

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
Оценка цитотоксичности стабильных активных радикалов, как перспективных агентов для фотодинамической терапии опухолей

УДК 54.024-056.13:577.33:616-006

Студент

Группа	ФИО	Подпись	Дата
9ДМ01	Бердинская Елизавета Сергеевна		

Руководитель

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент	Плотников Е.В.	к.х.н.		

КОНСУЛЬТАНТЫ:

По разделу «Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение»

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент	Маланина В.А.	к.э.н.		

По разделу «Социальная ответственность»

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Профессор	Федорчук Ю.М.	д.т.н.		

ДОПУСТИТЬ К ЗАЩИТЕ:

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

Томск – 2022 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, выработать стратегию действий
УК(У)-2	Способен управлять проектом на всех этапах его жизненного цикла
УК(У)-3	Способен организовывать и руководить работой команды, выработывая 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
14.03.2022 г.

ЗАДАНИЕ
на выполнение выпускной квалификационной работы

В форме:

магистерской диссертации

Студенту:

Группа	ФИО
9ДМ01	Бердинской Елизавете Сергеевне

Тема работы:

Оценка цитотоксичности стабильных активных радикалов, как перспективных агентов для фотодинамической терапии опухолей

Утверждена приказом директора (дата, номер)

24.02.2022, № 55-51/с

Срок сдачи студентом выполненной работы:

10.06.2022 г.

ТЕХНИЧЕСКОЕ ЗАДАНИЕ:

Исходные данные к работе	Объект исследования: стабильные активные радикалы, клеточные культуры 3Т3-L1, MCF-7 и MDA MB 231. Предмет исследования: цитотоксичность стабильных активных радикалов. Провести оценку цитотоксичности стабильных активных радикалов, как перспективных агентов для фотодинамической терапии опухолей, с использованием культур клеток в качестве биологических моделей.
Перечень подлежащих исследованию, проектированию и разработке вопросов	Аналитический обзор по тематике научно-исследовательской работы. Проведение комплекса экспериментов для достижения цели исследования. Анализ и обсуждение результатов

	<p>проведенной работы.</p> <p>Анализ ресурсной, финансовой, бюджетной, социальной и экономической эффективности исследования.</p> <p>Анализ рисков и опасностей проведения исследования и составления перечня нормативов для их регулирования.</p> <p>Формулировка выводов и заключений по работе.</p>
Перечень графического материала	Нет
Консультанты по разделам выпускной квалификационной работы	
Раздел	Консультант
Социальная ответственность	Д.т.н., профессор ООД Федорчук Ю.М.
Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение	К.э.н., доцент ОСГН ШБИП Маланина В.А.
Раздел ВКР на иностранном языке	К.ф.н., доцент ОИЯ Зяблова Н.Н.
Названия разделов, которые должны быть написаны на русском и иностранном языках:	
Название разделов на русском языке: введение, аналитический обзор, объекты и методы исследования, результаты исследования, социальная ответственность, финансовый менеджмент ресурсоэффективность и ресурсосбережение, заключение.	
Название разделов на иностранном языке: аналитический обзор	

Дата выдачи задания на выполнение выпускной квалификационной работы по линейному графику	14.03.2022 г.
---	---------------

Задание выдал руководитель:

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент ИШХБМТ	Плотников Е.В.	к.х.н.		14.03.2022 г.

Задание принял к исполнению студент:

Группа	ФИО	Подпись	Дата
9ДМ01	Бердинская Елизавета Сергеевна		14.03.2022 г.

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
Уровень образования магистратура
Период выполнения весенний семестр 2021/2022 учебного года

Форма представления работы:

магистерская диссертация

КАЛЕНДАРНЫЙ РЕЙТИНГ-ПЛАН
выполнения выпускной квалификационной работы

Срок сдачи студентом выполненной работы: 10.06.2022 г.

Дата контроля	Название раздела (модуля) / вид работы (исследования)	Максимальный балл раздела (модуля)
21.03.2022 г.	Разработка раздела «Введение»	10
04.04.2022 г.	Разработка раздела «Аналитический обзор»	10
18.04.2022 г.	Разработка раздела «Объекты и методы исследования»	10
10.05.2022 г.	Разработка разделов «Результаты исследования»	10
24.05.2022 г.	Разработка разделов «Социальная ответственность» и «Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение»	10
06.06.2022 г.	Оформление ВКР	10
14.06.2022 г.	Представление ВКР	40

Составил преподаватель:

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент ИШХБМТ	Плотников Е.В.	к.х.н.		14.03.2022

СОГЛАСОВАНО:

Руководитель ООП	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
18.04.01 Химическая технология				
Профессор	Пестряков А.Н.	д.х.н.		14.03.2022

**ЗАДАНИЕ ДЛЯ РАЗДЕЛА
«СОЦИАЛЬНАЯ ОТВЕТСТВЕННОСТЬ»**

Студенту:

Группа	ФИО
9ДМ01	Бердинской Елизавете Сергеевне

Школа	ИШХБМТ	Отделение (НОЦ)	-
Уровень образования	Магистратура	Направление/ специальность	18.04.01 Химическая технология

Тема дипломной работы: «Оценка цитотоксичности стабильных активных радикалов, как перспективных агентов для фотодинамической терапии опухолей»

Исходные данные к разделу «Социальная ответственность»:	
<p>1. Характеристика объекта исследования (вещество, материал, прибор, алгоритм, методика, рабочая зона) и области его применения</p>	<p><i>Объект исследования – стабильные активные радикалы; клеточные культуры 3T3-L, MCF-7 и MDA MB 231.</i></p> <p><i>Область применения – фотодинамическая терапия.</i></p> <p><i>Рабочая зона – лаборатория клеточных исследований.</i></p>
Перечень вопросов, подлежащих исследованию, проектированию и разработке:	
<p>1. Производственная безопасность</p> <p>1.1. Анализ выявленных вредных факторов</p> <ul style="list-style-type: none"> • Природа воздействия • Действие на организм человека • Нормы воздействия и нормативные документы (для вредных факторов) • Средства защиты коллективные и индивидуальные <p>1.2. Анализ выявленных опасных факторов:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Термические источники опасности • Электроопасность • Пожароопасности 	<p>1. Вредные факторы:</p> <p>1.1 Недостаточная освещенность; Проведен расчет освещения рабочего места; представлен рисунок размещения светильников на потолке с размерами в системе СИ;</p> <p>1.2 Нарушения микроклимата, оптимальные и допустимые параметры;</p> <p>1.3 Шум, ПДУ, СКЗ, СИЗ;</p> <p>1.4. Наличие токсикантов, ПДК, класс опасности, СКЗ, СИЗ;</p> <p>2. Опасные факторы:</p> <p>2.1 Электроопасность; класс электроопасности помещения, безопасные номиналы I, U, R_{заземления}, СКЗ, СИЗ;</p> <p>2.2 Пожароопасность, категория пожароопасности помещения, марки огнетушителей, их назначение и ограничения применения; Приведена схема эвакуации.</p>
<p>2. Экологическая безопасность:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Выбросы в окружающую среду • Решения по обеспечению экологической безопасности 	<p>Наличие промышленных отходов (бумага-черновики, вторцвет- и чермет, пластмасса, перегоревшие люминесцентные лампы, оргтехника) и способы их утилизации.</p>
<p>3. Безопасность в чрезвычайных ситуациях:</p> <ul style="list-style-type: none"> • перечень возможных ЧС при разработке и эксплуатации проектируемого решения; 	<p>Рассмотрены 2 ситуации ЧС:</p> <p>1) природная – сильные морозы зимой (аварии на электро-, тепло- коммуникациях, водоканале, транспорте);</p> <p>2) техногенная – террористические акты;</p>

<ul style="list-style-type: none"> • разработка превентивных мер по предупреждению ЧС; • разработка действий в результате возникшей ЧС и мер по ликвидации её последствий. 	представлены мероприятия по обеспечению устойчивой работы производства в том и другом случае.
4. Перечень нормативно-технической документации.	ГОСТы, СанПиНы, СНИПы
Дата выдачи задания для раздела по линейному графику	
26.03.2022	

Задание выдал консультант по разделу «Социальная ответственность»:

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Профессор ООД	Федорчук Юрий Митрофанович	д.т.н.		14.03.2022

Задание принял к исполнению студент:

Группа	ФИО	Подпись	Дата
9ДМ01	Бердинская Елизавета Сергеевна		14.03.2022

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

Студенту:

Группа	ФИО
9ДМ01	Бердинской Елизавете Сергеевне

Школа	ИШХБМТ	Отделение (НОЦ)	-
Уровень образования	Магистратура	Направление/специальность	18.04.01 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>	<i>Бюджет проекта – не более 600000 руб., в т.ч. затраты по оплате труда – не более 124000 руб.</i>
2. <i>Нормы и нормативы расходования ресурсов</i>	<i>Значение показателя интегральной ресурсоэффективности – не менее 4,1 баллов из 5,0.</i>
3. <i>Используемая система налогообложения, ставки налогов, отчислений, дисконтирования и кредитования</i>	<i>1.Налоговый кодекс Российской Федерации 2.ФЗ №212 от 24.07.2009 в ред. от 19.12.2016</i>

Перечень вопросов, подлежащих исследованию, проектированию и разработке:

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

Перечень графического материала

1. <i>«Портрет» потребителя результатов НТИ</i>
2. <i>Сегментирование рынка</i>
3. <i>Оценка конкурентоспособности технических решений</i>
4. <i>Матрица SWOT</i>
5. <i>График проведения и бюджет НТИ</i>
6. <i>Оценка ресурсной, финансовой и экономической эффективности НТИ</i>

Дата выдачи задания для раздела по линейному графику	26.03.2022
---	------------

Задание выдал консультант:

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент ОСГН ШБИП	Маланина Вероника Анатольевна	к.э.н.		14.03.2022

Задание принял к исполнению студент:

Группа	ФИО	Подпись	Дата
9ДМ01	Бердинская Елизавета Сергеевна		14.03.2022

РЕФЕРАТ

Выпускная квалификационная работа 103 с., 20 рис., 31 табл., 44 источника, 1 прил.

Ключевые слова: стабильные активные радикалы, цитотоксичность, биологические модели, исследования *in vitro*, 3T3-L1, MCF-7, MDA MB 231.

Объектом исследования являются: стабильные активные радикалы, клеточные культуры 3T3-L1, MCF-7 и MDA MB 231.

Цель работы – оценка цитотоксичности стабильных активных радикалов, как перспективных агентов для фотодинамической терапии опухолей, с использованием культур клеток в качестве биологических моделей.

В процессе исследования проводились эксперименты по оценке цитотоксичности стабильных активных радикалов, являющихся перспективными агентами для фотодинамической терапии опухолей, с использованием клеточных культур в качестве биологических моделей.

В результате исследования установлено, что алкилвердазилы как источник стабильных активных радикалов являются валидной базой для разработки новых противоопухолевых препаратов для лечения фотодинамической терапией.

Степень внедрения: идет стадия НИОКР.

Область применения: фармакология, онкология (новые агенты для фотодинамической терапии онкологических заболеваний).

Экономическая эффективность выполнения первых этапов токсикологических испытаний на биологических моделях *in vitro* выше, чем на биологических моделях *ex vivo* и *in vivo*, за счет экономии денежных и временных затрат.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	13
ГЛАВА 1. АНАЛИТИЧЕСКИЙ ОБЗОР	16
1.1 Основные методы борьбы с раком	16
1.1.1 Хирургия	17
1.1.2 Химиотерапия.....	18
1.1.3 Радиотерапия	18
1.1.4 Фотодинамическая терапия	18
1.1.4.1 Фотодинамические агенты.....	20
1.1.4.1.1 Применяемые фотосенсибилизаторы	20
1.1.4.1.2 Стабильные радикалы	21
1.1.4.1.3 Вердазилы	22
1.2 Токсикологические испытания	22
1.2.1 Исследования <i>in vivo</i>	23
1.2.2 Исследования <i>ex vivo</i>	23
1.2.3 Исследования <i>in vitro</i>	24
1.2.3.1 Клеточные культуры.....	25
ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	28
2.1 Технические характеристики оборудования.....	28
2.2 Сырье и материалы	29
2.3 Объекты исследования	31
2.3.1 Алкилвердазилы	31
2.3.2 Клеточная культура 3Т3-L1	33
2.3.3 Опухолевые клеточные культуры MCF-7, MDA MB 231.....	34
2.4 Методы исследования.....	34
2.4.1 Культивирование клеток	34
2.4.2 Активация алкилвердазилов	36
2.4.3 Колориметрические тесты	37
2.4.3.1 МТТ-тест.....	37

2.4.3.2 Аламаровый тест.....	39
ГЛАВА 4. ФИНАНСОВЫЙ МЕНЕДЖЕМЕНТ, РЕСУРСОЭФФЕКТИВНОСТЬ И РЕСУРСОСБЕРЕЖЕНИЕ	41
4.1 Предпроектный анализ	41
4.1.1 Потенциальные потребители результатов исследования	41
4.1.2 Анализ конкурентных технических решений.....	42
4.1.3 SWOT-анализ.....	44
4.2 Планирование научно-исследовательских работ.....	47
4.2.1 Структура работ в рамках научного исследования	47
4.2.2 Определение трудоемкости выполнения работ	48
4.2.3 Разработка графика проведения научного исследования.....	49
4.2.4 Бюджет научно-технического исследования (НТИ)	53
4.3 Определение ресурсной, финансовой, бюджетной, социальной и экономической эффективности исследования	59
ГЛАВА 5. СОЦИАЛЬНАЯ ОТВЕТСТВЕННОСТЬ	63
5.1 Производственная безопасность	64
5.1.1 Анализ выявленных вредных факторов	64
5.1.1.1 Недостаточная освещенность	64
5.1.1.2 Отклонение показателей микроклимата в помещении	68
5.1.1.3 Превышение уровня шума	70
5.1.1.4 Защита от токсикантов	71
5.1.2 Анализ выявленных опасных факторов	74
5.1.2.1 Поражение электрическим током	74
5.1.2.2 Пожарная опасность	75
5.2 Экологическая безопасность.....	78
5.3 Безопасность в чрезвычайных ситуациях.....	79
5.4 Перечень нормативно-технической документации.....	81
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	83
СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ СТУДЕНТА	84
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	85

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы:

1. В 2018 году на сайте интернет-издания Our World in Data была опубликована статья [1] о причинах смерти людей по всему миру с 1990 г. по 2017 г. Второе место стабильно занимает смерть от рака, при этом количество смертей постоянно растет. Всемирная организация здравоохранения привела статистику заболеваемости рака с 2015 по 2020 года [2]. Самыми распространенными видами рака во всем мире среди людей всех возрастов являются рак груди – 7,8 млн. случаев (15,4 %) и немеланомный рак кожи – 6,5 млн. случаев (12,8 %).

2. Основными методами лечения рака являются хирургия, радиотерапия и системная терапия [3]. Одним из эффективных и щадящих методов является фотодинамическая терапия [4]. Она заключается в применении фотосенсибилизаторов, которые после световой активации уничтожают раковые клетки.

3. К традиционным фотодинамическим агентам относятся гематопорфирин и его производные, а также производные хлоринового ряда [5]. В России с 1996 года применяется Фотогем, разработанный во второй половине 80-х годов А.Ф. Мироновым [6]. Действие данных соединений основано на превращении кислорода тканей в свободные радикалы кислорода, способные вызывать гибель клеток. Таким образом, в средах, в которых отсутствует кислород, применяемые фотосенсибилизирующие препараты имеют низкую эффективность. Однако оказывать разрушающее действие на клетки организма способны не только радикалы кислорода.

4. На базе Томского политехнического университета ведутся разработки перспективного фотосенсибилизатора – алкилвердазила [7], способного под действием излучения видимого спектра распадаться на радикалы: вердазильный и активный. Для оценки эффективности

разрабатываемого фотосенсибилизатора, необходимы токсикологические испытания, для установления характера вызываемой им токсичности.

5. На данном этапе работы токсикологические испытания проводятся на культурах клеток. Использование культур клеток в качестве биологических моделей имеет ряд преимуществ перед классическими методами токсикологических испытаний на млекопитающих. Данная модель *in vitro* позволяет проводить исследования с меньшими временными и денежными затратами. Кроме того, с ее помощью, удастся полностью обходить этические проблемы, связанные с массовым использованием и гибелью экспериментальных животных.

Цель исследования: оценка цитотоксичности стабильных активных радикалов, как перспективных агентов для фотодинамической терапии опухолей, с использованием культур клеток в качестве биологических моделей.

Задачи исследования:

1. Оценить цитотоксичности микрокапсул и индивидуальных частиц производного алкилвердазила;
2. Определить оптимальные условия активации алкилвердазила;
3. Оценить и сравнить цитотоксичности водорастворимой и водонерастворимой форм производного алкилвердазила;
4. Оценить цитотоксическое действие многократного применения производного алкилвердазила.

Объектом исследования в данной работе являются стабильные активные радикалы и клеточные культуры 3T3-L1, MCF-7 и MDA MB 231.

Научная и практическая новизна проекта:

1. Доказано, что без активации светом производные алкилвердазила не оказывают токсического действия на клетки;
2. Подобраны оптимальные условия фотодинамической активации производных алкилвердазила в условиях *in vitro*;

3. Установлено значительное цитотоксическое действие производных алкилвердазила при фотодинамической активации в отношении опухолевых клеток
4. Показано повышение неиндуцированной цитотоксичности производных алкилвердазила при повторном применении.

Апробация работы:

Основные положения работы были опубликованы в журнале *Mol. Pharmaceutics* в 2022 году [8] и представлены на XXII и XXIII Международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых «Химия и химическая технология в XXI веке» имени профессора Л.П. Кулёва.

ГЛАВА 1. АНАЛИТИЧЕСКИЙ ОБЗОР

1.1 Основные методы борьбы с раком

Раком называют [9] группу заболеваний, которые связаны со злокачественными новообразованиями, поражающими любые органы в организме человека.

В 2018 году на ресурсе Our World in Data была опубликована статья [1] о причинах смерти людей по всей планете в период с 1990-ого по 2017-ый года. На протяжении 27 лет рак является второй по значимости причиной смерти во всем мире, уступая только сердечнососудистым заболеваниям. Всемирная организация здравоохранения привела статистику заболеваемости рака с 2015 по 2020 года [2]. Самыми распространенными видами рака во всем мире среди людей всех возрастов являются рак груди – 7,8 млн. случаев (15,4 %) и немеланомный рак кожи – 6,5 млн. случаев (12,8 %). Среди новых случаев заболевания в 2020 г. они также занимают лидирующие позиции: 2,3 млн. случаев (11,7 %) и 1,2 млн. случаев (6,2 %), соответственно.

Онкологические заболевания очень разнообразны и затрагивают глубинные механизмы жизнедеятельности клеток, которые не полностью установлены и продолжают активно изучаться.

Новообразования возникают из клеток эпителия кожи, слизистых оболочек и паренхиматозных органов: печени, почек, легких, селезенки, поджелудочной и щитовидной железы. От структурно-функциональных особенностей клеток зависит строение новообразования (или опухоли). Например, в тканях, соприкасающихся с внешней средой и покрытых многослойным плоским эпителием, возникает плоскоклеточный рак. А из эпителия желез происходит железистый рак, называемый аденокарциномой.

Лечение рака зависит от характеристик опухоли: ее расположения, строения, стадии развития и предусматривает использование различных методов.

Всемирная организация здравоохранения выделяет три основных метода лечения рака:

- хирургию;
- химиотерапию;
- радиотерапию.

Нередко применяют комбинированное лечение с одновременным или последовательным применением различных методов. Так, для закрепления эффекта, а также с целью профилактики метастазов до или после оперативного вмешательства назначают химиотерапию или химиотерапию в сочетании с лучевой терапией.

1.1.1 Хирургия

При хирургическом способе лечения удаляется часть опухоли, метастазы или новообразование целиком. При большой области поражения может быть удален весь орган, который впоследствии возможно заменить протезом или имплантатом. Помимо этого широкое распространение получило разрушение опухоли с помощью низких температур или лазерного излучения [9].

Оперативное вмешательство – наиболее распространенный метод лечения онкологических новообразований [10]. При раке внутренних органов организма человека в 85 % случаев применяется хирургическое лечение. Это связано со стадией болезни, которую обычно обнаруживают в уже сформировавшемся виде и при наличии симптомов 2, 3 или 4 стадий.

Можно заключить, что хирургическое лечение имеет ряд ограничений, в том числе диссеминированные очаги, сложность установления локализаций мелких новообразований и ряд других.

При этом наибольшей эффективностью обладает комбинация хирургии с другими методами.

1.1.2 Химиотерапия

Химиотерапия является малотравматичной. Заключается она в применении цитостатиков, т.е. таких соединений, которые разрушают раковые клетки.

По частоте химиотерапия применяется наравне с хирургическими операциями. Она применяется и как самостоятельный метод лечения, и для повышения эффективности других способов терапии, и для устранения сохранившихся злокачественных фрагментов, и для предотвращения повторного развития опухоли.

Данное лечение хоть и требует длительного времени, однако в случае успеха дает устойчивый эффект.

Во время терапии самочувствие пациентов оставляет желать лучшего. Лечение сопровождается набором веса, облысением, тошнотой и рвотой.

1.1.3 Радиотерапия

Некоторые виды рака чувствительны к действию ионизирующего излучения, на этом основанная радиотерапия (или лучевая терапия).

Этот вид терапии универсален и может применяться на любом этапе лечения. Радиотерапия может использоваться как до хирургического вмешательства, так и после операции или вовремя ее проведения. При необходимости лучевую терапию применяют для облегчения боли.

Ионизирующее излучение может поступать внешне к пациенту для целенаправленного облучения опухоли, в этом случае излучающий аппарат располагается снаружи. Или может проводиться внутреннее воздействие, источником излучения в этом случае служат капсулы, ленты или жидкости.

1.1.4 Фотодинамическая терапия

Рассмотренные ранее методы лечения рака не обладают необходимой селективностью по отношению к раковым клеткам. Но ей обладает эффективная и щадящая фотодинамическая терапия (далее – ФДТ).

Данный метод впервые был реализован на 25 пациентах в 1978 году американским профессором Т. Догерти, а с 1992 года получил развитие и в России [6].

Данный метод борьбы с раком основан на свойстве раковой клетки селективно накапливать и некоторое время удерживать окрашенные вещества, которые в последующем возбуждаются длиной волны света. При этом общая энергия света невысока, чтобы не поражать соседние здоровые клетки. Таким образом, ФДТ сочетает воздействие физических и химиотерапевтических методов. Отдельно взятое вещество и низкоэнергетическое лазерное излучение практически не оказывают воздействия.

Метод состоит из четырех этапов:

- 1) введение пациенту раствора сенсibilизатора;
- 2) накопление сенсibilизатора в опухоли в течение нескольких часов или суток, диагностика опухоли по флуоресценции сенсibilизатора;
- 3) облучение пораженного участка светом с определенной длиной волны в течение 15 – 20 минут;
- 4) разрушение злокачественного новообразования в течение 2 – 4 недель, частичное или полное восстановление пораженных участков.

В качестве источника излучения используются лазер, лампа или система светодиодов, позволяющая доставлять свет во внутренние органы. В данной работе использовалась система светодиодов, т.к. она обладала малыми размерами и низкой стоимостью.

Под воздействием облучения в участках опухоли, содержащих сенсibilизатор, развиваются высокотоксичные фотохимические превращения с образованием цитотоксичных продуктов, которые губительны для раковых клеток.

1.1.4.1 Фотодинамические агенты

Становление ФДТ рака связано с разработкой первых сенсibilизаторов на основе порфиринов. Они получили название сенсibilизаторов первого поколения.

Порфирины и их гидрированные аналоги – хлорины и бактериохлорины – входят в состав известных белков: гемоглобина, миоглобина, пероксидазы и др. Порфирины выступают в форме железных комплексов и участвуют в транспорте кислорода и обеспечении организма энергией. А хлорины и бактериохлорины содержат магний, выполняют фотосинтез и подобные процессы.

Первым перспективным сенсibilизатором для ФДТ был гематопорфирин IX, производное которого и применял Т. Догерти при лечении первых пациентов.

К сенсibilизаторам второго поколения относят новые исследуемые соединения. К идеальному сенсibilизатору для ФДТ предъявляется ряд требований:

- Он должен иметь высокую селективность к раковым клеткам, слабо задерживаясь в здоровых тканях;
- Он должен обладать низкой системной токсичностью и легко выводиться из организма;
- Он должен слабо накапливаться в коже;
- Он должен быть устойчивым при хранении и введении в организм;
- Он должен обладать хорошей люминесценцией для надежной диагностики новообразования и др.

1.1.4.1.1 Применяемые фотосенсibilизаторы

В настоящее время препараты на основе гематопорфирина наиболее применяемы в медицинской практике. В США и Канаде применяют Фотоприн, в Китае – Фотосан, в России – Фотогем.

Отечественный Фотогем был разработан во второй половине 80-х годов А.Ф. Мироновым [6]. С 1992 по 1995 год он проходил клиническую проверку, а с 1996 года был разрешен для медицинского применения.

Производные хлорофилла активно используют для создания сенсбилизаторов второго поколения. Известно [11], что природный хлорофилл недостаточно устойчив для использования в ФДТ. Большой устойчивостью обладает феофорбид, однако, он слабо растворим в воде. Решить эту проблему предлагают [12], добавив две, три и более карбоксильных групп.

1.1.4.1.2 Стабильные радикалы

Радикалами называют атом или молекулу, имеющие неспаренный электрон на внешней орбите. Радикалы живут доли секунд, т.к. стремятся вступить в реакцию с другими молекулами и восполнить нехватку электрона. В стабильных радикалах неспаренный электрон распределен по всей молекуле, что позволяет молекуле жить продолжительное время при комнатной температуре.

Первым открытым стабильным радикалом был трифенилметильный радикал. Его в 1900 году открыл Гомберг [13]. Из-за неспаренного электрона стабильные радикалы обладают особыми магнитными, оптическими и окислительно-восстановительными свойствами, которые позволяют применять их в различных сферах: биофизика, биохимия, биология и медицина. Также они используются для разработки новых материалов, таких как магнитные и оптоэлектронные материалы или полимеры, графены [14].

Для применения в качестве противоопухолевых агентов стабильные радикалы обладают определенными свойствами. Они способны окислять насыщенные жирные кислоты, входящие в состав клеточной мембраны, увеличивая ее проницаемость, повреждать белки и ДНК. Что приводит к старению, канцерогенезу, воспалению, радиоактивному и химическому поражению клеток.

1.1.4.1.3 Вердази́лы

Вердазильные радикалы – это новый класс стабильных радикалов [15], обладающий сильными нуклеофильными свойствами. Название получили от латинского слова *verde* – зеленый, потому что изначально большинство соединений имело зеленый окрас, однако, затем были синтезированы радикалы различного цвета.

Вердазильные радикалы представляют собой гетероциклические соединения с четырьмя атомами азота в шестичленном цикле (Рис. 1), где R' и R'' являются простыми или замещенными арилами, а R и R''' могут быть либо алкилом, либо также арилом:

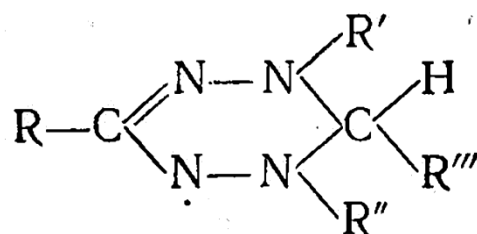


Рисунок 1 – Структурная формула вердазильных радикалов

Вердазилам характерна поразительная устойчивость, простота и легкость изучения их превращений спектрофотометрическим методом и растворимость во многих органических растворителях.

Вердази́лы уже заняли достойное место среди стабильных радикалов и продолжают находить новые применения при решении многих научно-технических и практических задач.

1.2 Токсикологические испытания

В РФ и ЕАЭС (евразийском экономическом союзе) предъявляются обязательные требования безопасности к веществам, контактирующим с человеком. Одним из таких требований является индекс токсичности (общетоксическое действие).

Токсикологические испытания могут проводиться *in vivo* и *ex vivo* или *in vitro*.

1.2.1 Исследования *in vivo*

Исследования *in vivo* предполагают использование живой ткани при живом организме. То есть, методами исследования *in vivo* являются тестирование на животных и клинические испытания на людях.

В качестве лабораторных животных используют морских свинок (альбиносов), кроликов (альбиносов или светло-серой масти), белых крыс.

Перед проведением исследований *in vivo* в тех случаях, когда это возможно, ОЭСР (организация экономического сотрудничества и развития) рекомендует использовать альтернативные испытания на тест-объектах *in vitro* или методы компьютерного моделирования. Часто методы *in vitro* используются для начального количественного определения воздействия вещества.

А в странах Европейского союза уже с 2003 года метод *in vivo* начали заменять на метод *in vitro*, с целью прекращения тестов на животных из этических соображений.

1.2.2 Исследования *ex vivo*

Ex vivo означает «вне живого тела». В экспериментах этого типа живые ткани создаются не искусственно, а непосредственно из живого организма. Затем эксперимент сразу же проводится в лабораторных условиях с минимальным изменением естественных условий организма.

Наиболее распространённая техника *ex vivo* использует живые клетки или ткани, извлечённые из живого организма и выращенные в стерильных лабораторных условиях в течение нескольких дней или недель. Такие клетки служат образцами поведения организма в целом, сокращая потребность в экспериментах над животными и человеком. Эксперименты *ex vivo*, как правило, проводятся *in vitro*, однако два эти термина не являются синонимами.

1.2.3 Исследования *in vitro*

Тестирование в условиях *in vitro* включено в перечень обязательных методов оценки потенциальной опасности химических веществ для здоровья человека и окружающей среды с целью последующей их регистрации, экспертизы и сертификации по правилам Европейского законодательства (REACH 1907/2006).

Исследования *in vitro* – исследования, при которых в качестве тест-систем используют не многоклеточные целостные организмы, а микроорганизмы или ткани, изолированные от целостного организма, или же их модели. Многие исследования *in vitro* согласно определению, приведенному в Принципах GLP, квалифицируют как краткосрочные.

In vitro переводится с латыни как «в стекле», ведь эксперименты *in vitro* исторически проводились в чашке Петри.

Одна из особенностей тестирования *in vitro* заключается в том, что определенная линия клеток (например, фибробласты) выделяется, отделяется и очищается от их обычного биологического окружения. Это позволяет проводить более подробный клеточный и молекулярный анализ по сравнению с использованием всего организма.

Эксперименты *in vitro* можно проводить на широком круге испытуемых, от бактерий до клеток, полученных из живых организмов. Все, что угодно, от модифицированных бактерий до реконструированных тканей, может быть создано, модифицировано и воспроизведено много раз специально для нужд эксперимента.

На первый взгляд, *in vitro* и *ex vivo* кажутся очень похожими, поскольку оба метода тестирования включают эксперименты с биологическим веществом, проводимые вне живого организма и в искусственной среде. Клетки и ткани для экспериментов *ex vivo* берут из живого организма, будь то донорский или собранный (например, волосяные фолликулы, кожные эксплантаты). Между тем, для тестов *in vitro* клетки

получают из репозитория и культивируют для создания необходимой модели (например, реконструированного эпидермиса человека).

Тем не менее, самое важное различие между двумя методами заключается в их сложности и быстродействии.

Например, модели *ex vivo*:

- с одной стороны, намного сложнее с точки зрения клеточного разнообразия и, следовательно, ближе к условиям *in vivo*;
- с другой стороны, менее реактивны с точки зрения биологической реакции на лечение или стресс.

Между тем, модели *in vitro*:

- по сути, упрощенные версии моделей *ex vivo* с точки зрения биологической сложности;
- но более реактивны с точки зрения биологической реакции.

Эксперименты *in vitro*, в тех случаях, когда альтернативой являются исследования на животных или человеке, считаются менее достоверными, чем *in vivo*, и часто бывают лишь необходимой предварительной стадией для оценки возможности и необходимости последующих исследований *in vivo*. Однако они часто удешевляют предварительные стадии исследования и позволяют сохранить жизнь подопытных животных.

1.2.3.1 Клеточные культуры

Клеточные культуры – это метод длительного сохранения в живом состоянии клеток, тканей или небольших органов, выделенных из организма человека, животных или растений.

Клеточные линии - клетки, которые подверглись генетическому изменению для иммортализации и в результате способны размножаться в течение длительного периода *in vitro*, а также могут распространяться и подвергаться криоконсервации в качестве депозитов банка клеток. Непрерывная клеточная линия, как правило, более однородна, более

стабильна и, следовательно, более репродуктивна, чем неоднородная популяция первичных клеток.

Впервые получить культуру ткани удалось в 1907 [16]. Американский учёный Р. Гаррисон поместил в каплю лимфы кусочек зачатка нервной системы зародыша лягушки, жизнеспособность клеток зачатка поддерживалась несколько недель, и из них выросли нервные волокна.

Существенный сдвиг в развитии метода клеточных культур произошёл в связи с установлением возможности культивирования клеточной взвеси, получаемой из любой ткани под воздействием протеолитического фермента трипсина, растворяющего межклеточное вещество. Для таких клеточных культур используется синтетическая жидкая питательная среда, содержащая физиологический раствор, 12 аминокислот, витамины, глюкозу и, как правило, сыворотку крови (2—10%); обязательно добавление к этой среде антибиотиков — пенициллина и стрептомицина.

Для культивирования тканей в зависимости от конкретных задач используются разнообразные сосуды: стекла с углублением (для культивирования в висячей капле), флаконы, пробирки, матрасы, большие сосуды типа ферментеров.

В зависимости от степени приспособления к условиям существования вне организма клеточные культуры делят [17] на 3 категории:

1) первичные культуры, которые могут быть получены практически из любого органа, однако даже при систематической смене питательной среды сохраняются лишь 20—30 дней, а затем гибнут;

2) диплоидные штаммы, получаемые в особых условиях из эмбриональных тканей человека и животных, их характерная черта — стабильность биологических свойств, в частности постоянство диплоидного набора хромосом, данные клетки сохраняются без изменения в течение 10—12 месяцев (до 50 смен питательной среды);

3) перевиваемые (стабильные) линии, полностью адаптированные к существованию вне организма, получают их из нормальных и раковых тканей, и размножаются они неограниченно долгое время.

Главное условие успешного культивирования клеток – строгое соблюдение стерильности.

Клеточные культуры — прекрасный объект для изучения действия на клетку физических, химических и биологических факторов. Использование культур клеток в качестве биологических моделей имеет ряд преимуществ перед классическими методами испытаний на млекопитающих. Данная модель *in vitro* позволяет проводить исследования с меньшими временными и денежными затратами. Кроме того, с ее помощью, получается полностью обходить этические проблемы, связанные с массовым использованием и гибелью экспериментальных животных. Еще одно преимущество используемых в исследовании моделей *in vitro* заключается в возможности работы непосредственно на культурах клеток человека, что делает полученные данные более адекватными при их проекции на организм человека.

В данной работе использовался ряд распространенных культур раковых и здоровых клеток.

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Технические характеристики оборудования

Ламинарный бокс LamSystems, Neoteric

Ламинарный шкаф LamSystems представляет собой бокс биологической безопасности второго класса типа А. Данный бокс защищает как исследуемые материалы от внешних воздействий, так и оператора от опасных веществ. Осуществляется это за счет фронтального окна и системы фильтрации воздуха, поступающего, рециркулирующего и выходящего из камеры. Помимо этого, по завершении работы внутренне пространство бокса обеззараживается УФ светом.

Термостатируемый CO-2 инкубатор ThermoScientific 8000 WJ

Инкубатор позволяет поддерживать на заданном уровне все необходимые параметры культивирования: температуру, относительную влажность и чистоту воздуха, а также концентрацию CO₂.

Центрифуга LMC-4200R BioSan

Лабораторная центрифуга предназначенная для работы с пробирками объемом 10 – 50 мл и микропланшетами. В рамках одной сессии поддерживает постоянную температуру в камере, что важно при работе с клеточными культурами.

Вортекс V-1 plus BioSan

Вортекс V-1 plus предназначен для перемешивания растворов и суспензий клеток в пробирках типа эппендорф и пробирках объемом до 50 см³.

Микроскоп флуоресцентный инвертированный Zeiss AxioVert.A1

Это световой микроскоп, ход лучей которого изменен относительно прямых световых микроскопов для исследования объекта в специализированной посуде. Данная модель микроскопа имеет выбор источника флуоресценции: светодиод (LED), ртутная лампа (HBO), металл-

галоидная лампа. Светодиодное освещение является щадящим и не содержит ультрафиолетового компонента, поэтому образцы клеточных культур не подвергаются негативному воздействию. Для изучения клеточных культур в микроскопе использованы следующие методы контрастирования: светлое и темное поля, фазовый контраст, DIC, PlasDIC для пластиковой посуды, контраст Хоффмана и флуоресценция.

Термошейкер TS-100 BioSan

Модель TS-100 является термошейкером для микропробирок и планшетов культуральных. Может быть использован в качестве шейкера, термостата или термостатирующего шейкера.

Фотометр микропланшетный Multiskan FC, ThermoFisher

Multiskan FC – это спектрофотометр с функцией загрузки планшетов для выполнения колориметрических тестов на клеточных культурах. Планшет с пробами располагается в пазу кронштейна, и кронштейн движется по координатам X-Y, движение задается программой.

Источник питания MATRIX MPS-3010L-1

MATRIX MPS-3010L-1 – регулируемый лабораторный источник питания постоянного тока. Он надежно защищен от короткого замыкания и перегрузки по току, что важно при выполнении лабораторных испытаний.

Помимо оборудования во время проведения анализа также использовались дозаторы лабораторные механические одноканальные переменного объема; флаконы культуральные 75 см²; планшеты культуральные 96-луночные; пластиковые пробирки; камера Горяева, а также светодиоды с длиной волны 395–410 нм и интенсивностью излучения 10 мВт/см².

2.2 Сырье и материалы

В ходе работы исследований были использованы следующие материалы, приведенные в таблице 1:

Таблица 1 – Характеристика используемых веществ

Название веществ	Квалификация	Внешний вид	Брутто формула	Мг, г/моль	ρ , г/см ³	T _{пл} , °C	T _{кип} , °C
1	2	3	4	5	6	7	8
Диметил-сульфоксид (ДМСО)	Ос.ч.	Бесцветная прозрачная жидкость	C ₂ H ₆ OS	78	1,10	19	189
Метиленовый синий	Ч.д.а.	Темно-зеленые кристаллы	C ₁₆ H ₁₈ Cl N ₃ S · 3H ₂ O	374	-	100	-
МТТ	Для биохимии	Желтый порошок/светло-желтый раствор	C ₁₈ H ₁₆ Br N ₅ S	414	-	200	-
Питательная среда DMEM	Ч.д.а.	Прозрачная жидкость красновато-оранжевого цвета без опалесценции и осадка	-	-	-	-	-
Раствор PBS	Ч.	Бесцветная прозрачная жидкость	-	-	-	-	-
Раствор трипсин-ЭДТА 0,25%	Ч.	Бесцветная прозрачная жидкость	-	-	-	-	-
Резазурина натриевая соль	Ч.	Порошок темно-синего цвета	C ₁₂ H ₇ NO ₄	251	-	-	-
Этиловый спирт	Х.ч.	Бесцветная жидкость	C ₂ H ₅ OH	46	0,789	-114	78

2.3 Объекты исследования

2.3.1 Алкилвердазилы

Молекула оксовердазильного радикала (соединение 4 на рисунке 2) была получена научной группой, в состав которой входили ученые Томского политехнического университета. Свойства, которыми обладает данная молекула, делают ее перспективным органическим магнитным материалом [7].

Однако, помимо этого, за счет распада на два радикала под действием коротковолнового излучения, производные данной молекулы могут быть перспективными для применения в качестве агентов в фотодинамической терапии.

Рассмотрим последовательность превращений для получения производных алкилвердазилов, представленную на рисунках 2 и 3.

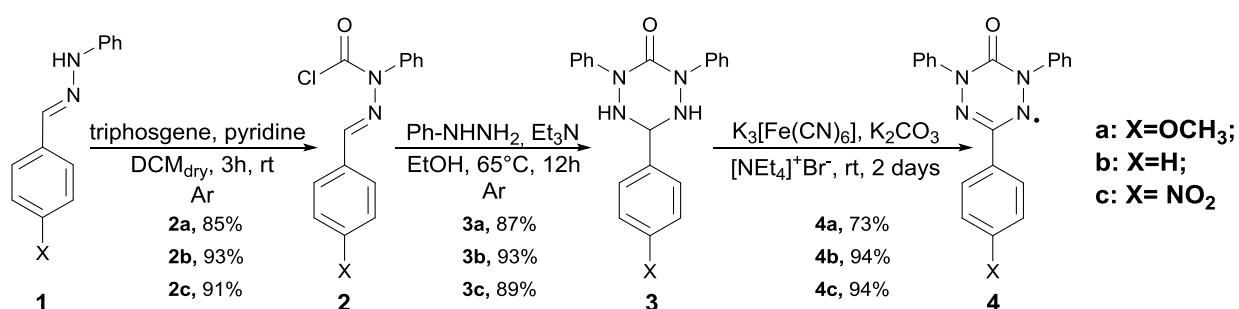


Рисунок 2 – Цепь превращений гидразонов в оксовердазильные радикалы

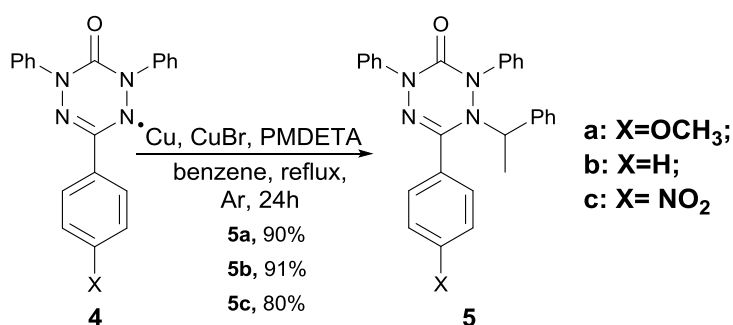


Рисунок 3 – Реакция превращения оксовердазильных радикалов в алкилвердазилы

Синтез алкилвердазилов начинается с гидразонов (соединение №1). Они реагируют с трифосгеном, давая хлоркарбамоилы (соединение №2). Далее при участии фенилгидразина проводится процесс циклизации до

тетразинан-3-онов (соединение №3). Затем проводится окисление гексацианоферратом (III) калия до вердазильных радикалов (соединение №4). Последняя стадия (Рис. 3) заключается в радикальном присоединении с переносом атомов в присутствии каталитической системы Cu-CuBr-PMDETA. Можно отметить, что выход каждой реакции практически 90%.

В результате превращений получают алкилвердазилы, которые под действием УФ-излучения распадаются на активный радикал (соединение №6 на рис. 4) и снова вердазильный радикал.

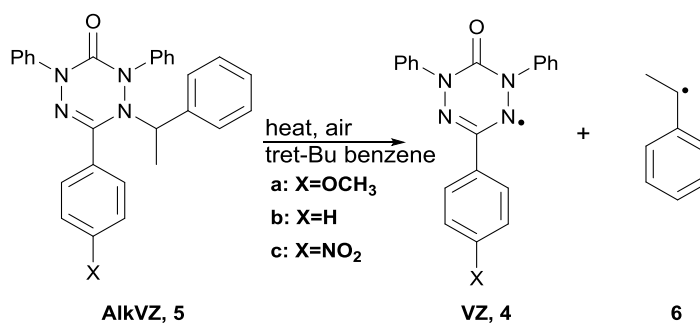


Рисунок 4 – Гомолиз алкилвердазилов

Позже была перенесена нитро группа из вердазильной части в активную (Рис. 5), что позволило сдвинуть длину волны активирующего излучения ближе к видимой области спектра. Видимое излучение безопаснее для клеток, чем УФ-излучение.

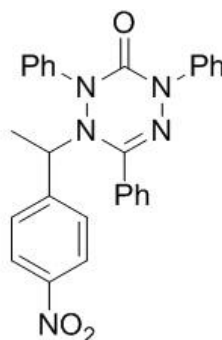


Рисунок 5 – Структура производного алкилвердазила (1- (1- (4-нитрофенил) этил) -2,4,6-трифенил-1,4-дигидро-1,2,4,5-тетразин-3 (2H) -он)

Помимо этого была получена молекула, в которой радикал X был изменен на группу сложного эфира (Рис. 6). Сделано это было с целью увеличения водорастворимости алкилвердазила.

Водорастворимое производное алкилвердазила было получено в виде индивидуальных частиц, а также в виде микрокапсул методом эмульгирования с использованием поливинилового спирта и полимолочной кислоты.

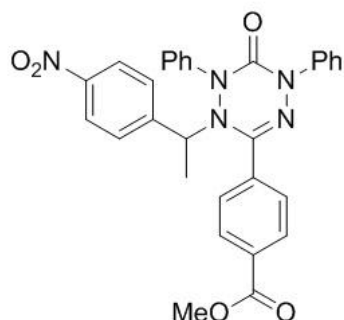


Рисунок 6 – Структура водорастворимого производного алкилвердазила (метил 4- (2- (1- (4-нитрофенил) этил) -6-оксо-1,5-дифенил-1,2,5,6-тетрагидро-1,2,4,5-тетразин-3-ил)бензоат)

Для оценки их потенциала применения в качестве фотодинамического агента были необходимы токсикологические испытания.

2.3.2 Клеточная культура 3Т3-L1

Клеточная культура 3Т3-L1 (Рис. 7) – это линия эмбриональных фибробластов мыши, полученных из Всероссийской коллекции микроорганизмов. Зачастую фибробласты используют из-за их «неприхотливости» к ростовым компонентам питательной среды, к тому же данные клетки не меняют свою форму, размер и функцию в ходе роста.



Рисунок 7 – Растущая культура 3Т3-L1 под микроскопом [18]

2.3.3 Опухолевые клеточные культуры MCF-7, MDA MB 231

Клеточные культуры MCF-7 и MDA MB 231 (Рис. 8, 9) получают из инвазивной аденокарциномы протоков молочной железы человека. Данные линии являются одними из наиболее распространенных линий клеток для исследований *in vitro* цитотоксичности противоопухолевых препаратов.

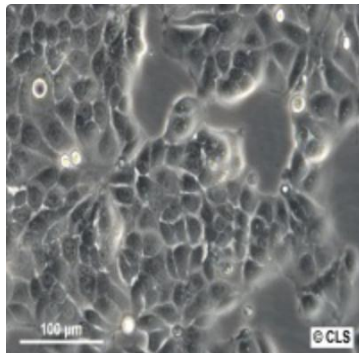


Рисунок 8 – Растущая культура MCF-7 под микроскопом [18]

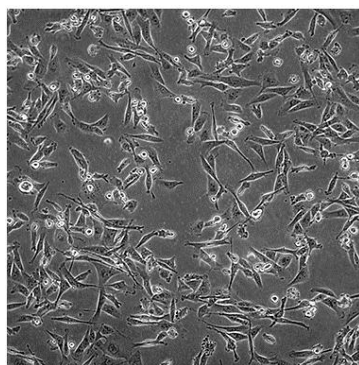


Рисунок 9 – Растущая культура MDA MB 231 под микроскопом [18]

Данные клеточные культуры являются линиями адгезивных клеток, зависящих от закрепления, т.е. им требуется стабильная поддержка для роста.

2.4 Методы исследования

2.4.1 Культивирование клеток

Перед каждым этапом работы ламинарно-поточковый шкаф подготавливается к работе, а после выполнения всех процедур – к выключению, выполняются необходимые асептические процедуры [19].

Этапы культивирования:

1. Подготовка клеточной линии к инкубированию:

- i. Из криохранилища достается криопробирка с клеточной культурой;

- ii. Содержимое оттаявшей криопробирки переносится в центрифужную пробирку. Добавляется 1-2 см³ полной питательной среды DMEM;
- iii. Проводится отцентрифугирование в течение 3 мин при 600 об/мин. Сливаются надосадочная жидкость;
- iv. Мутный осадок клеток ресуспендируется в 1 см³ полной питательной среды и переносится в культуральный флакон;
- v. Подписывается название культуры и дата посева;
- vi. Культуральный флакон помещается в CO₂-инкубатор (5% CO₂, влажная атмосфера).

2. Снятие клеток с поверхности культурального флакона:

- i. Флакон достается из CO₂-инкубатора через 48 ч. Удаляется питательная среда;
- ii. Клетки промываются раствором PBS объемом 3-4 см³;
- iii. Во флакон заливается раствор трипсин-ЭДТА 0,25% объемом 3 см³;
- iv. Флакон помещается в CO₂-инкубатор на 3-5 мин;
- v. С помощью микроскопа проверяется, открепилась ли клетки;
- vi. Добавляется 8 см³ питательной среды DMEM;
- vii. 10 см³ суспензии переносятся в центрифужную пробирку, центрифугирование проводится в течение 3 мин при 600 об/мин;
- viii. Удаляется надосадочную жидкость;
- ix. Осадок ресуспендируется в 2 см³ полной питательной среды;
- x. Количество клеток подсчитывается с помощью камеры Горяева.

3. Подсчет количества клеток с помощью камеры Горяева:

- i. Предварительно тщательно промывается и просушивается камера и покровное стекло, чтобы в проходящем свете на их поверхности ничего не было заметно;
- ii. Проводится окрашивание клеток 1% спиртовым раствором метиленового синего в пропорции 1:1;
- iii. Притирается покровное стекло и наносится дозатором небольшое количество суспензии с культурой клеток;

- iv. Подсчитывается количество клеток в 10 больших квадратах;
- v. Количество клеток в 1 см³ раствора (x) вычисляется по формуле:

$$x = \frac{a}{10} \cdot N \cdot k \cdot b = \frac{a \cdot 225 \cdot 1111}{10} \cdot b, \quad (1)$$

где a – число клеток в 10 квадратах;

N – число больших квадратов в камере Горяева, в ней 225 больших квадратов;

k – коэффициент, равный величине, обратной объему камеры Горяева;

b – разведение исходной суспензии клеток.

4. Посев клеток в 96-луночный планшет:

- i. Готовится суспензия клеток – 300 тыс. клеток в 10 см³ полной питательной среды DMEM;
- ii. Посев клеток в 96-луночный планшет производится в количестве 0,1 см³ клеточной суспензии на лунку (3 тыс. клеток в каждой лунке);
- iii. Планшет помещается в CO₂-инкубатор на 24 ч.

5. Внесение соединений в 96-луночный планшет:

- i. Готовится суспензия исследуемых соединений в ДМСО с концентрацией 500 мкг/см³;
- ii. Различные концентрации тестируемых соединений вносятся методом раститровки (например, 250; 125; 62,5; 31,3; 15,6; 7,8; 3,9 мкг/см³). Каждая концентрация выполняется в нескольких параллелях. Конечный объем среды в лунке составляет 0,1 см³;
- iii. Планшет с внесенными соединениями помещается в CO₂-инкубатор на 23-25 ч.

2.4.2 Активация алкилвердазилов

Активация алкилвердазилов осуществлялась посредством облучения светом с длиной волны 405 нм, близкой к нижней границе видимого излучения [20], следующим образом:

1. Была собрана светодиодная матрица 128×86 мм, длина волны излучения – 405 нм, интенсивность излучения 10 мВт/см²;

2. Планшет, засеянный клетками, помещался под матрицу на расстоянии 2,5 см в присутствии постоянного воздушного охлаждения;
3. Облучение светом происходило в течение необходимого времени: 10, 20 и 40 минут;
4. Затем планшет помещался в CO₂-инкубатор на 23-25 ч.

2.4.3 Колориметрические тесты

Уже разработано немало маркеров [21] для оценки степени повреждения клеток в культуре, однако нарушение даже одной клеточной функции неминуемо влечет за собой отрицательное воздействие на общую жизнеспособность монослоя через определенное время. Это существенно облегчает задачу исследователей, так как они могут использовать ограниченный набор клеточных культур и немногие простые показатели жизнеспособности клеток. Одним из таких показателей является снижение суммарной активности митохондриальных дегидрогеназ в микротетразолиевом тесте (МТТ – фотометрический метод).

2.4.3.1 МТТ-тест

В основе метода МТТ лежит способность живых клеток с помощью класса ферментов, называемых «оксидоректуразами», в особенности дегидрогеназы и редуктазы [22], восстанавливать желтый 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид (МТТ) в пурпурно-синие внутриклеточные кристаллы МТТ-формаза (Рисунок 10), растворимые в ДМСО.

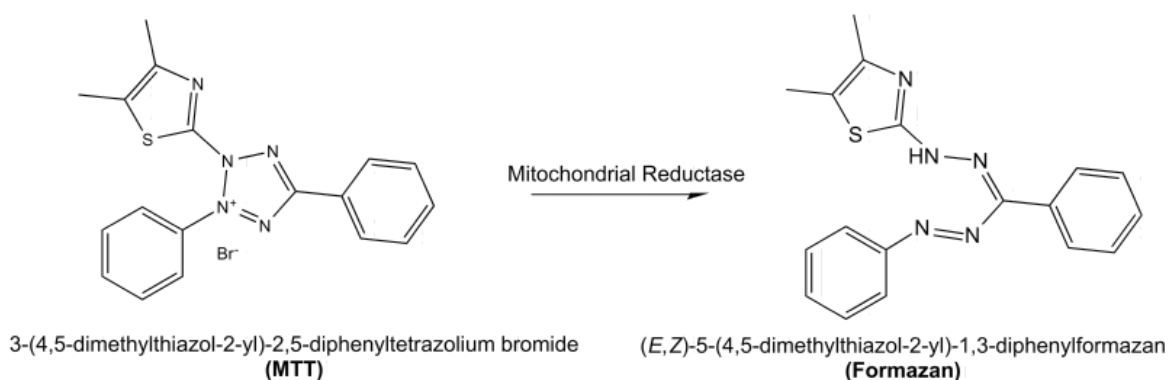


Рисунок 10 – Реакция восстановления МТТ в формазаан

Раствор диметилсульфоксида $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$ (ДМСО) добавляют для растворения формазаана, окрашивая тем самым растворитель. Поглощение этого окрашенного раствора может быть количественно определено путем измерения при определенной длине волны (обычно от 500 до 600 нм) с помощью спектрофотометра. Степень поглощения света зависит от степени концентрации формазаана, накопленной внутри клетки и на ее поверхности. Чем выше концентрация формазаана, тем более глубокий пурпурный цвет и, следовательно, выше поглощение.

Уменьшение оптической плотности опытных проб по сравнению с контрольными, регистрируемое на планшетном ридере, должно быть статистически значимым для заключения о токсическом действии вещества на клетки.

МТТ-тест проводится следующим образом:

1. Удаляется среда из всех лунок;
2. В каждую лунку вносится по $0,1 \text{ см}^3$ рабочего раствора МТТ;
3. Проводится инкубирование в течение 4 часов в условиях CO_2 -инкубатора;
4. Удаляется раствор и заливается раствор ДМСО для растворения образовавшихся кристаллов формазаана;
5. Планшет аккуратно встряхивается до растворения кристаллов формазаана;
6. Оптическую плотность каждой лунки определяется с помощью фотометра микропланшетного Multiskan FC при 540, 570 и 620 нм;
7. Жизнеспособность клеток при данных условиях определяется по формуле:

$$\text{Ж} = \frac{\sum_{i=1}^n (A_i - A_{\text{бланк}_{\text{ср}}}) \cdot m}{n \cdot \sum_{k=1}^m (A_{\text{контроль}_k} - A_{\text{бланк}_{\text{ср}}})} \cdot 100\%, \quad (2)$$

где Ж – жизнеспособность клеток при данных условиях, %;

A_i – оптическая плотность i -той лунки при длине волны, при которой наблюдается наибольшая оптическая плотность,

n – количество лунок с одинаковыми условиями;

$A_{\text{контроль}_k}$ – оптическая плотность контрольной лунки k при длине волны, при которой наблюдается наибольшая оптическая плотность;

m – количество контрольных лунок;

$A_{\text{бланк}_{\text{ср}}}$ – среднее значение оптической плотности лунок без клеток, только со средой.

2.4.3.2 Аламаровый тест

В данном тесте вместо раствора МТТ вносится раствор резазурина. Резазурин (аламаровый синий) – синий краситель, который при окислении превращается в розовый флуоресцирующий резорурфин.

Аламаровый тест проводится следующим образом:

1. Удаляется среда из всех лунок;
2. В каждую лунку вносится по $0,1 \text{ см}^3$ рабочего раствора резазурина;
3. Проводится инкубирование в течение 4 часов в условиях CO_2 -инкубатора;
4. Оптическая плотность каждой лунки определяется с помощью фотометра микропланшетного Multiskan FC при 540, 570 и 620 нм;
5. Жизнеспособность клеток определяется по оптической плотности равной разности оптических плотностей при 570 и 620 нм:

$$\text{Ж} = \frac{\sum_{i=1}^n (A_i^{620} - A_i^{570}) \cdot m}{n \cdot \sum_{k=1}^m (A_{\text{контроль}_k}^{620} - A_{\text{контроль}_k}^{570})} \cdot 100\%, \quad (3)$$

где Ж – жизнеспособность клеток при данных условиях, %;

A_i^{620} – оптическая плотность i -той лунки при длине волны, равной 620 нм;

A_i^{570} – оптическая плотность i -той лунки при длине волны, равной 570 нм,

n – количество лунок с одинаковыми условиями;

$A_{\text{контроль}_k}^{620}$ – оптическая плотность контрольной лунки k при длине волны

620 нм;

$A_{\text{контроль}_k}^{570}$ – оптическая плотность контрольной лунки k при длине волны

570 нм;

m – количество контрольных лунок.

ГЛАВА 4. ФИНАНСОВЫЙ МЕНЕДЖЕМЕНТ, РЕСУРСОЭФФЕКТИВНОСТЬ И РЕСУРСОСБЕРЕЖЕНИЕ

В данной работе представлена оценка цитотоксичности стабильных активных радикалов, как перспективных агентов для фотодинамической терапии опухолей, с использованием культур клеток в качестве биологических моделей. Данная модель *in vitro* имеет ряд преимуществ перед классическими методами токсикологических испытаний на млекопитающих: меньшие временные и денежные затраты. Кроме того, с ее помощью, удается полностью обходить этические проблемы, связанные с массовым использованием и гибелью экспериментальных животных.

4.1 Предпроектный анализ

4.1.1 Потенциальные потребители результатов исследования

Данная работа нацелена на проведение исследований методом *in vitro* с использованием культур клеток в качестве биологических моделей для оценки цитотоксичности перспективных агентов в области онкологии.

Для анализа потребителей результатов исследования необходимо рассмотреть целевой рынок и провести его сегментирование. Сегментирование – это разделение покупателей на однородные группы, для каждой из которых может потребоваться определенный товар (услуга).

Потенциальными потребителями НИР в основном являются юридические лица. Карта сегментирования рынка по области применения и доли рынка сбыта продукции приведена на таблице 11.

Таблица 11 – Карта сегментирования рынка по области применения *in vitro* исследований

Область реализации исследований	Доля, %
Фармацевтическая отрасль	35
Парфюмерно-косметическая отрасль	35
Пищевая отрасль	20
Диагностическая медицина	10

Из приведенной карты сегментирования можно сделать вывод, что основными областями применения *in vitro* исследований являются фармацевтическая и парфюмерно-косметическая отрасли, в них же наблюдается наибольшее число альтернативных методов. Потенциальными потребителями выбраны фармацевтическая и парфюмерно-косметическая отрасли.

4.1.2 Анализ конкурентных технических решений

В РФ и ЕАЭС (евразийском экономическом союзе) предъявляются обязательные требования безопасности к веществам, контактирующим с человеком. Одним из таких требований является индекс токсичности (общетоксическое действие).

Токсикологические испытания могут проводиться *in vivo* и *ex vivo* или *in vitro*.

Исследования *in vivo* предполагают использование живой ткани при живом организме. То есть, методами исследования *in vivo* являются тестирование на животных и клинические испытания на людях. Недостатками метода являются высокая стоимость исследований, определенные условия содержания (диета, анализ крови и др.), постоянная антибиотикотерапия для поддержания жизни, затрудненное размножение и негативное отношение общества к экспериментам над животными. Преимуществом метода является получение достоверных и достаточных по объему результатов, которые могут быть с успехом экстраполированы в клинику, применение различных моделей заболеваний на животных, а также использование генетически модифицированных видов способствует установлению механизмов фармакологического действия, эффективных доз, динамики значений маркеров патологии при длительном курсовом применении и др.

Исследования *ex vivo* представляют собой, как правило, изолированные органы и ткани живых организмов. Результаты исследований

ex vivo также как и результаты *in vitro*, не могут являться основанием для начала клинических испытаний фармакологического вещества. Преимуществами исследований *ex vivo* являются широкая известность и то, что данные, полученные в результате исследований, как правило, характеризуются большей релевантностью клинике.

В таблице 12 приведена оценочная карта для сравнения конкурентных методов исследований. В таблице B_{ϕ} обозначено разрабатываемое решение, B_{k1} , B_{k2} – конкурентные методы исследований (аналоги): *in vivo* и *ex vivo*, соответственно.

Таблица 12 – Оценочная карта для сравнения конкурентных методов исследований

Критерии оценки	Вес критерия	Баллы			Конкурентоспособность		
		B_{ϕ}	B_{k1}	B_{k2}	K_{ϕ}	K_{k1}	K_{k2}
1	2	3	4	5	6	7	8
Технические критерии оценки ресурсоэффективности							
1. Надежность (достоверность) результатов	0,2	2	5	3	0,4	1	0,6
2. Трудоемкость исследований	0,2	5	1	3	1	0,2	0,6
3. Продолжительность исследований	0,2	5	1	4	1	0,2	0,8
4. Безопасность исследований	0,1	5	3	5	1	0,3	1
Экономические критерии оценки эффективности							
5. Затраты	0,3	5	1	4	1,5	0,3	1,2
Итого	1				4,9	2	4,2

Критерии для сравнения и оценки ресурсоэффективности и ресурсосбережения, приведенные в таблице 12, подбираются, исходя из выбранных объектов сравнения с учетом их технических и экономических особенностей проведения исследований.

Позиция исследований *in vitro* и конкурентов оценивается по каждому показателю экспертным путем по пятибалльной шкале, где 1 – наиболее

слабая позиция, а 5 – наиболее сильная. Веса показателей, определяемые экспертным путем, в сумме должны составлять 1.

Анализ конкурентных технических решений определяется по формуле:

$$K = \sum V_i \cdot B_i, \quad (4)$$

где K – конкурентоспособность научной разработки или конкурента;

V_i – вес показателя (в долях единицы);

B_i – балл i -го показателя.

Выводы:

1) по техническим критериям конкурент 1 уступает рассматриваемому методу, а конкурент 2 уступает незначительно;

2) по экономическим критериям конкурент 1 и конкурент 2 уступают рассматриваемому методу.

Исходя из расчётов, сделанных выше, можно сделать вывод, что исследования *in vitro* имеют высокий уровень конкурентоспособности.

4.1.3 SWOT-анализ

SWOT – (Strengths – сильные стороны, Weaknesses – слабые стороны, Opportunities – возможности и Threats – угрозы) – это комплексный анализ научно-исследовательского проекта [23]. SWOT-анализ применяют для исследования внешней и внутренней среды проекта.

Результаты первого этапа SWOT-анализа представлены в таблице 13.

Таблица 13 – Первый этап SWOT-анализа

	Сильные стороны научно-исследовательского проекта: С1. Низкая трудоемкость С2. Малые временные затраты С3. Малые денежные затраты С4. Безопасность для исследователя и окружающей среды С5. Этичность	Слабые стороны научно-исследовательского проекта: Сл1. Сложность экстраполяции данных на целый организм Сл.2 Процесс ненагляден
Возможности: В1. Сохранение жизни многим лабораторным животным на первых этапах исследований В2. Биологическая доступность различных объектов исследования		
Угрозы: У1. Несвоевременное финансовое обеспечение научного исследования со стороны государства У2. Контаминация питательной среды, культур клеток		

Второй этап SWOT-анализа состоит в выявлении соответствия сильных и слабых сторон научно-исследовательского проекта внешним условиям окружающей среды. Это соответствие или несоответствие должны помочь выявить степень необходимости проведения стратегических изменений.

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

Интерактивные матрицы проекта представлены в таблице 14.

Таблица 14 – Интерактивная матрица проекта

		Сильные стороны проекта					Слабые стороны проекта	
		C1	C2	C3	C4	C5	Сл1	Сл2
Возможности проекта	B1	0	-	-	+	+	+	+
	B2	+	-	+	+	0	-	+
Угрозы проекта	У1	-	+	+	-	-	+	0
	У2	+	+	+	+	-	-	+

Таким образом, в рамках третьего этапа может быть составлена итоговая матрица SWOT-анализа, представленная в таблице 15.

Таблица 15 – Итоговая матрица SWOT-анализа

	Сильные стороны научно-исследовательского проекта:	Слабые стороны научно-исследовательского проекта:
	C1. Низкая трудоемкость	Сл1. Сложность экстраполяции данных на целый организм
	C2. Малые временные затраты	Сл.2 Процесс ненагляден
	C3. Малые денежные затраты	
	C4. Безопасность для исследователя и окружающей среды	
	C5. Этичность	
Возможности:		
B1. Сохранение жизни многим лабораторным животным на первых этапах исследований	C5. Исследования <i>in vitro</i> позволяют получить данные о биоактивности без массового убийства животных	Сл1. Переход к исследованиям <i>in vivo</i> только с самым лучшим кандидатом
B2. Биологическая доступность различных объектов исследования	C3. Приобретенные биообъекты способны размножаться и храниться в течение длительного периода	Сл2. Возможность создания 3D культур
Угрозы:		
У1. Несвоевременное финансовое обеспечение научного исследования со стороны государства	C2. Отсутствие финансирования увеличит продолжительность исследований	Сл1. Отсутствие возможности закупить достаточное разнообразие биообъектов
У2. Контаминация питательной среды, культур клеток	C1. Повтор эксперимента и/или наращивание биомассы культуры заново	Сл2. Искажение результатов эксперимента

4.2 Планирование научно-исследовательских работ

4.2.1 Структура работ в рамках научного исследования

Для выполнения научных исследований формируется рабочая группа, в чей состав входят: магистр, научный руководитель, консультант по части социальной ответственности (СО), консультант по экономической части (ЭЧ) и консультант по иностранному языку (ИЯ) выпускной квалификационной работы. Составим перечень этапов и работ в рамках проведения научного исследования и проведем распределение исполнителей по видам работ (таблица 16).

Таблица 16 – Перечень этапов, работ и распределение исполнителей

Основные этапы	№ раб	Содержание работ	Должность исполнителя
1	2	3	4
Разработка технического задания	1	Составление и утверждение технического задания	Научный руководитель, консультант ЭЧ, СО, ИЯ, магистр
Выбор направления исследований	2	Выбор направления исследований	Научный руководитель, магистр
	3	Подбор и изучение материалов по теме	Научный руководитель, магистр
	4	Патентный обзор литературы	Магистр
	5	Календарное планирование работ по теме	Научный руководитель, магистр
Теоретические исследования	6	Проведение теоретических расчетов и обоснований	Магистр
Обобщение и оценка результатов	7	Оценка эффективности полученных результатов	Научный руководитель, магистр
	8	Определение целесообразности проведения ВКР	Научный руководитель, магистр

Продолжение таблицы 16

Основные этапы	№ раб	Содержание работ	Должность исполнителя
1	2	3	4
Проведение ВКР			
Разработка технической документации и проектирование	9	Оценка цитотоксичности стабильных активных радикалов с использованием культур клеток в качестве биологических моделей	Магистр, научный руководитель
	10	Оценка эффективности производства и применения разработки	Магистр, консультант по ЭЧ
	11	Разработка социальной ответственности по теме	Магистр, консультант СО
	12	Разработка английской части ВКР	Магистр, консультант ИЯ
Оформление комплекта документации по ВКР	13	Составление пояснительной записки	Магистр

4.2.2 Определение трудоемкости выполнения работ

Трудоемкость выполнения научного исследования оценивается экспертным путем в человеко-днях и носит вероятностный характер, т.к. зависит от множества трудно учитываемых факторов. Для определения ожидаемого (среднего) значения трудоемкости $t_{ожi}$ используется формула (5):

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

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

$t_{\min i}$ – минимально возможная трудоемкость выполнения заданной i -ой работы, чел. – дн.;

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

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

$$T_{pi} = \frac{t_{ожi}}{Ч_i}, \quad (6)$$

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

$t_{ож i}$ – ожидаемая трудоемкость выполнения одной работы, чел. – дн.;

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

4.2.3 Разработка графика проведения научного исследования

При выполнении дипломных работ студенты становятся участниками сравнительно небольших по объему научных тем, поэтому наиболее удобным и наглядным является построение ленточного графика проведения научных работ в форме диаграммы Ганта.

Диаграмма Ганта – это горизонтальный ленточный график, на котором работы по теме представляются протяженными во времени отрезками, характеризующимися датами начала и окончания выполнения данных работ. Данный график строится на основе таблицы 17.

Для удобства построения графика, длительность каждого из этапов работ из рабочих дней следует перевести в календарные дни. Для этого необходимо воспользоваться формулой 7:

$$T_{ki} = T_{pi} \cdot k_{\text{кал}}, \quad (7)$$

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

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

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

Коэффициент календарности определяется по формуле 8:

$$k_{\text{кал}} = \frac{T_{\text{кал}}}{T_{\text{кал}} - T_{\text{вых}} - T_{\text{пр}}}, \quad (8)$$

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

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

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

Таким образом:

$$k_{\text{кал}} = \frac{T_{\text{кал}}}{T_{\text{кал}} - T_{\text{вых}} - T_{\text{пр}}} = \frac{142}{142 - 18 - 4} = 1,18.$$

Результаты расчетов занесены в таблицу 17.

Таблица 17 – Временные показатели проведения научного исследования

№	Название работ	Трудоемкость работ			Исполнители	T _р , раб. дн.	T _к , кал. дн.
		t _{min} , чел-дн.	t _{max} , чел-дн.	t _{ож} , чел-дн.			
1	Составление технического задания	0,3	1	0,6	Р	0,15	0,2
		0,3	1	0,6	М	0,15	0,2
		0,3	1	0,6	К ¹	0,15	0,2
		0,3	1	0,6	К ²	0,15	0,2
2	Выбор направления исследований	0,5	2	1	Р	0,5	0,6
		0,5	2	1	М	0,5	0,6
3	Подбор и изучение материалов	6	12	8,4	Р	4,2	5
		6	12	8,4	М	4,2	5
4	Литературный обзор	7	10	8,2	М	8,2	9,7
5	Календарное планирование работ по теме	1	2	1,4	Р	0,7	0,8
		1	2	1,4	М	0,7	0,8
6	Проведение теоретических расчетов и обоснований	2	3	2,4	М	2,4	2,8
7	Оценка эффективности результатов	2	3	2,4	Р	1,2	1,4
		5	7	5,8	М	2,9	3,4
8	Определение целесообразности проведения ВКР	6	7	6,4	Р	3,2	3,8
		6	7	6,4	М	3,2	3,8
9	Оценка цитотоксичности стабильных активных радикалов с использованием культур клеток в качестве биологических моделей	5	10	7	М	7	8,3
10	Оценка эффективности производства	7	10	7,6	М	4,1	4,8
		7	10	7,6	К ¹	4,1	4,8

Продолжение таблицы 17

№	Название работ	Трудоемкость работ			Исполнители	T _р , раб. дн.	T _к , кал. дн.
		t _{min} , чел-дн.	t _{max} , чел-дн.	t _{ож} , чел-дн.			
11	Разработка СО	7	10	8,2	М	4,1	4,8
		7	10	8,2	К ²	4,1	4,8

12	Разработка ИЯ	7	10	8,2	М	4,1	4,8
		7	10	8,2	К ³	4,1	4,8
13	Составление пояснительной записки	10	15	12	М	12	14,2

Р – руководитель;

М – магистр;

К¹ – консультант по экономической части;

К² – консультант по социальной ответственности;

К³ – консультант по иностранному языку.

На основании таблицы был построен календарный план-график. График строится для максимального по длительности исполнения работ в рамках научного исследования. План-график приведен в таблице 18.

Таблица 18 – Календарный план-график проведения НИОКР

Вид работы	Исполнители	T_{ki} , дней	Продолжительность выполнения работ														
			февраль		март			апрель			май						
			2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3				
Составление технического задания	Руководитель, Магистр, консультант ЭЧ, СО, ИЯ	0,2	■														
Выбор направления исследований	Руководитель, Магистр	0,6	■	■													
Подбор и изучение материалов	Руководитель, Магистр	5		■	■												
Патентный обзор литературы	Магистр	9,7			■	■	■										
Календарное планирование работ	Руководитель, Магистр	0,8				■	■										
Проведение теоретических расчетов и обоснований	Магистр	2,8					■	■									
Оценка эффективности полученных результатов	Руководитель, Магистр	1,4 3,4						■	■								
Определение целесообразности проведения ВКР	Руководитель, Магистр	3,8							■	■							
Оценка цитотоксичности	Магистр	8,3								■	■	■					
Оценка эффективности производства и применения разработки	Магистр, консультант ЭЧ	4,8											■	■			
Разработка социальной ответственности	Магистр, консультант СО	4,8												■	■		
Разработка главы на иностранном языке	Магистр, консультант ИЯ	4,8													■	■	
Составление пояснительной записки	Магистр	14														■	■

■ - Руководитель, ■ - Магистр, ■ - консультант ЭЧ, ■ - консультант СО, ■ - консультант ИЯ

4.2.4 Бюджет научно-технического исследования (НТИ)

В процессе формирования бюджета НТИ используется следующая группировка затрат по статьям:

- материальные затраты НТИ;
- затраты на оборудование;
- основная заработная плата исполнителей темы;
- дополнительная заработная плата исполнителей темы;
- отчисления во внебюджетные фонды (страховые отчисления);
- накладные расходы.

Материальные затраты НТИ включают стоимость всех материалов, используемых при разработке проекта, в частности, сырье и материалы, покупные комплектующие изделия и полуфабрикаты, используемые в качестве объектов исследований (испытаний) и для эксплуатации, технического обслуживания и ремонта изделий – объектов испытаний (исследований) [24]. Материальные затраты и затраты на оборудование для данного НТИ представлены в таблицах 19-20.

В данную статью включены все затраты, связанные с приобретением специального оборудования (приборов, контрольно-измерительной аппаратуры, устройств и механизмов), необходимого для проведения работ по данной теме. Определение стоимости спецоборудования производили по действующим прейскурантам с учетом НДС. При приобретении спецоборудования учтены затраты по его доставке и монтажу в размере 15 % от его цены. Все расчеты по приобретению спецоборудования и оборудования, используемого для каждого исполнения темы, сводятся в таблице 23.

Таблица 19 – Материальные затраты

	Ед. измер	Количество	Цена за ед. руб.	Сумма, руб.
Клеточная линия ЗТ3-L1	шт. (криопробирка)	1	124550,00	124550,00
Клеточная линия MCF-7	шт. (криопробирка)	1	70560,00	70560,00
Клеточная линия MDA MB 231	шт. (криопробирка)	1	70560,00	70560,00
Диметил-сульфоксид (ДМСО)	л	0,2	2475,00	495,00
Метиленовый синий	кг	0,001	8854,00	88,54
МТТ	г	5	1540,00	7700,00
Питательная среда DMEM	л	3	3000,00	9000,00
Раствор PBS	л	0,2	3640,00	728,00
Раствор трипсин-ЭДТА 0,25%	л	0,1	2800,00	280,00
Резазурина натриевая соль	шт. (комплект)	1	31000	31000
Этиловый спирт	л	5	155,00	775,00
96-луночный планшет	шт.	50	200,00	10000,00
Флаконы стерильные	уп.	1	650,00	650,00
Наконечники	уп.	10	550,00	5500,00
Пробирки	уп.	2	700,00	1400,00
Сумма				303066,54

Таблица 20 – Затраты на оборудование для научно-экспериментальных работ

№, п/п	Наименование оборудования	Количество единиц оборудования, шт	Цена единицы оборудования, руб.
1	Вортекс	1	15500,00
2	Источник питания	1	23000,00
3	Ламинарный бокс	1	836000,00
4	Микроскоп	1	550000,00
5	СО-2 инкубатор	1	700000,00
6	Термошейкер	1	110000,00
7	Фотометр	1	700000,00
8	Центрифуга	1	200000,00
Итого			3134500,00

Для оборудования нужно рассчитать величину годовой амортизации по следующей формуле:

$$A = \frac{C_n \cdot H_a \cdot n}{100 \cdot k}, \quad (9)$$

где C_n – первоначальная стоимость оборудования;

H_a – норма амортизации, %;

n – количество дней использования оборудования;

k – количество рабочих дней в году (2021 год – 247 раб. дней).

Результаты расчетов приведены в таблице 21.

Таблица 21 – Расчет затрат по статье «Амортизация оборудования»

Наименование оборудования	C_n , руб	H_a , %	n , дн	A , руб
Вортекс	23000,00	10	10	62,75
Источник питания	836000,00		7	65,18
Ламинарный бокс	550000,00		50	16923,08
Микроскоп	700000,00		20	4453,44
СО-2 инкубатор	110000,00		60	17004,05
Термошейкер	700000,00		15	668,02
Фотометр	200000,00		20	5668,02
Центрифуга	15500,00		20	1619,43
Итого				46463,97

Статья заработной платы исполнителей темы включает основную заработную плату работников, непосредственно занятых выполнением НИИ и дополнительную заработную плату:

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

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

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

Основная заработная плата ($Z_{\text{осн}}$) руководителя от предприятия рассчитывается по следующей формуле:

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

Среднедневная заработная плата рассчитывается по формуле:

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

где Z_m – месячный должностной оклад работника, руб.;

M – количество месяцев работы без отпуска в течение года:

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

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

F_d – действительный годовой фонд рабочего времени научно-технического персонала, раб. дн. (Табл. 22).

Таблица 22 – Баланс рабочего времени

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

Месячный должностной оклад работника:

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

где $Z_{\text{тс}}$ – заработная плата по тарифной ставке, руб.;

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

k_d – коэффициент доплат и надбавок составляет примерно 0,2 – 0,5;

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

Расчет основной заработной платы приведен в таблице 23.

Таблица 23 – Расчет основной заработной платы

Исполнители	З _{тс} , руб	k _{пр}	k _д	k _р	З _м , руб	З _{дн} , руб	T _р , раб.дн.	З _{осн} , руб
Научный руководитель	35120,00	0,3	0,3	1,3	73049,60	3406,80	9,95	33897,64
Магистр	12300,00	0	0	1,3	15990,00	673,26	49,45	33292,86
Консультант по ЭЧ	35120,00	0,3	0,3	1,3	73049,60	3406,80	4,25	14478,89
Консультант СО	35120,00	0,3	0,3	1,3	73049,60	3406,80	4,25	14478,89
Консультант ИЯ	35120,00	0,3	0,3	1,3	73049,60	3406,80	4,25	14478,89

Общая заработная плата исполнителей работы представлена в таблице 24.

Таблица 24 – Общая заработная плата исполнителей

Исполнитель	З _{осн} , руб.	З _{доп} (12 %), руб.	З _{зн} , руб.
Руководитель	33897,64	4067,716	37965,35
Магистр	33292,86	3995,144	37288,01
Консультант ЭЧ	14478,89	1737,467	16216,36
Консультант СО	14478,89	1737,467	16216,36
Консультант ИЯ	14478,89	1737,467	16216,36
Итого	110627,17	13275,26	123902,43

В статье расходов – отчисления во внебюджетные фонды (страховые отчисления) 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 этих отчислений определяется по следующей формуле:

$$Z_{\text{внеб}} = k_{\text{внеб}} \cdot (Z_{\text{осн}} + Z_{\text{доп}}), \quad (14)$$

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

Тарифы страховых взносов в 2022 году остались на прежнем уровне в соответствии с постановлением Правительства РФ от 26.11.2015 № 1265 [25], т. е. есть общий совокупный тариф все также составляет 30%, в том числе: 22

процента – в ПФ РФ; 2,9 процента – в ФСС России; 5,1 процента – в ФФОМС.

Отчисления во внебюджетные фонды представлены в таблице 25.

Таблица 25 – Отчисления во внебюджетные фонды

Исполнитель	Основная заработная плата, руб.	Дополнительная заработная плата, руб.
Руководитель проекта	33897,64	4067,72
Магистр	53268,58	6392,23
Консультант ЭЧ	14478,89	1737,47
Консультант СО	14478,89	1737,47
Консультант ИЯ	14478,89	1737,47
Коэффициент отчислений во внебюджетные фонды	0,3	
Итого	37170,73	

Накладные расходы учитывают прочие затраты организации, не попавшие в предыдущие статьи расходов: печать и ксерокопирование графических материалов, оплата услуг связи, электроэнергия, транспортные расходы и т.д. Их величина определяется по следующей формуле:

$$Z_{\text{накл}} = (\text{сумма статей } 1 \div 5) \cdot k_{\text{нр}}, \quad (15)$$

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

Величину коэффициента накладных расходов $k_{\text{нр}}$ допускается взять в размере 16%. 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.

Определение бюджета затрат на научно-исследовательский проект приведен в таблице 26.

Таблица 26 – Бюджет затрат на научно-исследовательский проект

Наименование статьи	Сумма, руб.	Примечание
1. Материальные затраты НИИ	303066,54	Табл. 19
2. Затраты на специальное оборудование для научных работ (амортизация)	46463,97	Табл. 21
3. Затраты по основной заработной плате исполнителей темы	110627,17	Табл. 24

Продолжение таблицы 26

Наименование статьи	Сумма, руб.	Примечание
4. Затраты по дополнительной заработной плате исполнителей темы	13275,26	Табл. 24
5. Отчисления во внебюджетные фонды	37170,73	Табл. 25
6. Затраты на научные и производственные командировки	-	-
7. Накладные расходы	81696,59	16 % от суммы ст.1-6
Итого: бюджет затрат НТИ	592300,26	Сумма ст. 1-7

Для наглядности данные из таблицы 26 представлены в виде круговой диаграммы:

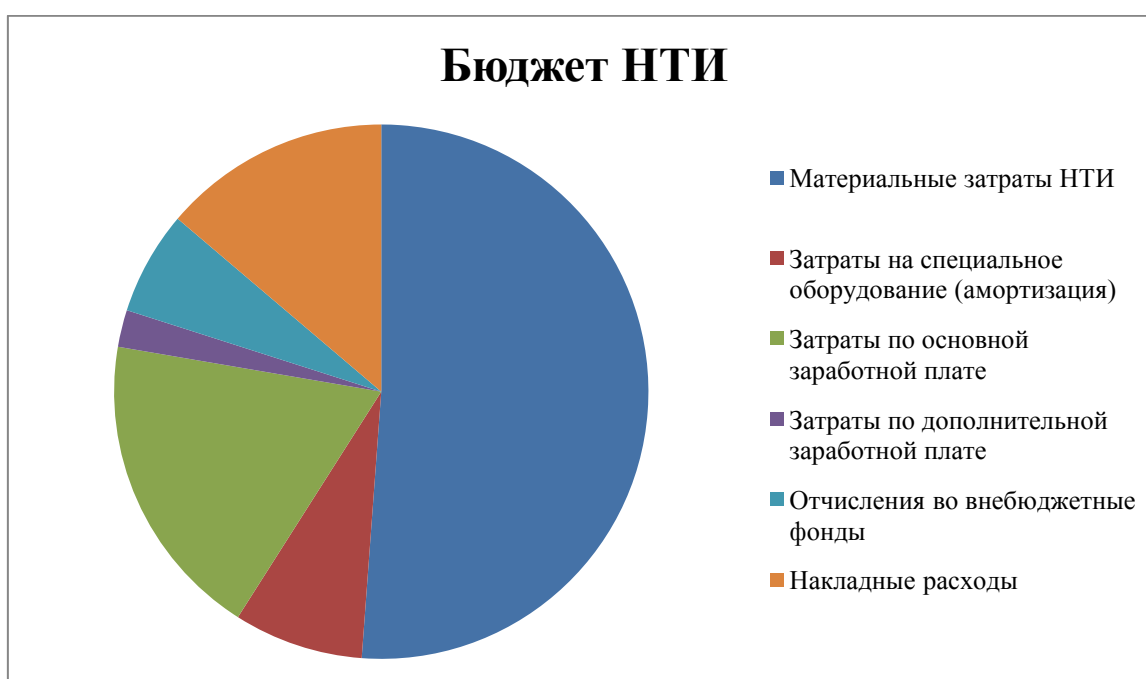


Рисунок 18 – Бюджет затрат на научно-исследовательский проект

Как видно из рисунка 18, основные затраты НТИ приходятся на материальные затраты для проведения НТИ.

4.3 Определение ресурсной, финансовой, бюджетной, социальной и экономической эффективности исследования

Определение эффективности происходит на основе расчета интегрального показателя эффективности научного исследования [26]. Его нахождение связано с определением двух средневзвешенных величин: финансовой эффективности и ресурсоэффективности.

Интегральный финансовый показатель разработки определяется как:

$$I_{финр}^{исп.i} = \frac{\Phi_{pi}}{\Phi_{max}}, \quad (16)$$

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

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

Φ_{max} – максимальная стоимость исполнения научно-исследовательского проекта.

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

Стоимость альтернативных вариантов исполнения не известна, поэтому примем стоимость нашего проекта за 1, тогда интегральный финансовый показатель альтернативных вариантов будет показывать, во сколько раз они дороже или выгоднее нашего варианта.

Интегральный показатель ресурсоэффективности вариантов исполнения объекта исследования можно определить следующим образом по формуле (17) (таблица 27):

$$I_{pi} = \sum a_i \cdot b_i, \quad (17)$$

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

a_i – весовой коэффициент i -го параметра;

b_i – бальная оценка i -го варианта разработки, устанавливается экспертным путем по выбранной шкале оценивания;

n – число параметров сравнения.

Таблица 27 – Сравнительная оценка характеристик вариантов исполнения проекта

Критерии	Весовой коэффициент параметра	Объект исследования		
		Исп.1	Исп.2	Исп.3
1. Надежность (достоверность) результатов	0,30	2	5	3
2. Трудоемкость исследований	0,30	5	1	3
3. Продолжительность исследований	0,25	5	1	4
4. Безопасность исследований	0,15	5	3	5
Итого	1	4,1	2,5	3,6

Исполнение 1 соответствует данному проекту – исследованиям *in vitro*, исполнение 2 – исследованиям *in vivo*, исполнение 3 – исследованиям *ex vivo*.

Интегральный показатель эффективности вариантов исполнения разработки ($I_{испi}$) определяется на основании интегрального показателя ресурсоэффективности и интегрального финансового показателя по формуле:

$$I_{исп.1} = \frac{I_{р-исп1}}{I_{финр}^{исп.1}}, \quad (18)$$

Сравнительная эффективность проекта (\mathcal{E}_{cp}):

$$\mathcal{E}_{cp} = \frac{I_{исп.1}}{I_{исп.2}}, \quad (19)$$

Таблица 28 – Сравнительная эффективность разработки

№ п/п	Показатели	Исп.1	Исп.2	Исп.3
1	Интегральный финансовый показатель разработки	1,0	3,0	1,2
2	Интегральный показатель ресурсоэффективности разработки	4,1	2,5	3,6

Продолжение таблицы 28

№ п/п	Показатели	Исп.1	Исп.2	Исп.3
3	Интегральный показатель эффективности	4,1	0,8	3,0
4	Сравнительная эффективность вариантов исполнения	1	5,1	1,4

Из полученной таблицы можно сделать вывод, что текущий проект имеет большую эффективность по сравнению с аналогами, но также имеет свои недостатки.

ГЛАВА 5. СОЦИАЛЬНАЯ ОТВЕТСТВЕННОСТЬ

Социальная ответственность - ответственность отдельного ученого и научного сообщества перед обществом. Первостепенное значение при этом имеет безопасность применения технологий, которые создаются на основе достижений науки, предотвращение или минимизация возможных негативных последствий их применения, обеспечение безопасного как для испытуемых, как и для окружающей среды проведения исследований.

Тема научно-исследовательской работы: «Оценка цитотоксичности стабильных активных радикалов, как перспективных агентов для фотодинамической терапии опухолей».

Объект исследования – стабильные активные радикалы и клеточные культуры 3T3-L1, MCF-7 и MDA MB 231.

Цель исследования: оценка цитотоксичности стабильных активных радикалов, как перспективных агентов для фотодинамической терапии опухолей, с использованием культур клеток в качестве биологических моделей.

Исследуемые стабильные активные радикалы в перспективе будут применяться в качестве агентов для фотодинамической терапии опухолей, для этого они должны обладать следующими свойствами:

- в неактивированном виде они не должны оказывать токсического действия на раковые и здоровые клетки человека;
- после активации они должны оказывать высокое токсическое действие на раковые клетки и низкое токсическое действие на здоровые клетки человека.

Экспериментальная часть проводилась в лаборатории клеточных исследований Томского политехнического университета (г. Томск, Томская область, Россия), которая является коллективным рабочим местом. Раздел также включает в себя оценку условий труда на рабочем месте, анализ вредных и опасных факторов труда, разработку мер защиты от них.

5.1 Производственная безопасность

5.1.1 Анализ выявленных вредных факторов

Все вредные и опасные факторы, воздействующие на работника лаборатории, можно классифицировать следующим образом [27] на факторы, порождаемые: физическими, химическими и биологическими свойствами материалов.

Перечень вредных и опасных факторов, возникающий при данных исследованиях в лаборатории, представлен в таблице 29.

Таблица 29 – Возможные вредные и опасные факторы, возникающие в лаборатории при оценке цитотоксичности стабильных активных радикалов

Факторы (ГОСТ 12.0.003-2015)	Нормативные документы
Недостаточная освещенность	СНиП 23-05-95. Естественное и искусственное освещение [28]
Отклонение показателей микроклимата в помещении	СанПиН 2.2.4.548–96. Гигиенические требования к микроклимату производствен. Помещений [29]
Превышение уровня шума	ГОСТ 12.1.003 – 83 Система стандартов безопасности труда (ССБТ). Шум. Общие требования безопасности [30]
Защита от токсикантов	ГН 2.2.5.3532–18. Предельно допустимые концентрации (ПДК) вредных веществ в воздухе рабочей зоны [31]
Поражение электрическим током	ГОСТ Р 12.1.019-2009 Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты [32]
Пожарная опасность	СНиП 2.01.02-85 Противопожарные нормы [33]

5.1.1.1 Недостаточная освещенность

В лаборатории клеточных исследований присутствуют участки, на которых проводятся работы с высоким зрительным напряжением: подготовка клеточной линии к инкубированию, подсчет количества клеток с помощью камеры Горяева, посев клеток и внесение соединений в 96-луночный планшет а также выполнение колориметрических тестов. При длительном выполнении данных работ в условиях недостаточной

освещенности, снижается зрительное восприятие лаборанта, возникают головные боли, даже развивается близорукость.

Нормы освещенности в помещениях для точных измерений и лабораториях химической промышленности, где происходит периодическое наблюдение за ходом производственного процесса при постоянном нахождении людей в помещении, согласно СНиП 23-05-95 [28] освещенность при системе общего освещения не должна быть ниже 300 Лк. При этом освещение должно быть комбинированным совмещенным. Это когда для общего освещения применяют и естественное, и искусственное освещения света, и вместе с этим используют местное освещение. Коэффициент пульсации не должен превышать 10 %.

Правильно спроектированное и выполненное освещение обеспечивает высокий уровень работоспособности, оказывает положительное психологическое действие на человека и способствует повышению производительности труда.

На рабочей поверхности должны отсутствовать резкие тени, которые создают неравномерное распределение поверхностей с различной яркостью в поле зрения, искажает размеры и формы объектов различия, в результате повышается утомляемость и снижается производительность труда.

Расчёт общего равномерного искусственного освещения горизонтальной рабочей поверхности выполняется методом коэффициента светового потока, учитывающим световой поток, отражённый от потолка и стен. Длина помещения $A = 5$ м, ширина $B = 3$ м, высота $H = 3,5$ м. Высота рабочей поверхности над полом $h_p = 1,0$ м. В соответствии с разрядом зрительной работы согласно СНиП 23-05-95 [28] необходимо создать освещенность от 300 до 500 лк.

Площадь помещения:

$$S = A \cdot B, \quad (20)$$

где A – длина, м;

B – ширина, м.

$$S = 5 \cdot 3 = 15 \text{ м}^2$$

Коэффициент отражения свежепобеленных стен с окнами, без штор $\rho_C = 50\%$, свежепобеленного потолка $\rho_{II} = 70\%$. Коэффициент запаса, учитывающий загрязнение светильника, для помещений с малым выделением пыли равен $K_3 = 1,5$. Коэффициент неравномерности для люминесцентных ламп $Z = 1,1$.

Выбираем лампу белой цветности ЛБ-40, световой поток которой равен $\Phi_{\text{лд}} = 2800$ Лм.

Выбираем светильники с люминесцентными лампами типа ОД – 2 – 40. Этот светильник имеет две лампы мощностью 40 Вт каждая, длина светильника равна 1230 мм, ширина – 266 мм.

Интегральным критерием оптимальности расположения светильников является величина λ , которая для люминесцентных светильников без защитной решётки равна 1,4; принимаем расстояние светильников от перекрытия (свес) $h_c = 0,5$ м.

Высота светильника над рабочей поверхностью определяется по формуле:

$$h = h_n - h_p, \quad (21)$$

где h_n – высота светильника над полом, высота подвеса,

h_p – высота рабочей поверхности над полом.

$$h_n = H - h_c. \quad (22)$$

Наименьшая допустимая высота подвеса над полом для двухламповых светильников ОД – 3,5 м.

Высота светильника над рабочей поверхностью определяется по формуле:

$$h = H - h_c - h_p = 3,5 - 0,5 - 1 = 2,0 \text{ м.}$$

Расстояние между рядами определяется по формуле:

$$L = \lambda \cdot h = 1,4 \cdot 2,0 = 2,8 \text{ м.} \quad (23)$$

Число рядов светильников в помещении:

$$N_b = B / L = 3 / 2,8 = 1,07 \approx 1. \quad (24)$$

Число светильников в ряду:

$$N_a = A / L = 5 / 2,8 = 1,8 \approx 2. \quad (25)$$

Общее число светильников:

$$N = N_a \cdot N_b = 1 \cdot 2 = 2. \quad (26)$$

Расстояние от светильников до стены определяется по формуле:

$$l = L / 3 = 2,8 / 3 = 0,93 \text{ м}. \quad (27)$$

Потребный световой поток группы люминесцентных ламп светильника определяется по формуле:

$$\Phi_{\Pi} = (E_{\text{н}} \cdot S \cdot K_3 \cdot Z) / (N \cdot \eta), \quad (28)$$

где $E_{\text{н}}$ – нормируемая минимальная освещённость по СНиП 23-05-95, лк;

S – площадь освещаемого помещения, м²;

K_3 – коэффициент запаса, учитывающий загрязнение светильника;

Z – коэффициент неравномерности люминесцентных ламп;

N – число люминесцентных ламп в помещении;

η – коэффициент использования светового потока.

η определяем через индекс помещения:

$$i = \frac{S}{\square \cdot (A+B)} = \frac{15}{2 \cdot (5+3)} = 0,94. \quad (29)$$

Коэффициент использования светового потока, показывающий какая часть светового потока ламп попадает на рабочую поверхность, для светильников типа ОД с люминесцентными лампами при $\rho_{\Pi} = 70 \%$, $\rho_{\text{С}} = 50\%$ и индексе помещения $i = 0,94$ равен $\eta = 0,48$.

Тогда $\Phi_{\Pi} = (E_{\text{н}} \cdot S \cdot K_3 \cdot Z) / (N \cdot \eta) = (300 \cdot 15 \cdot 1,5 \cdot 1,1) / (4 \cdot 0,48) = 3030,61 \text{ Лм}$.

Делаем проверку выполнения условия:

$$-10\% \leq \frac{\Phi_{\text{ЛД}} - \Phi_{\Pi}}{\Phi_{\text{ЛД}}} \cdot 100\% \leq 20\%;$$

$$\frac{\Phi_{\text{ЛД}} - \Phi_{\Pi}}{\Phi_{\text{ЛД}}} \cdot 100\% = \frac{2800 - 3030,61}{2800} \cdot 100\% = -8,2\%.$$

Таким образом, мы получили, что необходимый световой поток не выходит за пределы требуемого диапазона. Теперь рассчитаем мощность осветительной установки:

$$P = 4 \cdot 40 = 160 \text{ Вт.}$$

Из условий равномерности освещения определяем расстояния L_1 и $L_1/3$ по уравнению:

$$5000 = L_1 + 2/3 \cdot L_1 + 2 \cdot 1230; L_1 = 1524 \text{ мм}; L_1/3 = 508 \text{ мм.} \quad (30)$$

На рисунке 19 изображен план помещения и размещения светильников с люминесцентными лампами.

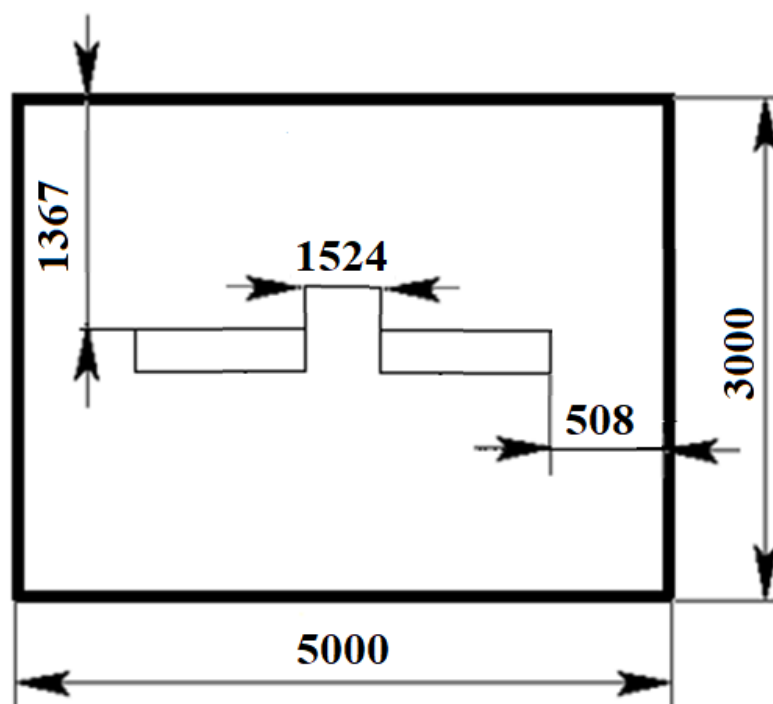


Рисунок 19 – План помещения и размещения светильников с люминесцентными лампами

5.1.1.2 Отклонение показателей микроклимата в помещении

Несоответствие оптимальным микроклиматическим условиям является вредным фактором. К микроклиматическим параметрам воздушной среды в лаборатории относятся температура и относительная влажность воздуха, скорость движения воздуха относительно тела лаборанта. Регламентируются они СанПиН 2.2.4.548–96. Гигиенические требования к микроклимату производственных помещений [29].

Проанализируем микроклимат в помещении, где находится рабочее место – лаборатория клеточных исследований. Лаборатория клеточных исследований относится к категории Па. Допустимые значения параметров микроклимата в соответствии с СанПиН 2.2.4.548-96 приведены в таблице 30.

Таблица 30 – Допустимые нормы микроклимата для категории работ Па

Температура воздуха, С°	Относительная влажность воздуха, %	Скорость движения воздуха, м/с
15-28	20-80	<0,5

Общая площадь рабочего помещения составляет 15 м², объем составляет 52,5 м³. На основании документа Постановления Главного государственного санитарного врача РФ 2.2.3670-20 «Санитарно-эпидемиологические требования к условиям труда» [34] нормы составляют 4,5 м² площади и 15 м³ объема помещения на одного человека. На экспериментальном участке находятся не более 2 человек, а рабочие операции выполняет только 1 человек. Исходя из приведенных выше данных, можно сказать, что количество рабочих мест соответствует размерам помещения по санитарным нормам.

После анализа габаритных размеров рассмотрим микроклимат в комнате на экспериментальном участке. В качестве параметров микроклимата рассмотрим температуру, влажность воздуха, скорость движения воздуха.

На экспериментальном участке находится лабораторное оборудование, характеризующееся выделением пыли, эксплуатация которого приводит к превышению гигиенических нормативов в воздухе рабочей зоны с постоянными рабочими местами, поэтому рабочее место оснащено устройствами местной вытяжной и приточной вентиляции и возможностью естественного проветривания. Согласно нормам СНиП 41-01-2003 «Отопление, вентиляция и кондиционирование» [35] объем воздуха

необходимый на одного человека в помещении с естественным проветриванием должен быть не менее 30 м^3 . В нашем случае объем воздуха на одного работающего человека составляет $52,5 \text{ м}^3$, из этого следует, что дополнительная вентиляция не требуется. Параметры микроклимата поддерживаются в холодное время года за счет систем водяного отопления с нагревом воды до $95 \text{ }^\circ\text{C}$, а в теплое время года – за счет проветривания.

По данным замеров температура воздуха в рабочей зоне экспериментального участка в теплый период года $21\text{-}23^\circ\text{C}$, в холодный период года $18\text{-}20^\circ\text{C}$, относительная влажность воздуха $60\text{-}75\%$, скорость движения воздуха $0,1 \text{ м/с}$.

Фактический уровень параметров микроклимата на рабочем месте соответствует требованиям Приказа Минтруда России № 33н от 24 января 2014 года с изменениями на 27 апреля 2020 года [36].

5.1.1.3 Превышение уровня шума

Одним из наиболее распространенных в производстве вредных факторов является шум. Он создается рабочим оборудованием, преобразователями напряжения, рабочими лампами дневного света, а также проникает снаружи.

Шум оказывает вредное воздействие на организм человека. Если кратковременный шум может только раздражить, то при длительном воздействии происходит снижение остроты слуха, повышение кровяного давления, снижение внимания и, следовательно, снижение работоспособности.

В лаборатории клеточных исследований находится оборудование, являющееся источником шума, к нему относятся: ламинарный бокс и центрифуга.

Эквивалентный уровень звука на данном рабочем месте составляет $48,8 \text{ дБ}$. Нормативное значение, согласно ГОСТ 12.1.003 – 83 [30], для работников лаборатории, выполняющих умственную работу с часто

получаемыми указаниями и акустическими сигналами, рекомендуемый уровень шума – 60 дБ, а предельно допустимый уровень – 82 дБА. Шум на рабочем месте не превышает предельно допустимый уровень звука, что соответствует требованиям Приказа Минтруда России № 33н от 24 января 2014 г. [36].

При значениях выше допустимого уровня необходимо предусмотреть средства индивидуальной защиты (СИЗ) и средства коллективной защиты (СКЗ) от шума.

Средства коллективной защиты:

- 1) устранение причин шума или существенное его ослабление в источнике образования;
- 2) изоляция источников шума от окружающей среды (применение глушителей, экранов, звукопоглощающих строительных материалов, например, шамотного кирпича);
- 3) применение средств, снижающих шум и вибрацию на пути их распространения.

Средства индивидуальной защиты:

- 1) применение спецодежды и защитных средств органов слуха: наушники, беруши, антифоны.

5.1.1.4 Защита от токсикантов

Работа с вредными веществами

Контакт с вредными веществами относится к факторам, порождаемым химическими свойствами находящихся в рабочей зоне веществ. Задачей защиты от химических негативных факторов является исключение или снижение до допустимых пределов попадания в организм человека вредных веществ, контакта с вредными или опасными объектами. Вредные вещества могут попадать в организм человека с вдыхаемым воздухом, питьевой водой, пищей, проникать через кожу.

В рабочей зоне необходимо обеспечить такие уровни негативных факторов, которые не вызывают ухудшения состояния здоровья человека, заболеваний. Для исключения необратимых изменений в организме человека необходимо ограничить воздействие негативных химических факторов предельно допустимыми концентрациями (далее – ПДК).

За время исследования выполнялись работы с применением диметилсульфоксида и этилового спирта. ПДК вредных веществ в воздухе рабочей зоны и их классы опасности [31] представлены в таблице 31.

Таблица 31 – Перечень вредных и опасных веществ, применяемых в исследовании

Вещество	Величина ПДК, мг/м ³	Характеристика	Класс опасности	Особенности воздействия на организм
Диметил-сульфоксид (ДМСО)	20	Бесцветная гигроскопичная жидкость	4	Пары при длительном воздействии вызывают головные боли и тошноту
Этиловый спирт ГОСТ 17299- 78 [37]	1000	Легковоспламеняющаяся бесцветная жидкость с характерным запахом	4	Пары при длительном воздействии раздражают оболочки глаз и носа, вызывают головные боли, сонливость и усталость

Лаборатория, снабжена приточно-вытяжной вентиляцией и вытяжным шкафом для защиты органов дыхания и слизистой оболочки глаз. Кроме того используются средства индивидуальной защиты: перчатки и халаты, для предотвращения попадания вредных веществ на кожу.

Работа с клеточными культурами

Лаборатория клеточных культур имеет ряд специфических опасностей, связанных с обращением и манипуляциями с клетками и тканями человека или животного, а также с токсичными, коррозионными или мутагенными растворителями и реагентами для клеточных культур.

Распространенными опасностями являются разливы и брызги на кожу и слизистые оболочки, попадание внутрь при пипетировании и ингаляционное воздействие инфекционных аэрозолей.

Основная цель любой программы биобезопасности состоит в том, чтобы уменьшить или устранить воздействие потенциально вредных биологических агентов на работников лабораторий и внешнюю среду. Самым важным элементом безопасности в лаборатории клеточных культур является строгое соблюдение стандартных микробиологических практик и методов.

Международные инструкции по биологической безопасности подготовлены Центром по контролю и профилактики заболеваний (CDC), а также Всемирной организацией здравоохранения (WHO). Документ определяет четыре повышающихся уровня локализации, называемых уровнями биобезопасности (BSL) с 1 по 4, и описывает микробиологическую практику и меры предосторожности для соответствующего уровня риска, связанного с работой с определенным агентом.

Большинство лабораторий клеточных культур должны иметь, по крайней мере второй уровень безопасности (BSL-2). Данный уровень подходит для агентов умеренной степени риска, которые, как известно, вызывают заболевания человека различной степени тяжести при приеме внутрь, в результате перкутанного воздействия или воздействия на слизистую оболочку. Но точные требования зависят от используемой линии клеток и типа выполняемой работы.

Оборудование безопасности в лаборатории клеточных культур включает в себя первичные барьеры, такие как ламинарные боксы, закрытые контейнеры и другие средства инженерного контроля, предназначенные для удаления или сведения к минимуму воздействия опасных материалов, в сочетании со средствами индивидуальной защиты.

Средства индивидуальной защиты образуют непосредственный барьер между персоналом и опасным агентом и включают такие средства

индивидуальной защиты, как перчатки, лабораторный халат, чехлы на обувь, сменную обувь, респираторы, щитки для лица, защитные очки.

5.1.2 Анализ выявленных опасных факторов

5.1.2.1 Поражение электрическим током

К опасным факторам можно отнести наличие в помещении большого количества аппаратуры, использующей однофазный электрический ток напряжением 220 В и частотой 50 Гц. В лаборатории отсутствуют условия, создающие повышенную или особую опасность, например, высокая температура, пыль, сырость или токопроводящие полы. Также в помещении постоянно или в течение длительного времени не хранятся агрессивные пары, газы, жидкости, не образуются отложения или плесень, разрушающие изоляцию и токоведущие части электрооборудования.

Лаборатория относится к помещению без повышенной опасности поражения электрическим током, согласно Правилам устройства электроустановок [32]. Безопасными номиналами являются: $I < 0,1 \text{ А}$; $U < (2 - 36) \text{ В}$; $R_{\text{зазем}} < 4 \text{ Ом}$.

Основные меры предотвращения электротравм в лаборатории – защита от прикосновения к находящимся под напряжением частям электрооборудования и применение защитного заземления [38].

В помещении применяются следующие меры защиты от поражения электрическим током: недоступность токоведущих частей для случайного прикосновения, все токоведущие части изолированы и ограждены. Недоступность токоведущих частей достигается путем их надежной изоляции, применения защитных ограждений (кожухов, крышек, сеток и т.д.), расположения токоведущих частей на недоступной высоте.

Каждому необходимо знать меры медицинской помощи при поражении электрическим током. В любом рабочем помещении необходимо иметь медицинскую аптечку для оказания первой медицинской помощи.

Для защиты от поражения электрическим током используют средства коллективной защиты и средства индивидуальной защиты.

Средства коллективной защиты:

1. Заземление, зануление источников электрического тока, электрическое разделение токовых цепей;
2. Использование щитов, барьеров, клеток, ширм, а также заземляющих и шунтирующих штанг, специальных знаков и плакатов.

Средства индивидуальной защиты:

1. Использование диэлектрических перчаток, изолирующих клещей и штанг, слесарных инструментов с изолированными рукоятками, указатели величины напряжения, калоши, боты, подставки и коврики.

5.1.2.2 Пожарная опасность

По взрывопожарной и пожарной опасности помещения подразделяются на категории А, Б, В1-В4, Г и Д.

Согласно СП 12.13130.2009 «Определение категорий помещений, зданий и наружных установок по взрывопожарной и пожарной опасности» [39] лаборатория относится к категории ВП, в которых взрывоопасные пылевоздушные смеси могут образовываться только в случае производственных неисправностей. По степени огнестойкости данное помещение относится к 1-й степени огнестойкости по СНиП 2.01.02-85 [33].

Возникновение пожара при работе может быть по причинам как электрического, так и неэлектрического характера.

Причины неэлектрического характера:

- неисправность производственного оборудования и нарушение технологического процесса;

- халатное и неосторожное обращение с огнем (курение, оставление без присмотра нагревательных приборов, определение утечки газа с помощью открытого огня);
- неправильное устройство и неисправность вентиляционной системы;
- плохая огнезащита металлоконструкций;
- самовоспламенение или самовозгорание веществ.

Причины электрического характера:

- короткие замыкания, перегрузки, большие переходные сопротивления, искрение и электрические дуги, статическое электричество.

Для локализации или ликвидации загорания на начальной стадии используются первичные средства пожаротушения. Первичные средства пожаротушения обычно применяют до прибытия пожарной команды.

Огнетушители водо-пенные (ОХВП-10) используют для тушения очагов пожара без наличия электроэнергии. Углекислотные (ОУ-2) и порошковые огнетушители предназначены для тушения электроустановок, находящихся под напряжением до 1000 В. Для тушения токоведущих частей и электроустановок применяется переносной порошковый огнетушитель ОП-5.

В общественных зданиях и сооружениях на каждом этаже должно размещаться не менее двух переносных огнетушителей. Огнетушители следует располагать на видных местах вблизи от выходов из помещений на высоте не более 1,35 м. Размещение первичных средств пожаротушения в коридорах, переходах не должно препятствовать безопасной эвакуации людей.

Для предупреждения пожара и взрыва необходимо предусмотреть:

- 1) специальные изолированные помещения для хранения и разлива легковоспламеняющихся жидкостей (ЛВЖ), оборудованные приточно-вытяжной вентиляцией во взрывобезопасном

исполнении – в соответствии с ГОСТ 12.4.021-75 [40] и СНиП 41-01-2003 [41];

- 2) специальные помещения (для хранения в таре пылеобразной канифоли), изолированные от нагревательных приборов и нагретых частей оборудования;
- 3) первичные средства пожаротушения на производственных участках (передвижные углекислые огнетушители ГОСТ 9230-77 [42], пенные огнетушители ТУ 22-4720-80 [43], ящики с песком, войлок, кошма или асбестовое полотно);
- 4) автоматические сигнализаторы (типа СВК-3 М 1) для сигнализации о присутствии в воздухе помещений предвзрывных концентраций горючих паров растворителей и их смесей.

Лаборатория полностью соответствует требованиям пожарной безопасности, а именно, наличие охранно-пожарной сигнализации, плана эвакуации, изображенного на рисунке 20, порошковых огнетушителей с поверенным клеймом, табличек с указанием направления к запасному (эвакуационному) выходу.



Рисунок 20 – План эвакуации

5.2 Экологическая безопасность

Важной характеристикой экологической безопасности является влияние химических и биологических отходов.

К химическим и биологическим отходам относятся:

- неиспользованные и просроченные вещества
- пролитые жидкости
- использованные расходные материалы
- ветошь.

Все отходы лаборатории клеточных исследований представляют собой жидкие вещества (спирт) и твердые отходы (пластик, ветошь).

Жидкие отходы в виде спирта собираются в канистру и отправляются на перегонку в технический спирт.

Чтобы сократить негативное воздействие твердых отходов, в виде бытового мусора, и твердого биоматериала, образующихся в лаборатории клеточных исследований, выполняют последовательность действий:

1. Твердый биоматериал и контактирующие с ним предметы удаляют в мягкую упаковку (одноразовые пакеты, маркированные желтым цветом с надписью «медицинские отходы», закрепленные в урнах);

2. После заполнения пакета примерно на 3/4 из него удаляют воздух, и сотрудник, ответственный за сбор отходов, осуществляет его герметизацию;

3. Транспортирование всех видов отходов класса Б вне пределов медицинского подразделения осуществляют только в одноразовой упаковке после ее герметизации.

Сбор отходов осуществляют до определенного момента и затем отвозят в специальные службы для утилизации.

5.3 Безопасность в чрезвычайных ситуациях

Природная чрезвычайная ситуация – обстановка на определенной территории или акватории, сложившейся в результате возникновения источника природной чрезвычайной ситуации, который может повлечь или повлек за собой человеческие жертвы, ущерб здоровью людей и (или) окружающей природной среде, значительные материальные потери и нарушение условий жизнедеятельности людей [44].

Природные чрезвычайные ситуации обусловлены географическим расположением города Томска. Возможными опасными явлениями, приводящими к нарушению нормальной деятельности, гибели людей и разрушению материальных ценностей могут быть пожары, взрывы, разрушения зданий в результате разрядов атмосферного электричества, ураганов. Здание защищают от прямых ударов молнии молнеприемниками, принимающими разряд на себя, заземлителями, служащими для отвода тока в землю и токопроводами, соединяющими молнеприемники и заземлители. В

случае стихийного бедствия (урагана, землетрясения) необходимо отключить воду, электричество и покинуть помещение согласно плану эвакуации.

Возможными чрезвычайными ситуациями в Томске могут быть сильные морозы. Для Сибири в зимнее время года характерны морозы. Достижение критически низких температур приводит к авариям систем тепло- и водоснабжения, сантехнических коммуникаций и электроснабжения, приостановке работы. В этом случае при подготовке к зиме следует предусмотреть:

- 1) газобаллонные калориферы (запасные обогреватели);
- 2) дизель или бензоэлектрогенераторы;
- 3) запасы питьевой и технической воды на складе (не менее 30 л на 1 человека);
- 4) теплый транспорт для доставки работников на работу и с работы домой в случае отказа муниципального транспорта.

Их количества и мощности должно хватать для того, чтобы работа на производстве не прекратилась.

В связи с нестабильной международной обстановкой, массовыми террористическими актами, нужно предусмотреть возможности начала военных действий и связанных с ними нападений на объекты с использованием средств массового поражения. По сигналу «воздушная тревога» производится отключение воды и электроэнергии в лаборатории, затем организуется эвакуация работающих в лаборатории согласно плану эвакуации. При угрозе нападения по радиотрансляционной сети передают сигналы «Воздушная тревога», «Отбой воздушной тревоги», «Химическая тревога», «Радиационная опасность» и «Биологическая опасность».

Для исключения возможности несчастных случаев должны проводиться обучение и проверка знаний работников о требованиях безопасности труда.

5.4 Перечень нормативно-технической документации

1. ГОСТ 12.0.003-2015 ССБТ. Опасные и вредные производственные факторы. Классификация;
2. СНиП 23-05-95 Естественное и искусственное освещение;
3. СанПиН 2.2.4.548–96 Гигиенические требования к микроклимату производственных помещений;
4. ГОСТ 12.1.003 – 83 Система стандартов безопасности труда (ССБТ). Шум. Общие требования безопасности;
5. ГН 2.2.5.3532-18. Предельно допустимые концентрации (ПДК) вредных веществ в воздухе рабочей зоны;
6. СП 2.2.3670-20 Санитарно-эпидемиологические требования к условиям труда;
7. СНиП 41-01-2003 Отопление, вентиляция и кондиционирование;
8. Приказа Минтруда России № 33н "Об утверждении Методики проведения специальной оценки условий труда, Классификатора вредных и (или) опасных производственных факторов, формы отчета о проведении специальной оценки условий труда и инструкции по ее заполнению" от 24 января 2014 года с изменениями на 27 апреля 2020 года;
9. Правила устройства электроустановок. Седьмое издание;
10. ГОСТ Р 12.1.019-2009 Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты;
11. ГОСТ 12.4.154-85 ССБТ. Устройства экранирующие для защиты от электрических полей промышленной частоты;
12. СП 12.13130.2009 Определение категорий помещений, зданий и наружных установок по взрывопожарной и пожарной опасности;
13. СНиП 2.01.02-85 Противопожарные нормы;
14. ГОСТ 12.4.021-75 ССБТ. Системы вентиляционные;
15. СНиП 41-01-2003 Отопление, вентиляция и кондиционирование;
16. ГОСТ 9230-77 Огнетушители СО(2) (углекислотные) передвижные. Технические условия;

17. ТУ 22-4720-80 Огнетушитель химический воздушно-пенный ОХВП-10;

18. Федеральный закон «О защите населения и территорий от чрезвычайных ситуаций природного и техногенного характера» от 21 декабря 1994 г. № 68.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате исследовательской работы была произведена оценка цитотоксичности стабильных активных радикалов, являющихся перспективными агентами для фотодинамической терапии опухолей. Цитотоксичность исследовалась *in vitro*, в качестве биологических моделей использовались культуры клеток: 3Т3-L1, MCF-7 и MDA MB 231.

Было определено, что индивидуальные частицы производного алкилвердазила являются оптимальной формой для исследования данных соединений и что без активации светом они не оказывают токсического действия на клетки.

Для активации водорастворимого производного алкилвердазила (метил 4- (2- (1- (4-нитрофенил) этил) -6-оксо-1,5-дифенил-1,2,5,6-тетрагидро-1,2,4,5-тетразин-3-ил)бензоата) оптимальными условиями являются излучение с длиной волны 405 нм в течение 20 минут. Данные условия причиняют наименьший вред клеткам.

Установлено, что водонерастворимое производное алкилвердазила (1- (1- (4-нитрофенил) этил) -2,4,6-трифенил-1,4-дигидро-1,2,4,5-тетразин-3 (2H)-он) без облучения показывает низкую токсичность на опухолевых культурах клеток, а при активации облучением проявляет высокую цитотоксичность, вызывая до 50 % гибели клеток.

Показано, что при повторном применении алкилвердазила происходит повышение неиндуцированной цитотоксичности.

Можно заключить, что алкилвердазила являются валидной базой для разработки новых противоопухолевых препаратов для лечения ФДТ.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ СТУДЕНТА

1. Votkina D.E. Alkylverdazyls as a Source of Alkyl Radicals for Light-Triggered Cancer Cell Death / Darya E. Votkina and etc. // Mol Pharm. – 2022;
2. Бердинская Е.С. Сравнительная оценка цитотоксичности производных вердазильных радикалов разными колориметрическими тестами / Е.С. Бердинская, Д.А. Очирова, Т.В. Рожникова // Химия и химическая технология в XXI веке: тезисы докл. Междунар. Конф. (Томск, 17 – 20 мая 2021 г.). – Томск, 2021. – с. 342-343;
3. Бердинская Е.С. Оценка цитотоксичности производного вердазильного радикала при облучении разными длинами волн / Е.С. Бердинская // Химия и химическая технология в XXI веке: тезисы докл. Междунар. Конф. (Томск, 16 – 19 мая 2022 г.). – Томск, 2022. – с. 417-418.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Ritchie H., Roser M. Causes of Death / H. Ritchie, M. Roser // Our World in Data, 2018 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://ourworldindata.org/causes-of-death> (Дата обращения: 15.07.2021);
2. Ferlay J. Global Cancer Observatory: Cancer Today / J. Ferlay, et al. // Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2020 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://gco.iarc.fr/today> (Дата обращения: 16.07.2021);
3. Лечение рака. Всемирная организация здравоохранения [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.who.int/cancer/treatment/ru/> (Дата обращения: 20.12.2020);
4. Рагулин Ю.А. Возможности ФДТ в лечении рецидивов рака легкого / Ю.А. Рагулин и др. // Сибирский онкологический журнал. – №1. – 2011. – С. 77-79;
5. Чан Тхи Хай Иен, Фотосенсибилизаторы хлоринового ряда в ФДТ опухолей / Чан Тхи Хай Иен, Г.В. Раменская, Н.А. Оборотова // Российский биотерапевтический журнал. – №8 (4). – 2009. – С. 99-104;
6. Миронов А.Ф. Фотодинамическая терапия рака – новый эффективный метод диагностики и лечения злокачественных опухолей / А.Ф. Миронов // Соровский образовательный журнал. – 1996. – №6. – С. 32-40;
7. Votkina Darya E. Kinetic investigation of thermal and photoinduced homolysis of alkylated verdazyls / Darya E. Votkina and etc. // Physical Chemistry Chemical Physics. – 2020;
8. Votkina D.E. Alkylverdazyls as a Source of Alkyl Radicals for Light-Triggered Cancer Cell Death / Darya E. Votkina and etc. // Mol Pharm. – 2022;
9. Первая медицинская помощь. – М.: Большая Российская Энциклопедия. –1994;
10. SOFIA – онкологический центр. Методы лечения рака: выбор и особенности разных видов терапии [Электронный ресурс]. – Режим доступа:

<https://cancercentersofia.ru/forpatient/articles/metody-lecheniya-raka-vybor-i-osobnosti-raznykh-vidov-terapii.html> (Дата обращения: 15.07.2021);

11. Химическая энциклопедия. Хлорофиллы. М. – 1995. – Т. 5;
12. Пат. 2276976 Российская Федерация, МПК А61К 31/409, А61К 47/26, А61К 47/30, А61Р 35/60. Фотосенсибилизатор и способ его применения [Текст] / Пономарев Г.В. и др.; заявитель и патентообладатель Открытое акционерное общество «Группа компаний «ГРАНД». – № 2004124218/15; заявл. 10.08.2004; опубл. 27.05.2006, Бюл. № 15. – С. 14.;
13. Gomberg M. An instance of trivalent carbon: triphenylmethyl / M. Gomberg // Journal Of The American Chemical Society. – 1900. – №22;
14. Kai Zhang, Stable Organic Radical Polymers: Synthesis and Applications / Kai Zhang and etc. // Polymer chemistry. – 2016. – №7;
15. Полумник О.М. Химия вердазильных радикалов / Полумник О.М.– Киев : Наук. думка. – 1984.– С. 252.;
16. Гаррисон, Харрисон (Harrison) Росс Гренвилл // Большая советская энциклопедия : [в 30 т.] / гл. ред. А. М. Прохоров. — 3-е изд. — М. : Советская энциклопедия. – 1969-1978.;
17. Черкасова Е.И., Брилкина А.А. Работа с культурами клеток / Учебно-методическое пособие. – Нижний Новгород: Издательство Нижегородского университета. – 2015. – С. 57;
18. Американская коллекция типовых культур [Электронный ресурс]. — Режим доступа: <https://www.atcc.org/> (Дата обращения: 06.04.2022).
19. Черкасова Е.И., Брилкина А.А. Работа с культурами клеток / Учебно-методическое пособие. – Нижний Новгород: Издательство Нижегородского университета, 2015. – С. 57.;
20. Харченко В.В. Оценка параметров нанометрических полос видимой части солнечного спектра / В.В. Харченко и др. // E-Sci. – 2020. – №6;
21. Ekwall B. Overview of the final MEIC results: II. The *in vitro* – *in vivo* evaluation, including the selection of a practical battery of cell tests for

prediction of acute lethal blood concentrations in humans // Toxicol. In Vitro. – 1999. – V. 13, № 4-5. – P. 665-673;

22. Молекулярно-генетические и биохимические методы в современной биологии растений / под ред. В.В. Кузнецова, Г.А Романова. – Эл. Изд. – М. : БИНОМ. Лаборатория знаний. – 2012. – С. 487;

23. SWOT-анализ [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://blog.ringostat.com/ru/swot-analiz-chto-eto-takoe-gde-ego-ispolzuyut-primery/> (Дата обращения 20.05.2022);

24. Безруких Ю.А. Экономика лесозаготовительных и деревоперерабатывающих производств. Учебное пособие / Ю.А. Безруких, С.О. Медведев, А.П. Мохирев. – М.: Российская Академия Естествознания. – 2017. – С. 102;

25. Постановление Правительства РФ О предельной величине базы для начисления страховых взносов в Фонд социального страхования Российской Федерации и Пенсионный фонд Российской Федерации с 1 января 2016 г. от 26.11.2015 N 1265 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_189499/ (Дата обращения 22.05.2022);

26. Галкина Е.В. Интегральные финансовые показатели эффективности управления / Е.В. Галкина // Экономический анализ: теория и практика. – 2010. – №13. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://cyberleninka.ru/article/n/integralnye-finansovye-pokazateli-effektivnosti-upravleniya> (Дата обращения: 23.05.2022);

27. ГОСТ 12.0.003-2015 ССБТ. Опасные и вредные производственные факторы. Классификация [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://docs.cntd.ru/document/1200136071> (Дата обращения 08.05.2022);

28. СНиП 23-05-95 Естественное и искусственное освещение [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://docs.cntd.ru/document/871001026> (Дата обращения 08.05.2022);

29. СанПиН 2.2.4.548–96 Гигиенические требования к микроклимату производственных помещений [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://docs.cntd.ru/document/901704046/titles> (Дата обращения 10.05.2022);

30. ГОСТ 12.1.003 – 83 Система стандартов безопасности труда (ССБТ). Шум. Общие требования безопасности [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://docs.cntd.ru/document/5200291> (Дата обращения 11.05.2022);

31. ГН 2.2.5.3532-18. Предельно допустимые концентрации (ПДК) вредных веществ в воздухе рабочей зоны [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://docs.cntd.ru/document/557235236> (Дата обращения 12.05.2022);

32. ГОСТ Р 12.1.019-2009 Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://docs.cntd.ru/document/1200080203> (Дата обращения 12.05.2022);

33. СНИП 2.01.02-85 Противопожарные нормы [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://docs.cntd.ru/document/871001017?section=text> (Дата обращения 13.05.2022);

34. СП 2.2.3670-20 Санитарно-эпидемиологические требования к условиям труда [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://docs.cntd.ru/document/573230583?marker=6560Ю> (Дата обращения 11.05.2022);

35. СНИП 41-01-2003 Отопление, вентиляция и кондиционирование [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://docs.cntd.ru/document/1200035579> (Дата обращения 11.05.2022);

36. Приказа Минтруда России № 33н "Об утверждении Методики проведения специальной оценки условий труда, Классификатора вредных и (или) опасных производственных факторов, формы отчета о проведении специальной оценки условий труда и инструкции по ее заполнению" от 24 января 2014 года с изменениями на 27 апреля 2020 года [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://docs.cntd.ru/document/499072756> (Дата обращения 12.05.2022);

37. ГОСТ 17299- 78 Спирт этиловый технический [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://docs.cntd.ru/document/1200005433> (Дата обращения 12.05.2022);

38. ГОСТ 12.4.154-85 ССБТ. Устройства экранирующие для защиты от электрических полей промышленной частоты [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://docs.cntd.ru/document/1200005824> (Дата обращения 12.05.2022);

39. СП 12.13130.2009 Определение категорий помещений, зданий и наружных установок по взрывопожарной и пожарной опасности [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://docs.cntd.ru/document/1200071156> (Дата обращения 13.05.2022);

40. ГОСТ 12.4.021-75 ССБТ. Системы вентиляционные [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://docs.cntd.ru/document/1200005274> (Дата обращения 13.05.2022);

41. СНиП 41-01-2003 Отопление, вентиляция и кондиционирование [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://docs.cntd.ru/document/1200035579> (Дата обращения 13.05.2022);

42. ГОСТ 9230-77 Огнетушители СО(2) (углекислотные) передвижные. Технические условия [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://docs.cntd.ru/document/822912978> (Дата обращения 14.05.2022);

43. ТУ 22-4720-80 Огнетушитель химический воздушно-пенный ОХВП-10 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.standards.ru/document/5645068> (Дата обращения 14.05.2022);

44. Федеральный закон О защите населения и территорий от чрезвычайных ситуаций природного и техногенного характера от 21 декабря 1994 г. № 68 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://docs.cntd.ru/document/9009935> (Дата обращения 16.05.2022).

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Раздел 1 Аналитический обзор на английском языке

Студент:

Группа	ФИО	Подпись	Дата
9ДМ01	Бердинская Елизавета Сергеевна		

Консультант ИШХБМТ:

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент	Плотников Е.В.	к.х.н.		

Консультант – лингвист отделения (НОЦ) школы ШБИП

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент	Зяблова Н.Н.	к.ф.н.		

1 Basic methods of cancer treatments

Cancer is [9] a group of diseases associated with malignant neoplasms that can affect any organs in the human body.

An article [1] about the causes of people death from 1990 to 2017 was published on Our World in Data in 2018. Cancer has been the second leading cause of death worldwide, behind only cardiovascular disease, for 27 years. The World Health Organization cited cancer incidence statistics from 2015 to 2020 [2]. The most common cancers worldwide among people of all ages are breast cancer with 7.8 million cases (15.4%) and non-melanoma skin cancer with 6.5 million cases (12.8%). They occupy the leading position among new cases in 2020: 2.3 million cases (11.7%) and 1.2 million cases (6.2%), respectively.

Oncological diseases are of great variety and affect the underlying mechanisms of cell vital activity, which are not fully established and continue to be actively studied.

Neoplasms arise from epithelial cells of the skin, mucous membranes and parenchymal organs: the liver, kidneys, lungs, spleen, pancreas and thyroid gland. The structure of the neoplasm depends on the structural and functional features of the cells. For example, squamous cell carcinoma occurs in tissues in contact with the external environment and covered with stratified squamous epithelium. And glandular cancer, called adenocarcinoma, originates from the epithelium of the glands.

Cancer treatment depends on the characteristics of the neoplasm: location, structure, stage of development and involves the use of various methods.

The World Health Organization identifies three main methods of cancer treatment:

- surgery;
- chemotherapy;
- radiotherapy.

Combined treatment with simultaneous or sequential application of various methods is often used. For example, chemotherapy or chemotherapy in

combination with radiation therapy is prescribed before or after surgery to consolidate the effect, as well as to prevent metastases.

1.1 Surgery

Part of the tumor, metastases or the entire neoplasm is removed during the surgical method of treatment. With a large area of damage, the entire organ can be removed, which can be replaced with a prosthesis or implant later. In addition, tumor destruction using low temperatures or laser radiation has become widespread [9].

Surgery is the most common method of treating oncological neoplasms [10]. Surgical treatment is used in 85% of cancer cases of the internal organs of the human body. This is due to the stage of the disease, which is usually found in an already formed form and in the presence of symptoms of stages 2, 3 or 4.

As a result, surgical treatment has a number of limitations, including disseminated lesion, the difficulty of establishing the localization of small neoplasms, and a number of others.

In this case, the combination of surgery with other methods has the greatest efficiency.

1.2 Chemotherapy

1.1.2 Chemotherapy

Chemotherapy is less traumatic. It consists in the use of cytostatics, i.e. compounds that destroy cancer cells.

Chemotherapy is used as often as surgery. It is used as an independent method of treatment, and to increase the effectiveness of other therapy methods, and to eliminate the remaining malignant fragments, and to prevent the recurrence of the tumor.

Although this treatment requires a long time, but if successful, it gives a lasting effect.

During therapy, the patient's well-being leaves much to be desired. Treatment is accompanied by weight gain, baldness, nausea and vomiting.

1.3 Radiotherapy

Some types of cancer are sensitive to the action of ionizing radiation, radiotherapy is based on which.

This type of therapy is universal and can be used at any stage of treatment. Radiotherapy can be used before surgery, after surgery or during surgery. If necessary, radiation therapy is used to relieve pain.

If ionizing radiation is supplied to the patient externally for targeted irradiation of the tumor, the emitting apparatus is located outside. If internal exposure is carried out, the source of radiation is capsules, tapes or liquids.

1.4 Photodynamic therapy

Previously considered methods of cancer treatment do not have the necessary selectivity in relation to cancer cells. But effective and sparing photodynamic therapy (hereinafter referred to as PDT) has it.

This method was first implemented on 25 patients in 1978 by the American professor T. Dougherty, and has been developed in Russia since 1992 [6].

This method is based on the ability of a cancer cell to selectively accumulate and retain colored substances for some time. These substances are subsequently excited by the wavelength of light. At the same time, the total energy of light is low so it does not affect neighboring healthy cells. Thus, PDT combines the effects of physical and chemotherapeutic methods. The substance itself and low-energy laser radiation have practically no effect.

The method consists of four steps:

- 1) introduction of a sensitizer solution to the patient;
- 2) accumulation of the sensitizer in the tumor for several hours or days, diagnosis of the tumor by the fluorescence of the sensitizer;
- 3) irradiation of the affected area with light with a certain wavelength for 15 - 20 minutes;
- 4) destruction of a malignant neoplasm within 2-4 weeks, partial or complete restoration of the affected areas.

A laser, lamp or LED system is used as a radiation source, which allows delivering light to the internal organs. In this work, we used a system of LEDs, because it was small in size and low in cost.

During irradiation, highly toxic photochemical transformations develop in tumor areas containing a sensitizer, cytotoxic products that are detrimental to cancer cells are formed.

1.4.1 Photodynamic agents

The development of photodynamic cancer therapy is associated with the development of the first sensitizers based on porphyrins. It is called first generation sensitizers.

Porphyrins, chlorins (hydrogenated analogues of porphyrins) and bacteriochlorins are part of known proteins: hemoglobin, myoglobin, peroxidase, etc. Porphyrins are iron complexes and are involved in oxygen transport and providing the body with energy. And chlorins and bacteriochlorins contain magnesium, carry out photosynthesis and similar processes.

The first promising sensitizer for PDT was hematoporphyrin IX. T. Doherty used its derivative in the treatment of the first patients.

Second-generation sensitizers include new compounds under investigation. The ideal sensitizer for PDT has a number of requirements:

- It should have high selectivity for cancer cells, with little retention in healthy tissues;
- It should have low systemic toxicity and be easily excreted from the body;
- It should accumulate slightly in the skin;
- It must be stable during storage and introduction into the body;
- It must have good luminescence for reliable diagnosis of neoplasm, etc.

1.4.1.1 Applied photosensitizers

Preparations based on hematoporphyrin are the most used in medical practice at the present time. Photofrin is used in the USA and Canada, Photosan is used in China, Photohem is used in Russia.

National Photogem was developed in the second half of the 80s by A.F. Mironov [6]. It was clinically tested from 1992 to 1995 and has been approved for medical use since 1996.

Chlorophyll derivatives are actively used to create second-generation sensitizers. Natural chlorophyll is not stable enough to be used in PDT [11]. Pheophorbide is more stable, however, it is slightly soluble in water. This problem is proposed [12] to be solved by adding two, three or more carboxyl groups.

1.4.1.2 Stable radicals

A radical is an atom or molecule that has an unpaired electron in its outer orbit. Radicals live for seconds fractions, because tend to react with other molecules and make up for the lack of an electron. In stable radicals, the unpaired electron is distributed throughout the molecule, which allows the molecule to live for a long time at room temperature.

The triphenylmethyl radical is the first stable radical to be discovered in 1900 by Gomberg [13]. Due to the unpaired electron, stable radicals have special magnetic, optical and redox properties that allow it to be used in various fields: biophysics, biochemistry, biology and medicine. They are also used to develop new materials, such as magnetic and optoelectronic materials or polymers, graphenes [14].

Stable radicals have certain properties for use as anticancer agents. They are able to oxidize saturated fatty acids that make up the cell membrane, thereby increasing its permeability, damage proteins and DNA. All this leads to aging, carcinogenesis, inflammation, radioactive and chemical damage to cells.

1.4.1.3 Verdazils

Verdazyl radicals are a new class of stable radicals [15] with strong nucleophilic properties. The name was obtained from the Latin word *verde* – green, because initially most of the compounds had a green color, however, then radicals of various colors were synthesized.

Verdazyl radicals are heterocyclic compounds with four nitrogen atoms in a six-membered ring (Fig. 1), where R' and R'' are simple or substituted aryls, R and R''' can be alkyl or also aryl:

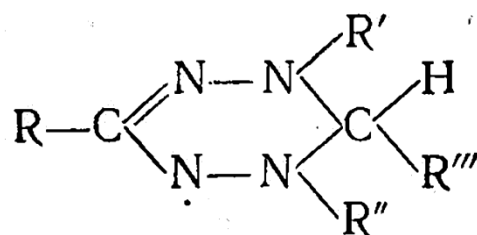


Figure 1 – Verdazyl radicals structural formula

The amazing stability, simplicity and ease of studying its transformations by the spectrophotometric method and solubility in many organic solvents are characteristic of verdazils.

Verdazils have already taken their rightful place among stable radicals and continue to find new applications in solving many scientific, technical and practical problems.

2 Toxicological tests

The Russian Federation and the Eurasian Economic Union impose mandatory safety requirements for substances that come into contact with humans. One of these requirements is the toxicity index (general toxic effect).

Toxicological tests can be carried out *in vivo* and *ex vivo* or *in vitro*.

2.1 *In vivo* studies

In vivo studies involve the use of living tissue in a living organism. That is, *in vivo* research methods are animal testing and human clinical trials.

Guinea pigs (albinos), rabbits (albinos or light gray), white rats are used as laboratory animals.

The Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) recommends the use of alternative *in vitro* test subjects or computer simulations prior to conducting *in vivo* studies whenever possible. Often, *in vitro* methods are used to initially quantify exposure to a substance. And in the countries of the European Union, the *in vivo* method has been replaced by the *in vitro* method since 2003, in order to stop testing on animals for ethical reasons.

2.2 *Ex vivo* studies

Ex vivo means "outside the living body". In experiments of this type, living tissues are not created artificially, they are taken directly from a living organism. Then the experiment is immediately carried out in the laboratory with a minimum change in the natural conditions of the organism.

The most common *ex vivo* technique uses living cells or tissues taken from a living organism and grown under sterile laboratory conditions for days or weeks. Such cells serve as models of the behavior of the whole organism, reducing the need for experiments on animals and humans. Experiments *ex vivo*, as a rule, are carried out *in vitro*, however, these two terms are not synonymous.

2.3 *In vitro* studies

In vitro testing is included in the list of mandatory methods for assessing the potential hazard of chemicals to human health and the environment for the purpose of their subsequent registration, examination and certification in accordance with the rules of European legislation (REACH 1907/2006).

In vitro studies are studies that do not use multicellular whole organisms as test systems, instead using microorganisms or tissues isolated from the whole organism, or their models. Many *in vitro* studies are classified as short term as defined in the *Good Laboratory Practice* (GLP) Principles.

In vitro is Latin for "in glass" because *in vitro* experiments have historically been carried out in a Petri dish.

One feature of *in vitro* testing is that a specific cell line (such as fibroblasts) is isolated, separated and purified from their normal biological environment. This allows for more detailed cellular and molecular analysis compared to using the whole organism.

In vitro experiments can be carried out on a wide range of subjects, from bacteria to cells derived from living organisms. Anything from modified bacteria to remodeled tissues can be created, modified, and replicated over and over again specifically for the needs of an experiment.

In vitro and *ex vivo* appear to be very similar, as both testing methods involve experiments on a biological substance outside of a living organism and in an artificial environment. Cells and tissues for *ex vivo* experiments are taken from a living organism, whether donated or harvested (for example, hair follicles, skin explants). Meanwhile, for *in vitro* tests, cells are obtained from repositories and cultured to create the required model (for example, reconstructed human epidermis).

However, the most important difference between the two methods is their complexity and speed.

For example, *ex vivo* models:

- on the one hand, much more complex in terms of cell diversity and, therefore, closer to *in vivo* conditions;
- on the other hand, are less reactive in terms of biological response to treatment or stress.

Meanwhile, *in vitro* models:

- essentially simplified versions of *ex vivo* models in terms of biological complexity;
- but more reactive in terms of biological response.

Experiments *in vitro*, are considered less reliable than *in vivo*, and are often only a necessary preliminary stage to assess the feasibility and necessity of further

studies in vivo. However, they often reduce the cost of the preliminary stages of research and save the life of experimental animals.

2.3.1 Cell cultures

Cell culture is a method of long-term preservation in a living state of cells, tissues or small organs isolated from the human, animal or plant body.

Cell lines are cells that have undergone genetic modification for immortalization, as a result are able to multiply for a long period in vitro, and can also be distributed and cryopreserved as deposits of a cell bank. A continuous cell line is generally more homogeneous, more stable, and therefore more reproducible than a heterogeneous population of primary cells.

It was possible to obtain tissue culture for the first time in 1907 [16]. The American scientist R. Garrison placed a piece of the rudiment of the nervous system of a frog embryo into a drop of lymph, the viability of the cells of the rudiment was maintained for several weeks, and nerve fibers grew from them.

A significant shift in the development of the cell culture method occurred in connection with the establishment of the possibility of culturing a cell suspension obtained from any tissue under the influence of the proteolytic enzyme trypsin, which dissolves the intercellular substance. For such cell cultures, a synthetic liquid nutrient medium containing physiological saline, 12 amino acids, vitamins, glucose, and, as a rule, blood serum (2-10%) is used; be sure to add antibiotics to this medium: penicillin and streptomycin.

Depending on the specific tasks, various vessels are used for tissue cultivation: glasses with a recess (for cultivation in a hanging drop), vials, test tubes, mattresses, large vessels such as fermenters.

Depending on the degree of adaptation to the conditions of existence outside the body, cell cultures are divided [17] into 3 categories:

- 1) primary cultures, which can be obtained from almost any organ, but even with a systematic change in the nutrient medium, they remain only 20-30 days, and then die;

2) diploid strains obtained under special conditions from embryonic tissues of humans and animals, their characteristic feature is the stability of biological properties, in particular the constancy of the diploid set of chromosomes, these cells remain unchanged for 10-12 months (up to 50 nutrient medium changes);

3) transplantable (stable) lines, fully adapted to existence outside the body, receive them from normal and cancerous tissues, and they multiply indefinitely for a long time.

The main condition for successful cell cultivation is strict observance of sterility.

Cell cultures are an excellent object for studying the effect of physical, chemical, and biological factors on the cell. The use of cell cultures as biological models has a number of advantages over classical methods of testing on mammals. This in vitro model allows you to conduct research with less time and money. In addition, with its help, it turns out to completely bypass the ethical problems associated with the massive use and death of experimental animals. Another advantage of the in vitro models used in the study is the ability to work directly on human cell cultures, which makes the data obtained more adequate when projected onto the human body.

In this work, a number of common cultures of cancerous and healthy cells were used.