



Исследовательская школа химических и биомедицинских технологий  
Направление подготовки 18.04.01 Химическая технология  
ООП «Перспективные химические и биомедицинские технологии»

**ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА МАГИСТРАНТА**

Тема работы
<b>Изучение <i>in vitro</i> нового радиофармацевтического лекарственного препарата на основе варианта DARPin G3 с хелатными группами на основе глутаминовой кислоты и цистеина</b>

УДК 615.012-026.63:577.112:547.466.6+577.112.386

Обучающийся

Группа	ФИО	Подпись	Дата
9ДМ11	Юлдашева Феруза Шерзод кизи		

Руководитель ВКР

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

**КОНСУЛЬТАНТЫ ПО РАЗДЕЛАМ:**

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
Старший преподаватель	Авдеева И.И.	-		

**ДОПУСТИТЬ К ЗАЩИТЕ:**

Руководитель ООП	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Профессор	Романенко С.В.	д.х.н.		

**ПЛАНИРУЕМЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ОСВОЕНИЯ ООП  
«Перспективные химические и биомедицинские технологии»**

<b>Код компетенции</b>	<b>Наименование компетенции</b>
<b>Универсальные компетенции</b>	
УК(У)-1	Способен осуществлять критический анализ проблемных ситуаций на 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) языке (-ах), для академического и профессионального взаимодействия;
УК(У)-5	Способен анализировать и учитывать разнообразие культур в процессе межкультурного взаимодействия;
УК(У)-6	Способен определять и реализовывать приоритеты собственной деятельности и способы ее совершенствования на основе самооценки.
<b>Общепрофессиональные компетенции</b>	
ОПК(У)-1	Способен организовать самостоятельную и коллективную научно-исследовательскую работу, разрабатывать планы и программы проведения научных исследований и технических разработок;
ОПК(У)-2	Способен использовать современные приборы и методики, организовать проведение экспериментов и испытаний, проводить их обработку и анализировать их результаты
ОПК(У)-3	Способен разрабатывать нормы выработки, технологические нормативы на расход материалов, заготовок, топлива и электроэнергии, контролировать параметры технологического процесса, выбирать оборудование и технологическую оснастку
ОПК(У)-4	Способен находить оптимальные решения при создании продукции с учетом требований качества, надежности и стоимости, а также сроков исполнения, безопасности жизнедеятельности и экологической чистоты.
<b>Профессиональные компетенции выпускников</b>	
ПК(У)-1	Способен к поиску, обработке, анализу и систематизации научно-технической информации по теме исследования, выбору методик и средств решения задачи
ПК(У)-2	Способен к созданию химических соединений, материалов и изделий биомедицинского назначения и (или) их физико-химического анализа
ПК(У)-3	Способен к применению методов математического моделирования химических соединений, материалов биомедицинского назначения и процессов химических и биомедицинских технологий
ПК(У)-4	Способен к защите объектов интеллектуальной собственности и коммерциализации прав на объекты интеллектуальной собственности
ПК (У)-5	Способен проектировать и организовывать учебный процесс по образовательным программам с использованием современных образовательных технологий



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

Исследовательская школа химических и биомедицинских технологий  
Направление подготовки 18.04.01 Химическая технология  
ООП «Перспективные химические и биомедицинские технологии»

УТВЕРЖДАЮ:  
Руководитель ООП  
18.04.01 Химическая технология  
\_\_\_\_\_ С.В. Романенко  
14.03.2023 г.

**ЗАДАНИЕ  
на выполнение выпускной квалификационной работы**

Обучающийся:

Группа	ФИО
9ДМ11	Юлдашева Феруза Шерзод кизи

Тема работы:

Изучение <i>in vitro</i> нового радиофармацевтического лекарственного препарата на основе варианта DARPin G3 с хелатными группами на основе глутаминовой кислоты и цистеина	
Утверждена приказом директора (дата, номер)	34-38/с от 03.02.2023 г.

Срок сдачи обучающимся выполненной работы:	13.06.2023 г.
--	---------------

**ТЕХНИЧЕСКОЕ ЗАДАНИЕ:**

<b>Исходные данные к работе</b>	<p>Объект исследования: HER2 направленные сконструированные белки DARPin G3 с хелатными группами.</p> <p>Предмет исследования: оценка специфичности, интернализации и аффинности нового радиофармпрепарата на основе DARPin G3E<sub>3</sub>C.</p> <p>Провести оценку <i>in vitro</i> специфичности, процессинга и равновесной константы диссоциации сконструированной молекулы на основе DARPin G3E<sub>3</sub>C, как перспективный агент для радиодиагностики опухолей, с использованием культур клеток в качестве биологических моделей.</p>
<b>Перечень подлежащих исследованию, проектированию и разработке вопросов</b>	<p>Аналитический обзор по тематике научно-исследовательской работы.</p> <p>Освоение комплекса культуральных и молекулярно-биологических методик и выполнение полного цикла исследований свойств скаффолда на клеточных культурах <i>in vitro</i>.</p>

	<p>Анализ и обсуждение результатов проведенного исследования.</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>
<b>Перечень графического материала</b>	Не предусмотрено

<b>Консультанты по разделам выпускной квалификационной работы</b> (с указанием разделов)	
<b>Раздел</b>	<b>Консультант</b>
Социальная ответственность	Старший преподаватель, Авдеева И.И.
Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение	К.э.н., доцент ОСГН ШБИП, Маланина В.А.
Раздел ВКР на иностранном языке	К.п.н., доцент ОИЯ, Гончарова Л.А.
<b>Названия разделов, которые должны быть написаны на русском и иностранном языках:</b>	
<b>Название разделов на русском языке:</b> введение, аналитический обзор, объекты и методы исследования, результаты исследования, социальная ответственность, финансовый менеджмент ресурсоэффективность и ресурсосбережение, заключение.	
<b>Название разделов на иностранном языке:</b> аналитический обзор.	

<b>Дата выдачи задания на выполнение выпускной квалификационной работы по линейному графику</b>	14.03.2023 г.
---	---------------

**Задание выдал руководитель:**

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент	Плотников Е.В.	к.х.н.		14.03.2023 г.

**Задание принял к исполнению обучающийся:**

Группа	ФИО	Подпись	Дата
9ДМ11	Юлдашева Феруза Шерзод кизи		14.03.2023 г.



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

Исследовательская школа химических и биомедицинских технологий  
Направление подготовки 18.04.01 Химическая технология  
ООП «Перспективные химические и биомедицинские технологии»  
Уровень образования магистратура  
Период выполнения весенний семестр 2022/2023 учебного года

**КАЛЕНДАРНЫЙ РЕЙТИНГ-ПЛАН  
выполнения выпускной квалификационной работы**

Обучающийся:

Группа	ФИО
9ДМ11	Юлдашева Феруза Шерзод кизи

Тема работы:

Изучение <i>in vitro</i> нового радиофармацевтического лекарственного препарата на основе варианта DARPin G3 с хелатными группами на основе глутаминовой кислоты и цистеина
---

Срок сдачи студентом выполненной работы:	13.06.2021 г.
--	---------------

Дата контроля	Название раздела (модуля) / вид работы (исследования)	Максимальный балл раздела (модуля)
22.03.2023 г.	Разработка раздела «Введение»	10
05.04.2023 г.	Разработка раздела «Литературный обзор»	10
19.04.2023 г.	Разработка раздела «Экспериментальная часть»	10
10.05.2023 г.	Разработка разделов «Результаты проведенного исследования (разработки)».	10
24.05.2023 г.	Разработка разделов «Социальная ответственность» и «Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение»	10
01.06.2023 г.	Оформление ВКР	10
15.06.2023 г.	Представление ВКР	40

**СОСТАВИЛ:**

**Руководитель ВКР**

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент	Плотников Е.В.	к.х.н.		15.03.2023

**СОГЛАСОВАНО:**

**Руководитель ООП**

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Профессор	Романенко С.В.	д.х.н.		15.03.2023

## ЗАДАНИЕ ДЛЯ РАЗДЕЛА «СОЦИАЛЬНАЯ ОТВЕТСТВЕННОСТЬ»

Студенту:

<b>Группа</b>		<b>ФИО</b>	
9ДМ11		Юлдашева Феруза Шерзод кизи	
<b>Школа</b>	<b>ИШХБМТ</b>	<b>Отделение (НОЦ)</b>	-
<b>Уровень образования</b>	магистратура	<b>Направление/специальность</b>	18.04.01 Химическая технология

Тема ВКР:

Изучение *in vitro* нового радиофармацевтического лекарственного препарата на основе варианта DARPin G3 с хелатными группами на основе глутаминовой кислоты и цистеина

**Исходные данные к разделу «Социальная ответственность»:**

<p><b>Введение</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>– Характеристика объекта исследования (вещество, материал, прибор, алгоритм, методика) и области его применения.</li> <li>– Описание рабочей зоны (рабочего места) при разработке проектного решения/при эксплуатации</li> </ul>	<p><i>Объект исследования:</i> HER2 направленные сконструированные белки DARPin G3 с хелатными группами</p> <p><i>Область применения:</i> радионуклидная диагностика, биомедицина</p> <p><i>Рабочая зона:</i> лаборатория</p> <p><i>Количество и наименование оборудования рабочей зоны:</i> автоматический гамма-спектрометр Wizard-2 2480, ТСХ-сканер, дозкалибратор, микроскоп МИБ-Р, ламинарные боксы БМБ-II –Ламинар-С-1,2 Neoteric, CO2-инкубаторы СВ150-О.</p> <p><i>Рабочие процессы, связанные с объектом исследования, осуществляющиеся в рабочей зоне:</i> работа с раковыми клетками в биологической лаборатории, экспериментальные исследования <i>in vitro</i> таргетной молекулы на основе <sup>99m</sup>Tc и белков с анкириновыми повторами.</p>
--	---

**Перечень вопросов, подлежащих исследованию, проектированию и разработке:**

<p><b>1. Правовые и организационные вопросы обеспечения безопасности при эксплуатации:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>– специальные (характерные при эксплуатации объекта исследования, проектируемой рабочей зоны) правовые нормы трудового законодательства;</li> <li>– организационные мероприятия при компоновке рабочей зоны.</li> </ul>	<p>«Трудовой кодекс Российской Федерации» от 30.12.2001 N 197-ФЗ;</p> <p>СанПиН 2.6.1.2523-09 Нормы радиационной безопасности (НРБ-99/2009);</p> <p>СП 2.6.1.2612-10 «Основные санитарные правила обеспечения радиационной безопасности (ОСПОРБ 99/2010)»;</p> <p>ГОСТ 12.2.032-78 ССБТ. Рабочее место при выполнении работ сидя. Общие эргономические требования;</p> <p>ГОСТ Р 52905-2007 (ИСО 15190:2003) Лаборатории медицинские. Требования безопасности;</p> <p>СП 2.4.3648-20 «Санитарно-эпидемиологические требования к организации воспитания и обучения, отдыха и оздоровления детей и молодежи».</p>
<p><b>2. Производственная безопасность при эксплуатации:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>– Анализ выявленных вредных и опасных производственных факторов</li> <li>– Расчет уровня опасного или вредного</li> </ul>	<p><b>Опасные факторы:</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Радиоактивное загрязнение поверхностей и материалов производственной среды, включая средства защиты работающих и их кожные покровы;</li> <li>2. Электроопасность; класс электроопасности помещения, безопасные номиналы I, U, R<sub>заземления</sub>, СКЗ, СИЗ;</li> </ol> <p><b>Вредные факторы:</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Недостаточная освещенность;</li> </ol>

<p>производственного фактора</p>	<p>2. Нарушения микроклимата, оптимальные и допустимые параметры;  3. Шум, ПДУ, СКЗ, СИЗ;  4. Вибрация;  5. Наличие токсикантов, ПДК, класс опасности, СКЗ, СИЗ;  6. Работа с клеточными культурами;  7. Физические перегрузки (динамические и статические);  8. Нервно-психические перегрузки (перенапряженность анализаторов, монотонность труда, эмоциональность перегрузки).</p> <p><b>Требуемые средства коллективной и индивидуальной защиты от выявленных факторов:</b> использование свинцовых контейнеров для радиоактивных растворов, перчатки, лабораторный халат, сменную обувь, осветительные приборы, устройства для вентиляции и очистки воздуха, беруши, наушники.</p> <p><b>Расчет:</b> расчет системы искусственного освещения</p>
<p><b>3. Экологическая безопасность при эксплуатации</b></p>	<p><b>Воздействие на селитебную зону:</b> не воздействует  <b>Воздействие на литосферу:</b> пластик, стеклянные сосуды, перегоревшие люминесцентные лампы, оргтехника, ТБО  <b>Воздействие на гидросферу:</b> радиоактивные и химические растворы  <b>Воздействие на атмосферу:</b> выбросы из вентиляционных систем, содержащие низкие концентрации радиоактивных веществ</p>
<p><b>4. Безопасность в чрезвычайных ситуациях при эксплуатации</b></p>	<p><b>Возможные ЧС:</b> возникновение очагов пожара, радиоактивное излучение при разливе радиоактивного раствора, природная – сильные морозы зимой (аварии на электро-, тепло- коммуникациях, водоканале)  <b>Наиболее типичная ЧС:</b> пожар в результате не правильного обращения с электрическими приборами, внезапное ухудшение состояния работника лаборатории</p>
<p><b>Дата выдачи задания для раздела по линейному графику</b></p>	

**Задание выдал консультант:**

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
старший преподаватель	Авдеева Ирина Ивановна	-		

**Задание принял к исполнению студент:**

Группа	ФИО	Подпись	Дата
9ДМ11	Юлдашева Феруза Шерзод кизи		

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

Студенту:

<b>Группа</b>	<b>ФИО</b>
9ДМ11	Юлдашева Феруза Шерзод кизи

<b>Школа</b>	<b>ИШХБМТ</b>	<b>Отделение (НОЦ)</b>	-
<b>Уровень образования</b>	Магистратура	<b>Направление/специальность</b>	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. «Портрет» потребителя результатов НТИ
2. Сегментирование рынка
3. Оценка конкурентоспособности технических решений
4. Матрица SWOT
5. График проведения и бюджет НТИ
6. Оценка ресурсной, финансовой и экономической эффективности НТИ

<b>Дата выдачи задания для раздела по линейному графику</b>	26.03.2023
---	------------

**Задание выдал консультант:**

<b>Должность</b>	<b>ФИО</b>	<b>Ученая степень, звание</b>	<b>Подпись</b>	<b>Дата</b>
Доцент ОСГН ШБИП	Маланина Вероника Анатольевна	К.Э.Н.		14.03.2023

**Задание принял к исполнению студент:**

<b>Группа</b>	<b>ФИО</b>	<b>Подпись</b>	<b>Дата</b>
9ДМ11	Юлдашева Феруза Шерзод кизи		14.03.2023



## РЕФЕРАТ

Выпускная квалификационная работа 112 с., 19 рис., 25 табл., 69 источников, 1 прил.

Ключевые слова: скаффолд-белки, таргетная радионуклидная тераностика, DARPIn, HER2, технеций-99м

Объектом исследования являются HER2 направленные сконструированные белки DARPIn G3 с хелатными группами.

Цель работы – разработка и исследование *in vitro* новой таргетной молекулы на основе  $^{99m}\text{Tc}$  и высокоспецифичной таргетной молекулы неиммуноглобулиновой природы DARPIn для радионуклидной диагностики онкологических заболеваний с гиперэкспрессией онкомаркера HER2/neu.

В ходе работы проводились разработка и оптимизация радионуклидной таргетной конструкции на основе технеция-99м и варианта DARPIn G3-E<sub>3</sub>C и химия мечения, *in vitro* исследования определение специфичности, клеточного процессинга и интернализации, равновесной константы диссоциации при оценке аффинности радионуклидной таргетной конструкции на основе технеция-99м и варианта DARPIn G3-E<sub>3</sub>C для визуализации HER2/neu.

В результате исследования показали, что таргетная конструкция на основе каркасного белка DARPIn G3 и  $^{99m}\text{Tc}$  продемонстрировала специфическое и высокоаффинное связывание с HER2-экспрессирующими раковыми клетками человека *in vitro*, количество интернализованной активности достигало плато через 6 ч после начала инкубации. В то же время общая клеточно-ассоциированная активность достигала максимума к 4–6 ч и затем снижалась, в результате оценки аффинности четко наблюдался насыщающий характер связывания [ $^{99m}\text{Tc}$ ]-Tc-G3-E<sub>3</sub>C с HER2-экспрессирующими клетками SKOV-3.

Степень внедрения: идет стадия НИОКР.

Область применения: фармакология, онкология, биомедицина.

Экономическая эффективность выполнения первых этапов токсикологических испытаний на биологических моделях *in vitro* выше, чем

на биологических моделях *in vivo*, за счет экономии денежных и временных затрат.

В будущем планируется исследование на биологических моделях *in vivo*, оценка биораспределения радиофармпрепарата на мышах CD1, ксенотрансплантация клеток SKOV-3 мышам Nu/J и сравнение биораспределение на нормальных тканях и опухоли.

## Оглавление

РЕФЕРАТ.....	9
ВВЕДЕНИЕ.....	11
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	13
1.1 Создание таргетных радиофармацевтических лекарственных препаратов.....	13
1.2 Методы визуализации опухолевых заболеваний.....	14
1.2.1 Позитронно-эмиссионная томография.....	16
1.2.2 Однофотонная эмиссионная компьютерная томография.....	17
1.3 Создание радиофармпрепарата для ПЭТ/ОФЭКТ.....	18
1.3.1 Радиоизотопы для ядерной медицины.....	19
1.3.2 Молекулярные мишени и таргетные молекулы для создания радиофармацевтических лекарственных препаратов.....	22
ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	25
2.1 Объекты исследования.....	25
2.1.1 Анкириновые белки DARPin G3.....	25
2.1.2 Опухолевые клеточные культуры.....	28
2.2 Сырье и материалы.....	29
2.2.1 Сырье и рабочие материалы.....	29
2.2.2 Расходные материалы.....	30
2.3 Приборы и оборудование.....	30
2.4 Методы исследования.....	31
2.4.1 Культивирование клеток.....	31
2.4.2 Разработка и оптимизация радионуклидной таргетной конструкции на основе технеция-99m и варианта DARPin G3-E <sub>3</sub> C.....	33
2.4.3 Оценка специфичности.....	34
2.4.4 Оценка процессинг и интернализации конъюгатов экспрессирующими HER2 клетками SKOV-3.....	34
2.4.5 Оценка аффинности.....	35
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	37

3.1 Результаты разработки и оптимизации таргетного агента на основе технеция-99m и DARPin G3-E3C.....	37
3.2 Результаты экспериментального исследования in vitro таргетного агента на основе технеция-99m и DARPin G3-E3C.....	38
3.2.1 Результаты оценки специфичности.....	38
3.2.2 Результаты определения клеточного процессинга и интернализации.....	39
3.2.3 Результаты оценки равновесной константы диссоциации при оценке аффинности.....	40
ГЛАВА 4. ФИНАНСОВЫЙ МЕНЕДЖЕМЕНТ, РЕСУРСОЭФФЕКТИВНОСТЬ И РЕСУРСОСБЕРЕЖЕНИЕ.....	42
4.1 Предпроектный анализ.....	42
4.1.1 Потенциальные потребители результатов исследования.....	42
4.1.2 Анализ конкурентных технических решений.....	43
4.1.3 SWOT-анализ.....	45
4.2 Планирование научно-исследовательских работ.....	47
4.2.1 Структура работ в рамках научного исследования.....	47
4.2.2 Определение трудоемкости выполнения работ.....	49
4.2.3 Разработка графика проведения научного исследования.....	50
4.2.4 Бюджет научно-технического исследования (НТИ).....	54
4.3 Определение ресурсной, финансовой, бюджетной, социальной и экономической эффективности исследования.....	60
ГЛАВА 5. СОЦИАЛЬНАЯ ОТВЕТСТВЕННОСТЬ.....	64
5.1 Правовые и организационные вопросы обеспечения безопасности.....	64
5.1.1 Специальные правовые нормы трудового законодательства .....	64
5.1.2 Эргономические требования к правильному расположению и компоновке рабочей зоны.....	66
5.2 Производственная безопасность.....	67
5.2.1 Анализ выявленных вредных факторов.....	67
5.2.1.1 Недостаточная освещенность.....	68

5.2.1.2 Отклонение показателей микроклимата в помещении.....	72
5.2.1.3 Превышение уровня шума .....	73
5.2.1.4 Превышение уровня вибрации.....	75
5.2.1.5 Защита от токсикантов.....	75
5.2.1.6 Психофизиологические факторы.....	77
5.2.2 Анализ выявленных опасных факторов.....	78
5.2.2.1 Поражение электрическим током.....	78
5.2.2.2 Радиоактивное загрязнение.....	80
5.3 Экологическая безопасность.....	80
5.4 Безопасность в чрезвычайных ситуациях.....	82
5.4.1 Анализ возможных ЧС, которые могут возникнуть в лаборатории при проведении исследований.....	82
5.4.2 Анализ наиболее типичных ЧС, которые могут возникнуть в лаборатории при проведении исследований.....	83
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	88
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	90
Приложение А.....	99

## ВВЕДЕНИЕ

В связи с постоянным ростом онкологических заболеваний населения за рубежом, особенно в США, Японии, Канаде, в Европе, все крупные клиники активно внедряют в свою практику таргетные радиофармацевтические лекарственные препараты (РФЛП), которые применяются как для диагностики, так и для терапии. В настоящее время в России отсутствуют зарегистрированные таргетные РФЛП, поэтому необходимы разработки современных, высокоспецифичных РФЛП на основе биомолекул таргетной доставки радионуклидов к органам и тканям [1].

В качестве перспективной мишени для радионуклидной диагностики онкологических заболеваний с последующим назначением таргетной терапии на протяжении двух последних десятилетий особый интерес вызывает изучение рецептора 2 эпидермального фактора роста человека HER2/neu (иначе HER2), относящегося к семейству трансмембранных тирозинкиназных рецепторов (EGFR = ErbB1/HER1; ErbB2/HER2; ErbB3/HER3; ErbB4/HER4) и в норме экспрессирующегося на поверхности всех эпителиальных клеток [2].

Наличие гиперэкспрессии молекулярной мишени HER2/neu выявляется на поверхности опухолевых клеток при раке молочной железы, яичников, легкого, желудка, простаты и ассоциируется с высокой степенью злокачественности и метастатическим поражением лимфатических узлов, а также с низкими показателями выживаемости.

**Цель исследования** – разработка и исследование *in vitro* новой таргетной молекулы на основе  $^{99m}\text{Tc}$  и высокоспецифичной таргетной молекулы неиммуноглобулиновой природы DARPIn для радионуклидной диагностики онкологических заболеваний с гиперэкспрессией онкомаркера HER2/neu.

### **Задачи исследования:**

1) Разработать и оптимизировать радионуклидную таргетную конструкцию на основе технеция-99m и варианта DARPIn G3-E<sub>3</sub>C

посредством молекулярного дизайна «DARPin G3-линкер (N<sub>3</sub>S)» и химии мечения.

2) Провести экспериментальные исследование *in vitro* определение специфичности радионуклидной таргетной конструкции на основе технеция-99m и варианта DARPin G3-E<sub>3</sub>C для визуализации HER2/neu.

3) Провести экспериментальные исследование *in vitro* определение клеточного процессинга и интернализации радионуклидной таргетной конструкции на основе технеция-99m и варианта DARPin G3-E<sub>3</sub>C для визуализации HER2/neu.

4) Провести экспериментальные исследование *in vitro* определение равновесной константы диссоциации при оценке аффинности радионуклидной таргетной конструкции на основе технеция-99m и варианта DARPin G3-E<sub>3</sub>C для визуализации HER2/neu.

**Объектом исследования** в данной работе являются HER2 направленные сконструированные белки DARPin G3 с хелатными группами.

**Научная новизна** состоит в том, что исследования предполагает разработку нового <sup>99m</sup>Tc-содержащего таргетного агента на основе варианта DARPin G3-E<sub>3</sub>C (с концевыми аминокислотами три глутамат и цистеин). Посредством этой новой конструкции впервые планируется применить подходы в мечении <sup>99m</sup>Tc варианта DARPin, а именно применение окси-<sup>99m</sup>Tc. В данной работе будут впервые проведены комплексные экспериментальные исследования *in vitro* таргетного агента на основе <sup>99m</sup>Tc и DARPin G3-E<sub>3</sub>C.

**Апробация работы:** Основные положения работы были опубликованы в журнале Int. J. Mol. Sci. в 2022 году [22] и представлены на Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2023», XXIV Международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых «Химия и химическая технология в XXI веке» имени профессора Л.П. Кулёва и III Международной научно-практической конференции «Научная инициатива иностранных студентов и аспирантов».

## **ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ**

### **1.1 Создание таргетных радиофармацевтических лекарственных препаратов**

Молекулярная визуализация рак-ассоциированных мишеней облегчает диагностику и стратификацию пациентов для целевого лечения. Молекулы на основе радионуклидов успешно используются на сегодняшний день в ядерной медицине. Исследуются разные радиоизотопы и методы их использования.

Для создания РФП существует несколько этапов разработки:

1. Поиск подходящего радиоизотопа для использования при диагностике или терапии определённых заболеваний в организме человека;
2. Выбор радионуклида исходя из целей и задач исследования и ядерно-физических свойств радиоизотопа;
3. Разработка методов введения радиоизотопа в организм человека (выбор линкера для связывания с биомолекулой, условия процесса, контроль фармакокинетики);
4. Разработка технологии, состава и методов контроля РФП;
5. Доклинические исследования препарата, контроль дозы и безопасности, определение токсикологических эффектов;
6. Клинические исследования, при положительных результатах доклинических исследований [3].

### **1.2 Методы визуализации опухолевых заболеваний**

Молекулярная визуализация (МИ) является новым направлением, которое направлена на интеграцию специфической для пациента и специфической для заболевания молекулярной информации, полученной из диагностической визуализации. Обеспечивая бесконечный контраст для визуализации, можно легко отличить радиофармацевтические препараты от



собственных молекул. Данный принцип работы отличается от других методов визуализации, таких как компьютерная томография (КТ). В случае КТ все ткани производят сигнал, а различия в интенсивности сигнала между различными тканями обеспечивают контрастность изображения (рис 1) [4].

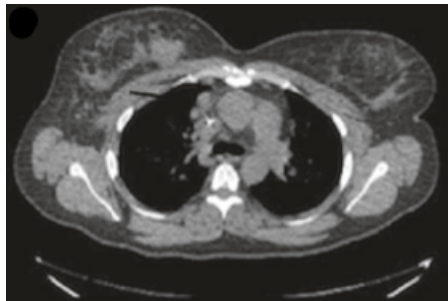


Рисунок 1 – [<sup>18</sup>F]-фтордезоксиглюкоза КТ рака молочной железы (распространение заболевания на мелкие средостенные узлы не обнаруживаются при КТ)

Одним из методов молекулярной визуализации считается магнитно-резонансная томография (МРТ). Преимуществом МРТ является способность предоставлять информацию о мягких тканях и функциях благодаря использованию протонной плотности, перфузии, диффузии, и биохимических контрастов. Основным недостатком МРТ является присущая ей низкая чувствительность для обнаружения целевых агентов по сравнению с методами ядерной визуализации [4,5].

Еще один из методов молекулярной визуализации, который обеспечивает высокое пространственное разрешение (<1 мм) и может предоставить отличную анатомическую информацию для сопоставления с молекулярной информацией является ультразвуковая визуализация. В ультразвуковой визуализации в качестве скаффолдов используются многие целевые агенты молекулярной визуализации такие, как микропузырьки, липосомы или перфторуглеродные эмульсии. Однако относительно большой размер частиц агента визуализации (<250 нм) ограничивают проникновение в ткани и делает этот метод неприменимым для сосудистых мишеней. Это свойство ультразвуковой визуализации является важным ограничением при использовании в молекулярной визуализации [6].

В целом каждая молекула диагностического радиофармпрепарата может быть обнаружено в течение всего срока его действия, что способствует исключительной чувствительности для диагностики. Однако, существуют факторы, ограничивающие визуализацию излучения радиофармацевтического препарата такие, как [5,6]:

1. Пределы возможности устройств обнаружения;
2. Поглощение излучения до того, как оно выведется из организма;
3. Необходимость ограничения радиационного воздействия на пациента.

Тем не менее, существует возможность генерировать высококачественные изображения, используя предельно малые дозы (30-600 МБк), что соответствует лишь наномолям соединения, в зависимости от периода полураспада радионуклида, что позволяет радиофармпрепаратам работать как молекулярные трассеры [7].

Методы ядерной визуализации, которые включают ПЭТ и ОФЭКТ, имеют свои преимущества. Они отличаются от других методов визуализации высокой внутренней чувствительностью и неограниченной глубиной проникновения. Одним из преимуществ ПЭТ заключается в том, что она полностью количественная и обеспечивает более высокое пространственное разрешение, чем ОФЭКТ. Основное преимущество методов ПЭТ и ОФЭКТ заключается в том, что небольшая масса зонда и стратегии радиомечения не оказывают существенного влияния на биологические процессы, которые изучаются [8].

### **1.2.1 Позитронно-эмиссионная томография**

Позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ) является одним из методов молекулярной визуализации, который имеет высокую внутреннюю чувствительность и неограниченную глубину проникновения. С помощью ПЭТ можно распознать изменения в обменных патологических сдвигах на

самом раннем этапе до образования морфологических изменений. Для молекулярной визуализации методом ПЭТ используются  $\beta^+$ -излучатели с периодами полураспада от нескольких секунд до нескольких часов (табл. 1) [9].

Таблица 1 – Радионуклиды для молекулярной визуализации методом ПЭТ

<b><math>\beta^+</math>-активные изотопы</b>	
<b>Изотоп</b>	<b><math>T_{1/2}</math> (мин)</b>
$^{15}\text{O}$	2,04
$^{13}\text{N}$	9,96
$^{11}\text{C}$	20,4
$^{18}\text{F}$	110

Относительно большой период полураспада изотопа  $^{18}\text{F}$  стал основой для наиболее распространённого радиофармпрепарата фтордезоксиглюкоза (ФДГ), являющейся аналогом глюкозы и субстратом для фермента гексокиназы. Однако, посредством радионуклидов  $^{15}\text{O}$ ,  $^{13}\text{N}$  и  $^{11}\text{C}$  получают более качественные изображения [4,9].

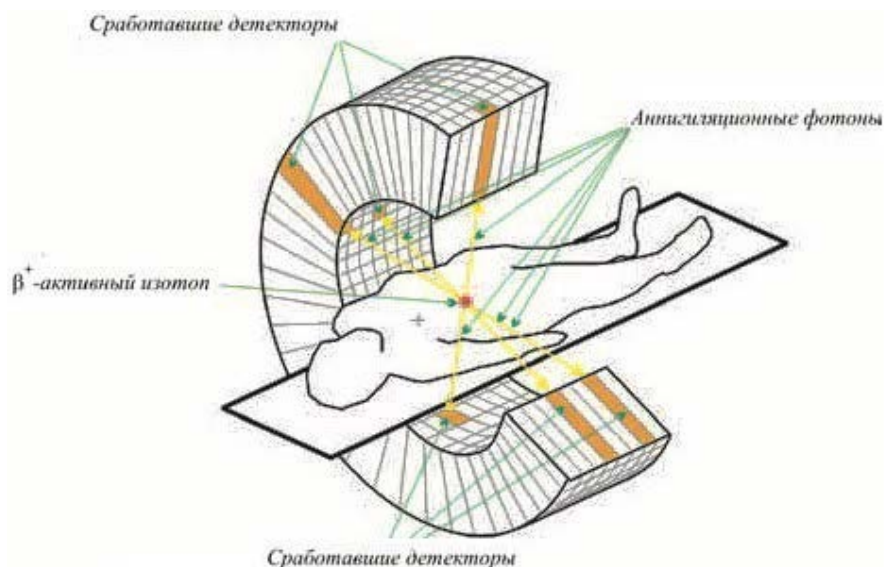


Рисунок 2 – Схематическое изображение ПЭТ

## 1.2.2 Однофотонная эмиссионная компьютерная томография

Однофотонная эмиссионная компьютерная томография (ОФЭКТ) является методом молекулярной визуализации, в которой происходит визуализация за счёт гамма-излучения с высокой проникающей способностью. В методе ОФЭКТ обычно используют  $\gamma$ -излучатели с энергией  $\gamma$ -квантов в пределах 100-200 кэВ и периодами полураспада от нескольких минут до нескольких дней [9].

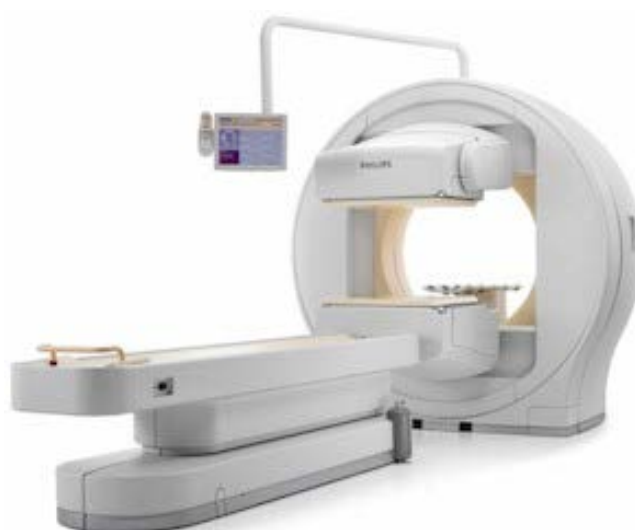


Рисунок 3 – Однофотонный эмиссионный компьютерный томограф  
Радионуклид  $^{99m}\text{Tc}$  у которого энергия гамма-излучения 140 кэВ является наиболее широко используемым изотоп для метода диагностики ОФЭКТ. Применяются и другие радиоизотопы (табл. 2) [9,10].

Таблица 2 – Радионуклиды используемые для молекулярной визуализации методом ОФЭКТ

Изотоп	$T_{1/2}$	Орган
$^{67}\text{Ga}$	78 ч	сердце
$^{99m}\text{Tc}$	6 ч	кости, костный мозг, легкие, сердце, почки
$^{201}\text{Tl}$	73 ч	сердце
$^{111}\text{In}$	2.8 дн	печень
$^{131}\text{I}$	8 дн	печень, почки, лёгкие, головной мозг
$^{189}\text{Au}$	28.7 м	лимфоузлы

В ядерной медицине можно встретить применение ОФЭКТ в таких областях медицины, как неврология, кардиология, урология, для диагностики опухолей головного мозга, при сцинтиграфии заболеваний скелета и рака молочной железы [11].

### **1.3 Создание радиофармпрепарата для ПЭТ/ОФЭКТ**

Основные препараты, используемые для ПЭТ и ОФЭКТ представляют собой радиофармпрепараты 3-го поколения, которые включают в себя [12]:

1. Радионуклид;
2. БХА – бифункциональный хелатирующий агент – связывает радионуклид и содержит свободные центры для дальнейшего связывания (DOTA, NODAGA, DTPA и др.);
3. Линкер;
4. Вектор: рецептор-специфичные пептиды и другие лиганды (позволяет всей конструкции РФП накапливаться в нужном месте) [13].

#### **1.3.1 Радиоизотопы для ядерной медицины**

В ядерной медицине радиоизотопы используются в зависимости от того, для диагностики или терапии какого заболевания. Например, в виде иодид ионов встречается  $^{123}\text{I}$  и используется для диагностики заболеваний щитовидной железы, для исследования перфузии миокарда используется  $^{201}\text{Tl}$  в виде однозарядного катиона, методом радиометрии можно исследовать нарушение обменных процессов и заболеваний гематологии при помощи радиоизотопов  $^{51}\text{Cr}$  и  $^{59}\text{Fe}$  [12].

По методу получения радиоизотопы делятся на следующие группы:

- 1) получаемые в ядерных реакторах ( $\alpha$ -излучающие,  $\beta$ -излучающие,  $\gamma$ -излучающие);
- 2) получаемые на ускорителях заряженных частиц ( $\alpha$ -излучающие,  $\beta^-$ -излучающие,  $\beta^+$ -излучающие,  $\gamma$ -излучающие);
- 3) получаемые с помощью изотопных генераторов (в реакторе и на ускорителе заряженных частиц).

В качестве примера альфа-излучающего изотопа служит  $^{223}\text{Ra}$  с периодом полураспада 11,4 дня. Распад  $^{223}\text{Ra}$  происходит за счет четырех высокоэнергетических альфа-частиц (два протона и два нейтрона) на коротких расстояниях. Излучение  $^{223}\text{Ra}$  действует на молекулярном уровне разрывая двуцепочечный ДНК. За счет перечисленных и других свойств  $^{223}\text{Ra}$  применяется в лечении рака предстательной железы, где наблюдается благоприятное биораспределение в нормальных тканях [14]. Однако, в костях за 24 ч. накапливается 99% концентрации препарата.

Терапия радия-223 хлоридом больных кастрационно-резистентным раком предстательной железы с костными метастазами приводит к увеличению общей выживаемости и времени до развития костных осложнений, а также характеризуется хорошей переносимостью [15].

Радиоизотоп  $\beta$ -излучением  $^{177}\text{Lu}$  за счет максимальной энергии бета-излучения 500 кэВ и аперидод полураспада 6 суток широко является одним из наиболее перспективных терапевтических радионуклидов и на сегодняшний день применяется в ядерной медицине для лечения и диагностики опухолей [16].

Наблюдается хорошее специфическое связывание  $^{177}\text{Lu}$  с простат-специфическим мембранным антигеном и применяется в мировой клинической практике как [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-PSMA-617 для лечения метастатического кастратрезистентного рака предстательной железы [17].

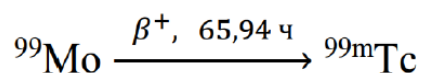
Для диагностики и лечения дифференцированного рака щитовидной железы и его метастазов более 50 лет используется еще один радиоизотоп  $\beta$ -излучением  $^{131}\text{I}$ . Радионуклид йод-131 испускает гамма-кванты и бета-частицы

и тем самым позволяет радиометрическим приборам точно проследить путь радиоактивного йода в организме и определить его содержание в различных органах и системах, а также моче, слюне и других выделениях [18].

На основе фосфоновых кислот и генераторного радионуклида  $^{68}\text{Ga}$  разрабатываются новые остеотропные РФЛП для диагностики метастатических изменений в костях, которые возникают при опухолях молочной железы, предстательной железы и лёгких. Период полураспада  $^{68}\text{Ga}$  составляет 68 минут, что позволяет использовать РФП с необходимой активностью без значительной дозовой нагрузки на пациента [19].

$\gamma$ -излучающий радионуклид  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  является универсальным для диагностики рака методом ОФЭКТ в составе разнообразных РФП.

Для исследования молекул для диагностики рака методом ОФЭКТ был выбран радиоизотоп  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  с периодом полураспада 6 ч. Радионуклидный генератор  $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$  является самым часто применяемым во всем мире в ядерной медицине. Радиоактивный технеций-99м получается в результате распада  $^{99}\text{Mo}$ .



После распада колонку смывают физиологическим раствором и получают радиоактивный раствор  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ , который используют для дальнейших целей. Технеций-99м является  $\gamma$ -излучателем, что способствует благоприятному профилю излучения, тем самым обеспечивает хорошее пространственное разрешение и низкое поглощение дозы в процессе молекулярной визуализации. Также, технеций-99м имеет способность хорошо конъюгировать белками и пептидами, что положительно влияет на связывание и таргетную доставку целевых белков.

Технеций-99м обладает хорошей специфичностью с многими линкерами. В качестве линкера могут случить антитела, аффибоди, белки с анкириновыми повторами DARPins.

Исследование молекулы аффибоди меченного  $^{99m}\text{Tc}$  показала стабильность молекулы и высокую гидрофильность, что способствует выведению препарата из нормальных тканей при диагностике рака молочной железы [20].

Рекомбинантные адресные молекулы меченные  $^{99m}\text{Tc}$  активно используется для молекулярной визуализации опухолей. Каркасные белки DARPin9\_29 меченные технецием-99м показали хорошую специфичность в культуре клеток с гиперэкспрессией поверхностного рецептора Her-2/neu, что может применяться для диагностики при раке легкого, яичников, желудка, простаты и др. [21].

В работе с каркасными белками DARPin-G3 [22] также наблюдается высокая специфичность и стабильность молекул после радиоактивного мечения белков радиоизотопом  $^{99m}\text{Tc}$ .

Исходя из этого можно сделать вывод, что радионуклид технеций-99м является перспективным радиоизотопом для диагностики и терапии раковых заболеваний и исследование специфичных таргетных молекул для технеций-99м является актуальным.

### **1.3.2 Молекулярные мишени и таргетные молекулы для создания радиофармацевтических лекарственных препаратов**

Как ядерная визуализация, так и терапия основаны на избирательную доставку радиофармацевтических препаратов в клетки. В контексте визуализации, чем больше мишеней на клетку, тем больше сигнал для этой клетки и тем лучше соотношение сигнала [4].

Антитела могут служить хорошо специфичными таргетными молекулами для высококонтрастной визуализации опухолей, но они слишком велики, чтобы обеспечить быструю кинетику. Таким образом, меньшие фрагменты антител вызывают все больший интерес. В свою очередь короткие



пептиды имеют маленькие размеры и быструю кинетику. Однако, редко обладают высоким сродством, необходимым для молекул-мишеней [23].

На сегодняшний день при создании РФЛП часто используются белки в качестве вектора. Примером могут служить аффибоди и анкириновые белки (DARPin). Оба варианта считается хорошим вектором для связывания с радионуклидом и доставки до мишени.

Молекула аффибоди состоит из трех альфа-спиралей с 58 аминокислотами. Эти белки выдерживают высокую температуру (около 90°C) и кислотно-щелочные условия [24]. Небольшой размер, высокая специфичность и аффинность, быстрое выведение позволяет использовать аффибоди в качестве моноклональных антител для молекулярной визуализации и таргетной терапии [25].

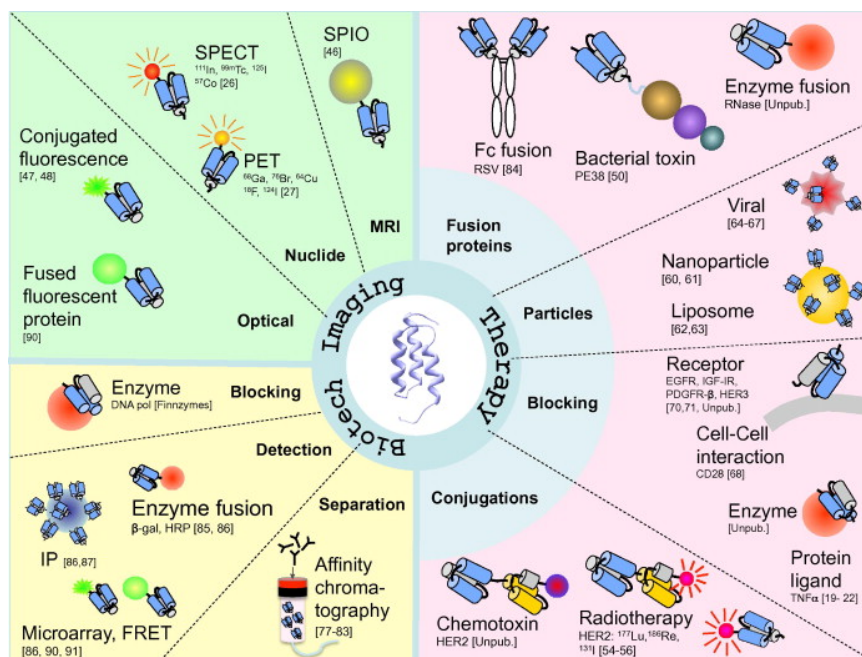


Рисунок 4 – Обзор отдельных применений молекул аффибоди.

Приложения разделены на три области исследований: терапия, визуализация и биотехнология [25]

Общая черта в том, что они специфичны к одним и тем же рецепторам, что дает возможность использовать их в одних и тех же процессах [26].

DARPin являются одним из белков проявляющих высокоспецифичное и высокоаффинное связывание с белком мишенью. DARPin состоят минимум

из трех повторов модулей из которых большинство N- и большинство C-концевых модулей называются кэп (рис. 5).

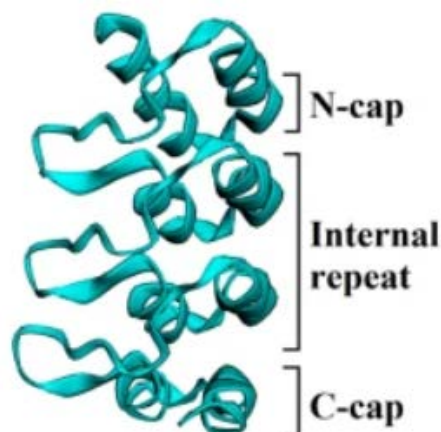


Рисунок 5 – 3D-структура DARPin G3

В зависимости от вида рака и диагностики подбираются разные концевые метки для DARPin. Например, гексагистидиновый ( $\text{His}_6$ ) и гистидин глутаматные  $(\text{HE})_3$  метки позволяют значительно более низкое поглощение печенью при диагностике HER2-положительные опухоли [27].

DARPin проявляют специфическое связывание и высокую аффинность к таким рецепторам, как EGFR (рецептор эпидермального фактора роста 1), ErCam (трансмембранный гликопротеин), HER2 (рецептор эпидермального фактора роста 2) и др.

Рецептор эпидермального фактора роста 1 – EGR трансмембранный рецептор тирозинкиназы, участвующий в регуляции пролиферации, апоптоза и подвижности клеток. EGFR часто используется в качестве биомаркера карциномы легких, молочной железы, предстательной железы, яичников и саркома мягких тканей [28].

У пациентов с плоскоклеточным раком головы и шеи может быть показателем рецидива после лучевой терапии высокий уровень экспрессии EGFR в опухолях, что способствует к выбору гиперфракционированной ускоренной лучевой терапии [29].

Традиционный метод определения уровня EGFR — путем биопсии с последующей иммуногистохимией имеет такие проблемы, как гетерогенность

экспрессии, несоответствие экспрессии EGFR при первичных опухолях и метастазах, неадекватность процедур и антител и изменение статуса EGFR во время терапии. В свою очередь, радионуклидная визуализация может решить многие из этих проблем [28].

Эпителиальная молекула адгезии эпителиальных клеток (EpcAM) сверхэкспрессируется в 40-60% случаев рака предстательной железы (РПЖ) и связана с метастазированием, повышенным риском рецидива РПЖ и устойчивостью к лечению. Исследовано использование DARPin Eс1 для целенаправленной доставки варианта псевдомонадного экзотоксина А (LoPE) с низкой иммуногенностью и низкой неспецифической токсичностью к EpcAM-экспрессирующие клетки рака простаты [30].

У пациентов с раком молочной железы сверхэкспрессия рецептора эпидермального фактора роста человека (HER2) является предиктором плохого прогноза. HER2 является установленной терапевтической мишенью при раке молочной железы. Анти-HER2 терапевтические средства значительно улучшают выживаемость пациентов с раком молочной железы. Однако только 20 % опухолей молочной железы имеют достаточно высокую уровень HER 2 для успешного таргетного лечения. Поэтому точное определение уровня HER2 в опухолях имеет решающее значение для принятия решения о таргетной терапии [31].

## ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1 Объекты исследования

#### 2.1.1 Анкириновые белки DARPin G3

Дарпины представляют собой белки с анкириновыми повторами, каждый из них образует  $\beta$ -поворот и две антипараллельные  $\alpha$ -спирали. Такой повтор образуется из 33 аминокислот, шесть из которых составляет связывающую поверхность. В эти позиции помещаются кодоны случайных аминокислот, кроме цистеина (чтобы не образовались дисульфидные связи), а также глицина и пролина (так как некоторые аминокислоты входят в состав  $\alpha$ -спирали) [26]. Чаще всего, дарпины образованы 2–3 связывающими мотивами, заключенными между N- и C-концевыми мотивами, загораживающими гидрофобные области (рис. 6). Дарпины отличаются от антител высокой стабильностью, хорошей растворимостью и меньшим размером в диапазоне 14-18 кДа. Также у дарпинов наблюдается чрезвычайная термостабильность ( $T_m$ , температура плавления, может достигать  $90^\circ\text{C}$ ), высокая устойчивость к протеазам и денатурирующим агентам. Они могут воспроизводиться в бактериях с высоким выходом – до 200 мг белка с 1 л жидкой культуры [32].

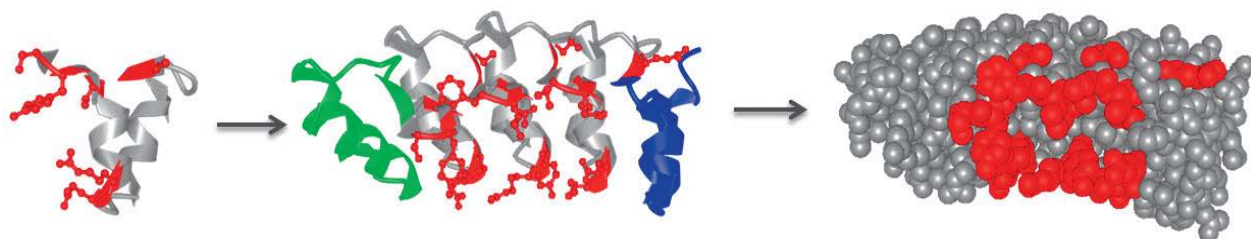


Рисунок 6 – Строение дарпинов. *A* – строение консенсусного анкиринового повтора, константная часть обозначена серым цветом, переменные участки – красным цветом. *B* – строение молекулы дарпина. Два или три центральных мотива формируют связывающую поверхность за счет переменных аминокислот (обозначены красным цветом), гидрофобные участки экранированы C- и N-концевыми мотивами. *C* – пространственная структура дарпина, переменные аминокислоты выделены красным

Исследуемый дарпин G3-E<sub>3</sub>C (рис. 7) специфичный к онкомаркеру HER2/neu. Белок был получен в штамме *Escherichia coli* BL-21(DE3).

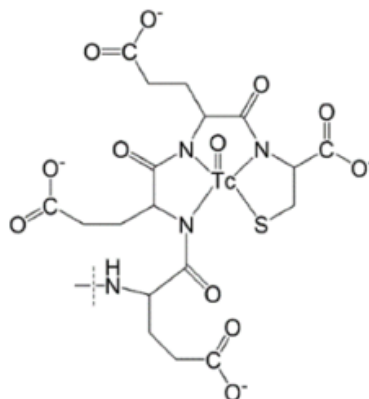


Рисунок 7 – Схематическое изображение комплекса G3-E<sub>3</sub>C

Выделяли белок из клеточной биомассы при помощи металлохелатной аффинной и ионообменной хроматографии. Чистота образца составляла более 97% в соответствии с данными электрофореза в 15% денатурирующем ПААГ в восстанавливающих условиях. Деконволюция данного масс-спектрометра показала, что белок в основном присутствовал в димерной форме (рис. 8).

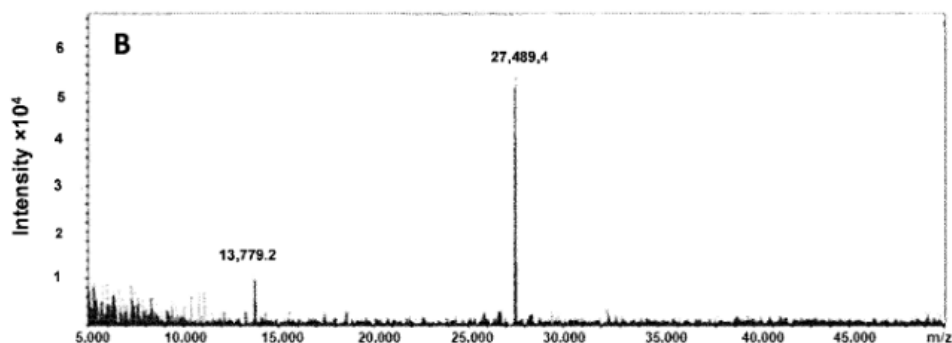


Рисунок 8 – Масс-спектр комплекса G3-E<sub>3</sub>C

Концентрация исходного раствора белка составляла 2,5 мг/мл (определено спектрофотометрически).

Аминокислотная последовательность для G3-E<sub>3</sub>C была DLGKKLLEAARAGQDDEVRLMANGADVNAKDEYGLPLYLATAHGHLEI VEVLLKNGADVNAVDAIGFTPLHLAAFIGHLEIAEVLLKHGADVNAQDKF GKTAFDISIGNGNEDLAEILQKLNQEEEC. Расчетная молекулярная масса составляет 13745,5 Da.

## 2.1.2 Опухолевые клеточные культуры

SKOV-3 представляет собой клеточную линию рака яичников человека с эпителиоподобной морфологией. Эти клетки устойчивы к фактору некроза опухоли и другим цитотоксическим препаратам, таким как дифтерийный токсин, цисплатин и адриамицин. Клеточная линия SKOV-3 образует колонии на мягком агаре, который служит суррогатным тестом на онкогенность. Внутрибрюшинная инъекция этих клеток мышам с ослабленным иммунитетом приводит к росту опухолей, напоминающих светлоклеточную аденокарциному, в течение двух-трех месяцев (рис.9).

Эта клеточная линия была создана в 1973 году из асцита 64-летней женщины европеоидной расы с аденокарциномой яичника [33].

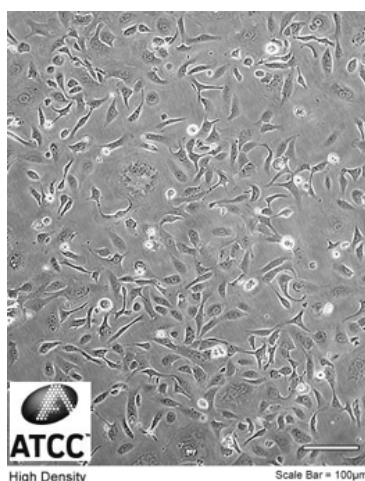


Рисунок 9 – Рак яичников человека – SK-OV-3

Эта клеточная линия была получена G. Trempe и LJ Old в 1970 г. из клеток плеврального выпота пациентки, белой женщины, европеоидной расы, 43 лет, группа крови A+, которая лечилась облучением, стероидами, цитоксаном и 5-фторурацилом.

Ультраструктурные особенности включают микроворсинки и десмосомы, гранулы гликогена, крупные лизосомы, пучки цитоплазматических фибрилл [33].

Клеточная линия SKBR-3 сверхэкспрессирует продукт гена HER2/c-erb-2 (рис. 10).

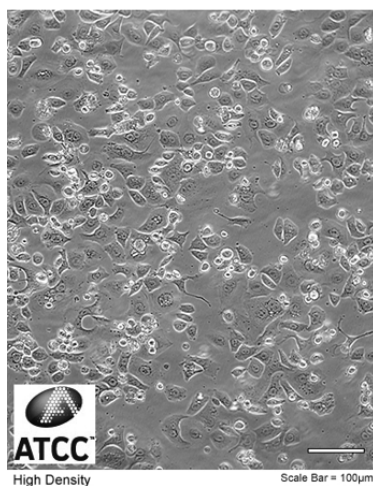


Рисунок 10 – Рак молочной железы человека – SKBR-3

Клеточная линия PC3 была создана в 1979 году из костных метастазов рака предстательной железы IV степени у 62-летнего мужчины европеоидной расы. Эти клетки не реагируют на андрогены, глюкокортикоиды или факторы роста фибробластов, но результаты показывают, что клетки находятся под влиянием эпидермальных факторов роста. Клетки PC3 можно использовать для создания подкожных ксенотрансплантатов опухоли у мышей для исследования окружения опухоли и терапевтического действия лекарств (рис. 11) [33].

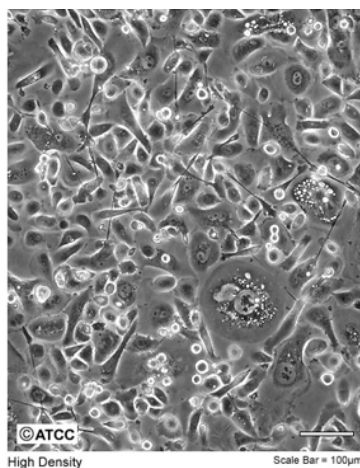


Рисунок 11 – Рак предстательной железы – PC-3

## 2.2 Сырье и материалы

### 2.2.1 Сырье и рабочие материалы

В ходе проведения исследования были использованы следующие рабочие материалы: культуральная среда DMEM/F12 (ПанЭко), культуральная среда RPMI (ПанЭко), эмбриональная телячья сыворотка FBS (Biosera), L-глутамин (ПанЭко), гентамицин (ПанЭко), трипсин (ПанЭко), фосфатный буфер PBS (Sigma), диметилсульфоксид (ПанЭко), трипановый синий (ПанЭко), 0,2 М глициновый буфер, 1 М раствор NaOH.

### **2.2.2 Расходные материалы**

Для выполнения исследования были использованы следующие расходные материалы: культуральные флаконы (75 см<sup>3</sup>, 175 см<sup>3</sup>), одноразовые пластиковые наконечники (10 мкл, 200 мкл, 1000 мкл), серологические пипетки (5 мл, 10 мл), пластиковые пробирки (15 мл, 50 мл), эппендорфы (1,5 мл, 2 мл), культуральные планшеты (6-, 24-, 96-луночные), пластиковые чашки Петри (80\*30 мм), пробирки для гамма-счетчика Artasa SpA.

### **2.3 Приборы и оборудование**

Исследования были выполнены с использованием следующего оборудования: Ламинарный бокс (LamSystems, Neoteric), Термостатируемый CO-2 инкубатор (ThermoScientific), Центрифуга LMC-4200R (BioSan), Вортекс V-1 plus (BioSan), микроскоп МИБ-Р (ООО «Ломо-МА», Россия), флуоресцентный микроскоп Axio Scope A1 (Carl Zeiss), низкотемпературный холодильник (Pozis), водяная баня WB-4MS (Biosan), автоматические дозаторы переменного объема (0,5-10 мкл, 10-50 мкл, 100-1000 мкл, 1-10 мл) (Ленпипет), автоматический гамма-спектрометр Wizard2 2480, ТСХ-сканер (ELYSIARaytest), радиометр активности радионуклидов (РИС-5А



«ДОЗКАЛИБРАТОР»), свинцовые контейнеры для переноски радиоактивных образцов «TISSA-RP» (ООО «Компания САУЛА», Россия).

## **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 [34].

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 см<sup>3</sup> 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 см<sup>3</sup> полной питательной среды и переносится в культуральный флакон;
- v. Подписывается название культуры и дата посева;
- vi. Культуральный флакон помещается в CO<sub>2</sub>-инкубатор (5% CO<sub>2</sub>, влажная атмосфера) [35].

#### **2. Снятие клеток с поверхности культурального флакона:**

- i. Флакон достается из CO<sub>2</sub>-инкубатора через 48 ч. Удаляется питательная среда;
- ii. Клетки промываются раствором PBS объемом 3-4 см<sup>3</sup>;
- iii. Во флакон заливается раствор трипсин-ЭДТА 0,25% объемом 3 см<sup>3</sup>;
- iv. Флакон помещается в CO<sub>2</sub>-инкубатор на 3-5 мин;
- v. С помощью микроскопа проверяется, открепилась ли клетки;
- vi. Добавляется 8 см<sup>3</sup> питательной среды DMEM;

- vii. 10 см<sup>3</sup> суспензии переносятся в центрифужную пробирку, центрифугирование проводится в течение 3 мин при 600 об/мин;
- viii. Удаляется надосадочную жидкость;
- ix. Осадок ресуспендируется в 2 см<sup>3</sup> полной питательной среды;
- x. Количество клеток подсчитывается с помощью камеры Горяева [35].

### 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 см<sup>3</sup> 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 см<sup>3</sup> полной питательной среды DMEM;
- ii. Посев клеток в 96-луночный планшет производится в количестве 0,1 см<sup>3</sup> клеточной суспензии на лунку (3 тыс. клеток в каждой лунке);
- iii. Планшет помещается в CO<sub>2</sub>-инкубатор на 24 ч.

### 5. Внесение соединений в 96-луночный планшет:

- i. Готовится суспензия исследуемых соединений в ДМСО с концентрацией 500 мкг/см<sup>3</sup>;
- ii. Различные концентрации тестируемых соединений вносятся методом раститровки (например, 250; 125; 62,5; 31,3; 15,6; 7,8; 3,9 мкг/см<sup>3</sup>). Каждая концентрация выполняется в нескольких параллелях. Конечный объем среды в лунке составляет 0,1 см<sup>3</sup>;
- iii. Планшет с внесенными соединениями помещается в CO<sub>2</sub>-инкубатор на 23-25 ч.

#### **2.4.2 Разработка и оптимизация радионуклидной таргетной конструкции на основе технеция-<sup>99m</sup> и варианта DARPin G3-E<sub>3</sub>C**

Сайт-специфическое радиоактивное мечение нового варианта [<sup>99m</sup>Tc][Tc=O]<sup>+</sup> с использованием хелаторов, содержащий цистеин, на основе C-концевой аминокислоты, выполняется аналогично методологии, описанной ранее Orojēni et al. [36]. Лиофилизированный набор для мечения, содержащий 75 мг дигидрата хлорида олова (II) (Fluka Chemika, Buchs, Швейцария), 5 мг натриевой соли глюконовой кислоты (Celsus Laboratories, Geel, Belgium) и 100 мкг ЭДТА (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) подготавливается к мечению [22].

В соответствии с общей процедурой мечения один лиофилизированный набор восстанавливается в 100 мкл PBS, смешивается с 75 мкг DARPin G3 в PBS (100 мкл) и добавляется 100 мкл генераторного элюата, содержащего 150–300 МБк <sup>99m</sup>Tc-пертехнетат. Смесь инкубируется при 60 °C в течение 60 мин. После инкубации радиоактивно меченый DARPin выделяется методом эксклюзионной хроматографии на одноразовых колонках NAP-5, предварительно уравнивается и элюируется PBS, содержащим 20 мкг/мл дигидрата хлорида олова (II). Анализ меченных [<sup>99m</sup>Tc]-Tc белков с помощью радио-ITLC проводится в PBS. В этой системе <sup>99m</sup>Tc-меченый DARPin-G3 и восстановленный гидролизованный технеций (RHT) останется в

точке нанесения, а все формы свободных радионуклидов (в том числе  $[^{99m}\text{Tc}]\text{TcO}_4^-$   $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}$ -глюконовая кислота) мигрирует с фронтом растворителя [22].

Для оценки стабильности растворы  $^{99m}\text{Tc}$ -меченого DARPin-G3 (20 мкл, 1,5 мкг) инкубируют в PBS (80 мкл) в течение 1, 2 и 4 ч при 37 °С. Испытание проводится в двух повторностях.

### **2.4.3 Оценка специфичности**

Специфичность связывания было исследовано на трех линиях клеток (SKOV-3, SKBR -3, PC -3). За сутки до эксперимента высевали клетки в 6-луночные планшеты плотностью  $6 \cdot 10^5$  клеток на чашку для каждой линии клеток. Для каждой клеточной линии использовали два набора чашек. К контрольной группе клеток (3 чашки) добавляли 100-кратный избыток немеченого белка DARPin-G3 (500 мкл) за 30 мин до добавления меченого соединения для насыщения рецепторов HER2. К трем другим чашкам добавляли равный объем полной среды. После этого раствор  $^{99m}\text{Tc}$ -меченые DARPins добавляли в каждую чашку до достижения концентрации 1 нМ. Чашки инкубировали при 37 °С 1 ч. Через час среду из заблокированных и неблокированных лунок собирали в разные пробирки. Промывали PBS и собирали в те же пробирки. Клетки снимали 500 мкл трипсином, через 10 минут нейтрализовали клеточной средой и собирали в пробирки. Промывали PBS и собирали в те же пробирки. Из одной пробирки считали количество клеток. Активность фракций, содержащих среду или клетки, измеряли с помощью гамма-спектрометра и рассчитывали процент связанной с клетками активности.

### **2.4.4 Оценка процессинг и интернализации конъюгатов экспрессирующими HER2 клетками SKOV-3**

Для оценки интернализации за 24 часа высевали клетки SKOV – 3 по  $10^6$  клеток на чашку. Для каждой часовой точки (1,2,4,6,24 часа) готовили 3 чашки. Каждую чашку инкубировали 1 нМ горячим раствором 1 час при 37 °С. Подготавливали фракционные пробирки, помеченные для сбора среды (M), кислотной фракции (A) и клеток (C) для каждой временной точки и соединения.

В нужных временных точках (1ч, 2ч, 4ч, 6ч и 24 ч) собирали инкубационную среду в пробирки (M) и промывали клетки PBS и собирали в эти же пробирки. Промывали клетки 0,5 мл 0,2 М глициновом буфером с 4 М мочевиной pH 2,0 и собрали раствор через 5 мин (A), промывали клетки 0,5 мл глициновом буфером и собирали в ту же пробирку (A). Радиоактивность в этой фракции является мембраносвязанной радиоактивностью.

После кислотной промывки добавляли 0,5 мл 1 М раствором NaOH и инкубировали 30 мин при 37°C. Собирали основные растворы в пробирки (B) и еще раз промывали 0,5 мл NaOH и собирали в те же пробирки. С помощью скребков собирали всю радиоактивность из лизата. Радиоактивность в этой фракции является интернализованной радиоактивностью.

Измеряли радиоактивность всех пробирок на гамма-счетчике и рассчитывали активность каждой фракции (% от общей добавленной активности) в соответствующей пробирке.

#### **2.4.5 Оценка аффинности**

Равновесные константы диссоциации ( $K_D$ ) определяли с помощью анализа насыщения (оценка аффинности). Для каждой концентрации тестируемого белка готовили набор из четырех чашек для культивирования клеток с клетками SKOV-3. Три чашки использовали для определения специфического связывания, а одну чашку для культивирования клеток использовали для определения неспецифического связывания путем блокирования рецептора. Клетки высевали за сутки до

эксперимента. Непосредственно перед измерениями среду удаляли и клетки промывали PBS. Были приготовлены восемь концентраций меченого белка (от 0,2 до 40 нМ). Каждую контрольную чашку предварительно насыщали 500 мкл немеченого белка в концентрации 2000 нМ. В остальные чашки набора добавляли только среды с сывороткой (тот же объем) и инкубировали клетки во влажном инкубаторе (5 % CO<sub>2</sub>, 37 °C) в течение 30 мин. К каждому набору клеток добавляли необходимую концентрацию меченого DARPin (4 °C, 500 мкл на чашку) и инкубировали клетки при 4 °C в течение 4 часов. Среду удаляли, клетки промывали PBS (×5), добавляли раствор трипсин-ЭДТА (500 мкл на чашку) и дополнительно инкубировали в течение 10 мин. Отделившиеся клетки разводили 500 мкл полной среды, ресуспендировали и переносили в пробирки для фракций. Из каждой пробирки отбирали по 40 мкл образца для подсчета клеток. Радиоактивность клеток и стандарты меченого белка измеряли с помощью автоматического гамма-счетчика. Реальные концентрации добавляемого радиоактивно меченого белка рассчитывали для каждой точки данных с использованием самой высокой концентрации. Затем клеточная радиоактивность как пмоль/10<sup>5</sup> клеток для каждого образца.

## ГЛАВА 4. ФИНАНСОВЫЙ МЕНЕДЖЕМЕНТ, РЕСУРСОЭФФЕКТИВНОСТЬ И РЕСУРСОСБЕРЕЖЕНИЕ

В данной работе представлена исследование нового радиофармпрепарата на основе белков DARPin G3 с хелатными группами для диагностики опухолей, с использованием культур клеток в качестве биологических моделей. Данная модель *in vitro* имеет ряд преимуществ перед классическими методами с использованием млекопитающих: меньшие временные и денежные затраты. Кроме того, с ее помощью, удастся 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 специфичности, интернализации и аффинности нового радиолиганда 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 5.

Таблица 5 – 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 6 приведена оценочная карта для сравнения конкурентных методов исследований. В таблице  $B_{\phi}$  обозначено разрабатываемое решение,  $B_{k1}$ ,  $B_{k2}$  – конкурентные методы исследований (аналоги): *in vivo* и *ex vivo*, соответственно.

Таблица 6 – Оценочная карта для сравнения конкурентных методов исследований

Критерии оценки	Вес критерия	Баллы			Конкурентоспособность		
		$B_{\phi}$	$B_{k1}$	$B_{k2}$	$K_{\phi}$	$K_{k1}$	$K_{k2}$
1	2	3	4	5	6	7	8
<b>Технические критерии оценки ресурсоэффективности</b>							
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
<b>Экономические критерии оценки эффективности</b>							
5. Затраты	0,3	5	1	4	1,5	0,3	1,2
<b>Итого</b>	<b>1</b>				<b>4,9</b>	<b>2</b>	<b>4,2</b>

Критерии для сравнения и оценки ресурсоэффективности и ресурсосбережения, 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:

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

где  $K$  – конкурентоспособность научной разработки или конкурента;

$B_i$  – вес показателя (в долях единицы);

$\beta_i$  – 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 [37]. SWOT-анализ применяют для исследования внешней и внутренней среды проекта.

Результаты первого этапа SWOT-анализа представлены в таблице 7.

Таблица 7 – Первый этап SWOT-анализа

	<b>Сильные стороны научно-исследовательского проекта:</b> С1. Низкая трудоемкость С2. Малые временные затраты С3. Малые денежные затраты С4. Безопасность для исследователя и окружающей среды С5. Этичность	<b>Слабые стороны научно-исследовательского проекта:</b> Сл1. Сложность экстраполяции данных на целый организм Сл.2 Процесс ненагляден
<b>Возможности:</b> В1. Сохранение жизни многим лабораторным животным на первых этапах исследований В2. Биологическая доступность различных объектов исследования		
<b>Угрозы:</b> 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 8.

Таблица 8 – 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 9.

Таблица 9 – 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	
<b>Возможности:</b>		
B1. Сохранение жизни многим лабораторным животным на первых этапах исследований	C5. Исследования <i>in vitro</i> позволяют получить данные о специфичности вещества 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
<b>Угрозы:</b>		
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 10).

Таблица 10 – 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 10

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 (2):

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

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:

$$T_{pi} = \frac{t_{ожi}}{Ч_i}, \quad (3)$$

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

$t_{ожi}$  – 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 10.

Для удобства построения графика, длительность каждого из этапов работ из рабочих дней следует перевести в календарные дни. Для этого необходимо воспользоваться формулой 4:

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

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 5:

$$k_{\text{кал}} = \frac{T_{\text{кал}}}{T_{\text{кал}} - T_{\text{вых}} - T_{\text{пр}}}, \quad (5)$$

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 11.

Таблица 11 – Временные показатели проведения научного исследования

№	Название работ	Трудоемкость работ			Исполнители	Т <sub>р</sub> , раб. дн.	Т <sub>к</sub> , кал. дн.
		t <sub>min</sub> , чел-дн.	t <sub>max</sub> , чел-дн.	t <sub>ож</sub> , 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 <sup>1</sup>	0,15	0,2
		0,3	1	0,6	К <sup>2</sup>	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 in vitro нового радиофармацевтического лекарственного препарата на основе варианта DARPin G3 с хелатными группами 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 <sup>1</sup>	4,1	4,8



Продолжение таблицы 11

11	Разработка СО	7	10	8,2	М	4,1	4,8
		7	10	8,2	К <sup>2</sup>	4,1	4,8
12	Разработка ИЯ	7	10	8,2	М	4,1	4,8
		7	10	8,2	К <sup>3</sup>	4,1	4,8
13	Составление пояснительной записки	10	15	12	М	12	14,2

Р – руководитель;

М – магистр;

К<sup>1</sup> – консультант по экономической части;

К<sup>2</sup> – консультант по социальной ответственности;

К<sup>3</sup> – 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 12.

Таблица 12 – Календарный план-график проведения НИОКР

Вид работы	Исполнители	T <sub>кi</sub> , 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 in vitro исследований	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

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) [38]. Материальные затраты и затраты на оборудование для данного НТИ представлены в таблицах 13-14.

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 17.

Таблица 13 – Материальные затраты

	Ед. измер	Количество	Цена за ед. руб.	Сумма, руб.
Клеточная линия SKOV-3	шт. (криопробирка)	1	124550,00	124550,00
Клеточная линия SKBR-3	шт. (криопробирка)	1	70560,00	70560,00
Клеточная линия PC-3	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
6-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
<b>Сумма</b>				<b>303066,54</b>

Таблица 14 – 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
<b>Итого</b>			<b>3134500,00</b>

Для оборудования нужно рассчитать величину годовой амортизации по следующей формуле:

$$A = \frac{C_n \cdot N_a \cdot n}{100 \cdot k}, \quad (6)$$

где  $C_n$  – первоначальная стоимость оборудования;

$N_a$  – норма амортизации, %;

$n$  – количество дней использования оборудования;

$k$  – количество рабочих дней в году (2022 год – 247 раб. дней).

Результаты расчетов приведены в таблице 15.

Таблица 15 – Расчет затрат по статье «Амортизация оборудования»

Наименование оборудования	$C_n$ , руб	$N_a$ , %	$n$ , 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
<b>Итого</b>				<b>46463,97</b>

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

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

где  $Z_{осн}$  – 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:

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

Среднедневная заработная плата рассчитывается по формуле:

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

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

$M$  – количество месяцев работы без отпуска в течение года:

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

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

$F_d$  – действительный годовой фонд рабочего времени научно-технического персонала, раб. дн. (табл. 16).

Таблица 16 – Баланс рабочего времени

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

Месячный должностной оклад работника:

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

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 17.

Таблица 17 – Расчет основной заработной платы

Исполнители	З <sub>тс</sub> , руб	к <sub>пр</sub>	к <sub>д</sub>	к <sub>р</sub>	З <sub>м</sub> , руб	З <sub>дн</sub> , руб	Т <sub>р</sub> , раб.дн.	З <sub>осн</sub> , 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 18.

Таблица 18 – Общая заработная плата исполнителей

Исполнитель	З <sub>осн</sub> , руб.	З <sub>доп</sub> (12 %), руб.	З <sub>зн</sub> , 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
<b>Итого</b>	<b>110627,17</b>	<b>13275,26</b>	<b>123902,43</b>

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:

$$Z_{внеб} = k_{внеб} \cdot (Z_{осн} + Z_{доп}), \quad (11)$$

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

Тарифы страховых взносов в 2023 году остались на прежнем уровне в соответствии с постановлением Правительства РФ от 26.11.2015 № 1265 [39], 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 19.

Таблица 19 – 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	
<b>Итого</b>	<b>37170,73</b>	

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:

$$Z_{\text{накл}} = (\text{сумма статей } 1 \div 5) \cdot k_{\text{нр}}, \quad (12)$$

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 20.

Таблица 20 – Бюджет затрат на научно-исследовательский проект

Наименование статьи	Сумма, руб.	Примечание
1. Материальные затраты НТИ	303066,54	Табл. 19
2. Затраты на специальное оборудование для научных работ (амортизация)	46463,97	Табл. 21

Продолжение таблицы 20

3. Затраты по основной заработной плате исполнителей темы	110627,17	Табл. 24
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
<b>Итого: бюджет затрат НИИ</b>	<b>592300,26</b>	<b>Сумма ст. 1-7</b>

Для наглядности данные из таблицы 20 представлены в виде круговой диаграммы:

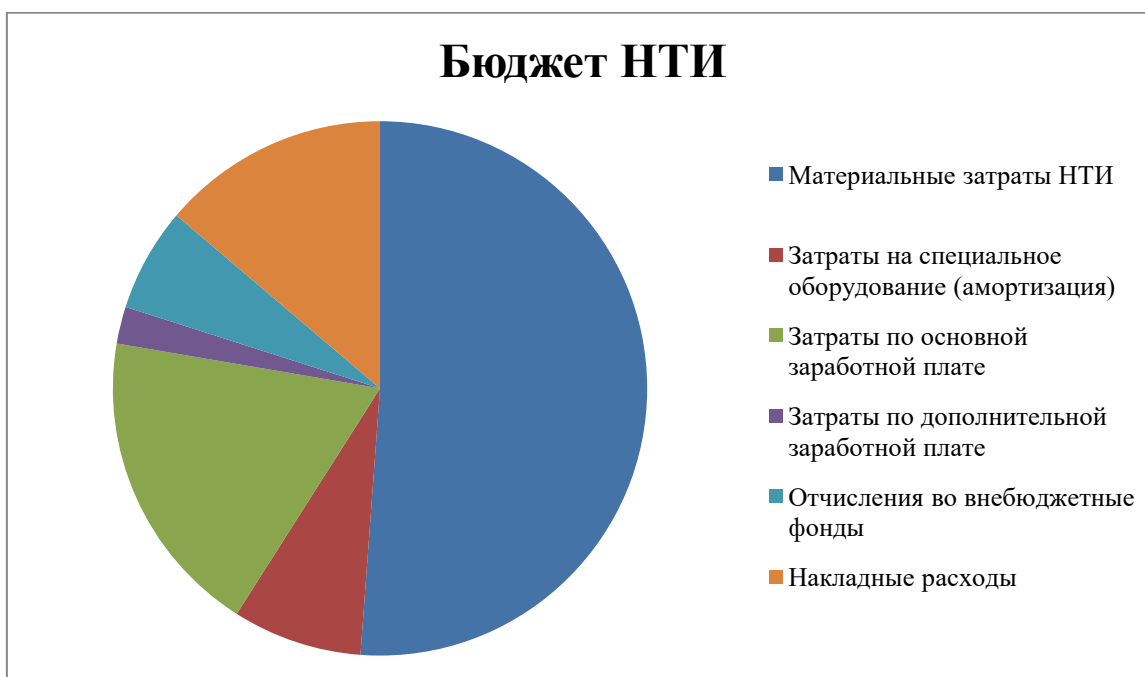


Рисунок 16 – Бюджет затрат на научно-исследовательский проект

Как видно из рисунка 16, основные затраты НИИ приходятся на материальные затраты для проведения НИИ.

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

Определение эффективности происходит на основе расчета интегрального показателя эффективности научного исследования [40]. Его нахождение связано с определением двух средневзвешенных величин: финансовой эффективности и ресурсоэффективности.

**Интегральный финансовый показатель** разработки определяется как:

$$I_{финр}^{исп.i} = \frac{\Phi_{pi}}{\Phi_{max}}, \quad (13)$$

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

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

$\Phi_{max}$  – максимальная стоимость исполнения научно-исследовательского проекта.

Полученная величина интегрального финансового показателя разработки отражает соответствующее численное увеличение бюджета затрат разработки в разгах (значение больше единицы), либо соответствующее численное удешевление стоимости разработки в разгах (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 (14) (таблица 21):

$$I_{pi} = \sum a_i \cdot b_i, \quad (14)$$

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 21 – 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** ( $I_{исп.i}$ ) определяется на основании интегрального показателя ресурсоэффективности и интегрального финансового показателя по формуле:

$$I_{исп.1} = \frac{I_{р-исп1}}{I_{финр.1}}, \quad (15)$$

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

$$\mathcal{E}_{ср} = \frac{I_{исп.1}}{I_{исп.2}}, \quad (16)$$

Таблица 22 – 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
3	Интегральный показатель эффективности	4,1	0,8	3,0

Продолжение таблицы 22

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: «Изучение *in vitro* нового радиофармацевтического лекарственного препарата на основе варианта DARPin G3 с хелатными группами на основе глутаминовой кислоты и цистеина».

Объект исследования – HER2 направленные сконструированные белки DARPin G3 с хелатными группами.

Цель исследования: *in vitro* исследование нового радиофармацевтического лекарственного препарата на основе варианта DARPin G3 с хелатными группами на клеточных линиях SKOV-3, SKBR-3 и PC-3.

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 Правовые и организационные вопросы обеспечения безопасности**

#### **5.1.1 Специальные правовые нормы трудового законодательства**

В России для регулирования правил охран труда используется трудовой кодекс Российской Федерации. Согласно ТК РФ статьи 91 и 111, нормальная продолжительность рабочего времени не может превышать 40 часов в неделю.

Так же всем работникам предоставляются выходные дни (еженедельный непрерывный отдых). При пятидневной рабочей неделе работникам предоставляются два выходных дня в неделю, при шестидневной рабочей неделе - один выходной день. В течение рабочего дня (смены) работнику должен быть предоставлен перерыв для отдыха и питания продолжительностью не более двух часов и не менее 30 минут, который в рабочее время не включается [41].

Все научные работы проводятся в исследовательской лаборатории научного парка ТПУ, включая работы с радиоактивными растворами. Лицензия на право осуществления деятельности в области использования техногенных источников ионизирующего излучения не требуется, так как активность техногенного радионуклида в открытом радионуклидном источнике на любом рабочем месте не превышает его минимально значимой активности (МЗА), а суммарная активность техногенного радионуклида в открытых радионуклидных источниках в организации не превышает 10 МЗА [42].

Для обеспечения условий, при которых радиационное воздействие будет ниже допустимого, с учетом достигнутого в организации уровня радиационной безопасности, администрацией организации дополнительно устанавливаются контрольные уровни (дозы, уровни активности, плотности потоков и др.) [43].

Весь лабораторный персонал, работающий с радионуклидами или подвергающийся их воздействию, должен быть проинструктирован и обучен технологиям, основанным радиации или сопряженным с ней, а также защите от радиации, и должен следовать правилам и процедурам радиационной безопасности [44].

## 5.1.2 Эргономические требования к правильному расположению и компоновке рабочей зоны

Рабочее место должно быть организовано с учетом эргономических требований согласно ГОСТ 12.2.032-78 «ССБТ. Рабочее место при выполнении работ сидя. Общие эргономические требования» [45].

Основными компонентами рабочего пространства лаборанта являются ламинарный шкаф, лабораторный стол, стул, лабораторные приборы (дозатор, растворы для работы с культурами клеток, пластиковые флаконы и т.д.). Основное рабочее положение сидя. Рабочий стул должен быть поворотным и регулируемым, по углам наклона, по высоте сидения, по расстоянию между спинкой и передним краем сидения.

Работа ведется двумя руками и лабораторные приборы в ламинарном шкафу размещаются с таким расчетом, чтобы не было перекрещивание рук.

Размещение используемых приборов и предметов в ламинарном шкафу ведется с учетом того, как часто используется во время определенной работы и рекомендуется размещать как на рисунке 17.

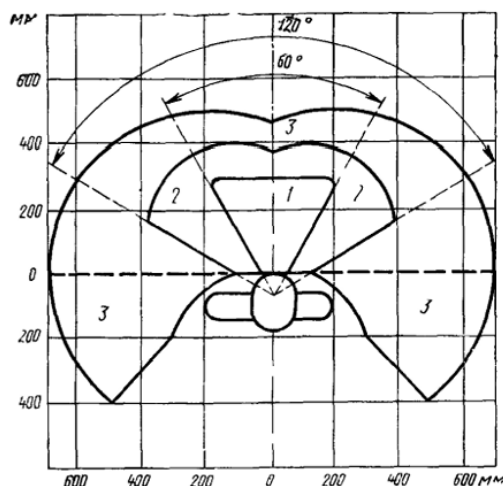


Рисунок 17 - Зоны для выполнения ручных операций и размещения органов управления

1 — оптимальная зона моторного поля; 2 — зона легкой досягаемости моторного поля; 3 — зона досягаемости моторного поля

## 5.2 Производственная безопасность

### 5.2.1 Анализ выявленных вредных факторов

Все вредные и опасные факторы, воздействующие на работника лаборатории, можно классифицировать следующим образом [46] на факторы, порождаемые: физическими, химическими и биологическими свойствами материалов.

Перечень вредных и опасных факторов, возникающий при данных исследованиях в лаборатории, представлен в таблице 23.

Таблица 23 – Возможные вредные и опасные факторы, возникающие в лаборатории при *in vitro* исследовании радиофармпрепарата

Факторы (ГОСТ 12.0.003-2015)	Нормативные документы
Недостаточная освещенность	СНиП 23-05-95*. Естественное и искусственное освещение [47]
Отклонение показателей микроклимата в помещении	СанПиН 1.2.3685-21. Гигиенические нормативы и требования к обеспечению безопасности и (или) безвредности для человека факторов среды обитания [48]
Превышение уровня шума	ГОСТ 12.1.003-2014 Система стандартов безопасности труда. Шум. Общие требования безопасности [49]
Вибрация	ГОСТ 12.1.012-2004 Система стандартов безопасности труда. Вибрационная безопасность. Общие требования [50]
Защита от токсикантов	ГН 2.2.5.3532–18. Предельно допустимые концентрации (ПДК) вредных веществ в воздухе рабочей зоны [51]
Физические и нервно-психические перегрузки	СП 2.4.3648-20 «Санитарно-эпидемиологические требования к организации воспитания и обучения, отдыха и оздоровления детей и молодежи [52]
Радиоактивное загрязнение	СП 2.6.1.2612-10 Основные санитарные правила обеспечения радиационной безопасности (ОСПОРБ 99/2010) [53]
Поражение электрическим током	ГОСТ 12.1.019-2017 Система стандартов безопасности труда. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты [54]
Работа с клеточными культурами	ГОСТ Р 52905-2007 (ИСО 15190:2003) Лаборатории медицинские. Требования безопасности [44]



### 5.2.1.1 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\* [47] 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 [47] необходимо создать освещенность от 300 до 500 лк.

Площадь помещения:

$$S = A \cdot B, \quad (1)$$

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  $\rho_{\Pi} = 70\%$ . Коэффициент запаса, учитывающий загрязнение светильника, для помещений с малым выделением пыли равен  $K_z = 1,5$ . 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  $\lambda$ , 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:

$$h = h_n - h_p, \quad (2)$$

где  $h_n$  – высота светильника над полом, высота подвеса,

$h_p$  – высота рабочей поверхности над полом.

$$h_n = H - h_c. \quad (3)$$

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:

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

Число рядов светильников в помещении:

$$N_b = B / L = 3 / 2,8 = 1,07 \approx 1. \quad (5)$$

Число светильников в ряду:

$$N_a = A / L = 5 / 2,8 = 1,8 \approx 2. \quad (6)$$

Общее число светильников:

$$N = N_a \cdot N_b = 1 \cdot 2 = 2. \quad (7)$$

Расстояние от светильников до стены определяется по формуле:

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

Потребный световой поток группы люминесцентных ламп светильника определяется по формуле:

$$\Phi_{\Pi} = (E_n \cdot S \cdot K_z \cdot Z) / (N \cdot \eta), \quad (9)$$

где  $E_n$  – нормируемая минимальная освещённость по СНиП 23-05-95, лк;

$S$  – площадь освещаемого помещения, м<sup>2</sup>;

$K_z$  – коэффициент запаса, учитывающий загрязнение светильника;

$Z$  – коэффициент неравномерности люминесцентных ламп;

$N$  – число люминесцентных ламп в помещении;

$\eta$  – коэффициент использования светового потока.

$\eta$  определяем через индекс помещения:

$$i = \frac{S}{h \cdot (A+B)} = \frac{15}{2 \cdot (5+3)} = 0,94. \quad (10)$$

Коэффициент использования светового потока, показывающий какая часть светового потока ламп попадает на рабочую поверхность, для

светильников типа ОД с люминесцентными лампами при  $\rho_{\Pi} = 70\%$ ,  $\rho_{С} = 50\%$  и индексе помещения  $i = 0,94$  равен  $\eta = 0,48$ .

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

Делаем проверку выполнения условия:

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

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

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:

$$5000 = L_1 + 2/3 \cdot L_1 + 2 \cdot 1230; L_1 = 1524 \text{ мм}; L_1/3 = 508 \text{ мм.} \quad (11)$$

На рисунке 18 изображен план помещения и размещения светильников с люминесцентными лампами.

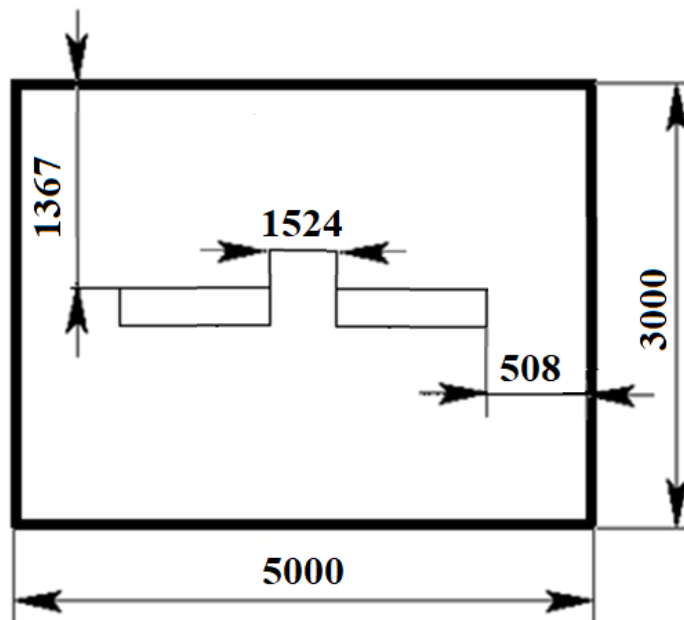


Рисунок 18 – План помещения и размещения светильников с люминесцентными лампами

### 5.2.1.2 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 1.2.3685-21. Гигиенические нормативы и требования к обеспечению безопасности и (или) безвредности для человека факторов среды обитания [48].

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 1.2.3685-21 приведены в таблице 24. Таблица 24 – 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 м<sup>2</sup>, объем составляет 52,5 м<sup>3</sup>. На основании документа Постановления Главного государственного санитарного врача РФ 2.2.3670-20 «Санитарно-эпидемиологические требования к условиям труда» [55] нормы составляют 4,5 м<sup>2</sup> площади и 15 м<sup>3</sup> 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 СП 60.13330.2020 «Отопление, вентиляция и кондиционирование воздуха» [56] объем воздуха необходимый на одного человека в помещении с естественным проветриванием должен быть не менее 30 м<sup>3</sup>. В нашем случае объем воздуха на одного работающего человека составляет 52,5 м<sup>3</sup>, 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 °С, а в теплое время года – за счет проветривания.

По данным замеров температура воздуха в рабочей зоне экспериментального участка в теплый период года 21-23°С, в холодный период года 18-20°С, относительная влажность воздуха 60-75%, скорость движения воздуха 0,1 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 [57].

### **5.2.1.3 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 дБ. Нормативное значение, согласно ГОСТ 12.1.003-2014 [49], 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. [57].

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.

#### **5.2.1.4 Превышение уровня вибрации**

Источниками вибрации в лаборатории являются центрифуга, встряхиватель медицинский (вортекс). Вибрация на человека способствует в повышении утомляемости, увеличению времени двигательной и зрительной реакции, нарушении вестибулярных реакций и координации движений. Требование к вибрационным характеристикам приборов указано в ГОСТ 12.1.012-2004 [50].

При работе с центрифугой всегда используется противовес для работы с растворами в пробирках, для правильной работы оборудования, тем самым предотвращает повышение уровня вибрации.

При использовании вортекса при правильной настройке скорости для разных объемов можно избежать повышение вибрации оборудования.

Специальные средства защиты от вибрации в лаборатории не используются.

### **5.2.1.5 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 [51] представлены в таблице 25.

Таблица 25 – Перечень вредных и опасных веществ, применяемых в исследовании

Вещество	Величина ПДК, мг/м <sup>3</sup>	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 [55]	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.

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 [44].

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.

#### **5.2.1.6 Психофизиологические факторы**

Психофизиологические опасные и вредные производственные факторы, делятся на: физические перегрузки (статические, динамические) и нервно-психические перегрузки (умственное перенапряжение, монотонность труда, эмоциональные перегрузки). Трудовая деятельность работников непроизводственной сферы относится к категории работ, связанных с использованием больших объемов информации, с применением компьютеризированных рабочих мест, с частым принятием ответственных решений в условиях дефицита времени, непосредственным контактом с людьми разных типов темперамента и т.д. Это обуславливает высокий уровень нервно-психической перегрузки, снижает функциональную активность центральной нервной системы, приводит к расстройствам в ее деятельности,

развития утомления, переутомления, стрессу. Наиболее эффективные средства предупреждения утомления при работе на производстве – это средства, нормализующие активную трудовую деятельность человека. На фоне нормального протекания производственных процессов одним из важных физиологических мероприятий против утомления является правильный режим труда и отдыха [52].

## **5.2.2 Анализ выявленных опасных факторов**

### **5.2.2.1 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 [54]. 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 [58].

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

Если произошло поражение электрическим током работника лаборатории необходимо:

1. Исключить опасность для себя;
2. Отключить электроустановку ближайшим рубильником;
3. Обезопасить возможное падение пострадавшего;
4. Вызовите скорую помощь по номеру 103 или 112.

Если быстро отключить установку не удастся, немедленно отделите пострадавшего от токоведущей части.

### **5.2.2.2 Радиоактивное загрязнение**

В лаборатории ведется работы с радиоактивными растворами, но радиоактивная активность не превышает нормы, как указано в [42]. Тем не менее есть опасность при работе с радиоактивными растворами, такие как

загрязнение рабочего места при переносе из радиоактивного стока часть раствора, загрязнение перчаток и касание этими перчатками волосы или одежду. Также при работе с радиоактивным раствором следует использовать свинцовые контейнеры, так как через пластиковые пробирки можно подвергаться излучению (даже меньше нормы).

При работе с радиоактивными растворами нужно использовать медицинские перчатки, лабораторный халат, лабораторную сменную обувь, свинцовые контейнера и четко регламентированное время работы с источниками.

Если при работе с радиоактивный раствор происходит разлив раствора в рабочем месте необходимо:

1. Убрать и закрыть пробирку с радиоактивным раствором;
2. Вытереть место разлива бумажной салфеткой;
3. Обработать место разлива 10 % щелочным раствором;
4. Снять перчатки и тщательно обработать руки мыльным раствором.

### **5.3 Экологическая безопасность**

В ходе работы используются химические соединения, которые могут оказывать вредное влияние на окружающую среду [56], однако это может происходить лишь при значительных потерях веществ (испарения) в атмосферу, а поскольку для анализа используются небольшие количества соединения, то воздействие на окружающую среду отсутствует.

Вредное воздействие на гидросферу [57] может оказывать химическое, биологическое и радиоактивное загрязнение водотоков в результате удаления биологических, радиоактивных и органических отходов в канализационную сеть населенных пунктов. Раздельный сбор отходов признан основным стратегическим способом снижения остроты экологических проблем. Применительно к лабораторным отходам данного исследования предлагается выделить следующие виды сливов:

- сливы для биологических клеток (остатки клеток, мертвые клетки, использованная питательная среда);
- сливы для радиоактивных растворов (они содержится в определенных сосудах до примерного времени полураспада). В работе используется радиоактивный технеций-99м время полураспада, у которого составляет 6 часов.

В ходе исследования в лаборатории образуются твердые отходы в виде бытового мусора, выбрасываемого в урну, пластик и перегоревшие люминесцентные лампы. Утилизация люминесцентных ламп заключается в их передаче перерабатывающим предприятиям, которые имеют специальное оборудование для переработки вредных ламп в безвредное сырье – сорбент, которое может являться материалом для других производств. Согласно ГОСТ Р 57740-2017 [59] и ГОСТ Р 51768-2001 [60] отработанные люминесцентные лампы относятся к отходам, которые собираются и сортируются отдельно, поэтому их утилизация и хранение должны отвечать определенным требованиям.

В ходе деятельности организация также создает бытовой мусор (канцелярские, пищевые отходы, искусственные источники освещения), который должен быть утилизирован в соответствии с определенным классом опасности или переработан, чтобы не оказывать негативное влияние на состояние литосферы.

## **5.4 Безопасность в чрезвычайных ситуациях**

### **5.4.1 Анализ возможных ЧС, которые могут возникнуть в лаборатории при проведении исследований**

При проведении исследования возможно возникновение следующего вида возможного ЧС: возникновение очагов пожара, природная – сильные морозы зимой (аварии на электро-, тепло- коммуникациях, водоканале).

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.

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 [61].

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 бензоэлектростанции;

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.

#### **5.4.2 Анализ наиболее типичных ЧС, которые могут возникнуть в лаборатории при проведении исследований**

Вследствие несоблюдения правил технической безопасности, источником возникновения пожара, как наиболее типичной ЧС, может послужить не правильное обращение с электрическими приборами (автоклав РАУРА АНС-50 N) возможно возникновение пожара. При возникновении пожара необходимо незамедлительно обратиться в службу спасения. Затем оповестить персонал о возникновении пожара нажатием на кнопку сигнализации. При опасности поражения электротоком, помещение необходимо обесточить. После чего можно приступать к тушению пожара. При тушении пожара, вызванного указанными химическими веществами, применяют порошковые, пенные, и углекислотные огнетушители, а также песок. Для тушения электрооборудования применяют углекислотные огнетушители. На основании Федерального закона от 22.07.2008 N 123-ФЗ (ред. от 30.04.2021) "Технический регламент о требованиях пожарной безопасности" помещения лабораторий оборудованы следующими средствами пожаротушения: огнетушитель ручной углекислотный ОУ-5, пожарный кран с рукавом, также каждое помещение оборудовано системой противопожарной сигнализации [62].

Для предупреждения пожара 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 [63] и СП 60.13330.2020 [56];

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 [62], пенные огнетушители ТУ 22-4720-80 [64], 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 19, порошковых огнетушителей с поверенным клеймом, табличек с указанием направления к запасному (эвакуационному) выходу. На рабочих местах регулярно проводятся инструктажи.



Рисунок 19 – План эвакуации

### Вывод по разделу

В данном разделе рассмотрены правовые и организационные вопросы обеспечения безопасности работы при выполнении исследования, выявлены вредные и опасные факторы физической, химической и биологической природы, а также разработаны мероприятия по снижению или ликвидации действия данных факторов на работников лаборатории.

Были рассмотрены нормативы микроклимата, освещения, шума, электробезопасности помещения. Исходя из полученных данных можно утверждать, что оно соответствует требованиям законодательства РФ. Так же были рассмотрены аспекты экологической, производственной безопасности,

безопасности в чрезвычайных ситуациях в виде описания мероприятий по предотвращению.

Значение всех производственных факторов на изучаемом рабочем месте соответствует нормам, которые также были продемонстрированы в данном разделе, за исключением фактора, обладающего свойствами психофизиологического воздействия на организм человека. Для минимизации влияния данного фактора на организм человека, достаточно соблюдать меры, приведенные в МР 2.2.9.2311 – 07 «Профилактика стрессового состояния работников при различных видах профессиональной деятельности» [53]. Категория помещения по электробезопасности, согласно ПУЭ, соответствует первому классу – «помещения без повышенной опасности» [66]. Согласно правилам по охране труда при эксплуатации электроустановок персонал должен обладать I группой допуска по электробезопасности. Присвоение группы I по электробезопасности производится путем проведения инструктажа, который должен завершаться проверкой знаний в форме устного опроса и (при необходимости) проверкой приобретенных навыков безопасных способов работы или оказания первой помощи при поражении электрическим током [54]. Категория тяжести труда в лаборатории по СанПиН 1.2.3685-21 "Гигиенические нормативы и требования к обеспечению безопасности и (или) безвредности для человека факторов среды обитания" относится к категории Ib (работы, производимые сидя, стоя или связанные с ходьбой и сопровождающиеся физическим напряжением) [48]. Помещение лаборатории категории помещения группы А, возможный класс пожара В. Характеристика веществ и материалов, находящихся в помещении: горючие газы, легковоспламеняющиеся жидкости с температурой вспышки не более 28 °С в таком количестве, что могут образовывать взрывоопасные парогазовоздушные смеси, при воспламенении которых развивается расчетное избыточное давление взрыва в помещении, превышающее 5 кПа, и (или) вещества и материалы, способные взрываться и гореть при взаимодействии с водой, кислородом воздуха или друг с другом, в таком

количестве, что расчетное избыточное давление взрыва в помещении превышает 5 кПа [68].

Рассмотренный объект, оказывающий незначительное негативное воздействие на окружающую среду, относится к объектам III категории [69].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты данного исследования показали, что таргетная конструкция на основе каркасного белка DARPIn G3 и  $^{99m}\text{Tc}$  продемонстрировала специфическое и высокоаффинное связывание с HER2-экспрессирующими раковыми клетками человека *in vitro*,

Блокирование рецепторов путем добавления большого избытка немеченого DARPIn-G3 достоверно снизила связывание радиоактивно меченого варианта DARPIn-G3 с клеточными линиями с высокой экспрессией HER2 (SKOV-3 и SK-BR-3).

Валидация теста интернализации [ $^{99m}\text{Tc}$ ]-Tc-G3-E<sub>3</sub>C показала, что менее 5% активности было связано с клетками после 2-часовой инкубации на льду и последующей промывки кислотой. Количество интернализованной активности достигало плато через 6 ч после начала инкубации. В то же время общая клеточно-ассоциированная активность достигала максимума к 4–6 ч и затем снижалась.

В результате оценки аффинности четко наблюдался насыщающий характер связывания [ $^{99m}\text{Tc}$ ]-Tc-G3-E<sub>3</sub>C с HER2-экспрессирующими клетками SKOV-3.

Таким образом, использование таргетных агентов на основе  $^{99m}\text{Tc}$  и DARPIn-хелат (N3S) для дальнейших исследований является перспективным.

Основные положения работы были опубликованы в журнале *Int. J. Mol. Sci.* в 2022 году [22] и представлены на Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2023», XXIV Международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых «Химия и химическая технология в XXI веке» имени профессора Л.П. Кулёва и III Международной научно-практической конференции «Научная инициатива иностранных студентов и аспирантов».

В результате работы над разделом «Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение» был рассчитан бюджет для

проведения научного исследования. Определены возможные возможности и угрозы, а также сильные и слабые стороны проекта.

В рамках раздела «Социальная ответственность» была проведена оценка вредных и опасных факторов. После анализа нормативной документации были рассмотрены две чрезвычайные ситуации, а также меры по их предупреждению и минимизации последствий.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Чернов В. И. Инновационные радиофармпрепараты для диагностики и лечения злокачественных новообразований // Онкологический журнал: лучевая диагностика, лучевая терапия. – 2020. – Т. 3. – №. 4. – С. 26-38.
2. Ibrahim T. Hormonal receptor, human epidermal growth factor receptor-2, and Ki67 discordance between primary breast cancer and paired metastases: clinical impact // *Oncology*. – 2013. – Vol. 84, №. 3. – P. 150-157.
3. Подрезова Е. В. Технологические основы получения [omega]-дипиридил замещенных кислот для производства радиофармпрепаратов на основе технеция-99м: дис. – 2021.
4. Lewis J. S., Windhorst A. D., Zeglis B. M. (ed.). *Radiopharmaceutical Chemistry*. – Springer, 2019.
5. Cherry S. R. et al. Total-body imaging: transforming the role of positron emission tomography // *Science translational medicine*. – 2017. – Т. 9. – №. 381. – С. 61-69.
6. Surti S. Update on time-of-flight PET imaging // *Journal of Nuclear Medicine*. – 2015. – Т. 56. – №. 1. – С. 98-105.
7. Mankoff D. A. et al. Tumor receptor imaging // *Journal of Nuclear Medicine*. – 2008. – Т. 49. – №. 2. – С. 149-163.
8. Vallabhajosula S. *Molecular imaging: radiopharmaceuticals for PET and SPECT*. – Springer Science & Business Media, 2009.
9. Черняев А. П., Колыванова М. А., Борщеговская П. Ю. Радиационные технологии в медицине. Часть 1. Медицинские ускорители // Вестник Московского университета. Серия 3. Физика. Астрономия. – 2015. – №. 6. – С. 28-36.
10. Егорова Б. В. Комплексообразование  $Ac3+$ ,  $Eu3+$ ,  $Lu3+$ ,  $Y3+$ ,  $Bi3+$ ,  $Cu2+$ ,  $Pb2+$  пиридин-и фенил-содержащими азакраун-эфирами: дис. – Моск. гос. ун-т им. МВ Ломоносова, 2016.

11. Арсвольд Д., Верник М. Эмиссионная томография. Основы ПЭТ и ОФЭКТ/Emission Tomography: The Fundamentals of PET and SPECT // М.: Техносфера, 2009.—612 с. – 2009.
12. Ларенков А. А., Брускин А. Б., Кодина Г. Е. Получение препаратов  $^{68}\text{Ga}$  высокой химической и радиохимической чистоты для позитронно-эмиссионной томографии: дис. – Моск. гос. ун-т им. МВ Ломоносова, 2015.
13. Бадун Г. А. Производство изотопов и ядерная медицина–URL: <https://teachin.ru/file/synopsis/pdf/isotope-and-medicine-M.pdf> (дата обращения: 26.04. 2023) // Текст: электронный.
14. Грицкевич А. А., Мишугин С. В., Русаков И. Г. Возможности применения радия-223 в лечении рака предстательной железы // Медицинский совет. – 2017. – №. 6. – С. 118-122.
15. Каприн А. Д. и др. Терапия препаратом радий-223 больных с костными метастазами кастрационно-резистентного рака предстательной железы // Медицинский совет. – 2018. – №. 10. – С. 78-82.
16. Джолумбетов С. К., Жуковский М. В. Обоснование использования перспективных радиофармпрепаратов на основе лютеция-177 // Физика. Технологии. Инновации (ФТИ-2019).—Екатеринбург, 2019. – 2019. – С. 974-975.
17. Гелиашвили Т. М. и др. ПСМА-таргетная радиолигандная терапия радиофармацевтическим лекарственным препаратом  $^{177}\text{Lu}$ -ПСМА-617 пациента с метастатическим кастрационно-резистентным раком предстательной железы //Онкологический журнал: лучевая диагностика, лучевая терапия. – 2023. – Т. 6. – №. 1. – С. 88-96.
18. Гарбузов П. И. и др. Радиойодтерапия рака щитовидной железы //Практическая онкология. – 2007. – Т. 8. – №. 1. – С. 42-45.
19. Тищенко В. К. и др. Остеотропные радиофармацевтические препараты на основе фосфоновых кислот и  $^{68}\text{Ga}$  (обзор) // Радиация и риск (Бюллетень Национального радиационно-эпидемиологического регистра). – 2020. – Т. 29. – №. 1. – С. 102-119.



20. Oroujeni M. et al. Preclinical evaluation of  $^{99m}\text{Tc}$ -ZHER2: 41071, a second-generation affibody-based HER2-visualizing imaging probe with a low renal uptake // *International journal of molecular sciences*. – 2021. – Т. 22. – №. 5. – С. 2770.
21. Брагина О. Д. и др. Разработка высокоспецифичного радиохимического соединения на основе меченых  $^{99m}\text{Tc}$  рекомбинантных адресных молекул для визуализации клеток с гиперэкспрессией Her-2/neu // *Бюллетень сибирской медицины*. – 2017. – Т. 16. – №. 3. – С. 25-33.
22. Larkina M. et al. Comparative Preclinical Evaluation of Peptide-Based Chelators for the Labeling of DARPIn G3 with  $^{99m}\text{Tc}$  for Radionuclide Imaging of HER2 Expression in Cancer // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2022. – Т. 23. – №. 21. – С. 13443.
23. Orlova A. et al. Tumor imaging using a picomolar affinity HER2 binding affibody molecule // *Cancer research*. – 2006. – Т. 66. – №. 8. – С. 4339-4348.
24. Ahlgren S. et al. Targeting of HER2-expressing tumors with a site-specifically  $^{99m}\text{Tc}$ -labeled recombinant affibody molecule, ZHER2: 2395, with C-terminally engineered cysteine // *Journal of Nuclear Medicine*. – 2009. – Т. 50. – №. 5. – С. 781-789.
25. Löfblom J. et al. Affibody molecules: engineered proteins for therapeutic, diagnostic and biotechnological applications // *FEBS letters*. – 2010. – Т. 584. – №. 12. – С. 2670-2680.
26. Plückthun A. Designed ankyrin repeat proteins (DARPin): binding proteins for research, diagnostics, and therapy // *Annual review of pharmacology and toxicology*. – 2015. – Т. 55. – С. 489-511.
27. Goldstein R. et al. Development of the designed ankyrin repeat protein (DARPIn) G3 for HER2 molecular imaging // *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*. – 2015. – Т. 42. – С. 288-301.
28. Tolmachev V. et al. Imaging of EGFR expression in murine xenografts using site-specifically labelled anti-EGFR  $^{111}\text{In}$ -DOTA-Z EGFR: 2377 Affibody molecule: aspect of the injected tracer amount // *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*. – 2010. – Т. 37. – С. 613-622.

29. Bentzen S. M. et al. Epidermal growth factor receptor expression in pretreatment biopsies from head and neck squamous cell carcinoma as a predictive factor for a benefit from accelerated radiation therapy in a randomized controlled trial // *J Clin Oncol.* – 2005. – Т. 23. – №. 24. – С. 5560-5567.
30. Xu T. et al. Epithelial cell adhesion molecule-targeting designed ankyrin repeat protein-toxin fusion Ec1-LoPE exhibits potent cytotoxic action in prostate cancer cells // *Oncology Reports.* – 2022. – Т. 47. – №. 5. – С. 1-10.
31. Vorobyeva A, Schulga A, Konovalova E, Güler R, Mitran B, Garousi J, Rinne S, Löfblom J, Orlova A, Deyev S, Tolmachev V. Comparison of tumor targeting properties of directly and indirectly radioiodinated designed ankyrin repeat protein (DARPin) G3 variants for molecular imaging of HER2. *Int J Oncol.* 2019 Apr;54(4):1209-1220. doi: 10.3892/ijo.2019.4712. Epub 2019 Feb 11. PMID: 30968147; PMCID: PMC6411343.
32. Deyev S. Comparative evaluation of two DARPin variants: effect of affinity, size, and label on tumor targeting properties // *Molecular pharmaceuticals.* – 2019. – Vol. 16. – №. 3. – P. 995-1008.
33. Американская коллекция типовых культур [Электронный ресурс]. — Режим доступа: <https://www.atcc.org/> (Дата обращения: 28.04.2023).
34. Черкасова Е.И., Брилкина А.А. Работа с культурами клеток / Учебно-методическое пособие. – Нижний Новгород: Издательство Нижегородского университета, 2015. – С. 57.
35. Кудояров Э. Р. и др. Исследование гепатопротекторных свойств производных урацила при цитотоксическом действии тетрахлорметана на культуре гепатоцитов МН22а // *Медицина труда и экология человека.* – 2019. – №. 2 (18). – С. 63-68.
36. Oroujeni M. Preclinical evaluation of <sup>99m</sup>Tc-ZHER2: 41071, a second-generation affibody-based HER2-visualizing imaging probe with a low renal uptake // *International journal of molecular sciences.* – 2021. – Vol. 22. – №. 5. – P. 2770.

37. SWOT-анализ [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://blog.ringostat.com/ru/swot-analiz-chto-eto-takoe-gde-ego-ispolzuyut-primery/> (Дата обращения 10.04.2023).
38. 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.
39. 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/](http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_189499/) (Дата обращения 10.04.2023).
40. 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: 11.04.2023).
41. Трудовой кодекс Российской Федерации ТК РФ от 30.12.2001 N 197ФЗ [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://docs.cntd.ru/document/901807664> (Дата обращения 04.05.2023).
42. СанПиН 2.6.1.2523-09 Нормы радиационной безопасности (НРБ-99/2009) [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://docs.cntd.ru/document/902170553> (Дата обращения 28.04.2023).
43. СП 2.6.1.2612-10 Основные санитарные правила обеспечения радиационной безопасности (ОСПОРБ 99/2010 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://docs.cntd.ru/document/902214068> (Дата обращения 28.04.2023).

44. ГОСТ Р 52905-2007 (ИСО 15190:2003) Лаборатории медицинские. Требования безопасности [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://docs.cntd.ru/document/1200065691> (Дата обращения 28.04.2023).
45. ГОСТ 12.2.032-78 ССБТ. Рабочее место при выполнении работ сидя. Общие эргономические требования [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://docs.cntd.ru/document/1200003913> (Дата обращения 28.04.2023).
46. ГОСТ 12.0.003-2015 ССБТ. Опасные и вредные производственные факторы. Классификация [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://docs.cntd.ru/document/1200136071> (Дата обращения 28.04.2023).
47. СНиП 23-05-95\*. Естественное и искусственное освещение [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://docs.cntd.ru/document/456054197> (Дата обращения 28.04.2023).
48. СанПиН 1.2.3685-21. Гигиенические нормативы и требования к обеспечению безопасности и (или) безвредности для человека факторов среды обитания [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://docs.cntd.ru/document/573500115> (Дата обращения 04.05.2023).
49. ГОСТ 12.1.003-2014 Система стандартов безопасности труда. Шум. Общие требования безопасности [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://docs.cntd.ru/document/1200118606> (Дата обращения 04.05.2023).
50. ГОСТ 12.1.012-2004 Система стандартов безопасности труда. Вибрационная безопасность. Общие требования [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://docs.cntd.ru/document/1200059881> (Дата обращения 04.05.2020).
51. 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 28.04.2023).
52. СП 2.4.3648-20 «Санитарно-эпидемиологические требования к организации воспитания и обучения, отдыха и оздоровления детей и молодежи [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://docs.cntd.ru/document/566085656> (Дата обращения 26.04.2023).

53. СП 2.6.1.2612-10 Основные санитарные правила обеспечения радиационной безопасности (ОСПОРБ 99/2010) [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://docs.cntd.ru/document/902214068> (Дата обращения 26.04.2023).
54. ГОСТ 12.1.019-2017 Система стандартов безопасности труда. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://docs.cntd.ru/document/1200080203> (Дата обращения 28.04.2023).
55. СП 2.2.3670-20 Санитарно-эпидемиологические требования к условиям труда [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://docs.cntd.ru/document/573230583> (Дата обращения 28.04.2023).
56. СП 60.13330.2020 Отопление, вентиляция и кондиционирование воздуха [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://docs.cntd.ru/document/573697256> (Дата обращения 28.04.2023).
57. 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 28.04.2023).
58. 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 28.04.2023).
59. ГОСТ Р 57740-2017. Обращение с отходами. Требования к приему, сортировке и упаковыванию опасных твердых коммунальных отходов [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://docs.cntd.ru/document/1200156943> (Дата обращения 28.04.2023).

60. ГОСТ Р 51768-2001. Обращение с отходами. Методика определения ртути в ртутьсодержащих отходах [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://docs.cntd.ru/document/1200025450> (Дата обращения 28.04.2023).
61. 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 28.04.2022).
62. ГОСТ 9230-77 Огнетушители СО(2) (углекислотные) передвижные. Технические условия [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://docs.cntd.ru/document/554344860> (Дата обращения 28.04.2022).
63. ГОСТ 12.4.021-75 ССБТ. Системы вентиляционные [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://docs.cntd.ru/document/1200005274> (Дата обращения 08.05.2023).
64. ТУ 22-4720-80 Огнетушитель химический воздушно-пенный ОХВП-10 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.standards.ru/document/5645068> (Дата обращения 08.05.2023).
65. ГОСТ 17299- 78 Спирт этиловый технический [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://docs.cntd.ru/document/1200005433> (Дата обращения 28.04.2023).
66. МР 2.2.9.2311-07 Профилактика стрессового состояния работников при различных видах профессиональной деятельности [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://docs.cntd.ru/document/1200072234> (Дата обращения 28.04.2023).
67. ГОСТ 12.1.019-79 ССБТ. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://docs.cntd.ru/document/1200005433> (Дата обращения 08.05.2023).
68. 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 08.05.2023).

69. Федеральный закон "Об охране окружающей среды" от 10.01.2002 N 7-ФЗ [Электронный ресурс]. – Режим доступа: [Электронный ресурс]. – Режим доступа: [https://www.consultant.ru/document/cons\\_doc\\_LAW\\_34823/](https://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_34823/) (Дата обращения 08.05.2023).

## Приложение А

### Раздел 1 Literature review

Обучающийся:

Группа	ФИО	Подпись	Дата
9ДМ11	Юлдашева Феруза Шерзод кизи		

Консультант ИШХБМТ:

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент ИШХБМТ	Плотников Евгений Владимирович	Кандидат химических наук		

Консультант – лингвист отделения (НОЦ) школы

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент отделения иностраннных языков	Гончарова Любовь Анатольевна	Кандидат педагогических наук		



## **1.1 Development of targeted radiopharmaceuticals**

Molecular imaging of cancer-associated targets facilitates diagnosis and stratification of patients for targeted treatment. Radionuclide-based molecules are successfully used today in nuclear medicine. Different radioisotopes and methods of their use are being investigated.

There are several stages of development for the creation of an RFP:

1. Finding a suitable radioisotope for use in the diagnosis or therapy of certain diseases in the human body;
2. Selection of the radionuclide based on the aims and objectives of the study and the nuclear-physical properties of the radioisotope;
3. Development of methods for introducing a radioisotope into the human body (choice of linker for binding to the biomolecule, process conditions, control of pharmacokinetics);
4. Development of technology, composition and methods of control of RFPs;
5. Preclinical drug studies, dose and safety monitoring, determination of toxicological effects;
6. Clinical trials, with positive results from pre-clinical studies [3].

## **1.2 Imaging techniques for tumour diseases**

Molecular imaging (MI) is a new field that aims to integrate patient-specific and disease-specific molecular information from diagnostic imaging. By providing infinite contrast for imaging, radiopharmaceuticals can be easily distinguished from their own molecules. This principle of operation differs from other imaging techniques such as computed tomography (CT). In the case of CT, all tissues produce a signal and differences in signal intensity between different tissues provide contrast to the image (Figure 1) [4].



Figure 1 - [<sup>18</sup>F]-fluorodeoxyglucose CT scan of breast cancer (spread of disease to small mediastinal nodes not detectable on CT scan)

One method of molecular imaging is considered to be magnetic resonance imaging (MRI). MRI has the advantage of being able to provide information on soft tissue and function through the use of proton density, perfusion, diffusion, and biochemical contrasts. The main disadvantage of MRI is its inherently low sensitivity for detecting target agents compared to nuclear imaging techniques [4,5].

Another molecular imaging technique that provides high spatial resolution (<1 mm) and can provide excellent anatomical information for comparison with molecular information is ultrasound imaging. Many targeted molecular imaging agents such as microbubbles, liposomes or perfluorocarbon emulsions are used as scaffolds in ultrasound imaging. However, the relatively large particle size of the imaging agent (<250 nm) limits tissue penetration and makes this method inapplicable to vascular targets. This property of ultrasound imaging is an important limitation when used in molecular imaging [6].

In general, every molecule of a diagnostic radiopharmaceutical can be detected throughout its lifetime, which contributes to exceptional sensitivity for diagnosis. However, there are factors limiting the visualisation of radiopharmaceutical radiation such as [5,6]:

1. Limits of detection devices;
2. Absorption of radiation before it leaves the body;
3. The need to limit radiation exposure to the patient.

However, it is possible to generate high quality images using extremely low doses (30-600 MBq), corresponding to only nanomoles of a compound, depending

on the half-life of the radionuclide, which allows radiopharmaceuticals to work as molecular tracers [7].

Nuclear imaging techniques, which include PET and SPECT, have their advantages. They differ from other imaging techniques in their high internal sensitivity and unlimited depth of penetration. One advantage of PET is that it is fully quantitative and provides higher spatial resolution than SPECT. A major advantage of PET and SPECT methods is that the small mass of the probe and radio-labelling strategies do not significantly affect the biological processes being studied [8].

### 1.2.1 Positron emission tomography

Positron emission tomography (PET) is one of the molecular imaging techniques that has high intrinsic sensitivity and unlimited depth of penetration. With PET, changes in metabolic pathological shifts can be recognised at a very early stage before morphological changes form. Molecular imaging PET uses  $\beta^+$  -emitters with half-lives ranging from a few seconds to several hours (Table 1) [9].

Table 1 - Radionuclides for molecular imaging by PET

<b><math>\beta^+</math> -active isotopes</b>	
<b>Isotope</b>	<b>T<sub>1/2</sub> (min)</b>
<sup>15</sup> O	2,04
<sup>13</sup> N	9,96
<sup>11</sup> C	20,4
<sup>18</sup> F	110

The relatively long half-life of the isotope <sup>18</sup>F has provided the basis for the most common radiopharmaceutical fluorodeoxyglucose (FDG), which is a glucose analogue and substrate for the enzyme hexokinase. However, the radionuclides <sup>15</sup>O, <sup>13</sup>N and <sup>11</sup>C provide better images [4,9].

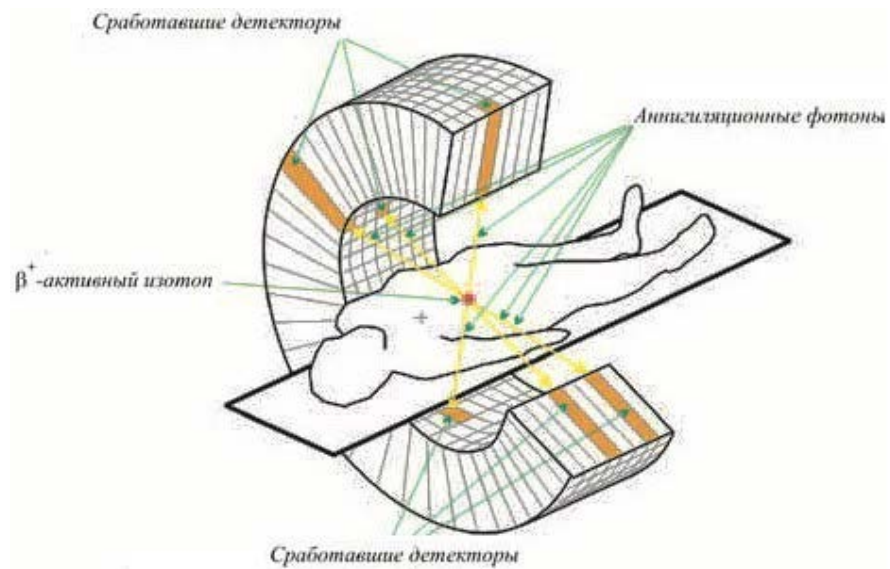


Figure 2 - Schematic representation of PET

### 1.2.2 Single photon emission computed tomography

Single Photon Emission Computed Tomography (SPECT) is a molecular imaging technique in which imaging is performed by high penetrating gamma rays. SPECT generally uses gamma rays with a gamma ray energy of between 100-200 keV and half-lives of a few minutes to a few days [9].

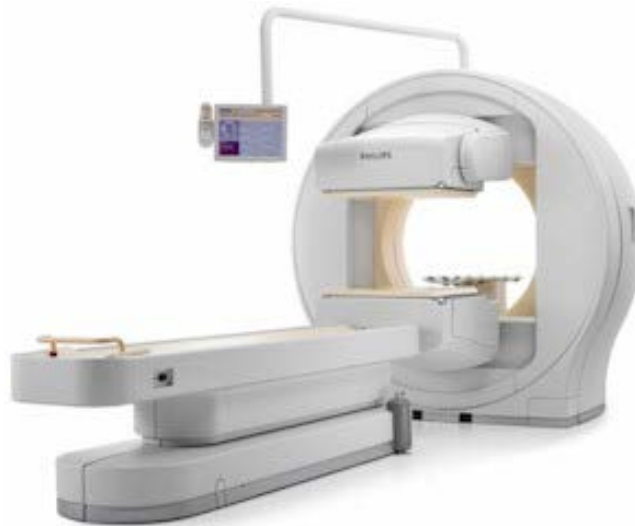


Figure 3 - Single-photon emission computed tomography scanner

The radionuclide  $^{99m}\text{Tc}$ , which has a gamma radiation energy of 140 kBq, is the most widely used isotope for SPECT diagnostics. Other radioisotopes are also used (Table 2) [9,10].

Table 2 - Radionuclides used for molecular imaging by SPECT

<b>Isotope</b>	<b>T<sub>1/2</sub></b>	<b>Organ</b>
$^{67}\text{Ga}$	78 h	heart
$^{99m}\text{Tc}$	6 h	Bones, bone marrow, lungs, heart, kidneys
$^{201}\text{Tl}$	73 h	heart
$^{111}\text{In}$	2.8 days	liver
$^{131}\text{I}$	8 days	liver, kidneys, lungs, brain
$^{189}\text{Au}$	28.7 min	lymph nodes

Applications of SPECT in nuclear medicine include neurology, cardiology, urology, diagnosis of brain tumours, scintigraphy of skeletal diseases and breast cancer [11].

### 1.3 Creating a radiopharmaceutical for PET/OPECT

The main drugs used for PET and SPECT are 3rd generation radiopharmaceuticals, which include [12]:

1. Radionuclide;
2. BCA, a bifunctional chelating agent, binds the radionuclide and contains free centers for further binding (DOTA, NODAGA, DTPA, etc.);
3. Linker;
4. Vector: Receptor-specific peptides and other ligands (allows the entire RFP construct to accumulate in the right place) [13].

### 1.3.1 Radioisotopes for nuclear medicine

In nuclear medicine, radioisotopes are used depending on which disease is being diagnosed or treated. For example,  $^{123}\text{I}$  is found as iodide ions and is used to diagnose thyroid disorders,  $^{201}\text{Tl}$  is used as a single-charged cation to study myocardial perfusion, radioisotopes  $^{51}\text{Cr}$  and  $^{59}\text{Fe}$  can be used to study metabolic disorders and hematological diseases using radiochemistry [12].

Radioisotopes are divided into the following groups according to the method of production:

- 1) produced in nuclear reactors ( $\alpha$ -emitting,  $\beta$ -emitting,  $\gamma$ -emitting);
- 2) produced by charged particle accelerators ( $\alpha$  -emitting,  $\beta^-$  emitting,  $\beta^-$  -emitting,  $\gamma$  -emitting);
- 3) produced by isotope generators (in the reactor and at the charged particle accelerator).

An example of an alpha-emitting isotope is  $^{223}\text{Ra}$  with a half-life of 11.4 days. The decay of  $^{223}\text{Ra}$  is due to four high-energy alpha particles (two protons and two neutrons) at short distances. Radiation from  $^{223}\text{Ra}$  acts at the molecular level by breaking double-stranded DNA. Due to these and other properties  $^{223}\text{Ra}$  is used in the treatment of prostate cancer, where a favourable biodistribution in normal tissues has been observed [14]. However, 99% of the drug concentration is accumulated in bone in 24 h.

Radium-223 chloride therapy of castration-resistant prostate cancer patients with bone metastases leads to increased overall survival and time to development of bone complications, and is also characterised by good tolerability [15].

The radioisotope  $\beta$ -radiation  $^{177}\text{Lu}$  due to its maximum beta radiation energy of 500 kBq and a half-life of 6 days is one of the most promising therapeutic radionuclides and is currently used in nuclear medicine to treat and diagnose tumours [16].

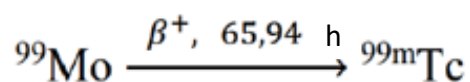
Good specific binding of  $^{177}\text{Lu}$  to prostate-specific membrane antigen has been observed and is used in worldwide clinical practice as [ $^{177}\text{Lu}$ ]-Lu-PSMA-617 for the treatment of metastatic castrate-resistant prostate cancer [17].

For the diagnosis and treatment of differentiated thyroid cancer and its metastases, another radioisotope  $\beta$ -radiation  $^{131}\text{I}$  has been used for more than 50 years. The radionuclide iodine-131 emits gamma rays and beta particles and thus allows radiometric instruments to accurately trace radioactive iodine in the body and determine its content in various organs and systems as well as in urine, saliva and other excretions [18].

Based on phosphonic acids and the generator radionuclide  $^{68}\text{Ga}$ , new osteotropic RFLPs are being developed for the diagnosis of metastatic changes in the bones that occur in breast, prostate and lung tumors. The half-life of  $^{68}\text{Ga}$  is 68 minutes, allowing an RFLP with the required activity to be used without a significant dose burden to the patient [19].

The  $\gamma$ -emitting radionuclide  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  is universal for cancer diagnosis by SPECT as part of a variety of RFIs.

A radioisotope  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  with a half-life of 6 h has been chosen for molecules for cancer diagnosis by SPECT. The radionuclide generator  $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$  is used worldwide in nuclear medicine. Radioactive technetium-99m is produced by the decay of  $^{99}\text{Mo}$ .



After decay, the column is washed with saline and a radioactive solution  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  is obtained, which is used for further purposes. Technetium-99m is a  $\gamma$ -emitter, which contributes to a favorable radiation profile, thus providing good spatial resolution and low dose absorption during molecular imaging. Also, technetium-99m has the ability to well conjugate proteins and peptides, which positively affects the binding and targeting delivery of target proteins.

Technetium-99m has good specificity with many linkers. Antibodies, affibodies, proteins with ankyrin repeats of DARPins can serve as linkers.

A study of the affibody-labelled molecule  $^{99m}\text{Tc}$  showed the stability of the molecule and high hydrophilicity, which facilitates the elimination of the drug from normal tissues in the diagnosis of breast cancer [20].

Recombinant targeting molecules labeled with  $^{99m}\text{Tc}$  are actively used for molecular imaging of tumours. Technetium-99m labelled DARPIn9\_29 frame proteins have shown good specificity in cell culture with hyperexpression of surface receptor HER-2/neu, which can be used for diagnosis in lung, ovarian, stomach, prostate and other cancers. [21].

The work with DARPIn-G3 framework proteins [22] also shows high specificity and stability of the molecules after radioactive labelling of the proteins with the radioisotope  $^{99m}\text{Tc}$ .

From this we can conclude that the radionuclide technetium-99m is a promising radioisotope for the diagnosis and therapy of cancer and research into specific target molecules for technetium-99m is relevant.

### **1.3.2 Molecular targets and target molecules for radiopharmaceutical drug development**

Both nuclear imaging and therapy are based on the selective delivery of radiopharmaceuticals into cells. In the context of imaging, the more targets per cell, the greater the signal for that cell and the better the signal ratio (4).

Antibodies can serve as well-specific targeting molecules for high-contrast imaging of tumours, but they are too large to allow rapid kinetics. Thus, smaller antibody fragments are of increasing interest. In turn, short peptides are small and have fast kinetics. However, they rarely have the high affinity required for target molecules [23].



Today, proteins are often used as vectors in the creation of RFLPs. Examples include affibody and ankyrin proteins (DARPin). Both are considered good vectors for binding to the radionuclide and delivery to the target.

The affibody molecule consists of three alpha-helices with 58 amino acids. These proteins withstand high temperatures (around 90°C) and acid-alkaline conditions [24]. The small size, high specificity and affinity, and rapid elimination allow affibody to be used as a monoclonal antibody for molecular imaging and targeting therapy [25].

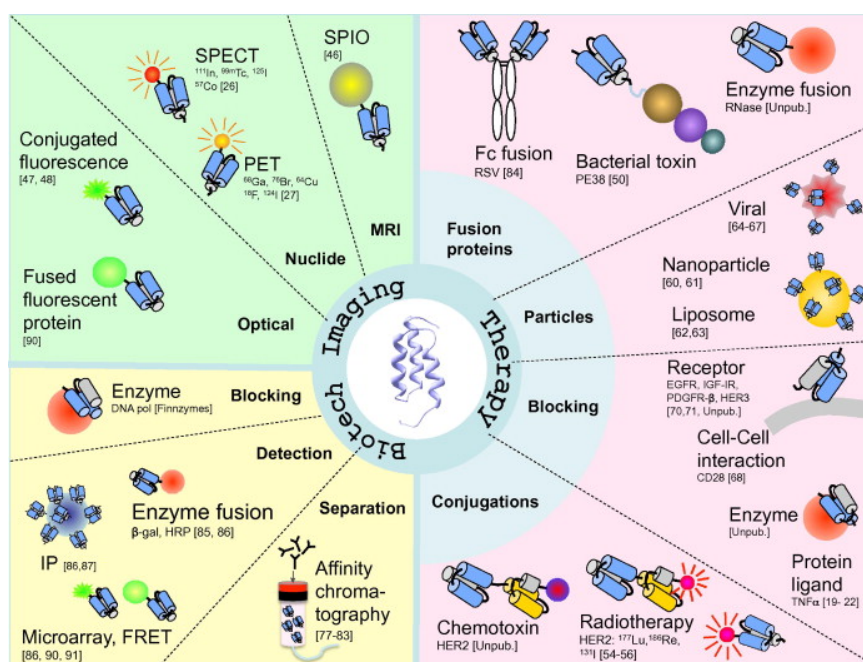


Figure 4 - Overview of selected applications of affibody molecules. Applications are divided into three research areas: therapy, imaging and biotechnology [25].

The common feature is that they are specific to the same receptors, allowing them to be used in the same processes [26].

DARPin is one of the proteins exhibiting highly specific and high-affinity binding to the target protein. DARPins consist of at least three repeat modules of which most of the N- and most of the C-terminal modules are referred to as a cap (Figure 5).

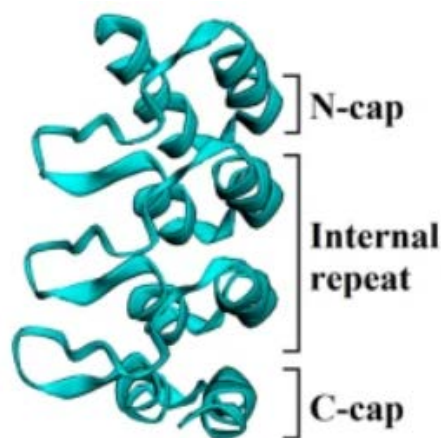


Figure 5 - 3D structure of DARPin G3

Depending on the type of cancer and diagnosis, different end tags are selected for DARPin. For example, hexahistidine ( $\text{His}_6$ ) and histidine glutamate ( $\text{HE}$ )<sub>3</sub> tags allow significantly lower liver uptake when diagnosing HER2-positive tumors [27].

DARPin exhibit specific binding and high affinity to receptors such as EGFR (epidermal growth factor receptor 1), EpCam (transmembrane glycoprotein), HER2 (epidermal growth factor receptor 2).

Epidermal growth factor receptor 1 - EGR is a transmembrane tyrosine kinase receptor involved in the regulation of cell proliferation, apoptosis and motility. EGFR is often used as a biomarker for lung, breast, prostate, ovarian and soft tissue sarcomas [28].

Patients with squamous cell carcinoma of the head and neck, there are high levels of EGFR expression in tumors that may be an indicator of recurrence after radiotherapy, contributing to the choice of hyper fractionated accelerated radiotherapy [29].

The traditional method of determining EGFR levels - by biopsy followed by immunohistochemistry - has problems such as heterogeneity of expression, inconsistency of EGFR expression in primary tumours and metastases, inadequate procedures and antibodies and changes in EGFR status during therapy. In turn, radionuclide imaging can address many of these problems [28].

Epithelial epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) is overexpressed in 40-60% of prostate cancer (PC) cases and is associated with metastasis, increased risk of PC recurrence and resistance to treatment. The use of DARPin Ec1 for targeted delivery of a variant of pseudomonad exotoxin A (LoPE) with low immunogenicity and low non-specific toxicity to EpCAM-expressing prostate cancer cells has been investigated [30].

Patients with breast cancer, overexpression of the human epidermal growth factor receptor (HER2) are a predictor of sexual prognosis. HER2 is an established therapeutic target in breast cancer. Anti-HER2 therapies significantly improve survival of patients with breast cancer. However, only 20% of breast tumours have high enough HER2 levels for successful targeted therapy. Accurate determination of HER2 levels of tumors is therefore crucial for deciding the targeted therapy [31].