

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

Инженерная школа новых производственных технологий
 Направление подготовки 19.04.01 Биотехнология, профиль Биотехнология
 Научно-образовательный центр Н.М. Кижнера

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Тема работы
Разработка методики выделения и сохранения микробиоты кишечника

УДК 612.336.3-047.37

Студент

Группа	ФИО	Подпись	Дата
4ДМ61	Гудовщикова Надежда Игоревна		19.05.2018

Руководитель ВКР

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Ст. преп., НОЦ Н.М. Кижнера	Иккерт О.П.	к.б.н.		29.05.2018

КОНСУЛЬТАНТЫ:

По разделу «Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение»

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент	Креницына З.В.	к.т.н., доцент		21.05.2018

По разделу «Социальная ответственность»

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Профессор	Ахмеджанов Р.Р.	д.б.н., профессор		19.05.2018

ДОПУСТИТЬ К ЗАЩИТЕ:

Руководитель ООП	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Профессор НОЦ Н.М. Кижнера	Потапов А.С.	д.х.н., профессор		31.05.2018

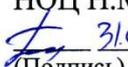
Томск – 2018 г.

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»**

Инженерная школа новых производственных технологий
Направление подготовки 19.04.01 Биотехнология, профиль Биотехнология
Научно-образовательный центр Н.М. Кижнера

УТВЕРЖДАЮ:
Руководитель ООП Профессор
НОЦ Н.М. Кижнера
 31.05.18 Потапов А.С.
(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
4ДМ61	Гудовщиковой Надежде Игоревне

Тема работы:

Разработка методики выделения и сохранения микробиоты кишечника

Утверждена приказом директора (дата, номер)

№ 1531/с от 06.03.2018

Срок сдачи студентом выполненной работы:

02.06.2018 г.

ТЕХНИЧЕСКОЕ ЗАДАНИЕ:

Исходные данные к работе

(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.).

Объектом исследования является микробиота кишечника человека. Для исследования использовали образцы фекалий здорового человека. Биоматериал был любезно предоставлен Госпитальной клиникой им. А.Г. Савиных СибГМУ, после проверки на все инфекционные заболевания. Выделенная микробиота кишечника человека рекомендована для трансплантации пациентам с заболеваниями желудочно-кишечного тракта

<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><i>Перечень разделов, разработанных в данной работе:</i></p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Обзор литературы 2. Объект и методы исследования 3. Результаты проведенного исследования 4. Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение 5. Социальная ответственность 6. Заключение 7. Раздел на иностранном языке
<p>Перечень графического материала</p> <p><i>(с точным указанием обязательных чертежей)</i></p>	
<p>Консультанты по разделам выпускной квалификационной работы</p> <p><i>(с указанием разделов)</i></p>	
<p>Раздел</p>	<p>Консультант</p>
<p>Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение</p>	<p>Креницына З.В., доцент отделения социально-гуманитарных наук, к.т.н.</p>
<p>Социальная ответственность</p>	<p>Ахмеджанов Р.Р., профессор отделения контроля и диагностики, д.б.н.</p>
<p>Раздел на иностранном языке</p>	<p>Кобзева Н.А., старший преподаватель отделения иностранных языков</p>
<p>Названия разделов, которые должны быть написаны на русском и иностранном языках:</p>	
<p><i>Объект и методы исследования</i></p>	

<p>Дата выдачи задания на выполнение выпускной квалификационной работы по линейному графику</p>	<p>29.01.2018 г.</p>
--	----------------------

Задание выдал руководитель:

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Ст. преп., НОЦ Кижнера	Иккерт О.П.	к.б.н.		12.03.2018

Задание принял к исполнению студент:

Группа	ФИО	Подпись	Дата
4ДМ61	Гудовщикова Надежда Игоревна		12.03.2018

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

Студенту:

Группа	ФИО
4ДМ61	Гудовщиковой Надежде Игоревне

Школа	Новых производственных технологий	Отделение школы (НОЦ)	Н.М.Кижнера
Уровень образования	Магистр	Направление/специальность	19.04.01 Биотехнология

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

1. Стоимость ресурсов научного исследования (НИ): материально-технических, энергетических, финансовых, информационных и человеческих	Проект реализовывался в центральной научно-исследовательской лаборатории Сибирского государственного медицинского университета (ЦНИЛ СибГМУ). В исследованиях принимали участие 2 человека: научный руководитель, магистрант-дипломник.
2. Нормы и нормативы расходования ресурсов	В соответствии с ГОСТ 14.322-83 «Нормирование расхода материалов» и ГОСТ Р 51541-99 «Энергосбережение. Энергетическая эффективность»

Перечень вопросов, подлежащих исследованию, проектированию и разработке:

1. Оценка коммерческого и инновационного потенциала НТИ	Инициация проекта (Цели и результаты, определение концепции проекта, анализ рынка поставщиков и потенциальных потребителей), экспертная оценка эффективности, оценка рисков проекта
2. Разработка устава научно-технического проекта	2.1. Устав проекта 2.2. Организационная структура проекта 2.3 Ограничения и допущения проекта
3. Планирование процесса управления НТИ: структура и график проведения, бюджет, риски и организация закупок	3.1 Формирование бюджета научного исследования 3.2 Организационная структура проекта 3.3 Матрица ответственности 3.4 Оценка рисков проекта
4. Определение ресурсной, финансовой, экономической эффективности	4.1 Оценка сравнительной эффективности исследования

Перечень графического материала (с точным указанием обязательных чертежей):

1. Сегментирование рынка
2. Диаграмма Исикавы
3. Организационная структура проекта
4. Иерархическая структура рисков
5. Диаграмма Ганта

Дата выдачи задания для раздела по линейному графику

29.01.2018г.

Задание выдал консультант:

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент	Креницына Зоя Васильевна	к.т.н., доцент		19.03.2018

Задание принял к исполнению студент:

Группа	ФИО	Подпись	Дата
4ДМ61	Гудовщикова Надежда Игоревна		19.03.2018

ЗАДАНИЕ ДЛЯ РАЗДЕЛА «СОЦИАЛЬНАЯ ОТВЕТСТВЕННОСТЬ»

Студенту:

Группа	ФИО
4ДМ61	Гудовщиковой Надежде Игоревне

Школа	Новых производственных технологий	Отделение школы (НОЦ)	Н.М.Кижнера
Уровень образования	Магистр	Направление/специальность	19.04.01 Биотехнология

Исходные данные к разделу «Социальная ответственность»:

<p>1. Описание рабочего места (рабочей зоны, технологического процесса, механического оборудования) на предмет возникновения:</p> <ul style="list-style-type: none"> – вредных проявлений факторов производственной среды (метеоусловия, вредные вещества, освещение, шумы, вибрации, электромагнитные поля, ионизирующие излучения) – опасных проявлений факторов производственной среды (механической природы, термического характера, электрической, пожарной и взрывной природы) – негативного воздействия на окружающую природную среду (атмосферу, гидросферу, литосферу) – чрезвычайных ситуаций (техногенного, стихийного, экологического и социального характера) 	<p>Объектом исследования является микробиота кишечника человека. Рабочее место находится в центральной научно-исследовательской лаборатории Сибирского государственного медицинского университета (ЦНИЛ СибГМУ). Для исследования использовали образцы фекалий человека. Биоматериал был любезно предоставлен Госпитальной клиникой им. А.Г. Савиных СибГМУ. До транспортировки в ЦНИЛ СибГМУ биоматериал хранился не более двух часов в холодильнике при +4°C. После поступления в лабораторию биоматериал сразу использовался для выделения тотальной микробиоты кишечника.</p> <p>Область применения – научно-исследовательские центры, клиники занимающиеся трансплантацией фекальной микробиоты.</p>
<p>2. Перечень законодательных и нормативных документов по теме</p>	

Перечень вопросов, подлежащих исследованию, проектированию и разработке:

<p>1. Анализ выявленных вредных факторов проектируемой производственной среды 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>2. Анализ выявленных опасных факторов проектируемой произведённой среды 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>Вредные факторы производственной среды:</p> <ul style="list-style-type: none"> - недостаток естественного освещения: действие фактора на организм человека: снижение зрительной функции, повышение уровня утомляемости, приведение допустимых норм рабочей зоны с необходимой размерностью: КЕО при естественном освещении - 1,2 %, КЕО при совмещенном освещении - 2,1 %, освещенность при искусственном комбинированном освещении - 500 лк, при общем освещении - 400 лк (СанПиН 2.2.1/2.1.1.1278–03. Гигиенические требования к естественному, искусственному и совмещенному освещению жилых и общественных зданий), рекомендуемые средства защиты (наличие остекленных оконных проемов, люминесцентных ламп дневного освещения; проведение очистка стекол оконных рам и светильников два раза в год и своевременная замена перегоревших ламп); - микроклимат помещений: научно-исследовательской лаборатория оборудована системами отопления, кондиционирования воздуха или эффективной приточно-вытяжной
--	--

	<p>вентиляцией, действие фактора на организм человека: системы вентиляции и отопления в лабораторном помещении обеспечивают параметры микроклимата в соответствии с требованиями, приведение допустимых норм рабочей зоны с необходимой размерностью: температура воздуха в холодный период года - 19-24 °С, температура воздуха в теплый период года - 20-28 °С, относительная влажность воздуха - 15-75 % (СанПиН 2.2.4.548–96. Гигиенические требования к микроклимату производственных помещений), рекомендуемые средства защиты - установка, диагностика и ремонт системы вентиляции и отопления;</p> <p>- уровень шума: повышенный уровень шума при работе системы вентиляции, действие фактора на организм человека: прогрессирующее понижение слуха, головные боли, повышенная утомляемость, приведение допустимых норм с необходимой размерностью: уровень звука в лаборатории - не более 75 дБА (ГОСТ 12.1.003–83 ССБТ. Шум. Общие требования безопасности), рекомендуемые средства защиты - диагностика и ремонт системы вентиляции, наушники;</p> <p>К опасным факторам производственной среды относятся:</p> <ul style="list-style-type: none"> - осколки стеклянной посуды; - повышенная температура поверхностей оборудования - оборудование, работающее под давлением; - электроприборы. - пожар на рабочем месте в результате разлива ЛВЖ, - облив химикатами, - ожоги кислотами.
<p>3. Охрана окружающей среды:</p> <ul style="list-style-type: none"> - защита селитебной зоны - анализ воздействия объекта на атмосферу (выбросы); - анализ воздействия объекта на гидросферу (сбросы); - анализ воздействия объекта на литосферу (отходы); - разработать решения по обеспечению экологической безопасности со ссылками на НТД по охране окружающей среды. 	<p>Возможны следующие воздействия объекта исследования и работы в целом на окружающую среду:</p> <ul style="list-style-type: none"> - с целью охраны атмосферы все работы должны проводиться в вытяжном шкафу при включенной вентиляции и обеспечении герметичности тары для хранения и транспортировки вредных и опасных веществ; - для предотвращения загрязнения гидросферы химическими веществами проводится организация раздельного сбора и хранения неорганических и органических отходов, обезвреживание кислых и щелочных стоков согласно утвержденным инструкциям, регенерация растворителей; - в научно-исследовательской лаборатории существуют твердые отходы в виде бытового мусора, который выбрасывается в урну, твердые отходы в виде отработанного биоматериала подлежат обезвреживанию методом стерилизации паром под давлением (автоклавированием) после чего приравниваются к пищевым отходам и выбрасываются в мусорный контейнер.

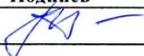
<p>4. Защита в чрезвычайных ситуациях:</p> <ul style="list-style-type: none"> - перечень возможных ЧС на объекте; - выбор наиболее типичной ЧС; - разработка превентивных мер по предупреждению ЧС; - разработка мер по повышению устойчивости объекта к данной ЧС; - разработка действий в результате возникшей ЧС и мер по ликвидации её последствий 	<p>К чрезвычайным ситуациям в лаборатории относится возникновение пожара на рабочем месте. В случае возникновения ЧС предусмотрены первичные средства пожаротушения: огнетушители ОПХ-10 и ОУ-5 для тушения электрооборудования.</p>
<p>5. Правовые и организационные вопросы обеспечения безопасности:</p> <ul style="list-style-type: none"> - специальные (характерные для проектируемой рабочей зоны) правовые нормы трудового законодательства; - организационные мероприятия при компоновке рабочей зоны 	<p>В случае возникновения ЧС предусмотрены инструктажи по технике безопасности</p> <ul style="list-style-type: none"> - характерные для проектируемой рабочей зоны правовые нормы трудового законодательства: <p>для допуска к работе в лаборатории необходимо провести обучение персонала правилам безопасности на рабочем месте, навыкам оказания первой помощи, а также вводный инструктаж при возникновении чрезвычайных ситуаций;</p> <ul style="list-style-type: none"> - организационные мероприятия при компоновке рабочей зоны: <p>обязательным является соблюдение стерильности на рабочем месте.</p>
<p>При необходимости представить эскизные графические материалы к расчётному заданию (обязательно для специалистов и магистров)</p>	

Дата выдачи задания для раздела по линейному графику	29.01.2018
--	------------

Задание выдал консультант:

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Профессор	Ахмеджанов Рафик Равильевич	д.б.н., профессор		12.03.2018

Задание принял к исполнению студент:

Группа	ФИО	Подпись	Дата
4ДМ61	Гудовщикова Надежда Игоревна		12.03.2018

РЕФЕРАТ

Выпускная квалификационная работа 94 с., 9 рис., 31 табл., 54 источников, 2 прил.

Ключевые слова: микробиота, microbiota, кишечная микробиота, intestinal microbiota, инфекция Clostridium difficile, Clostridium difficile infection, псевдомембранозный колит, pseudomembranous colitis, трансплантация кишечной микробиоты, fecal microbiota transplantation, воспалительные заболевания кишечника, inflammatory bowel diseases, лечение, treatment, криоконсервация, cryoconservation.

Объектом исследования является тотальная микробиота кишечника здорового человека. В исследовании использовались образцы фекалий человека, проверенного на инфекционные заболевания.

Цель работы – разработка методики выделения и сохранения тотальной микробиоты кишечника человека для последующей её трансплантации пациентам с заболеваниями желудочно-кишечного тракта.

В процессе исследования проводился подбор способа фильтрования, режима центрифугирования, концентрации и количества натрий-фосфатного раствора (PBS) и градиентной жидкости Перколла, также количества промываний бактериальных клеток раствором PBS для более качественной очистки клеток от различных солей и микрочастиц.

В результате исследования были подобраны оптимальные условия для выделения очищенной тотальной микробиоты кишечника человека, методы стандартизации количественного определения и хранения. Подана заявка на патент.

Область применения: биотехнология, медицина, научные исследования.

По результатам проведенного исследования планируется подача заявки на грант для дальнейшего исследования влияния микробиоты кишечника при различных заболеваниях. Также планируется сотрудничество с медицинскими клиниками, специализирующимися на пересадке микробиоты кишечника, такими как Центр новых медицинских технологий г. Новосибирск.

Определения, обозначения, сокращения, нормативные ссылки

В данной работе применены следующие обозначения и сокращения:

PBS – Phosphate buffered saline (рус. яз. Натрий-фосфатный буфер);

ТФМ – трансплантация фекальной микробиоты;

ЦНМТ – Центр новых медицинских технологий;

C. difficile – *Clostridium difficile*;

FDA – Food and Drug Administration (рус. яз. Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов);

ЖКТ – желудочно-кишечного тракта;

НИН – National Institutes of Health (рус. яз. Национальный институт здоровья);

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота;

МТТ – бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-тетразолий;

FBS – Foetal Bovine Serum (рус. яз. Эмбриональная телячья сыворотка);

ДМСО – Диметилсульфоксид;

КОЕ – колониеобразующие единицы;

НИР – научно – исследовательская работа;

НТИ – научно – техническое исследование;

СанПин – санитарные правила и нормы;

ГОСТ – государственный стандарт;

ФЗ – федеральный закон;

ЛВЖ – легко – воспламеняющиеся жидкости;

ЧС – чрезвычайная ситуация.

Введение.....	13
1.Обзор литературы	15
1.1 Микробиота кишечника человека и ее дисфункция	15
1.2 Методы восстановления микрофлоры кишечника при ее дисфункции.....	17
1.3 Методология трансплантации фекальной микробиоты кишечника человека.....	19
1.4 Методы хранения биообразцов при низких температурах.....	21
2 Объект и методы исследования	25
2.1 Сбор биоматериала для исследования	25
2.2 Выделение тотальной микробиоты кишечника человека и ее качественная и количественная оценка.....	25
2.3 Выделение ДНК из микробиоты кишечника фенол-хлороформным методом	26
2.4 Определение концентрации белка методом Бредфорда	27
2.5 Определение концентрации клеток в микробиоте	29
2.6 МТТ-тест на жизнеспособность клеток.....	30
3. Результаты проведенного исследования	34
3.1 Выбор оптимальных условий для выделения микробиоты кишечника человека.....	34
3.2 Методика выделения тотальной микробиоты кишечника для трансплантации	38
3.3 Анализ качественной оценки и определение КОЕ тотальной микробиоты кишечника человека после криозаморозки	39
4. Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение.....	43
4.1. Предпроектный анализ	43
4.2. Инициация проекта.....	47
4.3. Планирование управления научно-техническим проектом	50
4.4. Определение ресурсной (ресурсосберегающей), финансовой, бюджетной, социальной и экономической эффективности исследования.....	64
5. Социальная ответственность	68
5.1. Производственная безопасность	69
5.2 Экологическая безопасность.....	74

5.3 Безопасность в чрезвычайных ситуациях	76
5.4 Правовые и организационные вопросы обеспечения безопасности.	77
Выводы	78
Список публикаций студента.....	79
Список использованных источников	80
Приложение А	86
Приложение Б.....	94
Диаграмма Исикавы.....	94

Введение

На настоящий момент исследователи все больше внимания уделяют влиянию микробиоты кишечника населяющих организм, на здоровье человека, а особенно ее состав и соотношение микроорганизмов. Микробиотой называют совокупность различных видов микроорганизмов – бактерий, вирусов, грибков, архей. Сохранение физиологических соотношений в содержании различных видов микроорганизмов крайне важно для поддержания здоровья человека. При изменении состава микрофлоры, в частности вызванного приемом антибиотиков, нормальное функционирование организма нарушается. В качестве примера можно привести инфекцию *Clostridium difficile*, которая является главным возбудителем псевдомембранозного колита, тяжёлого заболевания кишечника, зачастую связанного с уничтожением кишечной микробиоты в случае антибиотикотерапии [1].

Стандартные методы коррекции микрофлоры кишечника включая прием про- и пребиотиков не в состоянии восстановить состав микробиоты при его серьезном изменении или приводят только к временному улучшению, облегчению симптомов. В последние годы в мире набирает популярность трансплантация кишечной микрофлоры от здорового донора человеку, страдающему расстройствами стула или другими заболеваниями желудочно-кишечного тракта. В России впервые трансплантация микробиоты от донора к больному человеку успешно прошла в Новосибирске в ЦНМТ [2]. На сегодняшний день инфекция *C. difficile* по рекомендациям управления по контролю за пищевыми продуктами и лекарственными средствами США (Food and Drug Administration — FDA) является прямым показанием для трансплантации микробиоты [3].

Целью данной работы является разработка методики выделения и сохранения тотальной микробиоты кишечника человека для последующей её трансплантации пациентам с заболеваниями желудочно-кишечного тракта.

В соответствии с поставленной целью в работе решались следующие взаимозависимые задачи:

1. Получить тотальную микробиоту кишечника с помощью методов фильтрации, центрифугирования, градиентного центрифугирования, промывания натрий-фосфатным раствором;

2. Определить оптимальные способы фильтрации и режимы центрифугирования для микробиоты, с помощью определения концентрации белка, ДНК, количества клеток микроорганизмов в пробе, МТТ-теста на жизнеспособность.

3. Определить оптимальные методы сохранения микробиоты кишечника и ее жизнеспособности при различных условиях заморозки.

Объектом исследования является микробиота кишечника человека. Для исследования использовали образцы фекалий здорового человека. Биоматериал был любезно предоставлен Госпитальной клиникой им. А.Г. Савиных СибГМУ, после проверки на все инфекционные заболевания. Выделенная микробиота кишечника человека рекомендована для трансплантации пациентам с заболеваниями желудочно-кишечного тракта. До транспортировки в ЦНИЛ СибГМУ биоматериал хранился не более двух часов в холодильнике при +4°C. После поступления в лабораторию биоматериал сразу использовался для выделения тотальной микробиоты кишечника.

1. Обзор литературы

1.1 Микробиота кишечника человека и ее дисфункция

В последние годы ученые, в том числе и врачи, выделяют микробиоту кишечника как отдельный орган человека, выполняющий определенные функции в организме. Нормальная микробиота кишечника формирует иммунобиологическую реактивность организма, защищает от внедрения и размножения в нём условно-патогенных и патогенных микроорганизмов, аккумулирует образование витаминов В1, В2, В6, В12, С, К, никотиновой, фолиевой кислот и биотина, регулирует сорбцию и экскрецию ионов и катионов, как Na, K, Ca, Mg, Zn, Fe, Cu, Mn, P, Cl, утилизирует непереваренные пищевые волокна [4].

В кишечнике человека количество микроорганизмов превышает 500 видов, при этом общая масса их составляет приблизительно 2 кг. Также количество, состав и соотношение бактерий в разных отделах желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) различны, большинство микроорганизмов обнаруживается в толстой кишке и составляет до 50% ее содержимого. Показано, что более 90% кишечных бактерий являются членами двух крупных микробоценозов — бактероидов и фирмикутов, с некоторой разницей в преобладании представителей тех или других [5, 6, 7]. При этом интересно отметить, что представители бифидобактерий и лактобактерий составляют весьма небольшую часть общей микробной популяции.

На протяжении практически всей жизни состав микробиоты кишечника стабилен, это объясняется тем, что на стенках кишечника микробиота образует специфические биопленки. В биопленке микроорганизмы находятся во внеклеточном матриксе (специфическая слизь), который ограждает микроорганизмы от пагубных воздействий внешней среды (среды внутри кишечника). Но, несмотря на это, под действием антибиотиков, длительного приема алкоголя, приема неспецифичной пищи, стресса и др., биопленки могут разрушаться, что может привести к дисбалансу состава и численности микробиоты и повлечь за собой более серьезные нарушения ЖКТ.

Здоровая микрофлора пищеварительного тракта дает возможность производить достаточное количество противовоспалительных и противоопухолевых веществ, так называемых короткоцепочечных жирных кислот, защищающих организм от патогенов и токсинов и стимулируя развитие нормальной микрофлоры. Кроме того, здоровая микробиота способна синтезировать антибиотико-подобные вещества, как средство защиты от патогенов, которые влияют исключительно на аггессоров внутри кишечника и не влияют на организм человека в целом. Таким образом, здоровая микрофлора стимулирует гомеостаз и целостность слизистой кишечника. Значительное влияние оказывает микробиота на человеческий иммунитет и устойчивость к патогенным микроорганизмам, а также участвует во всех видах обмена нутриентов как микро-, так и макроэлементов [5, 8, 9].

В гастроэнтерологии уделяется пристальное внимание функциональным расстройствам желудочно-кишечного тракта связанным с нарушением баланса и состава микрофлоры кишечника. Например, клостридиальная инфекция (псевдомембранозный колит), антибиотик-ассоциированная диарея, синдром раздражённого кишечника с диареей или констипацией, метаболический синдром, воспалительные заболевания кишечника (неспецифический язвенный колит, болезнь Крона).

Например, при синдроме раздраженного кишечника с преобладанием констипация происходит активизация родов аэробных бактерий, в частности обладающих протеолитической активностью (так как кишечные палочки, фекальные стрептококки рассматриваются как сильнейшие протеолитики). При диарее наблюдается повышение активности анаэробных микроорганизмов родов бактероидов, пропионибактерий, клостридий и т.д. Это связано с переключением метаболизма колоноцитов с цикла Кребса на активацию гексозомонофосфатного шунтирования, что при синдроме раздраженного кишечника с констипацией приводит к увеличению продукции активных форм кислорода, способствующих активизации аэробных микроорганизмов; при диарее – к активации анаэробного типа гликолиза, приводящего к подавлению

функциональной деятельности облигатных аэрофилов при блокировании терминальных ферредоксинсодержащих ферментов и активизации условно-патогенных штаммов анаэробов, в частности бактериоидов [10].

При колите также отмечается усиление активности анаэробных микроорганизмов, однако при этом превалируют клостридии, фузобактерии, эубактерии, причем штаммы, обладающие гемолитической активностью. Из приведённых примеров видно, что органическая или функциональная патология органов ЖКТ может возникать из-за нарушения микробиоценоза кишечника.

1.2 Методы восстановления микрофлоры кишечника при ее дисфункции

На сегодняшний день по всему миру известны профилактика и терапевтическое лечение стандартными методами коррекции микрофлоры такие как прием антибиотиков, про- и пребиотиков, специфические диеты и др. Эти методы не в состоянии полностью восстановить состав микробиоты кишечника при его серьезном изменении, тем самым возникает вопрос об их эффективности.

Переходя к вопросам о лечебной коррекции и профилактики нарушений микробиоты кишечника, существуют широкого спектра действия антибактериальные средства, которые можно заменить бактериальными препаратами. Антибиотики широкого спектра действия по настоящее время используются в практике лечения, что, по мнению некоторых авторов, приводит к еще более сильному дисбалансу микроорганизмов в кишечнике. Применение препаратов пробиотиков малоэффективно в связи тем, что вводимые в агрессивную среду штаммы быстро погибают. Однако в связи с прогрессом развития биотехнологических процессов были созданы препараты пробиотиков обладающие высокой клинической эффективностью. Более того, установлены показания к их применению и уточнено место пробиотиков в схеме лечебной коррекции микробиоценоза кишечника человека [11]. Например, разработаны кишечнорастворимые капсулы, которые не

разрушаются под действием желудочного сока и сохраняют штаммы микроорганизмов до места назначения. Также применяют и ацидофильные штаммы лакто- и бифидобактерий, которые выдерживают низкие значения рН.

Применение в клинической практике антибиотиков широкого спектра действия произвело фурор, кажущиеся ранее смертельными, многие болезни и инфекции сейчас поддаются лечению [12]. Однако ни один препарат не может воздействовать на организм только с положительным эффектом. Лекарственные средства даже самые эффективные имеют и другую сторону воздействия на макроорганизм в целом и микрофлору, включая обитающую в кишечнике человека. Достаточно продолжительное время побочным действиям антибиотиков не уделяли нужного внимания, так как их положительные эффекты превышали все их недостатки.

Что касается пробиотиков, то основоположником теории пробиотиков был И.И. Мечников, который ещё в начале прошлого столетия простоквашу рекомендовал к употреблению, которая обогащена культурой *Lactobacillus bulgaricus*, в качестве профилактики различных болезней [13]

Тем не менее, что касается применения ферментированных продуктов, берет свое начало в национальных традициях питания различных народов, и на настоящий момент разные виды ферментированных продуктов широко представлены в питании коренного населения многих стран [14]. По сути, считается, что полезные микроорганизмы вошли в питание человека около 10 тыс. лет назад [15]. В итоге метаболические системы человека изменились на протяжении тысячи лет совместно с метаболическими системами микрофлоры и микроорганизмов, получаемых совместно с питанием.

Основными пробиотиками являются микроорганизмы продуценты молочной кислоты, которые в свою очередь и есть одни из типичных представителей нормальной микрофлоры человека. Также обычными обитателями кишечника являются бифидо- и лактобактерии. Пробиотики назначают как диету в рационе питания в виде диетических добавок, то есть

порошков, которые содержат бифидобактерии, лактобактерии, также возможны их комбинации [16].

Многие опубликованные рандомизированные контролируемые исследования и дальнейшие мета-анализы показывают эффективность применения пробиотиков в профилактике антибиотикоассоциированной диареи [18], в том числе связанной с *C. difficile*. Однако большинство исследований посвящены именно лактобактериям [17, 18, 19]. Важным является то, что частота побочных реакций от пробиотических препаратов не отличается от плацебо в меру своей высокой безопасности [18].

Механизмом действия биотерапевтических препаратов является наличие у микроорганизмов, которые входят в их состав, следующих функциональных свойств: способность выживать в кислой среде, вызывать стимуляцию иммунной системы, продуцировать антимикробные вещества, прикрепляться к эпителиоцитам слизистой стенки кишки и колонизировать ее, предохранять обильный рост и размножение патогенных микробов и восстанавливать нормальную кишечную микрофлору человека.

1.3 Методология трансплантации фекальной микробиоты кишечника человека

Растет интерес к пониманию роли микробиоты кишечника человека в раскрытии терапевтического потенциала его манипуляции. Трансплантация фекальной микробиоты (ТФМ) – это введение раствора фекального вещества от донора в кишечный тракт реципиента с целью непосредственного изменения микробного состава кишечника реципиента и восстановления функции микробиоты и кишечника в целом.

В последние годы в мире отмечается значительный прогресс в отношении кишечной микробиоты основанным на таких научных исследованиях как *Human Microbiome Project* [20] и Европейскому Метагеному (*MetaHIT – European-based Metagenomics of the Human Intestinal Tract*) [21]. Которые были созданы в первую очередь для исследований микробиоты

желудочно-кишечного тракта человека. Полученные результаты данных научных проектов значительно улучшили и помогли сформировать установившиеся взгляды на роль микроорганизмов в таких вопросах, как гомеостаза и также патогенеза заболеваний. На сегодняшний день микрофлора воспринимается ни как безвредный колонизатор, а уже как активный участник функционирования системы организма и отдельных органов, развития аутоиммунных заболеваний и др.

Впервые упоминание о пересадке микробиоты встречается у известного китайского врача Гэ Хун (*Ge Hong*) в IV веке н. э. Он описал применение кала для пациентов с пищевым отравлением или тяжелой диареей. Следующее упоминание относится к XVI веку; также в Китае Ли Шичжэнь (*Li Shizhen*) предложил серию рецептов с использованием ферментированного, свежего, сухого кала или детского кала при заболеваниях органов брюшной полости, проявляющихся тяжелой диареей, лихорадкой, болью, рвотой, а также для лечения констипаций. В XVII веке *Fabricius Acquapendente* описывает пересадку кала от здоровых лошадей больным [22].

Затем в 1958 г. появилось первое сообщение об использовании фекальной микробиоты (ФМ) для лечения больных с псевдомембранозным колитом, и только к концу XX века относятся исследования о применении ТФМ при целом ряде других патологических состояний [23].

На сегодняшний день накоплен опыт применения ТФМ в виде ретенционных клизм, введения фильтрата кала через назоеюнальный зонд и с помощью эндоскопа. Так, например, в Центре новых медицинских технологий (ЦНМТ) в г. Новосибирск восстанавливают кишечную микрофлору здоровой микробиотой от донора. Тем самым лечат такие заболевания как клостридиальная инфекция (псевдомембранозный колит), антибиотик-ассоциированная диарея, синдром раздражённого кишечника, метаболический синдром, неспецифический язвенный колит, болезнь Крона [2].

В ЦНМТ собрана собственная донорная база. Универсальный донор для трансплантации микробиоты проходит ряд обследований для признания

материала безопасным и приемлемым для трансплантации соответственно требованиям стандартов Национального Института Здоровья, США (*NIH, USA*).

1.4 Методы хранения биообразцов при низких температурах

На сегодняшний день в литературе представлены довольно результативные методологии длительного хранения микроорганизмов и клеточных культур, гарантирующие у них сохранение жизнеспособности клеток и фенотипической, генетической стабильностей.

При выборе способа хранения определенного биообъекта необходимо базироваться на сохранении жизнеспособности культуры, морфологических, физиологических, биохимических характеристик, а также генетической стабильности, учитывая максимум времени консервирования бактериальной культуры, а также надежности реализации данного метода консервации и условий работы во время продолжительного промежутка времени.

В последние годы для сохранения большинства различных микроорганизмов применяют такие методы, как лиофилизация, низкотемпературное замораживание и криоконсервация [24].

Лиофилизация – это высушивание культур при низких температурах (-20°C , -40°C) под вакуумом. Культуры прошедшие лиофильную сушку, можно хранить длительное время без доступа к кислороду, влаге и свету при низких температурах. Метод лиофилизации по сравнению с известными способами высушивания позволяет обеспечить стабильность для большинства микроорганизмов. Метод лиофилизации дает возможность иметь как можно больше ампул каждой культуры, чем удобно применять в практических целях. Однако в результате лиофилизации титр жизнеспособных клеток микроорганизмов достаточно быстро падает при хранении даже при $+4^{\circ}\text{C}$. А также многие неспорообразующие микроорганизмы не переносят применяемые режимы высушивания при низких температурах и не могут храниться методом лиофилизации. Зафиксировано, что этот метод также приводит к отбору особо

устойчивых клеток в культуре, которые могут и не обладать желаемыми свойствами.

Существует способ длительного хранения микроорганизмов при низких температурах от -20 до -130°C . Большинство микроорганизмов можно хранить при температуре ниже -60°C в морозильной камере, при этом сохраняя высокий титр клеток. А также применяется метод низкотемпературного замораживания микроорганизмов на носителях, этот метод дает возможность увеличить их срок хранения до 5 и более лет. Низкотемпературная замораживание используется в последние годы для консервации микроорганизмов во все возрастающих масштабах в связи с наличием и доступностью низкотемпературных холодильников, способных надежно поддерживать пониженные температуры в течение длительного времени. При этом время хранения биоматериала при таких температурах ограничено. По данным *Gibson L.F. и Khoury J.T.* [25], время хранения разных видов бактерий в морозильной камере при -70°C колеблется в пределах от 12 до 40 месяцев. Для хранения сложных по составу ассоциаций микроорганизмов этого времени недостаточно, так как микробиоценозы в отличие от чистых культур бактерий, не могут периодически пересеваться, подращиваться, а, следовательно при таком способе хранения время от времени потребуется повторный забор микробиоценозов, что часто оказывается невозможным в связи с изменениями их состава во времени, связанными с неблагоприятными внешними и внутренними воздействиями, например, химиотерапией, радиационным воздействием, экологическими, возрастными факторами и т.п. Таким образом, при низкотемпературном хранении естественных микробиоценозов существует реальная опасность потери их в течение 2-4 лет, а возможно, и ранее.

И наконец, известен способ длительного хранения биоматериала в жидком азоте – криоконсервация. Криоконсервация предназначена для длительного сохранения биологических объектов. Время хранения в жидком азоте криоконсервированных микроорганизмов и других биологических объектов в стабильном и жизнеспособном состоянии практически не

ограничено. В настоящее время отработаны режимы криоконсервации для целого ряда видов и штаммов микроорганизмов.

Усовершенствован способ криоконсервации микробиоты толстого кишечника человека [26], который был впервые разработан и запатентован в 1998 г. сотрудниками подразделения Шендеров Б.А., Гахова Э.Н. и др. Способ длительного хранения естественных симбиотических ассоциаций микроорганизмов человека и животных. Патент РФ. № 2123044. С1 от 02.03.1998. Изобретение относится к биотехнологии, в частности микробиологии и микробной экологии и может быть использовано в медицине, сельском хозяйстве, биологии, научных исследованиях. Изобретение заключается в том, что в качестве источника микробиоценозов используют суспензию содержимого толстой кишки человека или животных, подвергают ее селективной деконтаминации. Микробную суспензию подвергают криоконсервации и хранению в жидком азоте при температуре -196°C . В качестве криопротектора используют вещества белково-полисахаридной природы в концентрации до 0,1%. Предлагаемый прием длительного сохранения естественных микробных ассоциаций человека и животных позволяет практически полностью сохранять их жизнеспособность и неизменность на протяжении неопределенно длительного периода времени. Результаты количественного содержания наиболее показательных для естественных микробных симбиотических ассоциаций толстого кишечника человека микроорганизмов до и через 1 год после криоконсервации практически идентичны.

Авторами в результате выполненной работы были подобраны условия замораживания до температуры жидкого азота аутогенных штаммов бифидобактерий и лактобактерий в составе микробиоты, и разработан лабораторный регламент по хранению аутогенных штаммов бактерий микробиоты кишечника человека в криобанке (-196°C).

Предложены методы криоконсервирования аутогенных бактерий кишечника человека с учетом подбора нетоксичных для человека

криопротекторов с хорошими криозащитными свойствами, и разработки оптимальных режимов замораживания-оттаивания [27].

Особая важность самой идеи криоконсервации микробиоты кишечника человека заключается в том, что эта технология позволяет в любое время в случае необходимости успешно восстанавливать в короткие сроки поврежденную систему – «хозяин и его симбиотическая микробиота». Фундаментально-прикладные исследования по усовершенствованию способов криоконсервации микробиоты толстого кишечника имеют социальную направленность, поскольку связаны непосредственно с экологией человека и здоровьем нации.

Таким образом, оптимальными способами хранения образцов микроорганизмов является криозаморозка или заморозка при температуре ниже $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$. Но также для разных микроорганизмов важна и среда в которой замораживают образцы, которая будет способствовать правильной заморозке и питать клетки при оттаивании.

2 Объект и методы исследования

2.1 Сбор биоматериала для исследования

Для выделения тотальной микробиоты кишечника человека использовали свежий биоматериал (фекалии здорового человека). Перед сдачей биоматериала донор обследовался на инфекционные заболевания и общее состояние здоровья в Госпитальной клинике им. А.Г. Савиных СибГМУ. Сбор биоматериала осуществлялся только в утреннее время в плотно закрывающийся стерильный пластиковый стаканчик с крышкой. До транспортировки в ЦНИЛ СибГМУ биоматериал хранился не более 2х часов в холодильнике при +4°C. После поступления в лабораторию биоматериал сразу использовался для выделения тотальной микробиоты кишечника.

2.2 Выделение тотальной микробиоты кишечника человека и ее качественная и количественная оценка

Метод выделения тотальной микробиоты кишечника человека из фекалий основывается на выведении микроорганизмов из фекалий в раствор PBS и дальнейшем очищении их от макрочастиц мусора и растворимых солей. Для этого подбирали различные способы фильтрования, режима центрифугирования, концентрации и количества PBS и градиентной жидкости Перколла, а также изменяли количество промывания бактериальных клеток раствором PBS для более качественной очистки клеток от различных микрочастиц, что подробно изложено в главе 3 «Результаты и обсуждение». После выделения микробиоты кишечника проводили ее качественную и количественную оценку:

1. определение количества клеток на 1 мл методом подсчета клеток в поле зрения микроскопа, определение концентрации белка и ДНК – показатели измеряли непосредственно сразу после выделения микробиоты из биообразца;

2. тест на жизнеспособность методом МТТ проводили сразу после выделения микробиоты и после каждой заморозки.

Для определения оптимального способа хранения микробиоты при низких температурах и определения оптимальной криосреды образцы микробиоты замораживали при различных условиях (таблица 2.1.6.1).

2.3 Выделение ДНК из микробиоты кишечника фенол-хлороформным методом

Для определения концентрации ДНК в выделенной микробиоте кишечника общую ДНК выделяли фенол-хлороформным методом. Перед выделением ДНК готовили следующие реактивы и растворы:

1. TE (Tris-EDTA)-буфер: 10 мМ Трис HCl + 1 мМ ЭДТА (к 1 мл 1 М раствора Трис HCl добавляли 0,2 мл 0,5 М раствора ЭДТА и растворяли в 98,8 мл дистиллированной воды), pH=8;

2. Фенол;

3. Под «хлороформом» понимается смесь хлороформа и изоаминового спирта (24:1). Последний, уменьшает пенообразование во время экстракции, в результате чего происходит более четкое разделение фаз;

4. 1 М Трис HCl: 30,28 г Trizma-Base растворяли в 250 мл дистиллированной воды, pH=8;

5. 3 М Ацетат натрия: 246 г ацетата натрия на 1 л дистиллированной воды, pH=5,2;

6. РНК-аза: 0,878 мг NaCl ч.д.а. растворить в 1 мл 10 мМ Трис HCl (10 мкл 1 М Трис HCl + 980 мкл дистиллированной воды), после этого внести 1,2 мг РНК-азы. Раствор прогреть 15 мин при 100 °С и медленно охладить до комнатной температуры. Хранить при -20 °С;

7. Протеиназа К: в 1,2 мл TE-буфера растворить 1,2 мг протеиназы и 120 мг додецилсульфата натрия. Хранить при -20 °С.

Алгоритм выделения ДНК:

1. Осаждали клетки центрифугированием 30 мин при 5000 оборотов в минуту;

2. Ресуспендировали осажденные клетки в 6 мл ТЕ-буфера и переносили в пластмассовые центрифужные пробирки на 10 мл (делили на три пробирки по 2 мл клеточной взвеси);

3. Добавляли додецилсульфат натрия из расчёта 10 мг на 1 л буфера. Осторожно перемешивали (при этом клетки лизируются, и ДНК выходит в раствор, раствор становится вязким);

4. Добавляли равный объем смеси фенола с хлороформом (1:1) (на 2 мл суспензии – 2,5 мл хлороформа). Осторожно перемешивали и центрифугировали 10 мин при 5000 оборотов в минуту. Смесь разделяется на 2 фазы: водная – сверху и фенольная – снизу. Между ними находится интерфаза – слой осажденных белков. Верхнюю фазу с растворенной ДНК осторожно переносили в чистые пробирки, стараясь не захватить интерфазу, и повторяли процедуру очистки с фенолом 2-й раз (при отборе кончик у пипетки отрезали, чтобы не повредить длинные цепи молекул);

5. Верхнюю фазу после центрифугирования переносили в чистые пробирки и добавляли равный объем хлороформа (для удаления остатков фенола). Осторожно перемешивали и центрифугировали 10 мин при 15000 оборотов в минуту;

6. Верхнюю фазу переносили в чистые пробирки и добавляли 2,5 объема 96 % этанола и 1/10 от объема раствора ДНК – 3 М ацетата натрия. Осторожно перемешивали до образования комочка ДНК – «медузки». Центрифугировали 10 мин при 15000 оборотов в минуту;

7. Супернатант сливали, к осевшей на дно пробирки ДНК приливали 2 мл 70 % этанола (для очистки ДНК от солей) и центрифугировали 5 мин при 15000 оборотов в минуту;

8. Осадок споласкивали 0,5 мл 96 % этанола и сушили приблизительно 20 мин при комнатной температуре. Одинаково плохо и пересушить и недосушить осадок, что влечёт за собой плохое растворение ДНК;

9. Осадок ДНК растворяли в 2 мл ТЕ-буфера. В раствор добавляли 80 мкл раствора РНК-азы и инкубировали 1 час при 37 °С;

10. В тот же раствор добавляли 100 мкл раствора протеиназы К и инкубировали в тех же условиях еще час;

11. Повторяли операции 4-8 (очистка и осаждение ДНК) и растворяли осадок ДНК в ТЕ-буфере. Хранили при -20 °С.

Концентрацию ДНК измеряли на приборе спектрофотометре (NanoDrop 2000, Thermo Fisher Scientific, США) стандартным методом, приведенным в инструкции эксплуатации.

2.4 Определение концентрации белка методом Бредфорда

Измерение концентрации белка в образцах микробиоты кишечника проводили методом Бредфорда. Данный метод основан на связывании белками красителя *Coomassie Brilliant Blue G-250* (Кумасси G-250) за счет электростатического взаимодействия сульфонильных групп красителя с аминокислотными остатками белка. Исходный кислый раствор Кумасси G-250 имеет максимум поглощения при длине волны 465 нм. После связывания с белком и изменения окраски максимум поглощения смещается к 595 нм, измерение на спектрофотометре Unico 2800 (Unico Sys, США) проводили именно при этой длине волны.

Перед измерением белка готовили необходимые реактивы:

1. Реактив Бредфорда: 50 мг Кумасси G-250 растворить в 25 мл этанола 96% и перемешивая добавить 50 мл ортофосфорной кислоты. После растворения реактива Кумасси G-250 объем довести до 500 мл дистиллированной водой. Далее раствор профильтровать и хранить в банке из темного стекла при комнатной температуре;

2. Раствор 0,1 М NaOH: 200 мг NaOH (M=40 г/моль) растворить в 50 мл дистиллированной воды.

В исследуемых пробах разрушали бактериальные клетки в гидроксиде натрия при высокой температуре, для этого к 200 мкл пробы добавляли 200 мкл 1% PBS и 400 мкл 0,1 М NaOH и инкубировали 1 час при температуре +50°С. В

качестве контрольного образца использовали раствор: 400 мкл 1% PBS и 400 мкл 0,1 М NaOH.

После разрушения бактериальных клеток и выхода белка в раствор брали 100 мкл образца и добавляли к 1000 мкл реактива Бредфорда, тщательно перемешивали содержимое пробирок избегая образования пены, приводящей к плохой воспроизводимости. Для полного взаимодействия красителя с белками образцы оставляли на 5 минут при комнатной температуре. Перед началом измерений спектрофотометр калибровали и устанавливали на нужную длину волны.

Перед измерением испытуемых образцов спектрофотометр выставляли на значение «0» с помощью контрольного раствора. Далее измеряли оптическую плотность испытуемых образцов.

После каждого измерения кювету тщательно промывали 50% этанолом, а затем дистиллированной водой. После окончания измерений кювету тщательно промывали 0,1 М NaOH и дистиллированной водой.

2.5 Определение концентрации клеток в микробиоте

Для определения концентрации клеток (количество клеток в 1 мл раствора) в выделенной микробиоте кишечника, использовали метод подсчета клеток в поле зрения микроскопа. Готовили микроскопический препарат «раздавленная капля». Перед этим концентрированный образец (выделенную микробиоту кишечника) разводили в 1000 раз.

На предметное стекло наносили 2 мкл образца с помощью стерильного шприца с иглой. Затем каплю накрывали покровным стеклом, поверх которого наносили каплю иммерсионного масла. Проводили фазово-контрастную микроскопию, применяя иммерсионный объектив с увеличением в 1000 раз (Primo Star, Zeiss, Германия).

Количество бактериальных клеток в 1 мл образца определяли по формуле:

$$x = \frac{S_{\text{ст}} * N * 1000}{V * S}, \quad (2.5.1)$$

где X – число бактериальных клеток в 1 мл образца;

N – среднее количество клеток в поле зрения;

$V=2$ мкл – объем микрокопируемого образца;

$S_{\text{ст}} = 3,24 * 10^{-4} \text{ м}^2$ площадь покровного стекла;

$S = 0,0143 * 10^{-4} \text{ м}^2$ площадь поля зрения микроскопа.

2.6 МТТ-тест на жизнеспособность клеток

Т. Mossman в своих научных трудах описан метод применения МТТ-теста для оценки выживаемости бактериальных клеток, а также пролиферацию и цитотоксичность [28].

МТТ - тест является одним из видов колориметрического исследования, заключающийся в способности оксидоредуктаз живых бактериальных клеток катализирующих превращать растворимый желтый бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-тетразолия (МТТ) в нерастворимые пурпурно-синие внутриклеточные кристаллы МТТ-формаза (МТТ-ф). Подобной активностью могут обладать только жизнеспособные бактериальные клетки.

Оценку жизнеспособности бактериальной культуры проводили с помощью реагента МТТ (Sigma, США), который представляет собой тиазолий синий тетразолий бромид (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолий бромид).

Непосредственно перед проведением теста на жизнеспособность готовили раствор МТТ: 30 мг МТТ-реагента растворили в 15 мл раствора PBS, аккуратно перемешивали избегая образования пены. После полного растворения реагента МТТ раствор фильтровали через бумажный фильтр. К хранению данный раствор не предназначен.

Тесты на жизнеспособность проводили на разных концентрациях исследуемых образцов: 50, 20 и 10% концентрации образцов разведенных в 1% PBS, таким образом, чтоб при измерении у одного образца были три значения.

В качестве положительного контроля, для достоверности положительной реакции реагента МТТ и энергетических молекул внутри живой клетки, использовали культуру *Escherichia coli*. В качестве отрицательного контроля использовали убитые бактериальные клетки реагентом 10% раствора DMSO, для этого к 10 мкл образца вносили 90 мкл реагента DMSO и оставляли на 10 минут при комнатной температуре. Отрицательный контроль использовали для достоверности того, что реакция не протекает в убитых бактериальных клетках. В качестве нулевого контроля использовали раствор МТТ, который в последующем вычитался из значений испытуемых образцов в качестве погрешностей.

В эппендорфы на 1,5 мл вносили образцы в разных концентрациях и растворы по следующей схеме:

1. К0: раствор МТТ;
2. К+: 50 мкл культуры *E. Coli*, 50 мкл 1% PBS и 100 мкл р-ра МТТ;
3. К-: 10 мкл образца 1, 90 мкл DMSO, через 10 минут добавляли 100 мкл р-ра МТТ;
4. Обр. 1 (50): 50 мкл образца 1, 50 мкл 1% PBS и 100 мкл р-ра МТТ;
5. Обр. 1 (20): 20 мкл образца 1, 80 мкл 1% PBS и 100 мкл р-ра МТТ;
6. Обр. 1 (10): 10 мкл образца 1, 90 мкл 1% PBS и 100 мкл р-ра МТТ.

Растворы аккуратно перемешивали, плотно закрывали эппендорфы и инкубировали 1 час при температуре +4°C.

После инкубации к образцам добавляли по 200 мкл DMSO для разрушения бактериальных клеток и выхода кристаллов формазана в раствор, тщательно перемешивали наконечником пипетки. Затем образцы центрифугировали (Sigma Eppendorf Minispin) 5 мин при 5000 об/мин, для осаждения остатков бактериальных клеток. Надосадочную жидкость, аккуратно не задевая осадок, переносили в планшет на 96 лунок и измеряли оптическую плотность на автоматическом микропланшетном фотометре Sunrise (микропланшетный ридер) (Tecan, Австрия) при длине волны 540 нм.

Повторили выполнения МТТ-теста для каждого образца в течение всего эксперимента, а именно МТТ-тест:

1. непосредственно после выделения тотальной микробиоты кишечника, «свежий образец» ;
2. через 1 сутки после заморозки;
3. через 7 суток после заморозки;
4. через 30 суток после заморозки;
5. через 60 суток после заморозки.

За 100 % на калибровочной кривой принимали оптическую плотность «свежего образца», а именно оптическую плотность образцов после заморозки (1-60 суток) сравнивали именно со значениями «свежего образца».

Таблица 2.1.6.1. Способы криоконсервации тотальной микробиоты

Смесь для криоконсервации															
эмбриональная телячья сыворотка (FBS), диметилсульфоксид (DMSO), 1% PBS								20 % раствор глицерина, 1% PBS							
Температура криоконсервации, °C															
-80				-196				-80				-196			
Продолжительность криоконсервации, день															
1	7	30	60	1	7	30	60	1	7	30	60	1	7	30	60

Заморозка в смеси с эмбриональной телячьей сывороткой (FBS) и диметилсульфоксидом (ДМСО): 1200 мкл пробы отцентрифугировали (Sigma 3-30ks, Германия) при 14000 об/мин 15 мин, слили полностью надосадочную жидкость и довели осадок до 360 мкл раствором PBS и внесли 720 мкл FBS и 120 мкл ДМСО. Аккуратно размешали осадок в растворе до полного растворения. Затем по 115 мкл разнесли в криопробирки и эппендорфы на 2 мкл (8 шт.) и заморозили в сосуде Дьюара с жидким азотом (4 шт.) и в морозильной камере (POL-EKO, Польша) на -80°C (4 шт.).

Заморозка в глицерине: 1200 мкл пробы отцентрифугировали (Sigma 3-30ks, Германия) 15 мин при 14000 об/мин, слили полностью надосадочную

жидкость и довели до 1200 мкл 15% раствором глицерина. Затем по 115 мкл разнесли в криопробирки и эппендорфы на 2 мкл (8 шт.) и заморозили в сосуде Дьюара с жидким азотом (4 шт.) и в лабораторном морозильнике (POL-EKO, Польша) на -80°C (4 шт.). Фиксировать результаты \ (проведение МТТ) сразу после подготовки образца (свежая), 1, 7, 30, 60 суток.

4. Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение

4.1. Предпроектный анализ

Во всем мире на сегодняшний день трансплантация кишечной микрофлоры от здорового донора человеку, страдающему расстройствами стула становится общедоступна. Известны неудачные попытки по восстановлению нормальной микрофлоры кишечника при инфекционных заболеваниях и после нерациональной антибиотикотерапии, на фоне заболеваний желудочно-кишечного тракта. Например, вид анаэробных грамположительных бактерий рода клостридий *Clostridium difficile* является главным возбудителем псевдомембранозного колита, тяжёлого инфекционного заболевания прямой кишки, часто возникает в случае уничтожения флоры кишечника из-за использования антибиотиков. На сегодняшний день инфекция *Clostridium difficile* является показанием для трансплантации здоровой микробиоты в толстую кишку больного человека.

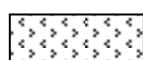
4.1.1 Потенциальные потребители результатов исследования

Для анализа потребителей был рассмотрен целевой рынок медицинских учреждений и отрасль экспериментальной биологии и медицины, которые занимаются клиническими исследованиями по терапии кишечной микрофлоры здоровой микробиотой от донора (фекотрансплантация) и проведено его сегментирование.

Сегментируем рынок потребителей данной работы по следующим критериям: размер компаний и вид деятельности, для которой будет актуальна методика выделения микробиоты. На рис.4.1.1.1 представлена карта сегментирования рынка по применению методики выделения микробиоты.

Размер компании	Вид целевой деятельности		
	Трансплантация	Клинические исследования	Производство препаратов на основе микробиоты
Крупные			
Средние			
Мелкие			

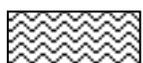
Рисунок 4.1.1.1. Карта сегментирования рынка по применению методики выделения микробиоты:



– Научные центры, занимающиеся клиническими исследованиями по восстановлению кишечной микрофлоры



– Клиники, практикующие фекотрансплантацию



– Предприятия, занимающиеся производством препаратов на основе микробиоты

Из карты следует, что основными сегментами данного рынка являются средние и крупные компании. Следовательно, наиболее перспективным сегментом в отраслях экспериментальной биологии и медицины для формирования спроса является сегмент независимых средних и крупных компаний, такие как клиники и предприятия, занимающиеся производством препаратов и терапией микробиоты.

На карты сегментирования видно, что ниша производства препаратов на основе полученной обогащённой культуры бактерий (микробиоты) не занята. С отработанной методикой получения микробиоты после клинических испытаний привлекательным для предприятия в будущем будет создание и пуск в оборот лекарственных форм на основе полученной микробиоты.

4.1.2 Диаграмма Исикавы

Если на предприятии имеется проблема, необходимо выявить и проанализировать причины ее возникновения, а также пути устранения.

Существует графический метод анализа причин проблемы и последующего графического представления - диаграмма Исикавы.

В нашем исследовании выявлена проблема, связанная с повышением выхода бактериальной культуры (микробиоты). В силу некоторых причин полученный нами выход образца микробиоты не был высоким. Для выявления факторов, влияющих на объект анализа, был использован прием 4М:

- персонал (Manpower);
- оборудование (Machine);
- материалы (Material);
- условия (Condition).

Причинно-следственная диаграмма Исикавы для данного случая приложение Б. Как видно из диаграммы, было выявлено 4 фактора приводящих к проблеме низкого выхода бактериальной культуры (микробиоты) и увеличении времени исполнения методики: условия, материалы, оборудование и персонал.

4.1.3 Оценка готовности проекта к коммерциализации

$$B_{\text{сум}} = \sum B_i, \quad (4.1.3.1)$$

где $B_{\text{сум}}$ – суммарное количество баллов по каждому направлению;

B_i – балл по i -му показателю.

Таблица 4.1.3.1. Бланк оценки степени готовности научного проекта к коммерциализации

№ п/п	Наименование	Степень проработанности научного проекта	Уровень имеющихся знаний у разработчика
1.	Определен имеющийся научно-технический задел	5	5
2.	Определены перспективные направления коммерциализации научно-технического раздела	5	5
3.	Определены отрасли и технологии (товары, услуги) для предложения на рынке	5	4

Продолжение таблица 4.1.3.1

4.	Определена товарная форма научно-технического задела для представления на рынок	5	5
5.	Определены авторы и осуществлена охрана их прав	4	4
6.	Проведена оценка стоимости интеллектуальной собственности	3	3
7.	Проведены маркетинговые исследования рынков сбыта	2	3
8.	Разработан бизнес-план коммерциализации научной разработки	1	1
9.	Определены пути продвижения научной разработки на рынок	4	4
10.	Разработана стратегия (форма) реализации научной разработки	1	1
11.	Проработаны вопросы международного сотрудничества и выхода на зарубежный рынок	3	4
12.	Проработаны вопросы использования услуг инфраструктуры поддержки, получения льгот	3	3
13.	Проработаны вопросы финансирования коммерциализации научной разработки	3	3
14.	Имеется команда для коммерциализации научной разработки	5	5
15.	Проработан механизм реализации научного проекта	3	4
	ИТОГО БАЛЛОВ	52	54

Критерии для сравнения и оценки ресурсоэффективности и ресурсосбережения, подбираются, исходя из выбранных объектов сравнения с учетом их технических и экономических особенностей разработки, создания и эксплуатации. Позиция разработки и конкурентов оценивается по каждому показателю экспертным путем по пятибалльной шкале, где 1 – наиболее слабая позиция, а 5 – наиболее сильная.

По результатам оценки готовности научного проекта к коммерциализации можно сделать вывод о том, что перспективность разработки выше среднего уровня. Для коммерциализации проекта в первую очередь необходимо провести регистрацию и оценку стоимости интеллектуальной собственности, а также привлечь команду для разработки бизнес-плана и для коммерциализации научной разработки, проработать вопросы международного сотрудничества и использования услуг инфраструктуры поддержки, получения льгот.

4.1.4 Методы коммерциализации результатов научно-технического исследования

На основании анализа методов коммерциализации проекта, а также с учётом степени готовности разработки, так как по результатам исследования подана заявка на патент, для успешного продвижения разработанной методики выделения микробиоты человека для последующей трансплантации является торговля патентными лицензиями, т.е. передача третьим лицам права использования объектов интеллектуальной собственности на лицензионной основе. При этом в патентном законодательстве выделяющие виды лицензий: исключительные (простые), исключительные, полные лицензии, сублицензии, опционы.

4.2. Инициация проекта

Обычно устав проекта документирует текущее понимание потребностей заказчика проекта, бизнес потребности или результат который планируется создать.

4.2.1 Цели и результат проекта

В таблице 4.2.1.1 представлена информация о заинтересованных сторонах проекта - это заказчик и исполнитель, и их ожидания относительно результатов проекта. Также в таблице 4.2.1.1 сформулированы цели проекта и требования к его результатам.

Таблица 4.2.1.1. Заинтересованные стороны проекта

Заинтересованные стороны проекта	Ожидания заинтересованных сторон
СибГМУ, ЦНИЛ	<ul style="list-style-type: none"> - принятый комиссией экспериментальный образец разработки; - протоколы приёмочных испытаний и акты приёмки опытного образца (макета) разработки; - расчеты экономической эффективности использования результатов разработки; - необходимую конструкторскую и технологическую документацию по изготовлению экспериментального образца
НИ ТПУ	<ul style="list-style-type: none"> - результаты экспериментальных испытаний образца и воспроизводимость методики; - разработка научно-технической документации и проекта технического задания на опытно-конструкторские работы; - удовлетворение требований заказчика проекта

Таблица 4.2.1.2. Заинтересованные стороны проекта

Заинтересованные стороны проекта	Ожидания заинтересованных сторон
Магистр	Исследование выделенной микробиоты кишечника человека
Научный руководитель	Руководство над проектом

Таблица 4.2.1.3. Цели и результат проекта

Цели проекта:	Разработка методики выделения микробиоты кишечника человека для последующей её трансплантации
Ожидаемые результаты проекта:	1. Получить обогащённую бактериальную культуру; 2. Разработать методику выделения микробиоты кишечника человека для последующей её трансплантации; 3. Разработать методику сохранения бактериальной культуры (микробиоты)

Продолжение таблица 4.2.1.3

Критерии приемки результата проекта:	Качественная и количественная оценку выделенной микробиоты кишечника: 1) подсчет клеток в поле зрения микроскопа, определение концентрации белка и ДНК; 2) тест на жизнеспособность методом МТТ
Требования к результату проекта:	Требование:
	Получить тотальную микробиоту кишечника человека
	Методика, рекомендованная к пересадке микробиоты
	Методика, с оптимальными параметрами сохранения выделенной микробиоты, для последующей ее трансплантации
	Запатентовать исследование

4.2.2 Организационная структура проекта

Таблица 4.2.2.1. Рабочая группа проекта

№ п/п	ФИО, основное место работы, должность	Роль в проекте	Функции	Трудозатраты, час.
1	Гудовщикова Н.И., НИ ТПУ, студент	Магистрант	Разработка методики и исследование выделенной микробиоты	500
2	Иккерт О.П., НИ ТПУ ИШНПТ, Старший преподаватель	Руководитель Магистерской диссертации	Координирует деятельность магистранта	78
3	Петров В.А., СибГМУ ЦНИЛ, Младший научный сотрудник	Эксперт проекта	Специалист, обладающий компетенциями	25

Продолжение таблица 4.2.2.1

4	Креницына З.В., НИ ТПУ Отделение социально- гуманитарных наук, Доцент	Эксперт проекта	Координирует выполнение раздела финансовый менеджмент	2
5	Ахмеджанов Р.Р., НИ ТПУ Отделение контроля и диагностики, Профессор	Эксперт проекта	Координирует выполнение раздела социальная ответственность	2
6	Кобзева Н.А., НИ ТПУ Отделение иностранных языков, Старший преподаватель	Эксперт проекта	Координирует выполнение раздела на иностранном языке	15
ИТОГО:				622

4.2.3 Ограничения и допущения проекта

Таблица 4.2.3.1. Ограничения проекта

Фактор	Ограничения/ допущения
1. Сроки проекта:	
1.1. Дата утверждения плана управления проектом	08.10.2016
1.2. Дата завершения проекта	10.03.2018
2. Прочие ограничения и допущения	ограничения по времени использования научного оборудования

4.3. Планирование управления научно-техническим проектом

Группа процессов планирования состоит из процессов, осуществляемых для определения общего содержания работ, уточнения целей и разработки последовательности действий, требуемых для достижения данных целей.

4.3.1 План проекта

В рамках планирования научного проекта необходимо построить календарный график проекта. Линейный график представляется в виде таблицы (табл. 4.3.1.1).

Таблица 4.3.1.1. Календарный план проекта

Код работы (из ИСР)	Название	Длительность, дни	Дата начала работ	Дата окончания работ	Состав участников (ФИО)
1.1	Исследование состояния проблемы в исследуемой области	2	10.02.17	12.02.17	Гудовщикова Н.И.
1.2	Изучение разработок конкурентов	6	13.02.17	15.02.17	Гудовщикова Н.И.
1.3	Определение направления работы исследования	15	16.02.17	17.02.17	Гудовщикова Н.И., Иккерт О.П., Петров В.А.
2.1	Распределение материалов	2	18.02.17	19.02.17	Гудовщикова Н.И.
2.2	Составление методик выделения микробиоты	30	20.02.17	02.03.17	Гудовщикова Н.И.
2.3	Составление методик сохранения микробиоты	25	03.03.17	13.03.17	Гудовщикова Н.И., Иккерт О.П., Петров В.А.
2.4	Выделение микробиоты	50	14.03.17	14.04.17	Гудовщикова Н.И.
3.1	Качественная и количественная оценка микробиоты	31	15.04.17	06.05.17	Гудовщикова Н.И.
Итого:		161	10.02.17	06.05.17	

На основе таблицы 4.3.1.1 строится календарный план-график проведения НИОКР по теме (табл. 4.3.1.2). График строится для максимального по длительности исполнения работ в рамках научно-исследовательского

проекта с разбивкой по месяцам и декадам (10 дней) за период времени дипломирования. При этом работы на графике следует выделить разной заливкой в зависимости от исполнителей, ответственных за ту или иную работу. С помощью графика можно проследить выполнение работ, отклонение от сроков и определить исполнителей.

4.3.2 Бюджет научного исследования

При планировании бюджета научного исследования было обеспечено полное и достоверное отражение всех видов планируемых расходов, необходимых для его выполнения. В процессе формирования бюджета, планируемые затраты группировались по статьям, представленным в таблице (табл. 4.3.2.1).

Таблица 4.3.2.1. Группировка затрат по статьям в руб.

Сырье, материалы, покупные изделия и полуфабрикаты	Специальное оборудование для научных работ	Основная заработная плата	Дополнительная заработная плата	Отчисления на социальные нужды	Накладные расходы	Итого плановая себестоимость
122 948,01	8 862,32	73 173,00	12 082,95	25 104,34	38 747,30	280 917,92

Сырье, материалы, покупные изделия и полуфабрикаты (за вычетом отходов)

В эту статью включались затраты на приобретение всех видов материалов, комплектующих изделий и полуфабрикатов, необходимых для выполнения работ по данной теме. В стоимость материальных затрат включены транспортно-заготовительные расходы (3% от цены). Результаты по данной статье представлены в таблице 3.2.2.

Таблица 4.3.2.2. Сырье, материалы, комплектующие изделия и покупные полуфабрикаты

Наименование	Марка, размер	Кол-во, Грамм	Цена за единицу, руб. за грамм	Сумма, руб.
Буфер фосфатно-солевой (таблетки) PBS	500 табл.	1 упак.	1 500	1 500,00
Раствор перколла, плотность 1,13 (Percoll)	1 литр	1	37 943,54	36 700,00
Сыворотка эмбриональная телячья (FBS)	50 мл	1	1 295,00	1 295,00
Диметилсульфоксид (DMSO)	1 бутылка/100 мл	3 шт.	456	1 368,00
Глицерин б/в для молекулярной биологии	1 бутылка/500 мл	1	4 303,26	4 303,26
МТТ (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide)	Фасовка 5 г	1 шт.	13 107,50	13 107,50

Продолжение таблица 4.3.2.2

Наконечники до 1 000 мкл	50 – 1 000 мкл, 1 упак./1 000 шт.	2 упак.	3 370,34	6 740,68
Дозатор автоматический одноканальный Ленпипет серии Лайт	переменного объема 100-1000 мкл	1 шт.	6 078,90	6 078,90
Планшет для иммуноферментного анализа однократного применения (96 лунок с плоским дном)	80 шт в коробе	1 короб	40	3 200,00
Жидкий азот	1 сорт с объёмная долей азота 99,999% 1литр	150 л	50	7 500,00
Дьюар (сосуд для жидкого азота)	СК-25, вместимостью до 26,5 л	1 шт.	37 700	32 300,00
Ступка и пестик фарфорова лабораторные	D=150 мм	1	1 400	1 400,00
Перчатки медицинские стерильные	245 мм (S) 200 штук в упаковке	2 упак.	800	1 600,00
Всего за материалы				117 093,34
Транспортно-заготовительные расходы (3-5%)				5 854,67
Итого по статье С _м				122 948,01

Специальное оборудование для научных (экспериментальных) работ

В данной статье стоимость оборудования, используемого при выполнении работ и имеющегося в данной научно-технической организации. Расчеты оборудования приведены в таблице 4.3.2.3.

Таблица 4.3.2.3. Специальное оборудование для научных работ

№ п/п	Наименование оборудования	Кол-во единиц оборудования	Цена единицы оборудования, руб.	Срок службы оборудования, год	АО за период проведения НИР, руб.	Общая стоимость оборудования, руб.
1.	Центрифуга для микропробирок MiniSpin (Eppendorf)	1	62 146,85	15	276,21	276,21

Продолжение таблица 4.3.2.3

2.	Центрифуга Sigma 3-30KS	1	936 000,00	15	4 160	4 160
3.	Термостат TDB-120 типа "Драй-блок"	1	44 435,55	10	296,24	296,24
4.	Лабораторный морозильник ZLN-T 300	1	247 464,00	15	1 099,84	1 099,84
5.	Шкаф вытяжной лабораторный	1	55 460,00	20	184,87	184,87
6.	Автоклав-полуавтоматический TuT-2340 МК 19л	1	183 505,00	10	1 223,37	1 223,37
7.	Аналитические весы Aczet Scale модель CY-224C	1	57 260,00	5	763,47	763,47
8.	Дистиллятор Д-4	1	18 230,00	10	121,53	121,53
9.	Спектрофотометр ПЭ-5400ВИ	1	109 000,00	15	484,44	484,44
10.	Холодильник лабораторный Liebherr LKv 3910	1	56 779,66	15	252,35	252,35
Итого						8 862,32

Нами была рассчитана амортизация с использованием линейного метода. Линейный метод расчета амортизации соответствует равномерному переносу стоимости основных фондов на стоимость готовой продукции и сумма амортизационных отчислений зависит от первоначальной стоимости приобретения основных средств. При этом методе рассчитывается ежемесячная норма амортизации в зависимости от срока использования объекта основных фондов до полного списания его стоимости.

При применении линейного метода сумма начисленной амортизации за один месяц определяется по формуле:

$$AO_T = \frac{C}{T}, \quad (4.3.1.1)$$

$$AO_M = \frac{AO_T}{12} \quad (4.3.1.2)$$

$$AO_{НИР} = AO_M * K \quad (4.3.1.3),$$

где AO_T – сумма амортизационных отчислений за год;

AO_M – сумма амортизационных отчислений за месяц;

C – первоначальная стоимость оборудования;

T – срок службы основного оборудования, год;

K – норма амортизации в процентах к первоначальной стоимости оборудования, 0,8 % месяца использовалось оборудование в НИР.

Ежегодная сумма амортизационных отчислений пользования центрифуги (Eppendorf) находили по формуле 4.3.2.1:

$$AO_T = 62\,146,85 / 15 = 4\,143,12 \text{ (руб.)},$$

тогда ежемесячная сумма амортизации будет равна

$$AO_M = 4\,143,12 / 12 = 345,26 \text{ (руб.)}$$

Следовательно, сумма амортизации за время использования центрифуги в НИР составит:

$$AO_{НИР} = 345,26 * 0,8 = 276,21 \text{ (руб.)}$$

Расчет амортизационные отчисления за период проведения НИР сводится в таблице 4.3.2.3.

Основная заработная плата

В настоящую статью включена основная заработная плата научных и инженерно-технических работников, непосредственно участвующих в выполнении работ по данной теме. В состав основной заработной платы включается премия, выплачиваемая ежемесячно из фонда заработной платы. Расчет основной заработной платы сводится в таблице 4.3.2.4.

Таблица 4.3.2.4. Расчет основной заработной платы

№ п/п	Наименование этапов	Исполнители по категориям	Трудо-емкость, чел.-дн.	Заработная плата, приходящаяся на один чел.-дн., тыс.руб.	Всего заработная плата по тарифу (окладам), тыс. руб.
1.	Разбор литературных источников	Руководитель	2	1583	6332
2.	Подготовка эксперимента	Магистрант	2	820	1640
3.	Выделение микробиоты	Магистрант	30	820	24600
4.	Качественная и количественная оценки микробиоты	Магистрант	21	820	17220
5.	Оформление результатов	Руководитель	7	1583	11081
6.	Написание магистерской диссертации	Магистрант	15	820	12300
Итого: 73173					

Таблица 4.3.2.5. Баланс рабочего времени

Показатели рабочего времени	Руководитель	Магистрант
Календарное число дней	730	730
Количество нерабочих дней		
- выходные дни	132	132
- праздничные дни		
Потери рабочего времени		
- отпуск	48	48
- невыходы по болезни	0	0
Действительный годовой фонд рабочего времени	550	550

Месячный должностной оклад работника:

$$Z_m = Z_b \cdot (k_{np} + k_d) \cdot k_p, \quad (4.3.2.1)$$

где Z_b – базовый оклад, руб.;

k_{np} – премиальный коэффициент, (определяется Положением об оплате труда);

k_d – коэффициент доплат и надбавок (в НИИ и на промышленных предприятиях – за расширение сфер обслуживания, за профессиональное мастерство, за вредные условия: определяется Положением об оплате труда);

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

Таблица 4.3.2.6. Расчёт основной заработной платы

Исполнители	Z_b , руб.	k_p	Z_m , руб	$Z_{дн}$, руб.	T_p , раб. дн.	$Z_{осн}$, руб.
Руководитель	28924	1,3	37601	1583	11	17413
Магистрант	14874	1,3	19336	820,3	77	63140

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

Среднедневная заработная плата рассчитывается по формуле:

$$Z_{дн} = \frac{Z_m \cdot M}{F_d}, \quad (4.3.2.2)$$

где Z_m – месячный должностной оклад работника, руб.;

M – количество месяцев работы без отпуска в течение года;

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

Дополнительная заработная плата научно-производственного персонала

Дополнительная заработная плата рассчитывается исходя из 10-15% от основной заработной платы, работников, непосредственно участвующих в выполнении темы:

$$Z_{доп} = k_{доп} \cdot Z_{осн} \quad (4.3.2.3)$$

где $Z_{доп}$ – дополнительная заработная плата, руб.; $k_{доп}$ – коэффициент дополнительной зарплаты; $Z_{осн}$ – основная заработная плата, руб.

Коэффициент отчислений во внебюджетные фонды составляет 0,271. (фонд социального страхования, пенсионный фонд, федеральный фонд медицинского страхования, территориальный фонд медицинского страхования)

Таблица 4.3.2.7. Заработная плата исполнителей НТИ

Заработная плата	Руководитель	Магистрант
Основная зарплата	17413	63140
Дополнительная зарплата	2611,95	9471
Зарплата исполнителя	20024,95	72611
Коэффициент отчислений во внебюджетные фонды 0,271	5426,76	19677,58
Итого по статье $C_{зп}$	25104,34	

За исследования в разработке методике выделения микробиоты человека для последующей трансплантации, ученые за 6 месяцев получили 25105 рублей.

4.3.3 Организационная структура проекта

В практике используется несколько базовых вариантов организационных структур: функциональная, проектная, матричная. Наиболее подходящей организационной структурой данной работы является проектная, представленная на рисунке 4.3.3.1.

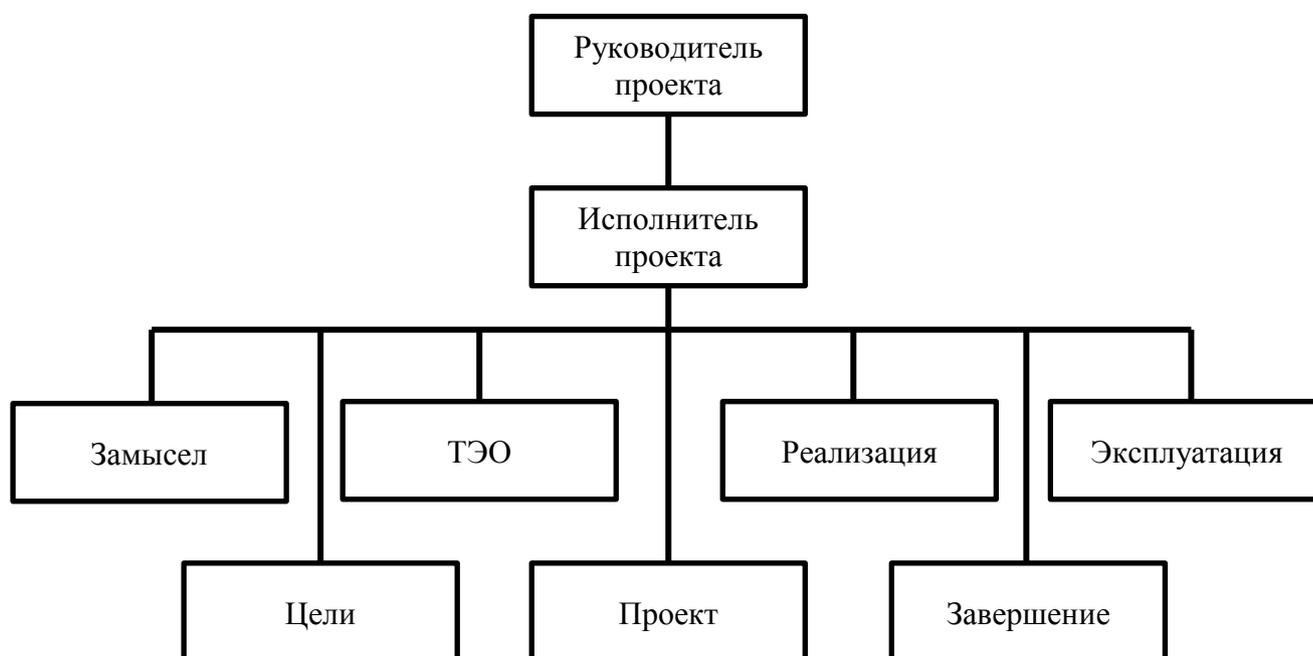


Рисунок 4.3.3.1. Организационная структура проекта

4.3.4 Матрица ответственности

Для распределения ответственности между участниками проекта формируется матрица ответственности (таблица 4.3.4.1).

Таблица 4.3.4.1. Матрица ответственности

Этапы проекта	Руководитель	Магистрант
Выбор направления исследования	О	И
Определение целей и задач исследования	О	И
Изучение литературных данных по теме исследования	У	И
Составление плана и методик эксперимента	У	И
Проведение экспериментальных работ		О/И
Анализ полученных экспериментальных данных		О/И
Формирование выводов по данным	У	О
Визуализация и презентация полученных данных	У	О

О - ответственный, И - исполнитель, У - утверждающее лицо

4.3.5 Реестр рисков проекта

На пути реализации проекта могут возникнуть разного рода риски, представляющие опасность того, что поставленные цели проекта могут быть не достигнуты полностью или частично. Полностью избежать риска практически невозможно, но снизить их угрозу можно, уменьшая действие неблагоприятных факторов. Возможные риски представлены в таблице 3.4.1 и на рисунке 3.5.1.

Таблица 4.3.5.1. Реестр рисков

№	Риск	Вероятность наступления (1-5)	Влияние риска (1-5)	Уровень риска	Способы смягчения риска
---	------	-------------------------------	---------------------	---------------	-------------------------

Продолжение таблица 4.3.5.1

Технические риски					
1	Требования	1	4	средний	Отслеживание изменений требований к материалом, с помощью которых проводится исследование. Постоянный поиск путей оптимизации производства..
2	Технология	1	3	низкий	
3	Использование ненадежных источников	2	4	средний	
4	Качество	2	4	средний	
Внешние риски					
5	Качество предоставляемых расходных материалов	2	4	низкий	Изучение конъюнктуры рынка. Страхование имущества. Изучение изменений в российском законодательстве. Определение мер поощрений и наказаний по отношению к рабочим.
6	Предписания контролирующих органов	3	3	средний	
7	Рынок	3	4	средний	
8	Непредвиденные обстоятельства	1	4	средний	
9	Изменения российского законодательства	4	5	высокий	
10	Небрежность и недобросовестность сотрудников	3	3	низкий	
Организационные риски					
11	Организации, от которых зависит проект	2	3	низкий	Строгий контроль за работой всех вспомогательных служб. Поиск альтернативных поставщиков и инвесторов. Возможность проведения исследования на новых научных платформах
12	Ресурсы	1	5	средний	
13	Финансирование	4	5	высокий	
14	Расстановка приоритетов	3	3	низкий	
Риски управления проектом					
15	Оценка	2	4	средний	Ответственный подход к разработке и управлению проектом. Повышение квалификации лиц, ответственных за управление проектом.
16	Планирование	2	3	низкий	
17	Контроль	3	4	средний	
18	Коммуникации	1	3	средний	

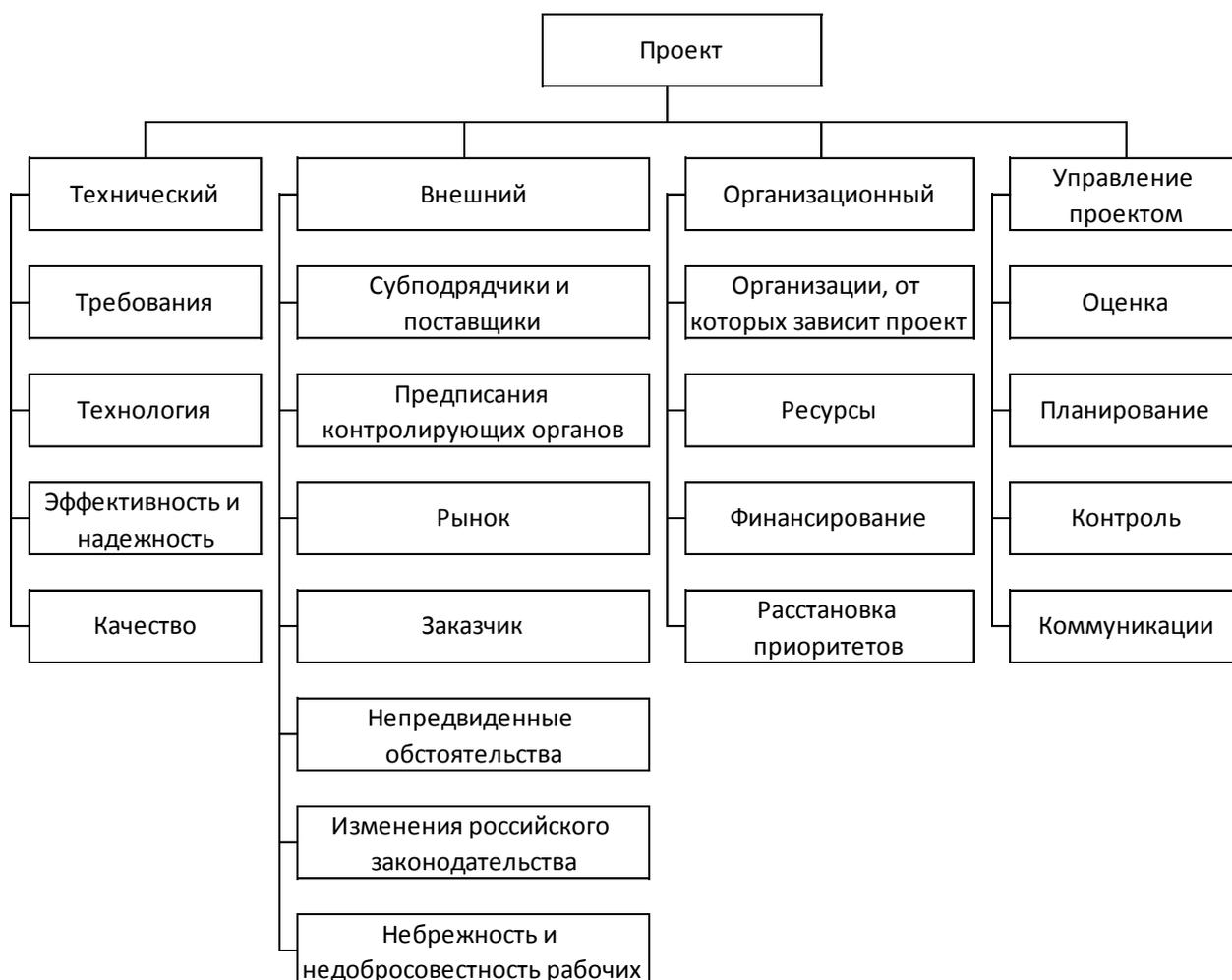


Рисунок 4.3.5.1. Иерархическая структура рисков

Выявленные сильные и слабые стороны проекта, а также угрозы и возможности, позволили провести планирование управления проектом и последовательность действий.

4.4. Определение ресурсной (ресурсосберегающей), финансовой, бюджетной, социальной и 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.

Интегральный финансовый показатель разработки определяется как:

$$I_{\phi}^p = \frac{\Phi_{pi}}{\Phi_{\max}}, \quad (4.4.1.1)$$

где I_{ϕ}^p - интегральный финансовый показатель разработки;

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

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

$$I_{\phi}^p = \frac{\Phi_{pi}}{\Phi_{max}} = \frac{280917,92}{1000000} = 0,28$$

$$I_{\phi}^{a1} = \frac{\Phi_{pi}}{\Phi_{max}} = \frac{1000000}{1000000} = 1$$

$$I_{\phi}^{a2} = \frac{\Phi_{pi}}{\Phi_{max}} = \frac{300000}{1000000} = 0,30$$

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

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

$$I_m^a = \sum_{i=1}^n a_i b_i^a, \quad I_m^p = \sum_{i=1}^n a_i b_i^p \quad (4.4.1.2)$$

где I_m – интегральный показатель ресурсоэффективности вариантов; a_i – весовой коэффициент i -го параметра;

b_i^a, b_i^p – бальная оценка i -го параметра для аналога и разработки, устанавливается экспертным путем по выбранной шкале оценивания;

n – число параметров сравнения.

Расчет интегрального показателя ресурсоэффективности проведён в таблице 4.4.1.1.

Таблица 4.4.1.1. Сравнительная оценка характеристик вариантов исполнения проекта

Критерии \ ПО	Весовой коэффициент параметра	Текущий проект	Аналог 1	Аналог 2
1. Экологичность	0,1	5	4	2
2. Отсутствие отходов	0,2	5	4	3
3. Безопасность для персонала	0,1	4	3	3
4. Эффективность	0,2	5	4	5
5. Простота технологии получения	0,1	5	4	4
6. Доступность	0,1	4	3	5
7. Конкурентоспособность продукта	0,2	5	4	3
ИТОГО	1			

$$I_m^p = 5 \times 0,1 + 5 \times 0,2 + 4 \times 0,1 + 5 \times 0,2 + 5 \times 0,1 + 4 \times 0,1 + 5 \times 0,2 = 4,8$$

$$I_1^a = 4 \times 0,1 + 4 \times 0,2 + 3 \times 0,1 + 4 \times 0,2 + 4 \times 0,1 + 3 \times 0,1 + 4 \times 0,2 = 3,8$$

$$I_2^a = 2 \times 0,1 + 3 \times 0,2 + 3 \times 0,1 + 5 \times 0,2 + 4 \times 0,1 + 5 \times 0,1 + 3 \times 0,2 = 3,6$$

Интегральный показатель эффективности разработки ($I_{финр}^p$) и аналога ($I_{финр}^a$) определяется на основании интегрального показателя ресурсоэффективности и интегрального финансового показателя по формуле:

$$I_{финр}^p = \frac{I_m^p}{I_{ф}^p}, \quad I_{финр}^a = \frac{I_m^a}{I_{ф}^a} \quad (4.4.1.3)$$

$$I_{финр}^p = \frac{4,8}{0,28} = 17,1$$

$$I_{финр}^{a1} = \frac{3,8}{1} = 3,8$$

$$I_{финр}^{a2} = \frac{3,6}{0,30} = 12$$

Сравнение интегрального показателя эффективности текущего проекта и аналогов позволит определить сравнительную эффективность проекта.

Сравнительная эффективность проекта:

$$\mathcal{E}_{cp} = \frac{I_{финр}^p}{I_{финр}^a} \quad (4.4.1.4)$$

$$\mathcal{E}_{cp} = \frac{I_{финр}^p}{I_{финр}^{a1}} = \frac{17,1}{3,8} = 4,51$$

$$\mathcal{E}_{cp} = \frac{I_{финр}^p}{I_{финр}^{a2}} = \frac{17,1}{12} = 1,43$$

где \mathcal{E}_{cp} – сравнительная эффективность проекта; $I_{мэ}^p$ – интегральный показатель разработки; $I_{мэ}^a$ – интегральный технико-экономический показатель аналога.

Таблица 4.4.1.2. Сравнительная эффективность разработки

№ п/п	Показатели	Аналог 1	Аналог 2	Разработка
1	Интегральный финансовый показатель разработки	1	0,30	0,30
2	Интегральный показатель ресурсоэффективности разработки	3,8	3,6	4,6
3	Интегральный показатель эффективности	3,8	12	17,1
4	Сравнительная эффективность вариантов исполнения	4,51	1,43	

Сравнение значений интегральных показателей эффективности позволило определить, что представленное в магистерской диссертации исследование и решение технической задачи с позиции финансовой и ресурсной эффективности является наиболее эффективным.

Список публикаций студента

1. Гудовщикова, Н. И. – Разработка методики выделения микробиоты для последующей трансплантации // Всероссийская итоговая 77-я студенческая научная конференция им. Н.И. Пирогова: сборник материалов, Томск, 24-26 апреля 2018 г. - Томск: СибГМУ, 2018 – С. 420-421;

2. Гудовщикова Н. И. Разработка методики выделения микробиоты для последующей трансплантации / Н. И. Гудовщикова; науч. рук. А. Г. Першина, В. А. Петров // Химия и химическая технология в XXI веке: материалы XVIII Международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых имени профессора Л.П. Кулёва, 29 мая-1 июня 2017 г., г. Томск. — Томск: Изд-во ТПУ, 2017. — С. 251-252;

3. Leonova A.A., Sukoco A.E., Gudovchshikova N.I. – Storage method of intestinal microbiome for further transplantation // Всероссийская итоговая 77-я студенческая научная конференция им. Н.И. Пирогова: сборник материалов, Томск, 24-26 апреля 2018 г. - Томск: СибГМУ, 2018 – С. 489-490;

Приложение А

Раздел 2

Объект и методы исследования

Студент:

Группа	ФИО	Подпись	Дата
4ДМ61	Гудовщикова Надежда Игоревна		23.05.2018

Консультант – лингвист отделения (НОЦ) ИЯ школы БИП:

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Старший преподаватель	Кобзева Н.А.			23.05.2018

2.1 Subjects and methods

2.1 The collection of biomaterials for research

For isolate the total gut bugs, recent biomaterial (human feces) was used. Before the donation of the biomaterial, the donor was examined for infection and general health in Savinykh A.G. the Hospital clinics Siberian State Medical University (SSMU). Collection of faeces was carried out only in the morning in the sterile an airtight container with a screw cap. Before transportation to the Central Research Laboratory SSMU biomaterial was stored for no more than two hours in the refrigerator at + 4°C. After receipt in the laboratory the biomaterial was at once used for isolation of the total microbiota intestinal.

2.2 Isolation of total gut bugs and its qualitative and quantitative assessment

The method isolation of the total gut bugs from the feces is based on isolation of microorganisms from the feces into the phosphate buffered saline (PBS) and further purification from macroscopic particles of garbage and soil solutes. To this end, various methods filtration, centrifugation regimes, were selected different concentrations and amounts solutions of PBS and Percoll, also, the amount of bacterial cells leaching with a solution PBS for better decontamination cells from what various microparticles, as detailed in chapter 3 "Results and discussion". After isolation of total gut bugs, its qualitative and quantitative assessment was carried out:

1. cell counting microscope field of view, the determination of protein and DNA concentrations were metered directly de novo the isolation of total gut bugs;
2. the vitality test MTT assay was taken directly de novo isolation of total gut bugs and after anyone cryopreservation.

For follow-up research study microbiota patterns were frozen under different conditions (table 2.6.1).

2.3 The DNA extraction from gut bugs guided by a pnenol-chlorophorm extraction

Before the DNA extraction prepared the following reagents and solutions:

1. Tris-EDTA (TE) buffer solution: to make 100 ml TE 10 mM Tris, 1 mM EDTA (combine 1 ml of a 1M Tris stock solution with 0.2ml of 0.5M EDTA and add 98.8 ml of sterile water), pH=8.0;

2. Pnenol;

3. Chloroform:Isoamyl alcohol (24:1). isoamyl alcohol reduces foaming during the extraction process, as a result there is a clearer phase separation.

4. 1M Tris HCl (pH 8.0): Dissolve 30.28 gm of Trizma base in 250 ml of distilled water.

5. 3M sodium acetate (pH=5.2): dissolve 246.1 gm of sodium acetate in 1000 ml of deionized H₂O.

6. RNase A can be dissolved at a concentration of 1 ml in 10 mM Tris-HCl (10 μL 1 M Tris HCl and added 980 μL of sterile water), heated to 100 °C for 15 minutes and slowly cool to indoor temperature. Roche recommends subsequent storage at -20 °C.

7. Proteinase K buffer: in 1.2 ml 10mM Tris-HCl solve 120 mg sodium dodecyl sulfate (SDS). Roche recommends subsequent storage at -20 °C.

An Algorithm for the Extraction of DNA:

1. Cells were settling by centrifugation of 30 min at 5000 revolutions per minute (rpm);

2. Settled cells resuspended in 6 ml TE buffer and transferred in eppendorf (10 ml), divided into three centrifuge tubes of 2 ml of cellular suspension;

3. Was added SDS from the calculation of 10 mg per liter of buffer. Gently stirred (the cells are lysed, and the DNA goes into the solution, the solution becomes viscous);

4. Was added equal volumes of mixture phenol/chloroform (1:1) (2.5 ml chloroform per 2 ml suspension). Gently stirred and centrifuged (10 min at 5000 rpm). The adjuvant is divided into 2 phases: water phase – top and phenolic – bottom. In between is the interphase is a layer of precipitated protein. The upper phase with dissolved DNA was carefully transferred to clean centrifuge tubes, trying not to capture the interphase, and repeated the cleaning procedure with phenol for the 2nd

time (when selecting the tip of the pipette was cut off, so as not to damage the long chain of molecules);

5. The upper phase after centrifugation was transferred to clean centrifuge tubes and an equal volume of chloroform was added (to remove phenol residues). Gently stirred and centrifuged for 10 min at 15000 rpm;

6. The upper phase was transferred to clean centrifuge tubes and added 2.5 volumes of 96% ethanol and 1/10 of the volume solution of DNA – 3 M sodium acetate. Gently stirred to form a lump of DNA - "jellyfish". Centrifuged 10 min at 15000 rpm;

7. The supernatant fluid was drained up to residuary DNA on the bottom of the test tube to pour 2 ml of 70 % ethanol (to clean the DNA from salts) and centrifuged 5 min at 15000 rpm;

8. The residuum was rinsed out with 0.5 ml of 96% ethanol and dried for about 20 minutes at room temperature. Equally bad wear out and underdry the pellet, which leads to poor dissolution of DNA;

The DNA pellet was dissolved in 2 ml of TE buffer. 80 μ l of RNAase solution was added to the solution and incubated for 1 hour at 37 °C;

10. In the same solution added 100 μ l proteinase K solution and incubated under the same conditions for another hour;

11. Operations 4-8 (cleaning and extraction of DNA) were repeated and the DNA precipitate was dissolved in TE buffer. Stored at -20 °C.

The DNA concentration was measured on the instrument the spectrophotometer (NanoDrop 2000, Thermo Fisher Scientific, USA).

2.4 Measuring protein with the Bradford assay

The concentration protein in the sample was measured by Bradford assay. This method is based on the proteins binding to the dye Coomassie Brilliant Blue G-250 (Coomassie G-250) due to the electrostatic interaction of a sulfonyl groups of the dye with the amino acid residues in protein. The mother acidic solution Coomassie G-250 has absorption maxima at the wavelength 465 nm. After binding with the protein and changing the color, the absorption maxima is jump to 595 nm, the measurement on

the spectrophotometer Unico 2800 (Unico Sys, USA) was carried out at this wavelength.

Before measuring the protein prepared the necessary reagents:

1. Bradford reagent: Dissolve 50 mg of Coomassie Brilliant Blue G-250 in 25 ml of ethanol (96%) and add 50 ml phosphoric acid (H_3PO_4). After dissolution of the Coomassie G-250 reagent, added the acid solution mixture slowly into 500 ml of H_2O and let the dye dissolve completely. Next, filter the solution and store in a jar of dark glass at room temperature;

2. Solution 0,1 M NaOH: 200 mg NaOH ($M=40$ g/mol) dissolve in 50 ml distilled water.

In the test samples, bacterial cells were destroyed in sodium hydroxide at high temperature, to do this to 200 μ l samples were added to 200 μ l of 1% PBS and 400 μ l of 0.1 M NaOH and incubated for 1 hour at a temperature of $+50^\circ C$. The following solution was used as a control sample: 400 ml 1% PBS and 400 μ l 0.1 M NaOH.

After destruction of the bacterial cells and protein yield, 100 μ l of the sample was taken into the solution and added to 1000 μ l of Bradford reagent. The contents of the tubes were then thoroughly mixed, avoiding the formation of foam, resulting in poor reproducibility. Then left for 5 minutes at room temperature for complete interaction of the dye with proteins. Before measurements began, the spectrophotometer was calibrated and set to the desired wavelength.

Before measurement the test specimens, the spectrophotometer exhibited at "0" using the control solution. Then the absorbancy of the samples tested was measured.

After each measurement, the measuring cell was thoroughly washed with 50% ethanol and then distilled water. After the end of the measurements, the measuring cell was thoroughly washed with 0.1M NaOH and distilled water.

2.5 Cells counting in the field of view microscope

Prepared microscopic preparation "crushed drop". Before that, the concentrated sample (isolated intestinal microbiota) was diluted by a factor of 1000.

2 μ l of the sample was applied to the slide using a sterile syringe with a needle. Then a drop was covered with a cover-glass over which a drop of immersion oil was

applied. Phase-contrast microscopy was performed using an immersion lens with a magnification by a factor of 1000 (Primo Star, Zeiss, Germany).

The number of bacterial cells in 1 ml of the sample was determined taken by the formula:

$$x = \frac{S_{CT} * N * 1000}{V * S}, \quad (2.5.1)$$

where X – number of bacterial cells in 1 ml of sample;

N – average number of bacterial cells in the field of view;

$V=2$ MKL – volume of microscopic sample;

$S_{CT} = 3,24 * 10^{-4} \text{M}^2$ cover-glass area;

$S = 0,0143 * 10^{-4} \text{M}^2$ the area of the field of view of the microscope.

2.6 MTT assay for the bacteria cells viability

Tim Mossman in his scientific works describes the method of using MTT assay to assess the survival of bacterial cells, as well as proliferation and cytotoxicity [14].

The MTT assay is a type colorimetric study consisting in the ability of living bacterial cells catalyzing oxidoreductase to convert soluble yellow 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) to its insoluble purple-blue intracellular crystals of MTT-formazan (MTT-f). Only viable bacterial cells can possess such activity.

The viability evaluation of the bacterial cultures was performed using the MTT reagent (Sigma, USA), which represents thiazole blue tetrazolium bromide (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide).

Immediately before the viability test, a MTT solution was prepared: 30 mg of the MTT reagent was dissolved in 15 ml of PBS solution, gently mixed, avoiding the formation of foam. After complete dissolution of the reagent MTT solution was filtered through a paper filter. This solution is not intended for storage.

Viability tests were carried out at different concentrations of the test samples: 50, 20 and 10% of the sample concentration diluted in 1% PBS, so that the measurement of one sample had three values. As a positive control, Escherichia coli culture was used to verify the positive reaction of the MTT reagent and energy

molecules inside the living cell. As a negative control, killed bacterial cells were used by the reagent of 10% DMSO solution, for this purpose, 90 μl of DMSO reagent was introduced to 10 μl of the sample and left for 10 minutes at room temperature. Negative control was used to ensure that the reaction does not proceed in killed bacterial cells. The MTT solution was used as a zero quality control, which was subsequently subtracted from the values of the tested samples as errors.

The eppendorf 1.5 ml samples were introduced in different concentrations and solutions according to the following scheme:

1. K0: a solution of MTT;
2. K+: 50 μl of E. Coli culture, 50 μl of 1% PBS and 100 μl of MTT;
3. K-: 10 μl sample 1, 90 μl of DMSO, in a 10 minutes, was added 100 μl of MTT solution;
4. sample 1 (50): 50 μl sample 1, 50 μl 1% PBS and 100 μl of MTT solution;
5. sample 1 (20): 20 μl sample 1, 80 μl 1% PBS and 100 μl of MTT solution;
6. sample 1 (10): 10 μl sample 1, 90 μl 1% PBS and 100 μl of MTT solution;

The solutions were gently mixed, tightly closed eppendorf and incubated for one hour at a temperature of + 4 °C.

After incubation, 200 μl DMSO was added to the samples to destroy bacterial cells and release formazan crystals into the solution, thoroughly mixed with a pipette tip. The samples were then centrifuged (Sigma Eppendorf Minispin) 5 min at 5000 rpm to precipitate the residues of bacterial cells. The superposition liquid was accurately transferred to the 96-well plate without touching the sediment and measured the optical density at the automatic Sunrise microplanet photometer (Tecan, Austria) at a wavelength of 540 nm.

Repeated MTT assay for each sample during the experiment, namely MTT assay:

1. immediately after the isolation of the total intestinal microbiota, " a fresh sample»;
2. 1 day after conservation;
3. 7 days after conservation;

4. 30 days after conservation;

5. 60 days after conservation.

For 100% on the calibration curve, the optical density of the "fresh sample" was taken, namely, the optical density of samples after cryopreservation (1-60 days) was compared with the values of the "fresh sample".

Table 2.1.6.1. Methods for cryopreservation of total microbiota

The mixture for conservation															
foetal bovine serum (FBS), dimethylsulphoxide (DMSO), 1% solution PBS								20% solution glycerol, 1% solution PBS							
Conservation temperature, °C															
-80				-196				-80				-196			
Time of duration conservation, day															
1	7	30	60	1	7	30	60	1	7	30	60	1	7	30	60

Freezing in a mixture with Fetal Bovine Serum (FBS) and dimethylsulphoxide (DMSO): 1200 µl samples were centered (Sigma 3-30ks, Germany) at 14000 rpm 15 min, completely drained and precipitated to 360 µl with PBS solution and contributed 720 µl FBS and 120 µl DMSO. Gently stirred the sediment in the solution until completely dissolved. Then 115 µl were separated into cryovials and eppendorfs by 2 µl (8 pcs.) and frozen in a Dewar vessel with liquid nitrogen freezant (4 pcs.) and in a freezer (POL-EKO, Poland) at -80°C (4 pcs.).

Freezing in glycerol: 1200 µl of samples were centrifuged (Sigma 3-30ks, Germany) 15 min at 14000 rpm, completely drained of the superposition liquid and brought to 1200 µl of 15% glycerol solution. Then 115 µl were separated into cryovials and eppendorfs by 2 µl (8 pcs.) and frozen in a Dewar vessel with liquid nitrogen freezant (4 pcs.) and in a laboratory refrigerator (POL-EKO, Poland) at -80°C (4 pcs.). Record the results (MTT) immediately after sample preparation (fresh), 1, 7, 30, 60 days.

Приложение Б

Диаграмма Исикавы

