	Разработка
1	Интегральный финансовый показатель разработки	0,75
2	Интегральный показатель ресурсоэффективности разработки	4,85
3	Интегральный показатель эффективности	6,47

Поскольку данное исследование на сегодняшний день не имеет аналогов невозможно провести сравнение значений интегральных показателей эффективности.

В результате расчета бюджета научно-технического исследования влияния микробиоты пациентов с болезнью Паркинсона на экспрессионный профиль клеток нейробластомы в эксперименте *in vitro*, была получена сумма, необходимая для выполнения работы, равная 933061,3 рублей. Таким образом, можно сказать, что исследование рентабельно.

В результате проведения разработки раздела «Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение» было выяснено, что данное исследование является конкурентоспособным, отличающиеся безопасностью и простотой исполнения.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ СТУДЕНТА

1. Гридина М.В. «Оценка влияния микробиоты пациентов с болезнью Паркинсона на экспрессионный профиль клеток нейробластомы в эксперименте *in vitro*» // Материалы Всероссийской итоговой 78-ой студенческой научной конференции им. Н. И. Пирогова. – Томск: Изд. СибГМУ, 2019. -114 с.
2. Перекуча Н.А., Гридина М.В., Иккерт О.П. «Определение цитотоксического эффекта микроорганизмов, выделенных из пациентов с болезнью Паркинсона, на клеточной линии U251» // Перспективы развития фундаментальных наук: сборник трудов XVI Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых (Томск, 23–26 апреля 2019 г.): в 7 т. Т. 4: Биология и фундаментальная медицина / под ред. И.А. Курзиной, Г.А. Вороновой. – Томск: Издательский Дом Томского государственного университета, 2019.