



«НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ТОМСКИЙ ПОЛИТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

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

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Тема работы
Применение медицинского биотехнологического метода ВЕСТЕРН БЛОТТИНГА для идентификации белков и их использования для изучения патогенетических аспектов злокачественных новообразований

УДК 577.112:602.4

Студент

Группа	ФИО	Подпись	Дата
4ДМ41	Мычко Кристина Александровна		16.05.16

Руководитель

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Профессор	Серебров В.Ю	д.м.н., профессор		03.06.2016

КОНСУЛЬТАНТЫ:

По разделу «Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение»

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Ассистент	Грахова Е.А.			27.05.2016

По разделу «Социальная ответственность»

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

ДОПУСТИТЬ К ЗАЩИТЕ:

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

Томск – 2016 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



**«НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ТОМСКИЙ ПОЛИТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

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

УТВЕРЖДАЮ:

Зав. кафедрой БИОХ

Е.А. Краснокутская Краснокутская Е.А.
(Подпись) (Дата) (Ф.И.О.)

ЗАДАНИЕ

на выполнение выпускной квалификационной работы

В форме:

магистерской диссертации

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

Студенту:

Группа	ФИО
4ДМ41	Мычко Кристине Александровне

Тема работы:

**Применение медицинского биотехнологического метода ВЕСТЕРН БЛОТТИНГА для
идентификации белков и их использования для изучения патогенетических аспектов
злокачественных новообразований**

Утверждена приказом директора (дата, номер)	№ 3085/с от 24.04.2016
---	------------------------

Срок сдачи студентом выполненной работы:	01.06.2016
--	------------

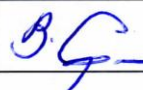
ТЕХНИЧЕСКОЕ ЗАДАНИЕ:

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.).	Объект исследования – образцы нормальной и опухолевой ткани, больных раком эндометрия
---	---

Перечень подлежащих исследованию, проектированию и разработке вопросов (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).	1. Литературный обзор 2. Объект и методы исследования 3. Результаты проведенного исследования 4. Заключение
Перечень графического материала (с точным указанием обязательных чертежей)	
Консультанты по разделам выпускной квалификационной работы (с указанием разделов)	
Раздел	Консультант
«Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение»	Грахова Е.А.
«Социальная ответственность»	Ахмеджанов Р.Р.
Названия разделов, которые должны быть написаны на русском и иностранном языках:	
1. Обзор литературы	

Дата выдачи задания на выполнение выпускной квалификационной работы по линейному графику	16.09.2015
--	------------

Задание выдал руководитель:

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Профессор	Серебров В.Ю	д.м.н., профессор		16.09.2015

Задание принял к исполнению студент:

Группа	ФИО	Подпись	Дата
4ДМ41	Мычко Кристина Александровна		16.09.2015

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

Студенту:

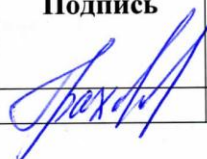
Группа	ФИО
4ДМ41	Мычко Кристине Александровне

Институт	физики высоких технологий	Кафедра	биотехнологии и органической химии
Уровень образования	магистр	Направление	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		При проведении исследования используется база лабораторий НИИ онкологии Томск; в исследовании задействованы 2 человека: студент-исполнитель и научный руководитель.
2. Нормы и нормативы расходования ресурсов		Проект выполняется в соответствии с ГОСТ 14.322-83 «Нормирование расхода материалов» и ГОСТ Р 51541-99 «Энергосбережение. Энергетическая эффективность»
3. Используемая система налогообложения, ставки налогов, отчислений, дисконтирования и кредитования		Согласно п.3 п.п.16 ст. 149 НК РФ данная НИР не подлежит налогообложению. На основании п. 1 ст. 58 закона №212-ФЗ для учреждений осуществляющих образовательную и научную деятельность в 2016 году вводится пониженная ставка для расчета отчислений во внебюджетные фонды – 27,1% от фонда оплаты труда.
Перечень вопросов, подлежащих исследованию, проектированию и разработке:		
1. Оценка коммерческого и инновационного потенциала НТИ		Определение концепции проекта, анализ основных критериев сравнения, экспертная оценка эффективности, SWOT-анализ.
2. Планирование процесса управления НТИ: структура и график проведения, бюджет, риски и организация закупок		Планирование работ по НТИ, определение трудоемкости выполнения работ, разработка графика проведения НИ, расчет материальных затрат НИ, расчет затрат на оборудование для научно-экспериментальных работ, расчет основной и дополнительной заработной платы, расчет отчислений во внебюджетные фонды (страховые отчисления), расчет накладных расходов, расчет бюджета НТИ.
3. Определение ресурсной (ресурсосберегающей), финансовой, бюджетной, социальной и экономической эффективности исследования		Оценка сравнительной эффективности исследования, определение перспективности, целесообразности научного исследования с точки зрения ресурсоэффективности.
Перечень графического материала (с точным указанием обязательных чертежей):		
1. Матрица SWOT		
2. График проведения и бюджет НТИ		

Дата выдачи задания для раздела по линейному графику	28.04.2016
--	------------

Задание выдал консультант:

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Ассистент	Грахова Е.А.			28.04.2016

Задание принял к исполнению студент:

Группа	ФИО	Подпись	Дата
4ДМ41	Мычко Кристина Александровна		28.04.2016

ЗАДАНИЕ ДЛЯ РАЗДЕЛА «СОЦИАЛЬНАЯ ОТВЕТСТВЕННОСТЬ»

Студенту:

Группа	ФИО
4ДМ41	Мычко Кристине Александровне

Институт	физики высоких технологий	Кафедра	биотехнологии и органической химии
Уровень образования	магистр	Направление	19.04.01 Биотехнология

Исходные данные к разделу «Социальная ответственность»:

1. Характеристика объекта исследования (вещество, материал, прибор, алгоритм, методика, рабочая зона) и области его применения	Объект исследования – образцы нормальной и опухолевой ткани, больных раком эндометрия и колоректальным раком Рабочая зона – молекулярно-биологическая лаборатория Область применения - медицина
--	---

Перечень вопросов, подлежащих исследованию, проектированию и разработке:

1. Производственная безопасность 1.1. Анализ выявленных вредных факторов при разработке и эксплуатации проектируемого решения в следующей последовательности: – 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). 1.2. Анализ выявленных опасных факторов при разработке и эксплуатации проектируемого решения в следующей последовательности: – 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).	<i>Характеристика вредных факторов изучаемой производной среды, описывающих процесс взаимодействия человека с окружающей производственной средой в следующей последовательности:</i> – физико-химическая природа фактора, его связь с разрабатываемой темой; – действие фактора на организм человека; – приведение допустимых норм с необходимой размерностью (с ссылкой на соответствующий нормативно-технический документ); – рекомендуемые средства защиты (сначала коллективной защиты, затем – индивидуальные защитные средства). <i>Анализ опасных факторов проектируемой производственной среды в следующей последовательности:</i> – термические опасности (источники, средства защиты); – электробезопасность; – пожаровзрывобезопасность (причины, профилактические мероприятия, первичные средства пожаротушения).
2. Экологическая безопасность: – защита селитебной зоны	2. Экологическая безопасность: – анализ воздействия объекта на

– 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.	<i>атмосферу (выбросы);</i> – анализ воздействия объекта на гидросферу (сбросы); – анализ воздействия объекта на литосферу (отходы);
---	--

3. Безопасность в чрезвычайных ситуациях: – перечень возможных ЧС при разработке и эксплуатации проектируемого решения; – выбор наиболее типичной ЧС; – разработка превентивных мер по предупреждению ЧС; – разработка действий в результате возникшей ЧС и мер по ликвидации её последствий.	3. Безопасность в чрезвычайных ситуациях: – 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.
4. Правовые и организационные вопросы обеспечения безопасности: – специальные (характерные при эксплуатации объекта исследования, проектируемой рабочей зоны) правовые нормы трудового законодательства; – организационные мероприятия при компоновке рабочей зоны.	Правовые и организационные вопросы обеспечения безопасности: – специальные (характерные при эксплуатации объекта исследования, проектируемой рабочей зоны) правовые нормы трудового законодательства; – организационные мероприятия при компоновке рабочей зоны.

Дата выдачи задания для раздела по линейному графику	29.04.16
--	----------

Задание выдал консультант:

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Профессор	Ахмеджанов Р.Р.	д.б.н., профессор		29.04.16

Задание принял к исполнению студент:

Группа	ФИО	Подпись	Дата
4ДМ41	Мычко Кристина Александровна		29.04.16

РЕФЕРАТ

Выпускная квалификационная работа с. 129, рис. 1, табл. 26, источника 88, прил. 1

Ключевые слова: вестерн блоттинг, рак эндометрия, метаболический синдром, IGFBP-6 - белок, связывающий инсулиноподобный фактор роста.

Объектом исследования являются образцы нормальной и опухолевой ткани, больных раком эндометрия и колоректальным раком.

Цель работы – изучение особенностей системы инсулиноподобных факторов роста в опухолевой ткани у больных раком эндометрия в зависимости от наличия и выраженности метаболического синдрома, с помощью медицинского биотехнологического метода вестерн-блоттинга.

В процессе исследования проводилось получение супернатантов тканей для Вестерн блоттинг анализа, электрофорез белков в полиакриламидном геле по Лемли, электроблоттинг, проведение и регистрация вестерн-блот гибридизации.

В результате исследования обнаружена зависимость экспрессии IGFBP-6, а также экспрессии AdipoR1, AdipoR2 от опухолевой инвазии и наличия лимфогенного метастазирования. У больных раком эндометрия не выявлена взаимосвязь экспрессии IGFBP-6, уровня сывороточного адипонектина, экспрессии рецепторов адипонектина AdipoR1, AdipoR2 с МС.

Область применения: биохимия, медицина.

Экономическая эффективность/значимость работы: экономичный, экологичный и эффективный метод, полученные данные о белках, содержащихся в опухолевых клетках, может оказаться полезным для создания новых подходов в диагностике, а также значительно расширит понимание патогенетических механизмов развития онкологических заболеваний.

В будущем планируется изучить взаимосвязь уровня экспрессии IGFs и IGFBPs у больных раком эндометрия с клинико-морфологическими факторами и определить взаимосвязь компонентов ИФР-системы в ткани рака эндометрия с клиническими проявлениями МС и гормонально-метаболическими нарушениями.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АГ – артериальная гипертензия

БСА – бычий сывороточный альбумин

ИМТ – индекс массы тела

ИР – инсулинорезистентность

ИНСД – инсулинозависимый сахарный диабет

ИЛ-6 – интерлейкин 6

МС – метаболический синдром

РЭ – рак эндометрия

СД – сахарный диабет

СЖК – свободные жирные кислоты

ФНО- α – фактора некроза опухоли α

РАI-1 – ингибитор активатора плазминогена

IGF-1R – рецептор инсулиноподобного фактора роста 1-го типа

IGF-2R – рецептор инсулиноподобного фактора роста 2-го типа

IGFBPs – белки, связывающие инсулиноподобные факторы роста

IGFs – инсулиноподобные факторы роста

NC – нитроцеллюлоза

SDS – додецилсульфата натрия

PVDF – поливинилидендифторида

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ.....	14
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	14
1.1 Факторы риска развития рака эндометрия.....	17
1.2 Инсулинорезистентность как один из важнейших патогенетических моментов метаболического синдрома.....	21
1.3 Инсулиноподобные факторы роста и рак эндометрия.....	28
1.4 Вестерн-блоттинг.....	32
1.4.1 Подготовка образца.....	33
1.4.2 Гель-электрофорез.....	33
1.4.3 Перенос на мембрану.....	34
1.4.4 Блокирование.....	37
1.4.5 Детекция.....	37
1.4.6 Анализ.....	39
1.4.7 Колориметрическая детекция.....	40
1.4.8 Хемилюминесцентная детекция.....	40
1.4.9 Радиоактивная детекция.....	40
1.4.10 Флюоресцентная детекция.....	41
1.4.11 Система оптимизации вестерн-блоттинга.....	41
2 ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	43
2.1 Клиническая характеристика больных.....	43
2.2 Методы исследования.....	43
2.2.1 Получение супернатантов тканей для Вестерн блоттинг анализа.....	44
2.2.2 Определение содержания белка в образце по методу Лоури.....	44
2.2.3 Электрофорез белков в полиакриламидном геле по Лемли.....	45
2.2.4 Электроблоттинг – перенос белков на мембрану.....	46
2.2.5 Проведение и регистрация вестерн-блот гибридизации.....	46
2.2.6 Методы статистической обработки результатов исследования.....	47
3 РЕЗУЛЬТАТЫ ПРОВЕДЕННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ.....	48
4 ФИНАНСОВЫЙ МЕНЕДЖМЕНТ, РЕСУРСОЭФФЕКТИВНОСТЬ И РЕСУРСОСБЕРЕЖЕНИЕ.....	53
4.1 Предпроектный анализ.....	53
4.1.1 Потенциальные потребители результатов исследования.....	53
4.1.2 SWOT-анализ.....	54
4.2 Планирование работ по НТИ.....	56

4.3	Определение трудоемкости выполнения работ.....	58
4.4	Разработка графика проведения научного исследования.....	59
4.5	Календарный план-график выполнения дипломной работы.....	62
4.6	Бюджет научно-технического исследования (НТИ).....	67
4.6.1	Расчет материальных затрат НТИ.....	67
4.6.2	Расчет затрат на оборудование для научно-экспериментальных работ.....	68
4.6.3	Основная заработная плата исполнителей темы	71
4.6.4	Дополнительная заработная плата исполнителей темы	73
4.6.5	Отчисления во внебюджетные фонды (страховые отчисления)	73
4.6.6	Накладные расходы	74
4.6.7	Формирование бюджета затрат научно-исследовательского проекта	75
4.7	Определение экономической эффективности исследования.....	76
4.7.1	Оценка сравнительной эффективности исследования.....	76
5	СОЦИАЛЬНАЯ ОТВЕТСТВЕННОСТЬ.....	81
5.1	Производственная безопасность	81
5.1.1	Анализ вредных производственных факторов и обоснование процедур по их устранению (<i>производственная санитария</i>)	82
5.1.2	Состояние воздушной среды в помещении лаборатории	82
5.1.3	Освещение рабочей зоны.....	86
5.1.4	Шум и вибрация.....	86
5.2	Анализ опасных и вредных производственных факторов и обоснование мероприятий по их устранению (техника безопасности).....	87
5.2.1	Обращение с веществами.....	89
5.2.2	Обращение с установкой.....	89
5.2.3	Электробезопасность.....	89
5.2.4	Термическое воздействие	90
5.2.3.	Пожаровзрывоопасность веществ и материалов.....	91
5.3	Экологическая безопасность (<i>охрана окружающей среды</i>).....	92
5.4	Безопасность в чрезвычайных ситуациях (техногенного, природного, социального характера).....	93
5.4.1	Пожарная и взрывная безопасность.....	93
5.5	Правовые и организационные мероприятия обеспечения безопасности.....	94
5.5.1	Специальные правовые нормы трудового законодательства.....	94

5.5.2 Организационные мероприятия при компоновке рабочей зоны исследователя.....	94
Выводы.....	96
Список литературы	97
Приложение А.....	107

Введение

Актуальность

В работе методом ВЕСТЕРН БЛОТТА планируется идентифицировать в ткани аденокарцином эндометрия белок, связывающий инсулиноподобные факторы роста 6 (IGFBP-6). Выявление различных молекулярных механизмов опухолевой прогрессии является одним из перспективных подходов для улучшения прогноза при данной локализации. Только привлечение высокотехнологичных методов оценки белковой экспрессии (Вестерн блоттинг) позволяет решить данную проблему.

Известно, достаточно большое количество клеточных процессов и молекулярных механизмов вовлечено в развитие рака. Среди наиболее важных механизмов обсуждается роль системы инсулиноподобных факторов роста (ИФР-система), включающая инсулиноподобные факторы роста (IGF-I, IGF-II), шесть связывающих инсулиноподобные факторы роста белков (IGFBPs) и тирозинкиназный рецептор IGF-IR. Известно, что IGF-I и IGF-II стимулируют пролиферацию, клеточную подвижность, дифференциацию и выживаемость во многих типах опухолевых клеток. Обсуждается роль белков системы IGFs в таких сложных процессах как опухолевая инвазия и метастазирование. Известно, что IGF-II для ряда злокачественных опухолей действует как аутокринный фактор роста, повышенная экспрессия IGF-II по сравнению с нетрансформированной тканью выявлена во многих солидных опухолях, экспрессия IGF-II выявлялась чаще во многих злокачественных новообразованиях, чем IGF-I и уровень экспрессии IGF-II был значительно выше. В настоящее время IGFBP-6 позиционируется как уникальный среди других IGFBPs белок, имеющий в 20-100 раз более высокую аффинность к IGF-II, чем к IGF-I. Кроме того, у этого белка выявлены IGFs-независимые эффекты, такие как ингибирование неоангиогенеза, но с другой стороны, активация клеточной миграции. На экспериментальной модели колоректального рака было показано, что сниженная продукция IGFBP-6 ассоциировалась с активацией клеточной пролиферации. Возникновение и прогрессирование

колоректального рака и рака эндометрия часто происходит на фоне метаболического синдрома. На основании данных литературы можно предположить, что наряду с некоторыми перспективными внутриклеточными мишенями-белками исследование внеклеточных IGFBPs, и в том числе IGFBP-6, достаточно перспективно в плане выявления возможных взаимосвязей адипокин-опосредованных (через адипокины – основные гормоны жировой ткани) и IGF-IR-опосредованных сигнальных путей, вовлеченных в важнейших процессы канцерогенеза.

Данное исследование будет выполнено в рамках международного Гранта РФФИ (грант № 14–04–91150 ГФЕН_а) «Фундаментальные аспекты участия системы инсулиноподобных факторов роста в развитии злокачественных новообразований, ассоциированных с метаболическим синдромом». Исследование имеет определенное практическое значение для отработки биотехнологических методов исследований для изучения аспектов патогенеза рака и поиска возможных новых факторов прогноза рака на фоне метаболического синдрома.

Научная новизна: впервые изучена экспрессия экспрессия белка IGFBP-6 в злокачественных новообразованиях, ассоциированных с метаболическим синдромом.

Практическая значимость работы обусловлена полученными данными о связи экспрессии IGFBP-6 с наличием метаболического синдрома, позволит в будущем планировать профилактические мероприятия для больных данных локализаций, ассоциированных с метаболическим синдромом.

Цель исследования: изучение ассоциированных с системой инсулиноподобных факторов роста патогенетических аспектов злокачественных новообразований взаимосвязи с клинико-морфологическими параметрами и уровнем рецепторов адипонектина.

Задачи:

1. Изучение биотехнологического метода вестерн блоттинг;
2. Изучить белковую экспрессию IGFBP-6 в ткани рака методом Вестерн блоттинг;
3. Сопоставить данные по белковой экспрессии IGFBP-6 с клиническими параметрами и уровнем рецепторов адипонектина;
4. Расчет ресурсоэффективности и ресурсосбережения;
5. Оценка производственной и экологической безопасности проекта.

.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Факторы риска развития рака эндометрия

Согласно данным мировой статистики рак эндометрия (РЭ) является одним из наиболее распространенных злокачественных новообразований у женщин. В России по итогам 2014 г. лидирующими заболеваниями злокачественных опухолей у женщин является рак молочной железы (21,2%), злокачественные новообразования кожи (14,6%) и рак эндометрия (7,7%). Было установлено 23570 случаев РЭ, за последнее десятилетие заболеваемость возросла на 37,2 % и составила 30,5 случаев на 100 000 населения. Пик заболеваемости приходится на возраст 60-64 года. Несмотря на высокую заболеваемость РЭ, показатель смертности, остается относительно на низком уровне, с тенденцией его уменьшения [1].

Большинство больных РЭ выявляется в I-II стадии заболевания 75-80%, III стадия 10-15%, а оставшаяся часть имеет IV стадию заболевания [13].

Основными причинами увеличение роста заболеваемости являются: увеличения продолжительности жизни женщин, неблагоприятная экологическая обстановка, генетическая предрасположенность, гормональнозависимые нарушения функции женских половых органов, отсутствие половой жизни, беременностей, родов, ранее менархе, позднее наступление менопаузы, эндокринных заболеваний [2,3,4].

Загрязнения окружающей среды могут быть факторами риска развития РЭ. Например, загрязнение окружающей среды кадмием ассоциируется увеличением риска развития РЭ в 1,39 – 2,29 раз, что является следствием его эстрогеноподобного эффекта. Было выявлено что, кадмий попадая в организм, взаимодействует с α -эстрогенными рецепторами, оказывая стимулирующий эффект на рост эндометрия [16].

Повышенный риск развития РЭ у женщин с ранним менархе и поздней менопаузой связан с увеличением длительности эстрогенного воздействия. Длительное воздействие эстрогенов приводит к активизации пролиферации

эндометрия, что увеличивает риск появления спонтанной мутации и ошибок репликации ДНК. Помимо этого раннее менархе у женщин, зачастую является следствием увеличения калорийности потребляемой пищи, что может приводить к развитию ожирения с запуском соответствующего механизма [14].

При бесплодии механизм увеличения риска РЭ, в основном связан с хронической ановуляцией, приводящей к длительному воздействию эстрогенов на эндометрии, без соответствующего противодействия, оказываемого прогестероном [14]. Помимо этого, бесплодием может проявляться синдром поликистозных яичников. При этом на фоне хронической ановуляции также имеется инсулинорезистентность, что приводит к повышению содержания инсулиноподобных факторов роста 1 и 2 (IGF-1,2) в эндометрии [14,15].

Одним из ключевых факторов развития РЭ является эндокринно-обменные нарушения – изменение репродуктивного и энергетического гомеостаза. Причины нарушения обменных процессов могут быть разнообразны, это зависит от образа жизни с отсутствием физической активности и нарушения режима питания (голодание или переедание). Чрезмерное употребление жирной пищи приводит к ожирению, а недостаток питательных веществ к заболеваниям сердечно-сосудистой системы. В мета-анализе 17 перспективных исследований, было выявлено, что сидячий образ жизни приводит к увеличению риска РЭ в 1,28 – 1,66 раз [17].

Питание со сниженным содержанием растительной клетчатки, содержащейся в цельно-зерновых злаках, бобовых, овощах и фруктах – также является фактором риска развития РЭ. Это связано с тем, что в растительной клетчатке содержатся лигнаны, из которых кишечная флора синтезирует энтеролактон, конкурентно блокирующий эстрогеновые рецепторы [18]. Увеличение калорийности потребляемой пищи приводит к развитию ожирения – одного из основных факторов риска развития РЭ. В одном исследовании было показано, что даже у женщин юного возраста, увеличение ИМТ на каждые 5 кг/м², способствует росту риска развития РЭ в 1,29 – 1,83 раз [19,20]. А у

женщин в постменопаузальном периоде данная связь становится наиболее очевидной [21].

Механизм канцерогенеза при ожирении связан с усилением периферической ароматизации андростендиона в эстрон и эстрадиол, появлением инсулинорезистентности, гиперинсулинемии, и увеличением содержания IGF-1,2 которые активируют PIK3/AKT/mTOR и MAPK патогенетические механизмы туморогенеза. У женщин с ожирением также усиливается синтез адипокинов, в том числе фактора некроза опухоли α (ФНО- α), интерлейкина 6 (ИЛ-6), резистина, лептина – которые обладают провоспалительным, ангиогенным и митогенным эффектами [22]. В исследованиях показана убедительная связь между увеличением содержания общего холестерина и триглицеридов в сыворотке крови и ростом риска развития РЭ. Тогда как нормальные концентрации липопротеидов высокой плотности оказывают протективное воздействие [23,24].

Следует так же отметить ряд предшествующих или сопутствующих заболеваний эндокринной и сердечно-сосудистой системы, к ним относятся сахарный диабет (СД), гиперинсулемия, инсулинорезистентность, артериальная гипертензия, гиперлипидемия [5,6]. Сахарный диабет II типа также является фактором риска развития РЭ, что подтверждено результатами множества исследований. Так у женщин с СД-II типа риск развития РЭ увеличивается в 1,86 – 1,89 раз [25,26].

В 1980 г. немецкие ученые W. Leonhardt, M. Hanefeld ввели термин «метаболический синдром» (МС), объединив случаи сочетания различных нарушений обмена веществ [7]. В 1988 г. американский ученый G. Reaven описал «синдромом X», объединяющий по механизмам возникновения абдоминальное ожирение, атеросклероз, атерогенную дислипидимию, артериальную гипертензию (АГ) и инсулинозависимый сахарный диабет (ИНСД). Предложив гипотезу, согласно которой в основе этих сочетаний может лежать снижение чувствительности тканей к инсулину [8].

Метаболический синдром имеет единое патогенетическое основание – наличие инсулинорезистентности (ИР), это нарушение биологического ответа на инсулин, нарушение метаболизма углеводов, жиров, белков, изменение синтеза ДНК, регуляции транскрипции генов, процессов дифференцировки и роста клеток, тканей организма. ИР с точки зрения многих авторов имеет место в 100% случаев при наличии избыточной массы тела и в 80% случаев СД-II. Риск возникновения РЭ на фоне МС возрастает в несколько раз [9, 10].

На настоящий момент существуют общие критерии диагностики МС, предложенные 2005 г. International Diabetes Federation (IDF), где МС диагностируется при наличии центрального (абдоминального) ожирения в сочетании, как минимум, с двумя из четырех перечисленных факторов риска (таблица 1) [11].

Таблица 1 – Критерии МС IDF

Фактор риска	Диагностический критерий
Центральное (абдоминальное) ожирение	Окружность талии > 94 см у мужчин > 85 см у женщин
Повышение уровня триглицеролов	> 1,7 ммоль/л
Снижение липопротеидов высокой плотности (ЛПВП)	мужчины < 1,0 ммоль/л женщины < 1,3 ммоль/л
Повышение артериального давления	> 130/85 мм рт. ст.
Повышение уровня глюкозы в плазме натощак	> 5,6 ммоль/л или ранее диагностированный СД-II

Метаболический синдром является одной из широко обсуждаемых проблем в современной медицине. Актуальность изучения данного синдрома обусловлена его высокой распространенностью в мире. В России его распространенность варьирует от 20% до 35%, причем у женщин он встречается в 2,5 раза чаще и с возрастом число больных увеличивается [29].

1.2 Инсулинорезистентность как один из важнейших патогенетических моментов метаболического синдрома

На сегодняшний день причины и условия развития МС остаются до конца не установленными. Главным механизмом возникновения МС является ИР – пониженная чувствительность клеток к инсулину. К развитию нарушения чувствительности клеток к инсулину влияют различные факторы, такие как возраст, повышенное количество висцерального жира, уровень артериального давления, наследственные заболевания СД, наличие дислипидемии, действие некоторых лекарств, таких, как β -блокаторы, кортикостероиды, тиазидовые мочегонные препараты.

В появлении ИР выделяют несколько механизмов, которые действуют на разных уровнях воздействия инсулина на клетки. Пререцепторный уровень - аномальные молекулы инсулина. Рецепторный уровень - редуцированное число рецепторов к инсулину (IR), аномальные формы инсулиновых рецепторов и инсулинрецепторного сигнала (IRS-1), нарушение аффинности IR. Пострецепторный уровень – нарушение трансдукции инсулинового сигнала и фосфорилирования. В генезе приобретенных форм ИР имеет значение в первую очередь пострецепторный механизм [30, 31].

В условиях ИР происходит снижение утилизации глюкозы инсулиночувствительными тканями, вследствие этого повышенное содержание глюкозы способствует развитию гипергликемии и гиперинсулинемии. Длительно существующая гиперинсулинемия приводит к истощению β -клеток и их секреторной дисфункции, неспособности обеспечивать требуемый уровень секреции инсулина. Это приводит к нарушениям метаболизма углеводов, развивается гипергликемия натощак, а затем СД-II [32].

Абдоминальное ожирение, является главным признаком МС, и одним из факторов развития и прогрессирования ИР. Избыточное отложение жировой ткани связано с нарушением метаболизма, а именно атерогенного липидного профиля, который характеризуется: гипертриглицеридемией, повышением уровня липидов, липопротеинов в сыворотке крови и нарушениями со стороны

системы свертывания крови. Как правило, эти нарушения развиваются рано, и длительное время протекают бессимптомно, задолго до клинического проявления артериальной гипертензии, СД 2-го типа и атеросклероза сосудов.

Жировая ткань является крупнейшим источником энергии в организме и самостоятельным активным эндокринным органом, клетки которого вырабатывают целый ряд гормонов, ферментов, провоспалительных цитокинов (адипокинов) и ряд других веществ, участвующих в регуляции метаболизма липидов, действия инсулина и энергетического гомеостаза [33].

Таблица 2 – Вещества, секретируемые жировой тканью

Групповая принадлежность и функции	Вещества
Ферменты	Ароматаза, липопротеинлипаза, 17-β-гидроксистероиддегидрогеназа, 11-β-гидроксистероиддегидрогеназа 1, ангиотензинконвертирующий фермент
Провоспалительные цитокины и цитокиноподобные протеины	Интерлейкины 1, 6, 8, 10, фактор некроза опухоли α и β, С-реактивный белок, фактор роста фибробластов, резистин, лептин, адипсин, адипонектин
Белки острой фазы воспаления	амилоид сыворотки А, С-реактивный белок
Факторы, участвующие в процессе фибринолиза и сосудистого гомеостаза	Ингибитор активатора плазминогена 1, тканевые факторы фибринолиза, сосудистый эндотелиальный фактор роста
Системы регуляции артериального давления	Ангиотензинпревращающий фермент, ангиотензин I, ангиотензин II, ренин
Другие вещества	Жирные кислоты, ретинол, лактат, лизофосфолипиды, глицерол, простагландины, глутамин

Помимо буферной функции липидов, адипозная ткань обладает также эндокринной функцией, экспрессируя и секретируя ряд метаболически активных гормонов — адипокинов или адипоцитокинов. Метаболически

активные молекулы адипоцитарного происхождения и свободные жирные кислоты (СЖК) способны влиять на различные органы и ткани (печень, скелетные мышцы, поджелудочную железу) или оказывать локальный паракринный эффект. Идентифицировано более 100 факторов, секретируемых адипозной тканью, многие из них имеют непосредственное или опосредованное отношение к развитию ИР [41].

Адипокины влияют на функции различных органов непосредственно или через эндокринные механизмы, взаимодействуя с рецепторами гипофиза, инсулином, катехоламинами. Адипокины оказывают влияние на факторы иммунных, воспалительных процессов (гаптоглобин, фактор некроза опухоли (ФНО- α), интерлейкин-6 (ИЛ-6)), на эндокринную (лептин, половые гормоны, ростовые факторы), метаболическую (СЖК, адипонектин, резистин), кардиоваскулярную (СЖК, ангиотензиноген, ингибитор активатора плазминогена (РАI-1)) и другие функции. Кроме адипонектина, секретируемого только адипоцитами, все другие адипокины могут секретироваться другими клетками адипозной ткани [39,41].

Таблица 3 – Паракринные и эндокринные эффекты факторов адипоцитарного происхождения, связанных с инсулинорезистентностью

Субстраты	Биологический эффект
Лептин	Стимулирует липолиз, ингибирует липогенез, улучшает чувствительность к инсулину, усиливает метаболизм глюкозы, стимулирует окисление ЖК
Адипонектин	Антивоспалительный, усиливает чувствительность к инсулину, снижает развитие атеросклероза, стимулирует окисление ЖК и снижение их уровня в плазме, снижает уровень глюкозы и концентрацию адипонектина в плазме при ИР
Резистин	Снижает чувствительность к инсулину и стимулирует липолиз
Ангиотензиноген	Регулирует артериальное давление, стимулирует дифференциацию адипоцитов, снижает эффект инсулина, усиливает липогенез

РАІ -1	Ингибирует активацию плазминогена и фибринолиза
Висфатин	Проявляет инсулиноподобное действие, гипогликемические эффекты путем стимуляции захвата глюкозы, проадипогенное и липолитическое действие
Апелин	Увеличивается уровень в плазме при ожирении, связанном с ИР и гиперинсулинемией
Оментин	Усиливает стимулированный инсулином транспорт глюкозы в подкожном жире и в адипоцитах, модулирует действие инсулина
Адипсин	Усиливает накопление ТГ, ингибирует липолиз
Васпин	Улучшает чувствительность к инсулину, угнетает продукцию резистина, лептина и ФНО- α
ИЛ-6	Снижает концентрацию инсулина и лептина при ожирении
ФНО- α	Индукцирует ИР и усиливает липолиз в адипоцитах, снижает экспрессию адипонектина и повышает экспрессию ИЛ-6
Липин	Снижает ИР, при ожирения и при МС снижается экспрессия у женщин
Адипонутрин	Повышается в ответ на инсулин, обладает фосфолипазной активностью

Основные процессы в адипозной ткани происходят под воздействием внутриклеточной гормон-чувствительной липазы, активность которой контролируется и катехоламинами (положительная регуляция) и инсулином (отрицательная регуляция). Гормон-индуцированное высвобождение СЖК более выражено в висцеральной жировой ткани, в которой липофильный эффект катехоламинов выражается в большей степени, а антилиполитический эффект инсулина снижен [36].

В состоянии натошак адипозная ткань высвобождает жирные кислоты (ЖК), используя их в качестве субстрата для окисления другими тканями, а после потребления пищи абсорбирует ЖК из циркуляторного русла, предупреждая избыточное поступление в другие ткани. При высококалорийном питании в течение длительного времени эффективное хранение жиров преобразуется в избыточное накопление липидов, приводящее к ожирению,

которое способствует хроническому выбросу большого количества ЖК в кровотоки, приводящему к липотоксичности, поскольку липиды и их метаболиты вызывают оксидативный стресс в эндоплазматической сети, митохондриях, во всех тканях организма [37]. Избыток СЖК в плазме крови ингибирует липогенез, предотвращая клиренс триглицеридов (ТГ), что в результате приводит к гипертриглицеридемии. Липотоксичность вызывает нарушение функции инсулинового рецептора, развитие ИР и уменьшает секрецию инсулина панкреатическими β -клетками [38, 39]. Длительная ИР создает гипергликемию с компенсированным глюконеогенезом, который увеличивает продукцию глюкозы печенью, усиливая тем самым гипергликемию, вызванную самой же ИР. СЖК также уменьшают стимулированную инсулином утилизацию глюкозы мышцами, внося дополнительный вклад в развитие гипергликемии [40].

Адипонектин играет важную роль в метаболизме липидов и глюкозы в скелетных мышцах и печени, повышая чувствительность к инсулину. Изменение эндокринной функции адипозной ткани влияет на уровень липидов крови. Адипонектин уменьшает плазменную концентрацию липопротеидов очень низкой плотности (ЛПОНП), аполипопротеина В (апоВ), повышая уровень их катаболизма. Эта взаимосвязь не зависит от влияния ИР на секрецию ЛПОНП и апоВ печенью, а является результатом эффекта адипонектина на метаболизм липидов в скелетных мышцах. Поэтому низкий плазменный уровень адипонектина связан с атерогенным липидным профилем: низким уровнем липопротеидов высокой плотности (ЛПВП), высоким уровнем ТГ, преобладанием в кровотоке маленьких плотных частиц липопротеидов низкой плотности (мпЛПНП), отличающихся атерогенными свойствами [42,43].

Лептин — один из первых идентифицированных адипоцитокинов. Он представляет собой протеин, кодируемый геном ожирения *ob* в адипоцитах. Роль лептина в контроле аппетита обеспечивается сигналом о насыщении в гипоталамус через рецепторы центральной нервной системы. С дефицитом гена лептина наблюдается увеличение аппетита и ожирение, которое корректируется

введением лептина. Фенотипически дефицит проявляется развивающимися гиперинсулинемией, ИР, гиперлипидемией, иммунной дисфункцией, нейроэндокринными нарушениями. Уровень лептина плазмы коррелирует с массой жира. ФНО- α , инсулин, глюкоза, эстрогены повышают высвобождение лептина из адипоцитов. Экспрессия лептина выявлена в различных тканях, что может свидетельствовать о его роли в жизненно важных процессах, включающих рост, метаболический контроль, иммунную регуляцию, чувствительность к инсулину, репродукцию [44].

При увеличении уровня адипозного лептина у пациентов с ожирением развивается лептинорезистентность, проявляющаяся отсутствием адекватного органного ответа на высокий уровень лептина. Снижение чувствительности мозга к лептину приводит к избыточному накоплению ТГ в адипозной ткани, мышцах, печени и поджелудочной железе, нарушающему чувствительность к инсулину и его секрецию. Таким образом, при висцеральном ожирении происходит нарушения двух механизмов (повышение лептина и снижение адипонектина), отвечающих за чувствительность тканей к инсулину [44].

ФНО- α , синтезируемый в адипоцитах, рассматривается как один из регуляторов липидного обмена, функция которого заключается в ингибировании активности липопротеинлипазы адипозной ткани. Секреция ФНО- α возрастает пропорционально увеличению жировой массы тела и сопровождается воспалением в печени. ФНО- α регулирует экспрессию других адипокинов в жировой ткани [45].

Апелин секретируется преимущественно жировыми клетками, а также в сердце, легких, почках, пищеварительном тракте, мозге, надпочечниках, эндотелии. Повышение секреции апелина и его уровня в плазме крови наблюдаются в случае ожирения, ассоциированного с гиперинсулинемией. В меньшей степени повышение секреции адипокина регулируется массой жировой ткани или высокожировой диетой. Секреция апелина угнетается при голодании и увеличивается при последующем приеме пищи. Инсулин непосредственно регулирует секрецию апелина жировыми клетками [46].

Висфатин — адипокин, продуцируемый висцеральными адипоцитами. Введение рекомбинантного адипокина действует на инсулиновый рецептор аналогично инсулину. Уровень висфатина увеличивается соответственно степени ожирения. По механизму действия он является пре- β -клеточным специфическим фактором, обладающим инсулиноподобной активностью. Вероятно, изучение эффектов висфатина откроет новые возможности в лечении ИР [47].

При ожирении происходит инфильтрация макрофагов в адипозную ткань. Количество макрофагов коррелирует со степенью ИР. Происходит нарушение основной функции адипоцитов, заключающейся в контроле плазменного уровня СЖК, нарушение эндокринной функции, развитие ИР и сопутствующих метаболических нарушений. Механизм, объясняющий повышение инфильтрации макрофагов в жировую ткань при ожирении, не исследован. Макрофаги жировой ткани являются постоянным основным источником ФНО- α , ИЛ-6, фактора и резистина, снижающего чувствительность к инсулину [52,53]. Для них характерен высокий уровень экспрессии рецепторов лептина и адипонектина [38]. Макрофаги вносят свой вклад в воспалительное состояние как иммунностимуляторы, активируя семейство митоген-активизированных протеинкиназ (С-Jun N-терминальная киназа, киназа β ингибитора ядерного фактора транскрипции каппаВ (NF- κ B) и фосфатидилинозитол-3-киназа), вызывая дефосфорилирование фактора NF- κ B и изменение конформации субстратов инсулинового рецептора (IRS)-1 и -2, что приводит к ингибированию транспортера GLUT4 и снижению чувствительности к инсулину [45, 54].

Преобладание макрофагов отмечено в адипозной ткани полных субъектов по сравнению с худыми. Жировая ткань у худых секретирует достаточное количество адипонектина, отличается низкой экспрессией провоспалительных цитокинов и содержит незначительное число макрофагов. Таким образом, выделяемые макрофагами факторы могут вызывать воспалительный ответ в адипоцитах и развитие ИР. В результате повышается

липолиз и снижается эффект инсулина на ингибирование липолиза. Эффект воспалительных цитокинов на снижение чувствительности к инсулину связан с экспрессией NF- κ B, индукцией супрессоров сигнального пути цитокинов SOCS и инактивированием фосфорилирования субстрата IRS-1 [55].

У животных и человека определены три вида ядерных рецепторов, активируемых пролифератором пероксисом (PPARs): PPAR α , PPAR β/σ и PPAR γ , кодирующиеся генами PPARG, PPARG, регулирующими обмен липидов и углеводов. В адипозной ткани отмечена высокая степень экспрессии PPAR γ . Уровень экспрессии / активности PPAR γ тесно связан с чувствительностью адипозной ткани к инсулину. Ядерные рецепторы активируют гены, вовлеченные в дифференциацию адипоцитов и захват ЖК (транспортный протеин ЖК, липопротеинлипаза, белок, связывающий ЖК, адипонектин, ацил-КоА-синтетаза) [38, 56]. Активация PPAR γ в макрофагах подавляет продукцию воспалительных цитокинов и улучшает чувствительность к инсулину [57]. PPARs способны связывать различные лиганды, в том числе, продукты метаболизма ЖК. Активирование PPAR γ может вызывать апоптоз больших адипоцитов и стимулировать дифференциацию преадипоцитов в адипозной ткани и повышать экспрессию генов, вовлеченных в липогенез и накопление ТГ. Увеличение экспрессии адипонектина агонистами PPAR γ является ключевым звеном в коррекции ИР, так как этот адипокин улучшает чувствительность печени и других тканей к инсулину [58].

1.3 Инсулиноподобные факторы роста и рак эндометрия

В последние годы появилось много данных о том, что некоторые эффекты эстрогенов в эндометрии обусловлены влиянием факторов роста и цитокинов. Установлено, что эстрогены стимулируют эпителиальный фактор роста (ЭФР) и инсулиноподобные факторы роста (IGF-I, IGF-II). ЭФР оказывают эстрогеноподобный эффект, вступая во взаимодействие с рецепторами эстрогенов. IGF регулируются и эстрогенами (IGF-I), и прогестероном (IGF-II). Биологическая активность IGF на клеточном уровне

контролируется белками, способными к образованию обратимых связей с факторами роста (IGFBPs). Если белок, связывающий IGF-I, блокирует молекулы IGF-I, то пролиферативный эффект эстрогенов не проявится. В менопаузе, когда синтез в эндометрии IGFBPs снижается, IGF-I выходит из-под контроля и может способствовать пролиферативным процессам, вплоть до рака эндометрия. Усиление синтеза IGFBPs наблюдается при локальном применении гестагенов (внутриматочный контрацептив с левоноргестрелом) [59].

IGF-I, IGF-II – сывороточные факторы, относящиеся к семейству инсулина и известные соответственно как соматомедин С и А. IGF повторяет многие функции инсулина, такие как увеличение метаболизма глюкозы в жировой ткани, увеличение транспорта глюкозы, подавление липолиза, увеличение синтеза жиров, белков, гликогена, но эффективность IGF равна только 1-2% эффективности инсулина. IGF способствуют росту и развитию организма, дифференцировке мышечной и костной тканей.

IGF в основном синтезируются в печени, но могут, вырабатываются во многих тканях организма, где они оказывают паракринное и аутокринное воздействия. IGF присутствуют в высоких концентрациях в сыворотке крови (до 1 нг/мл), и, в основном, связаны с белком. IGF-I и IGF-II соединяются с IGF-1R, а IGF-II связывается только с рецептором 2 типа (IGF-2R), который не способен передавать сигнал внутрь клетки [60].

Инсулиноподобные факторы роста играют важную роль в росте опухоли, экспрессия IGF-1R сильно выражена на мембране опухолевых клеток [60]. Но оценить передачу сигнала через IGF-1R трудно в силу того, что этот рецептор представляет собой гетеродимер с инсулиновым рецептором. Гетеродимер с инсулиновым рецептором/IGF-1R передает сигнал внутрь клетки, скорее всего, через IGF-1R, чем через инсулиновый рецептор. С другой стороны моноклональные антитела могут нейтрализовать и IGF-1R, и инсулиновый рецептор/IGF-1R- гетеродимер [61].

Являясь медиаторами, IGF участвуют в процессах клеточного роста, дифференцировки, апоптоза и трансформации. Их действие модулируется

различными ферментами и рецепторами [62]. Но прежде всего IGF регулируются 6 белками, связывающими инсулиноподобные факторы роста (IGFBPs). Они имеют схожую структурную организацию, имеют предшественников в виде пептидов, состоящих из 20-39 аминокислот. Зрелые белки обнаружены только в межклеточном пространстве. IGFBP-1 был впервые выделен из ткани эндометрия и считается одним из его биомолекулярных маркеров. Некоторые IGFBPs конкурируют с IGF за рецептор и являются антагонистами IGF, другие (IGFBP-2, IGFBP-5) способны усилить биологические эффекты IGF [63]. Активность IGF-I определена, прежде всего, соединением с IGFBP-3, имеющим высокую аффинность к IGF-I. Протеолиз белка, связывающего инсулиноподобный фактор роста, способствует увеличению IGF и усилению клеточной пролиферации [64].

Таблица 4. Белки, связывающие инсулиноподобные факторы роста

Белок	Функции	Модификация действия
IGFBP-1	Связывает IGF, стимулирует IGF - независимую клеточную подвижность	Дефосфорилирование, полимеризация тканевой трансглутаминазой
IGFBP-2	Преимущественно связывает IGF-II	Протеолиз RAPP-A
IGFBP-3	Основной транспортный белок для IGF-I и IGF-II в сыворотке крови, секретируется многими клетками, связывает IGF	Протеолиз сериновыми протеиназами, катепсинами, матриксными металлопротеиназами
IGFBP-4	Связывает IGF	Протеолиз RAPP-A
IGFBP-5	Связывает IGF, стимулирует IGF - независимую клеточную подвижность	Протеолиз RAPP-A, связывание с белками экстраклеточного матрикса
IGFBP-6	Преимущественно связывает IGF-II	Посттрансляционные модификации неизвестны

Изучена регуляция содержания IGFBP-4 в культуре эндометриальных стволовых клеток. Было выявлено, что данный белок секретируется этими клетками и при инкубации клеток с IGF-I, или с IGF-II его уровень снижается. Однако повышение уровня экспрессии IGFBP-4 связано с активацией IGF-1R.

Инсулин при высоких концентрациях (100нг/мл) взаимодействует с IGF-1R, не связываясь с IGFBPs. Таким образом, выявлен синтез и протеолиз IGFBP-4 в эндометриальных стромальных клетках [64].

В настоящее время большое внимание также уделяется IGFBP-6, который в отличие от других IGFBPs предпочтительно связывает IGF-II, кроме того, у этого белка выявлены независимые эффекты, такие как ингибирование неоангиогенеза, но с другой стороны, активация клеточной миграции. На модели клеточной линии рака эндометрия выявлена даунрегуляция экспрессии IGFBP-6 прогестероном [64].

Исследования *in vitro* показали, что IGF обладают сильным митогенным и антиапоптотическим действием на опухолевые клетки. Циркулирующие IGF-I и IGF-II связываются с IGF-1R, опосредованно через Ras- и АКТ-сигнальные пути, активируется циклин D1 и его связывающая циклин-зависимая киназа 4 (CDK4), что приводит к фосфорилированию белка ретинобластомы, высвобождению E2F- транскрипционного фактора, экспрессии циклина E. Кроме того, активация IGF-1R регулирует супрессоры клеточного цикла, такие как p27kip1, p57kip2 и PTEN [65].

Необходимость участия IGF-сигнального пути в развитии рака была продемонстрирована при MYC-индуцированной трансформации фибробластов. IGF-I защищает клетки от апоптотического сигнала при увеличенной экспрессии MYC и, как следствие, увеличивают клеточную пролиферацию. В отличие от рецепторов тирозинкиназ, таких как рецептор эпидермального фактора роста (EGFR) и c-KIT, которые видоизменены при различных злокачественных новообразованиях, IGF-R1 не изменяется ни при какой онкологической патологии. Тем не менее, у IGF-сигнального пути есть свои особенности, которые важны для выживания раковых клеток. Показано, что каскад метаболических процессов при активации семейства рецепторов эпидермального фактора роста (EGFR) также опосредован IGF, что ведет к увеличению и выживаемости опухолевых клеток. Передача сигналов IGF-R1 необходима, но недостаточна для роста раковой клетки [66].

Вызывает интерес наличие перекрестного взаимодействия между IGF-1R и Her2. Доказано, что наблюдаемая при различных злокачественных новообразованиях повышенная концентрация IGF-1R связана с резистентностью к терапии ингибиторами Her2, в том числе и трастузумабом. Было продемонстрировано взаимодействие между IGF -сигнальным путем и опухолевым супрессором p53 и BRCA1. Уровень экспрессии гена IGF-1R зависит от сложного взаимодействия между стимулирующими и ингибирующими транскрипционными факторами, такими как p53, p63, p73 и BRCA1. Мутации этих белков могут увеличить концентрацию IGF-1R, predisposing к развитию злокачественной опухоли [67].

В настоящее время роль системы IGF в развитии рака неоднозначна, хотя известно, что у людей с врожденной недостаточностью IGF-I рак развивается реже [68], а у больных акромегалией чаще [69]. При исследовании уровней IGF и IGFBPs необходимо понять частоту генетического полиморфизма в популяции, чтобы оценить возможные риски развития рака. Такие данные достаточно противоречивы, потому что отдельные работы не могут осветить целостную картину IGF-сигнального пути и всех его участников, а также оценить вклад каждого в риск развития рака [70].

1.4 Вестерн-блоттинг

Вестерн-блоттинг является высокочувствительным методом для обнаружения белков или мониторинга наличия антител, которые реагируют с дискретными антигенами в сложных смесях. Высокая чувствительность и специфичность этого метода подходит для обнаружения малых концентраций конкретных белков и позволяет идентифицировать конкретные антитела к аллергенам, патогенным, опухолям и аутоантигенам в сыворотке человека и животных. Ранняя и чувствительная диагностика заболевания является решающим фактором в обеспечении эффективного и успешного лечения различных болезней.

На первом этапе используют электрофорез белков в полиакриламидном геле для разделения нативных неденатурированных белков по трехмерной структуре или денатурированных полипептидов по длине. Далее белки переносят на PVDF или нитроцеллюлозную мембрану, затем детектируют с использованием антител, специфичных к заданному белку.

1.4.1 Подготовка образца

Образец может быть взят из цельной ткани или из клеточной культуры. В большинстве случаев, твёрдые ткани сначала измельчаются механически с использованием блендера (для образцов большого объёма), с использованием гомогенизатора (меньшие объёмы), или обработки ультразвуком.

Различные детергенты, соли и буферы такие как β -меркаптоэтанол или Тритон X-100 могут быть применены для улучшения лизиса клеток и растворения белков. Ингибиторы протеаз и фосфатаз часто добавляются для предотвращения расщепления образцов их собственными ферментами. Подготовка тканей часто выполняется при низких температурах, чтобы избежать денатурации белка.

Для разделения различных клеточных компартментов и органелл применяют комбинации биохимических и механических методик фракционирования, в том числе, различные типы фильтрации и центрифугирования.

Обязательным шагом является также измерения общей концентрации белка (по методу Лоури или Брэдфорда) и выравнивание ее в разных образцах путем разведения, что облегчает сравнение конечных результатов.

1.4.2 Гель-электрофорез

Гель-электрофорез – это метод, в котором заряженные молекулы разделяются в зависимости от физических свойств, таких как заряд или масса, с помощью электрического тока.

Наиболее распространенный способ разделения белков — электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS) по

Лэммли. SDS вызывает денатурацию белков и поддерживает их в денатурированном состоянии, для разрушения вторичных и третичных структур белков используют восстановители дисульфидных связей, например, дитиотреитол и меркаптоэтанол. Денатурированные полипептиды мигрируют в электрическом поле через акриламидный гель к аноду, при этом белки меньшего размера двигаются быстрее и, таким образом, разделяются в соответствии с молекулярной массой. Концентрация акриламида определяет разрешающую способность геля — чем выше концентрация акриламида, тем лучше разрешение низкомолекулярных белков. Низкая концентрация акриламида улучшает разрешающую способность для высокомолекулярных белков. Также возможно использование двухмерного электрофореза (2-D). В таком случае разделение белков производят в двух направлениях — в соответствии с их изоэлектрической точкой в первом направлении, и в соответствии с молекулярной массой — во втором.

Образцы на гель наносят в карманы. Как правило, одну из «дорожек» оставляют для маркеров молекулярной массы (смеси белков с известными массами). После подачи напряжения белки двигаются в электрическом поле с различной скоростью. Отличия в скорости продвижения — электрофоретической подвижности приводит к разделению белков на полосы.

1.4.3 Перенос на мембрану

Для вестерн-блоттинга используются микропористые поверхности и мембраны, изготовленные из нитроцеллюлозы (NC), поливинилидендифторида (PVDF) и нейлона. Уникальные свойства микропористых поверхностей, которые делают их пригодными для анализа Вестерн-блоттинга являются: высокая связывающая способность; кратко- и долгосрочное хранение иммобилизованных молекул; легкость обработки, позволяя в фазе раствора, взаимодействовать с иммобилизованными молекулами; отсутствие помех при детекции и воспроизводимости.

Как правило, эти микропористые поверхности используются в виде мембран или листов с толщиной 100 мкм и обладающего средним размером пор, который находится в пределах от 0,05 до 10 мкм в диаметре.

Нитроцеллюлоза (NC), пожалуй, самый универсальный из всех поверхностей, упомянутых ранее для иммобилизации белков, гликопротеинов, или нуклеиновых кислот. В 1979 г. Towbin Н. в первые предложил использовать NC для переноса белков. NC мембраны Protran производятся из 100% нитроцеллюлозы и обладают высокой связывающей способностью. В состав других NC мембран может входить ацетат целлюлозы, который уменьшает связывающую способность белков. В отличие от PVDF мембран, NC Protran не требуют предварительного увлажнения метанолом, что позволяет использовать для белков которые предпочитают водное окружение. NC мембраны Protran совместимы с различными методами определения включая хемилюминесцентные, изотопные, флуоресцентные и колориметрические методы. NC мембраны Protran имеют очень низкий фон. Уникальным свойством формулы нитроцеллюлозных мембран Protran является доказанный срок хранения связанных белков. На Protran эмпирически доказано, что белки создают условия для распознавания молекул в течение пяти лет.

Одним из очевидных недостатков NC является однократное использование из-за своей хрупкости. Так, например NC мембраны Optitran состоит 100% нитроцеллюлозы на полиэфирном каркасе, не влияющем на проницаемость мембраны и на результаты блоттинга, но делающем мембрану прочнее, что позволяет использовать мембрану Optitran многократно.

Одним из преимуществ PVDF мембраны высокая гидрофобность, чем у других мембран, что позволяет лучше удерживать адсорбированные белки. Так как PVDF мембраны обладают высокой гидрофобностью, они должны быть предварительно смочены в метаноле или этаноле, до погружения в буфер передачи. PVDF мембрана обладает повышенной прочностью, чем из нитроцеллюлозы, это дает возможность производить многократную очистку и повторное исследование. Имеет высокую чувствительность и низкий фон с

хемилюминесцентным и колориметрическим методами определения, который обеспечит чистый сигнал и четкую полосу.

Нейлоновые мембраны обладают отличной механической прочностью. Мембраны Nytran SPC с обеих сторон залиты подпорной матрицей, это дает мембране способность находиться в плоском состоянии без скручивания. Нейлон показывает большую способность к связыванию белка по сравнению с NC. Кроме того, нейлон предлагает преимущества более стабильных результатов передачи и значительно повышенную чувствительность по сравнению с другими мембранами. Этот эффект возможен благодаря дополнительной разности потенциалов, создаваемого положительным зарядом.

Устаревший способ переноса белков на мембрану, предполагает размещение мембраны поверх геля, а поверх неё кладут стопку фильтровальной бумаги. Всю стопку помещают в буфер для переноса, который продвигается вверх по бумаге под действием капиллярных сил, унося с собой белки. На практике этот метод не используется, так как он занимает слишком много времени, электроблоттинг является предпочтительным. Основными преимуществами электроблоттинга являются скорость и полнота передачи. В данном методе использует электрический ток, который переносит белки из геля на мембрану с сохранением своего расположения. Мембраны используют из-за их свойства неспецифично связывать белки. Связывание белков основано на гидрофобных взаимодействиях, а так же на электростатических взаимодействиях между мембраной и белком. Передача может выполняться как во влажных, так и в полусухих условиях. Полусухой блоттинг быстрее и проще, и требует намного меньше объема буфера, чем влажный блоттинг.

Эффективность электроблоттинга значительно повышается при использовании системы Trans-Blot Turbo, позволяющей существенно уменьшить время переноса белков из геля на мембрану, 7 минут вместо двух часов. Также к преимуществам данной системы относится высокая производительность, прибор состоит из двух кассет с независимым

управлением, что позволяет запускать два разных протокола и проводить перенос до 4-х гелей одновременно.

Эффективность переноса белков из геля на мембрану может быть проверена окрашиванием мембраны красителями Coomassie blue или Ponceau S. Предпочтительно используется краситель Ponceau S, который обладает большей чувствительностью и лучше растворим в воде, что упрощает последующую отмывку и нанесение антител.

1.4.4 Блокирование

Блокирование мембраны проводится с целью предотвращения неспецифического связывания первичных антител. В случае недостаточной блокировки мембраны возможно появление высокого уровня фона на дальнейших ступенях обработки. Для блокировки мембран используются различные реагенты, в том числе 3% желатин, 5% обезжиренное сухое молоко, 1% БСА, с небольшим процентом детергента типа Triton X-100 или Tween 20. Для блокировки положительно заряженных нейлоновых мембран обычно используется обезжиренное сухое молоко. Белок из разбавленного раствора прикрепляется к мембране во всех местах, где не прикрепился целевой белок. Поэтому, при добавлении антител, нет свободного места на мембране, куда бы они могли прикрепиться, кроме сайтов связывания на специфичных целевых белках.

1.4.5 Детекция

После блокирования разведенный раствор первичных антител (обычно между 0.5 и 5 мкг/мл) инкубируется с мембраной и слегка встряхивается. Обычно раствор состоит из буферного раствора соли с небольшим процентным содержанием детергента, иногда с БСА или сухим молоком. Например, блокирование БСА является предпочтительным с биотином, поскольку в молоке содержится казеин, который сам по себе является фосфопротеином и биотином. Поставив первичные антитела в растворе БСА, дает возможность повторно использовать, если пятно не дает хорошего результата. Раствор

антител и мембрана могут быть инкубированы от 30 минут до оставления на ночь, при различных температурах, при повышенной температуре наблюдается лучшее связывание — и специфичное (целевого белка) и неспецифичное («шум»).

Далее мембраны отмывают для удаления не связавшихся первичных антител, после этого выдерживают во вторичных антителах, напрямую связывающихся с класс-специфическими участками первичных антител. Антитела получают из животного источника или животных — источников культуры гибридом. Вторичные антитела обычно связывают с биотином или с репортёрным ферментом, таким как пероксидаза хрена или щелочная фосфатаза. Это значит, что несколько вторичных антител могут связываться с одним первичным и усиливать сигнал.

Наиболее распространенные, связанные с пероксидазой хрена вторичные антитела используются для разрезания хемилюминесцентного агента, и продукт реакции производит люминесцентное излучение пропорционально количеству белка. Лист светочувствительной фотографической пленки помещается напротив мембраны и подвергается действию излучения реакции, создавая изображение полос антител на блоте. Более дешевый, но менее чувствительный подход с использованием 4-хлоронафтольного окрашивания в смеси с 1 % перекисью водорода. Реакция пероксидного радикала с 4-хлоронафтолом дает темно-коричневое окрашивание, которое регистрируется без использования специальной фотографической пленки.

Другой метод детекции вторичными антителами использует антитела со связанным флюорофором, который излучает в ближней инфракрасной области. Свет, излучаемый флюоресцентным красителем, постоянен и делает флюоресцентную детекцию более точным и чувствительным способом измерения разницы в сигнале, производимом белками, которые мечены антителами, на вестерн блоте. Белки могут быть определены количественно, так как сигнал рассчитывается как разница (излучения) по отношению ко всем

белкам на мембране, измеренном в покое, к (излучению) хемилюминесценции, которая измеряется в динамике.

Третий альтернативный метод использует радиоактивную метку вместо фермента, связанного с вторичным антителом, такую как меченный антителом связывающий белок типа Белка А *Staphylococcus* с радиоактивным изотопом йода. Другие методы безопаснее, быстрее и дешевле, поэтому радиоактивная детекция используется редко.

На сегодняшний день созданы автоматизированные системы для идентификации белков, которые позволяют экономить время в несколько раз чем, если бы проводилось вручную. iBind™ Western Device – высокочувствительная автоматизированная система для проведения Вестерн-блоттинга. Блокирование, первичное и вторичное связывание антител и все этапы отмывки проходят автоматически за счет технологии последовательного латерального потока (SLF). SLF обеспечивает своевременную доставку первичных и вторичных антител за счет механического давления, оказываемого на карту iBind™ Card. Стекловолокно в карте iBind™ Card позволяет антителам и промывочным растворам поступать на вестерн-мембрану с постоянной скоростью. Абсорбирующий стек, прикрепленный к одному из концов iBind™ Card, оттягивает ток жидкости, распространяя ее по карте и по мембране. Прибор iBind™ Western Device обеспечивает полную автоматизацию процесса, а также высокую его чувствительность и воспроизводимость по сравнению с традиционными методами вестерн-блота, проводимыми вручную, и при этом не требует никаких внешних источников энергии.

1.4.6 Анализ

После отмывки не связавшихся меток, вестерн блот готов к детекции зондов, связавшихся с целевым белком. На практике, белки обнаруживают лишь по одному бэнду на мембране. Приблизительный размер вычисляют сравнивая окрашенные бэнды с маркерами молекулярной массы, добавленными при электрофорезе. Процесс повторяют со структурными белками, такими как

тубулин или актин, которые не меняют между экспериментами. Количество целевого белка зависит от количества контрольного структурного белка между группами. Этот прием обеспечивает коррекцию количества общего белка на мембране в случае ошибки или неполного переноса.

1.4.7 Колориметрическая детекция

Метод колориметрической детекции основан на инкубации вестерн блота с субстратом, который реагирует с репортерным ферментом (таким как пероксидаза хрена), «сидящем» на вторичном антителе. Растворимый краситель переходит в нерастворимую форму другого цвета, осаждаясь рядом с ферментом и окрашивая мембрану. Рост пятна ограничивается смыванием растворимого красителя. Уровень количества белка оценивается денситометрически по интенсивности окрашивания или спектрофотометрически.

1.4.8 Хемилюминесцентная детекция

Метод хемилюминесцентной детекции основывается на инкубации мембраны с субстратом, который люминесцирует после взаимодействия с репортером вторичного антитела. Свет регистрируется фотопленкой или CCD-камерой, которая производит цифровую съемку вестерн блота. Изображение анализируется денситометрически, оценивая относительное количество окрашенного белка и даёт количественный результат в единицах оптической плотности. Новое программное обеспечение позволяет провести дальнейший анализ данных, например, определить молекулярный вес, если использовался соответствующий стандарт.

1.4.9 Радиоактивная детекция

Медицинскую радиографическую плёнку помещают напротив вестерн блота, давая ей возможность взаимодействовать с радиоактивными метками и создавая тёмные участки, которые соответствуют полосам исследуемого белка. Востребованность методов радиоактивной детекции снижается из-за их

дороговизны, высокого риска для здоровья и безопасности и альтернатив, предоставляемых ECL.

1.4.10 Флюоресцентная детекция

Флюоресцентные метки возбуждаются светом и излучают более длинноволновый свет, регистрируемый фотосенсорами, такими как CCD-камера, снабженная соответствующими фильтрами эмиссии. Камера делает цифровой снимок вестерн блота, позволяя проводить дальнейший анализ полученных данных, такой как анализ молекулярного веса и количественный вестерн блот анализ.

1.4.11 Система оптимизации вестерн-блоттинга

Система для вестерн-блоттинга Amersham (Amersham WB) представляет собой полностью интегрированную систему для проведения SDS-электрофореза и вестерн-блоттинга белков с флюоресцентной детекцией. Каждый этап процесса стандартизирован, контролируется системой. Amersham WB разработан для получения количественно измеримых данных для каждого образца. Реагенты для предварительной и вторичной маркировки антител, а также гелевая карта системы Amersham WB и мембранная карта (PVDF) обеспечивают воспроизводимость результатов и удобство управления процессом вестерн-блоттинга.

Ключевые функции и преимущества:

- встроенная система вестерн-блоттинга со стандартизированными протоколами сводит к минимуму вариативность получаемых результатов на каждом этапе;
- специально разработанные расходные материалы и реагенты обеспечивают высокое качество и воспроизводимость;
- оптимизированная предварительная маркировка образцов при помощи CyTM5 NHS обеспечивает уже доказанную производительность без загрязнения геля;

- надежная нормализация для мультиплексированных целей и контроля флюоресцентных сигналов в одном и том же блоте;
- процесс вестерн-блоттинга, завершаемый менее чем за 4 часа, позволяет быстро получать неопровержимые данные;
- программное обеспечение для управления системой и оценки данных предоставляет вам полный контроль над системой;
- система Amersham WB состоит из анализатора, ПО и расходных материалов для электрофореза и вестерн-блоттинга.

Анализатор Amersham WB Анализатор Amersham WB состоит из двух блоков: один для проведения электрофореза и сканирования, а второй — для полного цикла вестерн-блоттинга. Блок для электрофореза и сканирования используется для разделения обработанных додецилсульфатом натрия белков в полиакриламидном геле. Он также используется для сканирования гелей после электрофореза и поливинилиденных (PVDF) карт после взятия проб и сушки при проведении вестерн-блоттинга. Блок вестерн-блоттинга используется для: передачи разделенных в геле белков на PVDF-мембрану; взятия проб белков на мембране с первичными и вторичными антителами, сопряженными с CyDye™; высушивания PVDF-карт (перед сканированием в блоке для электрофореза). После завершения процесса результаты автоматически сканируются и анализируются.

2 ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследование было включено 49 больных раком эндометрия, находившихся на стационарном лечении ФГБУ «Томского НИИ онкологии» СО РАМН.

2.1. Клиническая характеристика больных

Все больные раком эндометрия в зависимости от наличия метаболического синдрома были разделены на две группы:

I группа – больные РЭ на фоне метаболического синдрома (33 человека), средний возраст которых составил $60,75 \pm 1,76$ года. Данная группа была составлена с учетом рекомендаций International Diabetes Federation (2005).

II группа – больные РЭ без метаболических нарушений (16 человек), средний возраст которых составил $52,69 \pm 3,2$ года.

Исследование антропометрических показателей включало: измерение роста, веса, окружности талии и окружности бедер. Оценка степени ожирения проводилась на основании расчета индекса массы тела по стандартной формуле. Оценка состояния углеводного и липидного обмена включала исследование уровня глюкозы глюкозооксидазным методом, общего холестерина, ЛПВП и ТГ с использованием реактивов фирмы Human (Германия) и ThermoScientific (Финляндия).

Уровень экспрессии IGFBP-6 в ткани рака и прилежащей нормальной ткани оценен с помощью метода Вестерн блоттинг с использованием коммерческих антител (Abcam) со стандартизацией результатов относительно содержания белка и экспрессии бета-актина (Santa Cruz, USA).

2.2. Методы исследования

Для молекулярных исследований были использованы опухолевые и нормальные (расположенные на расстоянии 10-20 см от опухоли) образцы тканей пациентов, полученные при проведении оперативного вмешательства. Для выделения ДНК и РНК образцы опухоли помещали в раствор RNeasy (Qiagen, USA) и сохраняли при температуре -80°C (после 24-часовой

инкубации при +4°C). Для процедуры Вестерн-блоттинг образцы тканей замораживали и хранили при температуре –80°C.

2.2.1. Получение супернатантов тканей для Вестерн блоттинг анализа

Замороженную ткань (около 100 мг) гомогенизировали в жидком азоте на микродисмембраторе, затем ресуспендировали в 300 мкл 50 mM Tris-HCl-буфера (pH 7,5), содержащего 100 mM хлорида натрия, 5 mM хлорида магния, 2 mM АТР, 1 mM дитиотреитол и 1mM EDTA. Гомогенат центрифугировали в течение 20 мин при 10 000 об/мин и 4°C. Аспирировали и аликвотировали полученные супернатанты.

Далее приготовленные супернатанты тканей (100 мкл) развели в 50 мкл 2XSLB-буфера, содержащего 1,5 мл Tris-буфера (pH 6,8), 2 мг DTT, 2 мл DDS, 1 мл глицерина, 2 мг Bromophenol blue, 5,5 мл воды (*при условии, что концентрация белка в пробе составила 3-4 г/л*). Супернатанты пригодны для Вестерн-блоттинг анализа.

2.2.2. Определение содержания белка в образце по методу Лоури

Реактивы:

1. Реактив А. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 2 г карбоната натрия, растворяют в 0,1 М растворе гидроксида натрия и доводят объём до метки этим же раствором.
2. Реактив Б. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 0,5 г сульфата меди и растворяют в 1 % растворе калия-натрия тартрата.
3. Реактив В. Перед анализом смешивают 50 мл реактива А и 1 мл реактива Б.

Ход работы:

К 1 мл исследуемого образца прибавляют 5 мл реактива В. Содержимое пробирки перемешивают и оставляют на 10 мин при комнатной температуре. Затем в каждую пробирку прибавляют 0,5 мл реактива Фолина, разбавленного перед употреблением водой в 2 раза, быстро и тщательно перемешивают и оставляют на 30 мин при комнатной температуре. Измеряют оптическую

плотность испытуемого раствора на спектрофотометре при длине волны 750 нм в кюветах с толщиной слоя 10 мм.

2.2.3. Электрофорез белков в полиакриламидном геле по Лемли

Приготовленные SLB-пробы прогреть в термостате при 95°C в течение 10 минут. Приготовить разрешающий и концентрирующий гели.

Таблица 5. Состав разрешающего и концентрирующего гелей.

Реагенты	Разрешающий гель	Концентрирующий гель
H ₂ O дистиллированная	2,72 мл	2,1 мл
30% акриламид	3,33 мл	500 мкл
Tris-буфер (pH 8,8)	3,75 мл	-
Tris-буфер (pH 6,8)	-	375 мкл
10% DDS-Na	100 мкл	30 мкл
ПСА	100 мкл	30 мкл
TEMED	8 мкл	3 мкл

Буфер для проведения электрофореза белков: 10XTGB-буфер: 30,3 г Tris, 144 г глицина, 10 г DDS-Na на 1 литр дистиллированной воды. Хранить при 4°C. Необходимо развести водой в 10 раз перед использованием.

Подготовить стекла, залить разрешающий гель до метки. Визуализировать полимеризацию геля, залить концентрирующий гель, вставить гребенку. Визуализировать полимеризацию концентрирующего геля. Убрать гребенку. Залить в карманы, денатурированные супернатанты по 10 мкл. Поместить гели в электрофоретическую камеру. Камеру заполнить 10XTGB-буфером и выбрать параметры для электрофореза: напряжение – 250 мВ, сила

тока - 350 мА, время – 1 час. Визуализировать прохождение электрофореза белков.

2.2.4. Электроблоттинг – перенос белков на мембрану

После электрофореза осуществляли перенос полипептидов на PVDF-мембрану (Immobilon, Millipore, США), с помощью Bio-Rad Mini Trans-Blot. Для этого отрезали концентрирующий гель, ненужные участки геля, и правый верхний угол и смочили в TS-буфере, состоящим из 5,8 г Tris-HCl, 2,9 г глицина в 100 мл этанола и 900 мл дистиллированной воды. PVDF-мембрану инкубировали в течение 10 мин в этаноле. Для каждого геля приготовили 8 листов бумаги Whatman 3MM, вырезанные по размеру геля 6,5×9,5 и смоченные в TS-буфере. Собирали установку для электроблоттинга: на нижнюю анодную пластину уложили бумагу, затем PVDF-мембрану, сверху гель, который накрыли оставшимися четырьмя листами бумаги и закрыли катодной пластиной. Для удаления пузырьков воздуха каждый слой аккуратно разглаживают ролик, смоченным в буфере для переноса. Поместить установку в электрофоретическую камеру. Камеру заполнить TS-буфером и выбрать параметры для электроблоттинга: напряжение – 100 мВ, сила тока - 350 мА, время – 1 час. После электроблоттинга ополоснуть мембрану в TBS-буфере с Tween-20, состоящим 500 мл TBS и 500 мкл Tween-20.

2.2.5. Проведение и регистрация вестерн-блот гибридизации

Мембраны с иммобилизованными белками предварительно инкубируют в течение 12 часов при 4°C в блокирующем растворе, содержащем TBS-буфер с Tween-20, 5% сухое обезжиренное молоко и блокирующий агент (anti-human anti-IGFBP-6) в концентрации 1-5 мкг/мл (Abcam, UK). После этого для удаления первичных не связавшихся антител мембраны промывают несколько раз 10 mM Tris-HCl буфером (pH=7,5) и 150 mM NaCl. Затем инкубируют в блокирующем буфере с вторичными антителами (anti-mouse) конъюгированными с ферментом пероксидазой хрена, разведенными в соотношении 1:10000, в течение 1 часа при комнатной температуре. Не

связавшиеся вторичные антитела удаляют повторным промывание буфера без блокирующего агента. После отмывки мембрану подвергали стандартной обработке системой хемилюминесцентной детекции ECL (GE Healthcare, Великобритания). Плотность полос оценивали с помощью компьютерной программы «ImageJ». Стандартизация проводилась относительно β -актина. Результаты выражали в процентах от содержания субъединиц протеасом в неизменной ткани

2.2.6 Методы статистической обработки результатов исследования

Статистическая обработка выполнена при помощи пакета программ Statistica 10.0. Все количественные данные представлены в таблицах в виде Me (25%-75%), где – Me – медиана выборки, (25%-75%) – квартили. Достоверность различий проверяли при помощи U-критерия Уилкоксона-Манна-Уитни (в случае независимых совокупностей). Различия считали достоверными при $p < 0,05$. Корреляционный анализ данных выполнен с расчетом коэффициентов корреляции Спирмена (R), анализировались только значимые корреляционные связи ($p < 0,05$).

4 ФИНАНСОВЫЙ МЕНЕДЖМЕНТ, РЕСУРСОЭФФЕКТИВНОСТЬ И РЕСУРСОСБЕРЕЖЕНИЕ

Целью данной работы является изучить особенности системы инсулиноподобных факторов роста в опухолевой ткани у больных раком эндометрия в зависимости от наличия и выраженности метаболического синдрома, с помощью медицинского биотехнологического метода вестерн-блоттинга.

Целью данного раздела является оценка коммерческого и инновационного потенциала научно-технического исследования (НТИ), планирование процесса управления НТИ, определение ресурсной, финансовой, экономической эффективности.

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

4.1 Предпроектный анализ

4.1.1 Потенциальные потребители результатов исследования

Потенциальными потребителями результатов исследования являются научно-исследовательские лаборатории, ведущие разработки в области лечения онкологических заболеваний. Полученные данные о белках, содержащихся в опухолевых клетках, может оказаться полезным для создания новых подходов в диагностике, а также значительно расширит понимание патогенетических механизмов развития онкологических заболеваний. Так же потенциальными потребителями могут быть различные базы данных, хранящие и предоставляющие информацию о идентифицированных белках в тканях опухоли. Новая информация о белках, поможет развитию других научных проектов.

4.1.2 SWOT-анализ

SWOT-анализ – представляет собой комплексный анализ научно-исследовательского проекта. SWOT-анализ применяют для исследования внешней и внутренней среды проекта.

Таблица 10 – Матрица SWOT

	Сильные стороны научно-исследовательского проекта: С1. Заявленная экономичность и ресурсоэффективность технологии. С2. Наличие бюджетного финансирования С3. Наличие необходимого оборудования. С4. Минимальное количество отходов производства	Слабые стороны научно-исследовательского проекта: Сл1. Высокая цена на реактивы и оборудование Сл2. Большой срок поставок реактивов используемых при проведении научного исследования
Возможности: В1. Использование инновационной инфраструктуры НИ ТПУ В2. Сотрудничество с Томским НИИ онкологии В3. Появление дополнительного спроса на новый продукт В4. Развитие данных разработок В5. Участие в грантах	В1С2 В2С1С2С3С4 В3С1С3 В4С1С2С3С4 В5С1С2С3С4	В1Сл1Сл2 В2Сл1Сл2 В3Сл1Сл2 В4Сл1Сл2 В5Сл1Сл2
Угрозы: У1. Развитая конкуренция технологий производства У2. Несвоевременное финансовое обеспечение исследования со стороны государства	У1С2С3С4 У2С1	У1Сл1Сл2 У2Сл1Сл2

Второй этап состоит в выявлении соответствия сильных и слабых сторон научно-исследовательского проекта внешним условиям окружающей среды. Это соответствие или несоответствие должны помочь выявить степень необходимости проведения стратегических изменений. Пример интерактивной матрицы проекта представлен в таблице 11.

Таблица 11 - Интерактивная матрица проекта

Сильные стороны проекта					
Возможности проекта		C1	C2	C3	C4
	B1	0	+	+	0
	B2	+	+	+	+
	B3	+	0	0	0
	B4	+	+	+	+
	B5	+	+	+	+
Угрозы проекта	У1	-	-	-	+
	У2	+	-	-	-
Слабые стороны проекта					
Возможности проекта		Сл1	Сл2		
	B1	-	-		
	B2	+	+		
	B3	-	+		
	B4	+	+		
	B5	+	+		
Угрозы проекта	У1	+	+		
	У2	-	+		

В рамках **третьего этапа** составлена итоговая матрица SWOT-анализа, которая приводится ниже (Таблица 12).

Таблица 12 - SWOT-анализ

	Сильные стороны научно-исследовательского проекта:	Слабые стороны научно-исследовательского проекта:
	C1. Заявленная экономичность и ресурсоэффективность технологии C2. Наличие бюджетного финансирования C3. Наличие необходимого оборудования. C4. Минимальное количество отходов производства	Сл1. Высокая цена на реактивы и оборудование Сл2. Большой срок поставок реактивов используемых при проведении научного исследования

Продолжение таблицы 12		
Возможности: В1. Использование инновационной инфраструктуры НИ ТПУ В2. Сотрудничество с Томским НИИ онкологии В3. Появление дополнительного спроса на новый продукт В4. Развитие данных разработок В5. Участие в грантах	В связи с уникальными свойствами разработки (экологичность, простота использования, и т.д.) у нее есть шансы выйти на зарубежный рынок. Есть необходимость заинтересовать инвесторов, чтобы данная разработка нашла практическое применение в промышленности.	Несмотря на достоинства разработки и на наличие возможностей ее реализации, она не развита на рынке из-за наличия альтернативных разработок. Соответственно, из-за незаинтересованности потенциальных потребителей отсутствует финансирование и необходимое оборудование для дальнейшего развития.
Угрозы: У1. Развитая конкуренция технологий производств У2. Несвоевременное финансовое обеспечение исследования со стороны государства	Следует усиленно продвигать разработку с целью создания спроса.	Следует выработать маркетинговую стратегию в области продвижения разработки на рынок.

При анализе данной интерактивной таблицы можно выявить, что коррелирующих слабых сторон нет.

Проведен комплексный анализ научно-исследовательского проекта. Самой большой угрозой для проекта является отсутствие спроса, что на данном этапе не прогнозируется, поскольку данное исследование актуально для прогнозирования течения рака эндометрия и колоректального рака.

Что касаясь слабых сторон, то для данного метода, требуется привлечение опытных кадров, нужно обучение нового персонала в области онкологии, биохимии, клеточной биотехнологии.

4.2 Планирование работ по НТИ

В данном разделе составлен перечень этапов и работ в рамках проведения научного исследования, проведено распределение исполнителей по видам работ представленных в таблице 13.

Таблица 13 – Перечень этапов, работ и распределение исполнителей

Основные этапы	№ раб	Содержание работ	Должность исполнителя
Разработка технического задания	1	Составление и утверждение технического задания	Руководитель
Выбор направления исследований	2	Подбор и изучение материалов по теме	Руководитель, дипломник
Теоретические и экспериментальные исследования	3	Проведение теоретических расчетов и обоснований	Дипломник
	4	Построение макетов (моделей и методик) и проведение экспериментов	Руководитель, дипломник
	5	Получение супернатантов тканей для Вестерн блоттинг анализа	Дипломник
	6	Определение содержания белка в образце по методу Лоури	Дипломник
	7	Электрофорез белков в полиакриламидном геле по Лемли	Дипломник
	8	Электроблоттинг – перенос белков на мембрану	Дипломник
	9	Проведение и регистрация вестерн-блот гибридизации	Дипломник, руководитель
	10	Обработка полученных данных	Руководитель, дипломник
	11	Сопоставление результатов экспериментов с теоретическими исследованиями	Дипломник
Обобщение и оценка результатов	12	Анализ полученных результатов, выводы	Дипломник
	13	Оценка эффективности полученных результатов	Руководитель
	14	Определение целесообразности проведения ОКР	Руководитель
<i>Проведение ОКР</i>			
Оформление отчета по НИР (комплекта документации по ОКР)	15	Составление пояснительной записки (эксплуатационно-технической документации)	Дипломник, руководитель

4.3 Определение трудоемкости выполнения работ

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

Трудоемкость выполнения научного исследования оценивается экспертным путем в человеко-днях и носит вероятностный характер, т.к. зависит от множества трудно учитываемых факторов. Для определения ожидаемого (среднего) значения трудоемкости $t_{ожі}$ используется следующая формула:

Ожидаемая трудоемкость выполнения:

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

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

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

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

Исходя из ожидаемой трудоемкости работ, определяется продолжительность каждой работы в рабочих днях T_p , учитывающая параллельность выполнения работ несколькими исполнителями.

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

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

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

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

4.4 Разработка графика проведения научного исследования

Для разработки графика проведения научного исследования наиболее удобным и наглядным является построение ленточного графика проведения научных работ в форме диаграммы Ганта.

Для удобства построения графика, длительность каждого из этапов работ из рабочих дней перевели в календарные дни. Для этого воспользовались формулой:

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

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

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

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

Коэффициент календарности определяется по следующей формуле:

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

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

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

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

Все рассчитанные значения внесли в таблицы 14 и 15.

Таблица 14 – Временные показатели проведения научного исследования

№	Наименование работ	Трудоемкость работ									Исполнители		
		t _{min} , чел-дни			t _{max} , чел-дни			t _{ожг} , чел-дни					
		Исп.1	Исп.2	Исп.3	Исп.1	Исп.2	Исп.3	Исп.1	Исп.2	Исп.3	Исп.1	Исп.2	Исп.3
1	Составление и утверждение технического задания	1	1	1	5	5	5	2,6	2,6	2,6	Р	Р	Р
2	Подбор и изучение материалов по теме	3 3	3 3	3 3	5 5	5 5	5 5	3,8 3,8	3,8 3,8	3,8 3,8	Р Д	Р Д	Р Д
3	Проведение теоретических расчетов и обоснований	30	40	20	90	90	60	54	60	36	Д	Д	Д
4	Построение макетов (моделей и методик) и проведение экспериментов	60 20	70 25	40 15	90 45	90 45	70 35	84 30	90 33	52 23	Д Р	Д Р	Д Р
5	Получение супернатантов тканей для Вестерн блоттинг анализа	14	14	14	30	30	30	20,4	20,4	20,4	Д	Д	Д
6	Определение содержания белка в образце по методу Лоури	5	5	5	7	7	7	5,8	5,8	5,8	Д	Д	Д
7	Электрофорез белков в ПААГ по Лемли	1	1	1	3	3	3	1,4	1,4	1,4	Д	Д	Д
8	Электроблот-тинг – перенос белков на мембрану	3	3	3	7	7	7	4,6	4,6	4,6	Д	Д	Д
9	Проведение и регистрация вестерн-блот гибридизации	5 5	5 5	5 5	14 14	14 14	14 14	8,6 8,6	8,6 8,6	8,6 8,6	Д Р	Д Р	Д Р
10	Обработка полученных данных	14 5	14 5	14 5	30 14	30 14	30 14	20,4 8,6	20,4 8,6	20,4 8,6	Д Р	Д Р	Д Р
11	Сопоставление результатов экспериментов с теоретическими исследованиями	4	4	4	7	7	7	5,2	5,2	5,2	Д	Д	Д

Продолжение таблицы 14													
12	Анализ полученных результатов, выводы	1 1	1 1	1 1	2 2	2 2	2 2	1,4 1,4	1,4 1,4	1,4 1,4	Д Р	Д Р	Д Р
13	Оценка эффективности полученных результатов	5	5	5	7	7	7	5,8	5,8	5,8	Р	Р	Р
14	Определение целесообразности проведения ОКР	1	1	1	2	2	2	1,4	1,4	1,4	Р	Р	Р
15	Составление пояснительной записки (эксплуатационно-технической документации)	14 5	14 5	14 5	30 14	30 14	30 14	20,4 8,6	20,4 8,6	20,4 8,6	Д Р	Д Р	Д Р

Р – руководитель

Д – дипломник

Таблица 15 – Временные показатели проведения научного исследования

№	Наименование работ	Длительность работ в рабочих днях, Т _{рi}			Длительность работ в календарных днях, Т _{кi}			Исполнители		
		Исп.1	Исп.2	Исп.3	Исп.1	Исп.2	Исп.3	Исп.1	Исп.2	Исп.3
1	Составление и утверждение технического задания	2,6	2,6	2,6	4	4	4	Р	Р	Р
2	Подбор и изучение материалов по теме	1,9 1,9	1,9 1,9	1,9 1,9	3 3	3 3	3 3	Р Д	Р Д	Р Д
3	Проведение теоретических расчетов и обоснований	54	60	36	80	89	53	Д	Д	Д
4	Построение макетов (моделей и методик) и проведение экспериментов	42 15	45 16,5	26 11,5	62 22	67 24	38 17	Д Р	Д Р	Д Р
5	Получение супернатантов тканей для Вестерн блоттинг анализа	20,4	20,4	20,4	30	30	30	Д	Д	Д
6	Определение содержания белка в образце по методу Лоури	5,8	5,8	5,8	9	9	9	Д	Д	Д

Продолжение таблицы 15										
7	Электрофорез белков в ПААГ по Лемли	1,4	1,4	1,4	2	2	2	Д	Д	Д
8	Электроблот-тинг – перенос белков на мембрану	4,6	4,6	4,6	7	7	7	Д	Д	Д
9	Проведение и регистрация вестерн-блот гибридизации	4,3 4,3	4,3 4,3	4,3 4,3	6 6	6 6	6 6	Д Р	Д Р	Д Р
10	Обработка полученных данных	10,2 4,3	10,2 4,3	10,2 4,3	15 6	15 6	15 6	Д Р	Д Р	Д Р
11	Сопоставление результатов экспериментов с теоретическими исследованиями	5,2	5,2	5,2	8	8	8	Д	Д	Д
12	Анализ полученных результатов, выводы	0,7 0,7	0,7 0,7	0,7 0,7	1 1	1 1	1 1	Д Р	Д Р	Д Р
13	Оценка эффективности полученных результатов	5,8	5,8	5,8	8	8	8	Р	Р	Р
14	Определение целесообразности проведения ОКР	0,7 0,7	0,7 0,7	0,7 0,7	1 1	1 1	1 1	Д Р	Д Р	Д Р
15	Составление пояснительной записки (эксплуатационно-технической документац ии)	10,2 4,3	10,2 4,3	10,2 4,3	15 6	15 5	15 6	Д Р	Д Р	Д Р

В 2016 г. при шестидневной рабочей неделе с одним выходным днем будет 294 рабочих дня, включая 48 дней отпуск, 46 выходных и 12 дней нерабочих праздничных. Норма рабочего времени в 2016 г. составит: при 48-часовой рабочей неделе — 2352 часа.

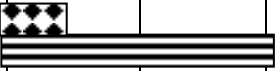
4.5 Календарный план-график выполнения дипломной работы

Календарный план-график – это графическое изображение взаимосвязи событий и работ, имеющих место в процессе проведения исследований.

Календарный план-график составляется на основе таблицы 14 и 15 с целью правильной организации и контроля выполнения работы, а также для рационального использования времени, отводимого на выполнение

дипломной работы. График строится для максимального по длительности исполнения работ в рамках научно-исследовательского проекта с разбивкой по месяцам за период времени дипломирования. Работы на графике выделили различной штриховкой в зависимости от исполнителей, ответственных за ту или иную работу.

Календарный план-график проведения НИОКР по теме

№ работ	Вид работ	Исполнители	T _{кi} , кал. дн.	Продолжительность выполнения работ									
				сент.	окт.	нояб.	дек.	янв.	февр.	март	апрель	май	июнь
1	Составление и утверждение технического задания	Руководитель	4										
2	Подбор и изучение материалов по теме	Руководитель, дипломник	3										
3	Проведение теоретических расчетов и обоснований	Дипломник	80										
4	Построение макетов (моделей и методик) и проведение экспериментов	Руководитель, дипломник	67										
5	Получение супернатантов тканей для Вестерн блоттинг анализа	Дипломник	30										
6	Определение содержания белка в образце по методу Лоури	Дипломник	9										
7	Электрофорез белков в ПААГ по Лемли	Дипломник	2										
8	Электроблоттинг – перенос белков на мембрану	Дипломник	7										
9	Проведение и регистрация	Дипломник, руководитель	6										

	вестерн-блот гибридизации												
10	Обработка полученных данных	Дипломник, руководитель	15										
11	Сопоставление результатов экспериментов с теоретическими исследованиями	Дипломник	8										
12	Анализ полученных результатов, выводы	Дипломник, руководитель	1										
13	Оценка эффективности полученных результатов	руководитель	8										
14	Определение целесообразности проведения ОКР	Руководитель	1										
15	Составление пояснительной записки (эксплуатационно- технической документации)	Дипломник, руководитель	15										



Руководитель



Дипломник

Исходя из SWOT – анализа был разработан план научного исследования, который состоит из 4 основных этапов. На основании планирования научного исследования (НИ) была составлена рабочая группа НИ, распределены работы для исполнителей НИ, определена трудоемкость выполнения работ и составлен календарный план-график проведения НИОКР.

4.6 Бюджет научно-технического исследования (НТИ)

4.6.1 Расчет материальных затрат НТИ

Данная статья включает стоимость всех материалов, используемых при разработке проекта:

Расчет материальных затрат осуществляется по следующей формуле:

$$Z_m = (1 + k_T) \cdot \sum_{i=1}^m C_i \cdot N_{расхi}, \quad (5)$$

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

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

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

k_T – коэффициент, учитывающий транспортно-заготовительные расходы.

Материальные затраты, необходимые для данной разработки, заносятся в таблицу 16.

Таблица 16 – материальные затраты

Наименование	Единица измерения	Количество	Цена за ед. (мл, г), руб.	Затраты на материалы, руб.
Акриламид	г	10	5	500
Дитиотреитол	г	5	136	680
Трис-HCL	г	100	5,6	560
DDS-Na	г	10	2,4	24
Хлорид магния	г	5	0,035	0,175
Хлорид натрия	г	5	0,02	0,1

Продолжение таблицы 16				
Карбонат натрия	г	2	0,075	0,15
Гидроксид натрия	г	25	0,135	3,375
Калия-натрия тетрат	г	50	0,01	0,5
Сульфат меди	г	0,5	0,25	0,125
ПСА	г	10	0,2	2
Bromephenol blue	г	2	406	812
ТЕМЕД	мл	5	21	105
Tween-20	мл	10	12,4	124
Этанол	мл	1000	0,07	70
Глицерин	мл	20	0,07	14
ЭДТА	мл	5	24	120
АТР	мл	1	2597	2597
раствор RNAlater	мл	25	595,12	14 878
Всего за материалы				29 756

4.6.2 Расчет затрат на оборудование для научно-экспериментальных работ

В данную статью включают все затраты, связанные с приобретением специального оборудования. Определение стоимости спецоборудования производится по действующим прейскурантам. Расчет затрат по данной статье заносится в таблицу 17. Стоимость оборудования имеющегося в научно-технической организации, учитываем в калькуляции в виде амортизационных отчислений которые вычисляются по формуле:

$$E_{\text{ам}} = (\sum K_{\text{об}i} * H_{\text{ам}i} * T_{\text{об}i}) / (365 * 100) , \quad (6)$$

где $K_{\text{об}i}$ – стоимость ед. прибора или оборудования, руб.;

$H_{\text{ам}i}$ – норма амортизации прибора или оборудования, %;

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

Все расчеты по оборудованию, имеющегося в организации, но используемого для каждого исполнения конкретной темы, сводятся в таблицу 18.

Таблица 17 – Расчет бюджета затрат на приобретение спецоборудования для научных работ

№ п/п	Наименование оборудования	Кол-во единиц оборудования	Цена единицы оборудования, руб.	Общая стоимость оборудования, руб.
1	Пробирка Эппендорф 1,5 мл	1000	1,15	1150
2	Наконечники с фильтром 0,5-10 мкл, стерильные	1000	0,317	317
3	Наконечники 5-200 мкл, универсальные	1000	0,285	285
4	Мерная колба 100 мл	2	80	160
5	Пробирки полимерные 10 мл	200	2,64	528
6	Стакан 50 мл	2	91	182
7	Иммун-Блот мембраны PVDF	5	820	4100
8	Бумага Whatman 3ММ	30	23,2	696
9	Набор RNeasy mini Kit	1	7 980	7 980
10	Набора Thermo Scientific RevertAid First Strand cDNA Synthesis kit	1	11 235	11 235
Итого				26 633

Таблица 18 – Расчет бюджета затрат имеющегося спецоборудования

№ п/п	Наименование оборудования	Кол-во единиц оборудования	Цена единицы оборудования, руб.	Сумма амортизацион- ных отчислений, руб.
1	Центрифуга с охлаждением типа Eppendorf	1 шт	121 446	2 229,28
2	Камера для блоттинга Mini Trans-Blot	1 шт	69 945	172,47
3	Источник питания PowerPack Basic	1 шт	51 910	128
4	Электронные весы E-200	1 шт	25 200	462,57
5	Аквадистилятор ДЭ-4-2М	1 шт	19 467	357,34
6	Термостат лабораторный СН-100	1 шт	35 029	643
7	Дозатор Экохим ОП-0,5-10	1 шт	7 820	143,54
8	Дозатор Экохим ОП-5-50	1 шт	7 820	143,54
9	Дозатор Экрос ОП-20-200	1 шт	10 350	189,99
10	Амплификатор iCycler (Bio- Rad, USA)	1 шт	255 372	489,75
11	Спектрофотоме тр Unico 2800	1 шт	320 000	789,04
12	Спектрофотоме тр NanoDrop 2000 C (Thermo Scientific, USA)	1 шт	1 224 707	2 348,75
Всего за оборудование			2 149 066	8 097,27

В процессе выполнения работ для выделения и идентификации белков было задействовано оборудование, находящиеся на балансе НИИ онкологии Томск.

4.6.3 Основная заработная плата исполнителей темы

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

$$З_{зп} = З_{осн} + З_{доп}, \quad (7)$$

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

$З_{доп}$ – дополнительная заработная плата (12% от $З_{осн}$).

Основная заработная плата ($З_{осн}$) рассчитывается по следующей формуле:

$$З_{осн} = З_{дн} \cdot T_p, \quad (8)$$

$$З_{осн.д} = 203,58 \cdot 260 = 52\,930,8 \text{ руб.}$$

$$З_{осн.р} = 1\,174,52 \cdot 63 = 73\,994,6 \text{ руб.}$$

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

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

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

Среднедневная заработная плата рассчитывается по формуле:

$$З_{дн} = \frac{З_m \cdot M}{F_d}, \quad (9)$$

$$З_{дн.д} = 5070 \cdot 10,4 / 259 = 203,58 \text{ руб.}$$

$$З_{дн.р} = 29\,250 \cdot 10,4 / 259 = 1\,174,52 \text{ руб.}$$

где $З_m$ – месячный должностной оклад работника, руб.;

M – количество месяцев работы без отпуска в течение года:

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

F_d – действительный годовой фонд рабочего времени научно-технического персонала, раб. дн. (таблица 19)

Таблица 19 – Баланс рабочего времени

Показатели рабочего времени	Руководитель	Дипломник
Календарное число дней	365	365
Количество нерабочих дней		
- выходные дни	46	46
- праздничные дни	12	12
Потери рабочего времени		
- отпуск	48	48
- невыходы по болезни	0	0
Действительный годовой фонд рабочего времени	259	259

Месячный должностной оклад работника:

$$З_m = З_{tc} \cdot (1 + k_{пр} + k_d) \cdot k_p, \quad (10)$$

$$З_{м.д} = 2\,600 \cdot (1 + 0,3 + 0,2) \cdot 1,3 = 5070 \text{ руб.}$$

$$З_{м.р} = 15\,000 \cdot (1 + 0,3 + 0,2) \cdot 1,3 = 29\,250 \text{ руб.}$$

где $З_{tc}$ – заработная плата по тарифной ставке, руб.;

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

k_d – коэффициент доплат и надбавок составляет примерно 0,2;

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

Произведем расчет фонда заработной платы производственных рабочих и занесем результаты в таблицу 20.

Таблица 20 – Расчет основной заработной платы

Исполнители	$З_{тс},$ руб.	$k_{пр}$	k_d	k_p	$З_m,$ руб.	$З_{дн},$ руб.	$T_p,$ раб. дн.	$З_{осн},$ руб.
Руководитель	15 000	0,3	0,2	1,3	29 250	1174,52	63	73 994,6
Дипломник	2 600	0,3	0,2	1,3	5 070	203	260	52 930,8
Итого								126 925,4

4.6.4 Дополнительная заработная плата исполнителей темы

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

Расчет дополнительной заработной платы ведется по следующей формуле:

$$З_{доп} = k_{доп} \cdot З_{осн}, \quad (11)$$

$$З_{доп,р} = 0,12 \cdot 73994,6 = 8879,35 \text{ руб.}$$

$$З_{доп,д} = 0,12 \cdot 52930,8 = 6351,7 \text{ руб.}$$

где $k_{доп}$ – коэффициент дополнительной заработной платы (на стадии проектирования принимается равным 0,12).

4.6.5 Отчисления во внебюджетные фонды (страховые отчисления)

В данной статье расходов отражаются обязательные отчисления по установленным законодательством Российской Федерации нормам органам государственного социального страхования (ФСС), медицинского страхования (ФФОМС) и пенсионного фонда (ПФ) от затрат на оплату труда работников.

Величина отчислений во внебюджетные фонды определяется исходя из следующей формулы:

$$З_{внеб} = k_{внеб} \cdot (З_{осн} + З_{доп}), \quad (12)$$

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

На 2016 г. в соответствии с Федеральным закона от 24.07.2009 №212-ФЗ установлен размер страховых взносов равный 30%. На основании пункта 1 ст.58 закона №212-ФЗ для учреждений осуществляющих образовательную и научную деятельность в 2016 году водится пониженная ставка – 27,1%.

Отчисления во внебюджетные фонды представлены в табличной форме (таблица 21).

Таблица 21 – Отчисления во внебюджетные фонды

Исполнитель	Основная заработная плата, руб.	Дополнительная заработная плата, руб.	Квнеб, %	Звнеб
Руководитель проекта	73 994,6	8 879,35	27,1	22 458,84
Дипломник	52 930,8	6 351,7	27,1	16 065,57
Итого				38 524,41

4.6.6 Накладные расходы

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

$$З_{\text{накл}} = (\text{сумма статей } 1 \div 5) \cdot k_{\text{нр}}, \quad (13)$$

$$З_{\text{накл}} = (29\,756 + 26\,633 + 8\,097,27 + 126\,925,4 + 15\,231 + 38\,524,41) \cdot 0,16$$

$$З_{\text{накл}} = 39\,226,73 \text{ руб.}$$

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

Величину коэффициента накладных расходов можно взять в размере 16%.

4.6.7 Формирование бюджета затрат научно-исследовательского проекта

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

Определение бюджета затрат на научно-исследовательский проект приведен в таблице 22.

Таблица 22 – Расчет бюджета затрат НТИ

Наименование статей	Сумма, руб.	Примечание
1. Материальные затраты НТИ	29 756	табл. 16
2. Затраты на специальное оборудование для научных (экспериментальных) работ	34 730,27	табл. 17, 18
3. Затраты по основной заработной плате исполнителей темы	126 925,4	табл. 20
4. Затраты по дополнительной заработной плате исполнителей темы	15 231	пункт 4.7.4
5. Отчисления во внебюджетные фонды	38 524,41	табл. 21
6. Накладные расходы	39 226,73	16 % от суммы ст. 1-5
7. Бюджет затрат НТИ	284 393,81	Сумма ст. 1-6

На основании проведенных расчетов и анализов изучение белков с помощью метода вестерн блоттинга является экономически выгодным, материальные затраты НТИ составили 29 756 рублей, а затраты на специальное оборудование для экспериментальных работ 34 730,27 рублей. Работу целесообразно проводить на базе лаборатории Томского НИИ онкологии, так как в данной лаборатории имеется все необходимое оборудование и реактивы.

4.7 Определение экономической эффективности исследования

4.7.1 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:

$$I_{\phi}^p = \frac{\Phi_{pi}}{\Phi_{\max}}, \quad (14)$$

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

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

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

$$I_{\phi}^p = \frac{\Phi_{pi}}{\Phi_{\max}} = \frac{284393,81}{500000} = 0,57$$

$$I_{\phi}^{a1} = \frac{\Phi_{pi}}{\Phi_{\max}} = \frac{500000}{500000} = 1$$

$$I_{\phi}^{a2} = \frac{\Phi_{pi}}{\Phi_{\max}} = \frac{428563,4}{500000} = 0,86$$

Полученная величина интегрального финансового показателя разработки отражает соответствующее численное увеличение бюджета затрат разработки в размах.

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

$$I_m^a = \sum_{i=1}^n a_i b_i^a, \quad I_m^p = \sum_{i=1}^n a_i b_i^p \quad (15)$$

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.

Таблица 23 – Сравнительная оценка характеристик вариантов исполнения проекта

ПО Критерии	Весовой коэффициент параметра	Текущий проект	ИСП.1	ИСП.2
1.Стоимость продукции	0,2	5	4	4
2. Отсутствие побочных продуктов	0,1	5	5	5
3. Удобство в эксплуатации	0,15	5	5	4
4. Энергосбережение	0,1	4	4	4
5. Время эксперимента	0,15	4	3	3
6. Чистота полученных продуктов	0,15	4	5	5
7. Ресурсосбережение	0,15	5	4	4
ИТОГО	1	4,6	4,25	4,1

$$I_{TP} = 5*0,2+5*0,1+5*0,15+4*0,1+4*0,15+4*0,15+ 5*0,15=4,6$$

$$I_{ИСП.1} = 4*0,2+5*0,1+5*0,15+4*0,1+3*0,15+ 5*0,15+4*0,15 = 4,25$$

$$I_{ИСП.2} = 4*0,2+5*0,1+4*0,15+4*0,1+3*0,15+ 5*0,15+4*0,15 = 4,1$$

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

$$I_{финр}^p = \frac{I_m^p}{I_\phi^p}, \quad I_{финр}^a = \frac{I_m^a}{I_\phi^a} \quad (16)$$

$$I_{финр}^p = \frac{4,6}{0,57} = 8,07$$

$$I_{финр}^{a1} = \frac{4,25}{1} = 4,25$$

$$I_{финр}^{a2} = \frac{4,1}{0,86} = 4,77$$

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

Сравнительная эффективность проекта:

$$\mathcal{E}_{cp} = \frac{I_{финр}^p}{I_{финр}^a} \quad (17)$$

$$\mathcal{E}_{cp1} = \frac{I_{финр}^p}{I_{финр}^{a1}} = \frac{8,07}{4,25} = 1,9$$

$$\mathcal{E}_{cp1} = \frac{I_{финр}^p}{I_{финр}^{a2}} = \frac{8,07}{4,77} = 1,69$$

где $\mathcal{E}_{cp}$ – сравнительная эффективность проекта;

$I_{тэ}^p$ – интегральный показатель разработки;

$I_{тэ}^a$ – интегральный технико-экономический показатель аналога.

Таблица 24 - Сравнительная эффективность разработки

№ п/п	Показатели	Разработка	ИСП.1	ИСП.2
1	Интегральный финансовый показатель разработки	0,57	1	0,86
2	Интегральный показатель ресурсоэффективности разработки	4,6	4,25	4,1
3	Интегральный показатель эффективности	8,07	4,25	4,77
4	Сравнительная эффективность вариантов исполнения		1,9	1,69

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.

В разделе были рассчитаны интегральный финансовый показатель разработки, интегральный показатель ресурсоэффективности разработки, интегральный показатель эффективности, сравнительная эффективность вариантов исполнения. Оценка сравнительной эффективности исследования позволила определить, что оно является наиболее эффективным по сравнению с аналогами.