

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

Школа: Инженерная школа природных ресурсов
 Направление подготовки: Химическая технология
 Отделение школы (НОЦ): Отделение химической инженерии

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Тема работы
Сравнительное исследование конъюгатов с ферментной и серебряной метками методами спектрофотометрии и вольтамперометрии

УДК 547.962.3:615.371:543

Студент

Группа	ФИО	Подпись	Дата
2ДМ93	Лунев Никита Андреевич		

Руководитель ВКР

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент (ОХИ, ИШПР)	Дорожко Е.В	к.х.н.		

КОНСУЛЬТАНТЫ ПО РАЗДЕЛАМ:

По разделу «Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение»

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент	Рыжакина Т.Г	к.э.н.		

По разделу «Социальная ответственность»

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент	Пашков Е.Н	к.т.н.		

ДОПУСТИТЬ К ЗАЩИТЕ:

Руководитель ООП	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент (ОХИ, ИШПР)	Михеева Е.В	к.х.н.		

Томск – 2021 г.

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

Школа: Инженерная школа природных ресурсов
 Направление подготовки: Химическая технология
 Отделение школы (НОЦ): Отделение химической инженерии

УТВЕРЖДАЮ:
 Руководитель ООП

 (Подпись) (Дата) (Ф.И.О.)

ЗАДАНИЕ
на выполнение выпускной квалификационной работы

В форме:

Магистерской диссертации

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

Студенту:

Группа	ФИО
2ДМ93	Луневу Никите Андреевичу

Тема работы:

Сравнительное исследование конъюгатов с ферментной и серебряной метками методами спектрофотометрии и вольтамперометрии	
Утверждена приказом директора (дата, номер)	

Срок сдачи студентом выполненной работы:	16.06.2021
--	------------

ТЕХНИЧЕСКОЕ ЗАДАНИЕ:

<p>Исходные данные к работе</p> <p><i>(наименование объекта исследования или проектирования; производительность или нагрузка; режим работы (непрерывный, периодический, циклический и т. д.); вид сырья или материал изделия; требования к продукту, изделию или процессу; особые требования к особенностям функционирования (эксплуатации) объекта или изделия в плане безопасности эксплуатации, влияния на окружающую среду, энергозатратам; экономический анализ и т. д.).</i></p>	<p>Объектами исследования являются конъюгаты пероксидазы хрена с иммуноглобулинами человека класса G, меченные наночастицами серебра.</p>
---	---

<p>Перечень подлежащих исследованию, проектированию и разработке вопросов <i>(аналитический обзор по литературным источникам с целью выяснения достижений мировой науки техники в рассматриваемой области; постановка задачи исследования, проектирования, конструирования; содержание процедуры исследования, проектирования, конструирования; обсуждение результатов выполненной работы; наименование дополнительных разделов, подлежащих разработке; заключение по работе).</i></p>	<p>В работе проведены сравнительные исследования синтезированных конъюгатов пероксидазы хрена с иммуноглобулинами человека класс G не меченных и меченных наночастицами серебра методами спектрофотометрии и вольтамперометрии; получена сравнительная характеристика каталитических активностей пероксидазных конъюгатов иммуноглобулинов IgG не меченных и меченных наночастицами серебра; проведена апробация пероксидазных конъюгатов иммуноглобулинов IgG меченных наночастицами серебра для определения антител к клещевому боррелиозу (болезнь Лайма) спектрофотометрическим и вольтамперометрическим методами.</p>
<p>Перечень графического материала <i>(с точным указанием обязательных чертежей)</i></p>	<p>Графический материал полученных результатов</p>

<p>Консультанты по разделам выпускной квалификационной работы <i>(с указанием разделов)</i></p>	
<p>Раздел</p>	<p>Консультант</p>
<p>Финансовый менеджмент и ресурсоэффективность</p>	<p>Рыжакина Т. Г</p>
<p>Социальная ответственность</p>	<p>Пашков Е. Н</p>
<p>Выполняемый на иностранном языке</p>	<p>Асадуллина Л.И</p>
<p>Названия разделов, которые должны быть написаны на русском и иностранном языках: Раздел 3. Результаты и обсуждения</p>	

<p>Дата выдачи задания на выполнение выпускной квалификационной работы по линейному графику</p>	<p>25.09.2020</p>
--	-------------------

Задание выдал руководитель:

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент (ОХИ, ИШПР)	Дорожко Е.В.	к.х.н		

Задание принял к исполнению студент:

Группа	ФИО	Подпись	Дата
2ДМ93	Лунев Никита Андреевич		

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

Школа: Инженерная школа природных ресурсов
 Направление подготовки: Химическая технология
 Отделение школы (НОЦ): Отделение химической инженерии
 Период выполнения: (осенний / весенний семестр 2020 /2021 учебного года)

Форма представления работы:

Магистерская диссертация

(бакалаврская работа, дипломный проект/работа, магистерская диссертация)

КАЛЕНДАРНЫЙ РЕЙТИНГ-ПЛАН выполнения выпускной квалификационной работы

Срок сдачи студентом выполненной работы:	16.06.2021
--	------------

Дата контроля	Название раздела (модуля) / вид работы (исследования)	Максимальный балл раздела (модуля)
20.12.2020	<i>Литературный обзор по теме</i>	20
10.02.2021	<i>Методики эксперимента</i>	30
16.04.2021	<i>Обсуждение результатов</i>	50

СОСТАВИЛ:

Руководитель ВКР

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент (ОХИ, ИШПР)	Дорожко Е.В.	к.х.н		

СОГЛАСОВАНО:

Руководитель ООП

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент (ОХИ, ИШПР)	Михеева Е.В.	к.х.н		

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

Студенту:

Группа	ФИО
2ДМ93	Луневу Никите Андреевичу

Школа	Инженерная школа природных ресурсов	Отделение (НОЦ)	Отделение химической инженерии
Уровень образования	Магистратура	Направление/специальность	Химическая технология

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

Сравнительное исследование конъюгатов с ферментной и серебряной метками методами спектрофотометрии и вольтамперометрии	Работа с информацией, представленной в российских и иностранных научных публикациях, аналитических материалах, статических бюллетенях и изданиях, нормативно-правовых документах.
--	---

Перечень вопросов, подлежащих исследованию, проектированию и разработке:

1. Оценка коммерческого потенциала, перспективности и альтернатив проведения научного исследования с позиции ресурсоэффективности и ресурсосбережения.	Проведение предпроектного анализа. Определение целевого рынка и проведение его сегментирования. Выполнение SWOT-анализа проекта
2. Планирование и формирование бюджета разработки	Определение целей и ожиданий, требований проекта. Определение заинтересованных сторон и их ожиданий.
3. Определение ресурсной, финансовой, экономической эффективности разработки.	Проведение сравнительной оценки экономической эффективности, ресурсоэффективности и сравнительной эффективности различных вариантов исполнения

Перечень графического материала:

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

Дата выдачи задания для раздела по линейному графику	31.01.2021
---	------------

Задание выдал консультант:

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент	Рыжакина Татьяна Гавриловна	к.э.н		31.01.2021

Задание принял к исполнению студент:

Группа	ФИО	Подпись	Дата
2ДМ93	Лунев Никита Андреевич		31.01.2021

ЗАДАНИЕ ДЛЯ РАЗДЕЛА «СОЦИАЛЬНАЯ ОТВЕТСТВЕННОСТЬ»

Студенту:

Группа	ФИО
2ДМ93	Лунев Никита Андреевич

Школа	ИШПР	Отделение (НОЦ)	ОХИ
Уровень образования	Магистратура	Направление/специальность	18.04.01 «Химическая технология»

Тема ВКР:

Сравнительное исследование конъюгатов с ферментной и серебряной метками методами спектрофотометрии и вольтамперометрии	
Исходные данные к разделу «Социальная ответственность»:	
1. Характеристика объекта исследования (вещество, материал, прибор, алгоритм, методика, рабочая зона) и области его применения	<p>Объект исследования – конъюгаты пероксидазы хрена с иммуноглобулинами человека класса G₁, меченные наночастицами серебра</p> <p>Приборы – анализатор вольтамперометрический, спектрофотометр, набор реагентов для ИФА по определению болезни Лайма АО «Вектор-Бест», материальное обеспечение лаборатории ОХИ ТПУ.</p> <p>Методика – иммуноферментный анализ.</p> <p>Рабочая зона – лабораторное помещение ОХИ НИ ТПУ.</p> <p>Область применения – фармацевтическая промышленность.</p>
Перечень вопросов, подлежащих исследованию, проектированию и разработке:	
1. Правовые и организационные вопросы обеспечения безопасности: <ul style="list-style-type: none"> – специальные (характерные при эксплуатации объекта исследования, проектируемой рабочей зоны) правовые нормы трудового законодательства; – организационные мероприятия при компоновке рабочей зоны. 	<ul style="list-style-type: none"> - ГОСТ Р 51609-2000 «Изделия медицинские. Классификация в зависимости от потенциального риска применения. Общие требования» - СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней»

	<ul style="list-style-type: none"> - МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения» - «Трудовой кодекс Российской Федерации» от 30.12.2001 N 197-ФЗ (ред. От 01.04.2019) - ГОСТ 12.0.004-90. «Организация обучения безопасности труда». - ПНДФ 12.13.1-03. «Методические рекомендации. Техника безопасности при работе в аналитических лабораториях (общие положения)». - ГОСТ 12.2.032-78 ССБТ «Рабочее место при выполнении работ сидя. Общие эргономические требования». - ГОСТ 12.2.033-78 ССБТ «Рабочее место при выполнении работ стоя. Общие эргономические требования»
<p>2. Производственная безопасность: 2.1. Анализ выявленных вредных и опасных факторов 2.2. Обоснование мероприятий по снижению воздействия</p>	<p>Работник подвержен воздействию следующих вредных и опасных факторов:</p> <ul style="list-style-type: none"> - повышенная температура поверхностей оборудования и материалов; - токсическое влияние химических веществ; - повышенный уровень статического электричества и электромагнитного излучения; - недостаточная освещенность рабочей зоны; - несоответствующие нормативам параметры микроклимата.
<p>3. Экологическая безопасность:</p>	<ul style="list-style-type: none"> – Для атмосферы представляют опасность выбросы загрязняющих веществ, выходящих из вытяжного шкафа. – Для гидросферы представляют опасность необезвреженные жидкие органические, неорганические и биологические отходы. – Для литосферы представляют опасность неправильно утилизированные твердые химические отходы, содержащие опасные вещества.
<p>4. Безопасность в чрезвычайных ситуациях:</p>	<p>Возможные ЧС при разработке и эксплуатации проектируемого решения:</p> <ul style="list-style-type: none"> – возгорание оборудования; – выход оборудования из строя; – ухудшение состояния исследователя; – утечка растворов кислоты. <p>Наиболее типичной ЧС является возгорание вследствие короткого замыкания</p>

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

Задание выдал консультант:

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент	Пашков Е.Н	К.Т.Н		

Задание принял к исполнению студент:

Группа	ФИО	Подпись	Дата
2ДМ93	Лунев Никита Андреевич		

18.04.01 - Химическая технология

Анализ и контроль в химических и фармацевтических производствах

Планируемые результаты освоения

Код	Результат обучения	Требования ФГОС ВО, СУОС, критериев АИОР, и/или заинтересованных сторон
Общие по направлению подготовки		
P1	Применять глубокие естественно-научные, математические и инженерные знания для создания новых материалов	Требования ФГОС ВО, СУОС ТПУ (ОПК-3, ПК-1, 2, 3), Критерий 5 АИОР (п. 2.1, 2.10), согласованный с требованиями международных стандартов EURACE и FEANI.
P2	Использовать глубокие знания в области современных технологий химического производства для решения междисциплинарных инженерных задач	Требования ФГОС ВО, СУОС ТПУ (ПК - 2, 4-7, ОПК-3), Критерий 5 АИОР (п. 2.1, 2.2), согласованный с требованиями международных стандартов EUR-ACE и FEANI
P3	Ставить и решать инновационные задачи инженерного анализа, связанные с созданием материалов и изделий, с использованием системного анализа и моделирования объектов и процессов химической технологии	Требования ФГОС ВО, СУОС ТПУ (ПК-2, 14), Критерий 5 АИОР (п. 2.1), согласованный с требованиями международных стандартов EURACE и FEAN
P4	Разрабатывать химико-технологические процессы, проектировать и использовать новое оборудование для создания материалов, конкурентоспособных на мировом рынке	Требования ФГОС ВО, СУОС ТПУ (ПК-4, 5, 6), Критерий 5 АИОР (п. 2.3), согласованный с требованиями международных стандартов EURACE и FEANI.
P5	Проводить теоретические и экспериментальные исследования в области создания новых материалов, современных химических технологий, нанотехнологий	Требования ФГОС ВО, СУОС ТПУ (ПК-1, 3), Критерий 5 АИОР (п. 2.4), согласованный с требованиями международных стандартов EURACE и FEAN
P6	Внедрять, эксплуатировать современные высокотехнологичные линии автоматизированного производства, обеспечивать их высокую эффективность, соблюдать правила охраны здоровья и безопасности труда на химическом производстве, выполнять требования по защите окружающей среды	Требования ФГОС ВО, СУОС ТПУ (ПК-4-7), Критерий 5 АИОР (п. 2.5), согласованный с требованиями международных стандартов EURACE и FEANI
Универсальные компетенции		

P7	Использовать глубокие знания по проектному менеджменту для ведения инновационной инженерной деятельности с учетом юридических аспектов защиты интеллектуальной собственности	Требования ФГОС ВО, СУОС ТПУ (УК-1, ПК-8, 13), Критерий 5 АИОР (п. 3.1), согласованный с требованиями международных стандартов EUR-ACE и FEANI
P8	Активно владеть иностранным языком на уровне, позволяющем работать в иноязычной среде, разрабатывать документацию, презентовать и защищать результаты инновационной инженерной деятельности	Требования ФГОС ВО, СУОС ТПУ (УК-4, ОПК-1, ОПК-5), Критерий 5 АИОР (п. 3.2), согласованный с требованиями международных стандартов EURACE и FEANI
P9	Эффективно работать индивидуально, в качестве члена и руководителя группы, состоящей из специалистов различных направлений и квалификаций, демонстрировать ответственность за результаты работы и готовность следовать корпоративной культуре организации	Требования ФГОС ВО, СУОС ТПУ (УК-3, ПК-9, ОПК-2), Критерий 5 АИОР (п. 3.3), согласованный с требованиями международных стандартов EURACE и FEANI
P10	Демонстрировать глубокие знания социальных, этических и культурных аспектов инновационной инженерной деятельности, компетентность в вопросах устойчивого развития	Требования ФГОС ВО, СУОС ТПУ (УК-3, ПК-6, 10), Критерий 5 АИОР (п. 3.4, 3.5), согласованный с требованиями международных стандартов EURACE и FEANI
P11	Самостоятельно учиться и непрерывно повышать квалификацию в течение всего периода профессиональной деятельности	Требования ФГОС ВО, СУОС ТПУ (УК-6, ПК-11), Критерий 5 АИОР (3.6), согласованный с 9 требованиями международных стандартов EURACE и FEANI.
Профиль Анализ и контроль в химических и фармацевтических производствах		
P12	Применять глубокие знания в области разработки современных технологий химикофармацевтического и биотехнологического производства для решения междисциплинарных инженерных задач	Требования ФГОС ВО, СУОС ТПУ (УК-1, ОПК-3, ПК-1, 2, 3), Критерий 5 АИОР (п. 2.1, 2.10), согласованный с требованиями международных стандартов EUR-ACE и FEANI, требования профессиональных стандартов (40.010 Специалист по техническому контролю качества продукции).

РЕФЕРАТ

Выпускная квалификационная работа 141 с., 40 рисунков, 51 таблиц, 48 источников, 1 приложение.

Ключевые слова: наночастицы серебра, биоконъюгаты, иммуноферментный анализ.

Объектами исследования являются конъюгаты пероксидазы хрена с иммуноглобулинами человека класса G, меченные наночастицами серебра.

Цель работы: исследовать спектрофотометрические и вольтамперометрические свойства конъюгата пероксидазы хрена с иммуноглобулинами IgG и наночастицами серебра.

В процессе исследования были синтезированы наночастицы серебра и их конъюгаты.

В работе проведены сравнительные исследования синтезированных конъюгатов пероксидазы хрена с иммуноглобулинами человека класс G не меченных и меченных наночастицами серебра методами спектрофотометрии и вольтамперометрии; получена сравнительная характеристика каталитических активностей пероксидазных конъюгатов иммуноглобулинов IgG не меченных и меченных наночастицами серебра; проведена апробация пероксидазных конъюгатов иммуноглобулинов IgG меченных наночастицами серебра для определения антител к клещевому боррелиозу (болезнь Лайма) спектрофотометрическим и вольтамперометрическим методами.

Степень внедрения: данная работа находится на стадии научного исследования

Область применения: медицинские и диагностические учреждения

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

НЧ – наночастицы

АГ- антиген

АТ-антитело

ПХ – пероксидаза хрена

ТМБ - тетраметилбензидин

ПХК-АТ – конъюгат пероксидазы хрена с иммуноглобулинами IgG

ПХК-АТ*Ag - конъюгат пероксидазы хрена с иммуноглобулинами IgG,

меченный НЧ серебра

ИФА – иммуноферментный анализ

ИВА- инверсионная анодная вольтамперометрия

ПДУ – предельно допустимые уровни

ЧС – чрезвычайные ситуации

Оглавление	
РЕФЕРАТ	12
ВВЕДЕНИЕ.....	18
Глава 1. Литературный обзор.....	20
1.1 Получение ферментных конъюгатов.....	20
1.1.1 Перйодатный метод	20
1.1.2 Гомобифункциональные сшивающие реагенты	21
1.1.3 Геторобифункциональные сшивающие реагенты	22
1.2 Способы оценки активности конъюгатов на основе пероксидазы хрена	
23	
1.3 Синтез биоконъюгатов на основе наночастиц металлов.....	25
1.3.1 Не ковалентный синтез биокнъюгатов на основе наночастиц	
металлов	26
1.3.2 Способы регистрации электрохимического сигнала от наночастиц	
серебра.....	29
1.4 Классификация методов ИФА	33
1.4.1 Гомогенные методы ИФА	35
1.4.2 Гетерогенные методы ИФА	35
1.4.3 Конкурентный метод ИФА	36
1.4.4 Неконкурентный метод ИФА	36
1.5 Субстраты и способы детектирования в методах ИФА	37
1.6 Болезнь Лайма: общие сведения и способы диагностики.....	39
Глава 2 Материалы и методы исследования	41
2.1 Приборы и оборудование	41
2.2 Реактивы.....	41
2.3 Объект исследования	42

2.4 Методы исследования.....	42
2.4.1 Методика очистки иммуноглобулинов класса IgG	42
2.4.2 Методика получения ПХК-АТ.....	43
Схема получения конъюгата пероксидазы хрена с иммуноглобулинами IgG (ПХК-АТ):	43
2.4.3 Методика получения наночастиц серебра.....	43
2.4.4 Методика подбора количества наночастиц серебра по отношению к конъюгату ПХК-АТ – тест с хлоридом натрия.....	44
2.4.5 Методика получения ПХК-АТ*Ag.....	46
2.4.7 Методика приготовления растворов тетраметилбензидина.....	46
2.4.7 Методика приготовления раствора пероксидазы хрена.....	47
2.4.8 Методика записи спектров поглощения ПХ, ПХК-АТ*Ag и ПХК-АТ	47
2.4.9 Методика проведения ИФА по выявлению иммуноглобулинов класса G к возбудителям иксодовых клещевых боррелиозов	49
2.4.10 Методика вольтамперометрического детектирования ПХК-АТ*Ag	50
Глава 3 Обсуждение результатов	52
3.1 Каталитическая активность не конъюгированной пероксидазы хрена (ПХ)	52
3.2 Каталитическая активность ПХК-АТ	57
3.3 Каталитическая активность ПХК-АТ*Ag	62
3.4 Сравнение каталитической активности ПХ, ПХ-АТ и ПХ-АТ*Ag	68
3.5 Сравнительные испытания ПХК-АТ и ПХК-АТ*Ag для определения антител к боррелиозу	69
3.6 Вольтамперометрическое определение серебряной метки пероксидазного конъюгата.....	70

Глава 4 Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение.....	74
4.1 Предпроектный анализ	74
4.1.1 Потенциальные потребители результатов исследования	74
4.1.2 Анализ конкурентных технических решений с позиции ресурсоэффективности и ресурсосбережения.....	75
4.1.3 SWOT-анализ.....	76
4.1.4 Оценка готовности проекта к коммерциализации.....	80
4.1.5 Метод коммерциализации результатов научно-технического исследования.....	83
4.2 Инициация проекта	83
4.3 Планирование управления научно-техническим проектом.....	85
4.3.1 Иерархическая структура работ проекта	85
4.3.2 План проекта.....	86
4.4 Бюджет научного исследования	88
4.4.1 Организационная структура проекта	97
4.4.2 План управления коммуникациями проекта.....	97
4.4.3 Реестр рисков проекта	98
4.5 Определение ресурсной (ресурсосберегающей), финансовой, бюджетной, социальной и экономической эффективности	99
4.5.1 Оценка абсолютной эффективности исследования.....	99
4.5.2 Оценка сравнительной эффективности исследования	104
Глава 5 Социальная ответственность.....	108
Введение.....	108
5.1 Правовые и организационные вопросы обеспечения безопасности ...	108

5.2 Производственная безопасность	109
5.2.1 Анализ опасных и вредных производственных факторов и обоснование мероприятий по снижению уровней их воздействия на исследователя (работающего).....	111
5.3 Экологическая безопасность.....	119
5.3.1 Анализ влияния объекта и процесса исследования на окружающую среду	119
5.3.2 Мероприятия по защите окружающей среды	120
5.4 Безопасность в чрезвычайных ситуациях.....	121
5.4.1 Анализ вероятных ЧС, которые могут возникнуть в лаборатории при проведении исследований	121
5.4.2 Обоснование мероприятий по предотвращению ЧС и разработка порядка действия в случае возникновения ЧС	122
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	125
Список используемых источников.....	126
ПРИЛОЖЕНИЕ А	130

ВВЕДЕНИЕ

Научно исследовательская работа (НИР) связана с получением и исследованием конъюгатов пероксидазы хрена с иммуноглобулинами класса G, меченные наночастицами серебра (ПХК-АТ*Ag), которые были использованы для определения антител к клещевому боррелиозу (болезнь Лайма). Введение коллоидного серебра в состав пероксидазного конъюгата способствует его увеличению времени жизни и возможности регистрации вольтамперометрического сигнала серебра - электрохимической метки конъюгата.

Объектами исследования в данной работе являются конъюгаты пероксидазы хрена с иммуноглобулинами человека класса G, меченные наночастицами серебра.

Цель исследования: исследовать спектрофотометрические и вольтамперометрические свойства конъюгата пероксидазы хрена с иммуноглобулинами IgG и наночастицами серебра для задач иммуноанализа.

Задачи исследования:

- 1) Синтезировать конъюгат ПХК-АТ методом периодатного ковалентного сшивания;
- 2) Синтезировать конъюгат ПХК-АТ*Ag;
- 3) Исследовать каталитическую активность конъюгатов ПХК-АТ и ПХК-АТ*Ag, в отношении ТМБ методом спектрофотометрии;
- 4) Провести сравнительные испытания конъюгатов ПХК-АТ и ПХК-АТ*Ag по определению клещевого боррелиоза методом ИФА;
- 5) Использовать конъюгат ПХК-АТ*Ag для вольтамперометрического определения иммуноглобулинов человека класса G к клещевому боррелиозу через регистрацию сигнала окисления серебряной метки;

- б) Сформулировать рекомендации по использованию конъюгата ПХК-АТ*Ag для иммуноанализа антител методами спектрофотометрии и вольтамперометрии.

Научная новизна работы

Впервые синтезирован конъюгат пероксидазы хрена с иммуноглобулинами класса G, меченный наночастицами серебра (ПХК-АТ*Ag). Конъюгат ПХК-АТ*Ag использовали для спектрофотометрического и вольтамперометрического определения иммуноглобулинов человека класса G к клещевому боррелиозу.

Реализация и апробация работы

Исследования находятся на стадии поисковых научно-исследовательских работ. Апробация конъюгата ПХК-АТ*Ag проведена методом ИФА с использованием контрольных положительных образцов иммуноглобулинов человека класса G к клещевому боррелиозу и контрольных отрицательных образцов. Регистрацию аналитических сигналов осуществляли спектрофотометрическим и вольтамперометрическим способами.

Глава 1. Литературный обзор

1.1 Получение ферментных конъюгатов

В иммуноферментном анализе используют биоконъюгаты, состоящие из молекул белка, меченные ферментной меткой. Белок, входящий в состав конъюгата, должен сохранять свою иммунологическую активность, а ферментная метка не должна быть инактивирована. Это условие выполняется при правильном подборе соотношения белок-фермент, которое должно составлять 1:1. Возникают стерические препятствия проведения иммунной реакции, за счет увеличения числа молекул фермента. Недостаток числа молекул фермента приводит к снижению его активности, что не позволяет провести эффективную ферментную реакцию.

Широко распространённым методом очистки биоконъюгатов от растворителей и других примесей является диализ, реже применяется гельфильтрация или аффинная хроматография [1].

Выделяют два вида биоконъюгатов по типу сшивающих реагентов – это гомобифункциональные и гетеробифункциональные. Одним из самых распространённых химических методов получения биоконъюгатов является периодатный метод. Однако существуют и нехимические методы получения биоконъюгатов, основой которых является связь антигена с антителом.

1.1.1 Периодатный метод

Этот метод был разработан японскими учеными Накане и Каваои. Основная цель этого метода - получение биоконъюгатов пероксидазы хрена с иммуноглобулинами. Метод основан на образовании активных альдегидных групп в молекуле пероксидазы хрена (рис. 1) [2].

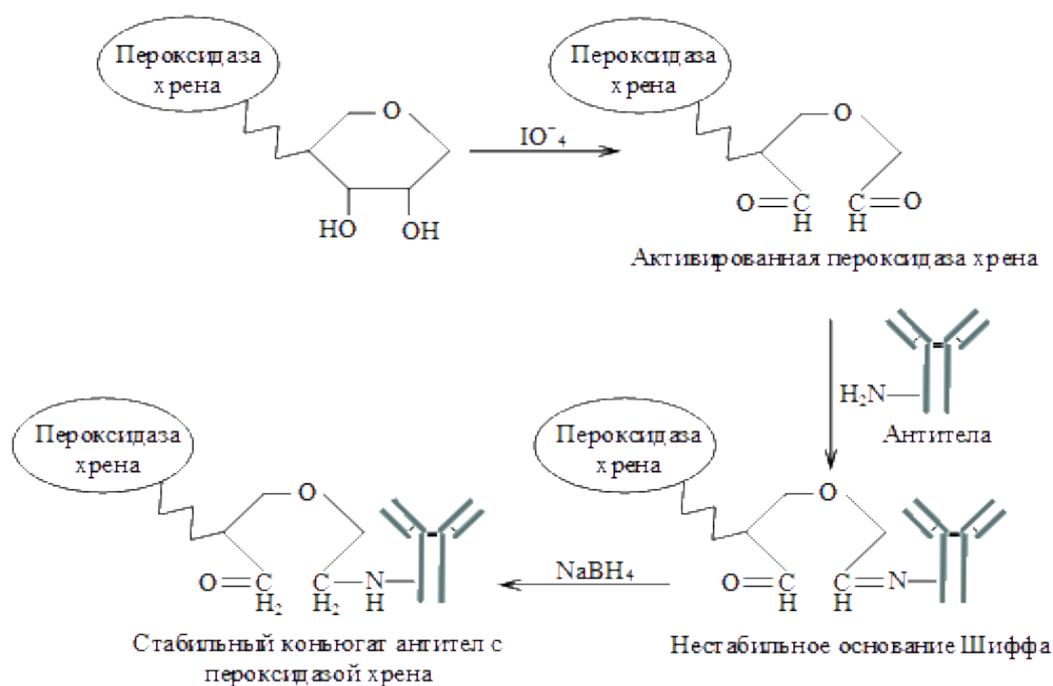


Рисунок 1 – Схема периодатного метода [2]

Окисление полисахаридных цепей пероксидазы хрена периодатом натрия приводит к образованию активных альдегидных групп. Альдегидные группы взаимодействуют с аминогруппами иммуноглобулинов, что приводит к образованию нестабильных оснований Шиффа. Полученные основания стабилизируются путем восстановления их боргидридом натрия [2].

1.1.2 Гомобифункциональные сшивающие реагенты

В литературных источниках имеются данные о применении таких гомобифункциональных сшивающих реагентах, как глутаровый альдегид п-бензохинон, и N,N'-о-фенилендималеид [3].

Рассмотрим получение биконъюгатов с использованием глутарового альдегида в качестве гомобифункционального сшивающего реагента.

Сущность метода заключается в способности данного реагента вступать во взаимодействие с ϵ -аминогруппами лизиновых остатков антител и ферментной метки. В отличие от метода, описанного выше, химические связи получаются более прочными.

Схема реакции получения биоконъюгата [3]:

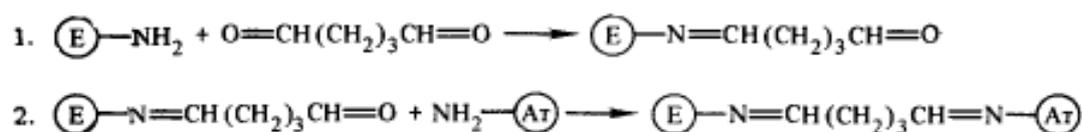


Рисунок 2- Схема реакции с глутаровым альдегидом [3]

Реакция протекает в одну или в две стадии. Для реакции в одну стадию реагент добавляют непосредственно в белково-ферментную смесь. При протекании реакции в две стадии сначала проводится модифицирование фермента реагентом, а после добавление его к белку [3].

Использование глутарового альдегида возможно с такими ферментами, как глюкоамилазой, щелочной фосфотазой и пероксидазой хрена. Преимуществами данного метода являются его простота и способность получить продукт, удовлетворяющий требованиям. Однако данный метод имеет невысокий выход биоконъюгата.

1.1.3 Гетеробифункциональные сшивающие реагенты

В литературных источниках имеются данные о применении таких гетеробифункциональных сшивающих реагентах, как N-оксисукцинимидный эфир m-малеимидобензойной кислоты, N-оксисукцинимидный эфир 4-йодацетил аминобензойной кислоты, N-оксисукцинимидный эфир 3(-2-пиридилдитио) пропионовой кислоты [4].

Рассмотрим получение биконъюгатов с использованием N-оксисукцинимидный эфир 3(-2-пиридилдитио) пропионовой кислоты, сокращено SPDP, в качестве гетеробифункционального сшивающего реагента. Сущность метода состоит в модифицировании молекул иммуноглобулинов класса IgG и молекул пероксидазы хрена, путем введения в них 2-пиридилсульфидных групп реагента SPDP. Модифицированные молекулы иммуноглобулинов IgG восстанавливаются дитиотреитолом до SH-

производного, которое взаимодействует с ранее модифицированным ферментом через дисульфидный обмен.

Схема реакции получения биоконъюгата [4]:

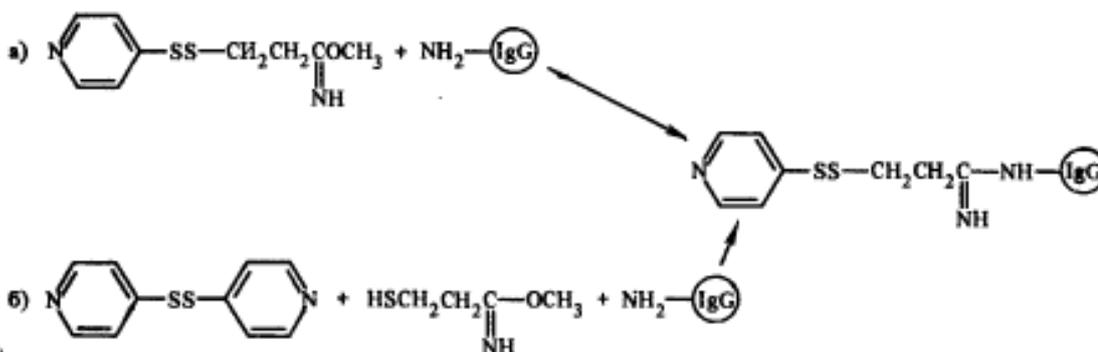


Рисунок 3- Биконъюгирование с использованием реагента SPDP [4]

1.2 Способы оценки активности конъюгатов на основе пероксидазы хрена

Каталитическая характеристика конъюгатов пероксидазы хрена зависит от их кинетических констант, которые связывают скорость реакции с концентрацией субстрата в соответствии с уравнением Михаэлиса-Ментена. В протоколе «Стандартизованные процедуры для определения каталитической активности и кинетики пероксидазоподобных нанозимов» описываются процедуры оценки кинетики колориметрических реакций, катализируемых пероксидазой хрена, в присутствии различных концентраций субстрата [5].

Определяют каталитические константы из кинетических кривых Михаэлиса-Ментена (рисунок 4) [5], которые были получены путем подбора скорости реакции, за счет изменения концентрации субстрата.

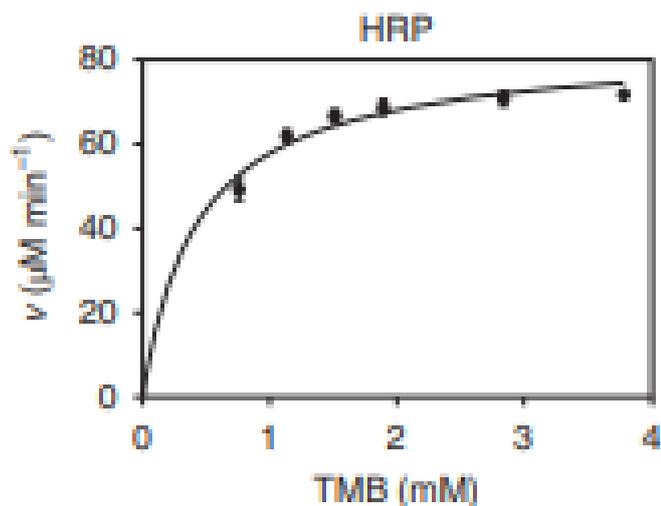


Рисунок 4 – Кинетическая кривая Михаэлиса-Ментена для пероксидазы хрена в отношении ТМБ [5]

Каталитические константы: k_{cat} / K_m – каталитическая эффективность, K_m – специфичность субстрата, k_{cat} – каталитическая константа скорости и v_{max} – максимальная скорость реакции. Оценка активности конъюгатов на основе пероксидазы хрена ведется на сравнении численных значений данных констант.

Схема проведения оценки каталитической активности пероксидазных конъюгатов на основе протокола [6]:

1. Растворите 10 мкг фермента в 2 мл натрий-ацетатного буфера НАс – NaAc (0,2 М, рН 3,6).
2. Добавьте различные объемы (от 0 до 100 мкл) исходного раствора ТМБ (10 мг / мл в ДМСО) к реакционной смеси в различных пробирках.
3. Добавьте H_2O_2 в реакционную смесь до конечной концентрации 1 М.
4. Смешайте образцы, поместите их в водяную баню с температурой 37 °С и запишите начальную скорость изменения оптической плотности при 652 нм (т. е. $\Delta A / \Delta t$, относительные единицы оптической плотности в минуту). Постройте график зависимости поглощения при 652 нм от времени реакции, чтобы получить кривую времени реакции.

5. Преобразуйте скорость увеличения абсорбции в концентрации субстрата, выраженные в микромолях в минуту (т.е. скорость каталитической реакции, v), и постройте график зависимости от концентраций субстрата, чтобы получить кривую Михаэлиса-Ментена (рисунок 4).
6. Рассчитайте кинетические константы v_{max} и K_m , подгоняя значения скорости реакции и концентрации субстрата к уравнению Михаэлиса – Ментена следующим образом:

$$v = \frac{v_{max} * [S]}{K_m * [S]}$$

где v - начальная скорость реакции, а v_{max} - максимальная скорость реакции, которая наблюдается при насыщающих концентрациях субстрата. $[S]$ - концентрация субстрата, а K_m - постоянная Михаэлиса. K_m отражает сродство фермента к его субстрату и определяется как концентрация субстрата при половинной максимальной скорости.

7. Рассчитайте каталитическую константу (k_{cat}), используя следующее уравнение:

$$k_{cat} = \frac{v_{max}}{[E]}$$

где k_{cat} - константа скорости, определяющая максимальное количество молекул субстрата, преобразованных в продукт за единицу времени. $[E]$ - концентрация фермента (М).

1.3 Синтез биоконъюгатов на основе наночастиц металлов

Методы получения биоконъюгатов описанные в разделах 1.1.2-1.1.3, с использованием гетеробифункциональных и гомобифункциональных сшивающих реагентов, применимы не только для создания ковалентной связи между белком и ферментной меткой, но и также применимы для синтеза белка с меткой, состоящей из наночастиц металла, например, серебро или золото. Из

литературных источников известно, что существуют нехимические методы синтеза конъюгатов, основанные на образовании не ковалентной связи между молекулами белков и наночастицами металла.

1.3.1 Не ковалентный синтез биоконъюгатов на основе наночастиц металлов

Метод физической адсорбции является одним из самых простых способов получения биоконъюгатов, который основывается на силах притяжения (Ван-дер-ваальсовых силах), водородных связях, гидрофобных и электростатических взаимодействиях [7]. Физическая адсорбция подразумевает прямую связь, которая не включает никакой химической модификации между антителами и наночастицами и происходит путем простого смешивания двух компонентов, приводящей к иммобилизации. Метод физической адсорбции был успешно применён Танака и соавторами [8], которые показывают иммобилизацию моноклональных антител на поверхности НЧ золота путем физической адсорбции без участия каких-либо химических соединений. Полученные биоконъюгаты затем использовались в качестве метки в иммуносенсорах для обнаружения антител к хорионическому гонадотропину (ХГЧ) и простатспецифического антигена (ПСА) в сыворотке крови человека.

В другом исследовании Соколов и соавторы [9], используют НЧ золота для конъюгирования с анти-эпидермальным фактором роста (анти-EGFR), и иммуноглобулином класса G (IgG), посредством физических взаимодействий. Понижая изоэлектрическую точку (pI) антител IgG, они смогли получить необратимые и высокостабильные биоконъюгаты. Данные биоконъюгаты нашли применение для маркировки раковых клеток шейки матки и продемонстрировали в 50 раз более высокую светорассеивающую способность по сравнению с немечеными раковыми клетками шейки матки.

Иммобилизация антител на НЧ серебра была описана авторами [10]. В работе представлены различные протоколы для успешной иммобилизации антител на НЧ серебра методом физической адсорбции и изучено, как изменение условий отражается на конечном биоконъюгате. Ван и соавторы [11] разработали высокоспецифичный электрохимический иммуносенсор для анализа раковых клеток с использованием маркировки наночастицами серебра, меди и палладия. В протоколе к данной публикации описано, что инкубация металлических НЧ с антителами проводилась при комнатной температуре, что приводило к адсорбции антитела на поверхности НЧ металла посредством ионных и гидрофобных взаимодействий.

В большинстве работ используются протоколы биоконъюгации основанные на комбинации электростатических и гидрофобных взаимодействий между антителом и поверхностью НЧ серебра или золота. Данные биоконъюгаты находят широкое применение в области разработок электрохимических иммуносенсоров.

На рисунке изображено схематическое представление нековалентных взаимодействий между отрицательно/положительно заряженными НЧ и антителами, опосредованных электростатическими притяжениями, приводящими к образованию биоконъюгатов антитело–наночастица (Рис. 5).

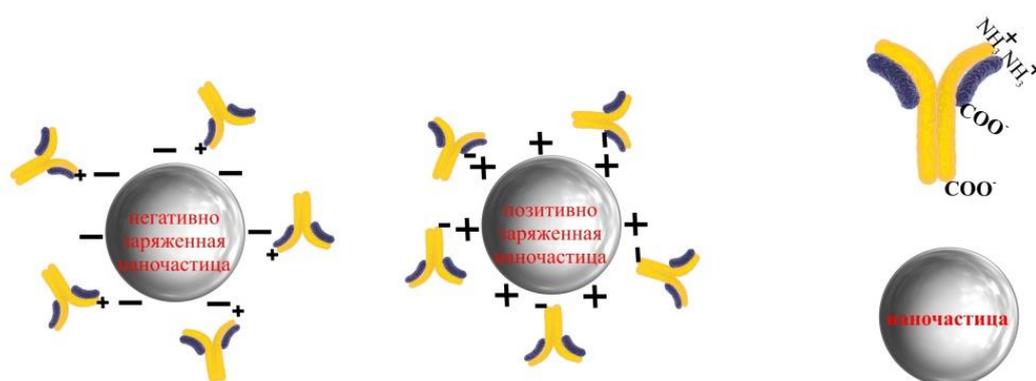


Рисунок 5 – Схематическое представление нековалентных взаимодействий антитело–наночастица

Положительные и отрицательные заряды, присутствующие на аминокислотах антител, служат якорями при их взаимодействии с поверхностью наночастиц. Даже небольшое изменение pH приведет к демобилизации антител из наночастиц [12], поэтому важно контролировать pH раствора опираясь на изоэлектрические точки антител и наночастиц.

При применении метода физической адсорбции необходимо учитывать факт, что существует также высокая вероятность неспецифической адсорбции белков в сыворотке крови, что объясняется наличием свободных заряженных функциональных групп на поверхности наночастиц [13]. Возможные преимущества и недостатки применения метода физической адсорбции отображены в таблице .

Таблица 1 – Различные стратегии синтеза биоконъюгатов антитело-наночастица методом физической адсорбции: преимущества и недостатки

Стратегия	Участвующие функциональные группы	Преимущества	Недостатки
Гидрофобные взаимодействия	Гидрофобные группы аминокислот	Простой механизм соединения между молекулами	Изменение 3D-конформации молекулы антитела, приводящее к его денатурации антител Плохая воспроизводимость
Электростатическая адсорбция	Преимущественно N ^{H₃⁺} и COO ⁻	Не требует активации антител и наночастиц Быстрое взаимодействие	Сильно зависит от окружающей среды и наличия заряженных групп Взаимодействия сильно зависят от pH Изменяется в зависимости от физических свойств наночастицы
Водородная связь	Донорно-акцепторные группы для образования водородной связи	Легкий Универсальный Нет необходимости модифицировать антитело	Обратимая конъюгация Плохая воспроизводимость

Из таблицы видно, что физически адсорбционный подход обладает некоторыми недостатками, например, гидрофобные взаимодействия могут

приводить к изменению трехмерной конформации антител, что приводит к необратимой денатурации или антитела при длительном взаимодействии с гидрофобными наночастицами могут терять биологическую активность и тем самым приводить к снижению специфичности [14]. Однако, исследований, изучающих данные эффекты ограниченное количество. Проведенный обзор литературы показывает, что существуют успешные примеры использования биоконъюгатов полученных методом физической адсорбции и, несмотря на все недостатки, физическая конъюгация проста в реализации и требует минимальный расход химических реагентов.

1.3.2 Способы регистрации электрохимического сигнала от наночастиц серебра

Для регистрации электрохимического сигнала наночастиц серебра используется инверсионная вольтамперометрия. Для получения аналитического сигнала необходимы правильно подобранные условия проведения анализа. В диссертационной работе «Разработка электрохимического иммуносенсора на основе наночастиц серебра для определения антител к вирусу клещевого энцефалита» под авторством Христуновой Е.П были описаны условия детектирования электрохимического сигнала от наночастиц серебра методами катодной инверсионной вольтамперметрии и анодной инверсионной вольтамперметрии.

В работе Христуновой Е.П была продемонстрирована зависимость значений определяемой силы тока при записи вольтапмерограмм от типа растворителя, использованного для растворения НЧ серебра (рисунок 6) [15].

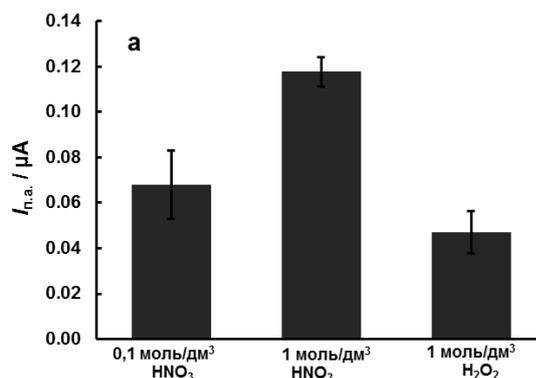


Рисунок 6 – Сравнение значений силы тока от типа растворителя для НЧ серебра [15]

Таким образом, исследование указывает на то, что наибольшая сила тока достигается при растворении НЧ серебра 1 моль/дм³ HNO_3 .

Электрохимические сигналы, получаемые от НЧ серебра, напрямую зависят от накопления ионов серебра на поверхностях электродов. Для получения аналитического сигнала необходимо правильно подобрать значения потенциала E_n и времени накопления t_n . В работе Христуновой Е.П. был исследован диапазон потенциала от 0,4 В до -1,0 В (рисунок 7) [15].

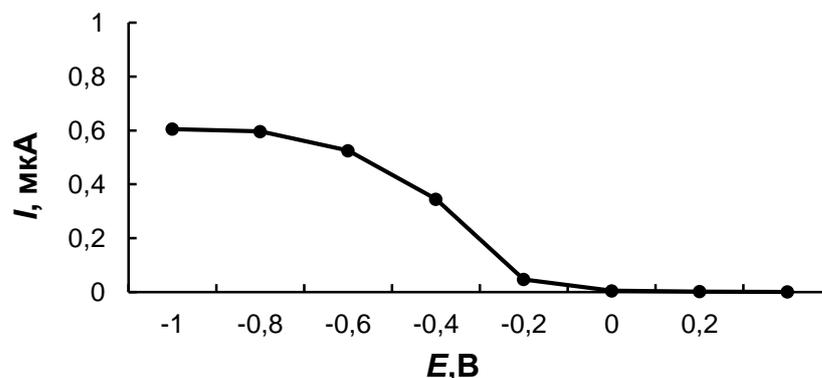


Рисунок 7 —Диапазон потенциалов накопления в постоянно токовой инверсионной вольтамперометрии НЧ серебра [15].

Из рисунка 7 можно сделать выводы о том, что аналитический сигнал от НЧ серебра возрастает при переходе потенциала накопления из положительной области значений в отрицательную, а также при $E_n = -0,6$ В

происходит насыщение. Таким образом, оптимальное значение для E_n является $-0,6$ В [16]. Для правильного подбора t_n был изучен диапазон 0 до 60 с (рисунок 8) [15].

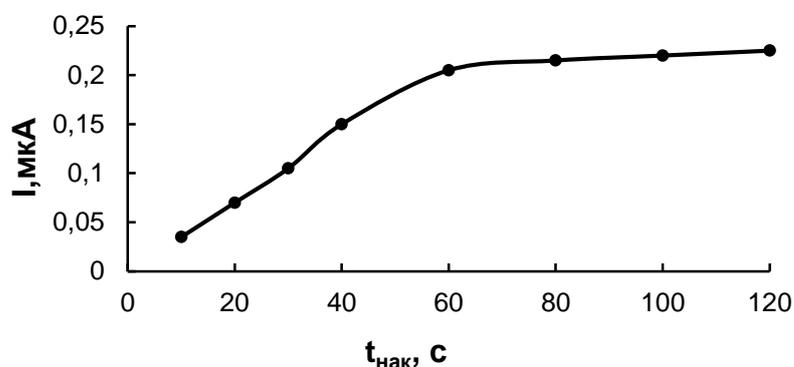


Рисунок 8 - Диапазон времени накопления в постоянноточковой инверсионной вольтамперометрии НЧ серебра [15]

Из рисунка 8 видно, что максимум аналитического сигнала достигается при $t_n=60$ с. Таким образом для получения аналитического сигнала от НЧ серебра необходимо использовать в качестве растворителя раствор 1 моль/дм³ HNO_3 , а E_n и t_n должны составлять $-0,6$ В и 60 с соответственно.

Для записи анодной инверсионной вольтамперограммы (рисунок 9) необходимо растворить НЧ серебра в растворе 1 моль/дм³ HNO_3 и добавить в электрохимическую ячейку, содержащую фоновый электролит (раствор 0,05 моль/дм³ KNO_3).

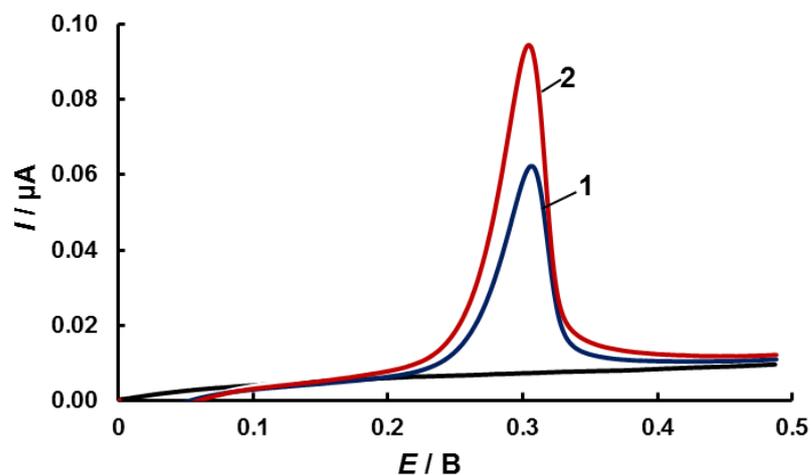


Рисунок 9 – Анодные инверсионные вольтамперограммы [15]: 1 – НЧ серебра (1 $\mu\text{моль/дм}^3$); 2 – НЧ серебра (0,01 ммоль/дм^3) $W=100 \text{ мВ/с}$, $E_{\text{H}} = -0,6\text{В}$, $t_{\text{H}}=60\text{с}$

Механизм электродного окисления Ag^0 на графитовом электроде представлен в виде уравнений (1,2):

При добавлении растворителя к наночастицам серебра образуется свободные ионы серебра, которые накапливаются в виде Ag^0 на поверхности графитового электрода. Далее Ag^0 переходит в ионную форму Ag^+ путем окисления.

При катодной инверсионной вольтамперограмме (рисунок 10) происходит осаждение твердой фазы на поверхностях электрода. Твердой фазой выступает соединение AgCl .

а
к
Е
≠
а
-

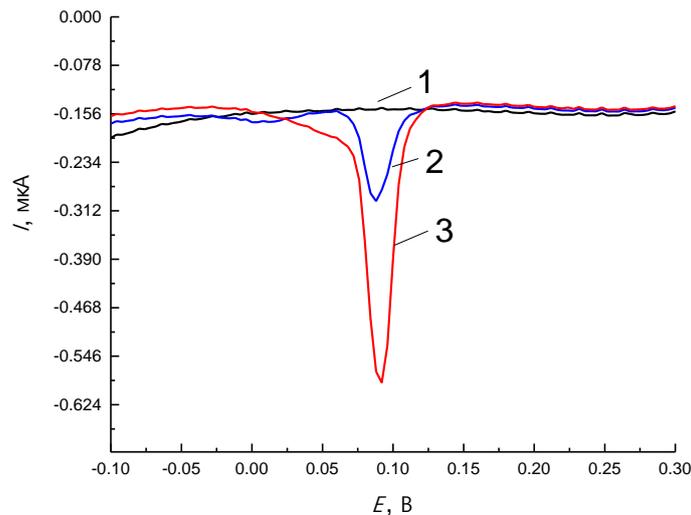


Рисунок 10- Катодные инверсионные вольтамперограммы [15]: 1 – фоновая кривая; 2 – НЧ серебра (1 моль/дм^3); 3 – НЧ серебра ($0,01 \text{ ммоль/дм}^3$), $W=100 \text{ мВ/с}$, $E_{\text{нак}} = -0,6\text{В}$, $t_{\text{нак}}=60\text{с}$

Для записи катодной инверсионной вольтамперограммы необходимо растворить НЧ серебра в растворе $1 \text{ моль/дм}^3 \text{ HNO}_3$ и добавить в электрохимическую ячейку, содержащую фоновый электролит (раствор $0,01 \text{ моль/дм}^3 \text{ KCl}$). Механизм электродного восстановления AgCl представлен уравнениями (3,4):

При добавлении растворителя к наночастицам серебра образуется свободные ионы серебра, которые накапливаются в виде AgCl на поверхности электрода. Далее осаждённый AgCl восстанавливается до Ag^0 .

1.4 Классификация методов ИФА

Данная работа посвящена синтезу пероксидазному конъюгату иммуноглобулинов IgG меченных наночастицами серебра для определения

антител к клещевому боррелиозу (болезнь Лайма) методом вольтамперометрии. В перспективе эти конъюгаты могут использоваться в ИФА антител к клещевому боррелиозу. В связи с этим в работе проведен краткий обзор способов ИФА и способов диагностики болезни Лаймы.

Имуноферментный анализ – это широко распространенный иммунобиологический метод анализа, применяемый для количественно и качественного выявления специфических иммуноглобулинов к определенным возбудителям различных болезней – антигенам. Методы ИФА основаны на воспроизведении трех последовательных этапов: 1) Получение комплекса АГ-АТ, 2) Связывание биоконъюгата с комплексом АГ-АТ, 3) Получение аналитического сигнала от метки биоконъюгата и его детектирование [17].

Методы ИФА разделяют на две большие группы: тип I – определение специфического иммунного комплекса анализируемого соединения, тип II – определение оставшихся свободных центров специфического связывания (рисунок 11) [18]. Далее выделяют конкурентные и неконкурентные, гомогенные и гетерогенные методы иммуноферментного анализа.



Рисунок 11 – Классификация методов ИФА [18]

1.4.1 Гомогенные методы ИФА

Для гомогенных методов ИФА характерен процесс ингибирования активности фермента, при связывании его с АГ или АТ. Реакция образования комплекса АГ-АТ запускает процесс восстановления ферментной активности.

Основная мишень определения в данных методах анализа являются субстанции с низкомолекулярным весом [19]. Анализ проводят в растворе, промывочные стадии отсутствуют. Время проведения анализа составляет до одной минуты, а чувствительность до пикомолей.

1.4.2 Гетерогенные методы ИФА

Гетерогенные методы ИФА проводят в системе, состоящей из двух фаз. В качестве твердой фазы выступают специальные полистироловые луночные планшеты [20]. В данных методах присутствует процесс отмывки, суть которого состоит в удалении из лунок планшета материала неспособного образовывать комплексы на твердой фазе.

Методы гетерогенного ИФА проводят в три этапа [21]:

1. Получение иммуносорбента, путем иммобилизации АГ или АТ на поверхности твердой фазы.
2. Процесс отмывки и блокировки сайтов связывания на поверхности твердой фазы, инкубирование анализируемого материала с иммуносорбентом.
3. Процесс детектирования.

Выделяют конкурентный и неконкурентный гетерогенные методы ИФА.

1.4.3 Конкурентный метод ИФА

Исходя из способа детектирования аналитического сигнала выделяют прямой и косвенный конкурентные методы ИФА.

Прямой конкурентный метод ИФА, на твёрдой фазе АГ. Данный метод анализа определяет качественно или количественно растворимые АГ [22]. На твердую фазу сорбируют АГ, проводят блокировку. Биоконъюгат, состоящий из АТ с меткой (НЧ металла, фермент), инкубируют с исследуемым веществом растворимым АГ. Далее эту смесь добавляют к АГ, проводят инкубирование. После этого следует стадия удаления компонентов, не образовавших комплекс АГ-АТ. Добавляют субстрат. Остановка реакции происходит из-за присутствия в системе двух АГ, в сравнении с образцом контроля без конкурентного растворимого АГ, что является обратно пропорциональным значению количества исследуемого вещества. Прямой конкурентный метод ИФА, на твёрдой фазе АТ. Данный метод ИФА аналогичен вышеописанному методу, за исключением того, определяют растворимые АТ.

Косвенный конкурентный метод ИФА. Суть метода аналогично прямому конкурентному методу ИФА за исключением того, что используются реагент, меченный анти-Ig, или меченные вторичные АТ.

1.4.4 Неконкурентный метод ИФА

Исходя из способа детектирования аналитического сигнала выделяют прямой и косвенный неконкурентные методы ИФА.

Прямой неконкурентный метод ИФА. Исследуемый объект сорбируют на твердую фазу [23]. При образовании комплекса АГ-АТ, АТ с меткой непосредственно выступает в роли детектора. Другой способ отличается тем, что на твёрдой фазе сорбируются АГ, а в роли детектора выступает исследуемый объект с меткой.

Непрямой неконкурентный метод ИФА. На твердую фазу, где сорбирован блокированный АГ, добавляют раствор, состоящий из специфических АТ [24]. Первичное инкубирование приводит к образованию комплекса АГ-АТ, удаляют несвязанные АТ путем промывки. Далее добавляют конъюгат анти-АТ, меченный ферментной меткой. Проводят вторичное инкубирование, в результате которого происходит связывание анти-АТ с комплексом АГ-АТ. Вводят субстрат, способный давать окрашенный продукт, который позволяет провести детектирование исследуемых АТ.

Метод ИФА типа «сэндвич». На твердую фазу сорбируют первичные АТ, после добавляют исследуемый материал, содержащий АГ, проводят инкубацию [25]. Далее промывкой удаляют несвязанные АГ и добавляют АТ с ферментной меткой. Детектируют полученный комплекс.

1.5 Субстраты и способы детектирования в методах ИФА

Субстраты – это вещества, используемые в методах ИФА, которые взаимодействуют с ферментной меткой, образуя продукт для последующего детектирования исследуемого комплекса АГ-АТ [26]. Выбор субстрата основывается на природе ферментной метки.

Требования к субстратам и хромогенам. Субстрат при взаимодействии с ферментом должен обеспечивать высокую чувствительность метода. Субстрат, смешанный с хромогеном, выступает в роли проявителя, следовательно, должен образовываться ярко окрашенный продукт ферментной реакции [27]. Продукт реакции не должен выпадать в осадок и иметь высокий показатель поглощения.

Часто применяемыми ферментными метками в ИФА являются пероксидаза хрена, бета-D-галактозидаза и щелочная фосфатаза [28]. Для пероксидазы хрена субстратом выступает H_2O_2 . При использовании метода фотометрии для количественного определения продукта ферментной реакции

вносят вещества проявители – хромогены, которые образуют интенсивно окрашенные продукты при взаимодействии с O_2 , который высвобождается при взаимодействии ПХ с H_2O_2 . Соединения хромогены [29]: 2,2'-азинобис-(3-этилбензтиазолин)-6-сульфоная кислота (АБТС), тетраметилбензидин (ТМБ), ортофенилдиамин (ОФД).

Продукт окисления ТМБ дает синее окрашивание анализируемого раствора, при добавлении H_2SO_4 , в качестве стоп-реагента, окраска раствора меняется на ярко желтую окраску. Преимущества ТМБ такие, как отсутствие мутагенности и канцерогенности у продуктов окисления, привели к его широкому применению в методах ИФА [29]. Показатель поглощения определяется при длине волны равной 450 нм. Для ОФД показатель поглощения определяется при длине волны равной 492 нм. Для АБТС показатель поглощения определяется при длине волны 405-414 нм [], при этом окрас раствора приобретает зелено-голубой цвет. Реакция при использовании АБТС не останавливается.

Способы детектирования аналитического сигнала. В методах ИФА применяются различные способы детектирования аналитического сигнала. Выбор способа детекции основывается на природе метки, используемой в анализе. Наиболее распространённый способ – это спектрофотометрия, которая основывается на записи спектра поглощения окрашенного продукта взаимодействия проявителя (субстрано-хромогенная смесь) с ферментной меткой [30]. Данный способ довольно прост, однако требует использования специальных спектрофотометров для ИФА планшетов – ридеров. Для флюорометрического способа детектирования используют индикаторную систему, основанную на п-оксифенилпропионовой кислоте. Для хемиллюминесцентного способа детектирования используют индикаторную систему, основанную на H_2O_2 , п-иодфеноле, люминоле [30]. Отдельно выделяется электрохимический метод детектирования аналитического сигнала от полученного комплекса АГ-АТ. Основное отличие данного способа от других является использование в качестве метки НЧ металлов, а не

ферментов. При записи вольтапмерограмм получают аналитический сигнал от НЧ металлов, входящих в состав конъюгата.

1.6 Болезнь Лайма: общие сведения и способы диагностики

Болезнь Лайма – рецидивирующая трансмиссивная природно-очаговая инфекция, вызываемая спиторхетой *Borrelia burgdorferi* [31].

Данное заболевание развивается в три этапа [31]:

1. Для первого этапа характерно развитие лихордки и кожной сыпи, инкубационный период составляет от 3 до 33 дней после укуса клеща.
2. Для второго этапа характерно развитие патологий сердечно-сосудистой системы, а также проявление неврологических отклонений таких, как паралич Белла, асептический менингит, периферические невропатии. Время проявления данного этапа наступает после четырех недель.
3. Для третьего этапа характерно развитие артрита. Время проявления данного этапа наступает от шести недель до нескольких лет.

Постановка диагноза основывается на выявлении специфических АТ классов IgM и IgG к боррелиям методом иммуноферментного анализа. Для более точной диагностики заболевания используют алгоритм проведения анализа (рисунок 12) [32].



Рисунок 12 – Алгоритм проведения анализа [32]

Таким образом, на основании литературного обзора для синтеза пероксидазного конъюгата иммуноглобулинов человека IgG не меченного наночастицами серебра был выбран периодатный метод. Введение наночастиц серебра в состав пероксидазного конъюгата иммуноглобулинов человека IgG планируется осуществлять методом пассивной адсорбции. Для регистрации сигнала серебра конъюгата в качестве маркерной метки планируется использовать метод инверсионной вольтамперометрии.

Глава 2 Материалы и методы исследования

2.1 Приборы и оборудование

Исследование проводилось с использованием оборудования:

- Весы аналитические лабораторные ГОСМЕТР;
- Спектрофотометр Agilent Technologies Cary 60 Uv-Vis;
- Колонка Sephadex-G25 (Sigma, Германия);
- Мультифункциональная центрифуга с активным охлаждением Eppendorf;
- Спектрофотометр для нанобъемов Analytikjena ScanDrop
- Вольтамперометрический анализатор TA-Lab (ООО «НПП Томбаналит», г.Томск, Россия)

2.2 Реактивы

Исследование проводилось с использованием реактивов:

- Азотнокислое серебро AgNO_3 , (ГОСТ 1277-75 Россия);
- Борогидрид натрия NaBH_4 (CAS 16940-66-2, Sigma-Aldrich);
- Периодат натрия NaIO_4 (Sigma-Aldrich);
- Вода дистиллированная лабораторно полученная;
- Гидрокарбонат натрия NaHCO_3 (ГОСТ 4201-79);
- Карбонат натрия Na_2CO_3 (ГОСТ 83-79);
- Серная кислота H_2SO_4 (ГОСТ 2184-2013);
- Перекись водорода 3%;
- Хлорид натрия NaCl (ГОСТ 4233-77);
- Тетраметилбензидин (CAS 54827-17-7 Sigma-Aldrich);
- Пероксидаза хрена (CAS Number 9003-99-0 Sigma-Aldrich);
- Иммуноглобулин IgG (человека) получены в компании «Вектор БиАльгам»;
- Набор реагентов для иммуноферментного выявления иммуноглобулинов класса G к возбудителям иксодовых клещевых боррелиозов (болезнь Лайма) (АО «Вектор Бест», набор реагентов D-

1452). Потенциальный риск применения набора – класс 1 «Медицинские изделия с низким индивидуальным риском и низким риском для общественного здоровья» (Приказ МЗ РФ от 06.06.2012 № 34н).

2.3 Объект исследования

Объектом данного исследования выступают конъюгаты пероксидазы хрена с иммуноглобулинами человека класса G, меченные наночастицами серебра.

2.4 Методы исследования

2.4.1 Методика очистки иммуноглобулинов класса IgG

Для очистки иммуноглобулина от сульфата аммония и остатков каприловой кислоты использовался метод диализа. Иммуноглобулины, растворенные в растворе сульфата аммония (3М) помещались в плотно закрытую диализную мембрану. Мембрана погружалась в 0,1 М карбонатный буферный раствор, состоящий из NaHCO_3 и Na_2CO_3 , на сутки при +4 °С. Низкомолекулярные вещества по истечению времени удалялись из образца иммуноглобулина через стенку диализной мембраны и замещались буферным раствором. Выше описанным методом были получены очищенные иммуноглобулины IgG, растворенные в карбонатном буфере pH 9,5.

2.4.2 Методика получения ПХК-АТ

Схема получения конъюгата пероксидазы хрена с иммуноглобулинами IgG (ПХК-АТ):

1. Навеску пероксидазы хрена равной $0,0080 \pm 0,0005$ г растворили в дистиллированной воде объемом 400 мкл и добавили 300 мкл 0,1 М раствора периодата натрия.
2. Полученный раствор инкубировали в темноте при комнатной температуре 20 минут.
3. К полученному раствору добавили иммуноглобулины человека IgG, растворенный в карбонатном буфере, объемом 100 мкл и инкубировали в течении 40 минут при температуре 37°C.
4. Колонка замены буфера Sephadex G-25 была промыта фосфатным буфером из стандартного титра.
5. После инкубации к раствору прилили 0,1 М раствор тетрабората натрия объемом 100 мкл.
6. Раствор инкубировали 20 минут при температуре 37°C.
7. После инкубации раствор был пропущен через колонку Sephadex G-25 в буфер хранения (фосфатный буферный раствор pH 6,86).

По выше описанной методике был получен раствор содержащий сшитой пероксидазы хрена с иммуноглобулинами IgG - конъюгаты. Для сохранения свойств раствора при хранении добавляли раствор глицерина, а температурный режим хранения составил -20 °С.

2.4.3 Методика получения наночастиц серебра

Синтез НЧ серебра основан на реакции взаимодействия раствора нитрата серебра с раствором тетрабората натрия.

Схема синтеза НЧ серебра:

1. В колбу объемом 250 см³ с магнитной мешалкой добавляли 0,002 М раствор NaBH₄ объемом 15 см³. Далее колбу опускали в ледяную баню на 25 минут.
2. После остывания в колбу при постоянном перемешивании дозированно по 5 мкл добавляли 0,001 М раствор AgNO₃ в течении 2-3 минут.
3. После полного добавления раствора AgNO₃ к раствору NaBH₄ перемешивание останавливали, а раствор извлекали из ледяной бани. Проводили оценку окрашивания полученного раствора, светло-желтая окраска раствора сигнализировала о том, что синтез НЧ серебра прошел успешно. Для более точной идентификации продукта синтеза был записан спектр поглощения полученного раствора (Приложение А).

После синтеза НЧ серебра проводили их концентрирование методом центрифугирования. В 5 пробирок типа эпендорф вносили по 4 см³ полученного раствора и помещали в центрифугу с активным охлаждением на 30 минут 2600 об/мин, температурный режим при этом составлял 4 °С. После центрифугирования на дне пробирок выпадал черный осадок, состоящий из НЧ серебра. Лишний объем раствора над осадком убирали с помощью дозатора на 2000 мкл и помещали в отдельный стакан, в исследовании его больше не применяли. Осадки со всех пробирок объединяли в одной пробирке и помещали в ультрозвуковой гомонезатор для получения наночастиц однородных по размеру.

2.4.4 Методика подбора количества наночастиц серебра по отношению к конъюгату ПХК-АТ – тест с хлоридом натрия

Для получения стабильных конъюгатов пероксидазы хрена с иммуноглобулином IgG, меченных наночастицами, необходимо подобрать оптимальное количество наночастиц серебра. Выбор данного количества наночастиц основывается на методе титрования с использованием растворов таких, как раствор сшитой пероксидазы хрена с иммуноглобулином IgG

(раздел 2.4.2), раствор с наночастицами серебра и 10% раствор NaCl. Титрование проводили на планшете для иммуноферментного анализа (рисунок 13).

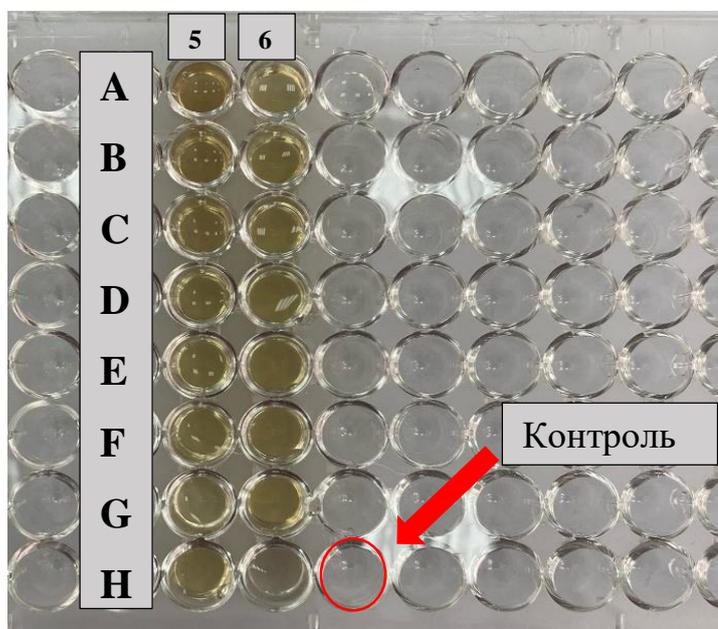


Рисунок 13 – Тест с NaCl

Схема проведения теста:

1. В лунки B₅-H₅ и A₆-G₆ внесли по 100 мкл H₂O₂;
2. В лунку A₅ внесли 200 мкл раствора конъюгата пероксидазы хрена с иммуноглобулином IgG
3. После из лунки A₅ отобрали 100 мкл раствора и перенесли в лунку B₅, последовательно разбавили раствор до лунки G₆
4. Следом в лунки B₅-H₆ внесли 50 мкл раствора наночастиц серебра
5. Планшет оставили накрытым на 10 минут
6. Далее в лунки B₅-H₆ вносили 50 мкл 10% раствора NaCl
7. Оценка результатов теста
8. Пересчет соотношения на реально используемые объемы

Добавление 10% раствора NaCl вызывает изменение окраски в тех лунках, где количество белка недостаточно, цвет этих лунок становится

серым. Причиной этого является большое количество НЧ серебра, которым недостаточно белка для полного связывания. Лунка А₅, содержащая только конъюгаты пероксидазы с иммуноглобулинами IgG, и лунка Н₆, содержащая только НЧ серебра, являются контрольными. Выбор соотношения НЧ серебра-иммуноглобулины IgG основывается на той лунке, цвет которой не изменился.

2.4.5 Методика получения ПХК-АТ*Ag

После проведения теста с раствором NaCl, было выбрано оптимальное соотношение НЧ серебра-конъюгат и произведен пересчет на реально используемые объемы, можно получить стабильные конъюгаты пероксидазы хрена с иммуноглобулином IgG, меченные наночастицами серебра (ПХК-АТ*Ag).

Схема проведения синтеза:

1. Раствор конъюгата объемом 2000 мкл смешивали с раствором НЧ серебра объемом 3000 мкл в колбе.
2. Полученный раствор инкубировали в течении 40 минут при постоянном перемешивании, температурный режим составил 37°C

Готовый раствор содержащий ПХК-АТ*Ag, использовали для дальнейшего исследования.

2.4.7 Методика приготовления растворов тетраметилбензидина

ТМБ является одним из основных компонентом проявителя, используемый в составе тестируемых образцов. В исследовании использовали четыре различные концентрации ТМБ: $C_1=1 \cdot 10^{-4}$ моль/л, $C_2=4 \cdot 10^{-4}$ моль/л, $C_3=8 \cdot 10^{-4}$ моль/л, $C_4=1 \cdot 10^{-3}$ моль/л

Схема приготовления исходного раствора ТМБ:

1. Навеску ТМБ массой 0,1 г растворяли в растворе ДМСО объемом 7,5 см³ и добавляли 2,5 см³ дистиллированной воды.

2. Из полученного раствора отбирали аликвоты объемом: 97 мкл, 400 мкл, 800 мкл, 980 мкл. Отобранные аликвоты помещали в отдельные пенициллиновые флаконы и разбавляли недостающим количеством дистиллированной воды до общего объема в 1000 мкл.
3. Из каждой пенициллинового флакона отбирали 100 мкл раствора ТМБ и добавляли в раствор испытуемого образца.

2.4.7 Методика приготовления раствора пероксидазы хрена

Пероксидаза хрена выступает в роли ферментной метки. Для сравнения кинетических характеристик один из наборов образцов состоял из неконъюгированной пероксидазы хрена.

Схема приготовления раствора чистой пероксидазы хрена:

1. Навеску пероксидазы хрена массой 0,008 г растворили в дистиллированной водой в объеме 2000 мкл.
2. Из приготовленного раствора отбирали аликвоту объемом 100 мкл и переносили в раствор испытуемого образца

Концентрация пероксидазы хрена составила в испытуемых образцах составила $2,19 \cdot 10^{-6}$ моль/л.

2.4.8 Методика записи спектров поглощения ПХ, ПХК-АТ*Ag и ПХК-АТ

Для записи спектров поглощения использовали различные наборы образцов (таблица 2). Запись спектров велась после проведения окислительной реакции ТМБ при добавлении 3% раствора перекиси водорода. Время реакции было фиксированным и составляло 0.17, 0.33, 0.5 и 0.7 минут соответственно. Контроль времени реакции осуществляли путем использования стоп реагента - 0,1 М раствор H_2SO_4 .

Таблица 2 – Состав тестируемых образцов

Номер набора	Состав образцов			
1	Раствор ПХ ($C=2,19 \cdot 10^{-6}$) + ТМБ ($C=1 \cdot 10^{-4}$ моль/л)	Раствор ПХ ($C=2,19 \cdot 10^{-6}$) + ТМБ ($C=4 \cdot 10^{-4}$ моль/л)	Раствор ПХ ($C=2,19 \cdot 10^{-6}$) + ТМБ ($C=8 \cdot 10^{-4}$ моль/л)	Раствор ПХ ($C=2,19 \cdot 10^{-6}$) + ТМБ ($C=1 \cdot 10^{-3}$ моль/л)
2	Раствор ПХК-АТ ($C=2,19 \cdot 10^{-6}$) + ТМБ ($C=1 \cdot 10^{-4}$ моль/л)	Раствор ПХК-АТ ($C=2,19 \cdot 10^{-6}$) + ТМБ ($C=4 \cdot 10^{-4}$ моль/л)	Раствор ПХК-АТ ($C=2,19 \cdot 10^{-6}$) + ТМБ ($C=8 \cdot 10^{-4}$ моль/л)	Раствор ПХК-АТ ($C=2,19 \cdot 10^{-6}$) + ТМБ ($C=1 \cdot 10^{-3}$ моль/л)
3	Раствор ПХК- АТ*Ag ($C=2,19 \cdot 10^{-6}$) + ТМБ ($C=1 \cdot 10^{-4}$ моль/л)	Раствор ПХК- АТ*Ag ($C=2,19 \cdot 10^{-6}$) + ТМБ ($C=4 \cdot 10^{-4}$ моль/л)	Раствор ПХК- АТ*Ag ($C=2,19 \cdot 10^{-6}$) + ТМБ ($C=8 \cdot 10^{-4}$ моль/л)	Раствор ПХК- АТ*Ag ($C=2,19 \cdot 10^{-6}$) + ТМБ ($C=1 \cdot 10^{-3}$ моль/л)

Схема проведения записи спектров образцов:

1. К образцу с заданной концентрацией ТМБ добавляли 5 мкл 3% раствора H_2O_2 для инициации реакции.
2. Фиксировали время начала реакции, по истечению которого реакцию останавливали добавлением 2000 мкл 0,1 М раствора H_2SO_4 .
3. Отбирали 500 мкл из прореагировавшего объема и переносили в кювету для снятия спектра.
4. Отобранный раствор разбавляли в кювете дистиллированной водой объемом 1500 мкл
5. Записывали спектры поглощения образцов таблицы в диапазоне от 200 до 800 нм, для расчета использовали оптическую плотность продукта окисления ТМБ при длине волны 450 ± 2 нм .

2.4.9 Методика проведения ИФА по выявлению иммуноглобулинов класса G к возбудителям иксодовых клещевых боррелиозов

Иммуноферментный анализ по выявлению иммуноглобулинов класса G к возбудителям иксодовых клещевых боррелиозов проводили с использованием коммерческого набора реагентов D-1452 АО «Вектор-Бест». Набор содержит положительные контрольные образцы (K^+) и отрицательные контрольные образцы (K^-), а также конъюгат ПХК-АТ. Для постановки сравнительного анализа были также использованы ПХК-АТ*Ag, полученные по методике 2.4.5

Анализ проводили на луночном планшете с иммобилизованными АГ согласно паспорту, приложенному к набору (рисунок 14).

После проведения работ весь материал и используемая посуда подвергались обработке 6% раствором перекиси водорода в течении 1 часа.



Рисунок 14 - ИФА анализ с использованием набора реагентов D-1452 АО «Вектор-Бест»

Порядок проведения ИФА:

1. Приготовить промывочный раствор и концентрированный раствор ПХК-АТ (АО «Вектор-Бест») согласно паспорту;

2. Внести в лунки планшета по 90 мкл раствор для разведения сывороток из набора;
3. Внести в лунки планшета по 10 мкл растворы образцов K^+ и K^- ;
4. Инкубировать под защитной плёнкой в течении 60 минут, температурный режим 37 °С;
5. Приготовить раствор ПХК-АТ в рабочем разведении согласно паспорту;
6. Промыть лунки планшета промывочным раствором (5 раз по 400 мкл);
7. Внести в лунки по 100 мкл растворы ПХК-АТ и ПХК-АТ*Ag;
8. Инкубировать под защитной плёнкой в течении 30 минут, температурный режим 37 °С;
9. Повторить пункт №6;
10. Приготовить раствор ТМБ в рабочем разведении согласно паспорту;
11. Внести в лунки по 100 мкл раствора ТМБ;
12. Инкубировать под защитной плёнкой в течении 30 минут, температурный режим 18-28 °С, без доступа света;
13. Внести в лунки по 100 мкл стоп-реагента
14. Провести детектирование*

*Согласно паспорту, проводят запись спектра поглощения на спектрофотометре при длине волны равной 450 нм, в работе также был использован вольтамперометрический метод определения серебра конъюгата.

2.4.10 Методика вольтамперометрического детектирования ПХК-АТ*Ag

После проведения ИФА, с использованием ПХК-АТ*Ag, по выявлению иммуноглобулинов класса G к возбудителям иксодовых клещевых боррелиозов по методике 2.4.9 были определены иммуноглобулины человека IgG контрольных образцов K^+ и K^- . Согласно теории, в образцах K^+ должен был образоваться комплекс АГ-АТ, с прикрепленным к нему ПХК-АТ*Ag, а в образцах K^- такой комплекс должен отсутствовать.

Для усиления сигнала от серебра конъюгатов использовался способ физического проявления серебром путем внесения ионного серебра и проявителя – метола, соотношение составило 1:1, а время проявления 2 минуты. После проявки лунки были промыты раствором ФСБТ-25. Для переноса в электрохимические ячейки содержимого в лунках растворяли 1 М раствором HNO_3 .

Схема записи вольтамперограмм:

1. В три электрохимические ячейки влить раствор фонового электролита (7000 мкл дистиллированной воды, 560 мкл 0,5 М KNO_3 , 1000 мкл 1 М HNO_3);
2. Записать вольтамперограмму для фонового электролита
3. Внести в ячейки K^+ и K^- образцы, после процедуры проявления серебра
4. Провести регистрация токов в программе «Определение Ag в во

Глава 4 Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение

4.1 Предпроектный анализ

Научно-исследовательская работа связана с разработкой биоконъюгата с меткой из НЧ серебра для определения антигена клещевого боррелиоза в организме человека электрохимическим методом. Каждый год на территории нашей страны регистрируется около 5-6 тысяч случаев заражения клещевым боррелиозом, поэтому очень важно диагностировать заболевание на ранних стадиях. Ранняя диагностика является ключом к улучшению прогноза выздоровления, за счет определения антигенов боррелий в сыворотке крови человека.

На сегодняшний день самым распространенным методом анализа на наличие клещевого боррелиоза является твердофазный непрямой неконкурентный иммуноферментный анализ. Антиген определяют методом спектрофотометрии. Но у этого метода есть такие недостатки, как использование специальных нанобъемных спектрофотометров (ридеров) из-за малых объемов анализируемого раствора, длительное время анализа, связанное с включением дополнительного этапа постановки ферментной реакции с использованием стоп-реагентов, ограниченный срок службы и низкая селективность. В связи с этим создание биоконъюгата с меткой из НЧ серебра может послужить альтернативой в проведении анализа. Одной из задач нашего исследования является определение антигена клещевого боррелиоза вольтамперометрическим методом анализа.

4.1.1 Потенциальные потребители результатов исследования

Потенциальными потребителями являются различные медицинские учреждения, проводящие анализы крови, а также фармацевтические

компании, медицинские учреждения и лаборатории разных профилей, диагностические центры.

4.1.2 Анализ конкурентных технических решений с позиции ресурсоэффективности и ресурсосбережения

В лабораторной диагностике по определению антигена клещевого боррелиоза применяются два основных метода анализа: иммуноферментный и полимеразная цепная реакция. Анализ конкурентных технических решений с позиции ресурсоэффективности и ресурсосбережения позволяет провести оценку сравнительной эффективности научной разработки и определить направления для ее будущего повышения.

Анализ конкурентных технических решений определяется по формуле:

$$K = \sum B_i * B_i \quad (4.1)$$

где К – конкурентоспособность научной разработки или конкурента;

B_i – вес показателя (в долях единицы);

B_i – балл i -го показателя.

Целесообразно проводить данный анализ с помощью оценочной карты, которая приведена в таблице 18

Таблица 18 – Оценочная карта сравнения конкурентных разработок

Критерииоценки	Вес критерия	Баллы			Конкуренто-способность		
		B_{ϕ}	$B_{к1}$	$B_{к2}$	K_{ϕ}	$K_{к1}$	$K_{к2}$
1	2	3	4	5	6	7	8
Техническиекритерииоценки ресурсоэффективности							
1.Точность определения	0.1	4	5	4	0.4	0.5	0.4
2.Экспрессность	0.2	5	2	2	1	0,4	0.4
3.Простота эксплуатации	0.1	5	4	4	0.5	0.4	0.4
Экономическиекритерииоценкиэффективности							
1.Конкурентоспособность продукта	0.1	3	5	3	0,3	0.5	0.3
2. Стоимость оборудования	0.2	5	4	3	0.5	0.4	0.3

Продолжение таблицы 18

3. Затраты на подготовку специалиста	0,1	4	4	3	0,4	0,4	0,3
4.Стоимость реактивов	0.2	4	4	3	0.4	0.4	0.3
Итого	1	30	28	22	3,5	3,0	2.4

Б_ф – наша разработка;

Б_{к1} – иммуноферментный анализ;

Б_{к2} – полимеразная цепная реакция.

По результатам оценочной карты сравнения конкурентных методов анализа по определению антигена клещевого боррелиоза можно сделать вывод о том, что основным конкурентом метода вольтамперометрии является иммуноферментный анализ.

4.1.3 SWOT-анализ

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

В первом этапе рассматривает сильные и слабые стороны проекта, а также выявлении возможностей и угроз.

Результаты первого этапа SWOT-анализа представлены в таблице 19

Таблица 19 – Результаты первого этапа SWOT-анализа

<p>Сильные стороны:</p> <p>С1. Экспрессность</p> <p>С2. Простота эксплуатации</p> <p>С3. Низкие затраты на пробоподготовку</p>	<p>Слабые стороны:</p> <p>Сл1. влияние размера НЧ на чувствительность определения клещевого боррелиоза</p> <p>Сл2.Необходимость прибора</p> <p>Сл3.Необходимость специализированных реактивов (антител, антигенов)</p>
<p>Возможности:</p> <p>В1. Появление дополнительного спроса на новый продукт</p> <p>В2. Разработка методики определения других антигенов</p> <p>В3.Перспективы внедрения вольтамперометрии в качестве метода анализа в медицине.</p>	<p>Угрозы:</p> <p>У1. Развитие конкурентных методов анализа</p> <p>У2. Повышение стоимости оборудования</p> <p>У3. Отсутствие необходимых реактивов</p>

На втором этапе SWOT – анализа рассматривает соответствия сильных и слабых сторон научно-исследовательского проекта внешним условиям окружающей среды. Это соответствие или несоответствие должны помочь выявить степень необходимости проведения стратегических изменений.

В рамках данного этапа необходимо построить интерактивную матрицу проекта. Ее использование помогает разобраться с различными комбинациями взаимосвязей областей матрицы SWOT. Каждый фактор помечается либо знаком «+» (означает сильное соответствие сильных сторон возможностям), либо знаком «-» (что означает слабое соответствие); «0» – если есть сомнения в том, что поставить «+» или «-».

Интерактивные матрицы проекта представлены в таблицах 20, 21, 22 и 23.

Таблица 20 – Интерактивная матрица проекта «Сильные стороны и возможности»

Сильные стороны проекта				
Возможности проекта		С1	С2	С3
	В1	+	+	-
	В2	-	+	+
	В3	+	+	+

Таблица 21 – Интерактивная матрица проекта «Слабые стороны и возможности»

Слабые стороны проекта				
Возможности проекта		Сл1	Сл2	Сл3
	В1	-	-	-
	В2	0	-	+
	В3	-	-	-

Таблица 22 – Интерактивная матрица проекта «Сильные стороны и угрозы»

Сильные стороны проекта				
Угрозы		С1	С2	С3
	У1	+	-	+
	У2	-	-	-
	У3	-	-	+

Таблица 23 – Интерактивная матрица проекта «Слабые стороны и угрозы»

Слабые стороны проекта				
Угрозы		Сл1	Сл2	Сл3
	У1	+	+	+
	У2	+	+	+
	У3	-	+	+

Таким образом, в рамках третьего этапа может быть составлена итоговая матрица SWOT-анализа, представленная в таблице 24

Таблица 24 – Итоговая матрица SWOT-анализа

	<p>Сильные стороны:</p> <p>С1. Экспрессность</p> <p>С2. Простота эксплуатации</p> <p>С3. Низкие затраты на пробоподготовку</p>	<p>Слабые стороны:</p> <p>Сл1. влияние размера НЧ на чувствительность определения клещевого боррелиоза</p> <p>Сл2.Необходимость прибора</p> <p>Сл3.Необходимость специализированных реактивов (антител, антигенов)</p>
<p>Возможности:</p> <p>В1.Появление дополнительного спроса на новый продукт</p> <p>В2. Разработка методики определения других антигенов</p> <p>В3.Перспективы внедрения вольтамперометрии в качестве метода анализа в медицине.</p>	<p>Благодаря возникновению спроса на новый продукт, появляется возможность использования его в качестве альтернативного метода анализа в медицине. Кроме того, возможно увеличить спектр определяемых антигенов.</p>	<p>Отсутствие у производителя квалифицированных кадров и долгий срок поставок материалов и оборудования могут негативно сказаться на успешном внедрении данного продукта, а соответственно, на его спросе.</p>
<p>Угрозы:</p> <p>У1. Развитие конкурентных методов анализа</p> <p>У2. Повышение стоимости оборудования</p> <p>У3. Отсутствие необходимых реактивов</p>	<p>Заявленная точность, низкая стоимость и экспрессность могут сделать предлагаемую методику конкурентоспособной.</p>	<p>Отсутствие спроса на новые методы и развитая конкуренция методов обусловлено тем, что данный продукт разрабатывается без прототипа научной разработки. Несвоевременное финансовое обеспечение научного исследования приводит к тому, что для проведения испытаний и опытов не хватает оборудования и реактивов, которые приводят к большим затратам времени на проведение научных исследований.</p>

В результате SWOT-анализа выявлено, что для данного проекта характерен некий баланс сильных и слабых сторон, а также возможностей и угроз. При правильно разработанной концепции продвижения проекта, можно внедрить продукт на рынок производства и сбыта.

4.1.4 Оценка готовности проекта к коммерциализации

На какой бы стадии жизненного цикла не находилась научная разработка полезно оценить степень ее готовности к коммерциализации и выяснить уровень собственных знаний для ее проведения (или завершения). Для этого заполнена специальная форма, содержащая показатели о степени проработанности проекта с позиции коммерциализации и компетенциям разработчика научного проекта (таблица 25).

При проведении анализа по таблице, приведенной ниже, по каждому показателю ставится оценка по пятибалльной шкале. При этом система измерения по каждому направлению (степень проработанности научного проекта, уровень имеющихся знаний у разработчика) отличается. Так, при оценке степени проработанности научного проекта 1 балл означает не проработанность проекта, 2 балла – слабую проработанность, 3 балла – выполнено, но в качестве не уверен, 4 балла – выполнено качественно, 5 баллов – имеется положительное заключение независимого эксперта. Для оценки уровня имеющихся знаний у разработчика система баллов принимает следующий вид: 1 означает не знаком или мало знаю, 2 – в объеме теоретических знаний, 3 – знаю теорию и практические примеры применения, 4 – знаю теорию и самостоятельно выполняю, 5 – знаю теорию, выполняю и могу консультировать.

Таблица 25 - Бланк оценки степени готовности научного проекта к коммерциализации

п/п	Наименование	Степень проработанности научного проекта	Уровень имеющихся знаний у разработчика
1	Определен имеющийся научно-технический задел	5	4
2	Определены перспективные направления коммерциализации научно-технического задела	4	4
3	Определены отрасли и технологии (товары, услуги) для предложения на рынке	5	4
4	Определена товарная форма научно-технического задела для представления на рынок	3	4
5	Определены авторы и осуществлена охрана их прав	3	3
6	Проведена оценка стоимости интеллектуальной собственности	3	4
7	Проведены маркетинговые исследования рынков сбыта	2	3
8	Проведены маркетинговые исследования рынков сбыта	1	1
9	Определены пути продвижения научной разработки на рынок	3	3
10	Разработана стратегия (форма) реализации научной разработки	3	4
11	Проработаны вопросы международного сотрудничества и выхода на зарубежный рынок	2	2

Продолжение таблицы 25

12	Проработаны вопросы использования услуг инфраструктуры поддержки, получения льгот	3	4
13	Проработаны вопросы финансирования коммерциализации научной разработки	2	3
14	Имеется команда для коммерциализации научной разработки	5	3
15	Проработан механизм реализации научного проекта	3	3
	ИТОГО БАЛЛОВ	47	49

Оценка готовности научного проекта к коммерциализации (или уровень имеющихся знаний у разработчика) определяется по формуле:

$$B_{\text{сум}} = \sum B_i \quad (4.2)$$

где $B_{\text{сум}}$ – суммарное количество баллов по каждому направлению; B_i – балл по i -му показателю.

Значение $B_{\text{сум}}$ позволяет говорить о мере готовности научной разработки и ее разработчика к коммерциализации. Так, если значение $B_{\text{сум}}$ получилось от 75 до 60, то такая разработка считается перспективной, а знания разработчика достаточными для успешной ее коммерциализации. Если от 59 до 45 – то перспективность выше среднего. Если от 44 до 30 – то перспективность средняя. Если от 29 до 15 – то перспективность ниже среднего. Если 14 и ниже – то перспективность крайне низкая.

Суммарное значение баллов данной таблицы позволяет говорить о готовности научной разработки и ее разработчика к коммерциализации выше среднего.

4.1.5 Метод коммерциализации результатов научно-технического исследования

Существуют различные методы коммерциализации научных разработок. На данной стадии, представленной научной разработки, успешному продвижению способствует торговля патентными лицензиями, с помощью которой будет достигнута передача третьим лицам интеллектуальной собственности на лицензионной основе.

4.2 Инициация проекта

Группа процессов инициации состоит из процессов, которые выполняются для определения нового проекта или новой фазы существующего. В рамках процессов инициации определяются изначальные цели и содержание и фиксируются изначальные финансовые ресурсы. Определяются внутренние и внешние заинтересованные стороны проекта, которые будут взаимодействовать и влиять на общий результат научного проекта. Данная информация закрепляется в Уставе проекта (таблица 26).

Таблица 26 – Заинтересованные стороны проекта

Заинтересованные стороны проекта	Ожидания заинтересованных сторон
НИ ТПУ	Выпуск высококвалифицированных специалистов
Лаборатории диагностического профиля	Получение результатов исследования применимых на практике

В таблице 27 представлены цели и результаты научно-исследовательского проекта

Таблица 27 – Цели и результаты проекта

Цели проекта:	Разработать биоконъюгат с меткой из НЧ серебра для определения антигена клещевого боррелиоза в организме человека электрохимическим методом.
Ожидаемые результаты проекта:	Определение серебряной метки конъюгата методом вольтамперометрии после получения комплекса антиген-антитело
Критерии приемки результатов проекта:	Получение новой методики определения антигена клещевого боррелиоза

В таблице 28 представлена организационная структура проекта (роль каждого участника, их функции, трудозатраты).

Таблица 28 – Рабочая группа проекта

№, п/п	ФИО, основное место работы, должность	Роль в проекте	Роль в проекте	Трудозатраты, час
1	к.х.н., доцент (ОХИ, ИШПР) Дорожко Е.В.	Руководитель	Распределение обязанностей, корреляция выполнения плана, формирует цели проекта, ограничения проекта по срокам и затратам (бюджету), контроль над ходом выполнения проекта. Консультации по поводу проведения эксперимента, получения и анализа результатов НИР	250
2	Лунев Н.А	Исполнитель	Выполнение проекта (проведение эксперимента, получение и анализ результатов НИР)	520
ИТОГО:				770

Ограничения проекта – это все факторы, которые могут послужить ограничением степени свободы участников команды проекта, а также «границы проекта» – параметры проекта или его продукта, которые не будут реализованных в рамках данного проекта (таблица 29).

Таблица 29 Ограничения проекта

Фактор	Ограничения/Допущения
Бюджет проекта	
Источник финансирования	НИ ТПУ
Сроки проекта	
Дата утверждения плана управления проектом	28.09.2020
Дата завершения проекта	28.05.2021

4.3 Планирование управления научно-техническим проектом

Группа процессов планирования состоит из процессов, осуществляемых для определения общего содержания работ, уточнения целей и разработки последовательности действий, требуемых для достижения данных целей. План управления научным проектом должен включать в себя следующие элементы:

- иерархическая структура работ проекта;
- контрольные события проекта;
- план проекта;
- бюджет научного исследования.

4.3.1 Иерархическая структура работ проекта

Иерархическая структура работ (ИСР) – детализация укрупненной структуры работ. В процессе создания ИСР структурируется и определяется содержание всего проекта. На рисунке 36 представлен шаблон иерархической структуры работ по проекту.



Рисунок 36 –Иерархическая структура работ проекта

4.3.2 План проекта

В рамках планирования научного проекта составлены календарный план проекта (таблица 30) и график проведения НИОКР по теме (таблица 31).

Таблица 30 – Календарный план проекта

Названиеработы	Длительность, дни	Дата начала работ	Дата окончания работ	Состав участников
Введение	2	13.04.2021	15.04.2021	Дорожко Е.В Лунев Н.А.
Литературныйобзор	15	18.01.2021	5.02.2021	Лунев Н.А.

Экспериментальная часть	Руководитель, Магистрант	40	
Результаты и обсуждения	Руководитель, Магистрант	10	
Разработка презентации и раздаточного материала	Магистрант	5	
Оформление дипломной работы	Магистрант	5	



4.4 Бюджет научного исследования

При планировании бюджета научного исследования должно быть обеспечено полное и достоверное отражение всех видов планируемых расходов, необходимых для его выполнения. В процессе формирования бюджета, планируемые затраты сгруппированы по статьям.

В данном исследовании выделены следующие статьи:

1. Сырье, материалы, покупные изделия и полуфабрикаты;
2. Специальное оборудование для научных работ;
3. Заработная плата;
4. Отчисления на социальные нужды;
5. Научные и производственные командировки;
6. Оплата работ, выполняемых сторонними организациями и предприятиями;

7. Накладные расходы.

Сырье, материалы, покупные изделия (за вычетом отходов). В эту статью включаются затраты на приобретение всех видов материалов, необходимых для выполнения работ по данной теме (таблица 32).

Таблица 32 – Расчет затрат по статье «Сырье и материалы»

п/п	Наименование затрат	Единица измерений	Расход	Цена за единицу, руб (с НДС)	Сумма, руб
1	Нитрат серебра	г	10	120	1200
2	Боргидрид натрия	кг	0,01	7500	75
3	Калия хлорид насыщенный	кг	0,02	263	5,26
4	Кислота азотная	л	0,01	208	2,08
5	Нитрат калия	г	15	5,73	85,95
6	Колбы мерные на 50 и 100 см ³	шт	10	120	1200
7	Цилиндры мерные с носиком на 25, 50, 100 см ³	шт	5	70	350
8	Пипетки, градуированные на 5, 10 см ³	шт	3	95	285
9	Стаканы на 25, 50, 100 см ³	шт	7	60	420
10	Пробирки	шт	3	20	60
11	Набор реagens для ИФА анализа D-1452 болезнь Лайма АО «Вектор-Бест»	шт.	1	16000	16000
12	Пероксидаза хрена	г	0,5	6000	3000
Итого по статье:					22683,3

Специальное оборудование для научных (экспериментальных) работ. В данную статью включены все затраты, связанные с приобретением специального оборудования, необходимого для проведения работ по теме НИР (таблица 33).

Таблица 33 – Расчет затрат по статье «Спецоборудование для научных работ»

№, п/п	Наименование оборудования	Количество единиц оборудования, шт	Цена единицы оборудования,	Общая стоимость оборудования, руб
1	Дистиллятор для приготовления воды очищенной (Россия, ЧЗБТ)	1	35000	35000
2	Весы аналитические (класс точности 0,0001 г., Россия)	1	38000	38000
3	Дозатор 1-канальный, переменного объема 1-5 мл (Россия)	1	5780	5780
4	Дозатор 1-канальный, переменного объема 10-100 мкл (Россия)	1	7906	7906
5	Углеродсодержащий электрод с обновляемой поверхностью	3	790	2370
Итого:				89056

Стоимость оборудования, используемого при выполнении НИР, имеющегося на кафедре отделения химической инженерии стоимостью свыше 40 тыс. рублей, учитывалось в виде амортизационных отчислений. В данном случае выбран линейный способ амортизации оборудования, при котором происходит равномерное начисление амортизации с первоначальной до

остаточной стоимости (в конце срока службы) в течение всего срока использования. Текущая остаточная стоимость определяется вычитанием суммарной накопленной амортизации основного средства из первоначальной стоимости.

Формула амортизации оборудования для определения ежемесячной суммы (М):

$$\Sigma M = ПС * n(4.4)$$

где ПС – первоначальная стоимость оборудования;

n – ежемесячная норма амортизации, рассчитываемая как отношение 1 к сроку полезного использования, выраженному в месяцах.

Расчет затрат по статье «Амортизация оборудования» представлена в таблице 34.

Таблица 34 - Расчет затрат по статье «Амортизация оборудования»

Наименование оборудования	Цена оборудования, руб.	Эксплуатация оборудования, кол-во лет	Амортизация, руб
Нано-объемный спектрофотометр NanodropAnalyticJena	650000	10	5416,45
Вольтамперометрический анализатор TA-Lab	230000	10	1916,59
Итого:			7333,04

Расчет основной заработной платы. В настоящую статью включается основная заработная плата научных и инженерно-технических работников, рабочих макетных мастерских и опытных производств, непосредственно участвующих в выполнении работ по данной теме. Величина расходов по заработной плате определяется исходя из трудоемкости выполняемых работ и действующей системы оплаты труда. Расчет основной заработной платы сводится в таблице 35.

$$C_{зп} = Z_{осн} + Z_{доп}$$

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

$Z_{доп}$ – дополнительная заработная плата;

Основная заработная плата ($Z_{осн}$) руководителя (лаборанта, инженера) от предприятия (при наличии руководителя от предприятия) рассчитывается по следующей формуле:

$$Z_{осн} = Z_{дн} + T_{раб}$$

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

$T_{раб}$ – продолжительность раб.дней, выполняемых научно-техническим работником, раб.дн.;

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

Среднедневная заработная плата рассчитывается по формуле:

$$Z_{дн} = \frac{Z_{м} \cdot M}{F_{д}}$$

где: $Z_{м}$ – 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;

$F_{д}$ – действительный годовой фонд рабочего времени научно-технического персонала, раб.дн.

Расчет заработной платы научно – производственного и прочего персонала проекта проводили с учетом работы 2-х человек – научно-руководителя и исполнителя. Баланс рабочего времени исполнителей представлен в таблице 4.4.4.

Таблица 35 – Баланс рабочего времени

Показатели рабочего времени	Руководитель	Магистрант
Календарное число дней	365	365
Количество нерабочих дней		
- выходные дни	118	118
- праздничные дни		
Потери рабочего времени		
- отпуск	24	-
- невыходы по болезни		
Действительный годовой фонд рабочего времени	223	247

Месячный должностной оклад работника:

$$Z_m = Z_b \cdot (k_{пр} + k_d) \cdot k_p,$$

где: Z_b – базовый оклад, руб.;

$k_{пр}$ – премиальный коэффициент (определяется Положением об оплате труда);

k_d – коэффициент доплат и надбавок;

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

При расчете заработной платы научно-производственного и прочего персонала проекта учитывались месячные должностные оклады работников, которые рассчитывались по формуле:

$$Z_m = Z_b \cdot k_p, \text{ где}$$

Z_b – базовый оклад, руб.;

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

Согласно информации сайта Томского политехнического университета, должностной оклад (ППС) доцента кандидата наук в 2020 году без учета РК составил 33664 руб., поскольку руководитель работает на 0,5 ставки, то оклад равен 16832. Расчет основной заработной платы приведен в таблице 36.

Таблица 36 - Расчет основной заработной платы

Исполнитель	З _б , руб.	к _{пр}	к _д	к _р	З _м , руб.	З _{дн} , руб.	Т _б , раб.дни	З _{осн.} , руб.
Руководитель	16832	1	0,35	1,3	29540,16	1483,6	223	330842,8
Магистрант	1923	-	-	1,3	2538,9	115,12	247	28434,64

Дополнительная заработная плата научно-производственного персонала. В данную статью включается сумма выплат, предусмотренных законодательством о труде, например, оплата очередных и дополнительных отпусков; оплата времени, связанного с выполнением государственных и общественных обязанностей; выплата вознаграждения за выслугу лет и т.п. (в среднем – 12 % от суммы основной заработной платы).

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

$$Z_{\text{доп}} = Z_{\text{осн}} * k_{\text{доп}}, \text{ где}$$

$Z_{\text{доп}}$ – дополнительная заработная плата, руб.;

$k_{\text{доп}}$ – коэффициент дополнительной зарплаты;

$Z_{\text{осн}}$ – основная заработная плата, руб.

В таблице 37 приведена форма расчёта основной и дополнительной заработной платы.

Таблица 37 – Заработная плата исполнителей НТИ

Заработная плата	Руководитель	Магистрант
Основная зарплата	330842,8	28434,64
Дополнительная зарплата	33084,3	2843,5
Итого по статье С _{зп}	363927,1	31278,14

Отчисления на социальные нужды. Статья включает в себя отчисления во внебюджетные фонды.

$C_{\text{внеб}} = k_{\text{внеб}} \cdot (Z_{\text{осн}} + Z_{\text{доп}})$, где $k_{\text{внеб}}$ – коэффициент отчисления на уплату во внебюджетные фонды.

На 2021 г. в соответствии с Федеральным законом от 24.07.2009 №212-ФЗ установлен размер страховых взносов равный 30%. Стипендиальный выплаты студентам, магистрам и аспирантам не облагаются налогом.

Отчисления на социальные нужды составляют: $C_{\text{внеб}} = 0,3 \cdot (330842,8 + 33084,3) = 108278,13$ рублей.

Научные и производственные командировки. В эту статью включаются расходы по командировкам научного и производственного персонала, связанного с непосредственным выполнением конкретного проекта, величина которых принимается в размере 10% от основной и дополнительной заработной платы всего персонала, занятого на выполнении данной темы.

Затраты на научные и производственные командировки составляют 39520,524 руб.

Накладные расходы. Расчет накладных расходов провели по следующей формуле:

$$C_{\text{накл}} = k_{\text{накл}} (Z_{\text{осн}} + Z_{\text{доп}}) = 0,8 \cdot (359277,4 + 35927,8) = 316164,16 \text{ руб.}$$

где $k_{\text{накл}}$ – коэффициент накладных расходов принят 0,8.

Таким образом, затраты проекта по всем рассмотренным статьям представлены в таблице 38.

Таблица 38 – Затраты научно-исследовательской работы

Вид исследования	Затраты по статьям							
	Сырье и материалы	Специальное оборудование	Основная заработная плата	Дополнительная заработная плата	Отчисления на соц. нужды	Науч. и произв. командировки	Накладные расходы	Итого плановая себестоимость
Данное исследование	22683,3	89056	359277,4	35927,8	108278,13	39520,524	316164,16	970907,3
Аналог	50000	200000	500000	55000	166500	55500	444000	1471000

4.4.1 Организационная структура проекта

Данный проект представлен в виде проектной организационной структуры. Проектная организационная структура проекта представлена на рисунке 37.



Рисунок 37 – Организационная структура проекта

4.4.2 План управления коммуникациями проекта

План управления коммуникациями отражает требования к коммуникациям со стороны участников проекта (таблица 39).

Таблица 39 – План управления коммуникациями

№, п/п	Передаваемая информация	Кто передает информацию	Кому передается информация	Когда передается информация
1	Статус проекта	Исполнитель	Руководителю	Еженедельно (понедельник)
2	Обмен информацией о текущем состоянии проекта	Исполнитель	Руководителю	Ежемесячно (конец месяца)

Продолжение таблицы 39

3	Документы и информация по проекту	Исполнитель	Руководителю	Не позже сроков графиков и к.точек
4	О выполнении контрольной точки	Исполнитель	Руководителю	Не позже дня контрольного события по плану управления

4.4.3 Реестр рисков проекта

Идентифицированные риски проекта включают в себя возможные неопределенные события, которые могут возникнуть в проекте и вызвать последствия, которые повлекут за собой нежелательные эффекты. Информация по возможным рискам представлена в таблице 40

Таблица 40 - Реестр рисков

№	Риск	Вероятность наступления	Влияние риска	Уровень риска	Способы смягчения риска	Условия наступления
1	Неточность метода анализа	2	5	Низкий	Сравнение данных от нескольких образцов	Низкая точность метода анализа
2	Погрешность расчетов	3	5	Средний	Проверка, пересчет	Невнимательность
3	Отсутствие интереса к результатам исследования	2	5	Низкий	Публикация научной статьи в журналах	Отсутствие положительных результатов исследования

4.5 Определение ресурсной (ресурсосберегающей), финансовой, бюджетной, социальной и экономической эффективности

4.5.1 Оценка абсолютной эффективности исследования

В основе проектного подхода к инвестиционной деятельности предприятия лежит принцип денежных потоков. Особенностью является его прогнозный и долгосрочный характер, поэтому в применяемом подходе к анализу учитываются фактор времени и фактор риска. Для оценки общей экономической эффективности используются следующие основные показатели:

- чистая текущая стоимость (NPV);
- индекс доходности (PI);
- внутренняя ставка доходности (IRR);
- срок окупаемости (DPP).

Чистая текущая стоимость (NPV) – это показатель экономической эффективности инвестиционного проекта, который рассчитывается путём дисконтирования (приведения к текущей стоимости, т.е. на момент инвестирования) ожидаемых денежных потоков (как доходов, так и расходов).

Расчёт NPV осуществляется по следующей формуле:

$$NPV = \sum_{i=1}^n \frac{ЧДП_{оп}}{(1+i)^t} - I_0$$

где:

ЧДП_{оп} – чистые денежные поступления от операционной деятельности;

I₀ – разовые инвестиции, осуществляемые в нулевом году;

t – номер шага расчета (t= 0, 1, 2 ...n)

n – горизонт расчета;

i – ставка дисконтирования (желаемый уровень доходности инвестируемых средств).

Расчёт NPV позволяет судить о целесообразности инвестирования денежных средств. Если $NPV > 0$, то проект оказывается эффективным.

Расчет чистой текущей стоимости представлен в таблице 41. При расчете рентабельность проекта составляла 30%, амортизационные отчисления 10 %.

Таблица 41 - Расчет чистой текущей стоимости по проекту

№	Наименование показателей	Шаг расчета				
		0	1	2	3	4
1	Выручка от реализации, руб.	0	1262179,5	1262179,5	1262179,5	1262179,5
2	Итого приток, руб.	0	1262179,5	1262179,5	1262179,5	1262179,5
3	Инвестиционные издержки, руб.	-970907,3	0	0	0	0
4	Операционные Затраты , руб.	0	555358,8	555358,8	555358,8	555358,8
5	Налогооблагаемая прибыль(1-4)	0	706820,7	706820,7	706820,7	706820,7
6	Налоги 20 %, руб. (5*20%)	0	141364,14	141364,14	141364,14	141364,14
7	Итого отток, руб.	-970907,3	696722,9	696722,9	696722,9	696722,9
8	Чистая прибыль, руб. (5-6)	0	565456,6	565456,6	565456,6	565456,6
9	Чистый денежный поток (ЧДП), руб. (чистая прибыль+амортизация)	-970907,3	662547,3	662547,3	662547,3	662547,3
10	Коэффициент дисконтирования (КД)	1	0,833	0,694	0,578	0,482
11	Чистый дисконтированный денежный поток (ЧДД), руб.(9*10)	-970907,3	551901,9	459807,8	382952,3	319347,8
12	ΣЧДД	1 714 009,8				
13	Итого NPV, руб.	743 102,5				

Коэффициент дисконтирования рассчитан по формуле:

$$КД = \frac{1}{(1 + i)^t}$$

где: i – ставка дисконтирования, 20 %;

t – шаг расчета.

Таким образом, чистая текущая стоимость по проекту в целом составляет

$$NPV = \sum_{t=1}^n \frac{ЧДП_{оп,t}}{(1+i)^t} - I_0 = \sum_{t=1}^n ЧДД - I_0 = 74310252; \text{ условие эффективности } NPV > 0$$

соблюдается.

Индекс доходности (PI) – показатель эффективности инвестиции, представляющий собой отношение дисконтированных доходов к размеру инвестиционного капитала. Данный показатель позволяет определить инвестиционную эффективность вложений в данный проект. Индекс доходности рассчитывается по формуле:

$$PI = \frac{\sum_{t=1}^n \frac{ЧДП_{оп,t}}{(1+i)^t}}{I_0}$$

где: ЧДД - чистый денежный поток, руб.;

I_0 – начальный инвестиционный капитал, руб.;

Таким образом PI для данного проекта составляет:

$$PI = \frac{\sum_{t=1}^n \frac{ЧДП_{оп,t}}{(1+i)^t}}{I_0} = \frac{17140098}{970907,3} = 1,77$$

Так как $PI > 1$, то проект является эффективным.

Внутренняя ставка доходности (IRR). Значение ставки, при которой обращается в нуль, носит название «внутренней ставки доходности» или IRR. Формальное определение «внутренней ставки доходности» заключается в том, что это та ставка дисконтирования, при которой суммы дисконтированных притоков денежных средств равны сумме дисконтированных оттоков или =0. По разности между IRR и ставкой дисконтирования i можно судить о запасе

экономической прочности инвестиционного проекта. Чем ближе IRR к ставке дисконтирования i , тем больше риск от инвестирования в данный проект.

Между чистой текущей стоимостью (NPV) и ставкой дисконтирования (i) существует обратная зависимость. Эта зависимость представлена в таблице 42 и на рисунке 38 .

Таблица 4.5.1.2 - Зависимость NPV от ставки дисконтирования

№	Наименование показателя	0	1	2	3	4	
1	Чистые денежные потоки	-970907	662547,3	662547,3	662547,3	662547,3	NPV,руб
2	Коэффициент дисконтирования						
	0,1	1	0,909	0,826	0,751	0,683	
	0,2	1	0,833	0,694	0,578	0,482	
	0,3	1	0,769	0,592	0,455	0,35	
	0,4	1	0,714	0,51	0,364	0,26	
	0,5	1	0,667	0,444	0,295	0,198	
	0,6	1	0,625	0,391	0,244	0,153	
	0,7	1	0,588	0,346	0,204	0,12	
	0,8	1	0,556	0,309	0,171	0,095	
	0,9	1	0,526	0,277	0,146	0,077	
	0,99	1	0,503	0,253	0,127	0,064	
3	Дисконтный денежный поток, руб						
	0,1	-970907	602255,5	547264,1	497573	452519,8	1128705
	0,2	-970907	551901,9	459807,8	382952,3	319347,8	743102,6
	0,3	-970907	509498,9	392228	301459	231891,6	464170,2
	0,4	-970907	473058,8	337899,1	241167,2	172262,3	253480,1
	0,5	-970907	441919	294171	195451,5	131184,4	91818,57
	0,6	-970907	414092,1	259056	161661,5	101369,7	-34728
	0,7	-970907	389577,8	229241,4	135159,6	79505,68	-137423
	0,8	-970907	368376,3	204727,1	113295,6	62941,99	-221566
	0,9	-970907	348499,9	183525,6	96731,91	51016,14	-291134
	0,99	-970907	333261,3	167624,5	84143,51	42403,03	-343475

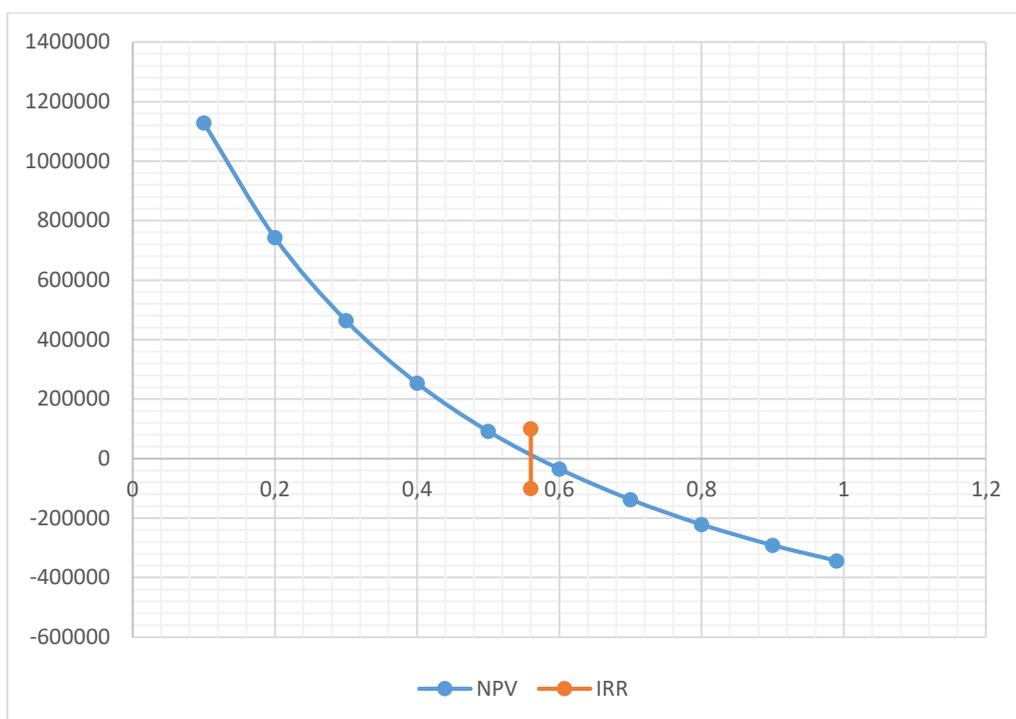


Рисунок 38 – Зависимость NPV от ставки дисконтирования

Из таблицы 42 и 38 графика следует, что по мере роста ставки дисконтирования чистая текущая стоимость уменьшается, становясь отрицательной. Значение ставки, при которой NPV обращается в нуль, носит название «внутренней ставки доходности» или «внутренней нормы прибыли». Из графика 38 получаем, что IRR составляет 0,56.

Запас экономической прочности проекта: $56\% - 20\% = 36\%$

Дисконтированный срок окупаемости. Как отмечалось ранее, одним из недостатков показателя простого срока окупаемости является игнорирование в процессе его расчета разной ценности денег во времени.

Этот недостаток устраняется путем определения дисконтированного срока окупаемости. То есть это время, за которое денежные средства должны совершить оборот.

Наиболее приемлемым методом установления дисконтированного срока окупаемости является расчет кумулятивного (нарастающим итогом) денежного потока (таблица 43).

Таблица 43 – Дисконтированный срок окупаемости

Шаг расчета	0	1	2	3	4
Денежный поток	-970907,3	395486,8	395486,8	395486,8	395486,8
Ставка дисконтирования, i, %	20				
Дисконтированный денежный поток	-970907,3	551901,9	459807,8	382952,3	319347,8
Накопленный дисконтированный денежный поток	-970907,3	-419005,4	40802,4	423754,7	743102,5

$$PP_{\text{диск}} = 1 + \frac{419005,4}{459807,8} = 1,9 \text{ года - дисконтированный срок окупаемости.}$$

Социальная эффективность научного проекта учитывает социально-экономические последствия осуществления научного проекта для общества в целом или отдельных категорий населения или групп лиц, в том числе как непосредственные результаты проекта, так и «внешние» результаты в смежных секторах экономики: социальные, экологические и иные внеэкономические эффекты (44).

Таблица 44 – Критерии социальной эффективности

До	После
Отсутствие информации о детектировании антигена клещевого боррелиоза методом вольтамперометрии	Впервые получены данные об детектировании антигена клещевого боррелиоза методом вольтамперометрии

4.5.2 Оценка сравнительной эффективности исследования

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

Интегральный показатель финансовой эффективности научного исследования получают в ходе оценки бюджета затрат трех (или более) вариантов исполнения научного исследования. Для этого наибольший интегральный показатель реализации технической задачи принимается за базу расчета (как знаменатель), с которым соотносятся финансовые значения по всем вариантам исполнения.

Интегральный финансовый показатель разработки определяется по следующей формуле:

$$I_{\text{финр}}^{\text{исп.}i} = \frac{\Phi_{pi}}{\Phi_{\text{max}}},$$

где: $I_{\text{финр}}^{\text{исп.}i}$ – интегральный финансовый показатель разработки;

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

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

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

Интегральный показатель ресурсоэффективности вариантов исполнения объекта исследования можно определить по следующей формуле:

$$I_{pi} = \sum a_i \cdot b_i,$$

где: I_{pi} – интегральный показатель ресурсоэффективности для i -го варианта исполнения разработки;

a_i – весовой коэффициент i -го варианта исполнения разработки;

b_i^a, b_i^p – балльная оценка i -го варианта исполнения разработки, устанавливается экспертным путем по выбранной шкале оценивания;

n – число параметров сравнения.

Расчет интегрального показателя ресурсоэффективности приведен в форме таблицы (таблице 45).

Таблица 45 – Сравнительная оценка характеристик вариантов исполнения проекта

ПО критерий	Весовой коэффициент параметра	Вольтамперометрия	ИФА	ПЦР
1.Рост производства	0,1	4	5	4
2. Удобство в эксплуатации (соответствует требованиям потребителя)	0,1	5	5	3
3. Цена (уменьшение себестоимости продукции)	0,2	4	4	3
4. Энергосбережение	0,2	4	3	4
5. Надежность	0,2	4	4	3
6. Материалоемкость	0,2	5	4	4
ИТОГО	1	26	25	21

$$I_B = 0,1 \times 4 + 0,1 \times 5 + 0,2 \times 4 + 0,2 \times 4 + 0,2 \times 4 + 0,2 \times 5 = 4,3$$

$$I_{\text{ифа}} = 0,1 \times 5 + 0,1 \times 5 + 0,2 \times 4 + 0,2 \times 3 + 0,2 \times 4 + 0,2 \times 4 = 4,0$$

$$I_{\text{пцр}} = 0,1 \times 4 + 0,1 \times 3 + 0,2 \times 3 + 0,2 \times 4 + 0,2 \times 3 + 0,2 \times 4 = 3,5$$

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:

$$I_{\text{исп.1}} = \frac{I_{p-\text{исп1}}}{I_{\text{финр}}^{\text{исп.1}}}, \quad I_{\text{исп.2}} = \frac{I_{p-\text{исп2}}}{I_{\text{финр}}^{\text{исп.2}}}$$

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

Сравнительная эффективность проекта:

$$\mathcal{E}_{cp} = \frac{I_{исп.1}}{I_{исп.2}}$$

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

Сравнение значений интегральных показателей эффективности позволяет понять и выбрать более эффективный вариант решения поставленной в бакалаврской работе технической задачи с позиции финансовой и ресурсной эффективности. Наглядно данное сравнение представлено в таблице 46.

Таблица 46 – Сравнительная эффективность разработки

№ п/п	Показатели	Вольтамперметрия	ИФА	ПЦР
1	Интегральный финансовый показатель	0,4	0,6	0,6
2	Интегральный показатель ресурсоэффективности	4,3	4,0	3,5
3	Интегральный показатель эффективности	10,75	6,66	5,83
4	Сравнительная эффективность вариантов исполнения	1,6	0,6	0,5

Выводы:

Сравнение значений интегральных показателей эффективности позволяет понять, что разработанный вариант проведения проекта является наиболее эффективным при решении поставленной в магистерской диссертации технической задачи с позиции финансовой и ресурсной эффективности. В ходе выполнения раздела финансового менеджмента определена чистая текущая стоимость, (NPV), равная 743102,52 руб.; индекс доходности PI=1,77; внутренняя ставка доходности IRR=56%, срок окупаемости PP_{дск}=1,9 года. Таким образом мы имеем ресурсоэффективный проект с высоким запасом финансовой прочности и коротким сроком окупаемости.

Глава 5 Социальная ответственность

Введение

В настоящем разделе рассматриваются вопросы охраны труда, связанные с работой в лаборатории, а также разрабатываются мероприятия по предотвращению воздействия на здоровье опасных и вредных факторов для работников лаборатории и создание безопасных условий труда для обслуживающего персонала. Научно-исследовательская работа по разработке синтеза конъюгатов пероксидазы хрена с иммуноглобулинами человека класса G, меченные наночастицами серебра, выполнялась с использованием электрооборудования, и применением химических реактивов в учебной лаборатории второго корпуса НИ ТПУ.

Потенциальными потребителями результатов исследования могут быть различные медицинские учреждения, проводящие анализы крови, а также фармацевтические компании, медицинские учреждения и лаборатории разных профилей.

5.1 Правовые и организационные вопросы обеспечения безопасности

На производстве отношения между нанимателем и исполнителем работы должны регулироваться согласно Трудовому Кодексу Российской Федерации. Для данного проекта предпочтителен режим гибкого рабочего времени. При работе в режиме гибкого рабочего времени начало, окончание или общая продолжительность рабочего дня (смены) определяется по соглашению сторон [33]. Данный режим позволяет оптимально использовать рабочее время на выполнения различных операций.

Защита персональных данных работника должна осуществляться по требованиям Трудового кодекса Российской Федерации. Для работников,

занятых на работах с вредными и (или) опасными условиями труда, предусмотрено обязательное медицинское обследование при приеме на работу и в течение всего рабочего времени приказом Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации.

Рабочее место исследователя должно быть организовано согласно ГОСТ 12.2.032-78 ССБТ «Рабочее место при выполнении работ сидя. Общие эргономические требования», если работа проводится в сидячем положении. Если работа выполняется стоя, то рабочее место должно быть организовано согласно ГОСТ 12.2.033-78 ССБТ «Рабочее место при выполнении работ стоя. Общие эргономические требования».

Для предотвращения несчастных случаев необходимо проводить обучение и проверять знания работников согласно ГОСТ 12.0.004-90. «Организация обучения безопасности труда». Для работы в лаборатории необходимо проводить инструктаж и вести журнал инструктажа по технике безопасности согласно ПНДФ 12.13.1-03. «Методические рекомендации. Техника безопасности при работе в аналитических лабораториях (общие положения)».

5.2 Производственная безопасность

Опасные и вредные факторы при работе по получению и исследованию биоконъюгатов на основе наночастиц серебра представлены в таблице 47

Таблица 47 - Возможные опасные и вредные факторы

Факторы (ГОСТ 12.0.003-2015)	Этапы работ			Нормативная документация
	Разработка	Изготовлен	Эксплуатация	
1. Работа с вредными химическими веществами	+	+		1.1 ГОСТ 12.1.005-88 Система стандартов безопасности

2. Отклонение показателей микроклимата	+	+	+	труда (ССБТ). Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны (с Изменением N 1) [34]
3. Превышение уровня шума		+	+	1.2 ГОСТ 12.1.007-76 Система стандартов безопасности труда (ССБТ). Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности (с Изменениями N 1,2) [35]
4. Недостаточная освещенность рабочей зоны	+		+	2. СанПиН 2.2.4.548-96 Гигиенические требования к микроклимату производственных помещений [36]
5. Электробезопасность	+	+	+	3. ГОСТ 12.1.003-83 Система стандартов безопасности труда (ССБТ). Шум. Общие требования безопасности (с Изменением N 1) [37] 4. СП 52.13330.2016 Естественное и искусственное освещение. Актуализированная редакция СНиП 23-05-95 [38] 5. ГОСТ Р 12.1.019-2017 Система стандартов безопасности труда (ССБТ). Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты [39]

5.2.1 Анализ опасных и вредных производственных факторов и обоснование мероприятий по снижению уровней их воздействия на исследователя (работающего)

5.2.1.1 Работа с вредными химическими веществами

Работа в аналитической лаборатории требует соблюдения техники безопасности, охраны труда работников, индивидуальной защиты [40]. Условия труда должны быть максимально безвредными. Научно-исследовательская работа по теме: «Сравнительное исследование конъюгатов с ферментной и серебряной метками методами спектрофотометрии и вольтамперометрии» связана с химическими реактивами и электроприборами.

Используются вредные и опасные химические вещества, при несоблюдении мер безопасности они могут причинить вред здоровью и угрозу жизни [41]. В аналитической лаборатории химик – аналитик подвергается физическим факторам: параметры микроклимата (температура воздуха, относительная влажность воздуха, скорость движения воздуха), параметры световой среды (искусственное освещение (освещенность) рабочей поверхности). При нарушении санитарно-гигиенического режима в аналитической лаборатории на работников могут воздействовать неблагоприятные факторы производственной среды. Основными из них являются, прежде всего, контакт с токсичными химическими веществами, значительное напряжение зрения при выполнении анализов, работа с приборами и взвешивание на аналитических весах.

Характеристика химических веществ, используемых при выполнении НИР, согласно ГН 2.2.5.1313-03, представлена в таблице 48. Минимизировать возможный незначительный риск для здоровья в процессе выполнения работы и снизить содержание реактивов в воздухе рабочей зоны позволили следующие мероприятия:

1. Использование средств индивидуальной защиты (очки, щитки, маски, респираторы, резиновые перчатки, спецодежда).

2. Герметизация тары хранения и оборудования для проведения реакции.

3. Вытяжная система вентиляции (вытяжной шкаф).

Таблица 48 – Характеристика химических веществ

Наименование	Физические свойства	Величина ПДК, мг/дм ³	Класс опасности	Токсическое действие
Конц. аммиак	Бесцветная жидкость с резким запахом нашатыря	20	4	Вызывает раздражение слизистых оболочек и кожных покровов
Конц. азотная кислота	Бесцветная, дымящая на воздухе жидкость	2	3	Пары вызывают раздражение дыхательных путей
Конц. уксусная кислота	Бесцветная жидкость с характерным резким запахом и кислым вкусом	5	3	Пары уксусной кислоты раздражают слизистые оболочки верхних дыхательных путей

5.2.1.2 Отклонение показателей микроклимата

Показателями метеорологических условий производственной среды согласно ГОСТ 12.1.005 – являются температура, относительная влажность и скорость движения воздуха. Негативные значения показателей микроклимата становятся причиной уменьшения производственных показателей в работе, простуды, радикулита, хронического бронхита и многих других заболеваний. Устанавливаются оптимальные и допустимые значения этих параметров с

учетом избытка теплоты, тяжести выполнения работ и сезонов года. В таблице 49 представлены нормы показателей метеорологических условий в рабочей зоне, которые соблюдаются в данной лаборатории.

В соответствии с СанПиНом 2.2.4.548–96, работа в лаборатории, выполняемая в положении стоя или сидя, и требующая определенного физического напряжения, связанная с постоянной ходьбой, перемещение мелких (до 1 кг) изделий или предметов относится к физической работе (категория Па) [36].

Таблица 49 – Допустимые нормы микроклимата

Сезон года	Категория тяжести выполняемых работ	Температура, °С		Относительная влажность, %		Скорость движения, м/с	
		Фактич.	Доп.	Фактич.	Доп.	Фактич.	Доп.
Холодный	Па	18	19-21	50-40	60-40	0,2	0,2
Теплый	Па	20	20-22	50-40	60-40	0,2	0,2

К средствам коллективной защиты можно отнести установки кондиционирования воздуха, основная задача которых поддерживать параметры воздуха в установленных пределах, для обеспечения надежной работы и комфортных условий для работников.

В лаборатории необходимо создать приток свежего воздуха. Воздух, который используется для вентиляции лаборатории, должен быть очищен от пыли. Для обеспечения допустимых норм микроклимата в рабочей зоне необходимо установить в холодный период времени отопительную систему. Помещение, где находится рабочее место, должно соответствовать нормам, количеству размещенного в нем оборудования и размерам (объем, площадь) по количеству рабочих мест. Нормальные условия труда согласно СанПиН 2.2.4.548 – 96 (Гигиенические требования к микроклимату производственных помещений) устанавливает, что на одно рабочее место должно отводиться не менее 4,5 м² площади в помещении и 20 м³ воздуха. Площадь данного помещения составляет

30 м², объем 100 м³. В данном помещении работают 4 человека, соответственно на одного человека приходится 6,6 м² и 25 м³ воздуха. Это соответствует санитарным нормам.

5.2.1.3 Превышение уровня шума

Шум является одним из наиболее распространенных вредных факторов на производстве, он крайне негативно влияет на здоровье человека. Длительное воздействие шума вызывает ухудшение слуха, реже приводит к глухоте, но также уменьшается внимание и увеличивается расход энергии человеком при выполнении какого-либо вида работ. Для рабочего места характерно наличие шумов: установки кондиционирования создают аэродинамический шум, преобразователи напряжения – электрический [42].

Уровни шума не должны превышать значений, установленных в ГОСТ 12.1.003 – 83 (с изм. на 10.12.2018) и ГОСТ 17187 – 81 (СТ СЭВ 1351-78) (с Изменением N 1) и проводится не реже двух раз в год. По СН 2.2.4/2.1.8.562-96 нормируются параметры шума и составляют: для лаборатории ПДУ 75 - Дб; для вентиляции ПДУ - 70 Дб. По уровню шума, локальной и общей вибрации данная лаборатория с вышеперечисленным оборудованием относится к допустимому классу, ПДУ < 25 дБА, что соответствует требованию безопасного нахождения в лаборатории установленного в этом стандарте. Контроль шума осуществляется шумером. Для снижения шума в лабораториях используется шумобезопасная техника, звукоизоляция, звукопоглощение, рациональная планировка помещения и т.д.

5.2.1.4 Освещенность рабочей зоны

Источник естественного освещения – поток энергии солнца. Естественное освещение является наиболее гигиеничным. Однако по условиям зрительной работы в лаборатории естественного освещения, как правило, недостаточно,

поэтому на рабочих местах оказывается задействованным и искусственное освещение [43]. Оно может быть обеспечено с помощью люминесцентных ламп ЛВ (белого цвета) мощностью 20, 40, 80 Вт. Для рабочих мест с искусственным освещением регламентирована допустимая освещенность, согласно действующим санитарным нормам и правилам СанПиН 1.2.3685-21. Согласно СанПиН 1.2.3685-21, лаборатория, в которой проводятся работы, относится к I группе помещений по задачам зрительной работы, в которых производится различение объектов зрительной работы, при фиксированном направлении линии зрения работающих на рабочую поверхность, а именно взвешивание малых количеств веществ (стандарта холестерина) [44]. В таблице 50 приведены нормы искусственного освещения.

Таблица 50 – Нормы искусственного освещения

Характеристика зрительной работы	Разряд зрительной работы	Искусственное освещение	
		Освещенность, лк	
		При комбинир. освещении	При общем освещении
Наивысшей точности	I	500	400

При выборе осветительного оборудования необходимо учесть условия среды, светотехнические требования и экономические показатели. Контроль искусственного и естественного освещения производственных помещений необходимо проводить не реже одного раза в год при помощи люксметра [45].

5.2.1.5 Электробезопасность

По действующим правилам устройства электроустановок (ПУЭ) лабораторное помещение относится к первому классу, т.е. помещениям без повышенной опасности. Тем не менее, необходимо знать о причинах воздействия электрического тока, и мероприятиях, проводимых для их устранения.

Основной причиной воздействия электрического тока на организм человека являются: напряжение, возникнувшее в результате повреждения изоляции на металлических частях оборудования. Наибольшую опасность при эксплуатации электрических устройств и проведении ремонтнопрофилактических работ представляет поражение электрическим током вследствие присоединения к токоведущим частям аппаратуры и к частям прибора, находящимся под напряжением. Поражающее воздействие электрического тока напрямую зависит от длительности и значения протекания электрического тока через организм человека, частоты и рода тока, места прохождения через тело человека, индивидуального состояния человека. Наибольшую опасность для организма человека представляет переменный ток с частотой от 20 до 100 Гц.

Мероприятия, проводимые для устранения факторов поражения электрическим током:

а) все лица, приступающие к работе с электрооборудованием, проходят инструктаж на рабочем месте, допуск к самостоятельной работе разрешается лишь после проверки знаний техники безопасности; б) осуществляется постоянный контроль качества и исправности защитных приспособлений и заземлении, ремонтно-наладочные работы на действующих электроустановках производится только с использованием защитных средств;

в) эксплуатация электроустановок предусматривает введение необходимой технической документации; обеспечивается недоступность к токоведущим частям, находящимся под напряжением; корпуса приборов и электроустановок заземляются. Установление предельно допустимых уровней (ПДУ) напряжения и тока согласно ГОСТ 12.1.038 – 82 (с изм. N 1). Защитные мероприятия от поражений электрическим током – защитное заземление ГОСТ 12.1.030-81 (с изм. N 1). Принцип действия защитного заземления: человек должен стоять внутри контура заземления и при попадании фазного напряжения на заземленный корпус прибора, под фазным напряжением окажется как корпус прибора, так и участок земли, на которой стоит человек.

5.2.1.6 Расчет времени эвакуации

Помещение исследовательской лаборатории состоит одной секции, в которой оборудование расположено рядами (рисунок 39). Здание II степени огнестойкости. Объем секции 5548 м³, размеры лаборатории: а=38 м, б=36,5 м, в=4 м, г=2,5 м, д=28 м, е=3,5 м.

Путь эвакуации от наиболее удаленной от выхода точки до выхода наружу состоит из шести участков. Людские потоки из проходов сливаются с потоком,двигающимся по сборному проходу, и направляются через лестничную клетку наружу.

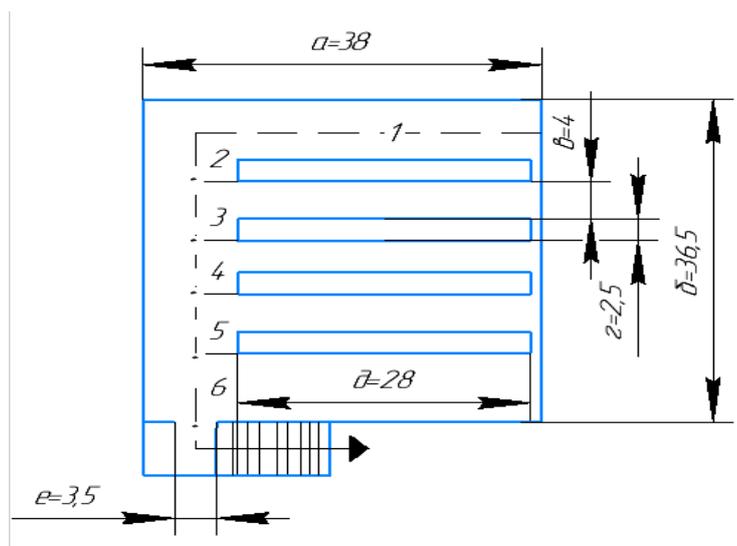


Рисунок 39 – Схема помещения исследовательской лаборатории

1. Расчет возможного числа людей в секции

Согласно СНиП II-77-80 на одного человека приходится 1,35 м², следовательно, расчетное число людей составляет [46]:

$$N = \frac{F_{\text{секции}} - F_{\text{оборуд.}}}{1,35} = \frac{a * б - 4 * г * д}{1,35} = 820 \text{ чел.}$$

2. Средняя плотность людского потока

$$D_{\text{ср}} = \frac{N \cdot f}{F_{\text{секции}} - F_{\text{оборуд.}}} = \frac{820 \cdot 0,1}{1107} = 0,074 \text{ (чел} \cdot \text{м}^2) / \text{м}^2.$$

f – средняя площадь горизонтальной проекции человека: взрослого в летней одежде $0,1 \text{ м}^2$, взрослого в зимней одежде – $0,125 \text{ м}^2$, подростка – $0,07 \text{ м}^2$.

3. Определение времени прохождения каждого участка пути

При расчете весь путь движения людского потока делят на участки длиной l и шириной σ .

- Участок 1 (проход)

$$D_1 = D_{\text{ср}} = 0,074$$

$V_1 = 90,4 \text{ м/мин}$ - скорость движения людского потока в зависимости от плотности.

$$l_1 = a - ((a - d) / 3) = 38 - ((38 - 28) / 3) = 34,67 \text{ м}$$

$$\text{время движения по первому участку: } t_1 = \frac{l_1}{V_1} = \frac{34,67}{90,4} = 0,38 \text{ мин}$$

$$\sigma_1 = 5,25 \text{ м}, q_1 = 6,4 \text{ м/мин}; \text{ что меньше } q_{\text{max}} = 16,5 \text{ м/мин}$$

- Участок 2 (расширение пути)

$$q_2 = q_1 \cdot \frac{\sigma_1}{\sigma_2} = 6,4 \cdot \frac{5,25}{9} = 3,73 \text{ м/мин}$$

$$V_2 = 100 \text{ м/мин}, t_2 = \frac{l_2}{V_2} = \frac{5}{100} = 0,05 \text{ мин}$$

- Участок 3 (Слияние потоков)

Интенсивность движения во всех потоках принимается одинаковой:

$$q_3 = \frac{q_2 \cdot \sigma_2 + q_1 \cdot \sigma_1}{\sigma_3} = \frac{3,73 \cdot 9 + 6,4 \cdot 5,25}{9} = 7,4 \text{ м/мин}$$

$$V_3 = 84 \text{ м/мин}, t_3 = \frac{l_3}{V_3} = \frac{6,25}{84} = 0,077 \text{ мин}$$

- Участок 4 (Слияние потоков)

$$q_4 = \frac{q_3 \cdot \sigma_3 + q_1 \cdot \sigma_1}{\sigma_4} = \frac{7,4 \cdot 9 + 6,4 \cdot 5,25}{9} = 11,3 \text{ м/мин}$$

$$V_4 = 63,5 \text{ м/мин}, t_4 = \frac{l_4}{V_4} = \frac{6,5}{63,5} = 0,1 \text{ мин}$$

- Участок 5 (Слияние потоков)

$$q_5 = \frac{q_4 \cdot \sigma_4 + q_1 \cdot \sigma_1}{\sigma_5} = \frac{11,3 \cdot 9 + 6,4 \cdot 5,25}{9} = 15,03 \text{ м/мин}$$

$$V_5 = 43,7 \text{ м/мин}, t_5 = \frac{l_5}{V_5} = \frac{6,5}{43,7} = 0,15 \text{ мин}$$

- Участок 6 (Слияние потоков)

$$q_6 = \frac{q_5 * \sigma_5 + q_1 * \sigma_1}{\sigma_6} = \frac{15,03 * 9 + 6.4 * 5.25}{9} = 18,76 \frac{\text{М}}{\text{МИН}} > q_{\text{max}}$$

$$= 16.5 \frac{\text{М}}{\text{МИН}}$$

Следовательно, на участке 6 возникает скопление людей, причем ширина участка 6 составляет 9 м, а участком, лимитирующим пропускную способность эвакуационного пути, является марш лестницы шириной 3 м, так как интенсивность движения при скоплении по маршу лестницы меньше интенсивности движения в дверном проеме.

Время эвакуации на участке 6, с учетом задержки движения у лестничного марша равно [14]:

$$t_6 = \frac{l_6}{v_{\text{ск}}} + Nf \left(\frac{1}{q_{\text{ск}} * \sigma_{\text{марш}}} - \frac{1}{q_5 * \sigma_5 + 4 * q_1 * \sigma_1} \right)$$

$$= \frac{9.25}{33} + 820 * 0.1 \left(\frac{1}{19.6 * 3,5} - \frac{1}{15.03 * 9 + 4 * 6.4 * 5.25} \right)$$

$$= 1.16 \text{ мин}$$

Расчетное время эвакуации людей из зала $t_p = \sum t_i = 1,54 \text{ мин.}$, $t_p < t_{\text{нб}} = 1,7 \text{ мин.}$ Условие безопасности соблюдается.

5.3 Экологическая безопасность

5.3.1 Анализ влияния объекта и процесса исследования на окружающую среду

Аналитическая деятельность по получению и исследованию конъюгатов на основе НЧ серебра проводится в закрытом помещении – это не оказывает прямое воздействие на окружающую среду.

Используемые растворы химикатов поступают в канализацию, которая выведена на муниципальные очистные сооружения. Эти растворы нейтрализованы и обладают малой концентрацией, что снижает их токсичность

и загрязнение сточных вод. Некоторые растворы не утилизируются, а используются повторно.

Воздействие паров химических соединений на персонал незначительно при условии использования вытяжных шкафов с вентиляций.

5.3.2 Мероприятия по защите окружающей среды

В целях обеспечения защиты окружающей среды следуют проводить ряд мероприятий по минимизации вредного влияния процесса синтеза и изучения конъюгатов на основе НЧ серебра.

В таблице 51 представлены вредные воздействия на литосферу, гидросферу, атмосферу и мероприятия по их минимизации, возникающие в процессе культивирования.

Таблица 51 – Вредные воздействия на окружающую среду и мероприятия по их минимизации

Сфера Земли	Вредные воздействия и их источники	Мероприятия по минимизации вредных воздействий	НД, регламентирующие экологические показатели
Литосфера	Загрязнение почвы и утраты ей плодотворных свойств из-за неправильной утилизации химических реактивов и органических растворителей	Организация правильной утилизации органических отходов, а также твердых химических отходов	ФЗ от 10.01.02 № 7-ФЗ «Об охране окружающей среды», ГОСТ Р 14.01-2005, ГОСТ 17.1.3.06-82, ГОСТ 17.1.3.13-86, ГН 2.1.5.1315-03
Гидросфера	Попадание опасных химических растворов и реактивов в общую систему водоотведения	Обезвреживание растворов с агрессивной средой химическим или	ФЗ от 10.01.02 № 7-ФЗ «Об охране окружающей среды», ГОСТ

		физическим способом. Организация безопасного слива химических реагентов	17.4.1.02-83, ГОСТ 17.4.3.03-85, ГОСТ 17.4.3.04-85, ГОСТ Р 14.01-2005
Атмосфера	Для атмосферы представляют опасность выбросы загрязняющих веществ, выходящих из вытяжного шкафа	Обезвреживание паров летучих химических соединений посредством очистки выходящего из вентиляции воздуха специальными фильтрами.	ФЗ "Об охране атмосферного воздуха" (ред. от 13.07.2015), ГОСТ 32673-2014, СанПиН 2.1.3684-21

5.4 Безопасность в чрезвычайных ситуациях

5.4.1 Анализ вероятных ЧС, которые могут возникнуть в лаборатории при проведении исследований

В ходе проведения исследования могут возникнуть ряд чрезвычайных ситуаций, таких как:

- возгорание оборудования;
- выход оборудования из строя;
- ухудшение самочувствия исследователя, из-за воздействия паров летучих соединений;
- утечка растворов агрессивных реагентов (кислота, щелочь);

5.4.2 Обоснование мероприятий по предотвращению ЧС и разработка порядка действия в случае возникновения ЧС

Все лабораторные помещения должны соответствовать требованиям пожарной безопасности согласно ГОСТ 12.1.004-91 (с изм. N 1) и иметь необходимые средства противопожарной безопасности согласно ГОСТ 12.4.009-83 (с изм. N 1). Помещения лабораторий по степени пожароопасности относятся к классу П-2, так как в нем присутствует выделение пыли и волокон во взвешенном состоянии (в ред. Федерального закона от 10.07.2012 N 117-ФЗ).

Лаборатории должны быть оснащены пожарными кранами (в количестве не менее одного на этаж) с пожарными рукавами необходимой длины. Каждое рабочее помещение должно быть оснащено песком и огнетушителями, а помещения с легковоспламеняющимися и огнеопасными веществами - дополнительными средствами пожаротушения. На видном месте в помещении лаборатории должен висеть план эвакуации. Необходимо назначить из числа сотрудников группу (2 - 5 человек), которая сможет организовать мероприятие противопожарной безопасности, получив предварительно инструктаж от местной команды пожарных.

Каждый сотрудник лаборатории должны быть ознакомлен с правилами обращения с взрыво- и огнеопасными веществами, газовыми приборами, а также использовать противогаз, огнетушитель и другие средства пожаротушения, имеющимися в наличие лаборатории. В лаборатории, а также в непосредственной близости от них (под лестницами, в коридорах) строго запрещается хранение горючих материалов, и установление предметов, загромождающих пути эвакуации и доступа к средствам пожаротушения. Курение разрешается только в специально отведенных и оборудованных зонах. Курение в лаборатории воспрещается. Отсутствие разрешения начальника или сотрудника, отвечающего за противопожарную безопасность, запрещается установление нагревательных и лабораторных приборов, запуск в эксплуатацию. Нагревательные приборы необходимо установить на термостойкую подставку.

Строго запрещена эксплуатация неисправных нагревательных и лабораторных приборов. Сотрудник лаборатории, заметивший задымление, пожар или другие признаки пожара обязан:

- незамедлительно сообщить в пожарную часть по телефону;
- принять всевозможные меры по недопущению распространения огня;
- известить начальника лаборатории, который в свою очередь обязан известить сотрудников, принять меры по ликвидации пожара и их эвакуации.
- знать и уметь пользоваться первичными средствами пожаротушения.



Рисунок 40 – План эвакуации при пожаре

Для тушения пожаров, в случае их возникновения, в лаборатории имеются следующие средства:

- асбестовое одеяло, которое используется при тушении обесточенных электропроводов, горячей одежды;
- ящик с песком для тушения обесточенных горящих на горизонтальной поверхности проводов;
- огнетушитель ОХП-10, предназначенный для тушения пожаров твердых горючих материалов, легковоспламеняющихся и горючих жидкостей;
- огнетушитель ОВП-10, предназначенный для тушения различных веществ и материалов, за исключением щелочных металлов и веществ, горение которых происходит без доступа воздуха, а также электроустановок, находящихся под напряжением [47].

В лаборатории имеются огнетушители марки ОХП-10 и ОВП-10, которые предназначены для тушения загорания различных веществ и материалов, за

исключением щелочноземельных элементов, а также электроустановок под напряжением до 1000 В. При загорании снять огнетушитель, поднести к очагу загорания (не менее 1 метра), прочистить спрыск иглой или гвоздем, повернуть рычаг до отказа до 180°, перевернуть огнетушитель вверх дном и направить струю на огонь. Действие огнетушителя 60 секунд, длина струи пены 6-8 метров. Выход пены из огнетушителя 50 литров.

Заключение

Проведение любого исследования в химической лаборатории требует знание техники безопасности. Перед началом работы в лаборатории нужно провести инструктаж сотрудника по технике безопасности, рассказать про меры устранения вероятных чрезвычайных ситуаций, а также рассказать про правильную эксплуатацию оборудования лаборатории. Так же следует обратить внимание на факторы, негативно влияющие на окружающую среду, и провести ряд мероприятий по их минимизации. Рабочее место сотрудника должно быть организовано согласно требованиям ГОСТа. Отношения между сотрудником и руководителем должны основываться на Трудовом Кодексе Российской Федерации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По результатам проведенного исследования:

- 1) Синтезирован конъюгат ПХК-АТ методом периодатного ковалентного сшивания;
- 2) Синтезирован конъюгат ПХК-АТ*Аg;
- 3) Исследована каталитическая активность конъюгатов ПХК-АТ и ПХК-АТ*Аg, в отношении ТМБ методом спектрофотометрии;
- 4) Проведены сравнительные испытания конъюгатов ПХК-АТ и ПХК-АТ*Аg по определению клещевого боррелиоза методом ИФА;
- 5) Использован конъюгат ПХК-АТ*Аg для вольтамперометрического определения иммуноглобулинов человека класса G к клещевому боррелиозу через регистрацию сигнала окисления серебряной метки;
- 6) Сформулированы рекомендации по использованию конъюгата ПХК-АТ*Аg для иммуноанализа антител методами спектрофотометрии и вольтамперометрии.

Список используемых источников

1. Иммуноглобулины I Под ред. Г. Литман, Р. Гуд. — М.: Мир, 1981.
2. Теория и практика иммуноферментного анализа. / Т 33 А.М Егоров, А.П Осипов, Б.Б. Дзантиев, Е.М Гаврилова – М.: Высш. шк., 1991,-288 с.
3. И. В. Березин, А. А. Клесов. Практический курс химической и ферментативной кинетики. — М.: Изд-во МГУ, 1976.
4. С. Д. Варфоломеев, С. В. Зайцев. Кинетические методы в биохимических исследованиях. — М.: МГУ, 1982.
5. Jiang, Bing; Duan, Demin; Gao, Lizeng; Zhou, Mengjie; Fan, Kelong; Tang, Yan; Xi, Juqun; Bi, Yuhai; Tong, Zhou; Gao, George Fu; Xie, Ni; Tang, Aifa; Nie, Guohui; Liang, Minmin; Yan, Xiyun (2018). Standardized assays for determining the catalytic activity and kinetics of peroxidase-like nanozymes. *Nature Protocols*, (), –. doi:10.1038/s41596-018-0001-1
6. Vineh, M. B., Saboury, A. A., Poostchi, A. A., Rashid, A. M. & Parivar, K. Stability and activity improvement of horseradish peroxidase by covalent immobilization on functionalized reduced graphene oxide and biodegradation of high phenol concentration. *Int. J. Biol. Macromol.* 17, 32776–32779 (2017).
7. Sidorov I.A., Prabakaran P., Dimitrov D.S. Non-covalent conjugation of nanoparticles to antibodies via electrostatic interactions - A computational model // *J. Comput. Theor. Nanosci.* American Scientific Publishers, 2007. Vol. 4, № 6. P. 1103–1107.
8. Tanaka R. et al. A novel enhancement assay for immunochromatographic test strips using gold nanoparticles // *Anal. Bioanal. Chem.* 2006. Vol. 385, № 8. P. 1414–1420.
9. Sokolov K. et al. Real-time vital optical imaging of precancer using anti-epidermal growth factor receptor antibodies conjugated to gold nanoparticles // *Cancer Res.* American Association for Cancer Research, 2003. Vol. 63, № 9. P. 1999–2004.
10. Szymanski M.S., Porter R.A. Preparation and quality control of silver nanoparticle-antibody conjugate for use in electrochemical immunoassays // *J. Immunol. Methods.* Elsevier, 2013. Vol. 387, № 1–2. P. 262–269.
11. Wan Y. et al. Highly Specific Electrochemical Analysis of Cancer Cells using Multi-Nanoparticle Labeling // *Angew. Chemie Int. Ed.* 2014. Vol. 53, № 48. P. 13145–13149.

12. Walkey C.D. et al. Nanoparticle size and surface chemistry determine serum protein adsorption and macrophage uptake // *J. Am. Chem. Soc.* 2012. Vol. 134, № 4. P. 2139–2147.
13. Verma A., Stellacci F. Effect of surface properties on nanoparticle-cell interactions // *Small*. 2010. Vol. 6, № 1. P. 12–21.
14. Mitragotri S., Burke P.A., Langer R. Overcoming the challenges in administering biopharmaceuticals: Formulation and delivery strategies // *Nature Reviews Drug Discovery*. Nature Publishing Group, 2014. Vol. 13, № 9. P. 655–672.
15. Христунова Е.П. Разработка электрохимического иммуносенсора на основе наночастиц серебра для определения антител к вирусу клещевого энцефалита. : дис. ... канд. хим. наук : 02.00.02 / Христунова Екатерина Петровна – Томск, 2020 – 120 с.
16. Mazzucchelli S. et al. Dependence of nanoparticle-cell recognition efficiency on the surface orientation of scFv targeting ligands // *Biomater. Sci. Royal Society of Chemistry*, 2013. Vol. 1, № 7. P. 728–735.
17. Общая фармакопейная статья метод иммуноферментного анализа. ОФС.1.7.2.0033.15 Метод иммуноферментного анализа / <https://pharmacopoeia.ru/ofs-1-7-2-0033-15-metod-immunofermentnogo-analiza/> доступ свободный, дата обращения 15.04.2021.
18. Иммуноферментный анализ /Под ред. Г. Г. Нго, Г. М. Леикофф. — М.: Мир, 1988.
19. Нго Г.Г., Ленкофф Г.М.(ред.) Иммуноферментный анализ. - М.: Мир, 1988. – 446 с.
20. Ванеева Л.И., Гридчина И.Ю., Пантелеев О.А. и др. Изучение сорбционной способности полистироловых планшетов, используемых в ИФА.// *ЖМЭИ*. – 1986. – №9. – С. 44 – 48.
21. Самуилов В.Д. Иммуноферментный анализ // *Соросовский образовательный ж.* № 12, 1999, с. 9-15
22. Чумак Р.М. Иммуноферментный анализ и рекомбинантные антигены // *Лабораторная диагностика*. - 1999. - №3. - С. 3 - 6.
23. Esser P., Knudsen H., Nielsen V. et al. *Solid Phase Guide*. – Denmark: Nunc, 1999. – 50 p.
24. Иммунологические методы исследований / Под ред. И. Лефковитса, Б. Пернуса, —М.: Мир, 1988.

25. Sandwich-type immunosensors and immunoassays exploiting nanostructure labels: A review / Xiaomei Pei, Bing Zhang, Juan Tang, Bingqian Liu, Wenqiang Lai, Dianping Tang // *Analytica Chimica Acta*. – 2013. – Vol. 758, P. 1-18.
26. Иванская Н.В. Практическое пособие по иммуноферментному анализу. – М.: Киев, 2003.
27. Введение в иммунологию / Л. В. Ирвинг, Е. Х. Лерой, Б. В. Уильям.— М.: Высшая школа, 1983.
28. Раевская Г.Е, Певец М.Я., Пилипенко В.Г., Ростопира Н.М., Ткачикова Л. Получение пероксидазной конъюгатов для выявления ВИЧ-специфических антител методом иммуноферментного анализа // *Иммунология и аллергология*, 2002, № 2-3, С.39-42.
29. Гончаренко В.С., Раевская Е., Касьяненко Т.В., Ганова Л.А., Шимко Н.М. сравнительное изучение использование в-фенилендиамину и тетраметилбензидина в иммуноферментном анализе для диагностики ВИЧ-инфекции, гепатитов В и С и сифилиса // *Иммунология и аллергология*, 2002, № 4, с.18-21.
30. Неизотопные методы иммуноанализа//Итоги науки и техники. — М.: ВИНТИ, 1987. Сер. Биотехнология. Т. 3.
31. Кишкин А.А Иммунологические и серологические исследования в клинической практике. – М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2006. -536 с.
32. Карпищенко А. И. (ред.) Медицинская лабораторная диагностика (программы и алгоритмы): Справочник. –СПБ.: Интермедика, 1997.- 304 с.
33. Трудовой кодекс Российской Федерации от 30 декабря 2011 г. № 197-ФЗ (с изм. от 5 апреля 2021 г.)
34. ГОСТ 12.1.005-88. Система стандартов безопасности труда (ССБТ). Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны (с Изменением N 1)
35. ГОСТ 12.1.007-76. Система стандартов безопасности труда (ССБТ). Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности (с Изменениями N 1,2)
36. СанПиН 2.2.4.548-96. Гигиенические требования к микроклимату производственных помещений
37. ГОСТ 12.1.003-83. Система стандартов безопасности труда (ССБТ). Шум. Общие требования безопасности (с Изменением N 1)

38. СП 52.13330.2016. Естественное и искусственное освещение.
Актуализированная редакция СНиП 23-05-95
39. ГОСТ Р 12.1.019-2017. Система стандартов безопасности труда (ССБТ).
Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты
40. ТР ТС 019/2011 Технический регламент «О безопасности средств индивидуальной защиты» (с изменениями на 28 мая 2019).
41. ГОСТ 12.1.007-76 ССБТ. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности.
42. СН 2.2.4/2.1.8.562–96. Шум на рабочих местах, в помещениях жилых, общественных зданий и на территории застройки.
43. СП 52.13330.2016 Естественное и искусственное освещение.
Актуализированная редакция СНиП 23-05-95.
44. Строительные нормы и правила СНиП 23-05-95. Естественное и искусственное освещение (утв. постановлением Минстроя РФ от 2 августа 1995 г. N 18-78) (с изменениями от 29 мая 2003 г.).
45. СанПиН 1.2.3685-21. «Гигиенические нормативы и требования к обеспечению безопасности и (или) безвредности для человека факторов среды обитания»
46. Методические указания «Расчет времени эвакуации при пожаре»
47. ГОСТ Р 22.0.07-95. Безопасность в чрезвычайных ситуациях. Источники техногенных чрезвычайных ситуаций. Классификация и номенклатура поражающих факторов и их параметров
48. Synthesis and Study of Silver Nanoparticles / W Sally D. Solomon, Mozghan Bahadory, Aravindan V. Jeyarajasingam, Susan et al. // Journal of Chemical Education. – 2007. – Vol. 84, № 2, P. 322-328.