

В ходе выполнения проекта по Соглашению о предоставлении субсидии от 22 августа 2014 г. № 14.604.21.0119 с Минобрнауки России в рамках федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014- 2020 годы» на этапе № 1 в период с 22.08.2014 г. по 31.12.2014 г. выполнялись следующие работы:

1. Аналитический обзор современной научно-технической, нормативной, методической литературы.
2. Проведение патентных исследований.
3. Проведение сравнительной оценки эффективности возможных направлений исследований.
4. Разработка вариантов возможных решений задачи, выбор и обоснование оптимального варианта решения задачи.
5. Проведение сравнительной оценки вариантов возможных решений исследуемой проблемы с учетом результатов прогнозных исследований, проводившихся по аналогичной тематике.
6. Формирование биобанка образцов микробиоты кишечника пациентов с алкоголизмом и сбор 50 образцов (30 с патологией и 20 контрольных образца без патологии).
7. Создание критериев включения и исключения пациентов из исследования.
8. Разработка системы контроля качества образцов микробиоты кишечника человека.
9. Разработка методики выделения ДНК из биологических образцов, подготовки и хранения биологических образцов.
10. Полногеномное секвенирование 50 образцов (первой стадии) микробиоты кишечника человека.

11. Разработка программного обеспечения для обработки данных, полученных с помощью диагностической панели.
12. Создание базы данных, содержащей информацию о генах бактериальных токсинов и генах, ассоциированных с метаболизмом алкоголя.
13. Разработка вариантов диагностической панели.
14. Закупка материалов (сырья, реактивов) и оборудования для проведения ПНИ.
15. Синтез праймеров и олигонуклеотидных проб для генов функциональных маркеро
16. Подготовка промежуточного отчета о ПНИ.
17. Проведение мероприятий по достижению показателей результативности проекта
18. Синтез праймеров и олигонуклеотидных проб для генов филогенетических маркеров на базе индустриального партнера.
19. Разработка дизайна гибридизационных зондов в виде совокупности уникальных нуклеотидных последовательностей для таргетных участков генов.
20. Проверка выбранных вариантов компонентов диагностической панели на патентную чистоту.
21. Разработка программы и методик испытаний диагностической панели.
22. Материально-техническое обеспечение экспериментальных работ этапа

При этом были получены следующие результаты:

1. Обзор научно-технической литературы. В проведенном анализе литературы показана роль кишечной микробиоты в здоровье человека. Изменение состава микробиоты может быть связано с различными заболеваниями, такими как ожирение, аутизм, диабет и аллергия. Синдром алкогольной зависимости (САЗ) является социально значимым заболеванием в современном обществе и требует комплексного изучения всех факторов. В опубликованных исследованиях центральное место занимает оценка генетических и физиологических факторов макроорганизма-хозяина, в то время как ключевой «игрок» метаболизма организма человека, микробиота, в большинстве случаев не учитывается. В обзоре литературы представлена современная информация о различных типах бактериальных маркеров. Результаты показывают, что такая характеристика, как число генов в метагеноме, может со временем стать диагностическим инструментом для детекции заболеваний, в том числе САЗ. Обзор составлен на основе научных статей, преимущественно опубликованных за последние 5 лет.

2. Проведены патентные исследования по теме ПНИ с использованием ключевых слов, заявленных в теме. По результатам патентного поиска можно сделать вывод, что выявление маркеров заболеваний при помощи молекулярно-биологических методов является актуальной задачей. Большинство диагностических разработок, основанных на анализе состава микробиоты и соотношений между различными представленными в ней микроорганизмами, используются для определения различного рода инфекционных заболеваний и некоторых заболеваний, связанных с реакцией иммунитета человека. Таким образом, на текущий момент разработка модели диагностической панели соответствует современному уровню технологий, используемых для диагностических целей.

3. Проведена сравнительная оценка эффективности возможных направлений исследований. Среди существующих методов, используемых для анализа функционального и таксономического состава бактерий, были выбрана

следующие методы: иммунохимические, масс-спектрометрия, секвенирование ДНК по Сэнгеру, высокопроизводительное секвенирование генов 16S рРНК, полногеномное секвенирование ДНК (shotgun-секвенирование), использование ДНК гибридационных чипов, полимеразная цепная реакция (ПЦР) в режиме реального времени с использованием олигонуклеотидных зондов и с использованием красителя SYBR GREEN. При оценке эффективности возможных направлений исследования учитывались возможность приборной базы потенциальных потребителей диагностической тест-системы, время, необходимое на проведение анализа, и точность полученных данных. По результатам проведенного анализа оптимально подходящим методом среди выше приведенных по заданным нами критериям оказался подход полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с использованием красителя SYBR GREEN.

4. Для решения поставленных в исследовании задач были рассмотрены следующие методики анализа функционального и таксономического состава бактерий: иммунохимический метод, масс-спектрометрия, секвенирование, секвенирование по Сэнгеру, высокопроизводительное секвенирование генов 16S рРНК, полногеномное секвенирование ДНК, секвенирование на гибридационных чипах, ПЦР-анализ, ПЦР в режиме реального времени с использованием олигонуклеотидных зондов и с использованием красителя SYBR GREEN. После подробного изучения каждого данного метода сделано заключение, что метод ПЦР-анализа в реальном времени с использованием метки SYBR GREEN I позволяет получить необходимую информацию о функциональном и таксономическом составе микробиоты кишечника человека, является автоматизированным, стандартизованным и безопасным методом, не требующим специального дорогостоящего оборудования. Таким образом, данный метод наиболее подходит для построения диагностической модели.

5. Были проанализированы методики использующиеся в актуальных работах, направленных на изучение изменения состава микробиоты, возникающих при болезнях, таких как ожирение, диабет первого и второго типа, болезнь Крона. Из изученных вариантов решений задач, представленных в рассмотренных работах и схожих с исследуемой проблемой, метод количественного ПЦР анализа был отобран, как оптимальный для работы в рамках реализации ПНИ.

6. На 1-м этапе выполнения ПНИ собрано 30 контрольных и 20 опытных образцов кала человека, и проведено их полногеномное секвенирование.

7. На основе литературных данных, указывающих на факторы, которые могут оказать влияние на состав микробиоты кишечника, были разработаны критерии включения и исключения пациентов из исследования. Критерии включения: мужчины и женщины от 25 до 60 лет; стаж регулярного (не менее 3 раз в неделю) приема алкоголя более 3 лет; подтвержденный диагноз алкоголизм любой из стадий; наличие или отсутствие заболеваний, ассоциированных с длительным приемом алкоголя (алкогольный панкреатит, алкогольный гепатит, алкогольный цирроз печени, алкогольный энтерит, психические расстройства, вызванные приемом алкоголя); подписанное информированное согласие на участие в исследовании. Критерии исключения: любые онкологические заболевания; прием антибиотиков, пробиотков или пребиотиков за 6 месяцев до исследования; инфекционные и паразитарные заболевания, в том числе ВИЧ, гепатиты, туберкулез; наличие у пациента диареи (с частотой стула более 3 раз в день) в течение не менее 3 дней подряд в течение последнего месяца; беременность или лактация; наличие в анамнезе сопутствующих состояний и заболеваний, которые могли бы привести к выраженным изменениям состава микрофлоры кишечника .

8. На основе рекомендаций международных метагеномных консорциумов была разработана система контроля качества образцов микробиоты кишечника человека. Контроль качества проводится на уровнях

пробоподготовки (минимальная масса образца должна составлять не менее 10 г., после выделения ДНК, для полногеномного секвенирования количество ДНК должно составлять не менее 1 мкг, концентрация ДНК не менее 10 нг/мкл.; для секвенирования 16S рРНК - не менее 1 нг и 0,5 нг/мкл; для секвенирования 16S рРНК - 1 нг и 0,5 нг/мкл; после подготовки библиотеки секвенирования, концентрация должна составлять не менее 0,5 нг/мкл вне зависимости от формата секвенирования и др. критерии), по результатам секвенирования (количество ридов на образец должно быть не ниже 50% целевого показателя для данной величины; для секвенирования 16S рРНК, средняя длина ридов должна составлять не менее 80% от целевой длины, которая определяется протоколом секвенирования) и по результатам биоинформатического анализа (для секвенирования 16S рРНК доля успешно классифицированных ридов должна составлять не менее 80%; для полногеномного секвенирования - не менее 20%).

9. Основываясь на рекомендациях международных метагеномных консорциумов, была разработана методика подготовки и хранения образцов кала человека, учитывающая приборную базу клинической лаборатории. Предлагаемая методика позволяет осуществлять сбора и хранения образцов кала человека в формате, пригодном для последующего метагеномного профилирования посредством секвенирования библиотек фрагментов ДНК.

10. На собранных образцах микробиоты человека было проведено полногеномное секвенирование. Результат представлен отдельным документом: «Акт о полногеномном секвенировании 50 образцов микробиоты кишечника человека».

11. Было разработано программное обеспечение (ПО) для обработки геномных и протеомных данных, полученных с помощью диагностической панели. В ПО предусмотрены настройки, отвечающие типу и статусу образца, типу прибора, набору реактивов, месту использования, что делает его универсальным относительно условий проведения секвенирования.

12. На основе имеющихся бактериальных баз данных и ряда научных публикаций была создана база данных, содержащая информацию о генах бактериальных токсинов и генах, ассоциированных с метаболизмом алкоголя.

13. Была разработана эскизная конструкторская документация на диагностическую панель. Тест-система «АЛКО-ТЕСТ» предназначена для одновременного анализа в одном образце не менее 1000 генетических детерминант, характеризующих специфические маркеры для генов, позволяющих определить как филогенетический, так и функциональный состав микробиоты кишечника человека.

14. Из средств бюджетной субсидии были закуплены материалы (сырье, реактивы) и оборудование для проведения ПНИ.

15. Были разработаны и синтезированы 2 варианта дизайна праймеров для диагностической панели. Результат представлен отдельным документом: «Акт синтеза праймеров и олигонуклеотидных проб для генов функциональных маркеров».

16. Был подготовлен промежуточный отчет о ПНИ.

17. Результаты по теме ПНИ были доложены на 3-х конференциях, 2 из которых имели статус международных.

18. На базе индустриального партнера был проведен синтез олигонуклеотидных проб для генов филогенетических маркерах.

19. Была проведена разработка дизайна гибридизационных зондов в виде совокупности уникальных нуклеотидных последовательностей для таргетных участков генов.

20. Была проведена проверка выбранных вариантов компонентов диагностической панели на патентную чистоту. В результате проверки не

было найдено аналогов данного устройства ни среди зарубежных коммерческих приборов, ни среди отечественных.

21. Исходя из требований к диагностической панели была разработана программа и методики испытаний диагностической панели.

22. Было проведено материально-техническое обеспечение экспериментальных работ этапа.

Комиссия Минобрнауки России признала обязательства по Соглашению на отчетном этапе исполненными надлежащим образом.