

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

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

Тема работы
Взаимодействие наносистем на основе наночастиц оксида железа, полученных методом термального разложения, с клетками <i>in vitro</i>

УДК 661.872'02-022.532:621.762.214

Студент

Группа	ФИО	Подпись	Дата
4Д51	Гончаренко Анна Олеговна		5.06.19

Руководитель ВКР

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент НОЦ Н.М. Кижнера	Штрыкова В.В.	К.Х.Н.		05.06.19г.

Консультант по разделам «Взаимодействие наносистем на основе наночастиц оксида железа с опухолевыми клетками (обзор литературы)», «Объект и методы исследования», «Экспериментальная часть», «Результаты проведенного исследования»

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент ИШХБМТ	Першина А.Г.	К.Б.Н.		5.06.2019

КОНСУЛЬТАНТЫ ПО РАЗДЕЛАМ:

По разделу «Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение»

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент ОСГН	Криницына З.В.	К.Т.Н.		06.05.2019

По разделу «Социальная ответственность»

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Старший преподаватель	Скачкова Л.А.			26.05.2019

ДОПУСТИТЬ К ЗАЩИТЕ:

Руководитель ООП	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Руководитель ООП 19.03.01 Биотехнология	Лесина Ю.А.	К.Х.Н.		05.06.19г.

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

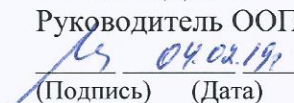
Код результата	Результат обучения (выпускник должен быть готов)
<i>Общекультурные компетенции</i>	
P1	Способность самостоятельно совершенствовать и развивать свой интеллектуальный, общекультурный и профессиональный уровень, добиваться нравственного и физического совершенствования своей личности
P2	Готовность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

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

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

УТВЕРЖДАЮ:

Руководитель ООП


 04.03.19 Веселов А.А.
 (Подпись) (Дата) (Ф.И.О.)

ЗАДАНИЕ на выполнение выпускной квалификационной работы

В форме:

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

Студенту:

Группа	ФИО
4Д51	Гончаренко Анне Олеговне

Тема работы:

Взаимодействие наносистем на основе наночастиц оксида железа, полученных методом термального разложения, с клетками <i>in vitro</i>
Утверждена приказом директора (дата, номер) 1645/с от 01.03.2019 г.

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

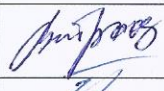
ТЕХНИЧЕСКОЕ ЗАДАНИЕ:

Исходные данные к работе	Объектом исследования являются магнитные наночастицы оксида железа, и их конъюгаты с пептидом rHLIP.
--------------------------	--

Перечень подлежащих исследованию, проектированию и разработке вопросов	Анализ литературных источников. Осуществление комплекса культуральных, биохимических и молекулярно-биологических методик для выполнения исследования. Анализ и обсуждение результатов проведенного исследования. Анализ экономической стороны и ресурсо-эффективности проекта. Анализ рисков и опасностей проведения исследования и составления перечня нормативов для их регулирования. Формулировка выводов и заключений по работе.
Перечень графического материала	-
Консультанты по разделам выпускной квалификационной работы	
Раздел	Консультант
Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение	Криницына З. В., доцент ОГН ШБИП, к.х.н.
Социальная ответственность	Скачкова Л. А., старший преподаватель отделения общетехнических дисциплин ШБИП.

Дата выдачи задания на выполнение выпускной квалификационной работы по линейному графику	04.02.2019
---	------------

Задание выдал руководитель / консультант (при наличии):

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент НОЦ Н.М. Кижнера	Штрыкова В.В.	к.х.н.		04.02.19
Доцент ИШХБМТ	Першина А.Г.	к.б.н.		04.02.19

Задание принял к исполнению студент:

Группа	ФИО	Подпись	Дата
4Д51	Гончаренко Анна Олеговна		4.02.19

ЗАДАНИЕ ДЛЯ РАЗДЕЛА «ФИНАНСОВЫЙ МЕНЕДЖМЕНТ, РЕСУРСООБЪЕДИНЕНИЕ И РЕСУРСОСБЕРЕЖЕНИЕ»

Студенту:

Группа	ФИО
4Д51	Гончаренко Анне Олеговне

Школа	ИШНПТ	Отделение школы (НОЦ)	Научно-образовательный центр Н.М. Кижнера
Уровень образования	бакалавр	Направление/специальность	19.03.01 Биотехнология

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

1. Стоимость ресурсов научного исследования (НИ): материально-технических, энергетических, финансовых, информационных и человеческих	Определена стоимость материально-технических и энергетических ресурсов, а также затраты на заработную плату исполнителей данного проекта.
2. Нормы и нормативы расходования ресурсов	Использованы амортизационные отчисления на использованное оборудование и нормативы расходования на электроэнергию, а также нормы и нормативы по заработной плате исполнителей темы: районный коэффициент для города Томска – 1,3, коэффициент дополнительной заработной платы 12%, база данных по окладной системе исполнителей.
3. Используемая система налогообложения, ставки налогов, отчислений, дисконтирования и кредитования	Ставка на отчисление во внебюджетные фонды для учреждений (32%). Коэффициент накладных расходов (14%).

Перечень вопросов, подлежащих исследованию, проектированию и разработке:

1. Оценка коммерческого потенциала, перспективности и альтернатив проведения НИ с позиции ресурсоэффективности и ресурсосбережения	Оценены коммерческий потенциал, а также перспективность научного исследования с позиции ресурсосбережения и перспективности
2. Планирование и формирование бюджета научных исследований	Проведено планирование основных этапов научно-исследовательской работы, с привязкой к исполнителям, также проведен расчет бюджета научных исследований.
3. Определение ресурсной (ресурсосберегающей), финансовой, бюджетной, социальной и экономической эффективности исследования	Определены показатели ресурсной, финансовой, бюджетной, социальной и экономической эффективности проекта.

Перечень графического материала (с точным указанием обязательных чертежей):

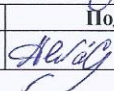
1. Оценка конкурентоспособности технических решений
2. Матрица SWOT
3. Альтернативы проведения НИ
4. График проведения и бюджет НИ
5. Оценка ресурсной, финансовой и экономической эффективности НИ

Дата выдачи задания для раздела по линейному графику	16.03.2019
--	------------

Задание выдал консультант:

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент ОСГН	Криницына Зоя Васильевна	к.т.н., доцент		16.03.2019

Задание принял к исполнению студент:

Группа	ФИО	Подпись	Дата
4Д51	Гончаренко Анна Олеговна		16.03.2019

ЗАДАНИЕ ДЛЯ РАЗДЕЛА «СОЦИАЛЬНАЯ ОТВЕТСТВЕННОСТЬ»

Студенту:

Группа	ФИО
4Д51	Гончаренко Анне Олеговне

Школа	ИШНПТ	Отделение (НОЦ)	Научно-образовательный центр Н.М. Кижнера
Уровень образования	бакалавр	Направление/специальность	19.03.01 Биотехнология

Тема ВКР:

Взаимодействие наносистем на основе наночастиц оксида железа, полученных методом термального разложения, с клетками *in vitro*

Исходные данные к разделу «Социальная ответственность»:

1. Характеристика объекта исследования (вещество, материал, прибор, алгоритм, методика, рабочая зона) и области его применения	Объектом исследования являются магнитные наночастицы оксида железа, конъюгированные с векторным пептидом и их взаимодействие с клетками <i>in vitro</i>. Рабочая зона, в которой осуществляется исследование, лаборатория СибГМУ ЦНИЛ. Для работы с культурами клеток используется ламинарный бокс с вентиляцией стерильным воздухом и УФ лампами. Область применения полученных результатов исследования – медицина, онкология.
--	---

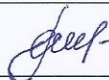
Перечень вопросов, подлежащих исследованию, проектированию и разработке:

1. 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.	– специальные: должностная инструкция работника, трудовой кодекс РФ; – перечень организационных мероприятий при компоновке рабочей зоны.
2. Производственная безопасность: 2.1. Анализ выявленных вредных и опасных факторов. 2.2. Обоснование мероприятий по снижению воздействия	Выявление и анализ вредных и опасных факторов при проведении исследования культуральной лаборатории можно разделить на следующие группы: – химические (соляная кислота, этанол) – пожаровзрывоопасность (ЛВЖ, лабораторное оборудование: автоклав, сушижаровый шкаф, твердотельный термостат) – повышенная температура поверхностей, оборудования, материалов (автоклав, сушижаровый шкаф, твердотельный термостат), возможно повышение температуры поверхности до 150°. Меры защиты: средства индивидуальной защиты: термостойкие перчатки, рукавицы-прихватки;

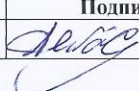
	– электроопасность (лабораторное оборудование: автоклав, сухожаровый шкаф, твердотельный термостат и другие электроустановки) – повышенный уровень ультрафиолетовой радиации (Источники: УФ-лампы в помещениях и УФ-лампы в ламинарных боксах, превышение уровня УФ облучения при длительном воздействии: 30Дж/м²) – повышенный уровень ультразвука (Источник: оборудование для генерации ультразвука, при отсутствии защитной камеры возможно превышение допустимого уровня воздействия: до 100 дБ) – отклонение показателей микроклимата в помещении (Измерения на соответствие показателей нормам проводятся каждые полгода ответственным за охрану труда ЦНИЛ, отклонения не выявлены) – недостаточная освещенность рабочей зоны (Измерения на соответствие показателей нормам проводятся каждые полгода ответственным за охрану труда ЦНИЛ, отклонения не выявлены)
3. Экологическая безопасность:	– анализ воздействия НТИ на атмосферу (летучие токсичные вещества: ДМСО, этанол, HCl); – анализ воздействия НТИ на гидросферу (жидкие токсичные вещества: ДМСО, органические соединения, кислоты; продукты метаболизма клеток); – анализ воздействия НТИ на литосферу (токсичные соединения и расходные материалы при неправильной утилизации отходов: лабораторный пластик, органические соединения, кислоты);
4. Безопасность в чрезвычайных ситуациях:	– перечень возможных ЧС при разработке и эксплуатации проектируемого решения: террористический акт, эпидемия, землетрясение, ураган, наводнение, пожар, взрыв; – выбор наиболее типичной ЧС: пожар лабораторного оборудования при несоблюдении правил безопасности;

Дата выдачи задания для раздела по линейному графику	16.03.2019
--	------------

Задание выдал консультант:

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Старший преподаватель	Скачкова Лариса Александровна			16.03.19

Задание принял к исполнению студент:

Группа	ФИО	Подпись	Дата
4Д51	Гончаренко Анна Олеговна		16.03.19

РЕФЕРАТ

Выпускная квалификационная работа 90 с., 10 рис., 19 табл., 101 источников.

Ключевые слова: злокачественные опухоли, магнитные наночастицы (МНЧ), оксид железа (Fe_3O_4), адресная доставка, векторные пептиды, pH-чувствительный встраивающийся пептид (pHLIP), исследования *in vitro*, клетки линии аденокарциномы молочной железы человека MDA-MB 231, клетки линии аденокарциномы молочной железы мыши 4T1.

Объектом исследования являются наносистемы на основе наночастиц оксида железа (Fe_3O_4), полученных методом высокотемпературного разложения органического комплекса железа (III) и конъюгированных с pH-зависимым встраивающимся пептидом pHLIP.

Цель работы – исследовать взаимодействие наносистем на основе магнитных наночастиц оксида железа, полученных методом высокотемпературного разложения органического комплекса железа (III), и векторного пептида pHLIP с клетками *in vitro*.

В процессе исследования проводились: работы по определению эффективности поглощения наноматериалов с векторным пептидом клетками, при кислом и нейтральном уровне pH, исследования цитотоксичности наноматериалов.

В результате исследования получены данные о взаимодействии наноматериалов с клетками *in vitro*.

Область применения: медицина, диагностика и терапия онкологических заболеваний.

Экономическая эффективность/значимость работы: в результате расчета финансового менеджмента, ресурсоэффективности и ресурсосбережения установлено, что научно-технический эффект исследования оправдывает физические и материальные ресурсы.

В будущем планируется продолжить исследование наноматериала Fe_3O_4 -pHLIP в экспериментах *in vivo* на моделях злокачественного опухолевого роста.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей работе использованы следующие сокращения и обозначения:

4T1 – карцинома молочной железы мыши;

AMF – внешнее переменное магнитное поле;

Cy5 – Cyanine 5

DMEM – среда Игла в модификации Дульбекко;

EPR – эффект повышенной проницаемости и удерживания в опухоли;

FBS – сыворотка зародыша телят;

Fe_3O_4 -pHLIP – магнитные наночастицы оксида железа, полученных методом термального разложения, конъюгированные с pH-чувствительным встраиваемым пептидом;

HIF-1 – гипоксически-индуцируемый фактор 1

MDA-MB-231 – аденокарцинома молочной железы человека;

PBS – фосфатно-солевой буфер;

pHLIP (pH-(Low)-Insertion Peptide) – пептид с трансмембранной активностью, встраиваемый в мембрану клетки при снижении pH среды ниже 7;

АПТЭС - 3-аминопропилтриэтоксисилан;

ВОД – внутриопухолевое давление;

МНЧ – магнитные наночастицы оксида железа;

ФАО – факторы ангиогенеза опухоли.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	15
1 ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ НАНОСИСТЕМ НА ОСНОВЕ НАНОЧАСТИЦ ОКСИДА ЖЕЛЕЗА С ОПУХОЛЕВЫМИ КЛЕТКАМИ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)	
1.1 Опухолевые клетки	17
1.2 Метаболизм опухолевых клеток	20
1.3 pH опухоли	21
1.4 Наномедицина. Наносистемы на основе наночастиц	22
1.5 Наночастицы на основе оксида железа Fe_3O_4	24
1.6 Система адресной доставки МНЧ	27
1.6.1. Пассивная адресная доставка	27
1.6.2. Активная адресная доставка	28
1.6.3. pH-селективное нацеливание	30
2 ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	
2.1 Объект исследования	
2.1.1 Наноматериалы	32
2.1.2 Клеточные линии	33
2.2 Сырье и материалы	
2.2.1 Сырье и рабочие материалы	33
2.2.2 Расходные материалы	33
2.3 Приборы и оборудование	34
3 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	
3.1 Культивирование клеточных линий	35
3.2 Оценка цитотоксичности наноматериалов	35
3.2.1 МТТ-тест	35
3.2.2 Метод проточной цитометрии	36
3.3 Исследование эффективности захвата наноматериалов клетками	36

3.4 Исследование методом флуоресцентной микроскопии	37
3.5 Статистическая обработка	38
4 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ	
4.1 Исследование эффективности связывания наноматериалов с клетками	39
4.2 Оценка влияния наноматериалов на жизнеспособность клеток	43
4.3 Оценка цитотоксичности наноматериалов методом МТТ-теста	44
5 ФИНАНСОВЫЙ МЕНЕДЖМЕНТ, РЕСУРСОЭФФЕКТИВНОСТЬ И РЕСУРСОСБЕРЕЖЕНИЕ	
5.1 Оценка коммерческого потенциала и перспективности проведения научных исследований с позиции ресурсоэффективности и ресурсосбережения	47
5.1.1 Потенциальные потребители результатов исследования	47
5.1.1.1 Сегментирование рынка	48
5.1.2 SWOT-анализ	49
5.2 Планирование научно-исследовательских работ	
5.2.1 Структура работ в рамках научного исследования	50
5.2.2 Определение трудоемкости выполнения работ	51
5.2.3 Разработка графика проведения научного исследования	51
5.2.4 Бюджет научно-технического исследования (НТИ)	55
5.2.5 Расчет материальных затрат НТИ	55
5.2.5.1 Расчет затрат на специальное оборудование для научных (экспериментальных) работ	56
5.2.5.2 Основная заработная плата исполнителей темы	57
5.2.5.3 Дополнительная заработная плата исполнителей темы	59
5.2.5.4 Отчисления во внебюджетные фонды	59
5.2.5.5 Накладные расходы	60

5.2.5.6	Формирование бюджета научно-исследовательского проекта	60
5.3	Определение ресурсной (ресурсосберегающей), финансовой, бюджетной, социальной и экономической эффективности исследования	61
	Вывод	64
6	СОЦИАЛЬНАЯ ОТВЕТСТВЕННОСТЬ	
	Введение	65
6.1	Правовые и организационные вопросы обеспечения безопасности	
6.1.1	Специальные (характерные для проектируемой рабочей зоны) правовые нормы трудового законодательства	66
6.1.2	Проектирование рабочей зоны	67
6.2	Производственная безопасность	68
6.2.1	Анализ вредных факторов производственной среды	68
6.2.1.1	Отклонение показателей микроклимата в помещении	69
6.2.1.2	Недостаточная освещенность рабочей зоны	70
6.2.1.3	Повышенная температура поверхностей, оборудования, материала	70
6.2.1.4	Повышенный уровень ультрафиолетовой радиации	71
6.2.1.5	Повышенный уровень ультразвука	71
6.2.1.6	Воздействие вредных и опасных химических факторов	72
6.2.1.7	Электроопасность	72
6.2.1.8	Пожаровзрывоопасность	73
6.2.2	Обоснование мероприятий по снижению воздействия опасных и вредных факторов	
6.2.2.1	Отклонение показателей микроклимата в помещении	74

6.2.2.2	Недостаточная освещенность рабочей зоны	74
6.2.2.3	Повышенная температура поверхностей, оборудования, материала	74
6.2.2.4	Повышенный уровень ультрафиолетовой радиации	74
6.2.2.5	Повышенный уровень ультразвука	74
6.2.2.6	Воздействие вредных и опасных химических факторов	75
6.2.2.7	Электробезопасность	75
6.2.2.8	Пожаровзрывобезопасность	75
6.3	Экологическая безопасность	76
6.4	Безопасность в чрезвычайных ситуациях	77
6.4.1	Анализ возможных ЧС	77
6.4.2	Выбор наиболее типичной ЧС	77
6.4.3	Разработка превентивных мер по предупреждению пожара и действий в результате его возникновения	78
	Выводы	79
	ВЫВОДЫ	80
	СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	81

ВВЕДЕНИЕ

На настоящий момент, второе место по смертности в мире, после сердечно-сосудистой патологии, занимают онкологические заболевания. По прогнозам ВОЗ (всемирная организация здравоохранения), заболеваемость и смертность будут продолжать повышаться, и в 2030 г. рак унесет более 13 млн жизней [1].

Наиболее широко используемыми методами лечения злокачественных новообразований на сегодняшний день являются хирургическое удаление, лучевая терапия и химиотерапия. Однако данные методы нельзя назвать совершенными. Хирургическое удаление иногда может оказаться невозможным или неэффективным: удаление первичного опухолевого узла злокачественной опухоли в ряде случаев не позволяет добиться излечения пациента из-за распространения метастаз в отдаленные участки тела. Химиотерапия является эффективным методом лечения, однако используемые лекарства токсичны и оказывают серьезное негативное влияние не только на раковые, но и на нормальные клетки. Лучевая терапия, являясь эффективным методом, оказывает губительный эффект особенно в отношении активно делящихся клеток. На практике, как правило, применяют комбинирование методов лечения [2].

В настоящее время крайне актуальной задачей является переход от системного воздействия к локальному. Возможный вариант решения – это адресная доставка лекарственных препаратов.

Одним из перспективных направлений в области создания биомедицинских систем адресной доставки, как для лечения, так и для диагностики рака, является использование магнитных наночастиц. Данные частицы могут быть использованы не только в качестве носителей лекарственных препаратов - терапия с их помощью может осуществляться за счет магнитной гипертермии, а диагностика может быть выполнена благодаря наличию у наночастиц МРТ-контрастных свойств [3]. Для реализации адресной доставки в опухоль наночастицы конъюгируют с векторными молекулами – антителами, пептидами, аптомерами и пептид

pHLIP. Благодаря pH-чувствительности, данный пептид попадая в микроокружение опухоли и встраивается в мембрану клетки [4, 5]. Стоит отметить, что в литературе конъюгированные с пептидом pHLIP наночастицы уже созданы, например, конъюгированные наночастицы золота [6], наноккомпозиты оксида железа и оксида цинка [7].

Первоочередным этапом разработки систем адресной доставки является изучение взаимодействия МНЧ с клетками *in vitro*. Одними из наиболее важных факторов, определяющих успешность использования систем адресной доставки, являются цитотоксичность и эффективность поглощения их клетками.

Практическая значимость результатов ВКР. Полученные результаты взаимодействия наночастиц с клетками могут быть применены для дальнейшего обоснования новых подходов в диагностике и терапии опухолевых заболеваний с использованием исследованного наноматериала.

Цель работы: исследовать взаимодействие наноматериалов на основе магнитных наночастиц оксида железа, полученных методом высокотемпературного разложения органического комплекса железа (III), и конъюгированных с пептидом pHLIP, с клетками *in vitro*.

Задачи:

- 1 Провести сравнительную оценку эффективности связывания наноматериалов, на основе наночастиц оксида железа Fe_3O_4 , полученных методом термического разложения, с диаметром ядра до 10 и до 20 нм, конъюгированных с пептидом pHLIP, с клетками *in vitro* при pH среды 6,8 и 7,4;
- 2 Провести сравнительную оценку цитотоксичности наноматериалов, на основе наночастиц оксида железа Fe_3O_4 , полученных методом термического разложения с диаметром ядра до 10 и до 20 нм, конъюгированных с векторным пептидом pHLIP;
- 3 Выполнить расчет финансовой эффективности проекта;
- 4 Провести анализ экологической и производственной безопасности проекта.

1 ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ НАНОСИСТЕМ НА ОСНОВЕ НАНОЧАСТИЦ ОКСИДА ЖЕЛЕЗА С ОПУХОЛЕВЫМИ КЛЕТКАМИ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

1.1 Опухолевые клетки

Рак - название, данное совокупности заболеваний, которые характеризуются неконтролируемой пролиферацией клеток [8].

На сегодняшний день выделяют более ста видов рака. Эти виды отличаются своими особенностями метаболизма и реакцией на лечение, следовательно, лечение для разных видов будет различно. Первостепенным вопросом в онкологии является различие между доброкачественными и злокачественными опухолями [9].

Опухоль - это новообразование, формирующееся в результате аномальной пролиферации клеток. Доброкачественная опухоль не распространяется или не проникает в близлежащие ткани, она остается ограниченной своим первоначальным расположением. Злокачественная опухоль, в свою очередь, способна не только вторгаться в здоровую ткань, но и распространяться по всему организму через кровеносную или лимфатическую системы, давая метастазы. Непосредственно «раковыми» принято называть именно злокачественные опухоли. Удаление хирургическим путем доброкачественных опухолей является практикуемым и эффективным методом лечения. Однако, из-за метастазирования, т.е. распространения опухолевых клеток и появления новых (вторичных) областей роста, добиться излечения пациента в результате хирургического удаления первичного опухолевого узла в ряде случаев невозможно [10,11].

Для злокачественных клеток характерны такие свойства, как ускоренный клеточный цикл; изменения в геноме (мутации, перестройки); инвазивный рост (активное проникновение опухолевых клеток через тканевые барьеры); изменениями в клеточной поверхности; хемотаксис; секреция литических факторов и др.

Морфологические отличия раковых клеток от нормальных отражены на рисунке 1. Раковая клетка характеризуется большим ядром неправильной формы. Ядрышко, в свою очередь, также увеличено, характеризуется макро- и микросегрегацией, а также численным увеличением и образованием внутриядерных канальцевых систем.

Для злокачественных клеток характерно увеличение частоты и появление нетипичных форм митоза, с дефектами в веретене деления, что приводит к появлению хромосомных аббераций.

Нормальные клетки

Раковые клетки

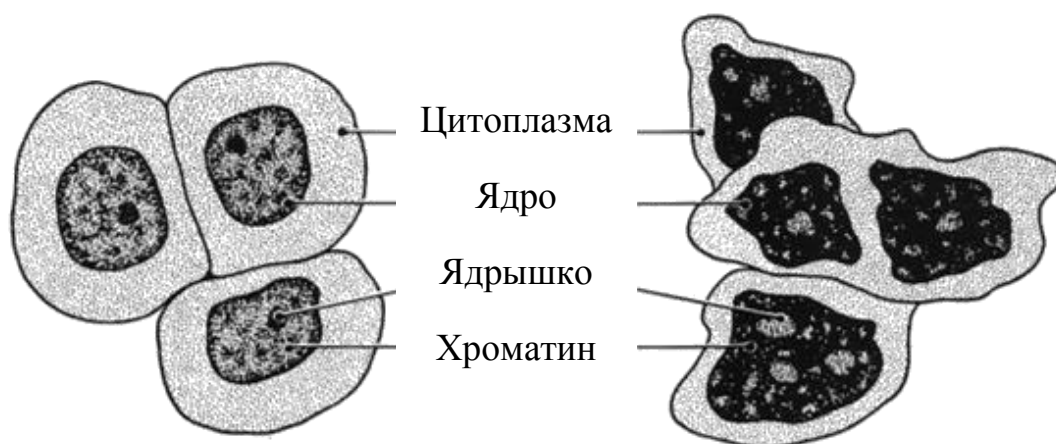


Рисунок 1 Морфологическое сравнение нормальных и раковых клеток

Структуры характерные для конкретного вида ткани, могут исчезать, а на их месте появляются новые нетипичные структуры. Происходит накопление рибосомальной РНК (рРНК) и транспортной РНК (тРНК) в цитоплазме, что делает ее базофильной. Злокачественные клетки имеют небольшое количество, часто вакуолизированной, цитоплазмы [12].

Гранулярный эндоплазматический ретикулум (ЭПР), или эндоплазматическая сеть (ЭПС), обладает упрощенной структурой. Аморфный, зернистый из нитевидного материала. Часто обнаруживаются фрагментация и дегрануляция с разрывом связей между гранулярным ЭПР и митохондриями. Одновременно с уменьшением гранулярного ЭПР в опухолевых клетках происходит увеличение количества свободных рибосом

и полисом. Это свидетельствует о интенсификации синтеза белков, необходимых для процесса роста клеток.

Аппарат Гольджи в злокачественных клетках, как правило, развит плохо, что предполагает отсутствие дифференцировки опухолевых клеток. Клетки, которые полностью потеряли дифференцировку, время от времени могут демонстрировать аппарат Гольджи [13].

С развитием опухоли наблюдается уменьшение митохондрий в объеме. Митохондрии показывают высокую изменчивость по форме и объему (иногда возникают огромные митохондрии). В митохондриальных мембранах происходят аномальные процессы гликолиза, известные в литературе как «эффект Варбурга». Происходят изменения в митохондриальных кристах, в матрице присутствуют включения. Продольное распределение митохондрий объясняется недостаточностью цитохромоксидазы [14].

Лизосомы претерпевают изменения в процессе клеточной малигнизации (перерождение и приобретения клеткой свойств злокачественной). Таким образом, появляются вторичные лизосомы, миелиновые структуры и гранулы липофусцина.

Дегенеративные клеточные изменения могут быть выражены появлением цитоплазматических включений. [12].

Способность к клонированию и развитию полноценной опухоли из отдельных клеток является важной особенностью раковых клеток. На клеточном уровне развитие раковых заболеваний рассматривается как многоступенчатый процесс.

Выделяют следующие этапы:

1. Возникновение одной или несколько стабильных мутаций, приводящих к постепенному увеличению способности данных клеток к пролиферации [15].
2. Выживание перерожденных клеток, пролиферация приводит к росту популяции клонов. Перерожденные клетки, в свою очередь, также

могут мутировать, тогда клоны клетки, обладающие селективным преимуществом, будут доминировать в популяции клеток опухоли. Этот процесс называется клональным отбором [12].

3. Инвазия и метастазирование – распространение клеток опухоли в организме, важной составляющей обеспечения данного процесса является ангиогенез [16].

1.2 Метаболизм опухолевых клеток

Морфологические характеристики опухолевых клеток отражают изменения, происходящие на метаболическом уровне.

Клетки, формирующие злокачественную опухоль, обладают высокой метаболической активностью, но в то же время и повышенной потребностью в поступлении кислорода и питательных веществ [17]. В связи с этим метаболизм опухолевых клеток изменяется. Вместе с тем происходят изменения и в микроокружении опухолевых клеток [18].

Стоит отметить, что раковые клетки способны влиять на область, называемую микроокружением, в котором находятся нормальные клетки, в том числе иммунные клетки и фибробласты, сигнальные молекулы, межклеточное вещество и кровеносные сосуды,. Злокачественные клетки выделяют факторы ангиогенеза опухоли (ФАО), которые стимулируют образование новых кровеносных сосудов, необходимых для снабжения опухоли кислородом и питательными веществами, удаления продуктов обмена из быстрорастущей опухоли. Молекулы ФАО, могут продуцировать и неперерожденные клетки, такие как лимфоциты, макрофаги, моноциты и т.д. находящимися в микроокружении опухоли [19].

Скорость пролиферации опухолевых клеток значительно выше, чем скорость образования новых капилляров, вследствие этого в опухоли постоянно протекают процессы некробиоза, некроза и апоптоза. Функциональная сосудистая сеть в области опухолей часто развита слабо и недостаточна для обеспечения необходимого уровня снабжения кислородом и питания клеток. В опухолевых клетках часто наблюдается гипоксия,

результатом которой является понижение pH межклеточного матрикса опухоли. Концентрация кислорода снижается до 1-2 % по сравнению с 3-6 % в нормальной ткани [19, 20].

Гипоксия способствует активации ряда генов, что в свою очередь приводит к дальнейшему изменению обмена веществ в клетках [21].

Аэробный гликолиз является одним из наиболее часто наблюдаемых метаболических изменений в раковых клетках.

Фактор, индуцируемый гипоксией 1 (HIF-1) является одним из ключевых регуляторов лежащих в основе перехода к аэробному гликолизу [18]. HIF-1 активируется в большинстве злокачественных опухолей и более чем в 60% метастазов [19]. Фактор HIF-1 регулирует экспрессию гликолитических ферментов и транспортеров глюкозы (GLUT1 и GLUT3). Как следствие, клетки опухоли эффективнее захватывают молекулы глюкозы, которые затем превращаются в пируват. Это, в свою очередь, позволяет раковым клеткам выжить и продолжить пролиферацию [22]. Полученный пируват, не поступает в цикл трикарбоновых кислот, вместо этого он превращается в молочную кислоту, которая после выводится в межклеточное пространство. [19-23].

1.3 pH опухоли

Из-за того, что в межклеточное пространство опухоли поступают лактат, а также ионы H^+ , в избытке образующиеся во время гликолиза, гидролиза АТФ и глутаминолиза [24] внеклеточная среда характеризуется пониженным уровнем pH [25].

В нормальных клетках кислые продукты обмена вымываются кровью, и потому интерстициальный pH остается неизменным. В связи с тем, что в опухоли сосудистая сеть лимфатическая система характеризуется недоразвитостью, скорость кровотока в опухолях часто снижена. По этой причине кислые продукты (ионы H^+ , лактат) накапливаются в межклеточном пространстве опухоли. Таким образом, среднее значение pH в опухоли

снижается и варьирует от 5,66-7,78, по сравнению с pH здоровой ткани (7,33) [19].

Как известно, при аэробном пути метаболизма из одной молекулы глюкозы образуется 38 молекул аденозинтрифосфата (АТФ). В то время как при анаэробном распаде той же одной молекулы глюкозы образуется только 2 молекулы АТФ [25]. Стоит отметить, что использование гликолитического пути превращения молекулы глюкозы наблюдалось в раковых клетках также и в присутствии кислорода [19]. Однако до сих пор не совсем понятно, почему раковые клетки используют путь, являющийся энергетически в 19 раз менее выгодным. Возможно, причина кроется в том, что в цикле трикарбоновых кислот могут образовываться продукты, способные ингибировать рост опухоли, в то время как при гликолитическом пути метаболизма, наоборот, будут образовываться продукты, способствующие опухолевому росту [23].

Например, пониженный уровень pH может способствовать инвазии и метастазированию опухоли, а также снижать эффективность ряда противоопухолевых препаратов [26]. Таким образом, изменение метаболизма позволяет опухолевым клеткам стать более устойчивыми к химиотерапии. В тоже время, отличные от нормальных физиологические и биохимические условия, формирующиеся в опухоли, могут быть использованы для разработки систем адресной доставки [19].

1.4 Наномедицина. Наносистемы на основе наночастиц

Концепция «волшебной пули» - это идея адресной доставки лекарственных молекул, предложенная более 100 лет назад химиком и биологом Паулем Эрлихом. До сих пор создание миниатюрных интеллектуальных устройств, способных направлено перемещаться внутри человеческого тела к цели, в частности в раковую опухоль, а затем накапливаться и по сигналу уничтожать перерожденные клетки, остается привлекательной идеей [27, 28].

Наноразмерные системы могут применяться как для диагностики, например, в качестве контрастных агентов, так и для терапии, например, фототермии или гипертермии. Наносистемы привлекательны как носители биомолекул или лекарств для их адресного накопления в пораженном участке [29, 30].

Использование наносистем позволяет модифицировать фармакокинетику уже существующих лекарственных препаратов.

Для создания наносистем для доставки лекарств могут быть успешно использованы наночастицы из неорганических материалов. Исследуются наночастицы на основе:

- драгоценных металлов, таких как золото и серебро;
- оксидов, к примеру, оксиды железа и цинка;
- диоксидов, например, кремния;
- материалов на основе углерода, например, нанотрубки и графены;
- липидов - липосомы, липидные частицы;
- полимеров - мицеллы, дендримеры, гидрогели и эмульсии [31].

Значительным плюсом систем доставки, на основе наночастиц, является высокая стабильность такой системы. Причем эта стабильность сохраняется и после введения наносистемы в живой организм [32].

Адресная доставка в опухоль, благодаря нацеленному действию наночастиц, позволяет повысить эффективность и снизить общую токсичность лекарственного препарата, что в свою очередь приводит к улучшению качества жизни пациента [33]. Стоит также отметить, что на сегодняшний день уже существует несколько химиотерапевтических препаратов для лечения рака на основе наночастиц. Эти препараты для терапии были одобрены и прошли клинические испытания. К ним относятся следующие препараты: доксил, абраксан и онкоспар [34, 35].

Однако, несмотря на существование данных систем адресной доставки, нанолекарства пока еще далеки от достижения пика своего потенциала в клиническом применении [36].

Для того чтобы увеличить эффективность адресной доставки наносистем в опухолевые клетки используются молекулярные векторы [37]. В качестве таких векторов активно применяют молекулы, демонстрирующие высокую аффинность к специфическим рецепторам, которые появляются на поверхности клеток в результате их злокачественного перерождения.

1.5 Наночастицы на основе оксида железа Fe_3O_4

Из-за наличия уникальных свойств в сочетании со способностью наноразмерных материалов проникать в клетки, наночастицы активно используются для решения биомедицинских задач *in vitro* и *in vivo* [38, 39].

Магнитные наночастицы (МНЧ) признаны одним из высокоперспективных вариантов решения проблем тераностики раковых заболеваний. Наиболее широко исследуются наночастицы на основе оксида железа. На сегодняшний день, выполнены исследования, доказывающие безопасность наночастиц оксида железа для организма человека [40]. Подтверждено, что наночастицы оксида железа являются биосовместимыми, биоразлагаемыми, нетоксичными и могут быть использованы в клинической практике [41]. Более того они уже используются в диагностике в качестве МРТ-контрастов [40] и для терапии [42, 43].

Существует несколько методов получения наночастиц оксида железа [41].

Одним из методов является термическое разложение органических комплексов железа (например, пентакарбонила железа, олеата железа или FeOON). Достоинства метода в том, что он позволяет контролировать размер, форму и дисперсность синтезируемых частиц и получать частицы с заданными магнитными свойствами. Недостатком метода является гидрофобность синтезированных наночастиц, из-за которой для использования данных наночастиц в биомедицине необходимо проведение сложных многоступенчатых модификаций поверхности с целью возможности перевода их в водные среды [44].

Другим методом является со-осаждение ионов Fe^{2+} и Fe^{3+} в щелочном растворе.

В течение последних двадцати лет наночастицы, полученные этим методом, широко исследованы и даже успешно используются в клинике [45]. Данный метод позволяет контролировать массовый выход продукта, однако существует проблема получения однородных частиц с узким распределением по диаметру ядра и обладающих заданными магнитными свойствами.

Как уже говорилось ранее, широкое использование наночастиц обусловлено появлением ряда специфических свойств у материалов в наноразмерном состоянии. МНЧ, наряду с другими видами наночастиц, также являются предметом активного изучения в таких сферах как физика, химия, биология и медицина. Далее будут рассмотрены некоторые свойства МНЧ.

Для тераностики опухолевых заболеваний одним из первостепенных факторов широкого применения является именно размер МНЧ. Учитывая, что эндотелий сосудов в опухоли имеет фенестрации [46] – перфорации диаметром до 700 нм - МНЧ способны проникать из кровеносных сосудов и накапливаться в опухоли за счет так называемого эффекта повышенной проницаемости и удерживания (ЭПР) [47, 48].

Следующее свойство, которое проявляется именно благодаря наноразмерам - это суперпарамагнитное поведение МНЧ. Это означает, что средняя намагниченность МНЧ при отсутствии внешнего магнитного поля равна нулю, тогда как при наложении магнитного поля МНЧ ведут себя как парамагнетики. МНЧ, особенно ферромагнитные МНЧ, такие как Fe_3O_4 , обладают T2-контрастными свойствами, в связи с чем, могут быть успешно использованы для МРТ диагностики. Это обусловлено тем, что МНЧ способны повышать поперечное (спин-спиновое) время релаксации протонов в близлежащих тканях, тем самым вызывая сокращение времени T2-релаксации, что может быть обнаружено с помощью МРТ. Сигнал будет виден как затемнение ткани на T2-взвешенных МРТ-изображениях. С

помощью этого метода клетки или ткани, в которых накапливаются МНЧ, можно обнаруживать *in vivo* неинвазивно [49-51].

Еще один размерно-зависимый фактор – это способность откликаться на внешнее переменное магнитное поле (AMF) [52]. Поглощая энергию внешнего электромагнитного поля, частицы конвертируют ее во внутреннюю энергию, которая уже в виде тепла передается окружающим биологическим объектам [53]. Благодаря этой особенности МНЧ могут применяться в качестве терапевтического агента, разрушая опухолевые клетки за счет магнитной гипертермии [43].

Известно, что чувствительность к гипертермии раковых клеток выше по сравнению со здоровыми клетками. Нагревание раковых клеток до температуры 40-43 °C вызывает необратимые физиологические изменения, приводящие к апоптозу клетки. МНЧ на основе оксида железа крайне привлекательны для терапии в связи с отсутствием токсичности и отличной биосовместимости [54, 55].

МНЧ можно использовать в качестве носителя лекарств, закрепляя его на поверхности. При наложении внешнего магнитного поля появляется возможность дистанционного управления МНЧ и конструкциями на их основе [56], в том числе возможно дистанционное декапсулирование лекарств, конъюгированных на поверхности МНЧ. В тоже время, широко обсуждаемое в литературе магнитно-направленное движение МНЧ достаточно ограничено, причина в необходимости применения слишком высоких магнитных полей для реализации данного подхода [53].

Следующим важным свойством является высокоразвитая поверхность МНЧ. Благодаря наличию высокой удельной поверхности на наночастицы можно наносить большое количество молекул (векторные молекулы, терапевтические препараты и др.) [47]. Стоит отметить, что модификация поверхности МНЧ также повышает их стабильность, а также позволяет избегать агрегации в водной среде.

При модификации на поверхность магнитного «ядра» наносятся различные покрытия - синтетические и природные полимеры, такие как полиэтиленгликоль (ПЭГ), полиэтиленмин (ПЭИ), поливинилпирролидон (ПВП), декстран, и глутатион, жирные кислоты и др. [50, 57, 58] или неорганические покрытия, например, кремнезем, углерод, благородные металлы [56].

Помимо защитной и стабилизирующей функции покрытие частиц может выполнять роль спейсера для присоединения различных биомолекул, фармацевтических агентов или различных функциональных групп (для дальнейшего конъюгации МНЧ с биомолекулами, лекарствами) – групп карбоновой кислоты (-COOH), amino- (-NH₂), сульфгидрильная (-SH) и др., [56, 59]. Модификация поверхности также позволяет модулировать заряд поверхности МНЧ.

Учитывая выше перечисленные свойства, можно сделать вывод, что МНЧ являются перспективной платформой для создания наносистем биомедицинского назначения.

1.6 Система адресной доставки МНЧ

Высокая генетическая изменчивость раковых клеток является одной из проблем, с которой сталкиваются ученые при разработке систем адресной доставки в опухоль. Изменение антигенов на поверхности опухолевой клетки приводит к тому, что использование определенной молекулярной мишени или антигена может стать неэффективным в ходе курса терапии и, таким образом, не обеспечит полной ремиссии злокачественного процесса [60].

Существующие подходы к адресной доставке можно разделить на 2 типа - пассивная и активная.

1.6.1. Пассивная адресная доставка

Механизм пассивной доставки основан на простой диффузии, усиленной ЭПР эффектом в опухоли [61]. Размер НЧ превышает размер молекул, именно это и способствует тому, что частицы накапливаются преимущественно в опухоли, а не в нормальных тканях, поскольку эндотелий

большинства нормальных тканей имеет плотные соединения [62]. Кроме того, если размер наночастиц более 10 нм, то они не будут подвергаться фильтрации и выведению почками. Таким образом, период выведения НЧ из крови продлевается, и, следовательно, повышается аккумуляция наночастиц в опухоли [34]. Измененная лимфатическая система опухоли приводит к дополнительному удержанию наночастиц, что дает достаточное время для высвобождения препарата с поверхности [37].

Таким образом, одним из важных факторов является размер наночастиц. Оптимальный размер колеблется в пределах от 10 до 200 нм. Наночастицы меньшего размера фильтруются почками, а большего - часто быстро накапливаются в селезенке, не достигая опухоли [63].

Тем не менее, метод пассивной доставки имеет ряд ограничений. Первые из них обусловлены разной степенью васкуляризации опухолей и различиями в пористости её сосудов. Более того, во время лечения одной и той же опухоли, может происходить изменение морфологии сосудистой сети [64]. Другим ограничением является повышенное внутриопухолевое давление (ВОД), которое возникает в результате аномального развития кровеносных сосудов опухоли и недостаточного лимфатического дренажа [65]. ВОД противодействует диффузии препаратов из кровеносных сосудов в опухоль.

1.6.2. Активная адресная доставка

Для увеличения селективности накопления применяют подход активной доставки. Активным называют метод адресной доставки, в рамках которого используют наночастицы конъюгированные с векторными молекулами [37]. В качестве векторных молекул - молекулярных лигандов - выступают белки (в основном антитела и их фрагменты), пептиды (например, аргинин-глицин-аспарагиновая кислота), нуклеиновые кислоты (аптамеры), небольшие молекулы (витамины или углеводы) [66, 67].

На настоящий момент можно выделить несколько видов активной адресной доставки:

- Взаимодействие высоко-аффинного лиганда со специфическим рецептором/белком, сверхэкспрессируемым на поверхности опухолевой клетки;
- Взаимодействие с рецептором/белком, сверхэкспрессируемым в микроокружении опухоли (например, эндотелии сосудов);
- Использование специфических физиологических или биохимических условий, формирующихся в опухоли (таких как пониженное содержание кислорода или pH, и др.).

Использование специфических антител, в качестве нацеливающих молекул имеет серьезный недостаток, а именно высокий риск провокации иммунного ответа. Решением данной проблемы стало использование не антител, а пептидов. Они также обеспечивают высокоспецифичное связывание с клетками-мишенями, но в отличие от антител имеют меньшие размеры и низкую иммуногенность [68].

Количество рецепторов на клеточной поверхности опухолевых клеток определяет количество целевых молекул, которые могут специфически с ними связаться. Также важную роль играют доступность этих рецепторов и их сродство к лиганду. Когда рецепторы достигают насыщения, все последующие новые молекулы-лиганды будут выводиться из организма наравне с другими не нацеленными молекулами [46].

В связи с этим, для более успешного использования данного типа адресной доставки, необходимо решить ряд задач. Первостепенной является задача количественной оптимизации векторных молекул на поверхности частиц. Стоит отметить, что достижение максимальной загрузки не всегда приводит к повышению эффективности связывания с клеткой. Оптимизация соотношения компонентов наносистемы может предотвратить уменьшение накопления наночастиц в опухоли, вследствие высокого содержания молекул вектора на поверхности. Также необходимы подбор наиболее оптимального размера наночастиц и контроль их биodeградации.

1.6.3. pH-селективное нацеливание

Один из перспективных подходов активной адресной доставки МНЧ основан на физиологической особенности ряда солидных опухолей, а именно пониженном значении pH межклеточной среды (pH 5,8-7,1) [2]. Так, адресная доставка наночастиц в опухоль за счет кислого значения pH может быть достигнута с использованием pH-чувствительных векторных молекул.

Семейство pH-чувствительных встраивающихся пептидов pHLIP (pH (Low) Insertion Peptide) – это уникальный класс водорастворимых мембранных пептидов, способных при кислых значениях pH встраиваться в клеточную мембрану [4, 48]. Причем сродство пептида к билипидному слою возрастает примерно в 20 раз при низком pH.

pHLIP состоит из трансмембранного участка и двух фланкирующих последовательностей. При нейтральном или высоком pH pHLIP существует в виде неструктурированного или слабоструктурированного мономера и практически не взаимодействует с поверхностью билипидного слоя. В то время как в кислой среде (pH 6,0-6,8) из-за повышенной концентрации протонов происходит протонирование отрицательно заряженных остатков пептида, общая гидрофобность pHLIP увеличивается, что приводит к его мгновенному свертыванию. Образуется альфа-спираль, которая встраивается в фосфолипидный бислой как трансмембранная спираль [69].

Вставка pHLIP в мембрану является однонаправленной: С-конец проникает внутрь клетки, а N-конец остается снаружи [70]. Механизм действия pHLIP при различных pH представлен на рисунке 2 [69].

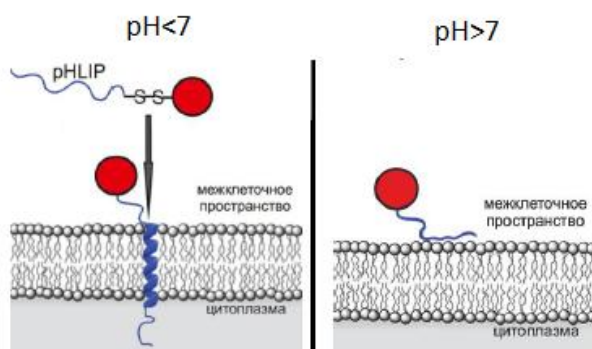


Рисунок 2 Механизм действия пептидов семейства pHLIP

Важно отметить, что в ряде экспериментов подтверждено отсутствие цитотоксичности рНЛР в отношении клеток. Внутривенное введение рНЛР не вызывает острой токсичности у мышей [70].

Таким образом, конъюгация МНЧ с рНЛР является весьма перспективным методом для разработки универсальной конструкции, применимой как для диагностики так и для терапии опухолевых заболеваний.

2 ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Объект исследования

2.1.1 Наноматериалы

В данной работе были исследованы наноматериалы, с диаметром ядра частиц до 10 нм и от 10 до 20 нм. Наночастицы были полученные методом высокотемпературного разложения органического комплекса железа (III). Для получения наноматериалов, способных образовывать устойчивые водные коллоидные растворы, и последующей конъюгации наночастиц с пептидом проводили модификацию поверхности наночастиц тетраэтоксисиликатом и 3-аминопропилтриэтоксисиланом, конъюгированным с Cyanine 5, с образованием силоксановой оболочки и далее О-[N-(6-малеимидогексаноил)аминоэтил]-O'-[3-(N-сукцинимидилокси)-3-оксопропил]полиэтиленгликолем-3000 (ПЭГ-3000). Ковалентное связывание с молекулами пептида рНЛIP проводили за счет взаимодействия между малеимидной группой в структуре ПЭГ-3000 и SH-группой цистеина в структуре пептида.

Характеристика наноматериалов, использованных в исследовании приведена в таблице 1.

Таблица 1 – Характеристика наноматериалов

Обозначение	Модификация рНЛIP пептидом	Размер модифицированной частицы (магнитного ядра), нм	Гидродинамический диаметр (в воде), нм	Дзета-потенциал, мВ	Массовая доля органического покрытия, wt. %.
10 CP	-	17-20 (7)	185	-6.9	31.55
20 CP	-	30-36 (14)	230	-1.5	36.95
10 CP рНЛIP	+	17-20 (7)	152	-11.4	26.61
20 CP рНЛIP	+	30-36 (14)	109	-12.6	33.82

Наночастицы были синтезированы на базе НИТУ «МИСИС», Москва.

Суспензии наночастиц были приготовлены методом диспергирования в фосфатно-солевом буфере (PBS) при помощи ультразвука, с дальнейшим разведением до концентраций 0,1-1,0 мг/л.

2.1.2 Клеточные линии

В работе были использованы следующие клеточные линии:

- аденокарцинома молочной железы человека MDA-MB-231 (предоставлены Институтом цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск);
- аденокарцинома молочной железы мыши 4T1 (предоставлены «Национальным медицинским научно-исследовательским центром онкологии им. Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва).

2.2 Сырье и материалы

2.2.1 Сырье и рабочие материалы

В ходе проведения исследования были использованы следующие рабочие материалы: культуральная среда DMEM/F12 (ПанЭко), эмбриональная телячья сыворотка FBS (Biosera), L-глутамин (ПанЭко), гентамицин (ПанЭко), раствор Хэнкса (ПанЭко), трипсин (ПанЭко), TrypLE (Thermo Fisher Scientific), PBS (Sigma), Triton-X100 (Sigma), DMSO (ПанЭко), HCl (Sigma), DAPI (Vectashield).

2.2.2 Расходные материалы

Для реализации исследования были использованы следующие расходные материалы: культуральные матрасы (25 см³, 75 см³), одноразовые пластиковые наконечники (10 мкл, 200 мкл, 1000 мкл, 5 мл), серологические пипетки (5 мл, 10 мл, 25 мл), пластиковые пробирки (15 мл, 50 мл), эппендорфы (0,2 мл, 0,7 мл, 1,5 мл, 2 мл), культуральные планшеты (6-, 24-, 96-луночные).

2.3 Приборы и оборудование

При выполнении исследования было использовано следующее оборудование: ламинарный бокс II класса, CO₂-инкубатор (Sanyo), инвертированный микроскоп Микромед И (Микромед), центрифуга (Sigma), низкотемпературный холодильник (Sanyo), настольная центрифуга (Eppendorf), водяная баня WB-4MS (Biosan), камера Горяева (Минимед, Россия), автоматические дозаторы переменного объема (0,5-10 мкл, 10-50 мкл, 100-1000 мкл, 1-10 мл) (Ленпипет), проточный цитофлуориметр (BD Accuri C6), спектрофотометр (UNICO 2800), вортекс (BioSan), аналитические весы (Adventure), генератор льда (PORKKA), pH-метр PB-11 (Sartorius), сухожаровый шкаф (Binder), термостат твердотельный настольный (BioSan), термостат ТС-1/80 СПУ, флуоресцентный микроскоп Axio Scope A1 (Carl Zeiss).

5. ФИНАНСОВЫЙ МЕНЕДЖМЕНТ, РЕСУРСОЭФФЕКТИВНОСТЬ И РЕСУРСОСБЕРЕЖЕНИЕ

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

На сегодняшний день онкологические заболевания занимают одну из лидирующих позиций в структуре смертности. Ежегодно в мире регистрируется порядка 6 миллионов новых случаев рака. Успех терапии во многом определяется обнаружением опухоли на ранней стадии. Поэтому создание наносистем на основе магнитных наночастиц оксида железа является перспективных вариантов решения этой проблемы. Данный наноматериал способен специфически накапливаться в поврежденных тканях за счет рН-зависимого встраивающегося пептида, а благодаря наличию магнитных свойств наночастицы могут быть успешно выявлены методом магнитно-резонансной томографии (МРТ) и активированы под действием внешнего магнитного поля для реализации терапевтического воздействия.

На российском рынке преобладают импортные биотехнологические препараты, хотя в последние годы российские компании стали более активно инвестировать разработку аналогов.

5.1.1 Потенциальные потребители результатов исследования

Потенциальными потребителями результатов исследования могут быть лаборатории, чьи разработки направлены на новые методы диагностики и терапии раковых заболеваний, более того ряд ведущих научных групп и лабораторий уже сегодня используют магнитные наноматериалы для разработки и исследования подходов, предназначенных для тераностики. Также возможными потребителями могут стать фармацевтические компании для создания МРТ-контрастного агента нового поколения.

Данные исследования помогут значительно расширить понимание механизмов лечения данного заболевания.

5.1.1.1 Сегментирование рынка

Основные тенденции на мировом рынке биотехнологий:

1. Патентный обвал как двигатель развития биофармацевтики. При этом лекарства теряют патентную защиту и на рынок выводятся их дженерики.

2. Адресная доставка лекарственных средств. Наиболее перспективными областями применения наномедицины являются лечение онкологических и сердечно-сосудистых заболеваний.

3. Биосовместимые материалы.

К наиболее развитым сегментам российской биофармацевтики относятся:

- Цитокины (интерфероны, эритропоэтины)
- Гормоны (инсулины, группа половых гормонов (ФСГ, ХГЧ, ЛГ) и др.)
- Коагулянты (в т.ч. факторы свертывания крови)
- Ингибиторы протеинкиназ
- Моноклональные антитела
- Вакцины
- Антибиотики и бактериофаги

Таблица 2 – Карта сегментирования разработок некоторых направлений в области создания биотехнологических препаратов, в России.

Наименование организации	Типы проектов в области наномедицины и адресной доставки		
	Наносистемы для доставки препаратов	Наносистемы для опухолевой диагностики и терапии	Модульные нанотранспортеры, повышающие эффективность препаратов
СибГМУ	\\		\\
ПСПбГМУ	\\		
МГУ	\\		\\
«Транслек»		\\	

5.1.2 SWOT-анализ

SWOT– Strengths (сильные стороны), Weaknesses (слабые стороны), Opportunities (возможности) и Threats (угрозы) – представляет собой комплексный анализ научно-исследовательского проекта. SWOT-анализ применяют для исследования внешней и внутренней среды проекта.

Таблица 3 – SWOT-анализ

	Сильные стороны научно-исследовательского проекта: С1. Заявленная экономичность и энергоэффективность технологии. С2. Применение перспективного объекта исследования. С3. Наличие необходимого оборудования С4. Наличие бюджетного финансирования. С5. Квалифицированный персонал.	Слабые стороны научно-исследовательского проекта: Сл1. Высокая стоимость исследования Сл2. Большой срок поставок материалов и комплектующих, используемых при проведении научного исследования Сл3. Длительный срок подготовки эксперимента.
Возможности: В1. Использование инновационной инфраструктуры ТПУ В2. Использование инфраструктуры ЦНИЛ В3. Повышение стоимости конкурентных разработок	Результаты исследования могут привести к разработке нового метода диагностики и терапии опухолей. Конструкция разрабатывается с применением экономически выгодного материала	Проведение исследования происходит с участием высокотехнологичных методов анализа, что значительно уменьшает сроки выполнения работы.
Угрозы: У1. Отсутствие спроса на новые технологии производства У2. Развитая конкуренция технологий производства У3. Введения дополнительных государственных требований к сертификации продукции	Результаты эксперимента будут иметь высокий спрос, что увеличивает финансирование в данный проект. Биологическая безопасность объект исследования снижает требования к сертификации продукции	Проблема, для которой проводится данное исследование, прогрессирует со временем, что увеличивает спрос к продукту.

В ходе SWOT-анализа были рассмотрены сильные и слабые стороны проекта. Сильной стороной проекта является современный и перспективный объект исследования, который имеет широкий спектр применения. Время исследования данного наноматериала можно сократить применением современного оборудования и новых методов анализа. В связи с широким распространением данного заболевания, нет угрозы снижения спроса и финансирования данного проекта. Важным является факт того то, что данное исследование может привести к разработке нового метода диагностики и терапии опухоли.

5.2. Планирование научно-исследовательских работ

5.2.1. Структура работ в рамках научного исследования

Для выполнения научных исследований формируется рабочая группа.

Порядок составления этапов и работ, распределение исполнителей по данным видам деятельности приведен в таблице 4.

Таблица 4 - Перечень этапов, работ и распределение исполнителей

Основные этапы	№ раб	Содержание работ	Должность исполнителя
Разработка технического задания	1	Составление и утверждение технического задания	Р
Выбор направления Исследований	2	Подбор и изучение материалов по теме	И
	3	Выбор направления исследований	Р
	4	Календарное планирование работ по теме	Р,И
Теоретические и экспериментальные исследования	5	Проведение теоретических расчетов и обоснований	И
	6	Построение макетов (моделей)	Р,И
	7	Ведение клеточной линии опухоли и контроль её роста	И
	8	Оценка эффективности захвата наносиситем клетками	И
	9	Оценка цитотоксичности наносиситем на опухолевых клеток	И
	10	Сопоставление результатов с теоретическими исследованиями	Р,И
Обобщение и оценка результатов	11	Оценка эффективности полученных результатов	Р,И
Оформление отчета по НИР	12	Составление пояснительной записки	И

Р – руководитель

И – инженер

5.2.2. Определение трудоемкости выполнения работ

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

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

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

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

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

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

Определение продолжительности работ в рабочих днях производится по формуле:

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

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

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

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

5.2.3. Разработка графика проведения научного исследования

При выполнении дипломных работ студенты в основном становятся участниками сравнительно небольших по объему научных тем. Поэтому наиболее удобным и наглядным является построение ленточного графика проведения научных работ в форме диаграммы Ганта, представляющая собой горизонтальный ленточный график, на котором работы по теме

представляются протяженными во времени отрезками, характеризующимися датами начала и окончания выполнения данных работ.

Для перевода длительности каждого этапа из рабочих в календарные дни, необходимо воспользоваться 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.

В 2019 году 365 календарных дней, из них 52 выходных и 14 праздничных дней. Тогда коэффициент календарности равен:

$$k_{\text{кал}} = \frac{365}{365 - 52 - 14} = 1,22 \quad (5)$$

Таблица 5 – Временные показатели проведения научного исследования

Название Работы (Этапы)	Трудоёмкость работ			Исполнители	Длительность работ в рабочих днях T_{pi}	Длительность работ в календарных днях T_{ki}
	$t_{\min}$, чел-дни	$t_{\max}$, чел-дни	$t_{\text{ожид}}$, чел-дни			
Составление и утверждение технического задания	0,50	1,0	0,70	Р	0,7	0,86
Подбор и изучение материалов по теме	10,00	20,00	15,00	И	15,00	18,30
Выбор направления исследований	0,50	1,00	0,70	Р	0,90	1,10

Продолжение таблицы 5

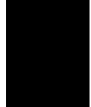
Календарное планирование работы теме	0,50	1,00	0,70	Р,И	0,35	0,43
Проведение теоретических расчетов	7,00	17,00	12,00	И	12,00	14,64
Построение макетов	0,50	1,00	0,70	Р,И	0,35	0,43
Ведение клеточной линии опухоли и контроль её роста	20,00	60,00	40,00	И	40,00	48,80
Оценка эффективности захвата наносистем клетками	15,00	25,00	20,00	И	20,00	24,40
Оценка цитотоксичности наносистем на опухолевых клетках	10,00	20,00	15,00	И	15,00	18,30
Сопоставление результатов с теоретическими исследованиями	0,50	2,00	1,10	Р,И	0,55	0,67
Оценка эффективности полученных результатов	0,50	2,00	1,10	Р,И	0,55	0,67
Составление пояснительной записки (эксплуатационно-технической документации)	10,00	15,00	12,50	И	12,50	15,25

Р – руководитель

И - инженер

На основе таблицы 5 был построен календарный план-график в виде диаграммы Ганта

Таблица 6 – Календарный план-график проведения НИОКР по теме

№	Вид работ	Исполнители	T_{ki} , кал. дн.	Продолжительность выполнения работ													
				Февр.			Март			Апрель			Май			Июнь	
				1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2
1	Составление ТЗ	Р	0,86														
2	Подбор и изучение материалов	И	18,30														
3	Выбор напр. исслед.	Р	1,10														
4	Календар. планир. работы	Р	0,43														
		И	0,43														
5	Теор. расч.	И	14,64														
6	Построение макетов	Р	0,43														
		И	0,43														
7	Вед. клет. л., контр. роста	И	48,80														
8	Оценка эфф. захвата	И	24,40														
9	Оценка цитотокс. наносисит.	И	18,30														
10	Сопост. результ. исслед. с теор.	Р	0,67														
		И	0,67														
11	Оценка эфф. результатов	Р	0,67														
		И	0,67														
12	Оформ. отчета по НИР	И	15,25														

 – Руководитель (Р)

 – Инженер (И)

5.2.4. Бюджет научно-технического исследования (НТИ)

При планировании бюджета научного исследования должно быть обеспечено полное и достоверное отражение всех видов планируемых расходов, необходимых для его выполнения. Расчет бюджета НТИ включает такие основные статьи затрат как материальные затраты, затраты на специальное оборудование для научных работ, затраты на электроэнергию, основная и дополнительная заработная плата исполнителей проекта, отчисления во внебюджетные фонды, контрагентные и накладные расходы.

5.2.5. Расчет материальных затрат НТИ

Расчет материальных затрат осуществляется по следующей формуле:

$$З_m = (1 + k_T) \cdot \sum_{i=1}^m Ц_i \cdot N_{расxi} , \quad (6)$$

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

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

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

k_T – коэффициент, учитывающий транспортно-заготовительные расходы (15%).

Таблица 7 – Материальные затраты

Наименование	Единица измерения	Количество	Цена за ед., руб.	Затраты на материалы, (З _м), руб.
Матрасы	5 шт.	30 уп.	589,00	20320,5
Серологические пипетки	200 шт.	3 уп.	4680,00	16146,00
Наконечники для дозаторов (0,1-200 мкл)	960 шт.	1 уп.	7500,00	8625,00
Наконечники для дозаторов (200-1000 мкл)	960 шт.	1 уп.	4500,00	5175,00
Эппендорфы 200 мкл	500 шт.	1 уп.	604,70	695,41
Культуральные планшеты 24-wp	1 шт.	240 уп.	155,00	42780,00
Культуральные планшеты 96-wp	1 шт.	120 уп.	155,00	21390,00
Эппендорфы 1,5 мл	500 шт.	12 уп.	604,70	8344,86
Эппендорфы 2 мл	500 шт.	6 уп.	604,70	4172,43

Продолжение таблицы 7

Центрифужные пробирки 50 мл	25 шт.	6 уп.	460,00	3174,00
Центрифужные пробирки 15 мл	50 шт.	6 уп.	510,00	3519,00
Трипсин	400 мл.	2 шт.	348,90	802,47
Раствор Хенкса	450 мл.	3 шт.	249,00	859,05
Культуральная среда	450 мл.	7 шт.	410,40	3303,72
Сыворотка	500 мл.	1 шт.	3600	4140,00
Антибиотики	10 мл.	1 шт.	167,20	192,28
Добавки	5 г.	7 уп.	11,05	88,95
PBS	100 мл.	4 шт.	2570,00	11822,00
Диметилсульфооксид (ДМСО)	100 мл.	2 шт.	456,00	1048,80
Triton-X100	100 мл.	1 шт.	4868,75	5599,06
HCl	500 мл.	1 шт.	6446,88	7413,91
ИТОГО:				169609,42

5.2.5.1. Расчет затрат на специальное оборудование для научных (экспериментальных) работ

Затраты, связанные с приобретением специального оборудования (приборов, контрольно-измерительной аппаратуры, стендов, устройств и механизмов), необходимого для проведения работ по теме представлено в таблице 8.

Таблица 8 - Затраты по статье «Спецоборудование для научных работ»

№ п/п	Наименование оборудования	Кол-во единиц оборудования	Цена единицы оборудования, тыс.руб.	Общая стоимость оборудования, руб.
1.	Центрифуга	2	27,250	54500
2.	Ламинарный бокс	1	342,850	342850
3.	Спектрофотометр	1	487,350	487350
4.	Инвертированный микроскоп	1	275,900	275900
5.	pH-метр	1	8,970	8970
6.	Пайпет	2	4,875	9750
7.	Автоматическая пипетка	6	7,850	47100
8.	СО ₂ -инкубатор	1	885,597	885597
9.	Термостат	1	58,400	58400
10.	Водяная баня	1	43,536	43536
11.	Транспортные расходы			332093
Всего				2546046

Стоимость оборудования, используемого при выполнении конкретного научного проекта и имеющегося в данной научно-технической организации, учитывается в виде амортизационных отчислений.

Сумма амортизационных отчислений определяются по формуле:

$$E_{\text{ам}} = (\sum K_{\text{об}} \cdot N_{\text{ам}} \cdot T_{\text{об}}) / (365 \cdot 100), \quad (7)$$

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

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

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

Затраты на спецоборудование оборудование, с учетом амортизационных отчислений приведены в таблице 9.

Таблица 9 – Расчет амортизационных отчислений на спецоборудование.

№	Наименование оборудования	Общая стоимость оборудования, тыс.руб.	Время использования, дни	Норма амортизации, %	Сумма амортизационных отчислений, руб.
1.	Центрифуга	54,500	150	12,3	2755
2.	Ламинарный бокс	342,850	200	18	33815
3.	Спектрофотометр	487,350	25	10,4	3472
4.	Инвертированный микроскоп	275,900	200	18	27212
5.	рН-метр	8,970	20	14,16	70
6.	Пайпет	9,750	200	10	534
7.	Автоматическая пипетка	47,100	200	10	2581
8.	СО2-инкубатор	885,597	200	18	87347
9.	Термостат	58,400	120	18	3456
10.	Водяная баня	43,536	20	18	429
Итого					161671

5.2.5.2. Основная заработная плата исполнителей темы

Статья включает основную заработную плату работников, непосредственно занятых выполнением НТИ, (включая премии, доплаты) и дополнительную заработную плату. Расходы по заработной плате определяется исходя из трудоемкости выполняемых работ и действующей системы окладов и тарифных ставок в НИ ТПУ.

$$З_{зп} = З_{осн} + З_{доп}, \quad (8)$$

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

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

Основная заработная плата рассчитывается по следующей формуле:

$$З_{осн} = З_{дн} \cdot T_p, \quad (9)$$

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

T_p – продолжительность работ, выполняемых научно-техническим работником, раб. дн. (табл. 4);

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

Среднедневная заработная плата рассчитывается по формуле:

$$З_{дн} = \frac{З_m \cdot M}{F_d}, \quad (10)$$

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

M – количество месяцев работы без отпуска в течение года:

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

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. (табл. 10).

Таблица 10 – Баланс рабочего времени

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

Месячный должностной оклад работника:

$$З_m = З_{тс} \cdot (1 + k_{пр} \cdot k_d) \cdot k_p, \quad (11)$$

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

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

$k_{д}$ —коэффициент доплат и надбавок составляет примерно 0,2 –0,5 (в НИИ и на промышленных предприятиях –за расширение сфер обслуживания, за профессиональное мастерство, за вредные условия: 15-20% от $Z_{тс}$);

$k_{р}$ —районный коэффициент, равный 1,3 (для Томска).

Расчет основной заработной платы приведен в таблице 11.

Таблица 11 – Расчет основной заработной платы

Исполнители	$Z_{тс}$ руб.	$k_{пр}$	$k_{д}$	$k_{р}$	$Z_{м}$ руб.	$Z_{дв}$ руб.	$T_{р, раб.}$ дн.	$Z_{осн}$ руб.
Руководитель	33664	0,3	0,2	1,3	65644,8	2719,9	3,4	9247,66
Инженер (студент)	26300	0,3	0,2	1,3	51285,0	1939,51	116,3	225565,01
Итого								234812,67

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

5.2.5.3. Дополнительная заработная плата исполнителей темы

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

Расчет дополнительной заработной платы ведется по следующей формуле:

$$Z_{доп} = k_{доп} \cdot Z_{осн} \quad (12)$$

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

$$Z_{доп.руководителя} = 9247,66 \cdot 0,12 = 1109,72$$

$$Z_{доп.инженера} = 225565,01 \cdot 0,12 = 27067,80$$

5.2.5.4. Отчисления во внебюджетные фонды

В данной статье расходов отражены обязательные отчисления по установленным законодательством Российской Федерации нормам органам

государственного социального страхования (ФСС), пенсионного фонда (ПФ) и медицинского страхования (ФФОМС) от затрат на оплату труда работников.

Величина отчислений во внебюджетные фонды определяется исходя из следующей формулы:

$$З_{\text{внеб}} = k_{\text{внеб}} \cdot (З_{\text{осн}} + З_{\text{доп}}), \quad (13)$$

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

Отчисления во внебюджетные фонды представлены в таблице 12.

Таблица 12 – Отчисления во внебюджетные фонды

Исполнитель	Основная заработная плата, руб.	Дополнительная заработная плата, руб.
Руководитель проекта	9247,66	1109,72
Инженер (студент)	225565,01	27067,80
Коэффициент отчислений во внебюджетные фонды	0,271	
Итого:		71270,34

5.2.5.5. 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:

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

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

5.2.5.6. Формирование бюджета научно-исследовательского проекта

Рассчитанная величина затрат научно-исследовательской работы является основой для формирования бюджета затрат проекта, который при формировании договора с заказчиком защищается научной организацией в

качестве нижнего предела затрат на разработку научно-технической продукции.

Определение бюджета затрат на научно-исследовательский проект по каждому варианту исполнения приведен в таблице 13.

Таблица 13 – Расчет бюджета затрат НТИ

Наименование статьи	Сумма, руб.
Материальные затраты НТИ	169609,42
Амортизация специального оборудования	161671,00
Затраты по основной заработной плате исполнителей темы	234812,67
Затраты по дополнительной заработной плате исполнителей темы	28177,52
Отчисления во внебюджетные фонды	71270,34
Накладные расходы	106486,55
Итого бюджет затрат НТИ:	772027,5

5.3. Определение ресурсной (ресурсосберегающей), финансовой, бюджетной, социальной и экономической эффективности исследования

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

Интегральный финансовый показатель разработки определяется как:

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

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).

В качестве аналога рассмотрена наносистема на основе наночастиц оксида железа для диагностики рака печени с помощью MPT (SPIO).

Вариант исполнения	Стоимость исполнения	I_{ϕ}^p
Предлагаемая технология	15000000	0,16
SPIO	24567000	0,26

Полученная величина интегрального финансового показателя разработки отражает соответствующее численное увеличение бюджета затрат разработки в разах (значение больше единицы), либо соответствующее численное удешевление стоимости разработки в разах (значение меньше единицы, но больше нуля).

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

$$I_{pi} = \sum a_i \cdot b_i, \quad (15)$$

где I_{pi} – интегральный показатель ресурсоэффективности вариантов;

a_i – весовой коэффициент i -го параметра;

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

n – число параметров сравнения.

Расчет интегрального показателя ресурсоэффективности проведен в таблице 14.

Таблица 14 – Сравнительная оценка характеристик вариантов исполнения проекта

Критерии \ Объект исследования	Весовой коэффициент параметра	Текущий проект	Аналог
1. Стоимость	0,25	5	3
2. Удобство в эксплуатации (соответствует требованиям потребителей)	0,15	4	3
3. Эффективность системы	0,25	4	3
4. Трудоёмкость	0,2	4	4
5. Надежность	0,15	5	3
ИТОГО	1	22	16

$$I_{пт} = 0,25 \cdot 5 + 0,15 \cdot 4 + 0,25 \cdot 4 + 0,2 \cdot 4 + 0,15 \cdot 5 = 4,4$$

$$I_{спio} = 0,25 \cdot 3 + 0,15 \cdot 3 + 0,25 \cdot 3 + 0,2 \cdot 4 + 0,15 \cdot 3 = 3,2$$

Интегральный показатель эффективности разработки

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

$$I_{финр}^p = \frac{I_m^p}{I_\phi^p}, \quad I_{финр}^a = \frac{I_m^a}{I_\phi^a} \quad (17)$$

$$I_{финр}^p = \frac{4,4}{0,16} = 27,5 \quad I_{финр}^a = \frac{3,2}{0,26} = 12,31$$

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

Сравнительная эффективность проекта:

$$\mathfrak{E}_{cp} = \frac{I_{финр}^p}{I_{финр}^a} \quad (18)$$

$$\mathfrak{E}_{cp} = \frac{27,5}{12,31} = 2,23$$

Таблица 15 – Сравнительная эффективность разработки

№ п/п	Показатели	Разработка	Аналог
1	Интегральный финансовый показатель разработки	0,16	0,26
2	Интегральный показатель ресурсоэффективности разработки	4,4	3,2
3	Интегральный показатель эффективности	27,5	12,31
4	Сравнительная эффективность вариантов исполнения	2,23	

Сравнение значений интегральных показателей эффективности позволяет понять, что предлагаемая в проекте разработка является более эффективным вариантом решения поставленной технической задачи с позиции финансовой и ресурсной эффективности.

Вывод:

В результате расчета бюджета научно-технического исследования наноматериала на основе магнитных наночастиц Fe_3O_4 , нацеленных pH-зависимым встраивающимся пептидом, была получена сумма, необходимая для выполнения работы, равная 772027,5рублей.

Выполненный анализ экономической эффективности разработки, показал, что исследование рентабельно; показаны значительные преимущества предлагаемой технологии по таким показателям, как экономическая и ресурсная эффективность, а также простота технологического оформления при масштабировании технологии.

В результате проведения разработки раздела финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение было выяснено, что данное исследование оправдывает физические и материальные затраты.