

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

Институт Физико–технический
Направление подготовки Ядерные физика и технологии
Кафедра Прикладной физики

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Тема работы
Разработка прибора для лечения опухолей методом электропорации

УДК 615.84.537.21.616–006.3

Студент

Группа	ФИО	Подпись	Дата
0AM51	Пак Фёдор Александрович		

Руководитель

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент кафедры ПФ	Алейник А.Н.	к. ф.-м. н		

КОНСУЛЬТАНТЫ:

По разделу «Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение»

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент каф.МЕН ИСГТ	Верховская М.В.	к.э.н.		

По разделу «Социальная ответственность»

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Ассистент кафедры ПФ	Гоголева Т.С.	к. ф.-м. н		

ДОПУСТИТЬ К ЗАЩИТЕ:

Зав. кафедрой	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
ПФ	Вагнер А.Р.	к. ф.-м. н		

Томск – 2017 г.

РЕЗУЛЬТАТЫ ОБУЧЕНИЯ (КОМПЕТЕНЦИИ ВЫПУСКНИКОВ)

Планируемые результаты обучения

Код результата	Результат обучения (выпускник должен быть готов)
Профессиональные компетенции	
P1	Применять глубокие, математические, естественнонаучные, социально-экономические и профессиональные знания для теоретических и экспериментальных исследований в области использования ядерной энергии, ядерных материалов, систем учета, контроля и физической защиты ядерных материалов, технологий радиационной безопасности, медицинской физики и ядерной медицины, изотопных технологий и материалов в профессиональной деятельности.
P2	Ставить и решать инновационные инженерно-физические задачи, реализовывать проекты в области использования ядерной энергии, ядерных материалов, систем учета, контроля и физической защиты ядерных материалов, технологий радиационной безопасности, медицинской физики и ядерной медицины, изотопных технологий и материалов.
P3	Создавать теоретические, физические и математические модели, описывающие конденсированное состояние вещества, распространение и взаимодействие ионизирующих излучений с веществом и живой материей, физику кинетических явлений, процессы в реакторах, ускорителях, процессы и механизмы переноса радиоактивности в окружающей среде.
P4	Разрабатывать новые алгоритмы и методы: расчета современных физических установок и устройств; исследования изотопных технологий и материалов; измерения характеристик полей ионизирующих излучений; оценки количественных характеристик ядерных материалов; измерения радиоактивности объектов окружающей среды; исследований в радиоэкологии, медицинской физике и ядерной медицине.
P5	Оценивать перспективы развития ядерной отрасли, медицины, анализировать радиационные риски и сценарии потенциально возможных аварий, разрабатывать меры по снижению рисков и обеспечению ядерной и радиационной безопасности руководствуясь законами и нормативными документами, составлять экспертное заключение.
P6	Проектировать и организовывать инновационный бизнес, разрабатывать и внедрять новые виды продукции и технологий, формировать эффективную стратегию и активную политику риск-менеджмента на предприятии, применять методы оценки качества и результативности труда персонала, применять знание основных положений патентного законодательства и авторского права Российской Федерации.
Общекультурные компетенции	
P7	Демонстрировать глубокие знания социальных, этических и культурных аспектов инновационной профессиональной деятельности.
P8	Самостоятельно учиться и непрерывно повышать квалификацию в течение всего периода профессиональной деятельности.
P9	Активно владеть иностранным языком на уровне, позволяющем работать в иноязычной среде, разрабатывать документацию, презентовать результаты профессиональной деятельности.
P10	Эффективно работать индивидуально и в коллективе, демонстрировать ответственность за результаты работы и готовность следовать корпоративной культуре организации.

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

Студенту:

Группа	ФИО
0AM51	Пак Фёдор Александрович

Институт	Физико-технический	Кафедра	ПФ
Уровень образования	Магистратура	Направление/специальность	14.04.02 Ядерные физика и технологии

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

1. <i>Стоимость ресурсов научного исследования (НИ): материально-технических, энергетических, финансовых, информационных и человеческих</i>	Затраты на специальное оборудование определяются согласно стоимости оборудования по прейскурантам или договорной цене Заработная плата рассчитывается исходя из тарифной ставки и коэффициентов зависящих от различных условий: организация, регион. Страховые отчисления определяются согласно Федеральному закону от 24.07.2009 №212–ФЗ Прочие и накладные расходы определяются исходя из суммы полной заработной платы исполнителей технического проекта
2. <i>Нормы и нормативы расходования ресурсов</i>	
3. <i>Используемая система налогообложения, ставки налогов, отчислений, дисконтирования и кредитования</i>	

Перечень вопросов, подлежащих исследованию, проектированию и разработке:

1. <i>Оценка коммерческого потенциала, перспективности и альтернатив проведения НИ с позиции ресурсоэффективности и ресурсосбережения</i>	Оценку потенциала и перспективности реализации ТП можно провести с помощью оценочной карты конкурентных технических решений
2. <i>Планирование и формирование бюджета научных исследований:</i>	Иерархическая структура работ Календарный план-график реализации проекта
3. <i>Оценка ресурсной, финансовой, социальной, бюджетной эффективности научного исследования</i>	Определение ресурсоэффективности проекта

Перечень графического материала (с точным указанием обязательных чертежей)

1. <i>Оценочная карта конкурентных технических решений</i>
2. <i>Иерархическая структура работ</i>
3. <i>Организационная структура проекта</i>
4. <i>Календарный план проекта</i>
5. <i>Бюджет проекта</i>
6. <i>Определение ресурсоэффективности проекта</i>
Дата выдачи задания для раздела по линейному графику

Задание выдал консультант:

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент каф. МЕН ИСГТ	Верховская М.В.	к.э.н.		

Задание принял к исполнению студент:

Группа	ФИО	Подпись	Дата
0AM51	Пак Фёдор Александрович		

ЗАДАНИЕ ДЛЯ РАЗДЕЛА «СОЦИАЛЬНАЯ ОТВЕТСТВЕННОСТЬ»

Студенту:

Группа	ФИО
0AM51	Пак Фёдор Александрович

Институт	Физико– технический	Кафедра	ПФ
Уровень образования	Магистратура	Направление/специальность	14.04.02 Ядерные физика и технологии

Исходные данные к разделу «Социальная ответственность»:

<i>1. Описание рабочего места (рабочей зоны) на предмет возникновения:</i>	<ul style="list-style-type: none"> – вредных проявлений факторов производственной среды (микроклимат, освещение, шумы, вибрации, электромагнитные поля, ионизирующее излучение); – опасных проявлений факторов производственной среды (электрической, пожарной и взрывной природы).
<i>2. Знакомство и отбор законодательных и нормативных документов по теме</i>	<ul style="list-style-type: none"> – электробезопасность; – пожаровзрывобезопасность; – требования охраны труда при работе на ПЭВМ.

Перечень вопросов, подлежащих исследованию, проектированию и разработке:

<i>1. Анализ выявленных вредных факторов проектируемой производственной среды в следующей последовательности:</i>	<ul style="list-style-type: none"> – действие фактора на организм человека; – приведение допустимых норм с необходимой размерностью (со ссылкой на соответствующий нормативно-технический документ); – предлагаемые средства защиты (коллективные и индивидуальные).
<i>2. Анализ выявленных опасных факторов проектируемой произведённой среды в следующей последовательности:</i>	<ul style="list-style-type: none"> – электробезопасность (в т.ч. статическое электричество, средства защиты); – пожаровзрывобезопасность (причины, профилактические мероприятия, первичные средства пожаротушения).

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

Задание выдал консультант:

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Ассистент кафедры ПФ	Гоголева Т.С..	к.ф.-м.н.		

Задание принял к исполнению студент:

Группа	ФИО	Подпись	Дата
0AM51	Пак Ф.А.		

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

Институт Физико-технический
Направление подготовки 14.04.02 Ядерная физика и технологии
Кафедра прикладная физика

УТВЕРЖДАЮ:
Зав. кафедрой

(Подпись) _____ (Дата) Вагнер А.Р.
(Ф.И.О.)

ЗАДАНИЕ
на выполнение выпускной квалификационной работы

В форме:

магистерской диссертации

Студенту:

Группа	ФИО
0AM51	Пак Федор Александрович

Тема работы:

Разработка прибора для лечения злокачественных опухолей методом электропорации.
--

Утверждена приказом директора

545/с от 31.01.2017

Срок сдачи студентом выполненной работы:
--

16.06.2017

ТЕХНИЧЕСКОЕ ЗАДАНИЕ:

Исходные данные к работе	
---------------------------------	--

	Объектом исследования является метод электропорации. На основе этого метода будет создан прибор для лечения злокачественных опухолей. Режим работы прибора – импульсный. Требования, выдвигаемые прибору, следующие: высокая степень защиты от сторонних источников электромагнитного излучения; однородность выдаваемого импульса (постоянная форма импульса, постоянное количество выдаваемых импульсов); регулируемое количество импульсов. Изготовление на современной элементной базе.
--	---

Перечень подлежащих исследованию, проектированию и разработке вопросов	<ol style="list-style-type: none"> 1. Проведение обзора и анализа литературы по тематике диссертации. 2. Постановка задачи. 3. Составление блок-схемы 4. Разработка макета прибора. 5. Разработка программного обеспечения для прибора 6. Исследование характеристик прибора. 7. Выводы и заключение по работе
Перечень графического материала	
Консультанты по разделам выпускной квалификационной работы	
Раздел	Консультант
Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережения	Верховская М.В.
Социальная ответственность	Гоголева Т.С.
Иностранный язык	Емельянов И.Л.
Названия разделов, которые должны быть написаны на русском и иностранном языках:	
Введение	
Раздел 1. Электропорация	
Дата выдачи задания на выполнение выпускной валификационной работы по линейному графику	6.02.2017

Задание выдал руководитель:

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент	Алейник А.Н.	к.ф.-м.н.		

Задание принял к исполнению студент:

Группа	ФИО	Подпись	Дата
0AM51	Пак Фёдор Александрович		

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

Институт физико-технический
Направление подготовки 14.04.02 Ядерные физика и технологии
Уровень образования магистратура
Кафедра прикладная физика
Период выполнения весенний семестр 2016/2017 учебного года

Форма представления работы:

магистерская диссертация

КАЛЕНДАРНЫЙ РЕЙТИНГ-ПЛАН
выполнения выпускной квалификационной работы

Срок сдачи студентом выполненной работы:	16.06.2017
--	------------

Дата контроля	Название раздела (модуля) вид работы (исследования)	Максимальный балл раздела (модуля)
10.02.2017г	1. Проведение обзора и анализа литературы по тематике диссертации. Постановка задачи	
20.02.2017	2. Составление блок-схемы прибора	
13.03.2017	3. Разработка макета прибора	
31.03.2017	4. Разработка программного обеспечения для прибора	
14.04.2017	5. Исследование характеристик прибора.	
30.04.2017	6. Испытание прибора .	
17.05.2017	7. Выводы и заключение по работе	

Составил преподаватель:

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент	Алейник А.Н.	к.ф.-м.н.		

СОГЛАСОВАНО:

Зав. Кафедрой	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
ПФ	Вагнер А.Р.	к.ф.-м.н.		

Реферат

Выпускная квалификационная работа 70 с., 21 рис., 12 табл., 27 источников, 1 прил.

Ключевые слова: электропорация, медицина, клетка, электрический импульс, электрические параметры

Объектом исследования является использование эффекта электропорации для лечения злокачественных опухолей

Цель работы –разработать прибор для электропорации злокачественных опухолей

В процессе исследования проводились разработка прибора, испытание прибора на эквивалентной цепи клетки, разработка метода оценки эффективности процедуры электропорации

В результате исследования был получен прибор для электропорации злокачественных опухолей и метод оценки эффективности

Основные конструктивные, технологические и технико-эксплуатационные характеристики: амплитуда, длительность, частота, форма электрического импульса

Степень внедрения: разработанный прибор используется для исследований в СибГМУ

Область применения: научные исследования, медицина

Экономическая эффективность прибора выражается в низкой себестоимости и высокой скорости работы

В будущем планируется усовершенствовать прибор для электропорации, изучить режимы работы для эффективного лечения

Нормативные ссылки

В настоящей работе использованы ссылки на следующие стандарты:

1. ГОСТ Р 1.5 – 2012 Стандартизация в Российской Федерации. Стандарты национальные Российской Федерации. Правила построения, изложения, оформления и обозначения.
2. ГОСТ 2.104 – 2006 Единая система конструкторской документации. Основные надписи.
3. ГОСТ 2.105 – 95 Единая система конструкторской документации. Общие требования к текстовым документам.
4. ГОСТ 2.106 – 96 Единая система конструкторской документации. Текстовые документы.
5. ГОСТ 2.301 – 68 Единая система конструкторской документации. Форматы.
6. ГОСТ 2.709 – 89 Единая система конструкторской документации. Обозначения условные проводов и контактных соединений электрических элементов, оборудования и участков цепей в электрических схемах.
7. ГОСТ 3.1105 – 2011 Единая система технологической документации. Формы и правила оформления документов общего назначения.
8. ГОСТ 3.1404 – 86 Единая система технологической документации. Формы и правила оформления документов на технологические процессы и операции обработки резанием.
9. ГОСТ 3.1407 – 86 Единая система технологической документации. Формы и требования к заполнению и оформлению документов на технологические процессы (операции), специализированные по методам сборки.
10. ГОСТ 7.0.12 – 2011 Система стандартов по информации, библиотечному и издательскому делу. Сокращения русских слов и словосочетаний в библиографическом описании произведений печати.

11. ГОСТ 7.32 – 2001 Система стандартов по информации, библиотечному и издательскому делу. Отчёт о научно-исследовательской работе. Структура и правила оформления.

12. ГОСТ 8.417 – 2002 Государственная система обеспечения единства измерений. Единицы величин.

Определения

В данной работе применены следующие термины с соответствующими определениями:

мульти模альная терапия: Комбинация нескольких видов терапий в одной.

липид: Группа органических соединений, включающая в себя жиры и жироподобные вещества.

бислойная структура: Сложная структура, состоящая из нескольких слоёв какого-либо химического соединения

бифазная форма импульса: Форма импульса, в котором присутствуют два полупериода: положительный и отрицательный

электрохимиотерапия: Комбинация химиотерапии и электропорации

скважность импульса: Отношение длительности импульса к периоду

Содержание

Введение	13
Раздел 1. Электропорация	15
1.1. Определение и физическое описание эффекта	15
1.2. Режимы работы электропоратора	19
1.3. Применение электропорации.....	21
1.4. Генная терапия	22
1.5. Электропорация ex vivo в генной терапии	25
1.6. Процедура электропорации на животных моделях.....	25
1.7. Преимущества и недостатки электропорации	27
Раздел 2. Разработка и испытание прибора.....	29
2.1. Блок–схема прибора	29
2.2. Блок питания.	30
2.3. Блок согласования и источник высокого напряжения.....	31
Раздел 3. Испытание прибора и оценка эффективности.....	34
3.1. Проведение испытаний прибора на эквивалентной электрической цепи клетки	34
3.2. Метод оценки эффективности электропорации.	37
Раздел 4. Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение	40
4.1. Предпроектный анализ.....	40
4.1.1 . Анализ конкурентных технических решений с позиции ресурсоэффективности и ресурсосбережения.....	41
4.2. Планирование управления научно–техническим проектом.....	43
4.2.1. Иерархическая структура работ проекта.....	43
4.2.2. Контрольные события проекта.....	43
4.2.3. План проекта.....	44
4.3. Бюджет научно–технического исследования (НТИ)	47

4.3.1. Расчёт материальных затрат	47
4.3.2. Затраты на оплату труда исполнителей НТИ.....	49
4.3.3. Отчисления во внебюджетные фонды.....	51
4.3.4 . Накладные расходы.....	51
4.4. Формирование бюджета затрат научно–технического исследования...	52
4.5. Организационная структура проекта	53
4.6. Матрица ответственности	54
4.7. Определение ресурсной эффективности исследования.....	55
Раздел 5. Социальная ответственность	58
5.1. Анализ опасных и вредных факторов.....	58
5.2. Обоснование и разработка мероприятий по снижению уровней опасного и вредного воздействия и устранению их влияния при работе с ПЭВМ	60
5.2.1. Организационные мероприятия	60
5.2.2. Технические мероприятия.....	60
5.2.3. Условия безопасной работы	62
5.3. Электробезопасность	65
5.4. Пожарная и взрывная безопасность. Оценка пожарной безопасности помещения.....	66
Заключение	69
Список литературы	70
Приложение А	73

Введение

Возникновение быстро растущих неоплазм не позволяет удалить опухоль чисто хирургическим путем. Поэтому раковые опухоли обрабатываются с помощью мультимодальной терапии. Химиотерапия применяется в случае повышенной тенденции опухоли к метастазированию. Однако высокая стоимость химиотерапии и наличие побочных эффектов ограничивают ее применение. Наиболее часто возникающие побочные эффекты радиотерапии – местный фиброз, некроз, повреждение нервов и т.д. Особенно велик риск возникновения побочных эффектов при наличии агрессивных неоплазм.

Новое направление – электрохимиотерапия имеет определенные преимущества по сравнению с традиционными методами лечения раковых заболеваний. Так как применяемые химпрепараты имеют большую молекулярную массу, то они с трудом проникают внутрь клетки. Поэтому вводимая доза достаточно большая, что приводит к нарушению иммунной системы. В случае проведения сеансов электрохимиотерапии, в мембране клетки образуются поры, через которые лекарства легко проникают внутрь. При этом их доза снижается в 500 раз.

В настоящее время специализированные приборы для электропорации опухолевых клеток созданы только в ряде зарубежных стран, такие как Германия, США, Бельгия, Франция, Словения. Аналогов прибора для электропорации опухолевых клеток в данный момент в России нет.

На кафедре прикладной физики НИ ТПУ был создан макет прибора, предназначенный для электропорации опухолевых клеток.

Цель работы

Разработка прибора для электропорации злокачественных опухолей

Задачи

1. Проведение обзора и анализа литературы по тематике диссертации.
2. Составление блок–схемы прибора
3. Разработка макета прибора.
4. Разработка программного обеспечения для прибора
5. Проведение испытаний прибора
6. Разработка метода оценки эффективности электропорации
7. Выводы и заключение по работе

Раздел 1. Электропорация

1.1. Определение и физическое описание эффекта

Электропорация- процесс возникновения дефектов, в мембране клетки путём действия импульсным электрическим током на ткани

Клетка представляет собой цитоплазму, окружённую мембраной. Цитоплазма является проводящей средой, мембрана- диэлектриком. Действие электрического тока на клетки обуславливается зарядкой мембраны клетки. Мембрана защищает клетку от воздействия внешних факторов, в том числе и от воздействия электрического тока. Для защиты в мембране присутствует двухслойный липидный слой толщиной 5-7 нм, который является диэлектриком.

В самой клетке так и в межклеточной жидкости существуют ионы. Они служат для контроля над функционированием клетки к примеру распространение потенциала действия в кардиомиоците–клетке сердечной мышцы. Обмен между ионами обеспечиваются с помощью специальных каналов, находящиеся в мембране клетки. Таким образом в клетке существует некая разность потенциалов, под которым мембрана клетки находится постоянно. Т.е. мембрана клетки имеет определённое сопротивление R электрическому току I , которое остаётся постоянным при разности потенциалов $\Delta\phi$ между двумя сторонами мембраны [1]. Таким образом для мембраны сохраняется закон Ома: $I = \phi/R$. Из экспериментов, учёные выяснили что закон соблюдается при разности потенциалов не выше 300 мВ. Эта разность потенциалов является граничной, поэтому если на мембрану клетки подействовать разностью потенциалов выше 300 мВ, это приведёт к резкому увеличению тока, проходящего через мембрану, тем самым приведёт к возникновению дефектов в мембране клетки. Это явление называется электрическим пробоем или электропорацией. При удалении разности потенциалов на мембране происходит уменьшение размеров пор. Связано это с тем, что на мембране, при образовании дефекта, увеличивается площадь раздела фаз “липид-вода”, что приводит к увеличению силы поверхностного натяжения

воды на границе раздела фаз. В нормальных условиях под действием сил натяжения мембрана клетки “затягивается”, размеры пор уменьшаются, и мембрана восстанавливается. Но при увеличении разности потенциалов, после преодоления энергетического барьера, образование пор становится самопроизвольным, что приводит к разрушению клетки.

Потенциал, при котором происходит образование пор называется потенциал пробоя. Этот потенциал отличается между видами клеток и зависит от множества факторов. В частности, потенциал пробоя зависит от липидного и белкового состава мембраны.

Кроме возникновения новых пор, в мембране активируются каналы, через которые мембрана обеспечивает питание и контроль над потенциалом клетки.

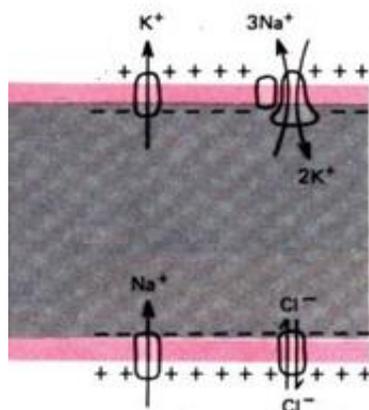


Рисунок 1 – Ионные каналы мембраны клетки

Для моделирования прохождения электрического тока через мембрану, клетка представляется в виде эквивалентной электрической цепи [2]. Цитоплазма клетки в эквивалентной цепи представляется в виде резистора с сопротивлением $R_c=100 \text{ Ом*см}$. Мембрану клетки можно представить в виде конденсатора, ёмкость C_m которого равна 10^{-6} Ф/см и сопротивлением около 1000 Ом* см^2 . [3]

Т.к. клетка находится в среде, то среду клетки можно представить в виде суспензии описываемой сопротивлением R_s , ёмкостью C_s . Эти величины линейно зависят от сопротивления среды ρ и диэлектрической постоянной ϵ соответственно. Также представим каналы мембраны в виде управляемых

проводников с проводимостью G_i ($i=1,2,3\dots$), соединённых последовательно с источниками тока U_i ($i=1,2,3\dots$) [4]. Тогда эквивалентную электрическую схему для мембраны клетки можно представить следующим образом.

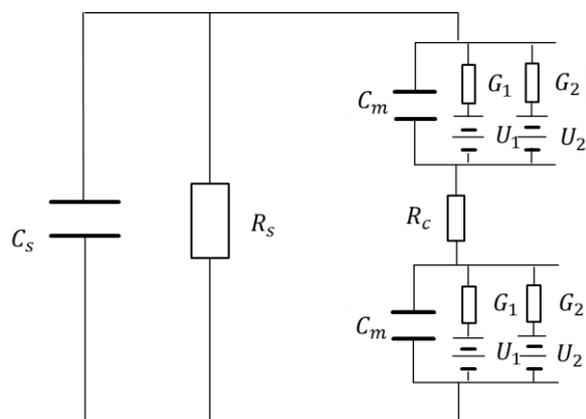


Рисунок 2 – Эквивалентная схема клетки в растворе, C_s , R_s -сопротивление и емкость раствора, C_m -ёмкость мембраны, G_i и U_i - проводники и источники напряжения управляемых каналов мембраны.

Для импульса с длительностью, сравнимой с постоянной времени релаксации

$$\tau_1 = \varepsilon \cdot \rho \quad (1)$$

Для среды с относительной диэлектрической постоянной примерно равной 80 и сопротивлением 100 Ом*см время диэлектрической релаксации около 0.7 нсек. При приложении импульса напряжения к клетке на мембране накапливается заряд, и величина потенциала на ней увеличивается.

Если представить мембрану в виде сферы, то время заряда τ_c можно представить в виде [5]

$$\tau_c = \left[\left\{ \frac{1+2V}{1-V} \right\} \frac{R_s}{2} + R_c \right] c_m a \quad (2)$$

где V - объем сферы, c_m - удельная емкость единицы площади мембраны и a - диаметр клетки. Для клетки с диаметром 10 мкм время заряда мембраны составляет примерно 75 нсек.

Для того, чтобы напряжение на мембране достигло напряжения возникновения пор и активации каналов необходимо приложить электрическое поле E_{cr} , чтобы зарядить мембрану до критического напряжения V_{cr}

$$E_{cr} = \frac{V_{cr}}{\{fa[1-\exp(\frac{-\tau}{\tau_c})]\}} \quad (3)$$

где τ – длительность импульса, f – фактор, определяемый формой клетки.

Электрическая энергия, достаточная для пробоя мембраны равна

$$W = \frac{E_{cr}^2 \tau}{R_s} = \frac{K_{\tau}}{\left(1-\exp\left(\frac{-\tau}{\tau_c}\right)\right)^2} \quad (4)$$

где $K_{\tau} = \frac{V_{cr}^2 * \tau}{(f * a)^2 * R_s}$ – константа. Из анализа функции следует, что W имеет

минимум при длительности импульса $1.25 \tau_c$. Также следует что действие поля напряжением 1 В на мембрану, размеры возникшей поры позволяют пропустить молекулы с большой массой. Таким образом размеры пор зависят не только от величины приложенного напряжения, но и от длительности импульса. [6]

Теория электропорации БЛМ предполагает, что появление водного канала обуславливается возникновением локальной перестройки в бислоевой липидной структуре мемbrane. Исходя из этого существуют две основные конфигурации поры – гидрофильная и гидрофобная.

В гидрофобной поре стенки поры характеризуются липидными «хвостами», а в гидрофильной поре – фосфолипидными «головами». При малых радиусах энергетически выгодной является гидрофобная пора, при больших радиусах – гидрофильная пора. Вода обладает большей диэлектрической проницаемостью, чем липиды. Поэтому мембрана, содержащая поры, обладает меньшей энергией во внешнем электрическом поле. Этот выигрыш энергии пропорционален площади поры и квадрату ее радиуса. Таким образом существует минимум отвечающий за метастабильное проводящее состояние бислоя. При определенной частоте метастабильное состояние переходит в начальное невозмущенное состояние с низкой проводимостью системы.

Скорость образования гидрофильных пор в липидном бислое единичной площади (K_c) можно описать следующим уравнением: [7]

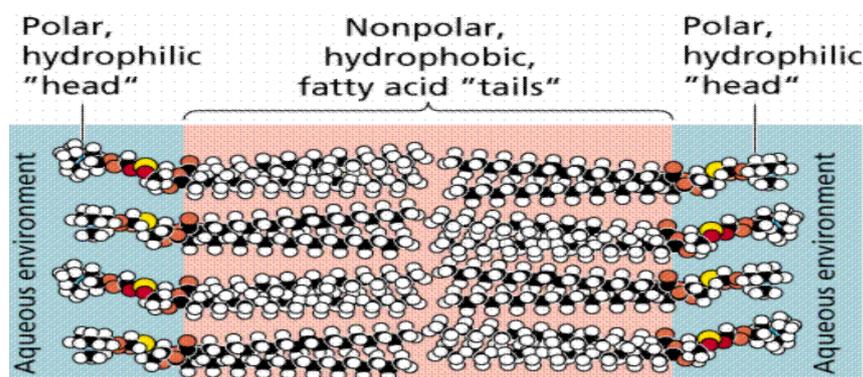


Рисунок 3 – Диаграмма фосфолипидного бислоя

$$K_c = A \cdot \exp(\alpha U_2) \quad (5)$$

где $A = \frac{\nu}{a \cdot \exp\left(\frac{-\Delta W_0}{kT}\right)}$, здесь, a – это площадь, приходящаяся на одну липидную

молекулу, k – константа Больцмана, ν – частота боковых флуктуаций липидных молекул, T – температура, U – электрическое напряжение на бислое, ΔW_0 – энергия активации поры в отсутствии электрического поля. Предполагается, что скорость зарастания пор не зависит от приложенного электрического поля и от плотности пор на бислое. Данное предположение хорошо согласуется с экспериментально наблюдаемыми фактами [8]

1.2. Режимы работы электропоратора

Исходя из выше перечисленного, можно определить режим работы электропоратора, задав значение мощности, длительности импульса и напряжения для электропорации. Для медицинских целей существуют некоторые границы для режима работы электропоратора. Нижняя граница области режимов, где биоэлектрические эффекты становятся важными, определяются зарядкой мембраны. [9] Поэтому критическое напряжение для обычных клеток млекопитающих в данном случае может быть принято за 1 В. Верхняя граница определяется увеличением температуры окружающей

суспензии, которая определяется джоулевым нагревом, при условии, что рассматриваются только обратимые эффекты. Следовательно, если температура превышает определенный уровень, клетка погибает, независимо от значений биоэлектрических эффектов, определенных выше. На рисунке 3 изображены две границы, а область между ними определяет значения величин электрического поля и длительности импульса, которые применимы для медицинских приложений.



Рисунок 4 – Области применения электропорации в зависимости от длительности импульса и величины электрического поля.

В зависимости от выбранных значений электрического поля и длительности импульса, можно ожидать различные результаты выживаемости клеток. В области коротких импульсов эффект оказывается доброкачественным. С увеличением ($E \cdot t$) мы приближаемся к области летальных эффектов, даже если в этом случае не превышен температурный предел. В зависимости от величины значений $E \cdot t$ можно выделить различные области приложений. Для медицинских приложений наиболее предпочтителен диапазон длинных импульсов и небольших значений электрического поля. В частности, перенос генов внутрь клетки происходит в миллисекундном диапазоне длительностей, а перенос лекарств требует микросекундного диапазона. Для предотвращения биозагрязнений и бактерицидных применений требуются более высокие значения электрических полей. Крайняя левая область, определяемая, короткими

импульсами и сильными электрическими полями служит для воздействия на внутриклеточные компоненты. В этом случае воздействие оказывается не на мембрану клетки, а на ее ядро и в частности на ДНК клетки, что можно использовать для генной терапии и воздействия на злокачественные опухоли.

1.3. Применение электропорации

Первый значительный сдвиг в области электропорации, метод получил при публикации первых результатов, полученных на животных моделях, где авторы применяли противораковый лекарственный препарат блеомицин в комбинации с импульсным электрическим полем. Данный эксперимент проводился Окино и Мори в 1987 г., в результате которого было выявлено, что комбинация блеомицина и импульсного поля гораздо эффективней работают, нежели по отдельности [10]. Это открытие казалось случайным совпадением, так как авторы не дали объяснения выбору лекарства. Сам по себе блеомицин имел ограниченное применение в онкологии в основном для применения в случаях рака головы и шеи. Процедура лечения, при котором лекарственный препарат применяли вместе с импульсным полем получило название электрохимиотерапия.

После результатов, опубликованных Окино и Мори, электрохимиотерапия постоянно прогрессировало вместе с электротехникой, являющейся основополагающей. Появление новых генераторов и видов электродов позволили вывести электрические параметры, при которых лечение разных видов опухолевых клеток было эффективней. Дальнейшие исследования электрохимиотерапии позволили значительно уменьшить дозы лекарств. Из-за образования дефектов, размеры которых соизмеримыми с размерами молекулы лекарственного препарата, повысилась проницаемость мембраны, что упростило действие молекул на внутреннее содержание клетки. Другими словами, клетки получают больше лекарственного средства с электропорацией, нежели без неё, тем самым усиливая цитоксический эффект. В большом количестве

экспериментов на моделях животных с различными видами рака применение электрохимиотерапии привело к большему числу полной ремиссии опухолей.

Принятая в настоящее время модель воздействия блеомицина заключается в генерации свободных радикалов активной формой блеомицина, которые разделяют на части ДНК и РНК. Известно, что блеомицин стимулирует выделение большого количества цитокинов. Эти факторы участвуют в уничтожении опухоли и одновременно оказывают иммуностимулирующий эффект на пациента. Излишнее количество этих факторов может быть токсичным и возможно ответственно за легочный фиброз, часто наблюдаемый при стандартном применении блеомицина. Однако при применении электрохимиотерапии эта доза значительно уменьшается и кроме того она сосредоточена внутри опухоли, что исключает легочный фиброз.

1.4. Генная терапия

Лечение наследственных или приобретенных болезней с помощью генной терапии, т.е. введением ДНК (или РНК) внутрь клеток пациента получило большой интерес в научном и клиническом сообществах в последние несколько лет. Болезни, вызванные одиночной генной мутацией, такие как фиброзный цистит или гемофилия могут контролироваться длительной экспрессией неповрежденного гена. Иммуностимулирующие гены могут помочь иммунной системе справиться с инфекционными болезнями и раком. Векторы ДНК, кодирующие антигены патогенов могут обеспечить превентивное или терапевтическое применение вакцин ДНК. Генная терапия *ex vivo* включает в себя удаление клеток у пациента с последующей их модификацией *in vitro* с помощью терапевтического гена.

Обработанные клетки затем возвращаются обратно пациенту. *In vivo* генная терапия с другой стороны включает в себя непосредственное необходимого гена в ткани пациента. Наиболее сложная проблема для генной терапии, это независимо от вида доставки *ex vivo* или *in vivo* обеспечить доставку

необходимого количества молекул ДНК к месту определенных таргетных клеток, чтобы достичь необходимых уровней экспрессии этих кодирующих генов. Несколько видов переноса ДНК в таргетные клетки в данное время осуществляются.

Вирусные векторы – наиболее часто используемый инструмент для переноса генов *in vivo* и *ex vivo*. Вирусы выработали механизм прикрепления к клеткам и проникновения через мембрану и находиться внутри клетки, эффективно поставляя ДНК и РНК. Векторы основанные на ретровирусах аденовирусах, лентивирусах или аденосвязанных вирусах используются очень широко, но векторные вирусы герпеса, альфа вируса или вирусы оспы также разрабатываются [11].

Хотя вирусы достаточно эффективны в доставке ДНК, тем не менее они вызывают побочные эффекты и осложнения. Любая вирусная система доставки чтобы быть достаточно эффективной должна содержать вирусные протеины для доставки необходимой ДНК в ядро и вызвать экспрессию необходимых продуктов гена, кроме того она быть разработана таким образом чтобы предотвратить иммунную реакцию против этих протеинов. Эти иммунные реакции делают повторные применения затруднительными или даже невозможными.

Для большинства используемых современных вирусов таргетные клетки должны делиться, интегрировать и экспрессировать доставленный ген. Размер ДНК, который может быть доставлен с помощью современных наиболее широко используемых систем ограничивается 5 кб, что очень мало для большинства генов, представляющих интерес, например, таких как фактор XIII. Эти ограничения постоянно упоминаются и разрабатываются некоторые решения: векторные лентивирусы, которые инфицируют неделящиеся клетки, могут иметь преимущества перед ретровирусными векторами, которым необходимы клеточные реплики для интеграции и экспрессии.

Эта интеграция происходит случайным образом и требует внимания к безопасности применения для большого числа пациентов. Также системы

лентивирусов, будучи AIDS-вирусами, получают из него или связаны с ним сталкиваются с большими проблемами в законодательстве, прежде чем их широкое применение для людей может быть рассмотрено.

Применение систем доставки, основанных на аденовирусах, которые продемонстрировали большие возможности для применений генной терапии, также затрудняется их высокой иммуногенностью; сейчас они замещаются AAV – системами. AAV достаточно трудно культивировать для больших титров, кроме того она имеет серьезные ограничения на размер внедряемого ДНК.

Альтернативы вирусным системам для генной терапии в настоящее время разрабатываются и достигли уровня клинических применений. Невирусные системы непатогенны [12], их легче создавать, и они дешевле, могут применяться повторно и могут содержать большие включения ДНК. Так как стабильность и усвоение голых плазмидных ДНК в тканях очень низки, то для увеличения эффективности применяются механические и химические средства.

Для покрытия ДНК с целью его защиты от разрушения усиления связи с клеткой и лучшей усвояемости применяются липосомные технологии. Эти липиды могут соединяться с другими молекулами для доставки к специфическим видам клеток предотвратить их обнаружение и уничтожение иммунной системой. Даже с этими улучшениями в технологии стабильности и восприимчивости некоторые невирусные системы доставки генов для применений в генной терапии остаются весьма неэффективными и поэтому приходится использовать очень большие количества ДНК.

Электропорация широко применяется для эффективного введения ДНК внутрь клеток эукариот и бактерий. Приложение коротких электрических импульсов к соответствующим клеткам открывает в их мембранах поры, облегчая усвоение ДНК. Только недавно было обнаружено, что приложение электрического поля к соответствующим тканям *in vitro* значительно увеличивает доставку ДНК и экспрессию генов. Усиленный с помощью электропорации перенос ДНК *in vivo* предоставляет определенное количество преимуществ перед вирусными векторами так как ДНК могут быть внедрены в

клетки любых тканей, расположенных возле электродов. Процедура достаточно легкая и занимает очень короткое время. Так как не создается никакой иммуногенности к векторам, то можно проводить повторные внедрения ДНК любого размера. Пример использования электропорации для генной терапии продемонстрирован Мэтью и др. [13].

1.5. Электропорация *ex vivo* в генной терапии

В настоящее время проводятся три клинических исследования по применению электропорации для усиления внедрения генов внутрь целевых клеток *in vitro* и с последующим возвращением обработанных клеток обратно пациенту: два включают в себя перенос генов для облегчения болезней связанных с кровотечением, а третье связано с раковой иммунотерапией. Поврежденные факторы IX и VIII соответственно ответственны за две болезни, связанные с кровотечением. Известно, что последовательное введение даже 5 % нормального уровня фактора свертывания FIX в поток крови может предотвратить серьезные случаи кровотечения у FIX- дефицитных пациентов (гемофилия А). Одно из известных приложений *ex vivo* электропорации это генная терапия гемофилии А.

В случае канцерогенных заболеваний FDA одобрила клинические испытания фазы 1, которые находятся в стадии развития для больных глиобластомой, получающих в настоящее время стандартные методы лечения. Эта работа проводится под руководством Фахрей, который ранее показал, что крысы, имплантированные клетками глиобластомы 9L и иммунизированные также клетками 9L. Клетки были генетически модифицированы с TGF-В антисмысловым геном с помощью электропорации и имели 100 % выживаемость.

1.6. Процедура электропорации на животных моделях

Проведение процедуры электропорации на животных моделях представлены ниже



Рисунок 5 – Процедура усыпления

Перед процедурой электропорации, лабораторную мышь усыпляют. Усыпление производится с помощью эфира. В колбу помещают мышь, на дне которого заранее размещалась смоченная в эфире вата. Спустя некоторое время проверяется состояние.



Рисунок 6 – Введение препарата

После процедуры усыпления мыши, вводится лекарственный препарат в злокачественную опухоль. Количество вводимого препарата выбирается в зависимости от объема опухоли и рекомендаций к препарату. Следует учесть, что объем вводимого препарата должен быть меньше, чем объем препарата, который вводился бы без процедуры электропорации в стандартном плане лечения опухолевых клеток.



Рисунок 7 – Процедура электропорации

Далее производится электропорация опухолевых клеток. Для этого электроды прибора прикладываются к области присутствия опухоли. Обработку опухоли следует проводить с разных сторон, чтобы эффективность электропорации была максимален, т.е. поры образовались во всех опухолевых клетках.

1.7. Преимущества и недостатки электропорации

Помимо метода электропорации, существуют другие различные методы эффективного внедрения молекул лекарственных препаратов. В данном разделе будут рассмотрены преимущества и недостатки метода электропорации по сравнению с другими методами внедрения чужеродного ДНК и молекул в злокачественные опухолевые клетки.

Преимущества:

1) Обширная область применения метода. Ряд экспериментов показали, что метод электропорации эффективен практически на любых клетках [14].

2) Высокая эффективность метода. Внедрение чужеродного ДНК и молекул происходит гораздо эффективней чем при остальных методах. Для примера можно привести изучение электротрансформации клеток кишечной палочки. [15] В эксперименте примерно 80 % клеток кишечной палочки приняли чужеродное ДНК.

3) Малое количество вводимого препарата. В случае метода электропорации, количество применяемого препарата для результата гораздо меньше, чем у других методов. [16].

Недостатки:

1) Высокая доля вероятности гибели ткани. Т.к. эффективность электропорации напрямую зависит от электрических характеристик прибора такие, как количество импульсов, длительность, частота, амплитуда, то при выборе неверного для ткани режима возможно повреждение клеток, что может повлечь за собой гибель ткани. [17].

2) Нарушение ионного баланса клетки. Т.к. метод электропорации основан на механическом повреждении мембраны клетки, то ионы, которые присутствуют вне клетки и внутри клетки ничем не контролируются. Происходит самопроизвольный обмен ионами клетки и межклеточной жидкости, что приводит к ионному дисбалансу клетки. Кроме, того электропорация может активировать природные ионные каналы клетки, что ухудшит дисбаланс. Дисбаланс может повлечь за собой неправильное функционирование клетки. [18].

Раздел 2. Разработка и испытание прибора

2.1. Блок–схема прибора

Прибор для электропорации работает по следующей блок схеме

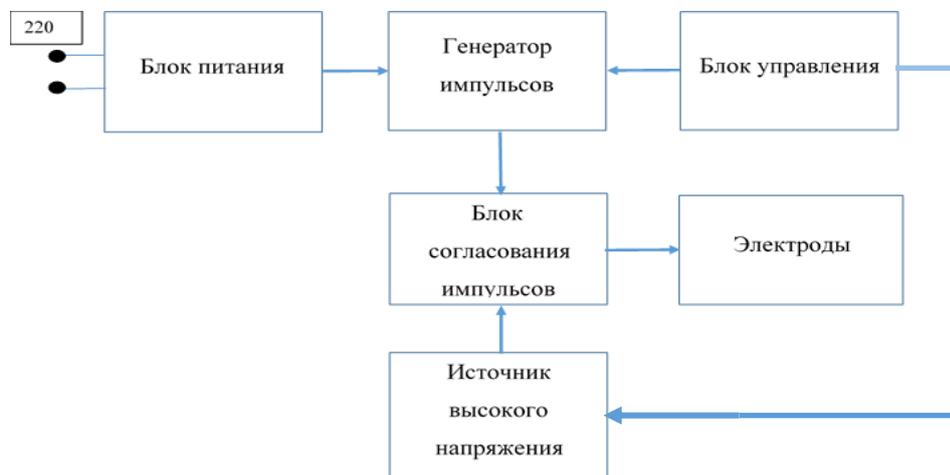


Рисунок 8 – блок схема работы электропоратора

Блок питания, как видно из блок–схемы, подключается к источнику тока 220 В переменного напряжения. После чего в блоке питания происходит “выпрямление” и понижение напряжения. В результате на выходе блока питания напряжение составляет 5 В постоянного напряжения. Такое напряжение необходимо для питания генератора импульсов по техническим рекомендациям. В качестве генератора импульсов выступает микроконтроллер ATmega16. Микроконтроллер позволяет сгенерировать импульсы разных частот и периодов возникновения, а также можно изменить количество импульсов, что позволяет исследовать различные режимы работы и находить оптимальные режимы работы для конкретной ткани. Блок управления представляет собой необходимое количество коммутаторов с дисплеем, подключённых к микроконтроллеру и источнику высокого напряжения, для контроля над выходными импульсами определённого напряжения, длительности, частоты и контроля количества импульсов. Источник высокого напряжения построен по такому же принципу что и блок питания, за исключением того, что в схеме присутствует управляющий трансформатор. Также элементы источника высокого напряжения имеют высокое значение напряжения пробоя, соответственно. В блоке

согласованию происходит увеличение амплитуды импульса, но при этом не изменяется длительность, частота и количество импульсов, задаваемых в микроконтроллере. Полученные импульсы поступают на электроды.

2.2. Блок питания.

Чтобы прибор и в частности микросхемы смогли нормально функционировать, предварительно ток с источника необходимо преобразовать до нужного значения и формы. Для этого используется блок питания следующей схемы.

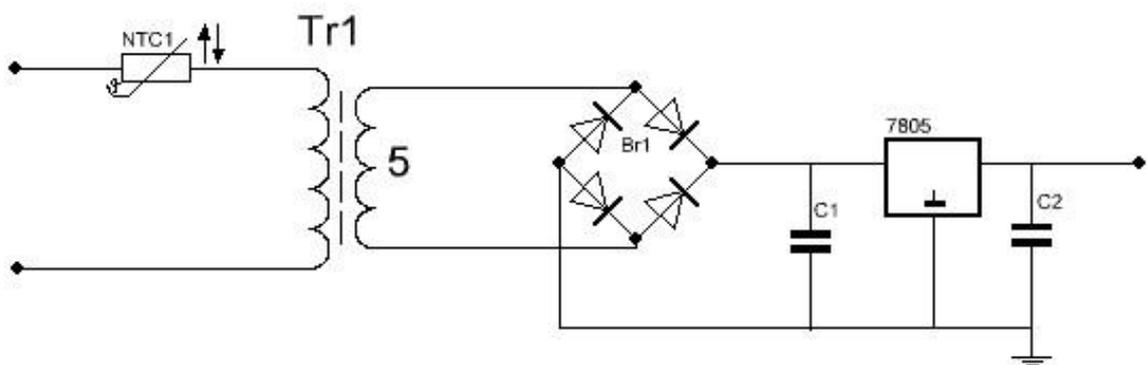


Рисунок 9 – Принципиальная схема блока питания

Так как для питания микроконтроллера нужен постоянный ток с напряжением +5 В необходимо уменьшить и “выпрямить” входное напряжение. Для этого напряжение от “розетки” уменьшается с помощью трансформатора, вторичная намотка которого по количеству меньше первичного. После чего полученное напряжение поступает на диодный мост. На диодном мосте отрицательный полупериод напряжения становится положительным и тем самым используется один период. После напряжение направляется на параллельно подключенный конденсатор, с помощью которого уменьшается пульсация выходного напряжения. Так как на первоначальном источнике напряжение не имеет постоянного напряжения, а постоянно меняется в определённом диапазоне, то трансформированное напряжение также имеет разброс значений. Поэтому после фильтра– конденсатора было решено

подключить регулятор напряжения, после которого напряжение будет постоянным. Для сглаживания остаточного конечного импульса был подключён второй фильтр. Выходной ток становится постоянным с напряжением +5 В

По такой же схеме регулируется напряжение, подаваемое на транзисторы. Для питания полевых транзисторов необходимо напряжение 15 В.

Так как существует риск выхода из строя диодов в мосте было решено подключить термисторы NTC 1 и NTC 2 перед трансформатором. Термисторы ограничивают пусковой ток, возникающий в результате заряда электролитического конденсатора. При включении блока питания происходит зарядка конденсатора меньшим током. Термистор в охлаждённом состоянии имеет высокое сопротивление. После того как через термистор начнёт течь ток, потребляемый прибором, сопротивление начнёт уменьшаться и в конечном итоге термистор практически не будет влиять на ток прибора. Тем самым обеспечивается “плавный пуск” прибора и защита от пробоя диодов моста. Также в случае выхода из строя электрических элементов прибора, термисторы служат в виде предохранителя. Из-за резкого увеличения потребляемого тока прибором, при превышении максимального рабочего тока термисторы выходят из строя и размыкают цепь.

2.3. Блок согласования и источник высокого напряжения

Для синхронизации импульсов микроконтроллера и источника высокого напряжения используется блок согласования следующей схемы

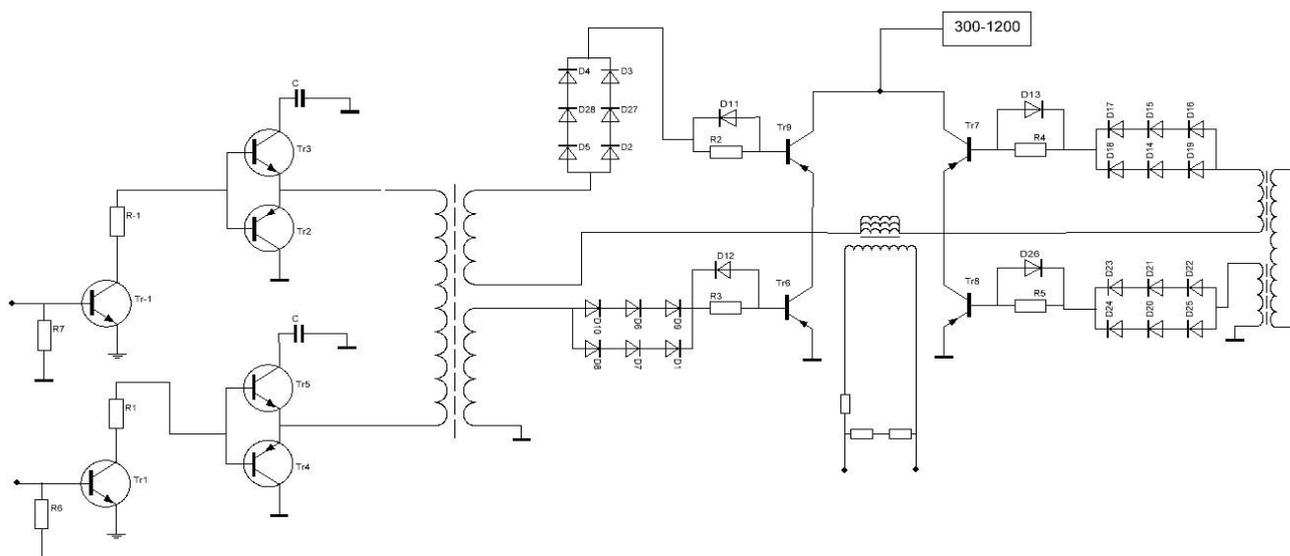


Рисунок 10 – Принципиальные схемы блока согласования

Т.к. в принципиальной схеме прибора применяется источник высокого напряжения (300–1000 В), то в блоке согласования элементы должны иметь максимальное рабочее напряжение и ток нагрузки. Поэтому в блоке согласования, для усиления импульса от микроконтроллера было принято решение использовать 4 полевых транзисторов. Нагрузка от источника будет равномерно распределяться на 2 транзистора за один полупериод. Тем самым мы получим импульс с двумя полупериодами. Импульсы такой формы будут более эффективными, чем однопериодный импульс. Также для питания полевых транзисторов необходимо напряжение +15 В. Но т.к. импульсы должны иметь частоту и длительность задаваемой микроконтроллером, то для синхронизации импульсов микроконтроллера и полевых транзисторов, используются биполярные транзисторы малой мощности.

Импульсы, генерируемые микроконтроллером, направляется на “базу” транзисторов. На “эмиттер” подключается источник 15 В напряжения. Усиленные импульсы от биполярных транзисторов идут к “затворам” полевых транзисторов. Усиленные импульсы, генерируемые микроконтроллером с транзисторами, с определённой частотой и длительностью, коммутируют сток и исток, тем самым ток с источника высокого напряжения приобретает после прохождения через транзистор импульсный характер с длительностью и

частотой импульса микроконтроллера. Таким образом в блоке согласования происходит увеличение амплитуды сигнала до напряжения 300 В–1000 В, в зависимости от параметров опухоли.

Принципиальная схема источника высокого напряжения имеет следующий вид

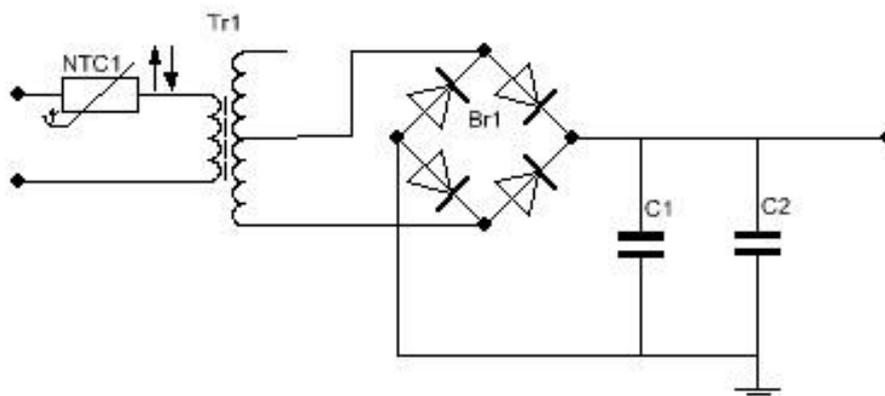


Рисунок 11 – Принципиальная схема источника высокого напряжения

Как ранее уже упоминалось источник высокого напряжения конструктивно не отличается от блока питания. Здесь также используется трансформатор, но другого типа. В данном случае для контроля над выдаваемым напряжением используется управляющий трансформатор. Все остальные элементы были подобраны так, чтобы они смогли выдержать высокое напряжение от трансформатора.

Раздел 3. Испытание прибора и оценка эффективности

3.1. Проведение испытаний прибора на эквивалентной электрической цепи клетки

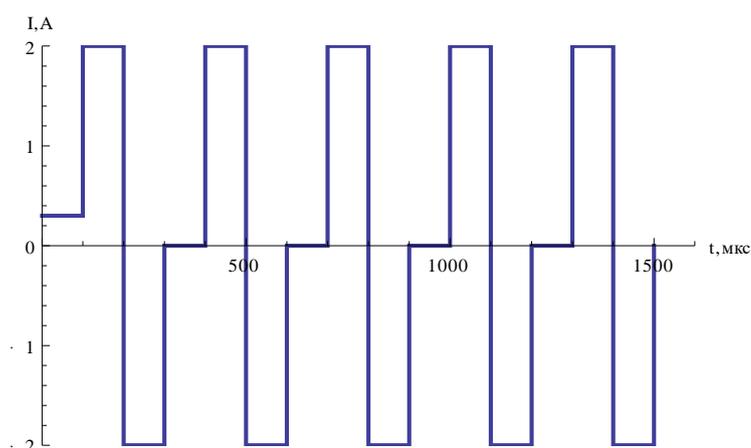
Перед тем как применять прибор для электропорации опухолевых клеток необходимо исследовать прибор на работоспособность и пригодность для процедуры электропорации. Прибор будет считаться пригодным для работы, если выдаваемые характеристики будут соответствовать определённым требованиям.

Требования, выдвигаемые к электропоратору опухолевых клеток следующие:

- Форма импульсов (прямоугольная, бифазная)
- Стабильность амплитуды импульса
- Стабильность скважности импульсов
- Стабильность длительности импульсов

В результате испытаний были получены следующие характеристики: форма импульса, ток и напряжение источника тока при приложении сопротивления на электроды, длительность спада и фронта.

Форма импульса, полученная в испытании, приведена на рисунке 12



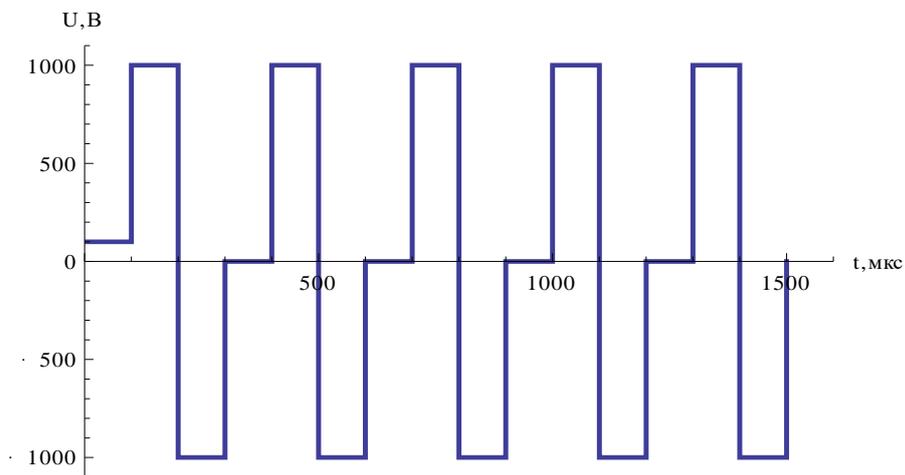


Рисунок 12 – Форма импульса

Из данной осциллограммы видно, что выдаваемые импульсы имеют однородную форму, то есть импульсы не меняют своей формы с течением времени. Также из осциллограммы видно, что длительность импульсов и их период не меняются и остаются постоянными с течением времени.

Следовательно, требования, предъявляемые к форме импульса, были выполнены. После исследования на осциллографе импульсов, выдаваемые прибором, необходимо провести исследование зависимости напряжения и тока на источнике от сопротивления на электродах. Это исследование позволит выявить зависимость падения напряжения от сопротивления.

В данном исследовании напряжение, на источнике не должно изменяться и зависеть от сопротивления, прилагаемое на электроды

Зависимость тока и напряжения от сопротивления на электродах, полученная в результате испытания, приведена на рисунке 13 и 14.

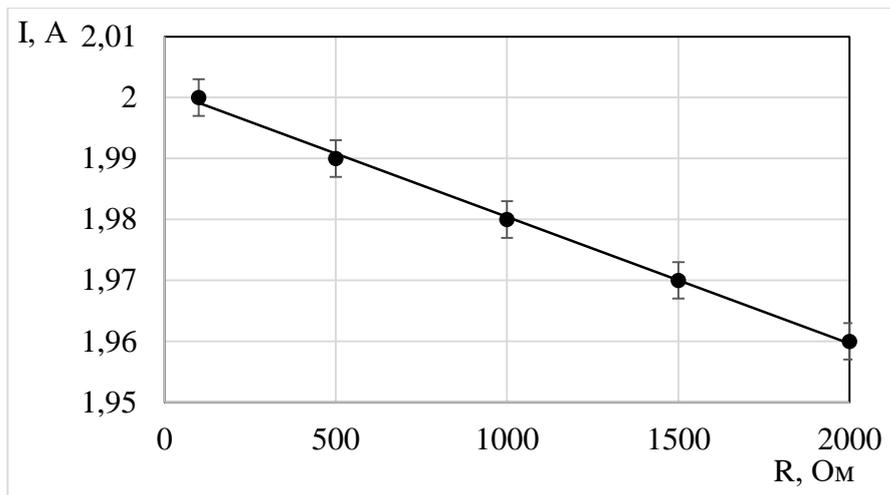


Рисунок 13– График зависимости тока источника от сопротивления

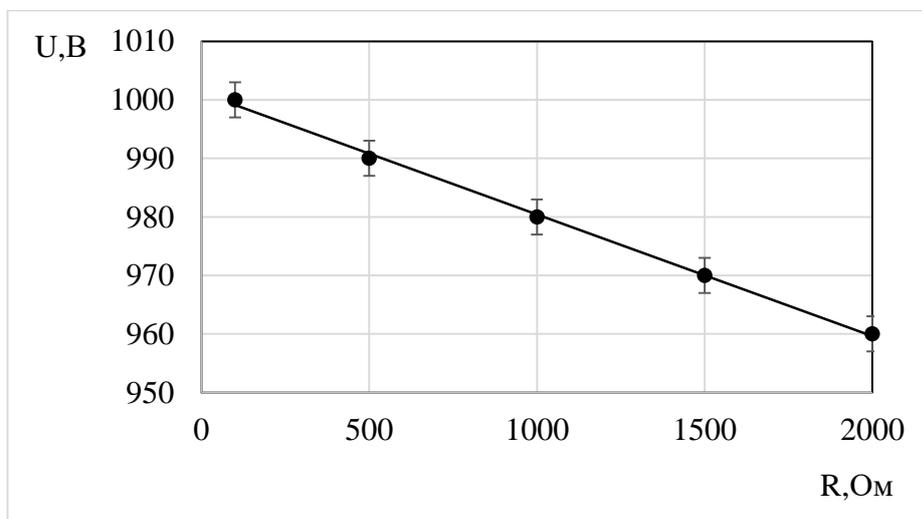


Рисунок 14 – График зависимости напряжения источника от сопротивления.

Из графиков видно, что изменение в токе и напряжении источника тока при увеличении сопротивления на электродах является не значительным и составляет 0,05 А и 50 В соответственно.

Длительность спада и фронта в зависимости от сопротивления приведена ниже

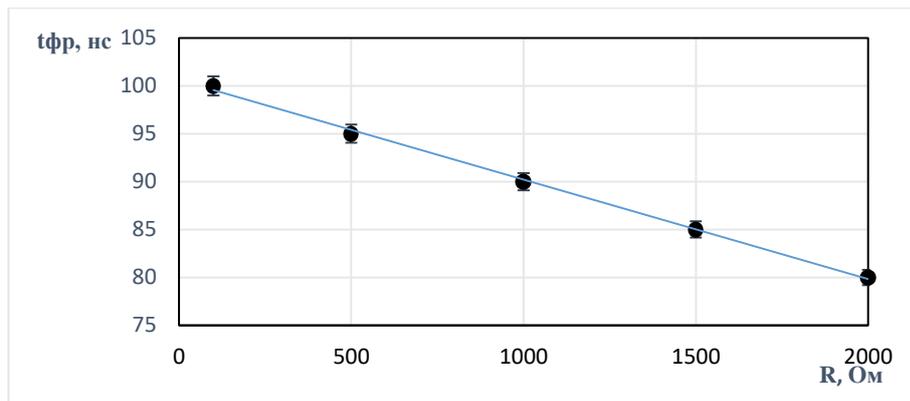


Рисунок 15-Зависимость длительности фронта от сопротивления.

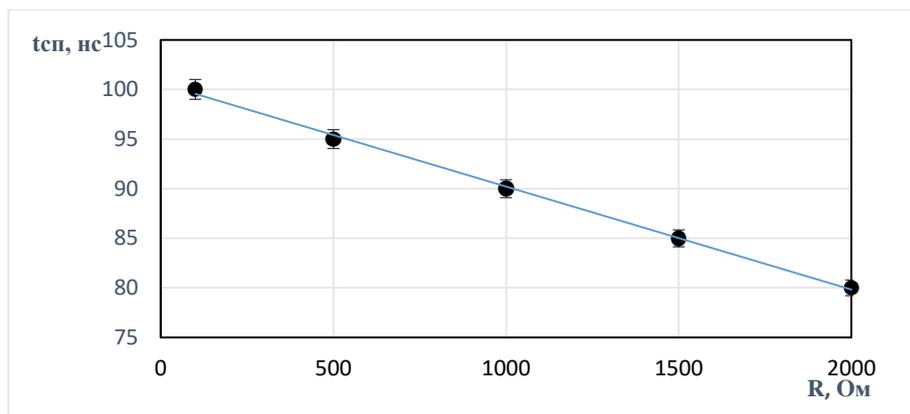


Рисунок 16- Зависимость длительности спада от сопротивления.

Из приведённых графиков видно, что изменение длительности спада и фронта при росте сопротивления является незначительным и составляет 10 нс.

Испытания прибора на эквивалентной электрической цепи можно считать успешным. Ни один из требований, выдвигаемые к прибору, не был нарушен. Форма импульса является однородной. Изменение тока и напряжения является незначительной. Изменение длительности спада и фронта также является незначительным.

3.2. Метод оценки эффективности электропорации.

Эффективность электропорации зависит от множества факторов, измерения которых дают результаты в разной степени информативности о эффективности. Поэтому было решено выбрать метод измерения проводимости тканей для оценки эффективности электропорации, который является оптимальным для нашего исследования. Критерий, по которому был выбран

данный метод, это простота исследования и достаточная информативность о клетках ткани. Измерения проводились при различных режимах работы электропоратора.

Таблица 1. Выбранные режимы работы

Номер режима работы	Амплитуда импульса	Длительность импульса	Количество импульсов
1	1000	100	10
2	1000	100	30
3	1500	100	10

Для измерения проводимости тканей была выбрана следующая схема измерения. Измерение характеристик проводилось до и после электропорации. Схема измерения приведена на рисунке.

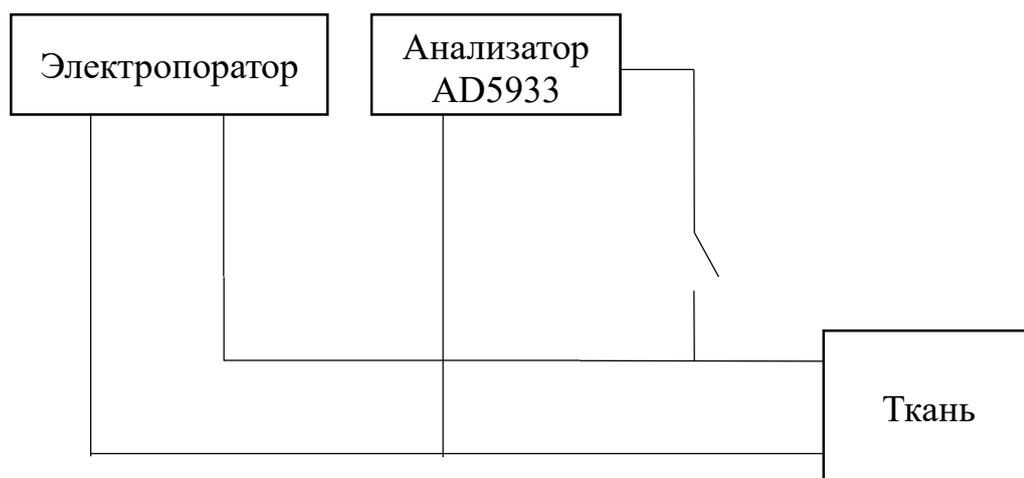


Рисунок 17– Схема измерения проводимости ткани

После снятия характеристик, рассчитывалось отношение проводимости ткани после электропорации к проводимости до электропорации. Измерение проводилось в течении 30 мин после электропорации. Проводимость ткани при разных режимах работы электропоратора приведена на рисунке 18

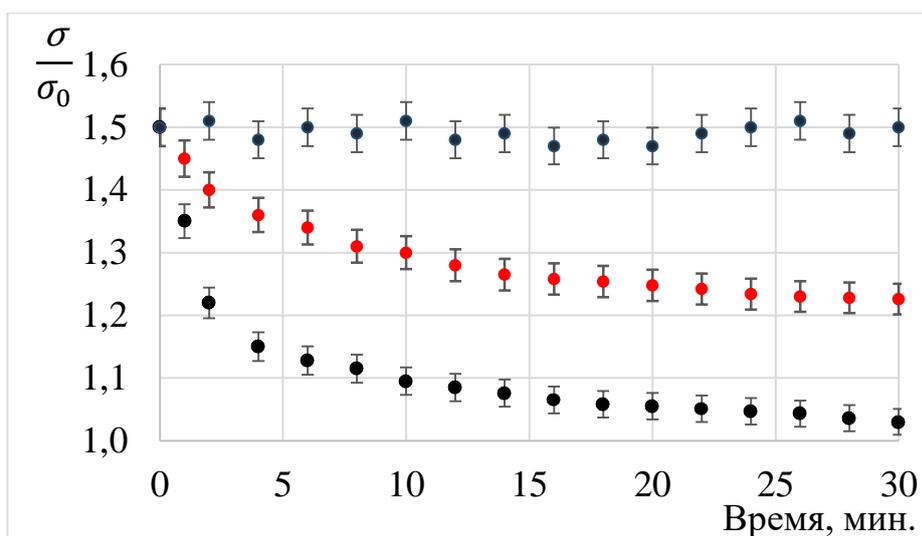


Рисунок 18– Зависимость временной проводимости тканей от режима работы электропоратора.

Из полученного графика видно, что при первом режиме работы происходит резкое увеличение проводимости ткани, после чего проводимость ткани плавно уменьшается до первоначального значения и приходит к 1, что свидетельствует о том, что эффективность электропорации высокая. При втором режиме работы видно, что проводимость ткани также резко увеличивается в первоначальный момент времени, но в дальнейшем падение проводимости тканей заметно медленней, чем при первом режиме работы. Проводимость при данном режиме работы остановиться при определённом значении больше 1, что свидетельствует о том, что ткань частично погибла. При третьем режиме работы наблюдается, что проводимость ткани также, как и при предыдущих режимах работы резко увеличилась, но отношение осталось на максимальном уровне и не изменялось с течением времени. Это свидетельствует о том, что ткань полностью погибла и при данном режиме работы электропорация не рекомендуется.

Раздел 4. Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение

4.1. Предпроектный анализ

В настоящее время перспективность научного исследования определяется не столько масштабом открытия, оценить которое на первых этапах жизненного цикла высокотехнологического и ресурсоэффективного продукта бывает достаточно трудно, сколько коммерческой ценностью разработки. Оценка коммерческой ценности разработки является необходимым условием при поиске источников финансирования для проведения научного исследования и коммерциализации его результатов. Это важно для разработчиков, которые должны представлять состояние и перспективы проводимых научных исследований.

Необходимо понимать, что коммерческая привлекательность научного исследования определяется не только превышением технических параметров над предыдущими разработками, но и тем, насколько быстро разработчик сумеет найти ответы на такие вопросы – будет ли продукт востребован рынком, какова будет его цена, каков бюджет научного проекта, какой срок потребуется для выхода на рынок и т.д.

Достижение цели обеспечивается решением задач:

- оценка коммерческого потенциала и перспективности проведения научных исследований;
- определение возможных альтернатив проведения научных исследований, отвечающих современным требованиям в области ресурсоэффективности и ресурсосбережения;
- планирование научно-исследовательских работ;
- определение ресурсной (ресурсосберегающей), финансовой, бюджетной, социальной и экономической эффективности исследования.

4.1.1. Анализ конкурентных технических решений с позиции ресурсоэффективности и ресурсосбережения

Важно реалистично оценить сильные и слабые стороны разработок конкурентов. Анализ конкурентных технических решений с позиции ресурсоэффективности и ресурсосбережения позволяет провести оценку сравнительной эффективности научной разработки и определить направления для ее будущего повышения.

Данный анализ проведен с помощью оценочной карты (таблица 2). Для этого отобрано две конкурентные разработки. Критерии для сравнения и оценки ресурсоэффективности и ресурсосбережения, приведенные в таблице 2, подбирали исходя из выбранных объектов сравнения с учетом их технических и экономических особенностей разработки, создания и эксплуатации.

Позицию разработки и конкурентов оценивали по каждому показателю экспертным путем по пятибалльной шкале, где 1 – наиболее слабая позиция, а 5 – наиболее сильная. Веса показателей, определяемые экспертным путем, в сумме должны составлять 1.

Анализ конкурентных технических решений определяется по формуле:

$$K = \sum V_i \cdot B_i, \quad (6)$$

где K – конкурентоспособность научной разработки или конкурента; V_i – вес показателя (в долях единицы); B_i – балл i -го показателя.

Для лечения опухолевых клеток с помощью электропорации важны электрические параметры прибора, т.к. от них зависит эффективность лечения. К параметрам относятся амплитуда, частота, длительность и форма импульса. В настоящее время существуют приборы для электропорации, но они используются в других сферах, такие как косметическая коррекция. Данные приборы не приспособлены к работе с опухолевыми клетками. Зарубежные аналоги достаточно дорогостоящие и охватывают не весь спектр опухолевых заболеваний.

Исследование в лечении опухолевых клеток с помощью электропорации продолжается и является перспективным.

Таблица 2 – Оценочная карта для сравнения конкурентных разработок

Критерии оценки	Вес критерия	Баллы			Конкурентоспособность		
		Бф	Бк1	Бк2	Кф	Кк1	Кк2
1	2	3	4	5	6	7	8
Технические критерии оценки ресурсоэффективности							
1. Время процедуры	0,08	5	4	3	0,4	0,3	0,2
2. Помехоустойчивость	0,07	4	4	5	0,3	0,3	0,35
3. Безопасность	0,1	5	5	5	0,5	0,5	0,5
4. Необходимые электрические параметры (амплитуда, частота и длительность импульса)	0,12	5	4	5	0,6	0,5	0,6
5. Простота в эксплуатации	0,09	5	4	5	0,45	0,36	0,45
6. Наличие дорогостоящих элементов	0,2	4	4	2	0,8	0,8	0,4
7. Размеры прибора	0,06	5	4	3	0,3	0,2	0,2
Экономические критерии оценки эффективности							
1. Конкурентоспособность продукта	0,03	4	4	5	0,12	0,12	0,15
2. Цена	0,15	5	3	2	0,75	0,45	0,3
3. Финансирование научной разработки	0,05	4	4	4	0,2	0,2	0,2
4. Наличие сертификации разработки	0,05	4	5	5	0,2	0,25	0,25
Итого	1				4,62	3,98	3,8

Из данной таблицы видно, что предложенный прибор обладает конкурентоспособностью за счёт низкой стоимостью прибора, т.к. не потребовалось использования дорогостоящих элементов. При этом прибор прост в эксплуатации, малогабаритен. Также прибор более приспособлен к лечению опухолевых клеток с помощью электропорации из-за наличия необходимых электрических параметров.

4.2 Планирование управления научно–техническим проектом

4.2.1. Иерархическая структура работ проекта

В процессе создания иерархической структуры работ проекта структурированы и определены содержание всего проекта, которые представлены на рисунке 19.



Рисунок 19 –Иерархическая структура работ

Группа процессов планирования состоит из процессов, осуществляемых для определения общего содержания работ, уточнения целей и разработки последовательности действий, требуемых для достижения данных целей. Иерархическая структура работ (ИСР) – детализация укрупненной структуры работ. [19]

4.2.2. Контрольные события проекта.

В рамках данного раздела определены ключевые события проекта, их даты и результаты, которые получены по состоянию на эти даты. Информация приведена в таблице 3.

Таблица 3 – Контрольные события проекта

№	Контрольное событие	Дата	Результат
1	Разработка технического задания	06.02.2017 – 07.02.2017	Приказ о ВКР
1.1	Составление технического задания	07.02.2017 – 08.02.2017	–
2.1	Определение направления исследования	08.02.2017 – 10.02.2017	–
2.2	Анализ и изучение технической литературы	10.02.2017 – 13.03.2017	Список литературы
3.1	Изучение оборудования, используемого при измерении электрического тока и формы импульса	13.03.2017 – 20.03.2017	–
3.2	Проведение калибровочных замеров на эталонном источнике тока.	20.03.2017 – 24.03.2017	–
3.3	Расчет калибровочных поправок.	24.03.2017 – 01.04.2017	Отчёт
4.1	Разработка макета прибора	01.04.2017 – 20.04.2017	Макет
4.2	Разработка программного обеспечения	20.04.2017 – 10.05.2017	–
4.3	Проведение испытаний прибора	10.05.2017 – 15.05.2017	Отчет
4.4	Анализ и обработка полученных данных	15.05.2017 – 20.05.2017	Отчет
5.1	Корректировка электрической цепи и программного обеспечения	20.05.2017 – 25.05.2017	–
5.3	Оформление пояснительной записки	20.02.2017 – 31.05.2017	Пояснительная записка
5.4	Подготовка к защите диссертационной работы	01.06.2017 – 10.06.2017	Презентация

4.2.3. План проекта

В рамках планирования научного проекта необходимо построить календарный график проекта, представленный в таблице 4. Далее с помощью диаграммы Ганта в таблице 5 проиллюстрирован календарный план проекта, на котором работы по теме характеризуются датами начала и окончания выполнения данных работ [20].

Таблица 4 – Календарный план проекта

Код	Название	Тк, кал. дн.	Дата начала и окончания работ	Состав участников
1	Разработка технического задания	1	06.02.2017 – 07.02.2017	Руководитель
1.1	Составление технического задания	1	07.02.2017 – 08.02.2017	Руководитель
2.1	Определение направления исследования	2	08.02.2017 – 10.02.2017	Руководитель Магистрант
2.2	Анализ и изучение технической литературы	31	10.02.2017 – 13.03.2017	Магистрант
3.1	Изучение оборудования, используемого при измерении электрического тока и формы импульса	7	13.03.2017 – 20.03.2017	Магистрант
3.2	Проведение калибровочных замеров на эталонном источнике тока.	4	20.03.2017 – 24.03.2017	Магистрант
3.3	Расчет калибровочных поправок.	7	24.03.2017 – 01.04.2017	Магистрант
4.1	Разработка макета прибора	19	01.04.2017 – 20.04.2017	Магистрант
4.2	Разработка программного обеспечения	20	20.04.2017 – 10.05.2017	Магистр
4.3	Проведение испытаний прибора	5	10.05.2017 – 15.05.2017	Руководитель Магистрант
4.4	Анализ и обработка полученных данных	5	15.05.2017 – 20.05.2017	Магистрант
5.1	Корректировка электрической цепи и программного обеспечения	2	20.05.2017 – 25.05.2017	Магистрант
5.3	Оформление пояснительной записки	100	20.02.2017 – 31.05.2017	Магистрант
5.4	Подготовка к защите диссертационной работы	7	01.06.2017 – 10.06.2017	Руководитель Магистрант

Таблица 5 – Календарный план-график в виде диаграммы Ганта.

№ работ	Вид работ	Исполнители	T _{кi} , чел. дн.	Продолжительность выполнения работ													
				Фев.			Март			Апр			Май		Июнь		
				1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	1	2	
1	Разработка технического задания	Руководитель															
2.1	Составление технического задания	Руководитель	1														
2.2	Определение направления исследования	Руководитель Магистрант	2														
2.3	Анализ и изучение технической литературы	Магистрант	31														
3.1	Изучение оборудования, используемого при измерении электрического тока и формы импульса	Магистрант	7		+												
3.2	Проведение калибровочных замеров на эталонном источнике тока.	Магистрант	4														
3.3	Расчет калибровочных поправок.	Магистрант	7														
4.1	Разработка макета прибора	Магистрант	19														
4.2	Разработка программного обеспечения	Магистрант	20														
4.3	Проведение испытаний прибора	Магистрант	5														
4.4	Анализ и обработка полученных данных	Магистрант	5														
5.1	Корректировка электрической цепи и программного обеспечения	Магистрант	2														
5.2	Оформление пояснительной записки	Магистрант	100														
5.3	Подготовка к защите диссертационной работы	Руководитель Магистрант	7														

4.3. Бюджет научно–технического исследования (НТИ)

При планировании бюджета НТИ должно быть обеспечено полное и достоверное отражение всех видов расходов, связанных с его выполнением. В процессе формирования бюджета НТИ используется следующая группировка затрат по статьям:

1. Материалы.
2. Затраты на оплату труда работников, непосредственно участвующих в НИОКР.
3. Отчисления во внебюджетные фонды.
4. Накладные расходы.

Статьи 1-4 относятся к прямым затратам, величину прямых затрат, как правило, следует определять прямым счетом, это затраты, связанные непосредственно с выполнением конкретного НТИ. Остальные затраты рассчитываются косвенным способом. Это - затраты на содержание аппарата управления, общетехнических и общехозяйственных служб, они объединяются в статье «Накладные расходы».

4.3.1. Расчёт материальных затрат

Основными затратами в данной исследовательской работе являются затраты на электроэнергию при работе на ЭВМ и с приборами измерения. Результаты расчётов по затратам на материалы приведены в таблице 6.

Таблица 6 – Материальные затраты

Наименование	Марка, размер	Количество	Цена за единицу, руб.	Сумма, руб.
Электроэнергия, потреблённая измерительными оборудованием	–	280 кВт·ч	5,8	1624
Электроэнергия, потреблённая персональным компьютером	–	140 кВт·ч	5,8	812
Электроэнергия, потреблённая прибором для электропорации	–	100 кВт·ч	5,8	580
Бумага	SvetoCopy	1 пачка	210	210
Ручка	Berlingo	1	45	45
Доступ в интернет	–	4 месяца	350	1400
Всего за материалы				4683
Транспортно-заготовительные расходы				0
Итого:				4683

В себестоимость НТИ также была включена стоимость электроэнергии, освещения и отопления помещения.

Затраты на электроэнергию рассчитываются по формуле:

$$C = C_{\text{эл}} \cdot P \cdot F_{\text{об}}, \quad (7)$$

где $C_{\text{эл}}$ – тариф на промышленную электроэнергию (5,8 рублей за 1 киловатт в час); P – мощность оборудования измеряется в кВт; $F_{\text{об}}$ – время использования оборудования в часах.

При выполнении работы использовался стационарный компьютер со средней мощностью 0,55 кВт. Тогда с расчётом на шестидневный восьмичасовой рабочий день мощность будет равна

$$E = P \cdot F_{\text{об}} = 0,55 \cdot 280 \text{ ч} = 140 \text{ кВт} \cdot \text{ч}.$$

Также, кроме работы на ЭВМ, при работе использовались измерительные приборы. К ним относятся следующие приборы: осциллограф, анализатор импеданса. Средняя мощность осциллографа составляет 0,48 кВт и средняя мощность анализатора импеданса 0,6 кВт. Полная мощность составляет с расчётом на шестидневный восьмичасовой рабочий день.

$$E = P_{\text{осц}} \cdot F_{\text{об}} + P_{\text{ан}} \cdot F_{\text{об}} = 0,48 \cdot 280 + 0,6 \cdot 280 = 280 \text{ кВт} \cdot \text{ч}$$

Средняя мощность макета прибора составляет 0,39 кВт. Полная мощность 100 кВт ч

Итого стоимость электроэнергии:

$$C = 5,8 \cdot (280 + 100 + 140) = 3016 \text{ руб}$$

4.3.2. Затраты на оплату труда исполнителей НТИ

Статья включает основную заработную плату работников, непосредственно занятых выполнением НТИ, (включая премии, доплаты) и дополнительную заработную плату [21].

$$C_{\text{зп}} = Z_{\text{осн}} + Z_{\text{доп}}, \quad (8)$$

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

Основная заработная плата научного руководителя рассчитывается на основании отраслевой оплаты труда. Отраслевая система оплаты труда в ТПУ предполагает следующий состав заработной платы:

1. оклад – определяется предприятием. В ТПУ оклады распределены в соответствии с занимаемыми должностями, например, ассистент, ст. преподаватель, доцент, профессор.

2. стимулирующие выплаты – устанавливаются руководителем подразделений за эффективный труд, выполнение дополнительных обязанностей и т.д.

Дополнительная заработная плата включает оплату за непроработанное время (очередной и учебный отпуск, выполнение государственных обязанностей, выплата вознаграждений за выслугу лет и т.п.) и рассчитывается исходя из 10-15% от основной заработной платы, работников, непосредственно участвующих в выполнении темы:

$$Z_{\text{доп}} = K_{\text{доп}} \cdot Z_{\text{осн}}, \quad (9)$$

где $Z_{\text{доп}}$ – дополнительная заработная плата в рублях; $K_{\text{доп}}$ – коэффициент дополнительной зарплаты; $Z_{\text{осн}}$ – основная заработная плата в рублях.

Основная заработная плата руководителя рассчитывается по формуле:

$$Z_{\text{осн}} = Z_{\text{дн}} \cdot T_{\text{раб}}, \quad (10)$$

где $Z_{\text{осн}}$ – основная заработная плата одного работника; $T_{\text{раб}}$ – продолжительность работ, выполняемых научно-техническим работником в рабочих днях; $Z_{\text{дн}}$ – среднедневная заработная плата работника в рублях.

Среднедневная заработная плата рассчитывается по формуле:

$$Z_{\text{дн}} = \frac{Z_{\text{М}} \cdot \text{М}}{F_{\text{д}}}, \quad (11)$$

где $Z_{\text{М}}$ – месячный должностной оклад работника, руб.; М – количество месяцев работы без отпуска в течение года; $F_{\text{д}}$ – действительный годовой фонд рабочего времени научно-технического персонала (в рабочих днях).

Количество месяцев работы без отпуска в течение года рассчитывается следующим образом: при отпуске в 8 рабочих дней М = 10,4 месяцев, 6-дневная неделя.

Основная заработная плата руководителя за период проведения работ (8 рабочих дня) равна:

$$Z_{\text{дн}} = \frac{Z_{\text{М}} \cdot \text{М}}{F_{\text{д}}} = \frac{26300 \cdot 10,4}{251} * 1,3 = 1416,8 \text{ руб./день} .$$

$$Z_{\text{осн}} = Z_{\text{дн}} \cdot T_{\text{раб}} = 1416,8 \cdot 8 = 11328,211 \text{ руб.}$$

$$Z_{\text{доп}} = K_{\text{доп}} \cdot Z_{\text{осн}} = 0,12 \cdot 11328,211 = 1359,66 \text{ руб.}$$

$$C_{\text{зп}} = Z_{\text{осн}} + Z_{\text{доп}} = 11328,21 + 1359,66 = 12687,59 \text{ руб.}$$

Заработная плата магистра состоит из стипендии. Магистр, выполнивший данную работу, получает стипендию в размере 2275 руб. Заработная плата составит: $C = 2275 \cdot 4 = 9100 \text{ руб}$

4.3.3. Отчисления во внебюджетные фонды.

Размер отчислений во внебюджетные фонды в 2017 составляет 32% от суммы затрат на оплату труда работников, непосредственно занятых выполнением НИОКР [22].

$$C_{\text{внеб}} = K_{\text{внеб}} \cdot (Z_{\text{осн}} + Z_{\text{доп}}), \quad (12)$$

где $K_{\text{внеб}}$ – коэффициент отчислений в социальные фонды.

$$C_{\text{внеб}} = 0,32 \cdot 12687,59 = 4060,03 \text{ руб.}$$

4.3.4. Накладные расходы

Для учета накладных расходов нужно учесть расходы на содержание аппарата управления и общехозяйственных (общеуниверситетских) служб, которые в равной степени относятся ко всем выполняемым НИИ. По этой статье учитываются оплата труда административно-управленческого персонала, содержание зданий, оргтехники и хозяйственного инвентаря, амортизация имущества, расходы по охране труда и подготовке кадров.

Накладные расходы учитывают прочие затраты организации, не попавшие в предыдущие статьи расходов: печать и ксерокопирование материалов исследования, оплата услуг связи, электроэнергии, почтовые и телеграфные расходы, размножение материалов и т.д. Их величина определяется по следующей формуле:

$$Z_{\text{накл}} = (\text{сумма статей } 1 \div 6) \cdot k_{\text{нр}}, \quad (13)$$

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

Величину коэффициента накладных расходов взята в размере 16%.

$$Z_{\text{накл}} = 12687,59 \cdot 0,16 = 2030,01 \text{ руб.}$$

4.4. Формирование бюджета затрат научно–технического исследования

Рассчитанная величина затрат научно-исследовательской работы является основой для формирования бюджета затрат проекта. Определение бюджета затрат на научно-исследовательский проект по каждому варианту исполнения приведен в таблице 7 [23].

Таблица 7– Расчет бюджета затрат НТИ

Наименование статьи	Стоимость затрат, в рублях (руководитель+магистр)
1. Материальные затраты НТИ	4683
2. Затраты по основной заработной плате исполнителей темы	21787,87
3. Затраты по дополнительной заработной плате исполнителей темы	1359,66
4. Отчисления во внебюджетные фонды	4060,03
5. Накладные расходы	2030,01
6. Бюджет затрат НТИ	33920,57

В ходе выполнения экономической части ВКР были проведены расчеты плановой себестоимости проведения НТИ и времени, необходимого на проведение ВКР. Плановая себестоимость работы составляет рублей, значительная часть которой – затраты на оборудование.

4.5. Организационная структура проекта

Организационная структура проекта — наиболее соответствующая проекту временная организационная структура, включающая всех его участников и создаваемая для успешного достижения целей проекта.

Разработка организационной структуры проекта включает:

- идентификацию всех организационных единиц;
- определение ролей участников проекта и их взаимодействия,
- определение ответственности и полномочий;
- распределение ответственности и полномочий между организационными единицами структуры;
- разработку инструкций, регламентирующих взаимодействия в структуре и рабочие процедуры.

Организационная структура проекта является динамической структурой, которая претерпевает изменения в процессе осуществления проекта. Эти изменения зависят от фаз жизненного цикла проекта, типов, используемых в проекте контрактов, и других условий выполнения проекта. Организационная структура данного проекта представлена на рисунке 20.



Рисунок 20—Иерархическая структура работ

4.6. Матрица ответственности

Матрица ответственности определяет степень ответственности каждого члена проекта за ту или иную задачу, если он имеет к ней некоторое отношение [24].

Таблица 8 – Матрица ответственности

Этапы исследования	Научный руководитель	Консультант Англ.яз.	Консультант менеджмент	Консультант Соц.отв-ть.	Магистрант
Сбор и изучение научно-технической литературы	О				И
Изучение оборудования для измерения электрических параметров	О				И
Проведение калибровочных работ	О				И
Разработка макета прибора	О				И
Разработка программного обеспечения	О				И
Проведение испытаний прибора	О				И
Анализ и обработка полученных результатов	О				И
Оценка ресурсоэффективности и ресурсосбережения			С		И
Раздел социальной ответственности				С	И
Перевод раздела на английский язык		С			И
Оформление пояснительной записки и презентации	С				И

Ответственный (О)– лицо, отвечающее за реализацию этапа проекта и контролирующее его ход. Исполнитель (И) – лицо (лица), выполняющие работы в рамках этапа проекта. Утверждающее лицо (У) – лицо, осуществляющее утверждение результатов этапа проекта (если этап предусматривает

утверждение). Согласующее лицо (С) – лицо, осуществляющее анализ результатов проекта и участвующее в принятии решения о соответствии результатов этапа требованиям [25].

4.7. Определение ресурсной эффективности исследования

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

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

где I_{pi} – интегральный показатель ресурсоэффективности для i -го варианта исполнения разработки; a_i – весовой коэффициент i -го варианта исполнения разработки; b_i^a, b_i^b – балльная оценка i -го варианта исполнения разработки, устанавливается экспертным путем по выбранной шкале оценивания; n – число параметров сравнения.

Для потребителя медицинских учреждений, специализирующие на лечении опухолевых заболеваний, необходимы приборы, которые просты в эксплуатации. Связано это с тем, что в клиниках нужно принять большое количество пациентов. Также чтобы приборы не реагировали и не выходили из строя из-за внешних источников электромагнитного поля необходимы приборы с повышенной помехоустойчивостью. Разнообразие заболеваний приводит к потребности к гибкости в работе. Для удобства и экономической выгоды учитываются размеры прибора и высокий срок работы.

В качестве аналога 1 был взят прибор фирмы OxyJet, модель NV-909 Super OxyJet Core. Аналог 2– BTL4000 NNM

Расчет интегрального показателя ресурсоэффективности данного исследования представлен в форме таблицы 9.

Таблица 9 – Сравнительная оценка характеристик вариантов исполнения

проекта

Критерии \ ПО	Весовой коэффициент параметра	Текущий проект	Аналог 1	Аналог 2
1. Размеры прибора	0,1	5	4	5
2. Удобство в эксплуатации (соответствует требованиям потребителей)	0,2	5	4	5
3. Помехоустойчивость	0,2	5	5	5
4. Энергосбережение	0,1	4	4	3
5. Надежность	0,2	5	5	5
6. Гибкость в работе	0,2	5	4	3
ИТОГО	1	4,9	4,3	4,4

Интегральный финансовый показатель разработки определяется как:

$$I_{\Phi}^p = \frac{\Phi_i}{\Phi_{max}}, \quad (15)$$

где Φ_i – стоимость i -го варианта исполнения; Φ_{max} – максимальная стоимость исполнения научно-исследовательского проекта (в т.ч. аналоги).

$$I_{\Phi}^p = \frac{\Phi_p}{\Phi_{max}} = \frac{33953,57}{600000} = 0,05;$$

$$I_{\Phi}^{a1} = \frac{\Phi_{a1}}{\Phi_{max}} = \frac{238000}{600000} = 0,39;$$

$$I_{\Phi}^{a2} = \frac{\Phi_{a2}}{\Phi_{max}} = \frac{600000}{600000} = 1.$$

Интегральный показатель эффективности вариантов исполнения разработки ($I_{финр}^p$) и аналога ($I_{финр}^a$) определяется на основании интегрального показателя ресурсоэффективности и интегрального финансового показателя по формуле:

$$I_{\text{финр}}^p = \frac{I_m^p}{I_{\phi}^p}, I_{\text{финр}}^a = \frac{I_m^a}{I_{\phi}^a}, \quad (16)$$

$$I_{\text{финр}}^p = \frac{4,9}{0,05} = 98, ; I_{\text{финр}}^{a1} = \frac{4,3}{0,39} = 11,02; I_{\text{финр}}^{a2} = \frac{4,4}{1} = 4,4$$

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

Сравнительная эффективность проекта:

$$\mathcal{E}_{\text{ср}} = \frac{I_{\text{финр}}^p}{I_m^p}, \quad (17)$$

Таблица 10 – Сравнительная эффективность анализа

№ п/п	Показатели	Аналог 1	Аналог 2	Разработка
1	Интегральный показатель ресурсоэффективности разработки и аналогов	4,2	4,4	4,9
2	Интегральный показатель эффективности вариантов исполнения разработки и аналога	11,02	4,4	98
3	Сравнительная эффективность вариантов исполнения	2,56	1	25

На основе расчета интегрального показателя с определением двух средневзвешенных величин: финансовой эффективности и ресурсоэффективности научного исследования можно заключить что, сравнительная оценка текущего проекта выше других аналогов.

Таким образом, итоговая себестоимость НИР составила 33953,85 рублей, время, необходимое для выполнения работы, составило 81 календарный день.

Раздел 5. Социальная ответственность

Современные условия работы повлекли к росту риска получения производственных травм и профессиональных заболеваний. Для того чтобы уменьшить риск, необходимо повсеместное внедрение комплексной системы управления охраной труда путём объединения различных мероприятий в единую систему целенаправленных действий на все возможных стадиях и уровнях производственного процесса.

Охрана труда – это система законодательных, социально-экономических, организационных, технологических, гигиенических и лечебно-профилактических мероприятий и средств, обеспечивающих безопасность, сохранение здоровья и работоспособности человека в процессе труда [26].

В целях предупреждения несчастных случаев вводятся правила по охране труда и техники безопасности, что обеспечивает безопасные условия труда для работающих и являются обязательными для исполнения рабочими, руководящими, инженерно–техническими работниками.

Производственный фактор, воздействие которого на работающего в определенных условиях приводит к заболеванию или снижению трудоспособности называется вредным производственным фактором. [26]

5.1. Анализ опасных и вредных факторов.

Производственные условия на рабочем месте характеризуются наличием опасных и вредных факторов, которые классифицируются по группам элементов: физические, химические, биологические, психофизиологические.

В таблице 11 приведены основные элементы производственного процесса, формирующие опасные и вредные факторы

Таблица 11 - Основные элементы производственного процесса, формирующие опасные и вредные факторы

Наименование видов работ и параметров производственного процесса	ФАКТОРЫ ГОСТ 12.0.003-74 ССБТ		Нормативные документы
	Вредные	Опасные	
Работа на ПК и измерение электрических параметров прибора НИ ТПУ, ФТИ, кафедра ПФ,		Электрический ток	ГОСТ 12.1.038-82 ССБТ. Электробезопасность
	Воздействие радиации (ВЧ,УВЧ,СВ Ч и т.д.)		СанПиН 2.2.2/2.4.1340-03 Санитарно-эпидемиологические правила и нормативы. «Гигиенические требования к ПЭВМ и организация работы»
		Пожары	ГОСТ Р12.1.004-85 ССБТ Пожарная безопасность

На инженера, работа которого связана с измерением электрических параметров на приборе и с введением отчётов на компьютере, воздействуют следующие факторы:

- 1) физические:
 - температура и влажность воздуха;
 - шум;
 - статическое электричество;
 - электромагнитное поле низкой частоты;
 - освещённость;

- наличие излучения;
- 2) психофизиологические

Психофизиологические опасные и вредные производственные факторы, делятся на: физические перегрузки (статические, динамические) и нервно-психические перегрузки (умственное перенапряжение, монотонность труда, эмоциональные перегрузки).

5.2. Обоснование и разработка мероприятий по снижению уровней опасного и вредного воздействия и устранению их влияния при работе с ПЭВМ

5.2.1. Организационные мероприятия

Весь персонал обязан знать и строго соблюдать правила техники безопасности. Обучение персонала технике безопасности и производственной санитарии состоит из вводного инструктажа и инструктажа на рабочем месте ответственным лицом.

Проверка знаний правил техники безопасности проводится квалификационной комиссией после обучения на рабочем месте. Проверяемому, присваивается соответствующая его знаниям и опыту работы квалификационная группа по технике безопасности и выдается специальная удостоверение.

Лица, обслуживающие электроустановки не должны иметь увечий и болезней, мешающих производственной работе. Состояние здоровья устанавливается медицинским освидетельствованием.

5.2.2. Технические мероприятия

Рациональная планировка рабочего места предусматривает четкий порядок и постоянство размещения предметов, средств труда и документации. То, что требуется для выполнения работ чаще должно располагаться в зоне легкой досягаемости рабочего пространства, как показано на рисунке 21

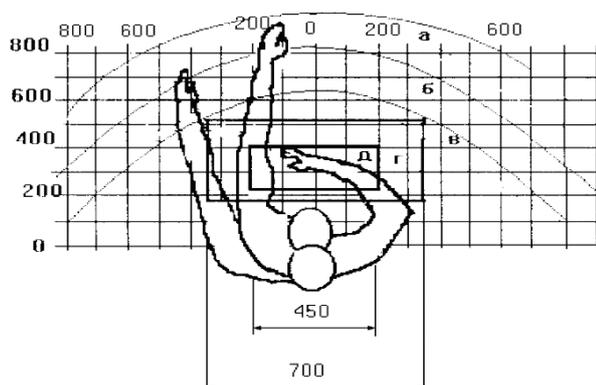


Рисунок 21- Зоны досягаемости рук в горизонтальной плоскости а – зона максимальной досягаемости рук; б – зона досягаемости пальцев при вытянутой руке; в - зона легкой досягаемости ладони; г – оптимальное пространство для грубой ручной работы; д – оптимальное пространство для тонкой ручной работы.

Оптимальное размещение предметов труда и документации в зонах досягаемости рук: дисплей размещается в зоне а (в центре); клавиатура – в зоне г/д; системный блок размещается в зоне б (слева); принтер находится в зоне а (справа); документация – в зоне легкой досягаемости ладони – в (слева) – литература и документация, необходимая при работе; в выдвижных ящиках стола – литература, не используемая постоянно.

При проектировании письменного стола должны быть учтены следующие требования.

Высота рабочей поверхности стола рекомендуется в пределах 680-800 мм. Высота рабочей поверхности, на которую устанавливается клавиатура, должна быть 650 мм. Рабочий стол должен быть шириной не менее 700 мм и длиной не менее 1400 мм. Должно иметься пространство для ног высотой не менее 600 мм, шириной – не менее 500 мм, глубиной на уровне колен – не менее 450 мм и на уровне вытянутых ног – не менее 650 мм.

Рабочее кресло должно быть подъёмно-поворотным и регулируемым по высоте и углам наклона сиденья и спинки, а также расстоянию спинки до переднего края сиденья. Рекомендуется высота сиденья над уровнем пола 420-550 мм. Конструкция рабочего кресла должна обеспечивать: ширину и глубину

поверхности сиденья не менее 400 мм; поверхность сиденья с заглублённым передним краем.

Монитор должен быть расположен на уровне глаз оператора на расстоянии 500-600 мм. Согласно нормам, угол наблюдения в горизонтальной плоскости должен быть не более 45 градусов к нормали экрана. Лучше если угол обзора будет составлять 30 градусов. Кроме того, должна быть возможность выбирать уровень контрастности и яркости изображения на экране.

Должна предусматриваться возможность регулирования экрана:

- по высоте +3 см;
- по наклону от 10 до 20 градусов относительно вертикали;
- в левом и правом направлениях.

Клавиатуру следует располагать на поверхности стола на расстоянии 100-300 мм от края. Нормальным положением клавиатуры является её размещение на уровне локтя оператора с углом наклона к горизонтальной плоскости 15 градусов. Более удобно работать с клавишами, имеющими вогнутую поверхность, четырёхугольную форму с закруглёнными углами. Конструкция клавиши должна обеспечивать оператору ощущение щелчка. Цвет клавиш должен контрастировать с цветом панели.

При однообразной умственной работе, требующей значительного нервного напряжения и большого сосредоточения, рекомендуется выбирать неяркие, малоконтрастные цветочные оттенки, которые не рассеивают внимание (малонасыщенные оттенки холодного зеленого или голубого цветов). При работе, требующей интенсивной умственной или физической напряженности, рекомендуются оттенки тёплых тонов, которые возбуждают активность человека.

5.2.3. Условия безопасной работы

Основные параметры, характеризующие условия труда это: микроклимат, шум, вибрация, электромагнитное поле, излучение, освещённость.

Воздух рабочей зоны (микроклимат) производственных помещений определяют следующие параметры: температура, относительная влажность, скорость движения воздуха. Оптимальные и допустимые значения характеристик микроклимата устанавливаются в соответствии со СНиП СанПиН 2.2.2/2.4.1340-03 и приведены в таблице 12

Таблица 12 Оптимальные и допустимые параметры микроклимата

Период года	Температура, °С	Относительная влажность, %	Скорость движения воздуха, м/с
Холодный и переходный	23-25	40-60	0,1
Тёплый	23-25	40	0,1

К мероприятиям по оздоровлению воздушной среды в производственном помещении относятся: правильная организация вентиляции и кондиционирования воздуха, отопление помещений. Вентиляция может осуществляться естественным и механическим путём. В помещение должны подаваться следующие объёмы наружного воздуха: при объёме помещения до 20 м³ на человека – не менее 30 м³ в час на человека; при объёме помещения более 40 м³ на человека и отсутствии выделения вредных веществ допускается естественная вентиляция.

Система отопления должна обеспечивать достаточное, постоянное и равномерное нагревание воздуха. В помещениях с повышенными требованиями к чистоте воздуха должно использоваться водяное отопление. Параметры микроклимата в используемой лаборатории регулируются системой центрального отопления, и имеют следующие значения: влажность – 40%, скорость движения воздуха – 0,1 м/с, температура летом – 20–25 °С, зимой – 13–15 °С. В лаборатории осуществляется естественная вентиляция. Воздух поступает и удаляется через щели, окна, двери. Основной недостаток такой вентиляции в том, что приточный воздух поступает в помещение без предварительной очистки и нагревания.

Шум и вибрация ухудшают условия труда, оказывают вредное воздействие на организм человека, а именно, на органы слуха и на весь организм через центральную нервную систему. В результате этого ослабляется внимание, ухудшается память, снижается реакция, увеличивается число ошибок при работе. Шум может создаваться работающим оборудованием, установками кондиционирования воздуха, осветительными приборами дневного света, а также проникать извне. При выполнении работы на ПЭВМ уровень шума на рабочем месте не должен превышать 50 дБ.

Экран и системные блоки производят электромагнитное излучение. Основная его часть происходит от системного блока и видео-кабеля. Согласно [СанПиН 2.2.2/2.4.1340-03] напряженность электромагнитного поля на расстоянии 50 см вокруг экрана по электрической составляющей должна быть не более:

в диапазоне частот 5Гц-2кГц - 25В/м;

в диапазоне частот 2кГц-400кГц - 2,5В/м.

Плотность магнитного потока должна быть не более:

в диапазоне частот 5Гц-2кГц - 250нТл;

в диапазоне частот 2кГц-400кГц - 25нТл.

Существуют следующие способы защиты от ЭМП:

- увеличение расстояния от источника (экран должен находиться на расстоянии не менее 50 см от пользователя);
- применение приэкранных фильтров, специальных экранов и других средств индивидуальной защиты.

При работе с компьютером источником ионизирующего излучения является дисплей. Под влиянием ионизирующего излучения в организме может происходить нарушение нормальной свертываемости крови, увеличение хрупкости кровеносных сосудов, снижение иммунитета и др. Доза облучения при расстоянии до дисплея 20 см составляет 50 мкР/час. По нормам [СанПиН 2.2.2/2.4.1340-03] конструкция ЭВМ должна обеспечивать мощность

экспозиционной дозы рентгеновского излучения в любой точке на расстоянии 0,05 м от экрана не более 100 мкР/час.

Утомляемость органов зрения может быть связана как с недостаточной освещенностью, так и с чрезмерной освещенностью, а также с неправильным направлением света.

5.3. Электробезопасность

В зависимости от условий в помещении опасность поражения человека электрическим током увеличивается или уменьшается. Не следует работать с ЭВМ и прибором для электропорации в условиях повышенной влажности (относительная влажность воздуха длительно превышает 75%), высокой температуры (более 35°C), наличии токопроводящей пыли, токопроводящих полов и возможности одновременного прикосновения к имеющим соединение с землёй металлическим элементам и металлическим корпусом электрооборудования. Оператор работает с электроприборами: компьютером (дисплей, системный блок и т.д.), периферийными устройствами, анализатором импеданса AD5933, осциллографом, прибором для электропорации.

Существует опасность электропоражения в следующих случаях:

- при непосредственном прикосновении к токоведущим частям во время ремонта электроприборов;
- при прикосновении к нетоковедущим частям, оказавшимся под напряжением (в случае нарушения изоляции токоведущих частей);
- при прикосновении с полом, стенами, оказавшимися под напряжением;
- при коротком замыкании в высоковольтных блоках: блоках питания приборов и блоке дисплейной развёртки.
- действие электрического тока на организм человека

Мероприятия по обеспечению электробезопасности электроустановок:

- отключение напряжения с токоведущих частей, на которых или вблизи которых будет проводиться работа, и принятие мер по обеспечению невозможности подачи напряжения к месту работы;
- вывешивание плакатов, указывающих место работы;
- заземление корпусов всех установок через нулевой провод;
- покрытие металлических поверхностей инструментов надежной изоляцией;
- недоступность токоведущих частей аппаратуры (заклучение в корпуса электропоражающих элементов, заклучение в корпус токоведущих частей).

5.4. Пожарная и взрывная безопасность. Оценка пожарной безопасности помещения.

Согласно НПБ 105-95 (Нормам пожарной безопасности), в зависимости от характеристики используемых в производстве веществ и их количества, по пожарной и взрывной опасности помещения подразделяются на категории А, Б, В, Г, Д. Так как помещение по степени пожаровзрывоопасности относится к категории В, т.е. к помещениям с твердыми сгорающими веществами, необходимо предусмотреть ряд профилактических мероприятий.[27]

Возможные причины загорания:

- неисправность токоведущих частей установок;
- работа с открытой электроаппаратурой;
- короткие замыкания в блоке питания;
- несоблюдение правил пожарной безопасности;
- наличие горючих компонентов: документы, двери, столы, изоляция кабелей и т.п.

Мероприятия по пожарной профилактике разделяются на: организационные, технические, эксплуатационные и режимные.

Организационные мероприятия предусматривают правильную эксплуатацию оборудования, правильное содержание зданий и территорий, противопожарный инструктаж рабочих и служащих, обучение производственного персонала правилам противопожарной безопасности, издание инструкций, плакатов, наличие плана эвакуации.

К техническим мероприятиям относятся: соблюдение противопожарных правил, норм при проектировании зданий, при устройстве электропроводов и оборудования, отопления, вентиляции, освещения, правильное размещение оборудования.

К режимным мероприятиям относятся, установление правил организации работ, и соблюдение противопожарных мер. Для предупреждения возникновения пожара от коротких замыканий, перегрузок и т. д. необходимо соблюдение следующих правил пожарной безопасности:

- исключение образования горючей среды (герметизация оборудования, контроль воздушной среды, рабочая и аварийная вентиляция);
- применение при строительстве и отделке зданий негорючих или трудно сгораемых материалов;
- правильная эксплуатация оборудования (правильное включение оборудования в сеть электрического питания, контроль нагрева оборудования);
- правильное содержание зданий и территорий (исключение образования источника воспламенения - предупреждение самовозгорания веществ, ограничение огневых работ);
- обучение производственного персонала правилам противопожарной безопасности;
- издание инструкций, плакатов, наличие плана эвакуации;
- соблюдение противопожарных правил, норм при проектировании зданий, при устройстве электропроводов и оборудования, отопления, вентиляции, освещения;
- правильное размещение оборудования;

- своевременный профилактический осмотр, ремонт и испытание оборудования.

При возникновении аварийной ситуации необходимо:

1. Сообщить руководству (дежурному).
2. Позвонить в соответствующую аварийную службу или МЧС – тел.

112.

3. Принять меры по ликвидации аварии в соответствии с инструкцией.

Заключение

Испытание прибора на эквивалентной цепи показали, что выходные импульсы соответствуют требованиям. Из осциллограммы видно, что выходной импульс имеет прямоугольную бифазную форму что соответствует требованиям. Также видно, что скважность импульса не нарушена и остаётся постоянным на протяжении времени работы.

Из графиков зависимости напряжения и тока источника от сопротивления следует, что отклонение с увеличением сопротивления на электродах составляет 50 В и 0.05 А, что является не значительным и соответствует требованиям.

Из демонстративных режимов работы, эффективным является первый т.к. при первом режиме работы прибора проводимость ткани восстанавливается до первоначального. Это означает что ткань полностью восстановилась после электропорации. При втором режиме работы проводимость ткани фиксируется на определённом значении >1 , что свидетельствует о не полном восстановлении ткани и эффективность электропорации при данном режиме работы низкая. При третьем режиме работы проводимость ткани не менялась с течением времени, что означает гибель ткани и электропорация не рекомендуется при данном режиме работы.

В результате работы был разработан прибор для электропорации, электрические параметры импульса которого регулируются в диапазоне: длительность импульса от 100 до 200 мкс, амплитуда импульса 300-1000 В, количество импульсов 7- 30 импульсов. Данный прибор конкурентноспособен из-за низкой себестоимости, высокой степени электрозащиты и наличия необходимых режимов работы. Также во время разработки были соблюдены все правила и нормы гигиенической, пожарной безопасности

Также разработан метод оценки эффективности электропорации ткани, основанный на измерении проводимости ткани, который был протестирован на трёх режимах работы.

Список литературы

1. Патофизиология: учебник : в 2 т. / под ред. В.В. Новицкого, Е.Д. Гольдберга, О.И. Уразовой. - 4-е изд., перераб. и доп. - ГЭОТАР-Медиа, 2009. - Т. 1. - 848 с
2. K. H. Schoenbach, S. J. Beebe, and E. S. Buescher, "Intracellular effect of ultrashort pulses," J. Bioelectromagn., vol. 22, p. 440, 2001.
3. H. P. Schwan, "Electric characteristics of tissues; A survey," Biophys., vol. 1, p. 198, 1963.
4. A. L. Hodgkin and A. F. Huxley, "A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve," J. Physiol., vol. 117, p. 500, 1952.
5. K. S. Cole, "Electric impedance of marine egg membranes," Trans. Faraday Soc., vol. 23, p. 966, 1937.
6. R. P. Joshi and K. H. Schoenbach, "Electroporation dynamics in biological cells subjected to ultrafast electrical pulses: A numerical simulation study," Phys. Rev., vol. E62, p. 1025, 2000.
7. Glaser, R. W., S. L. Leikin, L. V. Chernomordik, V. F. Pastushenko, and A. I. Sokirko. 1988. Reversible electrical breakdown of lipid bilayers – formation and evolution of pores. Biochimica Et Biophysica Acta 940:275-287.
8. Weaver, J. C., and Y. Chizmadzhev. 1996. Theory of electroporation: A review. Bioelectroch Bioener 41:135-160
9. A. Ghazala and K. H. Schoenbach, "Biofouling prevention with pulsed electric fields," IEEE Trans. Plasma Sci., vol. 28, p. 115, 2000.
10. S. B. Dev, D. P. Rabussay, G. Widera, and G. A. Hofmann, "Medical applications of electroporation," IEEE Trans. Plasma Sci., vol. 28, p.206, 2000.
11. K. H. Schoenbach, R. P. Joshi, R. H. Stark, F. C. Dobbs, and S. J. Beebe, "Bacterial decontamination of liquids with pulsed electric fields," IEEE Trans. Dielectrics and Electrical Insulation, vol. 7, p. 637, 2000.

12. P. C. Wouters and J. P. P. M. Smelt, "Inactivation of microorganisms with pulsed electric fields: Potential for food preservation," *Food Biotechnol.*, vol. 11, p. 193, 1997.
13. S. H. Jayaram, "Sterilization of liquid foods by pulsed electric fields," *IEEE Electrical Insulation Mag.*, vol. 16, p. 17, 2000.
14. Nickoloff, Jac A., ed. (1995) *Electroporation Protocols for Microorganisms, Methods in Molecular Biology, Volume 47*, (Humana Press, Totowa, New Jersey), p v-vi.
15. Nickoloff, Jac A., ed. (1995) *Animal Cell Electroporation and Electrofusion Protocols, Methods in Molecular Biology, Volume 48*. (Humana Press, Totowa, New Jersey). 369 pp.
16. Direct Plasmid Transfer Between Bacterial Species and Electro curing (pp. 47-54) *Withers, Helen L.* 1995
17. Weaver JC. 1995. Electroporation Theory: Concepts and Mechanisms. In: Nickoloff JA, editor. *Electroporation Protocols for Microorganisms*. Totowa, New Jersey: Humana Press. p 1-26. [Электронный ресурс] http://www.frontier.kyoto-u.ac.jp/rc01/in_vivo_electroporation.html
18. Withers HL. 1995. Direct Plasmid Transfer Between Bacterial Species and Electro curing. In: Nickoloff JA, editor. *Electroporation Protocols for Microorganisms*. Totowa, New Jersey: Humana Press. p 47-54.
19. Кузьмина Е.А, Кузьмин А.М. Методы поиска новых идей и решений "Методы менеджмента качества" №1 2003 г.
20. Кузьмина Е.А, Кузьмин А.М. Функционально-стоимостный анализ. Экскурс в историю. "Методы менеджмента качества" №7 2002 г.
21. Основы функционально-стоимостного анализа: Учебное пособие / Под ред. М.Г. Карпунина и Б.И. Майданчика. - М.: Энергия, 1980. - 175 с.
22. Сущность методики FAST в области ФСА [Электронный ресурс] <http://humeur.ru/page/sushhnost-metodiki-fast-v-oblasti-fsa>
23. Руководство к своду знаний по управлению проектами (Руководство РМВОК), 4-е издание, 2008 г.

24. Мазур И.И., Шапиро В.Д., Ольдерогге Н.Г. Управление проектами: Учебное пособие. – М.: Омега-Л, 2004. – 664 с.

25. Попова С.Н. Управление проектами. Часть I: учебное пособие / С.Н. Попова; Томский политехнический университет. – Томск: Изд-во Томского политехнического университета, 2009. – 121 с.

26. Федеральный закон «Об основах охраны труда» от 17.07.1999 г. № 181-ФЗ.

27. Пожаро- и взрывобезопасность промышленных объектов. ГОСТ Р12.1.004-85 ССБТ Пожарная безопасность

Приложение А

Development of a device for the electroporation of malignant tumors

Раздел 1 Электропорация

Студент:

Группа	ФИО	Подпись	Дата
0AM51	Пак Фёдор Александрович		

Консультант кафедры ПФ

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Старший преподаватель, каф.ПФ	Веригин Д.А.			

Консультант – лингвист кафедры ИЯ ФТИ

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент каф. ИЯ ФТИ	Емельянов И.Л.	к.с.н., доцент		

Introduction

The emergence of rapidly growing neoplasms does not allow removing the tumor purely surgically. Therefore, cancer tumors are treated with multimodal therapy. Chemotherapy is used in case of an increased tendency of a tumor to metastasize. However, the high cost of chemotherapy and the presence of side effects limit its use. The most common side effects of radiotherapy are local fibrosis, necrosis, nerve damage, etc. Especially the risk of side effects in the presence of aggressive neoplasms is great.

A new direction - electrochemotherapy has certain advantages in comparison with traditional methods of treatment of oncological diseases. Since the chemicals used have a large molecular weight, they hardly penetrate the cell. Consequently, the administered dose is sufficiently high, which leads to a violation of the immune system. In the case of electrochemical sessions, the pores in the cell membrane form through which the medications easily penetrate inside. At the same time, their dose is reduced by 500 times.

Currently, specialized devices for electroporation of tumor cells are created only in a number of foreign countries, such as Germany, the USA, Belgium, France, Slovenia. There are no analogues of the device for the electroporation of tumor cells at the moment in Russia.

At the Department of Applied Physics, a model of the device for the electroporation of tumor cells was developed.

Objective: to develop a device for the electroporation of malignant tumors

Tasks:

- 1) Drawing up a block diagram of the device
- 2) Software development
- 3) Drawing up the concept of the device
- 4) Testing the device
- 5) Development of a method for monitoring the efficiency of electroporation
- 6) Analyzing the results and summarizing the results

Chapter 1. Elektroporation

1.1 Definition and physical description

Electroporation is the process of the appearance of defects in the cell membrane by the action of impulse electric current on the tissues

The cell is a cytoplasm surrounded by a membrane. The cytoplasm is a conducting medium, the membrane is a dielectric. The action of an electric current on the cells is caused by the charging of the cell membrane. The membrane protects the cell from the effects of external factors, including the impact of electric current. For protection in the membrane there is a two-layer lipid layer 5-7 nm thick, which is a dielectric.

There are ions in the cell itself and in the intercellular fluid. They serve to control the functioning of the cell, for example, propagation of the action potential in the cardiomyocyte-cell of the cardiac muscle. Exchange between ions is provided by means of special channels located in the cell membrane. Thus, in the cell there is a certain potential difference, under which the membrane of the cell is constantly. Those. The cell membrane has a certain resistance R to the electric current I , which remains constant at a potential difference $\Delta\varphi$ between the two sides of the membrane [1]. Thus, the Ohm law is preserved for the membrane: $I = \varphi / R$. From the experiments, the scientists found out that the law is observed with a potential difference not exceeding 300 mV. This potential difference is boundary, so if the cell membrane acts a potential difference of more than 300 mV, this will lead to a sharp increase in the current passing through the membrane, thereby causing defects in the cell membrane. This phenomenon is called electrical breakdown or electroporation. When removing the potential difference on the membrane, the pore size decreases. This is due to the fact that on the membrane, when the defect is formed, the "lipid-water" phase interface increases, which leads to an increase in the surface tension of water at the interface. Under normal conditions, under the influence of tension forces, the cell membrane "tightens", the pore sizes decrease, and the membrane is restored. But with increasing

potential difference, after overcoming the energy barrier, the formation of pores becomes spontaneous, which leads to the destruction of the cell.

The potential at which the formation of pores occurs is called the breakdown potential. This potential differs between the types of cells and depends on many factors. In particular, the breakdown potential depends on the lipid and protein composition of the membrane.

In addition to the appearance of new pores, channels are activated in the membrane through which the membrane provides nutrition and control over the potential of the cell.

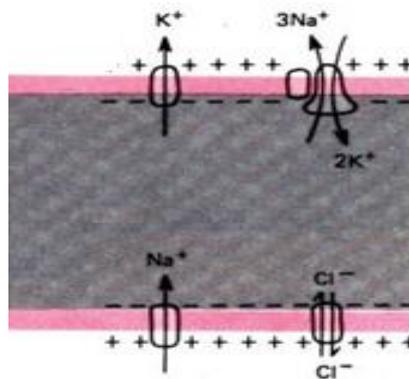


Figure 1-Ion channels of the cell membrane

To simulate the passage of electric current through the membrane, the cell is represented in the form of an equivalent electric circuit [2]. The cytoplasm of the cell in the equivalent circuit is represented as a resistor with resistance $R_c = 100 \text{ ohm} \cdot \text{cm}$. The cell membrane can be represented in the form of a capacitor whose capacitance C_m is equal to $10^{-6} \text{ F} / \text{cm}$ and a resistance of about $1000 \text{ Ohm} \cdot \text{cm}^2$. [3]

Because The cell is in the medium, then the cell medium can be represented as a suspension of the capacitance C_s described by the resistance R_s . These quantities are linearly dependent on the resistance of the medium ρ and the dielectric constant ϵ , respectively. We also represent the membrane channels in the form of controlled conductors with conductivity G_i ($i = 1,2,3 \dots$) [4] connected in series with current sources U_i ($i = 1,2,3 \dots$). Then the equivalent circuitry for the cell membrane can be represented as follows.

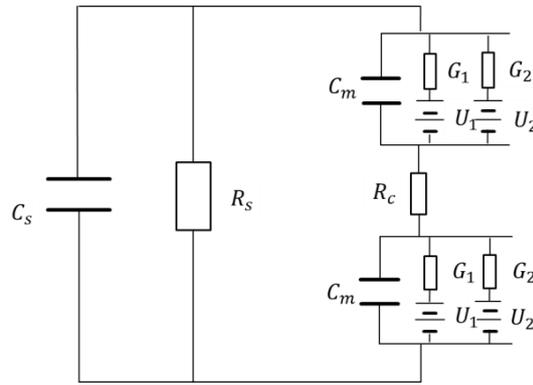


Figure 2-Equivalent circuit of the cell in solution, C_s , R_s -resistance and capacity of the solution, C_m -capacity of the membrane, G_i and U_i -conductors and voltage sources of the controlled channels of the membrane.

For a pulse with a duration comparable to the relaxation time constant

$$\tau_1 = \varepsilon * \rho$$

For a medium with a relative dielectric constant of approximately 80 and a resistance of $100 \text{ ohm} * \text{cm}$, the dielectric relaxation time is about 0.7 nsec. When a voltage pulse is applied to a cell, a charge accumulates on the membrane, and the potential on it increases.

If we represent the membrane in the form of a sphere, then the charge time τ_c can be represented in the form [5]

$$\tau_c = \left[\left\{ \frac{1+2V}{1-V} \right\} \frac{R_s}{2} + R_c \right] c_m a \quad (2)$$

Where V is the volume of the sphere, c_m is the specific capacitance of unit area of unit area of the membrane and a is the diameter of the cell. For a cell with a diameter of $10 \mu\text{m}$, the membrane charge time is approximately 75 nsec

In order for the voltage across the membrane to reach the voltage of the pores and activate the channels, it is necessary to apply an electric field E_{cr} to charge the membrane to the critical voltage V_{cr}

$$E_{cr} = \frac{V_{cr}}{\left\{ f a \left[1 - \exp \left(\frac{-\tau}{\tau_c} \right) \right] \right\}}$$

Where τ is the pulse duration, f is the factor determined by the shape of the cell. The electrical energy sufficient for breakdown of the membrane is

$$W = \frac{E_{cr}^2 \tau}{R_s} = \frac{K_\tau}{\left(1 - \exp\left(\frac{-\tau}{\tau_c}\right)\right)^2}$$

where $K_\tau = \frac{V_{cr}^2 \tau}{(f \cdot a)^2 \cdot R_s}$ is a constant. It follows from the analysis of the function

that W has a minimum at a pulse duration of $1.25 \tau_c$. It also follows that the action of a 1-volt field on the membrane, the dimensions of the pore formed allow the molecules with large masses to pass through. Thus, the pore sizes depend not only on the magnitude of the applied voltage, but also on the pulse width.[6]

The theory of electroporation of BLM suggests that the appearance of the water channel is caused by the appearance of local rearrangement in the bilayer lipid structure of the membrane. Proceeding from this, two basic pore configurations are possible - hydrophilic and hydrophobic. In the hydrophobic pore, the walls of the pores are lined with lipid "tails", and in the hydrophilic pore they are lined with phospholipid "heads." At small radii, the hydrophobic pore is energetically advantageous, while at large radii it is the hydrophilic pore. Water has a greater dielectric permeability than lipids. Therefore, a membrane containing pores has a lower energy in an external electric field. This energy gain is proportional to the area of the pore and the square of its radius. On the energy curve there is a local minimum corresponding to the metastable conducting state of the bilayer from which it, with a certain frequency, goes to the initial unperturbed state with low conductivity of the system, or undergoes a discontinuity. The rate of formation of hydrophilic pores in the lipid bilayer of a unit area (K_c) can be described by the following equation [7]:

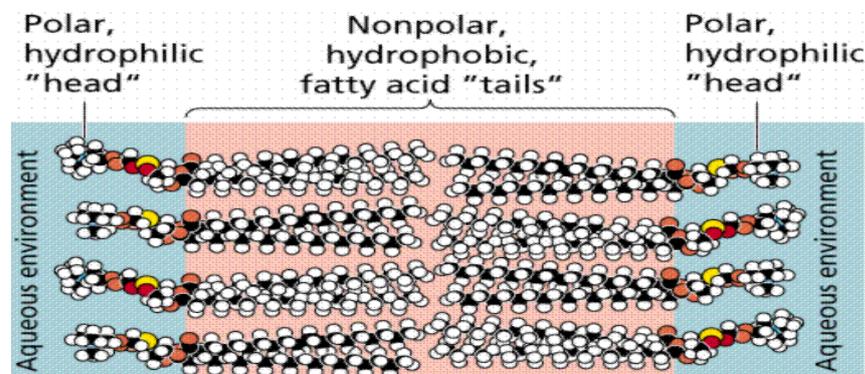


Figure 3 chart phospholipidic bisly

$$K_c = A \cdot \exp(\alpha U_2)$$

Where $A = \frac{\nu}{a \cdot \exp(\frac{-\Delta W_0}{kT})}$, here, a is the area per one lipid molecule, k is the

Boltzmann constant, ν is the frequency of lateral fluctuations of lipid molecules, T is the temperature, U is the electrical voltage per bilayer, and ΔW_0 is the activation energy of the pore in the absence of an electric field. It is assumed that the rate of growth of the pores is independent of the applied electric field and of the density of the pores on the bilayer. This assumption is in good agreement with the experimentally observed facts [8]

1.2. Operating modes of the electroporator.

Proceeding from the above, it is possible to determine the operating mode of the electroporator by specifying the power, pulse width and voltage for electroporation. For medical purposes, there are some limits for the operating mode of the electroporator.[9] The lower boundary of the region of regimes where bioelectrical effects become important is determined by the charging of the membrane. Therefore, the critical stress for ordinary mammalian cells in this case can be taken as 1 V. The upper limit is determined by the increase in the temperature of the surrounding suspension, which is determined by Joule heating, provided that only reversible effects are considered. Consequently, if the temperature exceeds a certain level, the cell dies, regardless of the bioelectric effects values defined above.

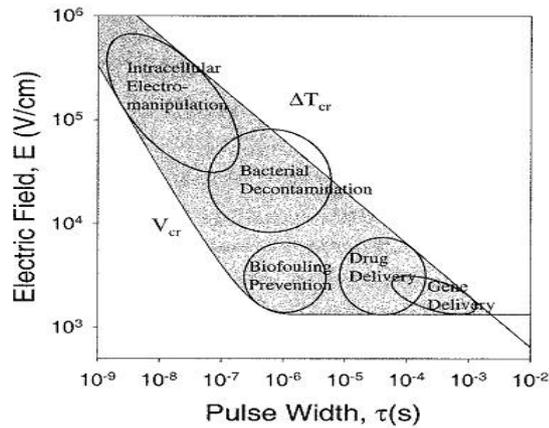


Figure 4-Areas of application of electroporation, depending on the pulse duration and the magnitude of the electric field.

Depending on the selected values of the electric field and the pulse duration, different results of cell survival can be expected. In the region of short pulses, the effect turns out to be benign. With increasing ($E * \tau$), we are approaching the field of lethal effects, even if in this case the temperature limit is not exceeded. Depending on the value of the $E * \tau$ values, different application areas can be distinguished. For medical applications, the range of long pulses and small values of the electric field is most preferable. In particular, the transfer of genes into the cell occurs in the millisecond range of durations, and the transfer of drugs requires a microsecond range. To prevent bio-contamination and bactericidal applications, higher electric field values are required. The extreme left region, defined by short pulses and strong electric fields, serves to influence the intracellular components. In this case, the effect is not on the cell membrane, but on its nucleus and in particular on the DNA of the cell, which can be used for gene therapy and the impact on malignant tumors.

1.3. The use of electroporation in biology and medicine

The first significant shift in the field of electroporation, the method was obtained by publishing the first results obtained in animal models, where the authors used the anti-cancer drug bleomycin in combination with a pulsed electric field. This experiment was conducted by Okino and Mori in 1987, as a result of which it was

found that the combination of bleomycin and pulsating field works much more efficiently than separately [10]. This discovery seemed a coincidence, because the authors did not explain the choice of drugs. By itself, bleomycin had limited use in oncology, mainly for use in cases of head and neck cancer. The treatment procedure, in which the drug was used together with the impulse field, was called electrochemotherapy.

After the results published by Okino and Mori, electrochemotherapy progressed continuously with electrical engineering, which is fundamental. The appearance of new generators and types of electrodes allowed to obtain electrical parameters in which the treatment of various types of tumor cells was more effective. Further studies of electrochemistry made it possible to significantly reduce the dose of drugs. Due to the formation of defects, the dimensions of which are commensurate with the size of the drug molecule, the permeability of the membrane increased, which simplified the effect of molecules on the inner contents of the cell. In other words, the cells receive more electroporation than without it, thereby increasing the cytotoxic effect. In a large number of experiments in animal models with different types of cancer, the use of electrochemotherapy led to more complete remission of tumors.

The current model of the effect of bleomycin is the formation of free radicals by the active form of bleomycin, which are separated into parts of DNA and RNA. It is known that bleomycin stimulates the release of a large number of cytokines. These factors are involved in the destruction of the tumor and simultaneously have an immunostimulating effect on the patient. An excessive number of these factors can be toxic and possibly responsible for pulmonary fibrosis, which is often observed with the standard use of bleomycin. However, when electrochemotherapy is used, this dose is significantly reduced and, in addition, it is concentrated inside the tumor, so that no lung fibrosis is observed.

1.4. Gene therapy

Treatment of hereditary or acquired diseases with the help of gene therapy, i.e. The introduction of DNA (or RNA) into the patient's cells has received great interest in the scientific and clinical communities in the past few years. Diseases caused by a single gene mutation, such as fibrous cystitis or hemophilia can be controlled by prolonged expression of the intact gene. Immunostimulating genes can help the immune system cope with infectious diseases and cancer. DNA vectors encoding antigens of pathogens can provide a preventive or therapeutic use of DNA vaccines. Ex vivo gene therapy involves the removal of cells from a patient, followed by modification in vitro with a therapeutic gene.

The treated cells are then returned back to the patient. In vivo gene therapy on the other hand includes an immediate necessary gene in the patient's tissue. The most difficult problem for gene therapy, regardless of the type of delivery ex vivo or in vivo, is to deliver the required amount of DNA molecules to the site of certain targeted cells in order to achieve the necessary levels of expression of these coding genes. Several types of DNA transfer into targeted cells are currently being carried out.

Viral vectors are the most commonly used tool for gene transfer in vivo and ex vivo. Viruses have developed a mechanism of attachment to cells and penetration through the membrane and are inside the cell, effectively supplying DNA and RNA. Vectors based on retroviruses adenoviruses, lentiviruses or adeno-linked viruses are used very widely, but vector viruses of herpes, alpha virus or smallpox viruses are also being developed [11].

Although viruses are quite effective in delivering DNA, they still cause side effects and complications. Any viral delivery system to be effective enough must contain viral proteins to deliver the necessary DNA into the nucleus and induce the expression of the necessary gene products, in addition, it should be designed so as to prevent an immune response against these proteins. These immune reactions make repeated use difficult or even impossible.

For most of the modern viruses used, target cells must share, integrate and express the delivered gene. The size of DNA that can be delivered using the most widely used systems is limited to 5 kb, which is very small for most genes of interest, such as factor XIII. These restrictions are constantly mentioned and some solutions are being developed: vector lentiviruses that infect non-dividing cells may have advantages over retroviral vectors that require cellular replicas for integration and expression.

This integration occurs randomly and requires attention to the safety of use for a large number of patients. Also, lentivirus systems, being AIDS viruses, are derived from it or associated with it, face great legislative challenges before their widespread use for humans can be considered.

The use of delivery systems based on adenoviruses that have demonstrated great potential for gene therapy applications is also hampered by their high immunogenicity; Now they are replaced by AAV - systems. AAV is difficult enough to cultivate for large titles, in addition it has serious limitations on the size of the injected DNA.

Alternatives to viral systems for gene therapy are currently being developed and reached clinical applications. Non-viral systems are non-pathogenic [12], they are easier to create and they are cheaper, can be reused and can contain large DNA inclusions. Since the stability and assimilation of bare plasmid DNA in tissues are very low, mechanical and chemical agents are used to increase the efficiency.

To cover DNA in order to protect it from destruction of the enhancement of communication with the cell and better digestibility, liposome technologies are used. These lipids can combine with other molecules to deliver to specific types of cells to prevent their detection and destruction by the immune system. Even with these improvements in stability and perception technology, some non-viral gene delivery systems for gene therapy applications remain highly inefficient and therefore very large amounts of DNA must be used.

Electroporation is widely used for effective introduction of DNA into eukaryotic cells and bacteria. The application of short electrical impulses to the corresponding cells opens up pores in their membranes, facilitating the assimilation of

DNA. It has only recently been discovered that applying an electric field to the appropriate tissues in vitro significantly increases the delivery of DNA and the expression of genes. Electroporation-enhanced DNA transfer in vivo provides a certain number of advantages over viral vectors, since DNA can be embedded in cells of any tissues located near the electrodes. [13]

1.5. Electroporation ex vivo in gene therapy

Three clinical studies on the use of electroporation are currently under way to enhance the introduction of genes into target cells in vitro and then return the treated cells back to the patient: two include the transfer of genes to relieve bleeding related diseases, and the third involves cancer immunotherapy. Damaged factors IX and VIII, respectively, are responsible for two diseases associated with bleeding. It is known that the sequential administration of even 5% of the normal level of the FIX coagulation factor into the bloodstream can prevent severe bleeding in FIX-deficient patients (haemophilia A). One of the known ex vivo electroporation applications is gene therapy for hemophilia A.

In the case of carcinogenic diseases, the FDA approved Phase 1 clinical trials that are in development for patients with glioblastoma who are currently receiving standard treatment. This work is conducted under the guidance of Fakhrei, who previously showed that rats implanted with glioblastoma 9L cells and also immunized with 9L cells. The cells were genetically modified with the TGF-B antisense gene by electroporation and had a 100% survival rate.

1.6. The procedure of electroporation in animal models

The procedure for electroporation in animal models is presented below



Figure 5 – The procedure of euthanasia

Before the electroporation procedure, the laboratory mouse is euthanized. Sleep is done by ether. A mouse is placed in the flask, at the bottom of which the wet wool was placed in advance. After some time, the status is checked.

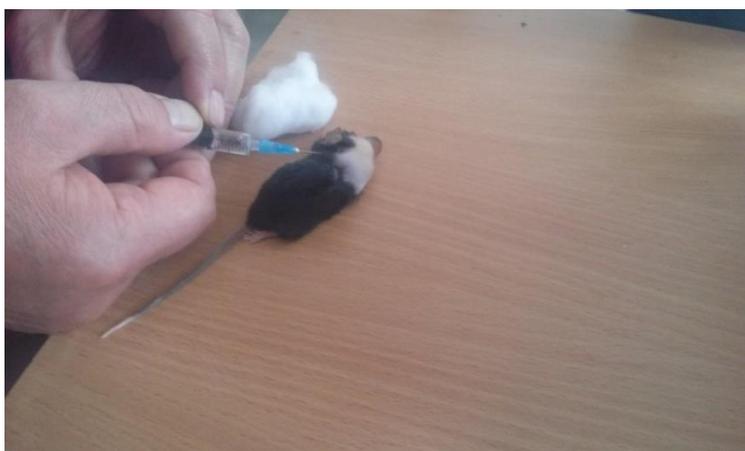


Figure 6 – Introduction of the drug

After the procedure of euthanizing the mouse, the drug is injected into the malignant tumor. The amount of the drug administered is selected depending on the tumor volume and recommendations to the drug. It should be noted that the amount of the drug administered should be less than the volume of the drug that would be administered without the electroporation procedure in the standard treatment of tumor cells.



Figure 7 – Electroporation procedure

Further, electroporation of tumor cells is performed. For this purpose, the electrodes of the device are applied to the area of tumor presence. Treatment of the tumor should be carried out from different sides, so that the efficiency of electroporation is maximized, i.e. Pores were formed in all tumor cells.