

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
**«НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ТОМСКИЙ ПОЛИТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

Исследовательская школа химических и биомедицинских технологий
Направление подготовки 18.04.01 Химическая технология

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Тема работы
Сенсоры для обнаружения молекул с использованием оптических и электрохимических методов

УДК 543.07:543.55:616-006

Студент

Группа	ФИО	Подпись	Дата
9ДМ91	Гридина Мария Вадимовна		

Руководитель

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
профессор ИШХБМТ	Родригес Р.Д.	PhD		

Консультант

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
профессор ИШФВП	Шеремет Е.С.	PhD		

КОНСУЛЬТАНТЫ:

По разделу «Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение»

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент ОСГН	Якимова Т.Б.	к.э.н		

По разделу «Социальная ответственность»

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Старший преподаватель	Романова С.В.			

ДОПУСТИТЬ К ЗАЩИТЕ:

Руководитель ООП 18.04.01 Химическая технология	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Профессор	Пестряков А.Н.	д.х.н.		

Томск – 2021 г.

**Планируемые результаты освоения ООП
«Перспективные химические и биомедицинские технологии»**

Код компетенции	Наименование компетенции
Общекультурные (универсальные) компетенции	
УК(У)-1	Способен осуществлять критический анализ проблемных ситуаций основе системного подхода, вырабатывать стратегию действий
УК(У)-2	Способен управлять проектом на всех этапах его жизненного цикла
УК(У)-3	Способен организовывать и руководить работой команды, вырабатывая командную стратегию для достижения поставленной цели
УК(У)-4	Способен применять современные коммуникативные технологии, в том числе на иностранном (-ых) языках (-ах), для академического и профессионального взаимодействия
УК(У)-5	Способен анализировать и учитывать разнообразие культур в процессе межкультурного взаимодействия
УК(У)-6	Способен определить и реализовывать приоритеты собственной деятельности и способы ее совершенствования на основе самооценки
Общепрофессиональные компетенции	
ОПК(У)-1	Готовность к коммуникации в устной и письменной формах на русском и иностранном языках для решения задач профессиональной деятельности;
ОПК(У)-2	Готовность руководить коллективом в сфере своей профессиональной деятельности, толерантно воспринимая социальные, этнические, конфессиональные и культурные различия;
ОПК(У)-3	Способность к профессиональной эксплуатации современного оборудования и приборов в соответствии с направлением и профилем подготовки
ОПК(У)-4	Готовность к использованию методов математического моделирования материалов и технологических процессов, к теоретическому анализу и экспериментальной проверке теоретических гипотез;
ОПК(У)-5	Готовность к защите объектов интеллектуальной собственности и коммерциализации прав на объекты интеллектуальной собственности
Профессиональные компетенции выпускников	
ПК(У)-1	Способность организовывать самостоятельную и коллективную научно-исследовательскую работу, разрабатывать планы и программы проведения научных исследований и технических разработок, разрабатывать задания для исполнителей
ПК(У)-2	Готовность к поиску, обработке, анализу и систематизации научно-технической информации по теме исследования, выбору методик и средств решения задачи
ПК(У)-3	Способность использовать современные приборы и методики, организовывать проведение экспериментов и испытаний, проводить их обработку и анализировать их результаты
ПК(У)-18	Способность и готовность к созданию новых экспериментальных установок для проведения лабораторных практикумов
ПК(У)-19	Готовность к разработке учебно-методической документации для реализации образовательных программ
ДПК(У)-1	Готовность к созданию химических соединений, материалов и изделий биомедицинского назначения и (или) их физико-химического анализа с учетом требований охраны здоровья и безопасности труда, защиты окружающей среды.

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
 федеральное государственное автономное образовательное учреждение
 высшего образования
**«НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
 ТОМСКИЙ ПОЛИТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

Исследовательская школа химических и биомедицинских технологий
 Направление подготовки 18.04.01 Химическая технология

УТВЕРЖДАЮ:
 Руководитель ООП
 18.04.01 Химическая технология
 _____ А.Н. Пестряков
 15.03.2021 г.

ЗАДАНИЕ
на выполнение выпускной квалификационной работы

В форме:

магистерской диссертации

Студенту:

Группа	ФИО
9ДМ91	Гридиной Марии Вадимовне

Тема работы:

Сенсоры для обнаружения молекул с использованием оптических и электрохимических методов	
Утверждена приказом директора (дата, номер)	

Срок сдачи студентом выполненной работы:	11.06.2021 г.
------------------------------------------	---------------

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>Объектом исследования являются мультифункциональные сенсоры, модифицированные слоем 4-нитробензотиола, для идентификации молекул с помощью оптических и электрохимических методов.</p> <p>Затраты на выполнение исследовательской работы минимальны, что говорит об экономической выгоде проведенного исследования.</p> <p>Выполнение работы сопровождается минимальными выбросами вредных веществ в окружающую среду.</p>
<p>Перечень подлежащих исследованию, проектированию и разработке вопросов</p> <p><i>(аналитический обзор по литературным источникам с целью выяснения достижений мировой науки техники в рассматриваемой области; постановка задачи</i></p>	<p>Перечень разделов, разработанных в данной работе:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Литературный обзор 2. Объекты и методы исследования 3. Экспериментальная часть

исследования, проектирования, конструирования; содержание процедуры исследования, проектирования, конструирования; обсуждение результатов выполненной работы; наименование дополнительных разделов, подлежащих разработке; заключение по работе).	<p>4. Результаты и обсуждение</p> <p>5. Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение</p> <p>6. Социальная ответственность</p> <p>7. Заключение</p>
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Консультанты по разделам выпускной квалификационной работы (с указанием разделов)

Раздел	Консультант
Социальная ответственность	Романова С.В., старший преподаватель
Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение	Якимова Т.Б., доцент ОСГН
Раздел ВКР на иностранном языке	Кобзева Н.В., доцент

Названия разделов, которые должны быть написаны на русском и иностранном языках:

На русском:

2. Экспериментальная часть

3. Результаты и обсуждение

На английском:

2. Experimental part

3. Results and discussion

Дата выдачи задания на выполнение выпускной квалификационной работы по линейному графику	15.03.2021 г.
-------------------------------------------------------------------------------------------------	---------------

Задание выдал руководитель:

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
профессор ИШХБМТ	Родригес Рауль Давид	PhD		15.03.2021 г.

Задание принял к исполнению студент:

Группа	ФИО	Подпись	Дата
9ДМ91	Гридина Мария Вадимовна		15.03.2021 г.

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

Студенту:

Группа	ФИО
9ДМ91	Гридина Мария Вадимовна

Школа	ИШХБМТ	Отделение школы (НОЦ)	
Уровень образования	Магистратура	Направление/специальность	Химическая технология

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

1. <i>Стоимость ресурсов научного исследования (НИ): материально-технических, энергетических, финансовых, информационных и человеческих</i>	Стоимость выполняемых работ, материальных ресурсов, согласно применяемой техники и технологии, в соответствии с рыночными ценами. Оклады в соответствии с окладами сотрудников «НИ ТПУ».
2. <i>Нормы и нормативы расходования ресурсов</i>	- районный коэффициент- 1,3; - коэффициент дополнительной заработной платы - 1,12; - накладные расходы – 16%; - норма амортизации 15%.
3. <i>Используемая система налогообложения, ставки налогов, отчислений, дисконтирования и кредитования</i>	- страховые взносы во внебюджетные фонды 30,2%.

Перечень вопросов, подлежащих исследованию, проектированию и разработке:

1. <i>Оценка коммерческого и инновационного потенциала НТИ</i>	Анализ потенциальных потребителей результатов исследования, конкурентных технических решений, оценка готовности проекта к коммерциализации, проведение SWOT-анализа.
2. <i>Разработка устава научно-технического проекта</i>	Определение целей и результатов проекта, организационной структуры проекта.
3. <i>Планирование процесса управления НТИ: структура и график проведения, бюджет, риски и организация закупок</i>	Формирование плана и графика проекта: - определение структуры работ; - определение трудоемкости работ;- Формирование бюджета затрат проекта.
4. <i>Определение ресурсной, финансовой, экономической эффективности</i>	Расчет показателей сравнительной эффективности проекта, интегрального показателя ресурсоэффективности

Перечень графического материала (с точным указанием обязательных чертежей):

1. <i>Оценочная карта для сравнения конкурентных технических решений</i>
2. <i>Матрица SWOT</i>
3. <i>Оценка готовности проекта к коммерциализации</i>
4. <i>Календарный план</i>
5. <i>Бюджет НИ</i>

Дата выдачи задания для раздела по линейному графику	15.03.2021
-------------------------------------------------------------	------------

Задание выдал консультант:

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент ОСГН	Якимова Татьяна Борисовна	к.э.н		15.03.2021

Задание принял к исполнению студент:

Группа	ФИО	Подпись	Дата
9ДМ91	Гридина Мария Вадимовна		15.03.2021

**ЗАДАНИЕ ДЛЯ РАЗДЕЛА
«СОЦИАЛЬНАЯ ОТВЕТСТВЕННОСТЬ»**

Студенту:

Группа	ФИО
9ДМ91	Гридиной Марии Вадимовне

Школа	ИШХБМТ	Отделение (НОЦ)	
Уровень образования	Магистратура	Направление/специальность	Химическая технология

Тема ВКР:

Сенсоры для обнаружения молекул с использованием оптических и электрохимических методов	
Исходные данные к разделу «Социальная ответственность»:	
<p>1. Характеристика объекта исследования (вещество, материал, прибор, алгоритм, методика, рабочая зона) и области его применения</p>	<p>Объектом исследования являются multifunctional сенсоры, модифицированные слоем 4-нитробензотиола, для идентификации молекул с помощью оптических и электрохимических методов. Рабочей зоной является Научный парк ТПУ.</p>
Перечень вопросов, подлежащих исследованию, проектированию и разработке:	
<p>1. Правовые и организационные вопросы обеспечения безопасности:</p> <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. 	<p>- специальные: Трудовой кодекс Российской Федерации от 30.12.2001 N 197-ФЗ (ред. от 30.04.2021); ГОСТ 12.4.299-2015 Система стандартов безопасности труда (ССБТ). Средства индивидуальной защиты органов дыхания. Рекомендации по выбору, применению и техническому обслуживанию (с поправкой);</p> <p>ГОСТ В-1586-42 Халаты медицинские санитарные и лабораторные;</p> <p>ГОСТ 12.4.103-83 Система стандартов безопасности труда (ССБТ). Одежда специальная защитная, средства индивидуальной защиты ног и рук. Классификация;</p> <p>- организационные мероприятия по компоновке рабочей зоны:</p> <p>ГОСТ 12.2.032-78 Рабочее место при выполнении работ сидя;</p> <p>ГОСТ 12.2.033-78 Рабочее место при выполнении работ стоя.</p>
<p>2. Производственная безопасность:</p> <p>2.1. Анализ выявленных вредных и опасных факторов</p> <p>2.2. Обоснование мероприятий по снижению воздействия</p>	<p>К вредным факторам производственной среды относятся:</p> <p>- Отклонение показателей микроклимата;</p>

	<ul style="list-style-type: none"> - Превышение уровня шума; - Недостаточная освещенность рабочей зоны; <p>К опасным факторам производственной среды относятся:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Химический фактор; - Воздействие лазерного излучения; - Повышенное значение напряжения в электрической цепи, замыкание которой может произойти через тело человека.
3. Экологическая безопасность:	<ul style="list-style-type: none"> – анализ воздействия объекта на атмосферу: возможность попадания в атмосферу летучих веществ; – анализ воздействия объекта на гидросферу: возможность попадания химических веществ в канализацию (культуральной среды, 4-нитробензотиола, нитрата серебра, наночастиц серебра); – анализ воздействия объекта на литосферу: загрязнение почвы расходными материалами при неправильной утилизации отходов (лабораторный пластик).
4. Безопасность в чрезвычайных ситуациях:	<ul style="list-style-type: none"> – возможные ЧС на рабочем месте: выход из строя системы энергоснабжения, возникновение эпидемии, обрушение зданий в результате землетрясения, урагана или пожара; - наиболее типичная ЧС: пожар

Дата выдачи задания для раздела по линейному графику	15.03.2021
-------------------------------------------------------------	------------

Задание выдал консультант:

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Старший преподаватель	Романова Светлана Владимировна	-		

Задание принял к исполнению студент:

Группа	ФИО	Подпись	Дата
9ДМ91	Гридина Мария Вадимовна		

РЕФЕРАТ

Выпускная квалификационная работа 117 с., 31 рис., 22 табл., 62 источника, 1 приложение.

Ключевые слова: раковые клетки, pH межклеточной среды, адреналин, 4-нитробензолтиол, димеркаптоазобензол, LIMPc, SERS, электрохимические сенсоры.

Объектом исследования являются мультифункциональные сенсоры, изготовленные путем лазерной интеграции наночастиц серебра в полиэтилентерефталат (ПЭТ) с электрохимически выращенными кристаллами серебра и функционализированные слоем 4-нитробензолтиола (4-NBT), для идентификации молекул.

Целью данной работы является разработать сенсоры для обнаружения молекул с использованием оптических и электрохимических методов путем отслеживания изменений в плазмон-индуцированных каталитических реакциях.

В процессе исследования были изготовлены подложки, полученные посредством лазерной обработки пленок металлических наночастиц с последующим электрохимическим выращиванием кристаллов серебра (AgLIMPc/AgEC/4-NBT). Полученные структуры обладают уникальными физическими и механическими свойствами. Изучена временная стабильность, надежность, антибактериальная активность, SERS чувствительность с межклеточной средой раковых клеток, перспективы применения *in vivo*, а также электрохимические свойства.

В результате исследования были разработаны сенсоры AgLIMPc/AgEC/4-NBT и изучены их свойства. Было установлено, что с помощью полученных датчиков можно отслеживать изменения в межклеточной среде раковых клеток по SERS сигналам изменения молекулы 4-NBT. Кроме того, показаны электрохимические свойства подложек для обнаружения молекулы адреналина в различных концентрациях.

Область применения: медицинские учреждения, университетские лаборатории, научно-исследовательские центры и промышленные предприятия.

Экономическая эффективность/значимость работы: проведены расчеты финансового менеджмента, ресурсоэффективности и ресурсосбережения, которые показали, что исследование рентабельно. Способ изготовления подложек достаточно прост и экономичен.

В будущем планируется дальнейшее изучение электрохимических свойств для обнаружения молекул в более низких концентрациях с целью снижения порога детектирования, а также изучение датчиков *in vivo* для обнаружения раковых клеток.

ОПРЕДЕЛЕНИЯ, СОКРАЩЕНИЯ, НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

ПЭТ – полиэтилентерефталат;

4-NBT – 4-нитробензолтиол;

4-ABT – 4-аминобензолтиол;

DMAВ – димеркаптоазобензол;

LIMPc – композитный материал, полученный путем лазерной обработки пленки серебряных наночастиц на полимерной подложке;

AgNPs – серебряные наночастицы;

SERS – Surface-enhanced Raman spectroscopy (гигантская спектроскопия комбинационного рассеяния света);

КР - комбинационное рассеяние;

СЭМ – сканирующая электронная микроскопия;

EDX – энергодисперсионная рентгеновская спектроскопия;

УЗ – ультразвук;

АФК – активные формы кислорода;

ВОЗ - всемирная организация здравоохранения.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	14
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	16
1.1 Раковые заболевания и их диагностика стандартными методами	16
1.2 SERS как перспективный метод диагностики раковых заболеваний	18
1.3 Детектирование рН и АФК как метод обнаружения раковых клеток	21
1.4 Плазмонный фотокатализ молекулы 4-нитробензолтиола	25
1.5 Влияние рН и АФК на образование молекулы DMAВ	27
1.6 Сенсоры для электрохимического детектирования адреналина	29
2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	33
2.1 Объекты исследования	33
2.2 Сырье и материалы	33
2.3 Оборудование	33
3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	34
3.1 Изготовление подложек AgLIMPc/AgEC/4-NBT	34
3.2 Культивирование клеточной линии MDA-MB-231 и отбор проб	36
3.3 Методика приготовления буфера Бриттона-Робинсона	37
3.4 Методика проведения SERS измерений	37
3.5 Методика проведения анализа антибактериальной активности AgLIMPc/AgEC/4-NBT	38
3.6 Методика подготовки материала для исследования подложек через кожу	39
3.7 Методика приготовления раствора адреналина	40
3.8 Методика изготовления электрохимического сенсора и исследование его электрохимических свойств	40

4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	41
4.1 Получение SEM и EDX изображений	41
4.2 Изучение эффективности электрохимического осаждения серебра на AgLIMPc	42
4.3 Изучение стабильности AgLIMPc/AgEC/4-NBT	43
4.4 Изучение возможности повторного использования AgLIMPc/AgEC/4-NBT	45
4.5 Антибактериальная активность AgLIMPc/AgEC/4-NBT	46
4.6 Получение спектров комбинационного рассеяния света AgLIMPc/AgEC/4-NBT с pH буферами	49
4.7 Получение спектров комбинационного рассеяния света AgLIMPc/AgEC/4-NBT с межклеточной средой раковых клеток MDA-MB-231	51
4.8 Перспективы применения AgLIMPc/AgEC/4-NBT <i>in vivo</i>	56
4.9 Детектирование адреналина на подложке AgLIMPc/AgEC/4-NBT	57
5. ФИНАНСОВЫЙ МЕНЕДЖМЕНТ, РЕСУРСОЭФФЕКТИВНОСТЬ И РЕСУРСОСБЕРЕЖЕНИЕ	60
5.1 Предпроектный анализ	60
5.1.1 Потенциальные потребители результатов исследования	60
5.1.2 Анализ конкурентных технических решений с позиции ресурсоэффективности и ресурсосбережения	61
5.1.3 SWOT-анализ	62
5.1.4 Оценка готовности проекта к коммерциализации	64
5.2 Инициация проекта	65
5.2.1 Цели и результаты проекта	65
5.2.2 Организационная структура проекта	66
5.3 Бюджет научного исследования	68

5.3.1 Сырье, материалы, специальное оборудование, покупные изделия	68
5.3.2 Расчет затрат на оборудование для научно-экспериментальных работ	69
5.3.3 Основная заработная плата исполнителей темы	70
5.3.4 Дополнительная заработная плата исполнителей темы.....	71
5.3.5 Отчисления во внебюджетные фонды	72
5.3.6 Накладные расходы.....	72
5.3.7 Формирование бюджета затрат научно-исследовательского проекта .	73
5.3.8 Оценка сравнительной эффективности исследования	73
5.4 Заключение по разделу	74
6. СОЦИАЛЬНАЯ ОТВЕТСТВЕННОСТЬ.....	76
6.1 Правовые и организационные вопросы обеспечения безопасности	77
6.1.1 Специальные (характерные для проектируемой рабочей зоны) правовые нормы трудового законодательства	77
6.1.2 Организационные мероприятия при компоновке рабочей зоны	78
6.2 Производственная безопасность	80
6.2.1 Анализ вредных факторов производственной среды	81
6.2.2 Анализ опасных факторов производственной среды	87
6.2.3 Обоснование мероприятий по снижению уровней воздействия опасных и вредных факторов на исследователя	92
6.3 Экологическая безопасность	93
6.4 Безопасность в чрезвычайных ситуациях	94
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	97
Список публикаций.....	99
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	100
Приложение А	107

ВВЕДЕНИЕ

В настоящий момент раковые заболевания являются одной из основных причин смертности по всему миру. Рак - это общий термин для большой группы заболеваний, которые могут поражать любую часть тела. Особенностью онкологических заболеваний является то, что их достаточно сложно диагностировать на ранних стадиях, поэтому возникает необходимость создать оптимальный метод детектирования раковых клеток на начальных стадиях их роста и развития [1].

На сегодняшний день известно несколько способов обнаружения раковых клеток, куда относят один из наиболее перспективных – Рамановскую спектроскопию (также называемую спектроскопией комбинационного рассеяния света, КР спектроскопии). Однако все чаще стали применять плазмонные структуры для усиления сигнала КР. Этот метод известен как спектроскопия гигантского комбинационного рассеяния света (ГКРС, англ. surface-enhanced Raman spectroscopy, SERS) [2]. Он является высокоспецифичным методом обнаружения молекул, который позволяет проводить диагностику опухолей.

В настоящее время многие исследования посвящены детектированию раковых клеток с помощью SERS, где наблюдаются изменения в плазмон-индуцированном фотокатализе. К наиболее распространенным и стандартным фотокаталитическим системам относят реакцию превращения 4-нитробензолтиола (4-NBT) в 4-аминобензолтиол (4-ABT) и димеркаптоазобензол (DMAВ). Однако механизм прохождения данной реакции все еще находится на стадии обсуждения.

Нашей научной группой была выдвинута гипотеза, что данная реакция будет зависеть от изменения рН среды. Известно, что раковые клетки имеют кислую межклеточную микросреду, рН которой на 0,5–1 единицу ниже, чем во внутриклеточном матриксе [3]. Предположительно кислая межклеточная среда

раковых клеток запустит реакцию димеризации молекулы 4-NBT до DMAВ, что легко можно будет детектировать с помощью Рамановской спектроскопии.

Для достижения поставленных целей были созданы гибкие, проводящие сенсоры AgLIMPc/AgNPs/4-NBT с помощью лазерной интеграции пленки серебряных наночастиц в полимер с электрохимическим выращиванием Ag и их химической функционализации монослоем молекулы 4-NBT. Сенсоры проявляют высокую SERS чувствительность, надежность, химическую стабильность и антибактериальную активность. Полученный датчик AgLIMPc/AgNPs/4-NBT может выступать в качестве электрода для электрохимического обнаружения некоторых биологически-активных молекул.

Объектом исследования являются мультифункциональные сенсоры для идентификации молекул.

Практическая значимость

Сенсоры на основе лазерной интеграции наночастиц серебра с последующим его электрохимическим осаждением и химической функционализацией молекулы 4-NBT позволят детектировать кислую межклеточную среду раковых клеток с помощью метода SERS, что в свою очередь обеспечит возможность мониторинга опухолей в режиме реального времени.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Раковые заболевания и их диагностика стандартными методами

В настоящее время одними из главных причин смерти по всему миру являются раковые заболевания. Рак или как его еще называют - злокачественная опухоль и новообразование образуется в результате абнормального роста тканей в организме человека [4]. Одной из определяющих особенностей рака является быстрое образование аномальных клеток, которые растут за пределами своих обычных границ. Они затем могут вторгаться в соседние здоровые ткани и распространяться на другие органы, данный процесс называется метастазирование. Метастазы являются основной причиной смерти от рака [5].

Как правило, заболевание вызвано генетическими изменениями клеток, а именно мутациями генов, которые отвечают за производство белков. Если один или несколько генов, кодирующих белок, будут повреждены, то клетка будет делиться и распространяться уже с аномальной ДНК. Это может привести к неконтролируемому размножению злокачественных клеток [6].

Принято считать, что не существует единой причины, вызывающей мутацию генов. Ученые предполагают, что рак вызывает взаимодействие многих факторов. Так, например, инициировать заболевание может большое количество неспецифических воздействий, включая радиацию, химические вещества, вирусы, воспаление и т. д. [7].

Заболевания, связанные с онкологией, занимают 2-е место после сердечно-сосудистых расстройств [4]. По данным ВОЗ в 2020 году от раковых заболеваний умерли почти 10 миллионов человек [8]. При этом самыми распространенными видами рака являлись:

- рак молочной железы (зафиксировано 2,26 млн случаев заболеваемости);
- рак легких (2,21 млн);
- рак прямой и толстой кишки (1,93 млн);
- рак кожи (1,2 млн);

- рак желудка (1,09 млн) [8].

К сожалению, даже после удаления опухолевых тканей не всегда удается избавиться от этой патологии из-за плохого раннего выявления и терапевтических возможностей [9]. Таким образом, возникает необходимость разработки новых технологий раннего обнаружения и лечения онкологических заболеваний с целью повышения выживаемости пациентов [9]. Диагностирование рака на ранних стадиях позволит увеличить эффективность лечения, сократить его стоимость, а также существенно повысить качество жизни пациентов, страдающих раковыми заболеваниями.

В настоящий момент существует много различных способов мониторинга опухолей. Одним из самых достоверных является гистологическое исследование первичного опухолевого очага [10]. Данное исследование проводится под микроскопом после биопсии для изучения происхождения опухоли и для определения будущего алгоритма лечения. Также всё чаще начали обнаруживать специфические онкомаркеры в различных биологических жидкостях, характерные для опухолей определенных локализаций.

По мере того как исследователи узнают больше о болезни, разрабатываются новые диагностические инструменты и совершенствуются существующие методы. Чаще всего применяют компьютерную томографию (КТ) и магнитно-резонансную томографию (МРТ), которые используются как методы анатомической визуализации. Также применяют позитронно-эмиссионную томографию (ПЭТ), позволяющую зафиксировать метаболические изменения в тканях [11].

К лабораторным методам анализа заболевания относят детектирование раковых клеток различными способами, к одним из которых относят метод полимеразной цепной реакции (ПЦР). ПЦР успешно используется для обнаружения небольшого количества опухолевых клеток при гематологическом раке, при котором аномалии ДНК достаточно устойчивы [12]. Так, например, Yamaguchi K et al. детектировали карциноэмбриональный антиген (СЕА) и

цитокератин 20 в крови, полученной от пациентов с колоректальной карциномой, с помощью обратной транскриптазы (ОТ-ПЦР) [13].

В последние несколько лет многие исследователи все чаще начали применять Рамановскую спектроскопию, как перспективный метод для диагностики и лечения раковых заболеваний [14]. Однако не всегда удается обнаружить интенсивный рамановский отклик от биологических молекул, вследствие чего используют плазмонные структуры на основе наночастиц благородных металлов для усиления интенсивности сигналов за счет рассеяния света в виде локального усиления электромагнитного поля. Данный метод известен как гигантская спектроскопия комбинационного рассеяния света или surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS). Высокая чувствительность и мультиплексирующие возможности технологий SERS делают эту методику достаточно специфичной и конкурентоспособной.

1.2 SERS как перспективный метод диагностики раковых заболеваний

Главное преимущество спектроскопии поверхностно-усиленного комбинационного рассеяния (SERS) заключается в том, что она является оптическим сверхчувствительным аналитическим методом, который может применяться неинвазивно для обнаружения и визуализации широкого спектра аналитов. SERS позволяет идентифицировать колебательные спектры или “отпечатки пальцев” молекул зонда, которые контактируют с плазмонными наноструктурами. Наноструктуры благородных металлов, где при облучении формируются так называемые “горячие точки” - областей усиления электромагнитного поля - широко исследуются в качестве SERS-активных подложек, в частности для селективного и чувствительного обнаружения белковых маркеров рака. Отличительной особенностью SERS метода является сверхчувствительность до уровня одной молекулы [15]. Также он практически не требует подготовки образца и применим в исследованиях *in vitro* [16].

Banaei N et al. в своей работе одновременно обнаруживали три биомаркера рака поджелудочной железы: CA19-9, MMP7 и MUC4 с помощью SERS, рис. 1 [17].

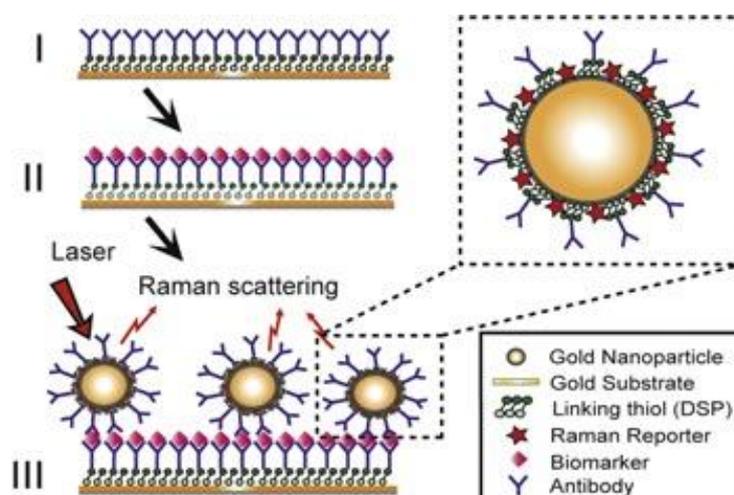


Рисунок 1 - Иммуноанализ на основе SERS для количественной оценки биомаркеров: (I) функционализация золотого субстрата тиолом и антителом; (II) захват желаемых антигенов из сыворотки; (III) модификация субстрата захвата и внешних рамановских меток [17].

Авторы продемонстрировали на 15 образцах сывороток (по 5 образцов от пациентов с панкреатитом, раком поджелудочной железы и здоровых индивидов) гетерогенность экспрессии изучаемых онкомаркеров. В эксперименте использовали кремниевую подложку, покрытую золотом, и золотые наночастицы с иммобилизованными на их поверхности антителами к изучаемым молекулам. Рамановской меткой служила молекула 4-NBT. Используя мультиплексную высокопроизводительную платформу иммуноанализа на основе SERS, авторы успешно обнаружили все три биомаркера [17]. Результаты демонстрируют большие перспективы использования SERS в качестве недорогого, высокочувствительного и высокопроизводительного подхода для новой диагностики жидкостной биопсии [17].

Авторы следующей статьи продемонстрировали применение комбинационного рассеяния света для обнаружения внеклеточных метаболитов опухоли в различных условиях культивирования клеток. Им удалось отследить метаболиты рака с применением наноструктурированного плазмонного субстрата, содежащего сверхрешетку наночастиц Au, рис 2 [18].

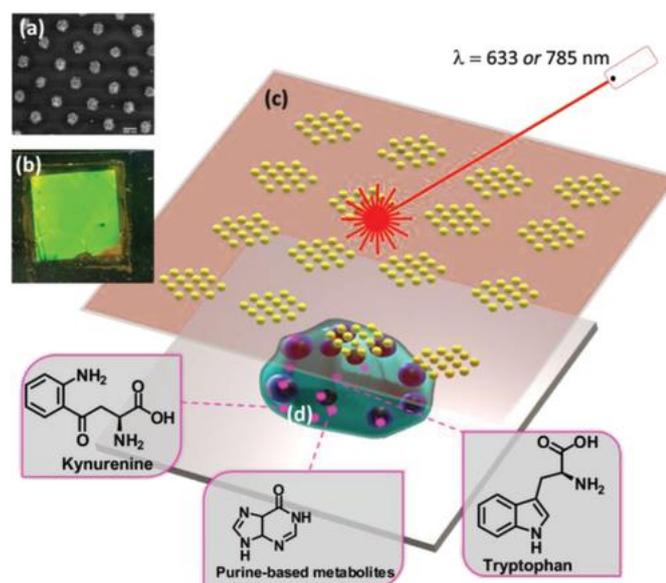


Рисунок 2 - Схема проведения эксперимента по детектированию метаболитов [18].

В результате были получены спектры комбинационного рассеяния с характеристическими пиками кинуренина (Кун) на 560 см^{-1} и триптофана (Трп) на 760 см^{-1} , которые секретируются раковыми клетками, рис.3 [18]. Данная разработка имеет решающее значение для безметочного обнаружения и визуализации биологических молекул.

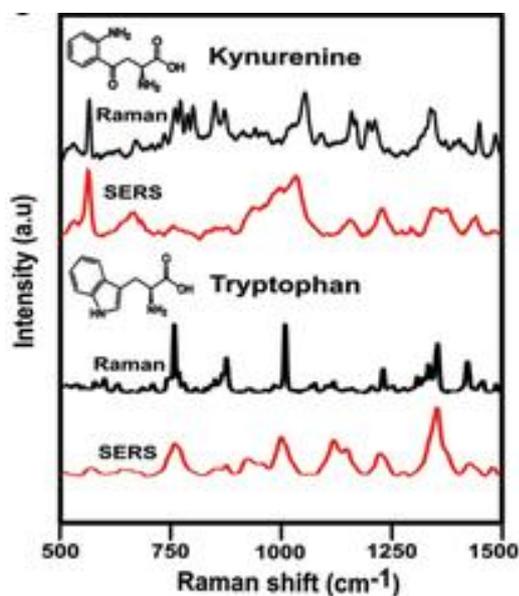


Рисунок 3 - Сравнение спектров комбинационного рассеяния и SERS кинуренина и триптофана, измеренных в твердом состоянии (черный) и в водном растворе на подложке (красный) [18].

1.3 Детектирование pH и АФК как метод обнаружения раковых клеток

Как правило здоровые клетки поддерживают внутриклеточный pH (pH_i) в узком диапазоне от 7,1 до 7,2. Это обеспечивается за счет управления мембранными протонными насосами и специальными переносчиками, активность которых определяется с помощью внутрицитоплазматических датчиков pH [19]. Эти рецепторы обладают способностью распознавать и вызывать клеточные реакции для поддержания pH_i , зачастую за счет подкисления внеклеточного pH.

Сильно регулируемый уровень pH внутри клеток и менее регулируемый уровень pH внеклеточного матрикса является результатом тонкого баланса между метаболическими процессами, производством и транспортировкой протонов и удалением продуктов жизнедеятельности. Раковые клетки демонстрируют выраженное усиление метаболических процессов, при которых увеличивается потребление глюкозы. Аэробный гликолиз или эффект Варбурга является одним из отличительных признаков метаболизма рака, который подразумевает чрезмерное производство протонов [3]. Высокая концентрация протонов приводит к гибели клетки, и для того чтобы избежать этого, раковые клетки переносят протоны во внеклеточный матрикс.

Избыток протонов (H^+), выведенных из злокачественных клеток, накапливается во внеклеточном матриксе, где хроническая гипоксия и отсутствие функциональных кровеносных сосудов препятствуют клиренсу протонов, создавая, таким образом, более кислую среду, pH которой на 0,5–1 единицу ниже, чем в межклеточном матриксе [3]. Это нарушение облегчает адаптивное поведение раковых клеток, такое как ремоделирование цитоскелета и направленная миграция, уклонение от апоптоза, инвазия и метастазирование [19].

Была выдвинута гипотеза, что контроль pH может позволить увеличить эффективность химиотерапии и снизить токсичность лечения. Традиционно, методы по измерению pH разделяют на 4 группы: индикаторные реагенты (в большинстве случаев применяют лакмусовую бумагу), pH тест-полоски,

методы с металлическими и стеклянными электродами [20]. Однако все эти методы не позволяют зафиксировать рН или изменение его уровня на несколько десятков в масштабах клеток.

Оптические методы сверхразрешающей микроскопии с использованием флуоресцентных меток (включающих ряд флуоресцентных рН-чувствительных красителей [21] и углеродные точки [22]) дают такую возможность. В своей работе Ye X et al. создали флуоресцентный зонд на основе углеродных точек (рН-CDs), которые обладали высокой селективностью, отличной фотостабильностью и низкой цитотоксичностью. Кроме того, они проявляли рН-чувствительную реакцию в диапазоне 1,0–9,0, что желательно для отслеживания значения рН в живых клетках. Однако существующие флуоресцентные зонды имеют существенные ограничения, которые заключаются в длительности синтетической подготовки образцов [22].

Тем не менее, в последние годы уделяется все большее внимания методам гигантского комбинационного рассеяния света (поверхностно-усиленной рамановской спектроскопии) в связи с малой токсичностью меток, высоким потенциалом к мультиплексности и возможностью комбинировать все сигналы в ИК - диапазоне.

Интересной особенностью использования SERS является то, что коллоидные наночастицы поглощаются клетками и дают информацию о внутриклеточной среде с характерным разрешением в сотни нм, в то время как сенсоры на основе больших структур позволяют изучать межклеточную среду с разрешением в несколько мкм.

Другим важным маркером для идентификации рака являются активные формы кислорода (АФК). Существуют пять основных активных форм кислорода: H_2O_2 , $\cdot\text{OH}$, $\text{O}_2\cdot^-$, $\text{ROO}\cdot$, $^1\text{O}_2$, образующихся при воспалительных и раковых заболеваниях [23]. Kai Cui et al. добились одновременного обнаружения всех пяти АФК с помощью одного зонда на основе 4-аминобензолтиола (4-АВТ), функционализированного гемином и золотыми наночастицами (Au/4-АВТ/Hemin). Авторы показали, что данный зонд может

вступать в реакцию с АФК с помощью радикального окислительного механизма связи с образованием 4,4'-димеркаптоазобензола (DMAB) [23]. Затем было показано, что DMAB дает характерные пики поверхностно-усиленного комбинационного рассеяния высокой интенсивности при 1142, 1386 и 1432 cm^{-1} , что, в свою очередь, позволяет непосредственно обнаруживать АФК [23], рис.4.

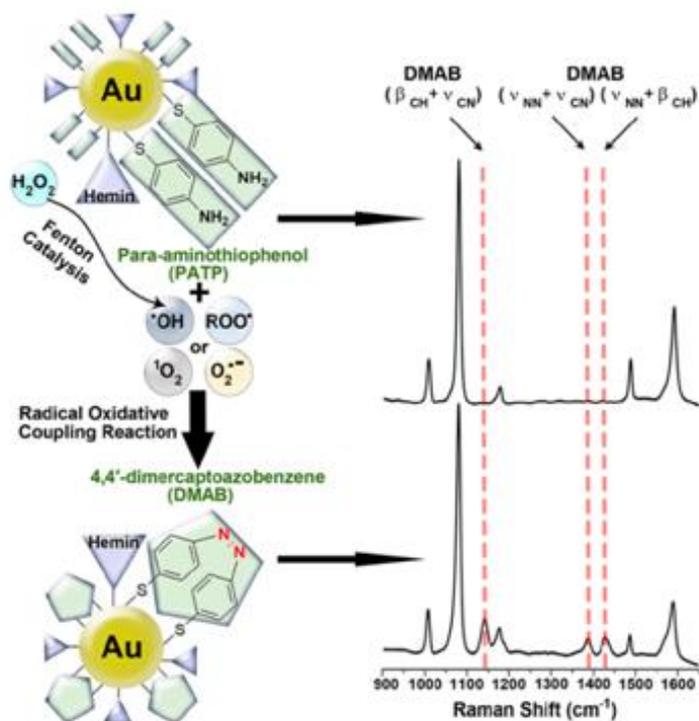


Рисунок 4 – Радикальная реакция нанозонда на основе 4-АВТ для обнаружения АФК [23].

Также было установлено, что 4-меркаптобензойная кислота (DMA) на золотых наночастицах является рН чувствительным зондом SERS даже для обнаружения нитратов [24]. Существуют работы, которые показывают создание рН сенсора для живых клеток. Например, Chen P. et al. продемонстрировали функционализированные 4-аминобензотиолом (4-АВТ) многостенные углеродные нанотрубки, которые дополнительно функционализированы наночастицами типа ядро-оболочка золота и серебра ($\text{Au} @ \text{Ag}$) в качестве субстрата SERS. При этом молекулы п-аминотиофенола служат в качестве SERS репортеров, которые имеют рН зависимые характеристики. Данная

работа демонстрирует возможность создания сенсоров, реагирующих на pH раковых клеток.

Еще в одном научном исследовании сообщается о внутриклеточном датчике pH, основанном на поверхностном усиленном комбинационном рассеянии (SERS), использующем обработанные соляной кислотой (HCl) золотые наностержни (GNRs) в качестве субстратов SERS и 4-аминобензотиол (4-ABT) в качестве репортера комбинационного рассеяния [26].

Было установлено, что спектр SERS 4-ABT сильно зависит от значения pH. Интенсивность полос SERS при 1142 см^{-1} , 1390 см^{-1} и 1432 см^{-1} явно возрастала при изменении значения pH от 3,0 до 8,0. pH-зависимая эффективность SERS 4-ABT, функционализированного золотыми наностержнями, хорошо сохранялась даже после включения GNRs в живую линию клеток HeLa [26]. Авторы Zong S et al. продемонстрировали, что зонды на основе 4-ABT, GNRs и CTAB (цетилтриметиламмония бромид), обработанные HCl могут быть использованы в качестве эффективного внутриклеточного датчика pH, рис.5 [26].

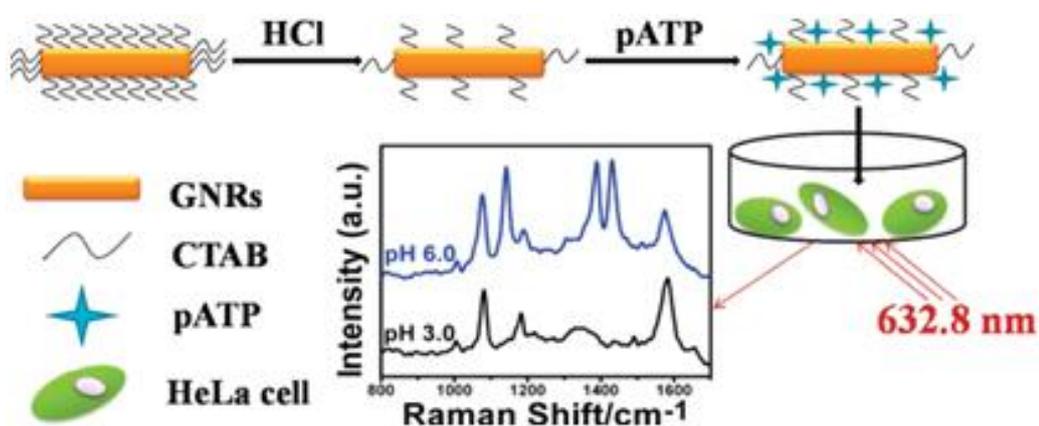


Рисунок 5 – Схема синтеза зонда на основе 4-ABT, GNRs и CTAB, обработанных HCl [26].

Следующая работа посвящена изучению внеклеточного pH, который является важным регуляторным фактором, определяющим многие клеточные процессы, включая пролиферацию, дифференцировку и апоптоз [27]. Авторами Mengxi Xu et al. были разработаны наночастицы Au, модифицированные 4-MPy (4-меркаптопиридин) в качестве внутриклеточных датчиков pH на основе поверхностно-усиленной рамановской спектроскопии (SERS). Также была

создана подложка с молекулами 4-MPy для *in situ* обнаружения рНе (внеклеточного рН) во время апоптоза, рис.6.

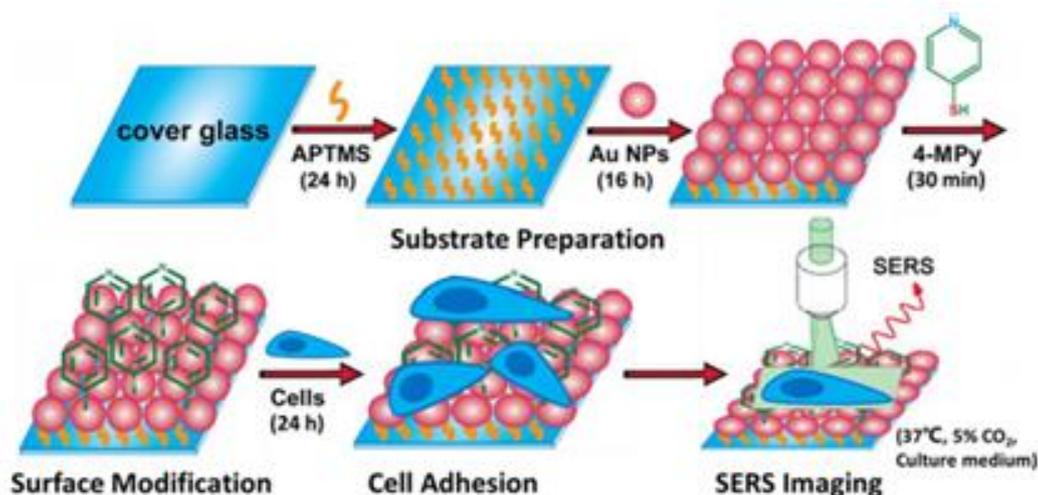


Рисунок 6 – Принципиальная схема подготовки подложки с золотыми наночастицами, модифицированными 4-MPy для *in situ* SERS мониторинга внеклеточного рН [27].

1.4 Плазмонный фотокатализ молекулы 4-нитробензолтиола

С точки зрения химии фотокатализ – это ускорение химической реакции в присутствии света и катализатора в совокупности. При фотокатализе свет поглощается адсорбированным субстратом. В фотогенерируемом катализе фотокаталитическая активность зависит от способности катализатора создавать пары электрон-дырка, которые генерируют свободные радикалы, способные вступать во вторичные реакции [28].

Известно, что использование лазерного возбуждения в рамановской спектроскопии может индуцировать фотокаталитические реакции органических веществ. В некоторых случаях для стимулирования химических реакций при облучении требуются дополнительные катализаторы, такие как наночастицы благородных металлов, например, серебра или золота [29].

В нашем исследовании была изучена одна из стандартных плазмон-индуцированных фотокаталитических реакций восстановления и окисления 4-нитробензолтиола (4-NBT) на наночастицах серебра. Данная молекула имеет

четкий сигнал комбинационного рассеяния. Схема реакции представлена на рис. 7.

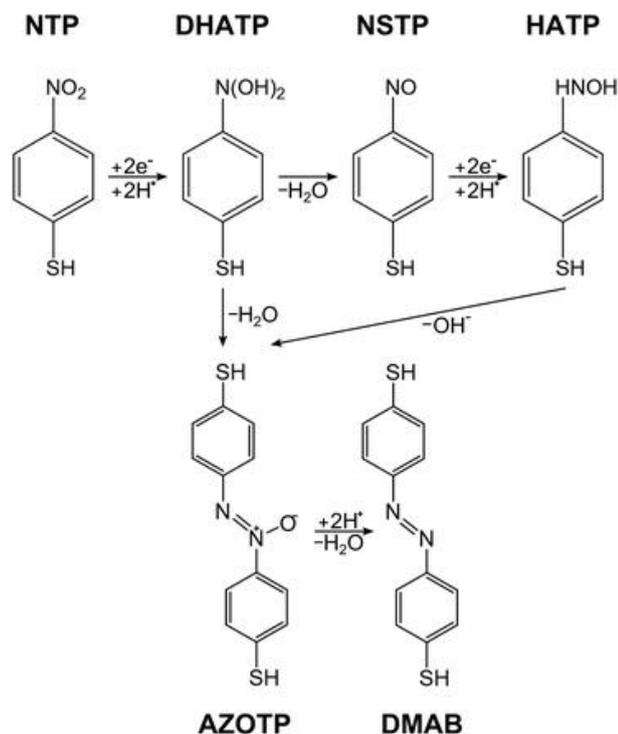


Рисунок 7 – Схема реакции димеризации молекулы 4-NBT [37].

Переход молекул 4-NBT в 4-ABT и DMAB на плазмонных наночастицах при лазерном облучении является широко изученным примером плазмон-индуцированных фотокаталитических реакций [29]. Условия такой реакции зависят от многих экспериментальных параметров, включая размер плазмонных наночастиц, химический состав, форму, мощность освещения и даже время лазерного возбуждения [29].

В настоящее время считается, что физические механизмы этой реакции зависят от энергии LSPR (локализованный поверхностный плазмонный резонанс), наличия горячих точек (hotspots), электронной плотности состояний, температуры реакции, а также зависят от расстояния субстрат - молекула [30].

Однако, основными причинами фотокаталитической реакции восстановления и окисления 4-NBT в 4-ABT и DMAB являются так называемый механизм переноса «горячих электронов», перенос заряда, гибридизация металл - молекула, а также высокая температура или термический нагрев подложки. После лазерного облучения образца с

плазмонными наночастицами и фотокаталитически-активной молекулой 4-NBT происходит переход «горячих электронов» из валентной зоны (HOMO) в зону проводимости (LUMO). Так как электроны отрицательно заряжены, протекает реакция с изменением степени окисления N от +5 до +3.

1.5 Влияние pH и АФК на образование молекулы DMAВ

Также есть предположения, что помимо термического нагрева и переноса «горячих электронов» запустить фотокаталитическую реакцию превращения 4-NBT в 4-ABT и DMAВ способна среда с различными pH и активные формы кислорода (АФК).

На данный момент существует множество работ посвященных управляемой реакции окисления 4-ABT в DMAВ в щелочных условиях. Однако вопрос контроля химической реакции 4-NBT в DMAВ с помощью различных значений pH, все еще находится на стадиях обсуждения.

Авторами Jingang Wang et al. было показано, что плазмон-индуцированная каталитическая реакция 4-NBT до DMAВ, зависит от значений pH и протекает в более кислых условиях, чем в нейтральных и щелочных. Кроме того, скорость данной реакции можно контролировать с помощью времени экспозиции и плотности мощности лазера [31]. На рис.8 представлены спектры комбинационного рассеяния 4-NBT с нейтральным, щелочным и кислым буфером, при этом молекула 4-NBT была смешана с AgNPs в водной среде.

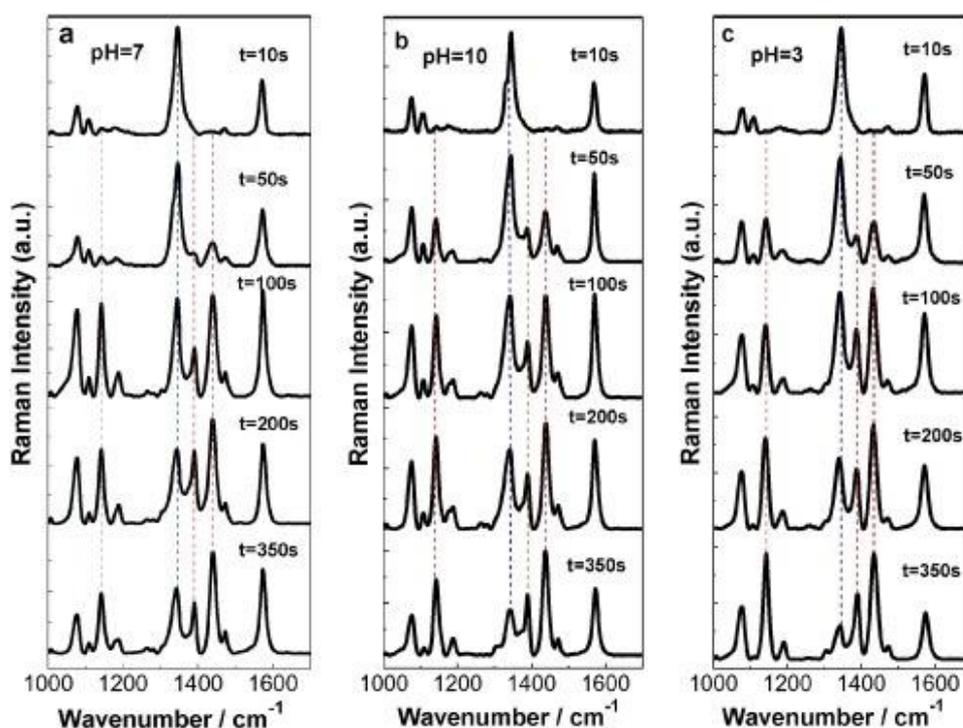


Рисунок 8 – Спектры комбинационного рассеяния 4-NBT в нейтральной (а), щелочной (б) и кислой среде (с) при увеличении времени экспозиции [31].

Авторами было показано, что управляемая плазмонами химическая реакция димеризации 4-NBT протекает в нейтральных и щелочных условиях в зависимости от времени экспозиции (рис. 8 а,б). Однако в кислой среде реакция так же происходит, начиная с 50 секунды, при этом интенсивность пика от DMAВ на расположенного 1439 см^{-1} превысила интенсивность пика от 4-NBT расположенного на 1332 см^{-1} . При увеличении времени облучения выход DMAВ продолжал расти. Таким образом, реакция протекала более полно при кислых условиях, чем при других двух рН средах [31].

Для того, чтобы произвести мониторинг химического превращения молекулы 4-NBT в DMAВ от времени экспозиции при различных рН, была проанализирована динамика реакции с помощью уравнения 1:

$$\frac{I(1439\text{ см}^{-1})}{I(1345\text{ см}^{-1})} = kt, \quad (1)$$

где $I(1439\text{ см}^{-1}) / I(1345\text{ см}^{-1})$ соотношение интенсивностей пиков DMAВ и NO_2 ,

k - кажущаяся константа скорости,

t - время экспозиции.

На рис. 9 показана зависимость соотношения интенсивностей и времени экспозиции.

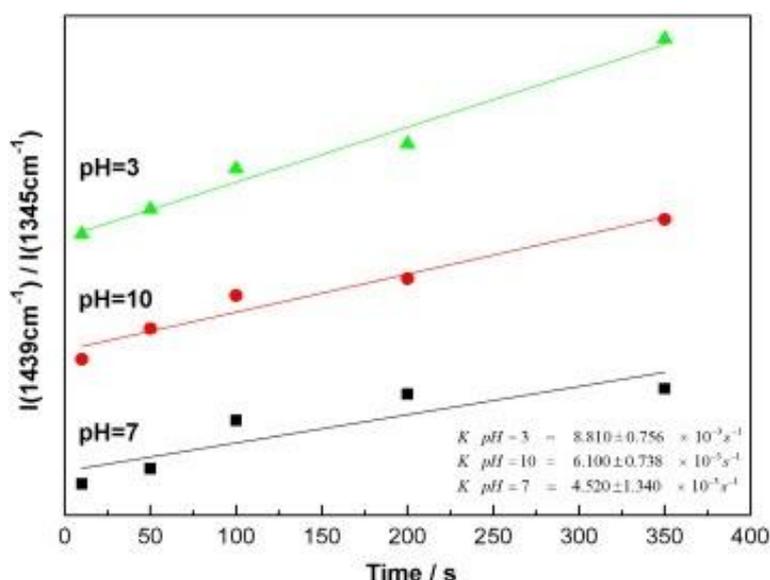


Рисунок 9 – Определение константы скорости реакции 4-NBT в DMAВ при различных pH [31].

В результате, авторы Jingang Wang et al. получили высокую кажущуюся константу скорости при измерении 4-NBT в кислой pH среде. Это указывает на то, что молекула 4-NBT сильнее димеризуется в кислых условиях за счет наличия H^+ , что значительно облегчает отщепление кислорода для 4-NBT [31].

1.6 Сенсоры для электрохимического детектирования адреналина

В предыдущих пунктах была рассмотрена методика SERS, как перспективный качественный метод для обнаружения раковых клеток. Однако одним из способов количественного определения является электрохимический анализ вещества. Все реакции, происходящие в электрохимических ячейках, протекают в результате переноса электронов и изменения количества тока, который зависит от концентрации измеряемого вещества.

Электрохимические датчики широко используются для обнаружения химических веществ, в том числе и газов на уровне миллионных долей, а также биологически активных молекул [32]. Регистрируемые молекулы в электрохимических экспериментах обычно либо свободно диффундируют в

растворе, либо адсорбируются, либо прикрепляются к поверхности электрода или мембраны [33]. Чаще всего применяют наноструктурированные металлические электроды, которые характеризуются высокой проводимостью, сверхвысокой чувствительностью, исключительной селективностью и низким энергопотреблением [34].

В данном исследовании мы были заинтересованы в создании multifunctional материала, применимого для сенсоров, с помощью которого можно было бы отследить не только кислую pH межклеточную среду раковых клеток, но и его применимость в электрохимическом детектировании различных биологических молекул, имеющих большое значение в фармацевтике и медицине.

В качестве определяемой молекулы с помощью изготавливаемых подложек был выбран эпинефрин (адреналин), который дает характерные пики окисления на вольтамперограммах. Рассмотрим работу, которая была посвящена электрохимическому детектированию эпинефрина.

Авторам Ewa Wierzbicka et al. удалось создать сенсор на основе нанопористых тонких золотых пленок, нанесенных на поверхность высокоупорядоченного анодного оксида алюминия, которые служили чувствительными электродами для простого и быстрого электрохимического определения адреналина в фосфатном буферном растворе с pH=7 [34].

Существует два основных предположительных механизма протекания реакции окисления адреналина: 1) перенос электрона – химическая реакция – химическая реакция; 2) перенос электрона – химическая реакция – перенос электрона. Схема электрохимического окисления приведена на рис. 10 [34].

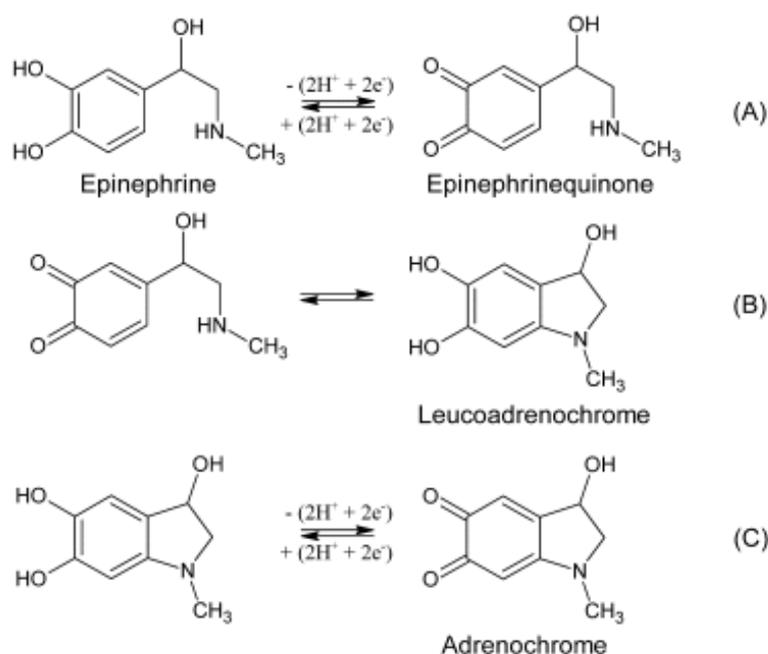


Рисунок 10 – Схема электрохимического окисления адреналина по механизму химическая реакция-перенос электрона [34].

Авторами было исследовано влияние скорости сканирования на вольтамперометрическое поведение высокоупорядоченной нанопористой тонкой золотой пленки. На рис. 11 приведены циклические вольтамперограммы, которые были записаны при высокой концентрации адреналина в буфере, для того чтобы обеспечить максимальное количество электроактивных частиц на электроде для всех скоростей сканирования [34].

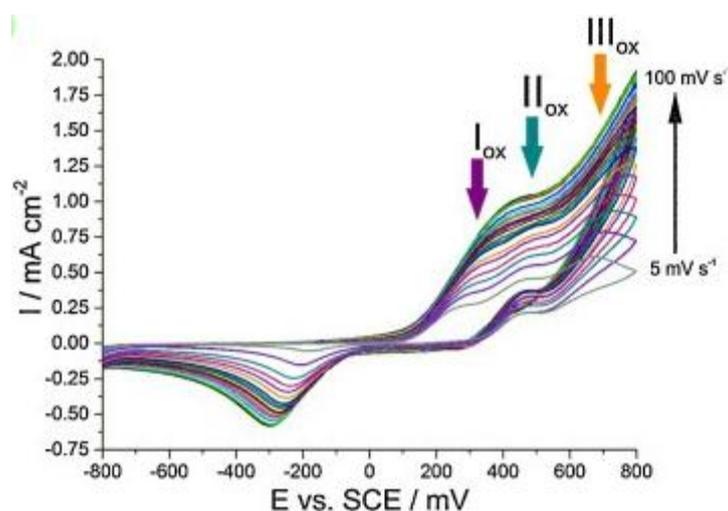


Рисунок 11 – Циклические вольтамперограммы, полученные на электроде при различных скоростях сканирования [34].

На рис. 11 можно увидеть три пика окисления адреналина (I_{OX} , II_{OX} , III_{OX}), при этом с увеличением скорости сканирования потенциалы окисления и восстановления перемещаются в положительном и отрицательном направлениях соответственно. Также авторами были получены результаты хроноамперометрических измерений, где определяли зависимость пиковых токов от концентрации адреналина в растворе. Было показано, что эта зависимость является линейной, т.е. с увеличением концентрации молекулы возрастают пиковые токи рис. 12.

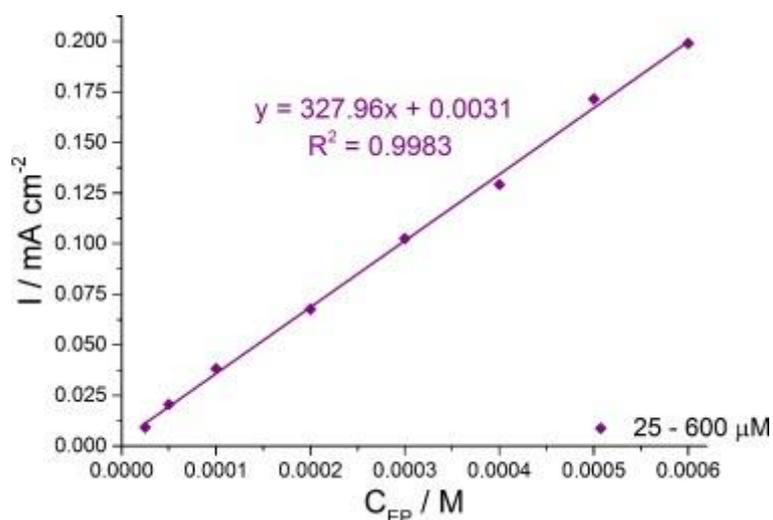


Рисунок 12 – Градуировочная кривая зависимости плотности тока от концентрации адреналина [34].

2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Объекты исследования

2.2 Сырье и материалы

Для реализации исследования использовали следующие материалы: полиэтилентерефталат (ПЭТ), пробирки типа «Эппендорф» (объемом 1,5 мл, производитель GenFollower, Китай), микроцентрифужные пробирки типа «Эппендорф» (объемом 0,5 мл, производитель МиниМед, Россия); наконечники для автоматических дозаторов (200 мкл, 1000 мкл, производитель Axugen Scientific Inc., США), индикаторные pH полоски (Aqua Natura, Германия), пластиковые чашки Петри (МиниМед, Россия).

Для культивирования раковых клеток была использована питательная среда DMEM (ПанЭко, Россия). Подложки AgLIMPc/AgEC/4-NBT изготовлены с помощью реагентов, приведенных в таблице 1.

Таблица 1 – Характеристика используемых веществ

Название вещества	Внешний вид	Брутто формула	M, г/моль	ρ , г/см ³	T пл., °C	T кип., °C
1	2	3	4	5	6	7
Серебряные наночастицы	Серый порошок	Ag	107,87	1,05	-60	187,4
Этанол	Бесцветная жидкость	C ₂ H ₅ OH	46	0,789	-117	78
4-нитробензолтиол	Желтые кристаллы	C ₆ H ₅ NO ₂ S	155,17	1,36	72-77	281
Нитрат серебра	Бесцветные кристаллы	AgNO ₃	169,87	4,35	209,7	440

2.3 Оборудование

Для реализации исследования были использованы следующие приборы: автоматические дозаторы переменного объема (100-1000 мкл) (Ленпипет), аналитические весы (Adventurer), ультразвуковая ванна Skymen 040S (10L/240W), лазерный гравер TwoWin-3000, потенциостат IPC Compact (НТФ Вольта) и потенциостат-гальваностат P-45X, Рамановский спектрометр NTEGRA SPECTRA, SANYO CO₂ инкубатор, инвертированный микроскоп

Микромед 3 ЛЮМ LED, рН - метр рН-150МИ (ООО «Измерительная техника»), растровый электронный микроскоп Quanta 200 3D.

3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

3.1 Изготовление подложек AgLIMPC/AgEC/4-NBT

В качестве подложки был выбран один из широко используемых полимеров во всем мире – полиэтилентерефталат (ПЭТ). При их изготовлении применяли лазерную технологию интеграции наночастиц серебра в полимер – LIMPC. Применение данной технологии позволяет создать подложки с высокой прочностью и электропроводностью, а также структурной и химической стабильностью [35].

Первым этапом стало приготовление суспензии серебряных наночастиц в этаноле с концентрацией 40 мг/мл. Затем, чтобы добиться однородности суспензии и предотвратить образование агломератов, суспензия подвергалась обработке ультразвуком в течении 20 минут при комнатной температуре (выходная мощность 120 Вт и 40 кГц). Далее суспензию серебряных наночастиц наносили на ПЭТ в объеме 0,71 мкл/мм² и полученные жидкие пленки высушивали при комнатной температуре.

Следующим этапом была проведена гравировка поверхности, используя твердотельный лазер с длиной волны 438 нм, частотой подачи импульсов до 1,6 кГц и номинальной мощностью 3 Вт. При этом интегрирование наночастиц в полимер осуществляли с мощностью ~ 600 МВт. В результате лазерной интеграции формируется прочная проводящая композитная структура. После гравировки остаточные неинтегрированные наночастицы были удалены промывкой и ультразвуковой обработкой.

Для усиления SERS сигнала на данные композитные структуры электрохимически осаждались крупные кристаллы серебра (так называемые 3Д серебряные дендриты) из водного раствора AgNO₃ с однородным распределением по поверхности. При этом важной задачей был подбор оптимальных параметров электрохимического осаждения, которое было

проведено в 2-х электродной ячейке с растворами AgNO_3 различной концентрации. В данном случае катодом являлась сама подложка LIMPC, анодом – Pt.

Подбор оптимальных параметров осуществлялся путём последовательного увеличения концентрации AgNO_3 , изменением напряжения и времени осаждения. На рис. 13 представлены оптические изображения полученных кристаллов серебра на AgLIMPC с различными параметрами.

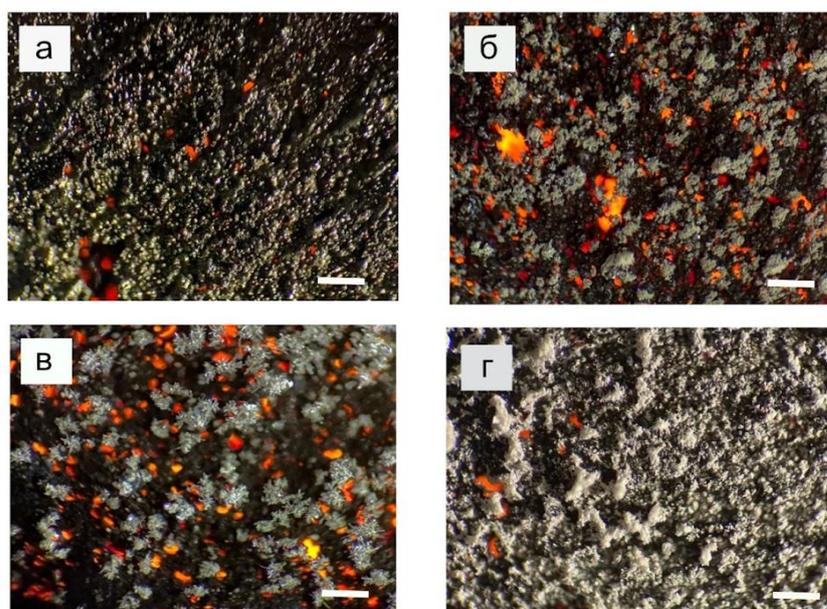


Рисунок 13 – Оптическое изображение AgLIMPC с электрохимически осажденным серебром, где а – осаждение из 0,001 М AgNO_3 (2В, 15 минут); б – осаждение из 0,01 М AgNO_3 (1,5В, 10 минут); в – осаждение из 0,1 М AgNO_3 (1,5В, 2 минуты); г – осаждение из 0,1 М AgNO_3 (2В, 1 минута).

Выращивание наночастиц серебра из 0,1 М раствора AgNO_3 при напряжении 2В в течении 1 минуты позволяет получить равномерное распределение достаточно крупных кристаллов, которые дают интенсивный SERS сигнал, рис.16.

Подложки были функционализированы монослоем молекул 4-NBT в качестве молекулярного зонда. Для этого 4-NBT растворяли в этаноле и использовали в качестве исходного раствора для функционализации металлических NPs. Далее помещали AgLIMPC/AgEC в маленькую чашку Петри с раствором 4-NBT с концентрацией 1мМ на 24 часа. При этом чашку

Петри накрывали алюминиевой фольгой, чтобы обеспечить образование монослоя 4-NBT на поверхности серебра и предотвратить переход 4-NBT к 4-ABT, изолировав от источников света. После этого образец осторожно вынимали, аккуратно промывали этанолом, затем дистиллированной водой для удаления возможных физически адсорбированных молекул и сушили в вытяжном шкафу при комнатных условиях [29]. Схема подготовки AgLIMPc/AgEC/4-NBT изображена на рис.14.

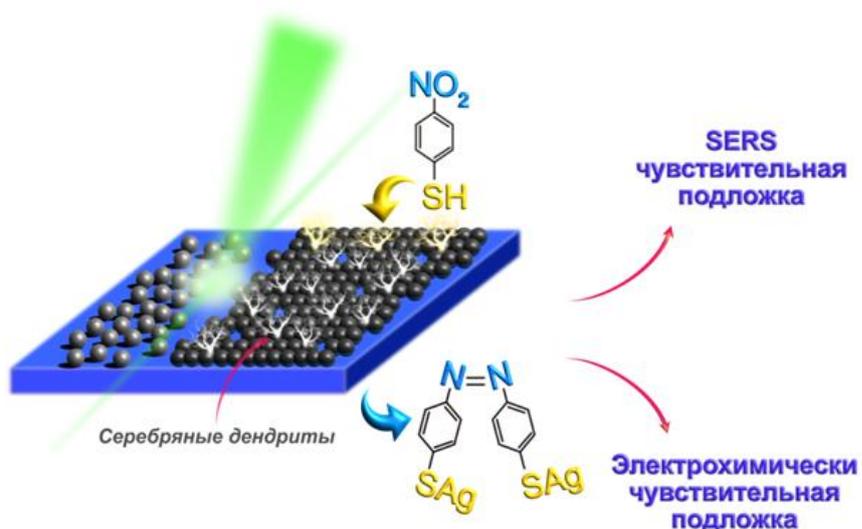


Рисунок 14 – Схема изготовления подложек AgLIMPc/AgEC/4-NBT.

3.2 Культивирование клеточной линии MDA-MB-231 и отбор проб

Клеточная линия рака молочной железы MDA-MB-231 была выбрана для изучения pH межклеточной среды раковых клеток на подложки AgLIMPc/AgEC/4-NBT. Эта клеточная линия имеет стабильный и быстрый рост, что приводит к заметным изменениям в питательной среде. Клетки культивировали в полной питательной среде DMEM с высоким содержанием глюкозы 4,5 г/л и с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки и 2 мМ глутамина.

Для проведения анализа влияния pH на изготавливаемые сенсоры необходимо было произвести отбор проб межклеточной среды во время культивирования клеток, при этом питательную среду не меняли в течение всего периода эксперимента (12 дней). Ежедневно отбирали аликвоту среды в объеме 200 мкл, центрифугировали и далее помещали в стерильные эппендорфы, после чего закрывали крышки парафильмом. Все образцы

хранили в холодильнике при температуре $+5^{\circ}\text{C}$ до конечной точки эксперимента.

Отбор образцов производили в течение 11 дней, при этом в первый день в качестве референса использовали свежую питательную среду. Во время культивирования раковых клеток изо дня в день менялся цвет среды за счет наличия в ней индикатора фенолового красного, что свидетельствовало о снижении pH.

3.3 Методика приготовления буфера Бриттона-Робинсона

В качестве контроля воздействия кислой pH на молекулу 4-NBT было решено провести Рамановскую спектроскопию AgLIMPc/AgNPs/4-NBT с pH буферами Бриттона-Робинсона. Также этот буфер использовали в качестве индифферентного электролита для изучения электрохимических свойств подложек. Буфер Бриттона – Робинсона представляет собой «универсальный» буфер pH, используемый в диапазоне pH от 2 до 12. Была приготовлена 1М смесь борной, уксусной и фосфорной кислот и 1 М раствор щелочи NaOH. Затем титровали кислотный раствор щелочью, измеряя показатель pH с помощью pH метра.

3.4 Методика проведения SERS измерений

Как уже упоминалось ранее, преобразование молекулы 4-NBT на плазмонных наночастицах может служить детектором наличия кислой pH межклеточной среды раковых клеток. Это изменение будет определяться комбинационным сигналом преобразования нитрогруппы в аминогруппу и DMAВ, а также изменением геометрии сигнала колебательного пика NO_2 .

В качестве контрольного эксперимента была проведена спектроскопия комбинационного рассеяния света с кислым и щелочным буфером Бриттона-Робинсона. Измерения проводили с использованием конфокальной Рамановской микроскопии (NTEGRA SPECTRA) на электрохимически модифицированных образцах AgLIMPc/AgEC/4-NBT при параметрах лазера 633 нм, объективе $10\times$ и мощности лазера 175 мкВт. Измерения проводились в

нескольких точках, при этом время экспозиции было равно 1 секунде, а накопление - 60 секунд.

Для изучения кислой pH межклеточной среды линии раковых клеток MDA-MB-231 на сенсоры проводили картирование интенсивности образца AgLIMPC/AgEC/4-NBT при параметрах: 633 нм, объектив 10×, мощность лазера 220 мкВт. При этом образец был закреплен в чашке Петри с помощью липкой ленты для предотвращения смещения образца во время измерений. Затем на тот же образец помещали 20 мкл питательной среды DMEM, предварительно измерив ее pH с помощью индикаторных полосок, и сверху накрывали покровным стеклом. Далее было проведено картирование интенсивности той же области при 633 нм, объективе 10×, мощности лазера 220 мкВт. Эксперименты проводились в спектральном диапазоне 1000-1700 см⁻¹.

Стабильность образцов AgLIMPC/AgEC/4-NBT оценивали путем измерения спектра комбинационного рассеяния в одной и той же точке в образце в течение 18 дней. При этом также был использован конфокальный Рамановский микроскоп (NTEGRA SPECTRA) с лазером длиной волны 633 нм (8,2 МВт), объективом 10×, дифракционной решеткой 600 линий/мм и временем экспозиции 0,1 с. Все полученные спектры были обработаны в программе Origin 2018 и нормализованы по сигналу NO₂ или NH₂.

3.5 Методика проведения анализа антибактериальной активности AgLIMPC/AgEC/4-NBT

Исследование антибактериальной активности сенсоров на жизнеспособность бактерий *E. Coli* и *Staph.aur.* проводили методом диффузных дисков.

В работе был использован бактериальный штамм *E. coli PQ Amp 100*. Культивирование проводили на плотной питательной среде Luria-Bertani (LB) в инкубаторе Precise Shaking Incubator при температуре 37°C в течение 24 часов. Перед началом проведения эксперимента готовили бактериальную суспензию по стандарту мутности № 3 Макфарланда на стерильной очищенной воде.

Также в работе был использован бактериальный штамм *Staphylococcus aureus*. Перед началом проведения экспериментов готовили бактериальную суспензию на среде ГРМ № 8 с плотностью 3 ЕД по стандарту мутности Макфарланда. Культивирование проводили на орбитальном шейкере Precise Shaking Incubator при температуре 37°C и скоростью 100 об/мин в течение 24 ч.

Для исследования подложек на антибактериальную активность методом диффузных дисков на 1% плотную питательную среду LB, которую разливали в чашки Петри (D=90мм), наносили суспензию *E.coli* в количестве 300 мкл и распределяли с помощью шпателя Дригальского. Аналогично на другую чашку Петри засеивали суспензию *Staph.aureus* на 1% плотную питательную среду ГРМ № 8.

На подсохшие питательные среды с бактериями помещали подложки AgLIMPc, AgLIMPc/AgEC, AgLIMPc/AgEC/4-NBT шероховатой стороной вниз. Культивирование проводили в термостате Precise Shaking Incubator при температуре 37°C в течении 24-48 часов.

3.6 Методика подготовки материала для исследования подложек через кожу

Для проверки перспективности использования данного подхода для измерений через кожу и изучения их свойств *in vivo* было решено провести Рамановскую спектроскопию AgLIMPc/AgEC/4-NBT через кожу свиного уха в режиме *in vitro*. Свиная шкура была куплена на скотобойне и обработана в течение 3 часов. Она была очищена скальпелем от жира на внутренней поверхности, промыта водой и 70%-ным этанолом, высушена с помощью бумажных полотенец и помещена в 0,9% раствор NaCl на 24 часа при температуре +4°C в холодильник. Перед экспериментом кожу нарезали на полоски с размером 30×70 мм, немного натягивая, плотно прижимали ее на шероховатую поверхность подложки. Излишки кожи по бокам срезали скальпелем.

3.7 Методика приготовления раствора адреналина

В работе были исследованы электрохимические свойства адреналина на подложки AgLIMPc/AgEC/4-NBT, которые выступали как рабочий электрод. В качестве электролита был выбран нейтральный буфер Бриттона-Робинсона с $\text{pH}=7$, так как он не влияет на токи адреналина. Также был приготовлен рабочий раствор адреналина с концентрацией 1.1×10^{-2} (навеску 0,01 г Эпинефрина (Sigma-Aldrich) растворили в 4 мл буфера, 1 мл 0,1 М NaOH и 50 мкл 1М NaOH).

3.8 Методика изготовления электрохимического сенсора и исследование его электрохимических свойств

Подложки для электрохимического детектирования адреналина были изготовлены согласно пункту 3.1. Далее собирали электрохимическую ячейку, где в качестве рабочего электрода выступал сенсор AgLIMPc/AgEC/4-NBT, противоэлектродом служила Pt и референсным электродом был Ag/AgCl, рис. 15.

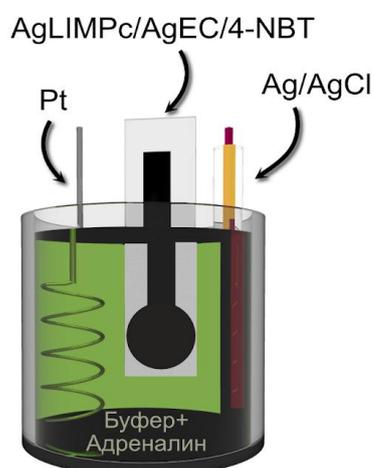


Рисунок 15 – Схематичное изображение электрохимической ячейки для детектирования адреналина.

В качестве электрохимического аналитического сигнала для измерения адреналина был выбран сигнал окисления в области потенциалов 0,5 - 0,6 В, регистрируемый методом инверсионной вольтамперометрией. Также измерения производились в нейтральном буфере Бриттона-Робинсона с $\text{pH}=7$ со скоростью развертки потенциала равной 100 мВ/с.

5. ФИНАНСОВЫЙ МЕНЕДЖМЕНТ, РЕСУРСОЭФФЕКТИВНОСТЬ И РЕСУРСОСБЕРЕЖЕНИЕ

Целью данного раздела является рассмотрение вопросов конкурентоспособности, ресурсоэффективности и ресурсосбережения, а также финансовых затрат по отношению к объекту изучения магистерской диссертации. SWOT-анализ позволяет выявить сильные и слабые стороны, а также возможности и угрозы, связанные с работой. Расчет показателя ресурсоэффективности помогает сделать окончательную оценку технического решения по отдельным критериям и в целом.

5.1 Предпроектный анализ

5.1.1 Потенциальные потребители результатов исследования

В результате анализа потенциальных потребителей результатов разработок рассмотрен целевой рынок и проведено его сегментирование. Определены основные критерии сегментирования.

Целью данной работы является разработать сенсоры для обнаружения молекул с использованием оптических и электрохимических методов путем отслеживания изменений в плазмонно-индуцированных каталитических реакциях. Разрабатываемые подложки на основе ПЭТ и наночастиц серебра, полученные посредством лазерной обработки пленок металлических наночастиц с последующим электрохимическим выращиванием кристаллов серебра (AgLIMPc/AgEC/4-NBT), обладают уникальными физическими и механическими свойствами в отличие от других материалов. Они достаточно дешевые, просты в изготовлении, гибкие и электропроводные. В данном проекте изучается один из способов применения данного композита, а именно как сенсор для обнаружения различных молекул и кислотной среды раковых клеток. Таким образом, целевым рынком для разработанных подложек AgLIMPc/AgEC/4-NBT являются медицинские учреждения, научно-исследовательские центры и промышленные предприятия.

5.1.2 Анализ конкурентных технических решений с позиции ресурсоэффективности и ресурсосбережения

Для того чтобы найти источники финансирования проекта, необходимо определить коммерческую ценность работы. Анализ конкурентных технических и методических решений с точки зрения ресурсоэффективности и ресурсосбережения позволяет оценить эффективность научных разработок. Этот анализ целесообразно проводить с использованием оценочной карты (таблица 1).

Критерии для сравнения и оценки ресурсоэффективности и ресурсосбережения, приведенные в таблице 4, они подбираются, исходя из выбранных объектов сравнения с учетом их технических и экономических особенностей разработки, создания и эксплуатации.

Подобный анализ осуществляется с помощью анализа конкурентных технических решений и определяется по формуле:

$$K = \sum V_i \cdot B_i, \quad (1)$$

где K – конкурентоспособность научной разработки или конкурента;

V_i – вес показателя (в долях единицы);

B_i – балл i -го показателя.

Анализ конкурентных технических решений был проведен для сравнения нашей научной разработки, реализованное в Научном парке ТПУ (B_f) с разработками, которые были проведены учеными Юго-восточного университета из Китая (B_{K1}) и учеными Китая из Государственной лаборатории физической химии твердых поверхностей (B_{K2}).

Таблица 4 – Оценочная карта для сравнения конкурентных технических решений (разработок)

Критерии оценки	Вес критерия	Баллы			Конкурентоспособность		
		БФ	БК1	БК2	КФ	КК1	КК2
1	2						
	Технические критерии оценки ресурсоэффективности						
1. Повышение производительности труда пользователя	0,04	5	4	4	0,2	0,16	0,16
2. Функциональная мощность (предоставляемые возможности)	0,07	4	3	3	0,28	0,21	0,21
3. Простота эксплуатации	0,18	5	4	5	0,9	0,72	0,9
4. Энергоэкономичность	0,05	4	4	4	0,2	0,2	0,2
5. Безопасность	0,15	4	4	3	0,6	0,6	0,45
6. Надежность	0,05	4	3	4	0,2	0,15	0,2
7. Массогабаритные параметры устройства	0,06	5	5	4	0,3	0,3	0,24
	Экономические критерии оценки эффективности						
1. Конкурентоспособность продукта	0,15	5	4	4	0,75	0,6	0,6
2. Цена	0,15	4	3	4	0,6	0,45	0,6
3. Уровень проникновения на рынок	0,1	4	3	3	0,4	0,3	0,3
Итого	1				4,43	3,69	3,86

Исходя из результатов анализа, можно сделать вывод, что разработанные SERS подложки AgLIMPc/AgEC/4-NBT на данном этапе достаточно конкурентоспособны. Таким образом, разрабатываемый проект является перспективным, поскольку обладает рядом уникальных свойств, лучшими физическими и механическими характеристиками, а также высоким коэффициентом полезного действия.

5.1.3 SWOT-анализ

Был проведен комплексный анализ внешней и внутренней среды научно-исследовательского проекта с помощью SWOT-анализа. Были выявлены сильные и слабые стороны исследования, а также возможности и угрозы, которые приведены в таблице 5.

Таблица 5 - SWOT-анализ

	<p>Сильные стороны научно-исследовательского проекта: С1. Более низкая стоимость по сравнению с другими разработками; С2. Простота эксплуатации; С3. Перспективное исследование в науке и медицине; С4. Возможность использования сенсора для обнаружения различных лекарств; С5. Наличие необходимого оборудования; С6. Квалифицированный персонал.</p>	<p>Слабые стороны научно-исследовательского проекта: Сл1. Возможная контаминация при культивировании клеток для эксперимента; Сл2. Высокая стоимость оборудования; Сл3. Оборудование постоянно используется другими исследователями и инженерами; Сл4. Временная неисправность оборудования. Сл5. Длительность обработки результатов.</p>
<p>Возможности: В1. Использование инфраструктуры Научного парка ТПУ; В2. Возможность контроля времени проведения эксперимента, плотности мощности лазера; В3. Большой потенциал применения сенсоров в России и других странах.</p>	<p>Простота изготовления сенсора AgLIMPC/AgEC/4-NBT, а также дальнейшее его введение под кожу для детектирования раковых клеток (<i>in vivo</i>) позволит в дальнейшем внедрять данный девайс в эксплуатацию по всей России. Относительная дешевизна позволит получать финансирование для дальнейших разработок по данной теме.</p>	<p>Оборудование, которое мы используем в экспериментах, достаточно дорогое, а сами эксперименты с их описанием иногда занимают много времени. Тем не менее, они помогают получить точные и надежные данные, которые могут быть воспроизведены в любой другой лаборатории в мире с тем же или аналогичным оборудованием с использованием нашей методологии. Для того чтобы рационально использовать временной ресурс на протяжении исследования, необходимо заранее планировать время использования оборудования, т.к. оно не всегда свободно.</p>
<p>Угрозы: У1. Развитая конкуренция технологий производств; У2. Сложность в достижении требуемых технических характеристик; У3. После публикации результатов могут возникнуть споры с другими научными исследователями, которые используют другие методы.</p>	<p>Результаты исследования будут иметь высокий спрос, т.к. они могут быть использованы в тераностике раковых опухолей и разработке новых нанобиосенсоров. Это в свою очередь может увеличить размеры финансирования проекта.</p>	<p>Благодаря постоянно развивающимся технологиям каждый год появляются новые методы. Чтобы ускорить распространение нашей методологии и не упустить ее актуальность, необходимо выполнять все эксперименты своевременно. Также из-за отсутствия финансирования и затрат на разработку сенсоров могут возникнуть проблемы в дальнейшем исследовании.</p>

Благодаря SWOT-анализу, можно сделать вывод о том, что сильной стороной проекта является его быстрота реализации и экономичность, а также технические характеристики, что позволит уменьшить влияние угроз на реализацию проекта. Перспективные возможности уменьшают влияние высоких затрат на разработку и внедрение разработки.

5.1.4 Оценка готовности проекта к коммерциализации

При разработке проекта на любой стадии жизненного цикла необходимо оценить степень готовности к коммерциализации, выяснить уровень собственных знаний для ее проведения (или завершения).

Для проведения оценки необходимо заполнить специальную форму оценки степени готовности научного проекта к коммерциализации. В таблице 6 представлен перечень вопросов, по которым необходимо произвести оценку.

Оценка степени готовности научного проекта к коммерциализации определяется по формуле:

$$B_{\text{СУМ}} = \sum B_i, \quad (2)$$

где $B_{\text{СУМ}}$ – суммарное количество баллов по каждому направлению;

B_i – балл по i -му показателю.

Таблица 6 – 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	4	4
2.	Определены перспективные направления коммерциализации научно-технического задела	2	3
3.	Определены отрасли и технологии (товары, услуги) для предложения на рынке	2	3
4.	Определена товарная форма научно-технического задела для представления на рынок	2	2
5.	Определены авторы и осуществлена охрана их прав	2	2

6.	Проведена оценка стоимости интеллектуальной собственности	1	1
7.	Проведены маркетинговые исследования рынков сбыта	2	2
8.	Разработан бизнес-план коммерциализации научной разработки	1	1
9.	Определены пути продвижения научной разработки на рынок	2	2
10.	Разработана стратегия (форма) реализации научной разработки	2	2
11.	Проработаны вопросы международного сотрудничества и выхода на зарубежный рынок	1	1
12.	Проработаны вопросы использования услуг инфраструктуры поддержки, получения льгот	1	1
13.	Проработаны вопросы финансирования коммерциализации научной разработки	3	1
14.	Имеется команда для коммерциализации научной разработки	3	3
15.	Проработан механизм реализации научного проекта	4	3
ИТОГО БАЛЛОВ		32	31

На основе данных, представленных в таблице 6, можно заметить, что большинство критериев не превышает трех баллов из пяти, что говорит о том, что проект находится на стадии реализации и пока не готов к коммерциализации, так как имеет ряд недоработок, устраняемых научной группой.

5.2 Инициация проекта

5.2.1 Цели и результаты проекта

В таблице 7 представлена информация о заинтересованных сторонах проекта.

Таблица 7 – Заинтересованные стороны проекта

Заинтересованные стороны проекта	Ожидания заинтересованных сторон
Руководители проекта	Использование результатов исследования в дальнейших исследованиях
Исполнитель проекта	Повышение уровня квалификации благодаря работе в научной сфере
Спонсор проекта	Развитие российских научных исследований и программ. Повышение уровня качества научных исследований в стране
Научные центры и лаборатории	Использование полученных результатов для создания нового подхода к обнаружению раковых клеток среди здоровых

В таблице 8 представлена иерархия целей проекта и критерии достижения целей.

Таблица 8 – Цели и результаты проекта

Цели проекта:	Разработка сенсоров для обнаружения молекул с использованием оптических и электрохимических методов
Ожидаемые результаты проекта:	Разработка сенсора для идентификации молекул и раковых клеток, а также изучение его характеристик
Критерии приемки результата проекта:	Разработанные SERS сенсоры для обнаружения молекул и раковых клеток, имеющие преимущества перед существующими SERS сенсорами
Требования к результату проекта:	Работоспособность устройства
	Анализ химических характеристик
	Анализ механических характеристик
	Применение сенсора <i>in vivo</i>

На основе данных, представленных в таблице 7 и 8, можно говорить о том, что разработка сенсоров AgLIMPC/AgEC/4-NBT поможет повысить конкурентоспособность в реализации нового технического продукта.

5.2.2 Организационная структура проекта

В таблице 9 приведена информация о рабочей группе проекта, ролях, функциях и трудозатратах каждого.

Таблица 9 – Рабочая группа проекта

Роль в проекте	Функции	Трудозатраты, день
Научный руководитель – Родригес Р.Д.	Определение темы исследования, постановка задачи и целей проекта, консультирование исполнителей проекта, участие в обсуждениях по результатам работы, промежуточная проверка достигнутых результатов	22
Исполнитель по проекту – Гридина М.В.	Обзор литературы, изготовление подложек, проведение экспериментов на воспроизводимость, проведение SERS экспериментов, обработка данных	83
Итого:		105

В данной таблице можно увидеть, какие функции в проекте выполняют научный руководитель и исполнитель, и какое количество дней было потрачено на выполнение проекта.

Планирование этапов работ по выполнению НИР включает в себя составление перечня этапов и работ, а также распределение исполнителей по всем видам работ (Таблица 10).

Таблица 10 – Календарный план проекта

Код работы (из ИСР)	Название	Длительность, дни	Дата начала работ	Дата окончания работ	Состав участников (ФИО ответственных исполнителей)
1	Постановка задачи	5	1.02.2021	5.02.2021	Родригес Р.Д. Гридина М.В.
2	Обзор литературы	54	6.02.2021	31.03.2021	Гридина М.В.
3	Составление плана работ	6	5.02.2021	10.02.2021	Родригес Р.Д. Гридина М.В.
4	Проведение серии экспериментов	42	1.04.2021	12.05.2021	Родригес Р.Д. Гридина М.В.
5	Анализ результатов	42	1.04.2021	12.05.2021	Родригес Р.Д. Гридина М.В.
6	Обсуждение результатов	12	1.05.2021	12.05.2021	Родригес Р.Д. Гридина М.В.

7	Оформление расчетно-пояснительной записки	18	3.05.2021	20.05.2021	Гридина М.В.
8	Сдача разработки и отчета о работе	4	21.05.2021	24.05.2021	Гридина М.В.

5.3 Бюджет научного исследования

Планирование бюджета научного исследования производится путем составления калькуляции по отдельным статьям, которые включают материальные затраты проекта, амортизационные отчисления за использованное оборудование, основную и дополнительную заработную плату исполнителей темы, отчисления во внебюджетные фонды и накладные расходы.

5.3.1 Сырье, материалы, специальное оборудование, покупные изделия

Данная статья расходов включает стоимость всех материалов, которые были использованы при разработке проекта. Расчет материальных затрат вычисляется по следующей формуле:

$$Z_m = (1 + k_T) \cdot \sum_{i=1}^m C_i \cdot N_{расxi}, \quad (8)$$

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

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

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

k_T – коэффициент, учитывающий транспортно-заготовительные расходы (15-25% от стоимости материалов).

Таблица 11 – Материальные затраты

Наименование	Единица измерения	Количество	Цена за ед., руб.	Затраты на материалы, (Z _м), руб.
ПЭТ	1 шт.	1 шт.	943,0	943,0
Наночастицы серебра	2 г.	1 шт.	4100,0	4100,0

Этанол	1 л.	0,1	900,0	90,0
Нитрат серебра	50 г.	0,25	4970,0	1242,5
4-нитробензотиол	25 г.	0,12	37000,0	4440,0
Предметные стекла	10 шт.	1 уп.	1890,0	378,0
Покровные стекла	20 шт.	1 уп.	350,0	70,0
Культуральная среда DMEM	450 мл.	1 шт.	410,4	6,4
Эппендорфы 1,5 мл	500 шт.	1 уп.	604,7	60,47
Наконечники для дозаторов (0,1-200 мкл)	960 шт.	1 уп.	7500,00	1562,5
Перчатки одноразовые латексные	100 шт.	1 уп.	1450,0	1740,0
ИТОГО:				14632,87

5.3.2 Расчет затрат на оборудование для научно-экспериментальных работ

В данную статью были включены все затраты, связанные с приобретением специального оборудования (приборов, контрольно-измерительной аппаратуры, устройств и механизмов). При приобретении спецоборудования необходимо учесть затраты по его доставке и монтажу в размере 15 % от его цены. Стоимость оборудования, используемого при выполнении конкретного научного проекта и имеющегося в данной научно-технической организации, учитывается в виде амортизационных отчислений.

Сумма амортизационных отчислений определяются по формуле:

$$E_{\text{ам}} = (\sum K_{\text{об}} \cdot N_{\text{ам}} \cdot T_{\text{об}}) / (365 \cdot 100), \quad (9)$$

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

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

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

Результаты расчетов амортизационных отчислений представлены в табл.

10

Таблица 12 - Расчет затрат на амортизационные расходы

№ п/п	Наименование оборудования	Кол-во единиц обор. шт.	Цена единицы оборудования, тыс.руб.	Кол-во дней работы оборуд., дней	Норма аморти. оборуд., %	Сумма аморти. отчислений, руб.
1	Автоматическая пипетка	1	7,850	42	10,0	90,33

2	СО ₂ -инкубатор	1	885,597	11	18,0	4804,06
3	Инвертированный микроскоп	1	275,900	15	18,0	2040,9
4	Ламинарный бокс	1	342,850	11	18,0	1859,84
5	УЗ ванна	1	3,500	20	18,0	34,52
6	Рамановский спектрометр NT-MDT SI	1	8592000	10	18,0	42371,5
7	Аналитические весы (Adventure)	1	46,140	15	12,0	227,54
8	Персональный компьютер	1	127000	83	10,0	2887,95
ИТОГО:						54316,64

5.3.3 Основная заработная плата исполнителей темы

Раздел включает основную заработную плату работников, непосредственно занятых выполнением НИИ, (включая премии, доплаты) и дополнительную заработную плату.

$$Z_{зп} = Z_{осн} + Z_{доп}, \quad (10)$$

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

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

Основная заработная плата рассчитывается по следующей формуле:

$$Z_{осн} = Z_{дн} \cdot T_p, \quad (11)$$

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

T_p – продолжительность работ, выполняемых научно-техническим работником, раб. дн. (6);

$Z_{дн}$ – средневзвешенная заработная плата работника, руб.

Средневзвешенная заработная плата рассчитывается по формуле:

$$Z_{дн} = \frac{Z_m \cdot M}{F_d}, \quad (12)$$

где Z_m — месячный должностной оклад работника, руб.;

M — количество месяцев работы без отпуска в течение года, 10,4;

F_d — действительный годовой фонд рабочего времени научно-технического персонала, раб. дн. (примем для научного руководителя $F_d=95$, для инженера $F_d=87$).

Месячный оклад работника рассчитывается как:

$$Z_m = Z_{тс} \cdot (1 + k_{пр} + k_d) \cdot k_p, \quad (13)$$

где $Z_{тс}$ — заработная плата по тарифной ставке, руб.;

$k_{пр}$ — премиальный коэффициент;

k_d — коэффициент доплат и надбавок;

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

Расчёт основной заработной платы приведён в табл. 13.

Таблица 13 – Расчет основной заработной платы

Исполнители	Разряд	$Z_{тс}$, руб.	$k_{пр}$	k_d	k_p	Z_m , руб	$Z_{дн}$, руб.	T_p , раб. дн.	$Z_{осн}$, руб.
Руководитель	профессор	49141	0,1	0,05	1,3	73466	3372	22	74184
Инженер	студент	17890	0,1	0,05	1,3	26746	1228	83	101924
Итого									176108

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

5.3.4 Дополнительная заработная плата исполнителей темы

В данную статью включается сумма выплат, предусмотренных законодательством о труде. Дополнительная заработная плата рассчитывается исходя из 10-15% от основной заработной платы работников, непосредственно участвующих в выполнении проекта:

$$Z_{доп} = k_{доп} \cdot Z_{осн} \quad (14)$$

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

$$Z_{доп.рук.} = 0,12 \cdot 74184 = 8902,08$$

$$Z_{инженера} = 0,12 \cdot 101924 = 12230,88$$

5.3.5 Отчисления во внебюджетные фонды

В данной статье расходов отражаются обязательные отчисления по установленным законодательством Российской Федерации нормам органам государственного социального страхования (ФСС), пенсионного фонда (ПФ) и медицинского страхования (ФФОМС) от затрат на оплату труда работников. Величина отчислений во внебюджетные фонды определяется исходя из следующей формулы:

$$Z_{\text{внеб}} = k_{\text{внеб}} \cdot (Z_{\text{осн}} + Z_{\text{доп}}), \quad (15)$$

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

Отчисления во внебюджетные фонды представлены в таблице 14.

Таблица 14 – Отчисления во внебюджетные фонды

Исполнитель	Основная заработная плата, руб.	Дополнительная заработная плата, руб.
Руководитель проекта	74184	8902,08
Инженер (студент)	101924	12230,88
Коэффициент отчислений во внебюджетные фонды	0,302	
Итого:		59566,77

5.3.6 Накладные расходы

Накладные расходы учитывают прочие затраты организации, не попавшие в предыдущие статьи расходов: печать и ксерокопирование материалов исследования, электроэнергия и др. Их величина определяется по следующей формуле:

$$Z_{\text{накл}} = k_{\text{накл}} \cdot (Z_{\text{осн}} + Z_{\text{доп}}), \quad (16)$$

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

Величину коэффициента накладных расходов можно взять в размере 16%.

Таким образом, накладные расходы на данные НТИ составляют рублей. 31558,55.

5.3.7 Формирование бюджета затрат научно-исследовательского проекта

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

Определение бюджета затрат на научно-исследовательский проект по каждому варианту исполнения приведен в табл. 15.

Таблица 15 – Расчет бюджета затрат НИИ

Наименование статьи	Сумма, руб.
Материальные затраты НИИ	14632,87
Амортизация специального оборудования	54316,64
Затраты по основной заработной плате исполнителей темы	176108
Затраты по дополнительной заработной плате исполнителей темы	21132,96
Отчисления во внебюджетные фонды	59566,77
Накладные расходы	31558,55
Итого бюджет затрат НИИ:	357315,8

5.3.8 Оценка сравнительной эффективности исследования

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

Интегральный финансовый показатель разработки определяется как:

$$I_{\Phi}^p = \frac{\Phi_{pi}}{\Phi_{max}}, \quad (17)$$

где I_{Φ}^p – интегральный финансовый показатель разработки;

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

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

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

$$I_m^a = \sum_{i=1}^n a_i b_i^a, I_m^p = \sum_{i=1}^n a_i b_i^p, \quad (18)$$

где I_m^a – интегральный показатель ресурсоэффективности вариантов;

a_i – весовой коэффициент i -го параметра;

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

n – число параметров сравнения.

Расчет интегрального показателя ресурсоэффективности проведен в форме таблицы 16.

Таблица 16 – Сравнительная оценка характеристик вариантов исполнения проекта

Объект исследования Критерии исследования	Весовой коэффициент параметра	Текущий проект	Исп.2	Исп.3
1. Способствует росту производительности труда пользователя	0,15	5	4	4
2. Простота эксплуатации	0,15	5	4	5
3. Энергосбережение	0,05	4	4	4
4. Надежность	0,1	4	3	4
5. Безопасность	0,15	4	4	3
5. Конкурентоспособность продукта	0,2	5	4	4
6. Цена	0,2	4	3	4
ИТОГО	1	31	26	28

$$I_{m.n.} = 0,15 \cdot 5 + 0,15 \cdot 5 + 0,05 \cdot 4 + 0,1 \cdot 4 + 0,15 \cdot 4 + 0,2 \cdot 5 + 0,2 \cdot 4 = 4,5;$$

$$I_{исп.2} = 0,15 \cdot 4 + 0,15 \cdot 4 + 0,05 \cdot 4 + 0,1 \cdot 3 + 0,15 \cdot 4 + 0,2 \cdot 4 + 0,2 \cdot 3 = 3,7;$$

$$I_{исп.3} = 0,15 \cdot 4 + 0,15 \cdot 5 + 0,05 \cdot 4 + 0,1 \cdot 4 + 0,15 \cdot 3 + 0,2 \cdot 4 + 0,2 \cdot 4 = 4$$

Из расчетов выявлено, что текущий проект по интегральному показателю ресурсоэффективности вариантов является выгодным и превосходит аналоги. Так как данный проект является только научной разработкой и началом исследования, то интегральный финансовый показатель разработки рассчитать не представляется возможным.

5.4 Заключение по разделу

Данный проект является перспективным с точки зрения ресурсопотребления, так как в отличие от аналогов в проекте предусмотрены меньшие затраты на себестоимость изготавливаемых сенсоров AgLIMPC/AgEC/4-NBT.

Данное исследование может помочь в развитии сенсоров для обнаружения различных молекул, в том числе и раковых клеток среди здоровых. Разработанные сенсоры позволяют детектировать раковые клетки с помощью Рамановской спектроскопии за счет обнаружения кислой межклеточной среды. Данное исследование позволит внести большой вклад в изучение тераностики раковых заболеваний и разработку новых нанобиосенсоров.

В ходе выполнения работы были достигнуты все поставленные цели и решены необходимые для этого задачи. Было проведено планирование научно-технических работ, был рассчитан бюджет НИИ, который составил 357315,8 рублей.

В результате проведения разработки раздела «Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение» было выяснено, что данное исследование является конкурентоспособным, отличающиеся безопасностью и простотой исполнения.

6. СОЦИАЛЬНАЯ ОТВЕТСТВЕННОСТЬ

Введение

Целью работы является разработать сенсоры для обнаружения молекул с использованием оптических и электрохимических методов путем отслеживания изменений в плазмонно-индуцированных каталитических реакциях. Данные сенсоры AgLIMPC/AgEC/4-NBT позволяют детектировать различные молекулы, а также кислую pH межклеточной среды раковых клеток.

Рабочим местом в процессе выполнения работы являлась лаборатория ИШХБМТ ТПУ, ауд. 207, 203 Научного парка. При выполнении научной работы были использованы: биологический материал, токсичные, химические, летучие и легковоспламеняющиеся вещества. При работе с наноматериалами, химическими реактивами и клеточной культурой необходимо учитывать определённые специфические факторы при охране труда и обеспечении экологической безопасности.

Несоблюдение мер безопасности при работе с лазером, который встроен в Рамановскую установку NT-MDT SI и лазерный гравёр TwoWin-3000, приводит к временной или постоянной слепоте. Также эта работа связана с синтезом и использованием некоторых химических веществ и материалов, таких как: наночастицы серебра и 4-NBT. Неправильное их использование может вызвать отравление, а также раздражение кожи и слизистых. Таким образом, необходимо обеспечить условия, которые будут соответствовать установленным правилам, и минимизировать негативное воздействие на человека.

В данном разделе будут рассмотрены правовые и организационные вопросы; производственная и экологическая безопасность; вредные и опасные факторы исследования, их влияние на человека; мероприятия по снижению уровня их воздействия, а также будут рассмотрены ситуации возникновения ЧС.

6.1 Правовые и организационные вопросы обеспечения безопасности

6.1.1 Специальные (характерные для проектируемой рабочей зоны) правовые нормы трудового законодательства

При работе в химической лаборатории работник подвергается воздействию вредных и опасных факторов (табл. 1). В связи с этим, сотрудникам, контактирующим с химическими веществами, предоставляется два раза в год оплачиваемый отпуск, который помогает предотвратить риск возникновения профессиональных заболеваний, а также помогает сохранить трудоспособность сотрудников [41].

Перед тем, как приступить к работе, необходимо прослушать инструктаж по охране труда и пройти первичное обучение. При работе в химической лаборатории должна использоваться следующая спецодежда и средства индивидуальной защиты: халат хлопчатобумажный, перчатки, респиратор, защитные очки с боковыми щитками при работе с химическими веществами, а также защитные очки для работы с лазерными приборами. Лаборатория должна быть обеспечена аптечкой с набором необходимых медикаментов и перевязочных средств [42-44].

Также в соответствии с Трудовым кодексом Российской Федерации N 197-ФЗ, гл.36, ст. 219 работник лабораторных кабинетов 207 и 203 Научного парка ТПУ имеет право [41]:

- иметь рабочее место, соответствующее требованиям охраны труда;
- иметь обязательное социальное страхование от несчастных случаев на производстве и профессиональных заболеваний в соответствии с федеральным законом;
- отказываться от выполнения работ в случае возникновения опасности для его жизни и здоровья в результате нарушения требований охраны труда, за исключением случаев, предусмотренных федеральными законами, до устранения такой опасности;

- обеспечиваться средствами индивидуальной и коллективной защиты в соответствии с требованиями охраны труда за счет средств работодателя;

- проходить обучение безопасным методам и приемам труда за счет средств работодателя;

- пройти внеочередной медицинский осмотр в соответствии с медицинскими рекомендациями с сохранением за ним места работы (должности) и среднего заработка во время прохождения указанного медицинского осмотра;

6.1.2 Организационные мероприятия при компоновке рабочей зоны

Для комфортного выполнения работ в химической лаборатории необходимо соблюдать следующие процедуры: технологический перерыв для сохранения трудоспособности работников, проветривание и посещение комнаты отдыха, которая должна размещаться вблизи от рабочих мест на расстоянии не более 300 м. Рабочее место в лабораторных кабинетах 207 и 203 Научного парка ТПУ должны соответствовать требованиям ГОСТ 12.2.032-78 и ГОСТ 12.2.033-78. Оно должно занимать площадь не менее 5 м². Высота помещения должна быть не менее 4 м, а объем - не менее 20 м³ на человека [45-46].

Помещения, где размещаются рабочие места с ПЭВМ, должны быть оборудованы защитным заземлением. Высота рабочей поверхности стола для пользователей должна регулироваться в пределах 680 - 800 мм; при отсутствии такой возможности высота рабочей поверхности стола должна составлять 725 мм.

Рабочее место сотрудника в лабораторных помещениях 207 и 203 Научного парка ТПУ соответствует требованиям ГОСТ 12.2.032-78 и ГОСТ 12.2.033-78. Оно должно занимать площадь не менее 5 м². Высота помещения должна быть не менее 4 м, а объем не менее 20 м³ на человека. Общая площадь лаборатории 207 составляет 33,8 м², объем - 118,3 м³ (длина А = 6,5 м, ширина В

= 5,2 м, высота Н = 3,5 м). Общая площадь лаборатории 203 составляет 24 м², объем - 72 м³ (длина А = 6 м, ширина В = 4 м, высота С = 3 м). Таким образом, в лаборатории 207 одновременно могут работать 6 человек, а в лаборатории 203 – 4 человека.

Размещение микроскопов, спектрометров и химического оборудования и организация рабочих мест происходит в соответствии с ПНД Ф 12.13.1-03 [47], СанПиН 5804-91 [48] и ГОСТ Р-50723-94 [49]. Для того чтобы обеспечить безопасность, необходимо выполнить ряд мер:

- Все химические вещества и материалы должны храниться при комнатной температуре, защищенные от воды, в чистой, сухой, инертной атмосфере, в герметичной упаковке;

- Должна быть матовая отделка стен и потолка, которая предотвращает отражение лазерного излучения;

- В качестве настенного и потолочного покрытия следует использовать негорючие материалы;

- Зеркальные покрытия должны быть исключены;

- Необходимо выделить отдельное место для средств, используемых во время работы

(перчатки, салфетки, очки и т. д.);

- Необходимо соблюдать вентиляцию помещения, которая обеспечивает трехкратный обмен воздуха в час;

- В работе используются оборудования, которые имеют встроенный лазер и лазерный знак опасности, поэтому на двери лаборатории должен висеть знак лазерный опасности:



Рисунок 30 – Предупреждающий знак безопасности «Опасно. Лазерное излучение»

6.2 Производственная безопасность

В данном пункте анализируются вредные и опасные факторы, которые могут возникать при изготовлении сенсоров AgLIMPc/AgEC/4-NBT с использованием лазерного оборудования и при их исследовании с внеклеточной средой раковых клеток с помощью Рамановского спектрометра.

Промышленная безопасность – это система организационных мероприятий и технических средств, предотвращающих или снижающих вероятность воздействия на рабочий персонал опасных факторов, возникающих в рабочей зоне во время выполнения работ.

Перечень опасных и вредных факторов, характерных для проектируемой производственной среды приведен в таблице 17, согласно ГОСТ 12.0.003-2015 [50].

Таблица 17 - Возможные опасные и вредные факторы

Факторы (ГОСТ 12.0.003-2015)	Этапы работ			Нормативные документы
	Разработка	Изготовление	Эксплуатация	
1. Отклонение показателей микроклимата	-	+	+	Параметры микроклимата устанавливаются СанПиН 2.2.4-548-96 [51].
2. Превышение	-	+	+	Санитарные нормы к параметрам шума

уровня шума				устанавливаются ГОСТ 12.1.029-80 ССБТ, ГОСТ 12.1.003-2014 ССБТ [52,53].
3. Недостаточная освещенность рабочей зоны	+	+	+	СанПиН 1.2.3685-21, СП 52.13330.2011 [54,55].
4. Химический фактор	-	+	+	ГОСТ 12.1.007-76 [56]; ГОСТ 12.1.005-88 [57];
5. Воздействие лазерного излучения	-	+	+	ГОСТ 12.1.030-81 [58]; ГОСТ 12.1.038-82 [59]; ГОСТ 12.1.045-84 [60].
6. Повышенное значение напряжения в электрической цепи, замыкание которой может произойти через тело человека	+	+	+	ГОСТ 12.1.038-82 ССБТ [61].

Наибольшее влияние на организм человека оказывают химические вещества и оборудование со встроенными лазерами (электромагнитное излучение). Химические вещества могут попадать в глаза и дыхательные пути, что вызывает кратковременное ухудшение зрения и затруднение дыхания и кашель. Поскольку лазеры, встроенные в оборудование, не слишком мощные, они могут быть опасны только для глаз. Однако длительное воздействие электромагнитного излучения может вызвать серьезные нарушения зрения, кратковременную или постоянную слепоту.

6.2.1 Анализ вредных факторов производственной среды

6.2.1.1 Отклонение показателей микроклимата в помещении

Оптимальные микроклиматические условия устанавливаются в соответствии с критериями оптимального теплового и функционального состояния человека. Они обеспечивают общее и локальное ощущение теплового комфорта в течение 8-часовой смены при минимальном напряжении механизмов терморегуляции, не вызывают отклонений в состоянии здоровья,

создают предпосылки для высокого уровня работоспособности и являются предпочтительными на рабочих местах.

В соответствии с СанПиН 2.2.4.548-96 оптимальные параметры микроклимата на рабочих местах должны соответствовать значениям, приведенным в таблицах 18, 19 [51]. Эти параметры установлены к выполнению работ различных категорий в холодный и теплый период.

Работа в лаборатории с оборудованием и работа в офисе за компьютером по затратам энергии соответствуют категориям Па и Ib соответственно.

Таблица 18 – Оптимальные значения показателей микроклимата на рабочих местах производственных помещений

Период года	Категория работ по уровням энергопотребления, ккал/ч	Температура воздуха, °С	Температура поверхностей, °С	Относительная влажность воздуха, %	Скорость движения воздуха, м/с
холодный	Ib (140-174)	21-23	20-24	60-40	0,1
	Па (175-232)	19-21	18-22		0,2
теплый	Ib (140-174)	22-24	21-25		0,1
	Па (175-232)	20-22	19-23		0,2

Таблица 19 – Допустимые значения показателей микроклимата на рабочих местах производственных помещений

Период года	Категория работ по уровням энергопотребления, ккал/ч	Температура воздуха, °С		Температура поверхностей, °С	Отн. влажность воздуха, %	Скорость воздуха, м/с	
		Диапазон и ниже оптимальн. знач.	Диапазон выше оптимальн. знач.			ниже оптимальн. значений, не более	ниже оптимальн. значений, не более
холодный	Ib (140-174)	19.0-20.9	23.1-24.0	18.0-25.0	15-75	0,1	0,2
	Па (175-232)	17.0-18.9	21.1-23.0	16.0-24.0	15-75	0,1	0,3
теплый	Ib (140-174)	20.0-21.9	24.1-28.0	19.0-29.0	15-75	0,1	0,3
	Па (175-232)	18.0-19.9	22.1-27.0	17.0-28.0	15-75	0,1	0,4

Нормализация микроклимата производственных помещений осуществляется с помощью следующих мероприятий:

- Оборудование зданий и помещений системами отопления;
- Установка стационарных и мобильных тепловых пунктов;
- Монтаж и ремонт систем вентиляции и кондиционирования;
- Использование увлажнителей воздуха;
- Проветривание рабочих мест.

6.2.1.2 Превышение уровня шума

Вредным фактором химической лаборатории является шум, источниками которого являются вентиляция и лабораторное оборудование: ультразвуковая ванна, которая находится в вытяжном шкафу 207 ауд. Научного парка ТПУ. Вредное воздействие шума вызывает головные боли и утомляемость. Шум, производимый ультразвуковой ванной, достаточно громкий и кратковременный. На время его работы сотрудники закрывают створку вытяжного шкафа.

В соответствии с ГОСТ 12.1.003-2014 для химических лабораторий допустимый уровень звукового давления составляет 50 дБА [52]. При превышении этого показателя проводят диагностику и ремонт вентиляционной системы лаборатории.

Для защиты работников химической лаборатории проводят следующие мероприятия по защите от шума:

- рациональное архитектурно-планировочное решение здания;
- применение ограждающих конструкций и звукопоглощающих облицовок;
- применение глушителей шума [53].

6.2.1.3 Недостаточная освещенность рабочей зоны и ее расчет

Одним из вредных факторов при работе в химической лаборатории является недостаточное освещение. При недостатке освещения происходит затруднение выполнения некоторых манипуляций (например, изготовление

подложек AgLIMPC/AgEC/4-NBT в вытяжном шкафу), основным критерием которых является точность, и происходит напряжение глаз, что вызывает зрительное и общее утомление.

Различают следующие виды освещения:

1) естественное освещение, которое является экономичным и более благоприятным для зрения. В лаборатории Научного парка ТПУ комбинированное освещение – естественное и искусственное, при этом коэффициент естественной освещенности $K_{ЕО} = 0,5\%$. Для компенсации недостатка освещения в химической лаборатории имеются боковые оконные проемы, обеспечивающие хорошее прохождение света.

2) искусственное освещение используется в любое время суток. При работе средней точности искусственное освещение с комбинированной системой освещения составляет 200 лк, при общей системе 150 лк. В лабораториях Научного парка используются светильники с люминесцентными лампами.

При выполнении работ целесообразнее использовать комбинированное искусственное освещение, так как при таком освещении происходит равномерное распределение света по всей площади и дает возможность выделить необходимые объекты или зоны. Согласно СП 52.13330.2016 в качестве источника света в лаборатории рекомендуется использовать газоразрядные лампы низкого давления белого цвета [55]. Коэффициент пульсации ламп K_p не должен превышать 20%.

Требования к освещению рабочих мест приведены в таблице 20 [54,55].

Таблица 20 – Требования к освещению рабочих мест

Рабочая поверхность и плоскость нормирования $K_{ЕО}$ и освещенности	Горизонтальная
Высота плоскости над полом, м	0,8

Естественное освещение, КЕО, % при верхнем или комбинированном освещении	3,5
при боковом освещении	1,2
Совмещенное освещение, КЕО, % при верхнем или комбинированном освещении при боковом освещении	2,1 0,7
Искусственное освещение Освещенность при комбинированном освещении	
Всего, лк	500
от общего, лк	300
Освещенность при общем освещении, лк	400

Как правило, расчета общего равномерного искусственного освещения горизонтальной рабочей поверхности выполняют методом коэффициента светового потока. Расчет будем вести для ауд. 207 Научного парка ТПУ. Длина помещения $A = 6,5$ м, ширина $B = 5,2$ м, высота $H = 3,5$ м. Высота рабочей поверхности над полом $h_p = 1$ м. В соответствии с СП 52.13330.2016 и разрядом работы (3-ий разряд, к которому относятся точные зрительные работы) необходимо обеспечить освещенность 200 лк [56].

Рассчитаем площадь помещения $S = A \cdot B = 6,5 \cdot 5,2 = 33,8 \text{ м}^2$

где A – длина помещения, м;

B – ширина помещения, м.

Коэффициент отражения побеленных стен с окнами без штор $\rho_c = 50\%$, побеленного потолка $\rho_{\Pi} = 70\%$. Также необходимо учитывать возможность загрязнения светильников и учесть коэффициент запаса, который равен $K_3 = 1,5$ для помещений с малым выделением пыли. В помещении установлены люминесцентные лампы, для которых коэффициент неравномерности равен $Z = 1,1$.

Для расчета выберем лампу ЛД-40 со световым потоком 2300 лм ($\Phi_{\text{лд}}$) и мощностью 40 Вт. Также выберем светильник типа ОД – 2-40 с двумя лампами, размерами 1230*266 мм.

Интегральным критерием оптимальности расположения светильников является величина λ , примем ее равной 1,2. Расстояние светильников от перекрытия $h_c=0,3$ м.

Определим высоту светильника над рабочей поверхностью:

$$h=h_n-h_p-h_c=3,5-1-0,3=2,2 \text{ м,} \quad (1)$$

где h_n – высота светильника над полом, которая для двухламповых светильников ОДОР должна быть не меньше 3,5 м,

h_p – высота рабочей поверхности над полом.

Метод коэффициента использования применяется для определения светового потока ламп, необходимого для создания заданной освещенности горизонтальной поверхности с учетом отраженного от стен и потолка света.

Рассчитаем индекс помещения:

$$i = \frac{S}{h \cdot (A + B)} = \frac{42}{2,2 \cdot 13} \approx 1,5 \quad (2)$$

Также коэффициент использования светового потока, показывающий какая часть светового потока ламп попадает на рабочую поверхность, для светильников типа ОДОР с люминесцентными лампами при $\rho_c=50\%$ и $\rho_{II}=70\%$ равен $\eta=0,45$.

Т.к. светильник содержит две лампы, то его световой поток составляет $\Phi = 4600$ лм. Определим необходимое число ламп для освещения рабочей зоны:

$$N = \frac{E \cdot S \cdot Z \cdot K_z}{\Phi \cdot \eta} = \frac{150 \cdot 42 \cdot 1,1 \cdot 1,5}{4600 \cdot 0,45} \approx 5 \quad (2)$$

Потребный световой поток группы люминесцентных ламп светильника:

$$\Phi_{II} = \frac{E \cdot A \cdot B \cdot Z \cdot K_z}{N \cdot \eta} = \frac{150 \cdot 7 \cdot 6 \cdot 1,1 \cdot 1,5}{5 \cdot 0,45} = 4620 \text{ лм} \quad (3)$$

Сделаем проверку выполнения условия:

$$-10\% \leq \frac{\Phi_{\text{ЛД}} - \Phi_{\text{П}}}{\Phi_{\text{ЛД}}} \cdot 100 \leq 20\%$$
$$-10\% \leq \frac{4600 - 4620}{4600} \cdot 100 \leq 20\%$$
$$-10\% \leq -0,43 \leq 20\%$$

По результатам можно сделать вывод, что помещение лаборатории 207 соответствует нормам СП 52.13330.2016 Естественное и искусственное освещение [15] 55.

6.2.2 Анализ опасных факторов производственной среды

6.2.2.1 Химический фактор

При выполнении работ на рассматриваемом рабочем месте были использованы такие химические вещества и материалы, как этанол, 4-нитробензотиол, нитрат серебра, а также серебряные наночастицы.

По степени воздействия на организм вредные вещества делятся на четыре класса опасности:

- 1й — вещества чрезвычайно опасные;
- 2й — вещества высокоопасные;
- 3й — вещества умеренно опасные;
- 4й — вещества малоопасные.

Этанол – одноатомный спирт, при стандартных условиях летучая, горючая, бесцветная прозрачная жидкость. Этиловый спирт также используется в качестве растворителя, как дезинфицирующее средство.

4-нитробензотиол – желтый порошок, лишь слегка растворяется в воде и испаряется в воздухе. Является токсичным веществом, которое вызывает раздражение кожи, глаз и дыхательных путей.

Нитрат серебра – бесцветные ромбические кристаллы, легко растворимые в воде, обладает антисептической активностью. Весьма токсичен, как и все растворимые соли серебра. В высоких концентрациях ядовит.

Серебряные наночастицы – представляют собой наночастицы серебра размером от 1 до 100 нм. Некоторые из этих частиц состоят из большого процента оксида серебра из-за их большого отношения поверхности к объемным атомам серебра. При высоких концентрациях токсичны, не являются канцерогенными.

Предельно допустимые концентрации (ПДК) вредных веществ в воздухе рабочей зоны приведены в таблице 21 [56].

Таблица 21 - предельно допустимые концентрации (ПДК) вредных веществ в воздухе рабочей зоны

Наименование вещества	N CAS	Формула (не приводится)	Величина ПДК, мг/м ³	Преимущественное агрегативное состояние в воздухе в условиях производства	Класс опасности	Особенности действия на организм
Этанол	64-17-5	C ₂ H ₆ O	2000/1000	п	4	Обладает наркотическим и общетоксичным действием
4-нитробензотиол	1849-36-1	C ₆ H ₅ NO ₂ S	0,2	п	2	Раздражение слизистых и кожи
Нитрат серебра	7761-88-8	AgNO ₃	0,5	п	2	Вызывает сильные ожоги кожи и повреждение глаз
Серебряные наночастицы	7440-22-4	Ag	1	п	2	Вдыхание пыли наночастиц серебра влияет на легкие,

						вызывает кратковременное ухудшение памяти
--	--	--	--	--	--	-------------------------------------------

При работе с вредными химическими веществами необходимо применять как коллективные меры защиты – работа под вытяжным шкафом для защиты дыхательных путей, так и средства индивидуальной защиты – халат, перчатки для защиты одежды и кожаных покровов, респиратор, защитные очки. Халаты должны быть длинными и застегиваться полностью, при этом быть закрытыми спереди, рукава плотно охватывать запястья. Перчатки должны быть длинными и удобными.

6.2.2.2 Воздействие лазерного излучения

Лазеры относятся к очень опасным устройствам. Как правило, лазерная безопасность относится к методам защиты от факторов, непосредственно связанных с лазерным излучением.

Даже лазеры самой низкой мощности (несколько милливатт) могут быть опасны для зрения. Попадая в глаз, лазерный луч фокусируется в пятне очень малого размера, что может привести к ожогам сетчатки, частичной или полной необратимой потере зрения за доли секунды. Более мощные лазеры могут вызвать повреждение глаз даже при рассеянном излучении. Прямое и в некоторых случаях рассеянное излучение такого лазера может вызвать ожоги кожи (вплоть до полного разрушения), а также он является пожароопасным.

Степень опасности определяется биологическим воздействием и регулируется специальными нормами и стандартами. Эти нормы и стандарты устанавливают предельно допустимые уровни энергетического воздействия (в Дж/см²) лазерного облучения на ткани в зависимости от длины волны излучения, времени воздействия, площади облучения, частоты повторения и длительности импульса.

Правила безопасности при эксплуатации лазерных систем должны предусматривать такие низкие уровни воздействия лазерного излучения, чтобы они находились ниже предельно допустимых уровней. Работа лазерной системы не должна представлять никакой угрозы здоровью персонала.

По степени генерируемой радиационной опасности технологические лазеры подразделяются на 5 классов, которые приведены в таблице 22.

Таблица 22 – классы опасности лазерных установок

Класс безопасности	Мощность лазера	Примечание
Класс I	Менее 0,39 мВт	Безопасен для применений.
Класс II	Менее 1 мВт	Применяется только к видимым лазерам. В качестве защиты - рефлекс промывания глаз. Не использовать на уровне головы.
Класс IIIА	Менее 5 мВт	Прямой контакт с глазами опасен, особенно через оптические приборы (бинокль, телескоп, линзы). Необходимо использовать квалифицированных рабочих и специалистов.
Класс IIIВ	Более 5 мВт, но менее 0,5 Вт	
Класс IV	Более 0,5 Вт	Очень опасен, особенно при использовании на открытой местности.

Лазеры, которые встроены в лазерный гравер TwoWin-3000 и Рамановскую установку NT-MDT SI относятся к первому и второму классам безопасности - то есть они, как правило, безопасны, если техник следует инструкциям по применению и носит защитные очки. Таким образом, перед началом эксперимента необходимо правильно спланировать все операции, проводимые с лазером, и не допустить ситуации, при которой лазерная головка окажется на уровне головы инженера.

Организационные меры безопасности при работе с лазером:

- лазерная система должна использоваться только по прямому назначению.

- эксплуатацию и ремонт лазерной системы может осуществлять только специально обученный персонал.

- персонал должен быть обеспечен лазерными защитными очками, защитной одеждой, перчатками и специальным инструментом для удаления обработанных деталей.

- перед запуском системы оператор должен убедиться, что в опасной зоне нет людей.

6.2.2.2 Повышенное значение напряжения в электрической цепи, замыкание которой может произойти через тело человека

Электробезопасность – это система организационно-технических мероприятий и средств, обеспечивающих защиту людей от вредного и опасного воздействия электрического тока, электромагнитного поля и статического электричества [62].

Наиболее распространенной причиной поражения от электрического тока является приближение сотрудника лаборатории на определенное расстояние или прямой контакт человека с открытыми токоведущими частями.

Это может произойти из-за нескольких факторов:

- неисправность приборов или электропроводки;
- недостаточная квалификация сотрудников, отсутствие базовых знаний норм безопасности;
- несоблюдение и несогласованность мер по временному включению и выключению токопроводящих элементов при эксплуатации, профилактике или ремонте оборудования;
- повреждение изоляции или отсутствие заземления.

Во избежание несчастных случаев необходимо строго соблюдать основные требования электробезопасности на рабочем месте при работе с электрооборудованием (инструкция по эксплуатации электроприборов).

Существует специальная классификация электрооборудования по степени электрической опасности. В большинстве случаев класс опасности зависит от напряжения (до 1000 вольт и более) и вида выполняемых работ.

Лабораторные помещения 207 и 203 Научного парка ТПУ относятся к помещениям без повышенной опасности, в которых отсутствуют условия, создающие повышенную или особую опасность, так как номинальное напряжение установки NT-MDT SI соответствует 220 В. Все токоведущие части установки изолированы, заключены в защитный кожух и заземлены.

Также в лабораториях необходимо иметь дополнительные изолирующие средства электрозащиты, к которым относят диэлектрические перчатки, ботинки, резиновые коврики и дорожки, изолирующие опоры и переносные заземлители.

По окончании рабочего дня нужно снять напряжение с отдельных приборов, а также отключить все щитки на лабораторных столах и общий рубильник за пределами лаборатории [61].

6.2.3 Обоснование мероприятий по снижению уровней воздействия опасных и вредных факторов на исследователя

Для обеспечения снижения влияния такого вредного фактора, как отклонение показателей микроклимата, в помещения вводят установки кондиционирования воздуха, которые поддерживают параметры воздуха в пределах, обеспечивающих надежную работу и комфортные условия для рабочего персонала.

Для снижения влияния повышенного уровня шума необходимо рационально располагать оборудование, применять ограждающие конструкции и глушители шума в системах принудительной вентиляции и кондиционирования воздуха, а также пользоваться средствами индивидуальной защиты (наушники).

Для обеспечения нормируемых значений освещенности рабочего места необходимо проводить регулярную очистку оконных проемов и светильников.

Работу с вредными веществами необходимо проводить исключительно под вытяжным шкафом. Также необходимо пользоваться средствами индивидуальной защиты – халатом и перчатками для защиты одежды и кожаных покровов, защитными очками и респиратором для защиты органов дыхания.

При работе с лазерными установками персонал обязан пользоваться необходимыми средствами индивидуальной защиты. Глаза сотрудников должны быть защищены масками или очками. Также работа с лазером должна проводиться в вытяжном шкафу в случае возможного образования вредных газов, паров и аэрозолей. В помещении, где расположена установка, запрещается использовать приборы и предметы с зеркальными поверхностями.

Для обеспечения электробезопасности исполнителей проекта необходимо соблюдать соответствующие расстояния до токоведущих частей. Все оборудования, формирующие опасные факторы, заземлены, а также имеют ограждения токоведущих частей, что соответствует требованиям к оборудованию на производстве.

6.3 Экологическая безопасность

Экологическая безопасность - это допустимый уровень опасностей, которые воздействуют на окружающую среду и человека. В данном разделе будем рассматривать влияние используемых в исследовании веществ на окружающую среду и атмосферу.

При работе с плазмонными наночастицами и молекулами 4 – нитробензотиола испарения и эмиссии в литосферу не происходило. Для этого все работы проводились в вытяжном шкафу, оснащенный фильтром и при включенной вентиляции. При работе с SERS оборудованием со встроенным

лазером и ПК так же отсутствует негативное воздействие на окружающую среду.

Вредное воздействие на гидросферу может оказывать химическое и биологическое загрязнение водотоков в результате удаления биологических, неорганических и органических отходов в канализационную сеть населенных пунктов. Если сточные воды содержат вредные вещества в концентрациях, превышающих установленные нормы, то их следует подвергать предварительной очистке. Жидкий биоматериал поступал в дезинфицирующие растворы, где подвергался обезвреживанию. Раствор 4-нитробензотиола утилизировали в специально отведенную тару.

6.4 Безопасность в чрезвычайных ситуациях

При проведении исследования в лаборатории могут возникнуть такие ЧС, как выход из строя системы энергоснабжения, возникновение эпидемии, а также обрушение зданий в результате землетрясения, урагана или пожара. В научном парке ТПУ действует пропускная система для предотвращения террористических актов.

Наиболее частыми причинами ЧС таких, как возгорание или взрыв, могут являться нарушение правил пожарной безопасности; неисправность электрооборудования, электросетей и нарушение электротехнических правил; самовозгорание, статическое электричество, грозовые разряды; неудовлетворительная постановка инструктажа, недостаточная дисциплина.

Пожар может возникнуть из-за неправильного обращения или хранения взрывчатых веществ, легковоспламеняющихся жидкостей, химических веществ, переохлажденных и нагретых жидкостей. В случае возгорания, возникновения пожара или взрыва необходимо немедленно прекратить работы в помещении и принять меры по устранению чрезвычайной ситуации. По возможности необходимо обесточить все оборудование в лаборатории при помощи общего рубильника. Также воспользоваться огнетушителем, песком

или асбестовым одеялом и сообщить руководителю. Для того чтобы снизить риск возникновения пожаров, необходимо:

- соблюдение мер безопасности при работе с легковоспламеняющимися веществами и оборудованием;
- систематическое прохождение инструктажей по пожарной безопасности;
- создание и использование систем своевременного оповещения работников.

Помещение, в котором осуществляется изготовление подложек LiMPc (Ag) / 4-NBT, по взрывопожарной и пожарной опасности относится к категории «В»: негорючие вещества и материалы находятся в холодном состоянии. Тем не менее, никогда не стоит забывать об опасности возникновения пожара.

В здании находятся огнетушители порошковые ОП-5, которые предназначены для ликвидации пожаров твердых веществ, в основном органического происхождения (класс А); пожаров горючих жидкостей или плавящихся твердых веществ (класс В); пожаров газообразных веществ (класс С), а также пожаров электрооборудования, находящегося под напряжением не более 1000 В (пожар класса Е).

План эвакуации персонала из лаборатории 2 этажа научного парка ТПУ при возникновении пожара представлен на рисунке 31.



Рисунок 31 – План эвакуации 2 этажа научного парка ТПУ

Вывод

В данном разделе были рассмотрены правовые и организационные вопросы, производственная и экологическая безопасность, а также безопасность в чрезвычайных ситуациях. Проведен анализ вредных и опасных факторов исследования, предложены мероприятия по снижению уровня их воздействия. Рабочее место полностью соответствует нормативно-технической документации. Также был приведен список нормативных документов, регламентирующий рассматриваемые аспекты.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Целью данной работы была разработка сенсоров для обнаружения молекул с использованием оптических и электрохимических методов путем отслеживания изменений в плазмон-индуцированных каталитических реакциях. В настоящем исследовании была изучена фотокаталитическая реакция перехода молекулы 4-NBT в 4-ABT и DMAВ на частицах серебра, которая, как предполагается, зависит от pH среды.

В результате научного исследования нами были разработаны сенсоры, которые обладают рядом преимуществ по сравнению с другими подобными устройствами. Разработанные сенсоры получены с помощью лазерной интеграции наночастиц серебра в полимер ПЭТ, благодаря чему удалось создать электропроводящий композит применимый в гибкой электронике. Для усиления SERS сигналов на подложках были электрохимически выращены серебряные дендриты с большой площадью поверхности, структура которых была изучена с помощью СЭМ и EDX.

Для возможного создания носимых датчиков для отслеживания наличия раковых клеток в организме человека был проведен тест на антибактериальную активность сенсоров. Для целей введения изготавливаемых устройств под кожу, они должны обеспечивать защиту от антибактериальной инфекции. Результаты показали проявление токсического эффекта по отношению к грамположительным и грамотрицательным бактериям.

Функционализация подложек монослоем 4-NBT позволила создать химически стабильные молекулярно-плазмонные структуры в течение нескольких дней. Механическая стабильность была доказана путем помещения сенсора в ультразвуковую ванну на несколько минут. В результате колебательные спектры комбинационного рассеяния показали незначительное падение уровня сигнала, временную и механическую стабильность изготавливаемых сенсоров, что говорит о возможности их повторного использования.

Чувствительный механизм разработанных устройств включает в себя плазмонное усиление молекулярного зонда 4-NBT и отслеживание его колебательного спектра. Так, например, нами были получены спектры комбинационного рассеяния света межклеточной среды раковых клеток, которая отличалась значениями pH в зависимости от дня культивирования. В результате было установлено, что чем ниже значение pH межклеточной среды, тем сильнее происходит реакция димеризации 4-NBT и образование 4-ABT с появлением характеристических пиков. Полученные результаты исследования могут быть использованы для изучения патологий, связанных с раковыми заболеваниями.

Кроме того, были показаны электрохимические свойства проводимых подложек для обнаружения молекулы адреналина в различных концентрациях. Результаты демонстрируют, что полученные сенсоры AgLIMPc/AgEC/4-NBT электрохимически чувствительны и дают окислительный отклик при концентрации адреналина 0,52 мМ и выше.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ

1. Написана научная статья на английском языке «Molecular plasmonic three-dimensional forests: Chemical sensors compatible with flexible electronics and photocatalysis», которая подана на публикацию в журнал с квартилем Q1.
2. Гридина М.В. «Оценка влияния микробиоты пациентов с болезнью Паркинсона на экспрессионный профиль клеток нейробластомы в эксперименте *in vitro*» // Материалы Всероссийской итоговой 78-ой студенческой научной конференции им. Н. И. Пирогова. – Томск: Изд. СибГМУ, 2019г. – С. 489
3. Перекуча Н.А., Гридина М.В., Иккерт О.П. «Определение цитотоксического эффекта микроорганизмов, выделенных из пациентов с болезнью Паркинсона, на клеточной линии U251» // Перспективы развития фундаментальных наук: сборник трудов XVI Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых (Томск, 23–26 апреля 2019 г.): в 7 т. Т. 4: Биология и фундаментальная медицина / под ред. И.А. Курзиной, Г.А. Вороновой. – Томск: Издательский Дом Томского государственного университета, 2019. – 187 с.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Zhao N, Pan Y, Cheng Z, Liu H. Gold nanoparticles for cancer theranostics — A brief update. *Journal of Innovative Optical Health Sciences*. 2016. p. 1630004. doi:10.1142/s1793545816300044
2. Heidari A (2018) Enhancing the Raman Scattering for Diagnosis and Treatment of Human Cancer Cells, Tissues and Tumors Using Cadmium Oxide (CdO) Nanoparticles. *J Toxicol Risk Assess* 4:012. doi.org/10.23937/2572-4061.1510012 Accepted: September 26, 2018: Published: Septem
3. Koltai T. Cancer: fundamentals behind pH targeting and the double-edged approach. *Onco Targets Ther*. 2016;9: 6343–6360.
4. Eurostat. Causes of death - deaths by country of residence and occurrence [hlth_cd_aro] (Last update 05-03-2020, Extracted on 10.03.2020)
5. Anand P, Kunnumakkara AB, Sundaram C, Harikumar KB, Tharakan ST, Lai OS, Sung B, Aggarwal BB: Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. *Pharm Res*. 2008, 25: 2097-2116. 10.1007/s11095-008-9661-9.
6. Hussain, S., Hofseth, L. & Harris, C. Radical causes of cancer. *Nat Rev Cancer* 3, 276–285 (2003). <https://doi.org/10.1038/nrc1046>
7. Szent-Gyorgyi A: The living state and cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1977, 74: 2844-2847. 10.1073/pnas.74.7.2844.
8. Ferlay J, Ervik M, Lam F, Colombet M, Mery L, Piñeros M, et al. Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2020 (<https://gco.iarc.fr/today>, по состоянию на февраль 2021г.).
9. Zhao N, Pan Y, Cheng Z, Liu H. Gold nanoparticles for cancer theranostics — A brief update. *Journal of Innovative Optical Health Sciences*. 2016. p. 1630004. doi:10.1142/s1793545816300044
10. Guide to cancer early diagnosis. Geneva: World Health Organization; 2017. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

11. Blanco-Formoso, M. & Alvarez-Puebla, R. A. Cancer Diagnosis through SERS and Other Related Techniques. *Int. J. Mol. Sci.* 21, (2020).
12. Burchill SA, Bradbury MF, Pittman K, Southgate J, Smith B, Selby P. Detection of epithelial cancer cells in peripheral blood by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Br J Cancer.* 1995;71(2):278-281. doi:10.1038/bjc.1995.56
13. Yamaguchi K, Takagi Y, Aoki S, Futamura M, Saji S. Significant detection of circulating cancer cells in the blood by reverse transcriptase-polymerase chain reaction during colorectal cancer resection. *Ann Surg.* 2000;232(1):58-65. doi:10.1097/00000658-200007000-00009.
14. Vendrell, M., Maiti, K. K., Dhaliwal, K. & Chang, Y.-T. Surface-enhanced Raman scattering in cancer detection and imaging. *Trends Biotechnol.* 31, 249–257 (2013).
15. Bodelón, Gustavo et al. “Detection and imaging of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm communities by surface-enhanced resonance Raman scattering.” *Nature materials* vol. 15,11 (2016): 1203-1211. doi:10.1038/nmat4720.
16. Howes PD, Chandrawati R, Stevens MM. Colloidal nanoparticles as advanced biological sensors. *Science.* 2014;346:1247390–1247390
17. Banaei, N. et al. “Multiplex detection of pancreatic cancer biomarkers using a SERS-based immunoassay.” *Nanotechnology* 28 45 (2017): 455101 .
18. Plou, Javier & García, Isabel & Charconnet, Mathias & Astobiza, Ianire & García Astrain, Clara & Matricardi, Cristiano & Mihi, Agustin & Carracedo, Arkaitz & Liz-Marzán, Luis. (2020). Multiplex SERS Detection of Metabolic Alterations in Tumor Extracellular Media. *Advanced Functional Materials.* 30. 1910335. 10.1002/adfm.201910335.
19. Damaghi M, Wojtkowiak JW, Gillies RJ. pH sensing and regulation in cancer. *Frontiers in Physiology.* 2013. doi:10.3389/fphys.2013.00370
20. New technology for the detection of pH. *J Biochem Biophys Methods.* 2005;63: 1–9.

21. Zhao M, Guo Y-S, Xu W-N, Zhao Y-F, Xie H-Y, Li H-J, et al. Far-red to near-infrared fluorescent probes based on silicon-substituted xanthene dyes for sensing and imaging. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2020. p. 115704. doi:10.1016/j.trac.2019.115704
22. Ye X, Xiang Y, Wang Q, Li Z, Liu Z. A Red Emissive Two-Photon Fluorescence Probe Based on Carbon Dots for Intracellular pH Detection. *Small*. 2019. p. 1901673. doi:10.1002/sml.201901673
23. Kai Cui, Chenchen Fan, Gaoxian Chen, Yuanyuan Qiu, Mingwang Li, Miao Lin, Jian-Bo Wan, Changsi Cai, Zeyu Xiao. para-Aminothiophenol Radical Reaction-Functionalized Gold Nanoprobe for One-to-All Detection of Five Reactive Oxygen Species In Vivo. *Analytical Chemistry* 2018, 90 (20),1213712144. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b03116>
24. Pan C, Li X, Sun J, Li Z, Zhang L, Qian W, et al. A Multiplexed SERS-Active Microneedle for Simultaneous Redox Potential and pH Measurements in Rat Joints. *ACS Applied Bio Materials*. 2019. pp. 2102–2108. doi:10.1021/acsabm.9b00117
25. Chen P, Wang Z, Zong S, Chen H, Zhu D, Zhong Y, et al. A wide range optical pH sensor for living cells using Au@Ag nanoparticles functionalized carbon nanotubes based on SERS signals. *Anal Bioanal Chem*. 2014;406: 6337–6346.
26. Zong S, Wang Z, Yang J, Cui Y (2011) Intracellular pH sensing using p-aminothiophenol functionalized gold nanorods with low cytotoxicity. *Anal Chem* 83(11):4178–4183. doi:10.1021/ac200467z.
27. Mengxi Xu, Xin Ma, Ting Wei, Zhi-Xuan Lu, and Bin Ren. In Situ Imaging of Live-Cell Extracellular pH during Cell Apoptosis with Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *Anal. Chem*. 2018, 90, 13922–13928.
28. Фотокатализ // Википедия. [2020]. Дата обновления: 28.12.2020. URL: <https://ru.wikipedia.org/?curid=542192&oldid=111360686> (дата обращения: 24.03.2021).

29. Golubev AA, Khlebtsov BN, Rodriguez RD, Chen Y, Zahn DRT. Plasmonic Heating Plays a Dominant Role in the Plasmon-Induced Photocatalytic Reduction of 4-Nitrobenzenethiol. *The Journal of Physical Chemistry C*. 2018. pp. 5657–5663. doi:10.1021/acs.jpcc.7b12101.
30. Boerigter, C., Aslam, U. & Linic, S. Mechanism of Charge Transfer from Plasmonic Nanostructures to Chemically Attached Materials. *ACS Nano* 10, 6108–6115 (2016).
31. Jingang Wang, Yong Dong, Yuanzuo Li, Zhenglong Zhang, Fengcai Ma. pH-Dependent plasmonic catalysis of 4-nitrobenzenethiol in aqueous environment. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, Volume 153, 2016, Pages 542-545, ISSN 1386-1425, <https://doi.org/10.1016/j.saa.2015.09.033>.
32. Heather Price. Air Analysis | Field Portable Instruments for the Measurement of Airborne Hazards. Editor(s): Paul Worsfold, Colin Poole, Alan Townshend, Manuel Miró, *Encyclopedia of Analytical Science (Third Edition)*. Academic Press 2019, Pages 40-43, ISBN 9780081019849, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.12680-0>.
33. F.R. Simões, M.G. Xavier. Electrochemical Sensors. Editor(s): Alessandra L. Da Róz, Marystela Ferreira, Fábio de Lima Leite, Osvaldo N. Oliveira. In *Micro and Nano Technologies, Nanoscience and its Applications*. William Andrew Publishing, 2017. Pages 155-178, ISBN 9780323497800, <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-49780-0.00006-5>.
34. Ewa Wierzbicka, Grzegorz D. Sulka. Fabrication of highly ordered nanoporous thin Au films and their application for electrochemical determination of epinephrine. *Sensors and Actuators B: Chemical*. Volume 222, 2016. Pages 270-279, ISSN 0925-4005, <https://doi.org/10.1016/j.snb.2015.08.066>.
35. Rodriguez, R. D., Shchadenko, S., Murastov, G., Lipovka, A., Fatkullin, M., Petrov, I., Tran, T. H., Khalelov, A., Saqib, M., Villa, N. E., Bogoslovskiy, V., Wang, Y., Hu, C. G., Zinovyev, A., Sheng, W., Chen, J. J., Amin, I., &

Sheremet, E. Ultra-Robust Flexible Electronics By Laser-Driven Polymer-Nanomaterials Integration. *Advanced Functional Materials*. <https://doi.org/10.1002/Adfm.202008818>

36. Endo-Kimura, M.; Kowalska, E. Plasmonic Photocatalysts for Microbiological Applications. *Catalysts* 2020, *10* (8), 824.
37. Koopman, W.; Sarhan, R. M.; Stete, F.; Schmitt, C. N. Z.; Bargheer, M. Decoding the Kinetic Limitations of Plasmon Catalysis: The Case of 4-Nitrothiophenol Dimerization. *Nanoscale* 2020, *12* (48), 24411–24418.
38. Skadtchenko, B. O.; Aroca, R. Surface-Enhanced Raman Scattering of P-Nitrothiophenol Molecular Vibrations of Its Silver Salt and the Surface Complex Formed on Silver Islands and Colloids. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* 2001, *57A* (5), 1009–1016.
39. Choi, H.-K.; Lee, K. S.; Shin, H.-H.; Kim, Z. H. Identification of the First Elementary Step in the Photocatalytic Reduction of Nitrobenzenethiols on a Metallic Surface. *J. Phys. Chem. Lett.* 2016, *7* (20), 4099–4104.
40. Dick IP, Scott RC. Pig ear skin as an in-vitro model for human skin permeability. *J Pharm Pharmacol.* 1992 Aug;44(8):640-5. doi: 10.1111/j.2042-7158.1992.tb05485.x. PMID: 1359086.
41. Трудовой кодекс Российской Федерации от 30.12.2001 N 197-ФЗ (ред. от 30.04.2021);
42. ГОСТ 12.4.299-2015 Система стандартов безопасности труда (ССБТ). Средства индивидуальной защиты органов дыхания. Рекомендации по выбору, применению и техническому обслуживанию (с поправкой);
43. ГОСТ В-1586-42 Халаты медицинские санитарные и лабораторные;
44. ГОСТ 12.4.103-83 Система стандартов безопасности труда (ССБТ). Одежда специальная защитная, средства индивидуальной защиты ног и рук. Классификация;
45. ГОСТ 12.2.032-78 Рабочее место при выполнении работ сидя;
46. ГОСТ 12.2.033-78 Рабочее место при выполнении работ стоя;

47. ПНД Ф 12.13.1-03 Методические рекомендации. Техника безопасности при работе в аналитических лабораториях (общие положения);
48. СанПиН 5804-91 Санитарные нормы и правила устройства и эксплуатации лазеров;
49. ГОСТ Р-50723-94 Лазерная безопасность. Общие требования безопасности при разработке и эксплуатации лазерных изделий;
50. ГОСТ 12.0.003-2015 Система стандартов безопасности труда (ССБТ). Опасные и вредные производственные факторы. Классификация»;
51. СанПиН 2.2.4.548–96. Гигиенические требования к микроклимату производственных помещений;
52. ГОСТ 12.1.003-2014 ССБТ. Шум. Общие требования безопасности;
53. ГОСТ 12.1.029-80 ССБТ. Средства и методы защиты от шума. Классификация;
54. СанПиН 1.2.3685-21 "Гигиенические нормативы и требования к обеспечению безопасности и (или) безвредности для человека факторов среды обитания";
55. СП 52.13330.2016 Естественное и искусственное освещение//М.: Изд-во стандартов. – 2016;
56. ГОСТ 12.1.007-76 ССБТ. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности;
57. ГОСТ 12.1.005-88 Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны;
58. ГОСТ 12.1.030-81 Система стандартов безопасности труда. Электробезопасность. Защитное заземление, зануление;
59. ГОСТ 12.1.038-82. Система стандартов безопасности труда. Электробезопасность. Предельно допустимые значения напряжений прикосновения и токов;
60. ГОСТ 12.1.045-84 Система стандартов безопасности труда. Электростатические поля. Допустимые уровни на рабочих местах и требования к проведению контроля;

61. ГОСТ 12.1.038–82 ССБТ. Электробезопасность. Предельно допустимые уровни напряжений прикосновения и токов;
62. ГОСТ 12.1.009-76. Система стандартов безопасности труда. Электробезопасность. Термины и определения.