

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

### БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

Тема работы			
Антимикробные пептиды UBI для диагностики гнойного остиомиелита			
УДК 615.28:616.71-018.46.002			
Студент			
Группа	ФИО	Подпись	Дата
4Д51	Болотова Ксения Викторовна		9.06.2019

Руководитель ВКР

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

Консультант

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент ИШХБМТ	Першина А.Г.	к.б.н.		10.06.2019

### КОНСУЛЬТАНТЫ ПО РАЗДЕЛАМ:

По разделу «Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение»

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

По разделу «Социальная ответственность»

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

### ДОПУСТИТЬ К ЗАЩИТЕ:

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

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

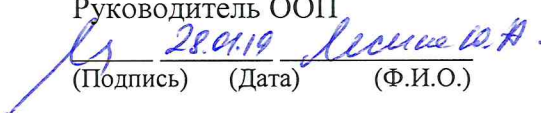
Код результата	Результат обучения (выпускник должен быть готов)
<b><i>Общекультурные компетенции</i></b>	
P1	Способность самостоятельно совершенствовать и развивать свой интеллектуальный, общекультурный и профессиональный уровень, добиваться нравственного и физического совершенствования своей личности
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
<b><i>Профессиональные компетенции</i></b>	
P4	Способность к овладению базовыми знаниями в области базовых естественных и технических наук, применение их в различных видах профессиональной деятельности
P5	Понимать сущность и значение информации в развитии современного информационного общества, быть готовым к использованию в профессиональной деятельности информационных и коммуникативных технологий
P6	Быть способным к планированию, проведению теоретических и экспериментальных исследований, обработке полученных результатов и представлению их в форме, адекватной задаче
P7	Быть способным к организационно-управленческой и инновационной деятельности в биофармацевтической области, демонстрировать знания для решения проблем устойчивого развития

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

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

УТВЕРЖДАЮ:

Руководитель ООП


  
 (Подпись)      (Дата)      (Ф.И.О.)

### ЗАДАНИЕ

#### на выполнение выпускной квалификационной работы

В форме:

бакалаврской работы
---------------------

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

Студенту:

Группа	ФИО
4Д51	Болотовой Ксении Викторовне

Тема работы:

Антимикробные пептиды UBI для диагностики гнойного остеомиелита	
Утверждена приказом директора (дата, номер)	1645/с от 01.03.2019 г.

Срок сдачи студентом выполненной работы:	<i>5.06.2019</i>
--	------------------



#### ТЕХНИЧЕСКОЕ ЗАДАНИЕ:

<b>Исходные данные к работе</b>	<i>Объектом исследования является антимикробные пептиды UBI29-41 и UBI18-35, меченные радиоактивным технецием 99m. Целью работы является Исследование селективности и эффективности накопления радиоактивно-меченых пептидов 99mTc-DPAH-UBI29-41 и 99mTc-DPAH-UBI18-35 in vivo на модели травматического остеомиелита у крыс</i>
---------------------------------	--


<p><b>Перечень подлежащих исследованию, проектированию и разработке вопросов</b></p>	<p><i>Перечень разделов, разработанных в данной работе:</i></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Литературный обзор</li> <li>2. Объекты и методы исследования</li> <li>3. Экспериментальная часть</li> <li>4. Результаты и обсуждение</li> <li>5. Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение</li> </ol> <p><i>Социальная ответственность</i></p>
<p><b>Консультанты по разделам выпускной квалификационной работы</b></p>	
<p><b>Раздел</b></p>	<p><b>Консультант</b></p>
<p>Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение</p>	<p>Креницына З. В., доцент ОСГН ШБИП, к.х.н.</p>
<p>Социальная ответственность</p>	<p>Скачкова Л. А., старший преподаватель отделения общетехнических дисциплин ООД ШБИП.</p>

<p><b>Дата выдачи задания на выполнение выпускной квалификационной работы по линейному графику</b></p>	<p>28.01.2019</p>
--	-------------------

**Задание выдал руководитель / консультант (при наличии):**

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
доцент НОЦ Н.М. Кижнера	Штрыкова В.В.	К.Х.Н.		28.01.2019
Доцент ИШХБМТ	Першина А.Г.	к.б.н.		28.01.2019

**Задание принял к исполнению студент:**

Группа	ФИО	Подпись	Дата
4Д51	Болотова Ксения Викторовна		28.01.2019

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

Студенту:

Группа	ФИО
4Д51	Болотовой Ксении Викторовне

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 (27,2%). Коэффициент накладных расходов (16%).

**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

16.03.19

Задание выдал консультант:

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

Задание принял к исполнению студент:

Группа	ФИО	Подпись	Дата
4Д51	Болотова Ксения Викторовна		16.03.2019

## ЗАДАНИЕ ДЛЯ РАЗДЕЛА «СОЦИАЛЬНАЯ ОТВЕТСТВЕННОСТЬ»

Студенту:

<b>Группа</b>	<b>ФИО</b>
4Д51	Болотовой Ксении Викторовне

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


Тема ВКР:

<b>Антимикробные пептиды UBI для диагностики острого остиомиелита</b>	
<b>Исходные данные к разделу «Социальная ответственность»:</b>	
<p>1. Характеристика объекта исследования (вещество, материал, прибор, алгоритм, методика, рабочая зона) и области его применения</p>	<p>Объектом исследования являются радиоактивно-меченые пептиды и использование их <i>in vivo</i> для диагностирования микробного воспаления.</p> <p>Исследование осуществлялось в лаборатории СибГМУ ЦНИЛ.</p> <p>Область применения полученных результатов исследования – медицина.</p>
<b>Перечень вопросов, подлежащих исследованию, проектированию и разработке:</b>	
<p><b>1. Правовые и организационные вопросы обеспечения безопасности:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>– специальные (характерные при эксплуатации объекта исследования, проектируемой рабочей зоны) правовые нормы трудового законодательства;</li> <li>– организационные мероприятия при компоновке рабочей зоны.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– специальные: должностная инструкция работника, трудовой кодекс РФ;</li> <li>– перечень организационных мероприятий при компоновке рабочей зоны.</li> </ul>
<p><b>2. Производственная безопасность:</b></p> <p>2.1. Анализ выявленных вредных и опасных факторов</p> <p>2.2. Обоснование мероприятий по снижению воздействия</p>	<p>1) Характерные для микробиологической лаборатории опасные и вредные факторы:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Недостаточная освещенность рабочей зоны</li> <li>- Отклонение показателей микроклимата в помещении</li> <li>- Повышенная температура поверхностей, оборудования, материалов</li> <li>- Повышенный уровень ультрафиолетовой радиации</li> <li>- Патогенные микроорганизмы (бактерии) и продукты их жизнедеятельности</li> <li>- Повышенный уровень ультразвука</li> <li>- Электробезопасность</li> <li>- Пожаровзрывоопасность</li> </ul> <p>2) Меры по снижению воздействия выявленных факторов.</p>


<p><b>3. Экологическая безопасность:</b></p>	<p>– анализ воздействия разрабатываемой методики на атмосферу – попадание в атмосферу бактериальных клеток;</p> <p>– анализ воздействия разрабатываемой методики на гидросферу – попадание обезвреживающих агентов, а также непосредственно бактериальной культуры в канализацию;</p> <p>– анализ воздействия разрабатываемой методики на литосферу - бактериальное заражение почв при неправильной утилизации отходов;</p>
<p><b>4. Безопасность в чрезвычайных ситуациях:</b></p>	<p>Перечень наиболее вероятных ЧС:</p> <p>1) Пожар;</p> <p>2) Взрыв.</p> <p>– Разработка плана действий в результате возникшей ЧС и мер по ликвидации её последствий.</p>

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

**Задание выдал консультант:**

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Старший преподаватель ООД ШБИП	Скачкова Лариса Александровна			16.03.2019

**Задание принял к исполнению студент:**

Группа	ФИО	Подпись	Дата
4Д51	Болотова Ксения Викторовна		16.03.2019

## РЕФЕРАТ

Выпускная квалификационная работа 84 листов, 13 рисунков, 22 таблицы, 58 источников.

Ключевые слова: антимикробные пептиды, убиквицидин, радиофармпрепараты, однофотонная эмиссионная компьютерная томография, гнойное воспаление.

Объектом исследования является антимикробные пептиды UBI29-41 и UBI18-35, меченные радиоактивным технецием-99м.

Цель работы: Исследовать селективность и эффективность накопления радиоактивно-меченых пептидов  $^{99m}\text{Tc}$ -DPAH-UBI29-41 и  $^{99m}\text{Tc}$ -DPAH-UBI18-35 *in vivo* на модели травматического остеомиелита у крыс.

В процессе исследования проводились работы по изучению накопления пептидов UBI29-41 и UBI18-35, меченных технецием-99м, на моделях стерильного и гнойного воспаления кости у крыс.

В результате исследования было установлено оптимальное время накопления технеций-99м-меченого пептида UBI29-41 в очаге гнойного воспаления и проанализирована эффективность применения пептидов UBI29-41 и UBI18-35, меченных технецием-99м, для диагностики гнойных воспалительных процессов в кости.

Область применения: дифференциальная диагностика гнойного остеомиелита на ранних стадиях.

Экономическая эффективность: описываемая в работе разработка является экономически эффективной.

В будущем планируется провести доклинические испытания препаратов  $^{99m}\text{Tc}$ -DPAH-UBI29-41 и  $^{99m}\text{Tc}$ -DPAH-UBI18-35.



## **Определения, обозначения, сокращения, нормативные ссылки**

В настоящей работе использованы ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ 12.1.004-91 ССБТ. Пожарная безопасность. Общие требования.

ГОСТ 12.4.009-83 ССБТ. Пожарная техника для защиты объектов.

Основные виды. Размещение и обслуживание.

В данной работе применены следующие термины с соответствующими определениями:

Сокращения и обозначения, использованные в работе:

АМП – антимикробные пептиды

UBI – убиквицидин

KSI – кетостероидизомераза

РФП – радиофармацевтические препараты

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	14
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	16
1.1 Остеомиелит и трудности его диагностирования.....	16
1.1.1 Классификация остеомиелита .....	16
1.1.2 Этиология заболевания .....	16
1.1.3 Диагностика остеомиелита .....	17
1.2 Антимикробные пептиды .....	18
1.2.1 Классификация антимикробных пептидов .....	18
1.2.2 Механизмы действия антимикробных пептидов.....	22
1.2.3 Антимикробные пептиды производные убиквицина и радиофармпрепараты на их основе .....	26
2. ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	28
2.1 Материалы .....	28
3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	30
3.1 Методы.....	30
3.1.1 Стерилизация посуды.....	30
3.1.2. Приготовление сред .....	30
3.1.3. Индукция экспрессии пептида UBI <sub>18-35</sub> в составе белка-слияния с кетостероидизомеразой (KSI).....	30
3.1.4. Аффинная хроматография .....	31
3.1.5. Электрофорез белков в полиакриламидном геле. ....	31
3.1.6. Получение пептида UBI <sub>18-35</sub> .....	32
3.1.7. Электрофорез низкомолекулярных белков и пептидов .....	32
3.2 Получение радифармпрепаратов на основе пептидов UBI.....	33

3.3 Исследование РФП на основе пептидов UBI iv vivo.....	33
3.3.1. Моделирование гнойного остеомиелита.....	33
3.3.2 Оценка диагностической эффективности радиофармацевтических препаратов .....	35
3.4 Статистическая обработка .....	35
4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ .....	36
4.1 Моделирование гнойного остеомиелита.....	36
4.2 Оценка диагностической эффективности <sup>99m</sup> Tc-DPAH-UBI29-41. ....	36
4.2.1 Оценка накопления <sup>99m</sup> Tc-DPAH-UBI29-41 и его распределения в организме животного. ....	36
4.2.2. Трехфазная сцинтиграфия с использованием остеотропного препарата <sup>99m</sup> Tc-пирфотех .....	39
4.2.3. Определение оптимального времени накопления <sup>99m</sup> Tc-DPAH- UBI29-41 для диагностики.....	40
4.2.4. Оценка накопления <sup>99m</sup> Tc-DPAH-UBI18-35 и его распределения в организме животного. ....	42
5. ФИНАНСОВЫЙ МЕНЕДЖМЕНТ, РЕСУРСОЭФФЕКТИВНОСТЬ И РЕСУРСОСБЕРЕЖЕНИЕ.....	44
5.1 Предпроектный анализ.....	44
5.1.1. Потенциальные потребители результатов исследования.....	44
5.1.2 Анализ конкурентных технических решений.....	45
5.1.3 SWOT-анализ.....	46
5.2. Планирование научно-исследовательских работ .....	49
5.2.1. Структура работ в рамках научного исследования .....	49
5.2.2 Определение трудоемкости выполнения работ.....	50

5.2.3. Разработка графика проведения научного исследования .....	50
5.2.4. Расчет материальных затрат НТИ .....	53
5.2.5 Специальное оборудование для научных (экспериментальных) работ .....	54
5.2.6. Основная заработная плата исполнителей темы .....	55
5.2.7. Дополнительная заработная плана исполнителей темы.....	57
5.2.8.Отчисления во внебюджетные фонды .....	57
5.2.9. Накладные расходы.....	58
5.2.10.Формирование бюджета научно-исследовательского проекта.....	58
5.3 Определение ресурсной (ресурсосберегающей), финансовой, бюджетной, социальной и экономической эффективности исследования.....	59
5.3.1.Интегральный показатель эффективности разработки .....	60
6. СОЦИАЛЬНАЯ ОТВЕТСТВЕННОСТЬ.....	62
6.1. Правовые и организационные вопросы обеспечения безопасности. ...	63
6.2. Производственная безопасность .....	64
6.2.1. Анализ выявленных вредных и опасных факторов.....	65
6.2.1.1.Отклонение показателей микроклимата в помещении .....	65
6.2.1.2. Недостаточная освещенность рабочей зоны.....	66
6.2.1.3. Повышенная температура поверхностей, оборудования, материалов.....	66
6.2.1.4. Повышенный уровень ультрафиолетовой радиации.....	67
6.2.1.5 Патогенные микроорганизмы (бактерии) и продукты их жизнедеятельности.....	67
6.2.1.6. Повышенный уровень ультразвука .....	68
6.2.1.6 Электробезопасность.....	68

6.2.1.7. Пожаровзрывоопасность.....	69
6.2.2. Обоснование мероприятий по снижению воздействия.....	69
6.2.2.1.Отклонение показателей микроклимата в помещении. ....	69
6.2.2.2. Недостаточная освещенность рабочей зоны.....	69
6.2.2.3. Повышенная температура поверхностей, оборудования, материала.....	70
6.2.2.4. Повышенный уровень ультрафиолетовой радиации.....	70
6.2.2.5 Патогенные микроорганизмы (бактерии) и продукты их жизнедеятельности.....	70
6.2.2.6. Повышенный уровень ультразвука.....	70
6.2.2.7 Электробезопасность.....	70
6.2.2.8. Пожаровзрывоопасность.....	71
6.3. Экологическая безопасность.....	72
6.4. Безопасность в чрезвычайных ситуациях.....	73
ВЫВОДЫ:.....	76
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	77
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	83
Приложение А.....	83
Приложение Б.....	84

## ВВЕДЕНИЕ

Диагностика остеомиелита и разграничение на асептическое и инфекционное воспаление является актуальной медицинской проблемой. Активно исследуются новые подходы к проведению дифференциальной диагностики заболевания, которая позволит верно поставить диагноз и начать своевременное лечение.

Радиоактивно-меченные пептиды благодаря способности селективно связываться с патогенными микроорганизмами могут быть успешно использованы для дифференциальной диагностики остеомиелита. Преимуществом использования пептидов по сравнению с другими радиоактивно-мечеными препаратами является их низкая иммуногенность и высокая специфичность.

Антимикробный пептид убиквицидин специфичен по отношению к основному возбудителю остеомиелита *Staphylococcus aureus*. Благодаря электростатическому притяжению катионных пептидов к бактериям достигается высокоселективное накопление его в очаге гнойного воспаления.

**Объектом исследования** являются радиоактивно меченные антимикробные пептиды  $^{99m}\text{Tc}$ -ДРАН-UBI29-41 и  $^{99m}\text{Tc}$ -ДРАН-UBI18-35.

**Цель работы:** Исследовать селективность и эффективность накопления радиоактивно-меченых пептидов  $^{99m}\text{Tc}$ -ДРАН-UBI29-41 и  $^{99m}\text{Tc}$ -ДРАН-UBI18-35 *in vivo* на модели травматического остеомиелита у крыс.

### **Задачи:**

1. Исследовать накопление пептидов UBI29-41 и UBI18-35, меченных технецием- $^{99m}$ , на моделях стерильного и гнойного воспаления кости у крыс.
2. Установить оптимальное время накопления технеций- $^{99m}$ -меченого пептида UBI29-41 в очаге гнойного воспаления.

3. Проанализировать эффективность применения пептидов UBI29-41 и UBI18-35, меченных технецием-99м, для диагностики гнойных воспалительных процессов в кости.
4. Провести анализ экономической эффективности разработки;
5. Оценить экологическую безопасность проведения исследования, условия труда и риски, связанные с проведением исследования.

# 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

## 1.1 Остеомиелит и трудности его диагностирования

Остеомиелит является гнойно-некротическим процессом, развивающимся в костной ткани, надкостнице и костном мозге. Этот процесс не ограничивается только патологическими изменениями в кости, также в него вовлекаются окружающие мягкие ткани, происходит нарушение кровоснабжения ткани на фоне инфекционного процесса и механических повреждений.

### 1.1.1 Классификация остеомиелита

В зависимости от характера течения и выраженности болезни различают острый и хронический остеомиелит. По форме заболевания различают: асептический и инфекционный остеомиелит. Также на основе этиологического фактора инфекционные остеомиелиты делят на два вида: раневые или травматические, которые возникают вследствие различного вида открытых травм (переломы, инфекции, проникающие в кость при ранении). В свою очередь асептические остеомиелиты возникают в основном вследствие закрытых переломов, а также после таких хирургических вмешательств, как интрамедуллярный остеосинтез.[1]

Несмотря на применение современных антисептических и антибактериальных средств после хирургических вмешательств частота развития инфекции остается практически неизменной. Это связано с тем, что в последние годы все больше микроорганизмов способны стать возбудителями остеомиелита. Это в первую очередь обуславливается экологической обстановкой и реактивностью микро- и макро- организмов.[2]

### 1.1.2 Этиология заболевания

Видовой состав возбудителей остеомиелита включают в себя прежде всего коагулазоположительный (*Staphylococcus aureus*) и



коагулазоотрицательные виды стафилококков (*S. saprophyticus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. sciuri*, *S. cohnii*). Так же в последнее время возросла встречаемость метициллинрезистентного стафилококка. На сегодняшний момент она составляет 25 % среди больных с хроническим остеомиелитом.

Штаммы родов *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Klebsiella pneumoniae* могут находиться во внутрибольничной флоре и имеют способность формировать бактериальную пленку с индивидуальными видовыми отличиями, что характеризует их патогенность. С помощью белков способных к адгезии, бактерии легко колонизируют тканях. Стандартное лечение может быть затруднено из-за полирезистентной устойчивости к антибактериальной терапии.[3]

Состав флоры инфекционных очагов остеомиелита постоянно видоизменяется, происходит рост резистентности к антибактериальным препаратам, процент больных с моноинфекцией снижается. Наблюдается также тенденция к росту патогенной активности таких микроорганизмов как энтерококки, бактериоиды, пептококки и другие.[4]

### **1.1.3 Диагностика остеомиелита**

Остеомиелит до настоящего времени является одним из самых тяжелых и широко распространенных заболеваний. Ранняя диагностика данного заболевания имеет ряд трудностей

Основой диагностики при остеомиелите является рентгенография, так как на обзорной рентгенографии можно оценить состояние мягких тканей, суставных поверхностей кости, выраженность остеопороза в зоне воспаления, истончение костных балок и костный рисунок. Однако первые признаки деструкции кости проявляются не ранее десятых суток после начала заболевания, что не позволяет оперативно диагностировать болезнь данным методом. Учитывая то что, рентгенография отображает состояние только минеральной составляющей кости, для получения более

детализированной информации о состоянии тканей используют методы компьютерной томографии (КТ) и магнитно-резонансной томографии (МРТ).[5]

КТ часто рассматривается как относительно простой и быстрый способ получения информации, сильной стороной этого метода является возможность оценки эрозии и деминерализации кости. МРТ является превосходным методом визуализации для оценки точного анатомического местоположения очага остеомиелита и степени повреждения мягких тканей. Кроме того, использование МРТ сканирования не сопряжено с радиационной нагрузкой на пациента. [6]

Начальный период остеомиелита является самым трудным для диагностирования, так как на данном этапе в качестве симптома проявляется только боль в пораженной конечности, другие проявления болезни либо отсутствуют, либо выражены очень слабо. Именно в этот период высока вероятность ошибок, которые мешают раннему выявлению болезни и своевременному предотвращению перехода болезни из острой стадии в хроническую.

Большинство методов диагностирования также не позволяют дифференцировать воспаление на стерильное и инфекционное и выявить возбудителя заболевания. Как правило эти методы обнаруживают воспаление, инициируемое иммунными клетками, как реакцию инфицированных тканей на инфекционный процесс, а не визуализируют непосредственно присутствие возбудителя инфекции.[7]

## **1.2 Антимикробные пептиды**

### **1.2.1 Классификация антимикробных пептидов**

Повышение специфичности сцинтиграфии контрастного агента может быть достигнуто за счет создания радиофармпрепарата (РФП) на основе антимикробных пептидов. Антимикробные пептиды (АМП) – представляют собой класс гетерогенных соединений, обнаруживаемых в различных

организмах в том числе и в организме человека. Они могут быть цитотоксичны для бактерий, но являются нетоксичными по отношению к клеткам организма человека.

Существует немало причин, благодаря которым АМП являются интересными объектами для исследований. АМП являются ключевыми компонентами врожденной иммунной системы, их использование решает задачу преодоления устойчивости микроорганизмов к антибиотикам и открывает возможности раннего диагностирования многих заболеваний.[8]

Первый противомикробный пептид – лизоцим был открыт Александром Флемингом в 1922 году. Однако АМП были мало исследованы до открытия цекропинов, дефензинов и магайнинов.[9]

Существует несколько подходов классификаций АМП. Например, пептиды могут быть классифицированы на основе механизма биосинтеза. Некоторые пептиды синтезируются мультиферментными системами, в то время как большинство АМП кодируются генами. Экспрессия и деградация АМП строго регулируется, поскольку избыточная или недостаточная экспрессия АМП может вызвать проблемы.[10] АМП могут быть также классифицированы на основе молекулярных мишеней (например, пептиды, нацеленные на мембрану или проникающие внутрь клетки).[11]

Являясь ключевыми молекулами врожденного иммунитета, АМП можно квалифицировать на основании выполняемых функций: антибактериальные, противовирусные, антигрибковые. Кроме того, некоторые АМП могут обладать противоопухолевой активностью, способствовать заживлению ран и модулировать иммунный ответ.

Согласно базе данных AMD (the Antimicrobial Peptide Database), только небольшая популяция АМП (13%) имеет известную трехмерную структуру, в первую очередь определяемую методом спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР) в растворе.[12] Пептиды, чья трехмерная структура известна можно разделить на семейства:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\alpha\beta$  и non- $\alpha\beta$ , их схемы представлены на Рисунке 1. Пептиды  $\alpha$ -семейства имеют  $\alpha$ -спиральную структуру, в  $\beta$ -семейство характеризуется наличием по меньшей мере двух  $\beta$ -

складчатых структур в молекуле. Семейство  $\alpha\beta$  содержит как  $\alpha$ -, так и  $\beta$ -структуры, тогда как семейство без  $\alpha\beta$  не имеет ни  $\alpha$ , ни  $\beta$ -структуры.

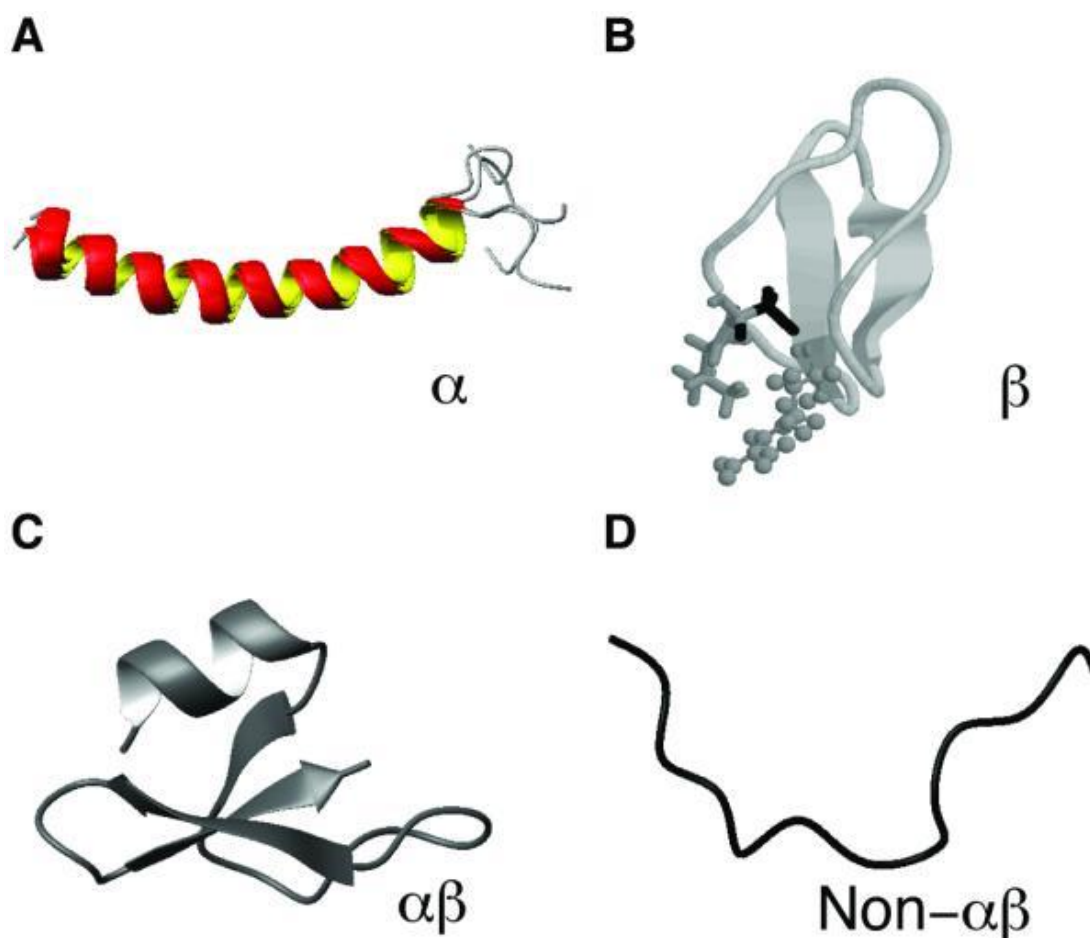


Рисунок 1 - Семейства антимикробных пептидов, выделяемые на основе структуры[11]

Поскольку только небольшое количество АМП имеет трехмерную структуру, была предложена универсальная классификация АМП на основе паттернов пептидных связей, которая не зависит от трехмерной структуры, источника пептида или активности. Данная классификация основана на способе соединения полипептидных связей. Класс I включает в себя линейные пептиды, которые могут быть химически модифицированы за счет амидирования, гликозилирования, присоединения сульфата, фосфата, бромида к аминокислотам боковых цепей или даже основных цепей. Однако такие модификации для АМП класса I не приводят к цепным связям между различными аминокислотами.

Класс II охватывает все АМП с химическими связями между различными пептидными боковыми цепями. К ним относятся лантибиотики (тиоэфирные кольца) и семейство дефензинов (дисульфидные связи). В широком смысле, это может быть любой тип химической связи между двумя аминокислотами. Когда два или более пептида работают вместе, они принадлежат к этому классу до тех пор, пока любая из полипептидных цепей содержит соединение боковой цепи.

АМП класса III должны обладать химической связью между пептидной боковой цепью и основной цепью. Это может быть любой тип химической связи между боковой цепью одной аминокислоты и главной цепью другой аминокислоты.

Класс IV состоит из кольцевых пептидов, где между амино- и карбоксильными концами пептидного остова образуется пептидная связь. Эти кольцевые пептиды могут содержать дополнительные модификации, такие как дисульфидные связи. Примерами являются энтероцин AS-48 выделенные из бактерий, циклотиды растений и  $\theta$ -дефензины приматов.

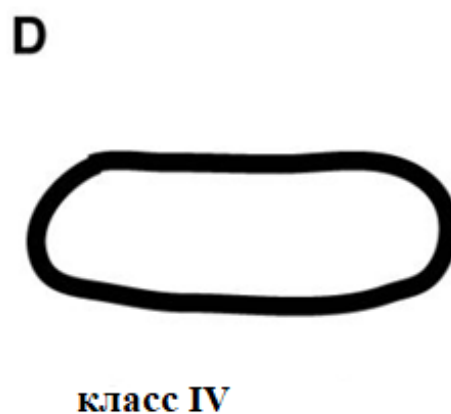
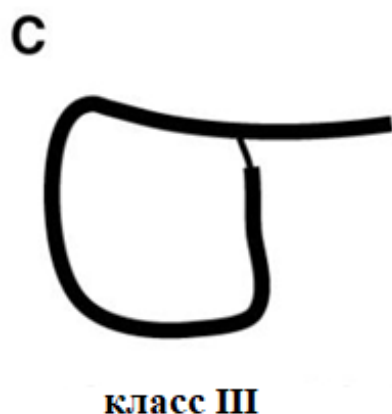
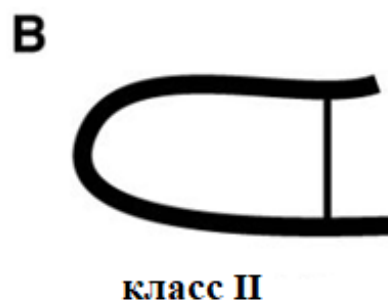
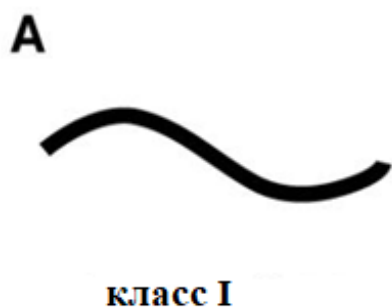


Рисунок 2 - Классы антимикробных пептидов, выделенные на основе паттернов связей в полипептидной цепи [13] (А) линейные полипептидные цепи (например, LL-37 и магайнины); (В) пептиды, связанные с боковой цепью, такие как дефензины и лантибиотики; (С) полипептидные цепи со связью боковой цепи и основной цепи; и (D) циклические пептиды (например, циклотиды).

### 1.2.2 Механизмы действия антимикробных пептидов

Антимикробные пептиды являются уникальными молекулами, и их механизм действия был тщательно изучен с момента их открытия. Изучение механизма действия АМП важен для дальнейшего создания на их основе лекарств и РФП для диагностирования болезней. Изначально считалось, что встраивание АМП в мембрану является единственным механизмом действия АМП на клетки бактерий. Однако сейчас появляется все больше доказательств того, что у АМП есть и другие механизмы антимикробного действия.[14]

Механизмы действия АМП можно разделить на два класса: прямой, за счет проникновения в мембрану, и иммунная модуляция.[14]

Большинство АМП позвоночных и беспозвоночных взаимодействуют непосредственно с мембраной без специфического взаимодействия с рецепторами. Данные АМП обычно активны *in vitro* против бактерий в микромолярных концентрациях [15] и функционируют, взаимодействуя с компонентами мембраны. Внешняя поверхность грамположительных и грамотрицательных бактерий содержит тейхоевые кислоты и липополисахариды, которые создают отрицательный заряд на поверхности, обеспечивая электростатическое притяжение с катионными АМП.[16]

Важно и то, что в основе селективного связывания АМП с микробными клетками лежит фундаментальное различие в строении

между бактериальной мембраной и мембраной многоклеточных животных. Внешний слой липидного бислоя в бактериальных мембранах несет отрицательный заряд. В противоположность бактериям, внешний слой мембраны эукариотических клеток состоит из цвиттерионных фосфолипидов, которые заряжены нейтрально. Большинство липидов с отрицательным зарядом находятся во внутреннем слое, обращенном в цитоплазму. АМП активно взаимодействуют с отрицательно заряженными фосфолипидами за счет электростатического притяжения.[17]

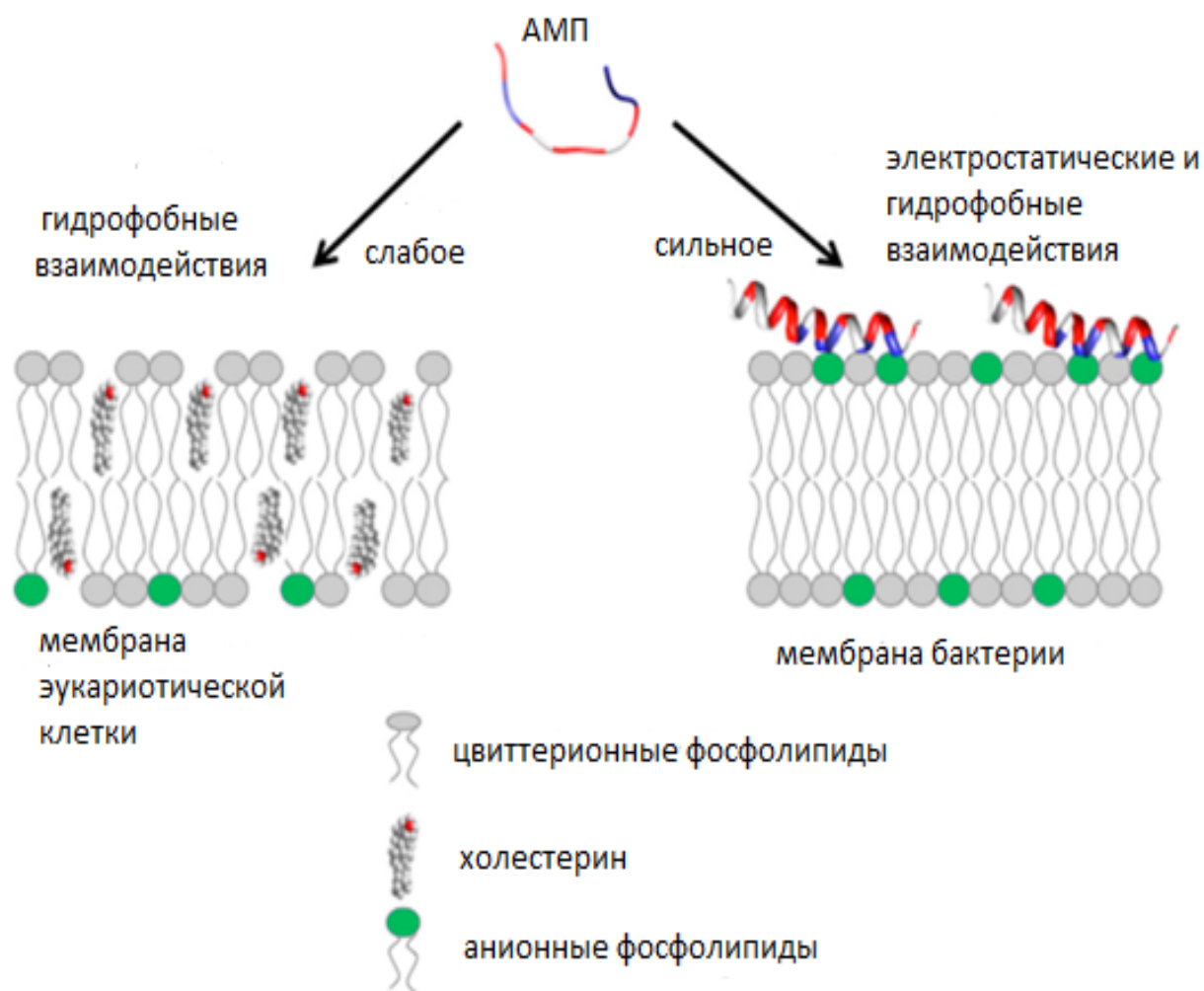


Рисунок 3 Взаимодействие катионных АМП с мембраной животной (слева) и бактериальной (справа) клетки. [18]

В результате электростатического притяжения АМП накапливаются на поверхности и, после достижения определенной концентрации, самоорганизуются на бактериальной мембране. На данном этапе происходят процессы, которые можно классифицировать на трансмембранные пористые и непористые. Модели трансмембранных пор подразделяются на две группы: модель бочарных пор и модель тороидальных пор.

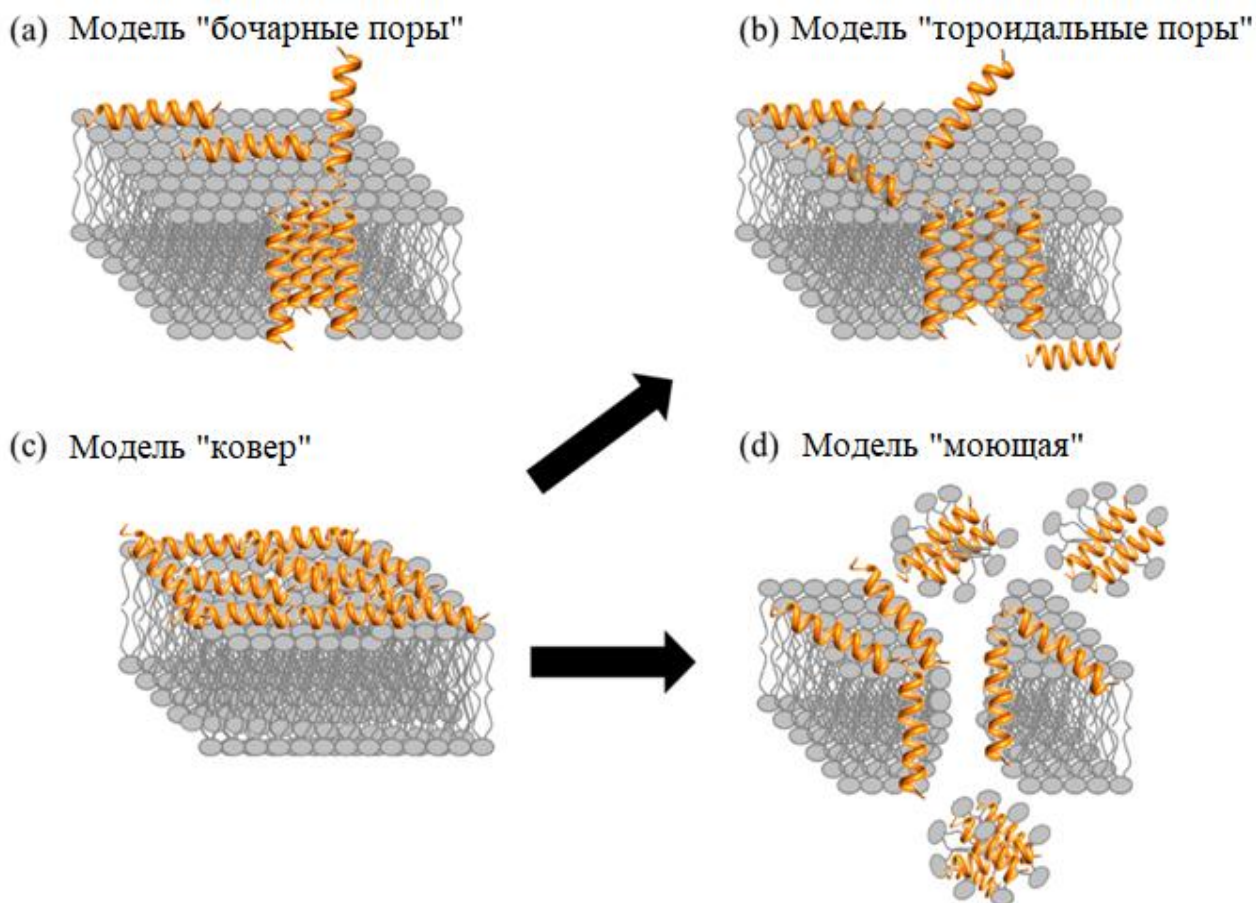


Рисунок 4. Предполагаемые механизмы действия АМП с мембраной бактериальной клетки.[18]

В модели бочарных пор АМП первоначально ориентированы параллельно мембране, но в конечном итоге встраиваются перпендикулярно в липидный бислой. Пептидная амфипатическая структура имеет важное значение в этом механизме порообразования, поскольку гидрофобные области взаимодействуют с липидами мембраны, а гидрофильные остатки образуют просвет каналов.[19]



Однако совсем немногие АМП образуют бочкообразные каналы. Среди них можно отметить нерибосомально синтезирующийся пептидный антибиотик аламетицин[20] который получают из гриба *Trichoderma viride*.

В тороидальной модели пептиды также встраиваются перпендикулярно в липидный бислой. Отличительной особенностью этой модели по сравнению с бочкообразной порой является сетчатое расположение бислоя: в бочкообразной поре гидрофобное и гидрофильное расположение липидов сохраняется, тогда как в тороидальных порах гидрофобное и гидрофильное расположение бислоя нарушается. При тороидальной модели есть возможность проникновения пептида в цитоплазму, что несет потенциальную угрозу целостности внутриклеточных компонентов.[21]

Ряд таких АМП как магайнин, лактицин и мелитин образуют тороидальные поры.[20]

АМП также могут действовать без образования специфических пор в мембране. Такой механизм действия пептидов описывает модель «ковра». В этом случае АМП адсорбируются параллельно липидному бислою и достигают пороговой концентрации, чтобы покрыть поверхность мембраны, образуя тем самым «ковер». Это приводит к неблагоприятным процессам на поверхности мембраны, в результате которых целостность мембраны нарушается, что приводит к преобразованию ее в мицеллы. Окончательный распад мембранной бислоевой структуры на мицеллы также известен как «моющая» модель. Многие пептиды действуют как противомикробные агенты, несмотря на их специфический аминокислотный состав или длину последовательности. Такие АМП обычно действуют по модели ковра[15] и оказывают эффект в высоких концентрациях из-за их амфифильной природы. Примерами АМП, действующими по модели «ковра», являются аураин[22].

В дополнение к приведенным выше моделям существуют и другие модели, такие как модель Shai-Huang-Matsuzuki, модель межфазной активности и модель электропорации .[23]

В дополнение к прямому цитотоксическому эффекту на микробов, АМП также могут рекрутировать и активировать иммунные клетки, что приводит к усиленному уничтожению микробов или развитию воспаления.[24]

### **1.2.3 Антимикробные пептиды производные убиквицидина и радиофармпрепараты на их основе**

Так как мембрана бактериальной клетки состоит из фосфолипидов с отрицательным зарядом, АМП убиквицидин адсорбируется на положительно заряженной поверхности бактерии в результате электростатического притяжения.[25] Данное свойство АМП стало особенно полезно для повышения специфичности РФП.

Убиквицидин - антимикробный пептид массой 6654 Да катионной природы. Было доказано, что убиквицидин обладает выраженной антимикробной активностью против *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *S. aureus* и авирулентного штамма *Yersinia enterocolitica*. [26] Благодаря специфическому воздействию на *S. aureus* меченный контрастной меткой убиквицидин отлично подходит для дифференцированной диагностики остеомиелита, так как аккумулируется в очаге инфекции и указывает на наличие патогенных микроорганизмов.

Радиоактивно меченные пептиды активно исследуются для использования в выявлении различных инфекционных процессов, так как они способны специфически накапливаясь в очаге инфекции.[27]

Так при диагностике скелетно-мышечных инфекций с помощью РФП на основе  $^{99m}\text{Tc}$ -УВІ (29-41) была продемонстрирована высокая точность диагностирования инфекции методом ОФЭКТ у пациентов, которая составила 94,5 %.[28] В другом исследовании  $^{99m}\text{Tc}$ -УВІ (29-41) успешно использовали в качестве дополнения к сканированию кости с метилендифосфонатом для дифференциальной диагностики асептического и инфекционного воспаления у пациентов с болезненными протезами.  $^{99m}\text{Tc}$ -

УВІ (29-41) продемонстрував накоплення в очагах інфекції с оптимальним часом візуалізації через 20–60 хвилин для оцінки розшарування протеза.[29]

## 2. ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1 Материалы

**2.1.1. Приборы:** лабораторная термостатируемая качалка (КТ 103), ламинарный бокс II класса, генератор чешуйчатого льда (PORKKA), термостат-инкубатор с естественной конвекцией (Memmert), сухожаровый шкаф (Binder), центрифуга с охлаждением (Sigma), низкотемпературный холодильник (Sanyo), настольная центрифуга (Eppendorf), автоматические дозаторы переменного объема (0,5-10 мкл, 10-50 мкл, 100-1000 мкл, 1-10 мл) (Ленпипет), вертикальная камера для электрофореза Mini-PROTEAN TetraCell (BioRad), источник тока (Biorad), система гель-документирования (G:BOX Chemi; XT4), аналитические весы (Adventure), лиофильная сушка (Labconco FreeZone), система однофотонной эмиссионной компьютерной томографии (ОФЭКТ «Philips BrightView»).

**2.1.2. Расходные материалы:** одноразовые пластиковые наконечники (200 мкл, 1000 мкл, 10 мл), одноразовые пластиковые чашки Петри, эппендорфы (1,5 мл, 2.5 мл), пластиковые пробирки (15 мл, 50 мл).

**2.1.3. Рабочие материалы:** штамм *Escherichia coli* Rossetta DE3 pLysS pET31b(+)-2xUBI18-35, *Staphylococcus aureus* номер в коллекции B-7520, штамм ATCC 19258. Ампициллин – 50 мг/мл, рабочая концентрация 1:1000.

Изопропил-бета-D-тиогалактопиранозид (ИПТГ) (Helicon), набор белковых маркеров M31 (СибЭнзим), набор низкомолекулярных белковых маркеров (Spectra Multicolor Low Range Protein Ladder, Thermo Scientific), CNBr (Acros Organics), муравьиная кислота (Fluka), желатин, золетил, липополисахарид (LPS), физраствор.

Радиофармпрепараты:  $^{99m}\text{Tc}$ -DPAH-UBI29-41,  $^{99m}\text{Tc}$ -DPAH-UBI29-41,  $^{99m}\text{Tc}$ -пирфотех (ООО «Диамед», Россия).

**Использованные среды:** LB Broth - Miller (Amresco), агар бактериологический (Helicon)

**Растворы для электрофореза белков:**

30 % АКА (37,5:1) – акриламид: N'N'-метилен-бисакриламид (30 % Т, 2,67 % С); 1,5 М трис-НСl, рН 8.8; 0,5 М трис-НСl, рН 6.8; 10 % (w/v) SDS; 10 % (w/v) персульфат аммония; 5х буфер для проб (62,5 мМ трис-НСl, рН 6.8, 20 % глицерин, 2 % SDS, 5 % β-меркаптэтанол); 1х рабочий буфер (25 мМ трис, 192 мМ глицин, 0,1 % SDS, рН 8.3); фиксатор (10 % ТХУ); красящий раствор (25 % (v/v) изопропанол, 10 % (v/v) ледяная уксусная кислота, 0,25 % (w/v) Кумасси R-250); отмывочный раствор (7 % (v/v) ледяная уксусная кислота, 10 % (v/v) изопропанол).

**Растворы для электрофореза низкомолекулярных белков и пептидов:**

Анодный буфер (200 мМ трис-НСl, рН 8.9); катодный буфер (100 мМ Трис-НСl, 100 мМ трицин (рН должен быть в районе 8.25), SDS до 0.1 %); буфер для геля (3 М трис-НСl, рН 8.45); сток акриламида АА<sub>концентрирующий</sub> (48 % акриламида, 1.5 % бис-акриламида); сток акриламида АА<sub>разделяющий</sub> (46.5 % акриламида, 3.0 % бис-акриламида); 2х буфер для проб (200 мМ трис-НСl, рН 6.8, 40 % глицерин, 2 % SDS, 2 % β-меркаптоэтанол, 0.04 % Кумасси G-250); раствор для фиксации (40 % изопропанол, 10 % уксусная кислота); раствор для окрашивания геля (10 % уксусная кислота, 0,025 % Кумасси G-250); раствор для отмывки (10 % уксусная кислота).

**Буферы для очистки пептида в составе белка-слияния методом металл-аффинной хроматографии:** отмывочный буфер (50 мМ трис НСl, 100 мМ NaCl, рН 8.0); раствор лизоцима (10 мг/мл); лизирующий и промывочный буфер (40 мМ трис-НСl, 500 мМ NaCl, 15мМ имидазол, 8М мочевины, рН 8.0); элюирующий буфер (40 мМ трис-НСl, 500 мМ NaCl, 300 мМ имидазол, 8 М мочевины, рН 8.0)

## 5. ФИНАНСОВЫЙ МЕНЕДЖМЕНТ, РЕСУРСОЭФФЕКТИВНОСТЬ И РЕСУРСОСБЕРЕЖЕНИЕ

### 5.1 Предпроектный анализ

#### 5.1.1. Потенциальные потребители результатов исследования

В ядерной медицине существует несколько стандартных протоколов для визуализации бактериальных инфекций с использованием рутинно применяемых в клинической практике контрастных агентов, и ряда новых препаратов, находящихся на стадии клинических исследований.

Однако наиболее перспективным и точным радиофармпрепаратом является меченный  $^{99m}\text{Tc}$  антимикробный пептид убиквицидин, который показывает хорошие результаты при дифференциальной диагностики гнойного остеомиелита. На сегодняшний момент в России отсутствует производство пептидных диагностических РФП на основе  $^{99m}\text{Tc}$ .

Наименование организаций	Классы радиофармацевтических препаратов			
	Радиоактивно-меченные антибиотики	Радиоактивно-меченные аутологичные лейкоциты	Радиоактивно-меченные антимикробные пептиды	Прочие РФП
ИМГ РАН				
МГМУ				
СибГМУ				

Рисунок 12 - Карта сегментирования рынка РФП

### 5.1.2 Анализ конкурентных технических решений

В последнее время на мировом рынке производство и сбыт радиофармпрепаратов стандартной номенклатуры уменьшаются с каждым годом, это связано с возникновением и продвижением на рынке новых, более эффективных препаратов. Политика ведущих компаний в области ядерной медицины направлена на разработку новых молекул (или модификацию и совершенствование уже существующих) и дальнейшее введение их в производство. Радиоактивно меченные АМП являются сравнительно новыми РФП и редко используемыми при диагностировании заболеваний. Это связано, в первую очередь с тем, что химический синтез таких препаратов является высокзатратным, а микробиологический путь производства требует совершенствования существующих технологических линий, а также замену морально устаревшего оборудования.

Таблица 2 - Оценочная карта для сравнения конкурентных технических решений (разработок)

Критерии оценки	Вес критерия	Баллы			Конкурентоспособность		
		Б <sub>ф</sub>	Б <sub>к1</sub>	Б <sub>к2</sub>	К <sub>ф</sub>	К <sub>к1</sub>	К <sub>к2</sub>
1	2	3	4	5	6	7	8
<b>Технические критерии оценки ресурсоэффективности</b>							
1. Эффективность диагностики	0,12	5	4	4	0,6	0,48	0,48
2. Отсутствие токсичности	0,1	5	3	3	0,5	0,3	0,3
3. Отсутствие иммунобиологической реакции	0,1	5	4	4	0,5	0,4	0,4
4. Отсутствие интоксикации	0,09	5	4	4	0,45	0,36	0,36
5. Отсутствие побочных эффектов	0,1	5	4	4	0,5	0,4	0,4
6. Простота производства	0,08	4	3	3	0,32	0,24	0,24

Продолжение таблицы 2

<b>Экономические критерии оценки эффективности</b>							
1. Конкурентоспособность продукта	0,06	5	4	4	0,3	0,24	0,24
2. Уровень проникновения на рынок	0,06	3	5	5	0,18	0,3	0,3
3. Цена	0,08	4	5	4	0,32	0,4	0,32
4. Финансирование научной разработки	0,09	4	4	4	0,36	0,36	0,36
5. Срок выхода на рынок	0,06	4	5	5	0,24	0,3	0,3
6. Наличие сертификации разработки	0,06	5	5	5	0,3	0,3	0,3
<b>Итого</b>	<b>1</b>	<b>54</b>	<b>50</b>	<b>49</b>	<b>4,57</b>	<b>4,08</b>	<b>4</b>

K1 – Радиоактивно-меченные антибиотики

K2 – Радиоактивно-меченные аутологичные лейкоциты

Получаемый препарат является конкурентоспособным по многим параметрам, особенно по отсутствию побочных, токсичных и иммунобиологических реакций. Являясь частью защитной системы организма, антимикробные пептиды синтезируются в различных органах человеческого тела, этим и обусловлено отсутствие вредных побочных эффектов. Однако по таким параметрам, как уровень проникновения, а также срок выхода на рынок данный продукт уступает уже существующим радиофармпрепаратам, так как является совершенно новым видом РФП и не имеет широкого распространения на мировом рынке, а в основном применяется в некоторых диагностических методах, лабораторных и клинических исследованиях.

### 5.1.3 SWOT-анализ

Для проведения комплексной оценки научно-исследовательского проекта воспользуемся инструментом SWOT-анализа и интерактивной матрицей проекта. **SWOT** позволяет оценить Strengths (сильные стороны), Weaknesses (слабые стороны), Opportunities (возможности) и Threats (угрозы). Результаты **SWOT** анализа представлены в таблице 3



Таблица 3 - SWOT-анализ

	<p><b>Сильные стороны научно-исследовательского проекта:</b>  С1. Получение нового типа РФП  С2. Экономическая эффективность по сравнению с существующим методом производства  С3. Экологичность технологии  С4. Наличие бюджетного финансирования.  С5. Квалифицированный персонал.</p>	<p><b>Слабые стороны научно-исследовательского проекта:</b>  Сл1. Отсутствие прототипа научной разработки  Сл2. Отсутствие необходимого оборудования для проведения испытания опытного образца  Сл4. Дороговизна научного исследования (в рамках лаборатории)  Сл5. Длительность поставки реактивов используемых при проведении научного исследования</p>
<p><b>Возможности:</b>  В1. Использование инновационной инфраструктуры ТПУ  В2. Сотрудничество с СибГМУ ЦНИЛ  В3. Использование оборудования и реактивов СибГМУ ЦНИЛ  В4. Участие в грантах</p>		
<p><b>Угрозы:</b>  У1. Отсутствие спроса на новые технологии у производства  У2. Ограничения на экспорт технологии  У4. Введение дополнительных государственных требований к сертификации продукции  У5. Отсутствие предприятия в Томске, которое могло бы провести масштабирование и опробовать методику.</p>		

Для оценки вариантов стратегического выбора составим интерактивную матрицу проекта (табл 4.):

Таблица 4 – интерактивная матрица проекта

Сильные стороны проекта						
Возможности проекта		C1	C2	C3	C4	C5
	B1	+	-	-	+	-
	B2	+	+	0	+	+
	B3	+	+	0	-	0
	B4	+	+	0	+	+

Анализ интерактивной таблицы: B1C1C4; B2B4C2C4C5; B3C1C2.

Итоговая матрица SWOT-анализа (табл. 5.).

Таблица 5 - SWOT-анализ

	<p><b>Сильные стороны :</b>            С1. Получение нового типа РФП            С2. Экономическая эффективность по сравнению с существующим методом производства            С3. Экологичность технологии            С4. Наличие бюджетного финансирования.            С5. Квалифицированный персонал.</p>	<p><b>Слабые стороны :</b>            Сл1. Отсутствие прототипа научной разработки            Сл2. Отсутствие необходимого оборудования для проведения испытания опытного образца            Сл4. Дороговизна научного исследования (в рамках лаборатории)            Сл5. Длительность поставки реактивов используемых при проведении научного исследования</p>
<p><b>Возможности:</b>            В1. Использование инновационной инфраструктуры ТПУ            В2. Сотрудничество с СибГМУ ЦНИЛ            В3. Использование оборудования и реактивов СибГМУ ЦНИЛ            В4. Участие в грантах</p>	<p><b>СиВ</b>            Разработка нового антимикробного РФП</p>	<p><b>СлиВ</b> 1. Приобретение необходимых реактивов и оборудования для проведения экспериментов            2. Участие в грантах для получения дополнительного финансирования</p>

Продолжение таблицы 5

<p>Угрозы:                  У1. Отсутствие спроса на новые технологии у производства                  У2. Ограничения на экспорт технологии                  У3. Введение дополнительных государственных требований к сертификации продукции                  У4. Отсутствие предприятия в Томске, которое могло бы провести масштабирование и опробовать методику.</p>	<p>СиУ                  1. Создание спроса на новые технологии в производстве                  2. Продвижение методики по получению радиоактивно меченного антимикробного пептида в России и, в частности, Томске                  3. Сертификация продукции                  4. Стимулирование инвесторов для создания совершенно новой технологической линии</p>	<p>СЛиУ                  1. Выполнение некоторых видов работ в сотрудничестве с другими НИИ и научными учреждениями Томска                  2. Участие в грантах как возможность дополнительного финансирования для приобретения приборов и материалов                  3. Создание спроса на новые технологии в производстве, стимулирование инвесторов                  4. Доработка методики по ее конкурентным преимуществам                  5. Сертификация продукции</p>
---	--	---

## 5.2. Планирование научно-исследовательских работ

### 5.2.1. Структура работ в рамках научного исследования

Таблица 6 - Структура работ в рамках научного исследования

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	Получение антимикробного пептида	И

Продолжение таблицы 6

Теоретические и экспериментальные исследования	8	Введение радиационно-меченного АМП	И
	9	Оценка визуализации РФП	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

### 5.2.2 Определение трудоемкости выполнения работ

Ожидаемая трудоемкость выполнения:

$$t_{ожі} = \frac{3t_{mini} + 2t_{maxi}}{5} \quad (1)$$

Продолжительность каждой работы в рабочих днях:

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

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

### 5.2.3. Разработка графика проведения научного исследования

Для удобства построения графика, длительность каждого из этапов работ из рабочих дней следует перевести в календарные дни.

Коэффициент календарности определяется по следующей формуле:

$$k_{кал} = \frac{T_{кал}}{T_{кал} - T_{вых} - T_{пр}} = \frac{365}{365 - 52 - 14} = 1,22 \quad (3)$$

$$T_{ki} = T_{pi} \cdot k_{кал} \quad (4)$$

Таблица 7 - Временные показатели проведения научного исследования

Название Работы (Этапы)	Трудоёмкость работ			Исполнители	Длительность работ в рабочих днях $T_{pi}$	Длительность работ в календарных днях $T_{ki}$
	$t_{min}$ , чел-дни	$t_{max}$ , чел-дни	$t_{ожг}$ , чел-дни			
Составление и утверждение технического задания	0,50	1,0	0,70	Р	0,7	0,86
Подбор и изучение материалов по теме	8,00	15,00	10,80	И	10,8	13,18
Выбор направления исследований	0,50	1,00	0,70	Р	0,70	0,94
Календарное планирование работы теме	0,50	1,00	0,70	Р,И	0,35	0,43
Проведение теоретических расчетов	8,00	15,00	10,8	И	10,8	13,18
Построение макетов	0,50	1,00	0,70	Р,И	0,35	0,43
Приготовление АМП	30,00	65,00	44,00	И	44,00	53,68
Введение АМП РФП	0,50	1,0	0,70	Р	0,7	0,86
Оценка результатов	8,00	15,00	10,80	И	10,8	13,18
Сопоставление результатов 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)	15,00	25,00	19	И	19	23,18

Р – руководитель

И – инженер

На основе таблицы 8 был построен календарный план-график в виде диаграммы Ганта

Таблица 8 – Календарный план-график проведения НИОКР по теме

№	Вид работ	Исполнитель	T <sub>кi</sub> , 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	13,18	█	█	█											
3	Выбор напр. исслед.	Р	0,94			█											
4	Календар. планир. работы	Р	0,43			█											
		И	0,43			█											
5	Теор. расч.	И	13,18			█	█	█									
6	Построение макетов	Р	0,43			█											
		И	0,43			█											
7	Получение АМП	И	53,68				█	█	█	█	█						
8	Введение радиационно-меченного АМП	И	0,86									█					
9	Оценка визуализации и РФП	И	13,18									█	█	█			
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	23,18										█	█	█		

█ – Руководитель (Р)

█ – Инженер (И)

#### 5.2.4. Расчет материальных затрат НТИ

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, м<sup>2</sup> и т.д.);

$C_i$  – цена приобретения единицы  $i$ -го вида потребляемых материальных ресурсов (руб./шт., руб./кг, руб./м, руб./м<sup>2</sup> и т.д.);

$k_T$  – коэффициент транспортно-заготовительных расходов (15%).

Таблица 9 – Материальные затраты

Наименование	Единица измерения	Количество	Цена за ед., руб.	Затраты на материалы, (Z <sub>м</sub> ), руб.
LB Broth Miller	250 г.	1 шт.	14028	16132,2
Tris	300 г.	1 шт.	6884,15	7916,77
Triton-X100	100 г.	1 шт.	4868,75	5599,06
NaCl	200 г.	1 шт.	2163	2487,45
NaOH	40 г.	1 шт.	5388,45	6196,72
имидазол	220 г.	1 шт.	59728,63	68687,2
мочевина	8500 г.	1 шт.	9324	10722,6
HCl	80 г.	1 шт.	58639,06	67434,9
лизоцим	10 г.	1 шт.	24069,75	27680,21
NiNTA	200 г.	1 шт.	40473,42	46544,43
CNBr	50 г.	1 шт.	39904,92	45890,66
Лабораторные крысы	1 шт.	12 шт.	2356,0	32761,2
<b>Итого:</b>				<b>338053,4</b>

## 5.2.5 Специальное оборудование для научных (экспериментальных) работ

Затраты, связанные с приобретением специального оборудования (приборов, устройств и механизмов), необходимого для проведения работ по теме представлено в табл. 10.

Таблица 10 - Расчет затрат по статье «Спецоборудование для научных работ»

№ п/п	Наименование оборудования	Кол-во единиц оборудования	Цена единицы оборудования, тыс.руб.	Общая стоимость оборудования, тыс.руб.
1.	Весы аналитические	1	156	156
2.	Вакуумный испаритель	1	760	760
3.	Насос для лиофильной сушки	1	120	120
<b>Всего</b>				<b>1036</b>

Расчет амортизационных отчислений:

Затраты определяются в виде амортизации по формуле:

$$E_{\text{ам}} = \frac{\sum K_{\text{оби}} \cdot N_{\text{оби}} \cdot T_{\text{оби}}}{365 \cdot 100} \quad (6)$$

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

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

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

Таблица 11 - Расчет амортизационных отчислений на спецоборудование для научных работ

№	Наименование оборудования	Цена единицы оборудования, $K_{\text{оби}}$ , тыс.руб	Время использования, $T_{\text{оби}}$ , дни	Норма амортизации, $N_{\text{ами}}$ , %	Сумма амортизационных отчислений, $E_{\text{ам}}$ , тыс.руб.
1	Весы аналитические	156	150	10,4	6,67



Продолжение таблицы 12

2	Вакуумный испаритель	760	125	9	23,4
3	Насос для лиофильной сушки	120	200	8	5,26
<b>Итого</b>					<b>35,33</b>

### 5.2.6. Основная заработная плата исполнителей темы

Статья включает основную заработную плату работников, непосредственно занятых выполнением НИИ, (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.

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

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

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

Основная заработная плата рассчитывается по следующей формуле:

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

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

$T_p$  – продолжительность работ, выполняемых научно-техническим работником, раб. дн. (табл. 8);

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

Среднедневная заработная плата рассчитывается по формуле:

$$Z_{\text{дн}} = \frac{Z_m \cdot M}{F_d} \quad (9)$$

где  $Z_m$  – 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;

Гд – действительный годовой фонд рабочего времени научно-технического персонала, раб. дн. (табл. 12).

Таблица 12 – Баланс рабочего времени

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

Месячный должностной оклад работника:

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

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

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

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

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

Расчет основной заработной платы приведен в таблице 13

Таблица 13 – Расчет основной заработной платы

Исполнители	$Z_{tc}$ , руб.	$k_{пр}$	$k_d$	$k_p$	$Z_m$ , руб.	$Z_{дн}$ , руб.	$T_p$ , раб. дн.	$Z_{осп}$ , руб.
Руководитель	33664	0,3	0,2	1,3	65644,8	2719,9	4	<b>10879,6</b>
Инженер (студент)	26300	0,3	0,2	1,3	51285,0	1939,51	97,2	<b>188 520,37</b>
<b>Итого</b>								<b>199 399,97</b>

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

### 5.2.7. 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:

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

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

$$З_{\text{доп.руководителя}} = 10879,6 \cdot 0,12 = 1\,305,55$$

$$З_{\text{доп.инженера}} = 188\,520,37 \cdot 0,12 = 22\,622,44$$

### 5.2.8. 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:

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

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 14.

Таблица 14 – Отчисления во внебюджетные фонды

Исполнитель	Основная заработная плата, руб.	Дополнительная заработная плата, руб.
Руководитель проекта	10879,6	1 305,55
Инженер (студент)	188 520,37	22 622,44
Коэффициент отчислений во внебюджетные фонды	0,271	
<b>Итого:</b>		<b>60 521,88</b>

### 5.2.9. 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:

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

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

### 5.2.10. 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 15.

Таблица 15 – Расчет бюджета затрат НТИ

Наименование статьи	Сумма, руб.
Материальные затраты НТИ	338 053,4
Амортизация специального оборудования	35330
Затраты по основной заработной плате исполнителей темы	199 399,97
Затраты по дополнительной заработной плате исполнителей темы	23 927,99
Отчисления во внебюджетные фонды	60 521,88
Накладные расходы	105 157,32
<b>Итого бюджет затрат НТИ:</b>	<b>762 390,56</b>

### 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  $I_{\phi}^p$ , - интегральный финансовый показатель разработки;

$\Phi_{pi}$  – стоимость  $i$ -го варианта исполнения;

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

Так как разработка имеет только одно исполнение:

$$I_{\phi}^p = \frac{\Phi_{pi}}{\Phi_{\max}} = 832\,592,89 / 832\,592,89 = 1$$

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 16.

Таблица 16 – Сравнительная оценка характеристик вариантов исполнения проекта

Критерии \ Объект исследования	Весовой коэффициент параметра	Текущий проект
1. Стоимость	0,2	5
2. Удобство в эксплуатации (соответствует требованиям потребителей)	0,15	4
3. Эффективность системы	0,30	4
4. Трудоемкость	0,2	4
5. Надежность	0,15	5
ИТОГО	1	22

$$I_{\text{ит}} = 0,2 \cdot 5 + 0,15 \cdot 4 + 0,3 \cdot 4 + 0,2 \cdot 4 + 0,15 \cdot 5 = 4,35 \quad (16)$$

### 5.3.1. Интегральный показатель эффективности разработки

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

$$I_{\text{исп.1}} = \frac{I_{p-\text{исп.1}}}{I_{\text{финр}}^{\text{исп.1}}} \quad (17)$$

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

Сравнительная эффективность проекта:

$$\mathcal{E}_{\text{ср}} = \frac{I_{\text{исп.1}}}{I_{\text{исп.2}}} \quad (18)$$

Таблица 17 – Сравнительная эффективность разработки

№ п/п	Показатели	Разработка
1	Интегральный финансовый показатель разработки	1
2	Интегральный показатель ресурсоэффективности разработки	4,35
3	Интегральный показатель эффективности	4,35
4	Сравнительная эффективность вариантов исполнения	1

Таким образом, основываясь на определении ресурсосберегающей, финансовой, бюджетной, социальной и экономической эффективности исследования, проведя необходимый сравнительный анализ, можно сделать вывод о превосходстве аналитического метода расчета над аналогами