

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РФ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования

"ПЕНЗЕНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ"

Факультет физико-математических и
естественных наук

Кафедра "Общая биология и
биохимия"

Направление подготовки 06.03.01 Биология

Профиль Биохимия

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

на тему:

**«ИССЛЕДОВАНИЕ КАЛЬЦИФИКАЦИИ ВНЕКЛЕТОЧНОГО
КОЛЛАГЕНОВОГО МАТРИКСА IN VITRO»**

Студент  Тимофеева Юлия Алексеевна

Руководитель  Кручинина А.Д.

Нормоконтролёр  Кручинина А.Д.

Работа допущена к защите (протокол заседания кафедры от 09.06.18 № 14)

Заведующий кафедрой  Карпова Г.А.

Работа защищена с отметкой отлично (протокол заседания ГЭК от 21.06.18 № 14)

Секретарь ГЭК  Кручинина А.Д.

Пенза, 2018

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	6
1.1 Биоматериалы	6
1.1.1 Общая характеристика биоматериалов и направления использования	6
1.1.2 Исследования новых биоматериалов и рисков, связанных с их применением.....	7
1.1.3 Виды материалов биомедицинского назначения.....	8
1.2 Новые реконструктивные технологии	9
1.2.1 Имплантаты в сердечно-сосудистой хирургии.....	10
1.2.2 Трансплантаты в сердечно-сосудистой хирургии.....	11
1.2.3 Тканевая инженерия в сердечно-сосудистой хирургии.....	12
1.3 Требования к имплантируемым биоматериалам для сердечно-сосудистой хирургии.....	13
1.3.1 Биосовместимость.....	14
1.3.2 Гемосовместимость.....	15
1.4 Реакция организма на имплантацию материалов.....	16
1.4.1 Воспаление.....	17
1.4.2 Кальцификация имплантатов.....	18
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	21
2.1 Подготовка материала к исследованию.....	21
2.2 Гистологические техники окраски.....	22
2.3 Моделирование кальцификации образцов внеклеточного коллагенового матрикса in vitro.....	25
2.4 Метод фотометрического определения содержания кальция в образцах биоматериала.....	27
2.5 Метод фотометрического определения содержания фосфора в образцах биоматериала.....	28

2.6 Методы статистической обработки данных.....	29
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ...	30
3.1 Характеристика внеклеточного коллагенового матрикса.....	30
3.2 Гистологические техники окраски.....	30
3.3 Результаты определения содержания кальция и фосфора в образцах внеклеточного коллагенового матрикса.....	33
3.3.1 Результаты определения содержания кальция в образцах биоматериала после моделирования кальцификации <i>in vitro</i>	36
3.3.2 Результаты определения содержания фосфора в образцах биоматериала после моделирования кальцификации <i>in vitro</i>	43
ВЫВОДЫ.....	49
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	50

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. В настоящее время основной причиной нетрудоспособности взрослого населения страны являются заболевания сердечно-сосудистой системы. С целью решения данной проблемы проводится активный поиск новых методов ранней диагностики лекарственных препаратов для коррекции состояния, материалов для разработки медицинских изделий и методов лечения [16].

Прогресс, достигнутый в медицине и технике, поспособствовал созданию имплантируемых устройств и медицинских изделий, длительно функционирующих в организме, а именно стент-графтов, коронарных стентов, протезов клапанов сердца и др. Поэтому, материалы, применяемые для изготовления таких устройств, должны сохранять биосовместимость на отдаленных сроках, а именно [50]:

- не изменять физико-химических свойств, обеспечивающих функционирование имплантатов;
- не вызывать хронического воспаления;
- не проявлять канцерогенный и токсический эффекты;
- не подвергаться кальцификации;

В этом случае кальцификация понимается как формирование нерастворимых кальцийсодержащих кристаллов на поверхности или в объеме материала изделия, что ведет к ухудшению функциональных свойств протеза и приводит к необходимости проведения повторной операции. Но следует отметить, что формирование кальцийсодержащих отложений занимает немаловажную роль в восстановительной хирургии костных тканей и обеспечивается применением специальных технологий и методов изготовления имплантатов [29].

Ацеллюлярные матриксы на основе тканей ксеногенного происхождения являются биосовместимыми материалами и находят широкое применение в различных областях хирургии.

В качестве сырья для изготовления подобных ацеллюлярных матриксов широко используются различные соединительнотканые структуры крупного рогатого скота и свиней: перикард, подслизистая тонкой кишки, подслизистая мочевого пузыря, глассонова капсула печени и другие. Биоматериалы ксеногенного происхождения на основе подслизистой тонкой кишки активно используются в ожоговой, сердечно-сосудистой хирургии, нейрохирургии, ключевой производителе - такая зарубежная компания как Cook Biotech [10].

На сегодняшний день ООО «Кардиоплант» (г. Пенза) ведет активную разработку новых конкурентоспособных медицинских изделий на основе подслизистой тонкой кишки, которые смогут найти применение в различных областях хирургии.

Целью данной работы является исследование кальцификации внеклеточного коллагенового матрикса in vitro.

Для достижения цели поставлены следующие **задачи**:

- 1) Получить внеклеточный коллагеновый матрикс на основе подслизистой тонкой кишки свиньи и ксеноперикарда;
- 2) Смоделировать кальцификацию образцов внеклеточного коллагенового матрикса in vitro;
- 3) Провести фотометрическое определение содержания кальция и фосфора в образцах биоматериала;
- 4) Провести статистическую обработку полученных результатов;
- 5) Проанализировать влияние концентрации сшивающего агента на интенсивность накопления кальция и фосфора;
- 6) Проанализировать соотношение содержания кальция и фосфора в образцах биоматериала;

Бакалаврская работа написана на 56 листах, содержит 14 рисунков, 3 таблицы и список литературы на русском и английском языках из 56 источника.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Биоматериалы

1.1.1 Общая характеристика биоматериалов и направления использования

В соответствии с рекомендациями организационных комитетов V и VI мировых конгрессов по биоматериалам, состоявшимся в 1998 и 2000 годах, а также Международной организацией по стандартизации ISO (ISO / TR 9966), ГОСТ Р 51148-98, биоматериалы означают нежизнеспособный материал, для контактирования с живой тканью и выполнение функций биомедицинского назначения. Биоматериал должен быть биосовместимым и может быть биоразлагаемым.

В качестве каркасов для искусственных органов и инжиниринге тканей. Быстрые темпы развития молекулярной и клеточной биологии поспособствовали разработке новых биоматериалов и их применению во многих областях медицины [5].

Биоматериалы находят следующие важные области применения в медицине [12]:

- изготовление имплантатов и эндопротезов, шовных материалов, в том числе биорезорбируемых, для сердечно-сосудистой хирургии, для реконструкции костной ткани, для офтальмологии, парадонтологии и т. д.;
- изготовление систем с биологической активностью, в том числе лекарственной;
- изготовление матриц и субстратов для культивирования клеток с целью выращивания новых тканей, доставки нуклеиновых кислот в клетку;
- разработка мембран и систем сорбции, применяемых в медицине и биологии;

- создание материалов для биохимического анализа и синтеза, например, изготовление микрочипов, носителей для синтеза биополимеров (пептидов и нуклеиновых кислот);
- производство систем с иммобилизованными ферментами или ферментативной активностью, отдельные органеллы или клетки;
- изготовление изделий, не контактирующих с кровью или лимфой, например, контактных линз и устройств для наружного остеосинтеза;
- изготовление биodeградируемых материалов для общего применения, способных к разрушению после использования микроорганизмами.

С середины XX века, значительно увеличилась практика применения биомедицинских материалов для замещения и реконструкции пораженных частей организма, а так же поврежденных или изношенных частей тела. Достижения в биологии и в отрасли биомедицинских материалах теперь позволяют выращивать живые конструкты и применять их для восстановления или замены поврежденных или поврежденных тканей, в качестве инжиниринговых тканей. Но не стоит забывать и о рисках связанных с их применением [13].

1.1.2 Исследования новых биоматериалов и рисков, связанных с их применением

Для получения разрешения на применение новых материалов биомедицинского назначения в медицине, необходимым является обязательное соблюдение требований, предъявляемых к их высокому уровню безвредности. В этом и заключается особенность разработки и использование новых материалов имеющих медицинское назначение [17].

Определение медицинских устройств охватывающих большое количество изделий, от реагентов, используемых в исследованиях *in vitro*, до простых устройств, в частности временные повязки для кожи и очень

сложные аппараты жизнеобеспечения. И вот здесь необходимо различать риски, связанные с использованием этих устройств [24].

Классификация по трем классам, в зависимости от степени возможного риска связанного с применением в медицинских целях, является важной частью процесса получения разрешения на использование нового медицинского изделия. К первому классу относят медицинские изделия с низкой степенью риска. Ко второму - медицинские изделия со средней степенью риска, применяемые для хирургического воздействия на слизистые оболочки, кожу, полости тела; терапевтических, физиотерапевтических манипуляций. К третьему классу принадлежат изделия с высокой степенью риска, применяемые для проведения хирургических вмешательств, пластических реконструктивных операций; трансплантации органов и тканей, используемые в клеточных технологиях и генных манипуляциях [25].

1.1.3 Виды материалов биомедицинского назначения

Список материалов, получение которых имеет большое значение для развития и улучшения трансплантологии и реконструктивной хирургии, включает в себя различные материалы и композиты, различающиеся в функциональных характеристиках и основных свойствах [33].

В настоящее время ведется усиленная работа по классификации и систематизации разных видов биоматериалов, изучению их свойств и возможностей применения. Причем выделяют в отдельные группы материалы для урологии, тканевой и сердечно-сосудистой хирургии, ортопедии и др. Среди них [32]:

- материалы совместимые с живым организмом (они при вживлении в организм, не вызывают негативной реакции, находясь в нем на протяжении длительного времени). На сегодняшний день успешно используют тефлон, силикон, полиэтилен, титан и др.

- материалы не склонные к тромбогенности (подходящие для протяжного контакта с кровью и используемые для производства протезов сосудов, сердечных клапанов, искусственных легочных диафрагм и перикарда);
- материалы для микрокапсулирования (необходимые для изготовления микрокапсул с диаметром порядка микрон для систем доставки лекарств, носителей кислорода);
- волокнистые материалы (микропористые материалы с высокой степенью эффективности метаболизма, используемые в конструктах искусственных органов);
- биоклеи для склеивания тканей (восстановления целостности кровеносных сосудов, кишечника, протоков желчевыводящих путей и т.д., такие вещества должны быть иметь быстрое действие, быть стабильными в жидкой агрессивной среде без образования тепла и веществ токсичного характера);
- упруго - эластичные материалы, устойчивые к истиранию (материалы, специально предназначенные для создания искусственных костей и суставов, а также сердечных клапанов). Такие материалы должны иметь перечень физико-механических свойств, гарантирующих их безопасность при продолжительной эксплуатации при механических нагрузках;
- композиционные материалы, в том числе для многоразового применения. Такие материалы можно получить путем различного сочетания биологических, синтетических материалов и металлов, что дает возможность получать материалы с кардинально новыми функциональными свойствами.

1.2 Новые реконструктивные технологии

За последние десятилетия, тревожные тенденции стали наблюдаться в темпе роста заболеваний сердечно-сосудистой системы, а также инвалидизация населения трудоспособного возраста в связи с патологиями,

что неуклонно требует введения и применения в клинической практике новых, более эффективных и доступных методов реституционного лечения пациентов [35].

На данный момент уровень науки и развитие технологий дает возможность предложить несколько разных путей реконструкции или замены поврежденных или пораженных патологией тканей и органов [38]:

- имплантацию;
- трансплантацию;
- тканевую инженерию;

1.2.1 Имплантаты в сердечно-сосудистой хирургии

Имплантаты принадлежат к классу изделий медицинского назначения, используемых для введения в организм при проведении хирургических операций, выступающих в роли протезов, функционирующих в организме в окружении тканей реципиента. Для их изготовления активно применяют полимерные материалы различного происхождения. Эндопротезами называют имплантаты, которые вводятся в организм вместо удаленного внутреннего органа или его фрагментов [37].

Выделяют несколько групп имплантатов в зависимости от способности материалов, используемых для их изготовления, к резорбции под воздействием окружающей среды. В случае резорбируемых материалов нахождение в организме приводит к постепенному уменьшению массы и объема вводимого в организм объекта (биodeградация), в случае нерезорбируемых материалов наблюдается формирование соединительнотканной капсулы вокруг имплантата, что является проявлением защитной реакции организма в ответ на возникновение чужеродного объекта [34].

Имплантаты для проведения операций в сердечно-сосудистой хирургии являются наиболее крупной группой изделий [50].

Для создания изделий, контактирующих с кровью (протезы кровеносных сосудов, сердечных клапанов, сердца, системы вспомогательной кровеносной циркуляции и т.д.), необходимо использовать материалы, которые имеют высокую степень гемосовместимости.

Они не должны изменять электролитный баланс и pH крови, не должны способствовать тромбообразованию, а также повреждению и потере функциональной активности молекулярных и клеточных компонентов крови [30].

Одновременно с этим продолжается поиск материалов с лучшими показателями гемосовместимости, чем те, что применяются в настоящее время [22].

1.2.2 Трансплантаты в сердечно-сосудистой хирургии

Трансплантаты – объекты, которые можно применять для пересадки в организм реципиента, представляют собой живые клетки, ткани или органы. Существует несколько видов трансплантации биоматериала [1]:

- Аутотрансплантация – это процесс, в котором в качестве пересаживаемой ткани используют ткань того же человека.
- Аллотрансплантация – это процесс, в котором в качестве пересаживаемой ткани используют ткань или орган от организма того же биологического вида (от одного человека к другому).
- Ксенотрансплантация – это процесс, в котором в качестве пересаживаемой ткани используют ткань или орган от организма другого биологического вида (от животного к человеку).

Каждый из потенциальных вариантов имеет, как положительные, так и отрицательные качества. Использование аутотрансплантатов считают «золотым стандартом» в реконструктивной хирургии, хотя количество материала для пересадки сильно лимитировано и получение сопряжено с дополнительной травмой. Использование таких трансплантатов можно

наблюдать в сердечно сосудистой хирургии, например при шунтировании сосудов широко используются аутотрансплантаты, заимствуя подходящий сосуд из ноги или руки пациента [3].

Доступность аллотрансплантатов также ограничена, что приводит к повышению стоимости изделий [8]. Еще одной проблемой, связанной с использованием аллотрансплантатов является необходимость длительного приема иммунодепрессантов. На сегодняшний день в аллотрансплантации, преобладающий вид выполняемых операций является трансплантация почек, лёгких, печени и сердца [14].

Ксенотрансплантаты без обработки вызывают сильный иммунный ответ со стороны реципиента, что требует проведение генетических или химических модификаций для снижения риска отторжения трансплантата [7]. Ткани ксеногенного происхождения служат сырьем для изготовления протезов сердечных клапанов. В отличие от механических клапанов, биологические клапаны позволяют избежать антикоагулянтной терапии, которая вызывает поражение печени, и потенциально способны к ремоделированию в организме реципиента [4]. Однако срок функционирования трансплантатов ограничен, что в значительной степени определяется их кальцификацией и дегенерацией, которые приводят к необходимости повторных операций у молодых пациентов и к высокой смертности пациентов в раннем детском возрасте [37].

1.2.3 Тканевая инженерия в сердечно-сосудистой хирургии

Принципиально новым подходом выступают методы клеточной и тканевой инженерии. Этот подход открыл большие возможности в создании эффективных биомедицинских технологий, благодаря которым стало возможным восстановление поврежденных тканей и органов и лечение большого количества тяжелых заболеваний [11].

Целью тканевой инженерии является культивирование и конструирование живых, функциональных тканей или органов, вне пределов человеческого организма, для последующей трансплантации пациенту, чтобы заменить или стимулировать регенерацию поврежденного органа или ткани.

Биоматериалы, созданные с помощью методов тканевой инженерии, обладают характеристиками нативных тканей и могут использоваться для изготовления медицинских изделий с высокой степенью биосовместимости [27]. Они обладают способностью к самостоятельному восстановлению; не нарушают кровоснабжение прилежащих к изделию тканей; могут менять структуру и свойства под воздействием факторов окружающей среды, в том числе под действием механической нагрузки [13].

В качестве источника клеток могут выступать ткани тела и внутренние органы. Можно использовать соответствующие клетки у пациента, нуждающегося в восстановительной терапии, или от ближайшего родственника (аутогенные клетки). Клетки могут быть различного происхождения, включая стволовые клетки [23].

1.3 Требования к имплантируемым биоматериалам для сердечно-сосудистой хирургии

Сердечно-сосудистая система является одной из важнейших систем организма человека. Функциональное назначение сердечно-сосудистой системы состоит в осуществлении жизненно необходимых функций организма, таких как доставка кислорода и необходимых питательных компонентов непосредственно к клеткам и тканям организма и удаление из них продуктов жизнедеятельности. В составе сердечно-сосудистой системы выделяют сердце и сосуды организма. Она включает огромную сосудистую сеть, через которую кровь доставляется ко всем органам и тканям тела и оттекает от них. Нарушения в ее работе могут привести к серьезным последствиям и необратимым изменениям в организме [18].

Материалы для кардиохирургии представлены самой большой группой медицинских материалов. Материалами (биоматериалам) называют любые синтетические или природные полимеры, металлы, сплавы, керамику или обработанные (консервированные) биологические ткани, применяемые в качестве медицинских изделий или их частей [40].

Широкое применение искусственных материалов в кардиохирургии поставило главной задачей разработку полностью биосовместимых с тканями организма и в условиях длительного контакта материалов [26].

В первую очередь материалы и продукты их распада должны быть нетоксичными, не должны вызывать аллергическую реакцию и некроз тканей, активировать ферментативные каскады, нарушать электролитный баланс и вызывать изменение строения белковых молекул и форменных элементов крови, не должны нарушать метаболизм и оказывать канцерогенный эффект, обладать низкой способностью к кальцификации [12].

1.3.1 Биосовместимость

Понятие «биосовместимость» на сегодняшний день не имеет четкой интерпретации. Биосовместимыми считают биоматериалы, не приносящие вред организму при длительном контакте с ним и способные выполнять функции живой материи. Таким образом, требования к биоматериалам различны и многогранны, поэтому в каждом отдельном случае нужно учитывать конкретный контекст, вложенный в концепцию биосовместимости [31].

Для исследования биосовместимых свойств медицинских изделий, на сегодняшний день выделяют 4 группы тестов. Каждая группа имеет ограничения и возможности [28]:

- методы *in vitro* и *ex vivo*;
- острые эксперименты *in vivo*;

- хронические эксперименты *in vivo*;
- клинические испытания;

Эта множественность имеет несколько причин. В первую очередь, не до конца известны молекулярные механизмы ответа организма на имплантацию медицинских материалов и изделий в условиях их кратковременной или длительной работы [42]. Например, неизвестно изменение каких физико-химических параметров имплантата при длительном пребывании в организме человека влияет на биологические и функциональные свойства изделия. Кроме того, контакт имплантата с тканями организма приводит к возникновению взаимосвязанных между собой иммунологических, гемолитических, гемостатических, воспалительных реакций [1].

В связи с активным развитием методов кардиохирургии и трансплантологии встал вопрос поиска новых биоматериалов, пригодных к использованию в условиях продолжительного взаимодействия с кровью, то есть обладающих высокой гемосовместимостью [6].

1.3.2 Гемосовместимость

Гемосовместимость — это обобщенная характеристика материала, предназначенного для длительного или кратковременного контакта с кровью или ее компонентами. Кровь является жидкой соединительной тканью, чувствительной к воздействию различных материалов, химических реагентов. В настоящее время известно не так много гемосовместимых материалов, и большинство из них требуют длительный прием антикоагулянтов [32].

1.4 Реакция организма на имплантацию материалов

Получение фундаментальной основы для разработки и внедрения новых материалов, устройств и технологий для реконструктивной медицины требует всесторонних исследований. Это связано с тем, что для того, чтобы понять механизм взаимодействия имплантатов с тканями тела, нужно глубже изучить закономерности реакции организма на инородное тело, природу регенеративного процесса с одной стороны, и изучение «судьбы» (включая кинетику биodeградации и динамику прочностных свойств) имплантированного материала с другой [24].

Как правило, контакт живого организма с имплантированным материалом либо изделием, несет негативный характер. В этом случае характер и тяжесть этого эффекта определяется как комплекс химико-физических свойств самого материала, массы и геометрии имплантата, а также характер и сила физиологически-биохимических реакций организма-хозяина. При имплантации в тело инородного материала неизбежно вызывает клеточную реакцию, как правило рассматриваемую как асептическое воспаление. Эта реакция является защитной функцией тканей и имеет направленность на их регенерацию [34].

Характер клеточного и тканевого ответа на имплантат определяется рядом параметров - химической структуры материала, стабильности (или неустойчивости) в биологических средах, химико-биологических свойств продуктов разрушения материала, формы и массы имплантата, а так же места имплантации в организм [37].

После хирургического вмешательства и имплантации материала или испытываемого изделия в месте имплантации развивается асептическое воспаление тканей [36].

1.4.1 Воспаление

Воспаление представляет собой сложную эволюционно выработанную реакцию организма, возникающую в ответ на введение в организм механических, химических или бактериальных агентов, которые вызывают более или менее заметное повреждение тканей [20]. Особенностью воспаления, как биологического процесса, считается его защитно-адаптивной функции, которая заключается в сосудисто-мезенхимной реакции на повреждение, направленное на устранение или изолирование повреждающего агента и восстановление поврежденной ткани. В этом смысле воспаление и регенерация (репарация) являются неразрывными компонентами целостной тканевой реакции на повреждение [36].

Асептическое воспаление тканей, возникающее после хирургического вмешательства либо после имплантации материала или испытуемого изделия в месте имплантации, принято разделять на несколько стадий: альтерации (повреждения), экссудации и пролиферации; последняя также является первой стадией репаративной регенерации [43]. Воспалительный процесс приводит к пролиферации фибробластов, которые производят компоненты внеклеточного матрикса, а так же коллагеновые волокна. Далее следует, процесс образования фиброзной капсулы, которая изолирует инородное тело от окружающих тканей [45].

Интенсивность воспаления и продолжительность регенеративных процессов зависят от характера материала имплантата, степени его биосовместимости. У каждого случая, течение этих процессов имеет свои особенности [9].

С развитием воспаления наблюдаются общие (системные) реакции организма, такие как повышенная температура, изменения в крови и т. д., а также локальные реакции, которые представляют собой комплекс физиологических, морфологических, биохимических и физико-химических изменений в воспалительном очаге [24].

Немаловажную роль во время воспалительно-репаративного процесса играют компоненты экстрацеллюлярного матрикса, которые продуцируются фибробластами. Это коллагены I – XIV типов, из них основное значение несут коллагены I и III типов, образующие коллагеновые волокна, а также коллаген IV типа, входящий в базальные мембраны сосудов [39].

1.4.2 Кальцификация имплантатов

Кальцификация представляет собой образование кальцийсодержащих отложений на поверхности или в объеме имплантатов. Это в свою очередь ведет к утрате функциональных свойств протеза и необходимости повторной операции. Однако этот процесс играет и положительную роль в восстановительной хирургии костной ткани. Отрицательные последствия этого процесса связаны с подверженностью к аномальной кальцификации этих искусственных материалов и продуктов, используемых в сердечно-сосудистой хирургии, офтальмологии, урологии и абдоминальной хирургии [28].

Во время исследования причин и протекания процесса кальцификации нужно учесть локализацию кальцийсодержащих отложений и их состав. Конструкции экстрагированные после имплантации, подвергнутые кальцификации, исследуются дальше различными методами, включая физико-химические, радиоиммунологические, биохимические, гистологические, гистохимические, электронно-микроскопические, радиоавтографические и т. д. [56].

Локализация отложений бывает внутренней и внешней. При внешней локализации отложения расположены внутри материала, например, для биотканей – внутри коллагенового волокна (внутрифибрилярно), а во втором случае отложения образуются в межфибрилярном пространстве биоткани или на поверхности материалов [21].

Важную роль при местоположении отложений занимают механические нагрузки, они в свою очередь испытывает имплантат. Зачастую, фосфаты кальция обнаруживаются в местах в местах динамических механических нагрузок, независимо от типа биоматериала протеза. Это, по-видимому, связано с изменениями энергетических характеристик поверхности при интенсивных нагрузках и возникновение областей с повышенной внутренней энергией [48]. При использовании материалов натурального происхождения для изготовления протезов, возможно, ослабить структуру материала и повреждение самих волокон, что в дальнейшем стимулирует возникновение зон формирования кристаллов [2].

На сегодняшний день есть два главных подхода к объяснению механизма формирования кальциевых отложений: клеточный и концентрационный.

В этом случае клетки играют ведущую роль в процессе физиологической и патологической кальцификации. Во время такого подхода первичные стадии кальцификации связаны либо с присутствием уже умерших клеток (как в случае обработанных биологических тканей), либо со смертью клеток-реципиентов, контактирующих с биоматериалом. Согласно данным представлениям процесс кальцификации начинается с лизиса клеток. Погибшие клетки служат важным условием, ведущим к локальному изменению концентрации ионов кальция, фосфатов, что приводит к их осаждению на поверхности биоматериала [29].

Что касается концентрационной теории, то она старается учитывать и оценивать роль концентрации ионов кальция и фосфатов в межклеточной жидкости, понять, как идет накопление солей фосфата кальция из раствора и их кристаллизация. Такой подход появился за долго до клеточного. Обнаружение высокой концентрации щелочной фосфатазы при ранней минерализации костей дало основания для предположения ее роли в минерализации тканей. Считается, что гидролиз веществ, ингибирующих кальцификацию, например, пирофосфата и АТФ, приводит к повышению

локальной концентрации фосфатов-ионов, что провоцирует возникновению зон кристаллизации.

Позднее была предложена физико-химическая теория кальцификации, согласно которой формирование кристаллов гидроксиапатита связано со стереоконфигурацией коллагеновых волокон [46].

В настоящее время наиболее популярной теорией кальцификации является предположение о формировании комплексов кальций – фосфолипид – фосфат в связи с высокой аффинностью фосфолипидов к ионам кальция. Наличие подобных комплексов вызывает усиление осаждения нерастворимого гидроксиапатита на поверхности материала [54].

Каждая из теорий способна объяснить лишь некоторые особенности течения процесса кальцификации, при этом не до конца понятна роль гуморальных факторов, являющихся основополагающими для формирования поверхностного слоя из органических компонентов. Свойства слоя определяют и ответную реакцию клеток на границе раздела биоматериал – кровь, что ведет к развитию кальцификации [47].

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Подготовка материала к исследованию

Процесс подготовки материала включает в себя первичную обработку материала, химико-ферментативную обработку, стабилизацию материала сшивающими агентами, упаковку и стерилизацию. В качестве сырья для получения внеклеточного коллагенового матрикса использовали ткани животного происхождения: ксеноперикард крупного рогатого скота и подслизистая тонкой кишки свиньи [55].

Первичная обработка заключается в заборе биоматериала, первичной очистке и отбраковки. Взятие перикарда производится в течение 20 мин после забоя животного. Биоматериал помещается в физиологический раствор и транспортируется в течение не более двух часов в лабораторию для проведения первичной очистки и дальнейшей обработки [52].

Химико-ферментативная обработка включает обработку растворами солей с возрастающими концентрациями, выдержку в растворе трипсина, его последующую инактивацию и выдержку в растворах солей (патент РФ № 2542432, РФ № 2197818 правообладатель ООО «Кардиоплант»). Основной задачей этапа химико-ферментативной обработки является удаление клеток и их компонентов, поскольку наличие в имплантируемом человеку материале клеток животного происхождения способствует развитию выраженного иммунного ответа [48]. Удаление клеток из ткани оставляет внеклеточный матрикс (ВКМ), который хорошо переносится даже ксеногенными реципиентами. Однако различные компоненты ВКМ, которые необходимы для клеточной адгезии, роста и миграции, могут быть удалены путем децеллюляции. По окончании химико-ферментативной обработки перикарда проводится гистологическое исследование материала на отсутствие

клеточных элементов с помощью общепринятых гистологических техник [51].

Для улучшения стабильности, а также устойчивости против ферментативной деградации часто требуется поперечное сшивание коллагена. Этап стабилизации биологического материала на основе подслизистой тонкой кишки свиньи включает наслаивание, выдерживание образцов в растворе сшивающего агента, лиофилизацию, позволяет получить многослойный конструкт с заданными прочностными характеристиками. Этап стабилизации биологического материала на основе ксеноперикарда крупного рогатого скота включает выдерживание образцов в растворе сшивающего агента, лиофилизацию [53].

Снижение биodeградации материала, в результате образования связей, которые образует сшивающий агент в коллагеновых тканях, делает его (при сохранении анатомической целостности, прочности и гибкости) биосовместимым и не склонным к образованию тромбов [21].

Основной задачей лиофильной сушки является получение биоматериала с низким содержанием воды (менее 1 % к массе сухого остатка). В первую очередь при высушивании удаляется свободная вода из биоматериала, досушивание заключается в удалении связанной воды, процесс проводят при более высокой температуре (20° и выше) в условиях вакуума в системе [41].

2.2 Гистологические техники окраски

Основным структурным элементом соединительной ткани является коллаген, он также является самым распространённым белком у млекопитающих и может составлять до 35% всех белков организма. Он является важным компонентом костей, хрящей, сухожилий и дермы. Именно поэтому визуализация коллагена важна для исследования патологических процессов в этих структурах. Существует несколько методов специальных

окрасок, которые позволяют определить коллаген в тканях. В данном исследовании были использованы две из них. Окрашивание по Ван Гизону и окраску гематоксилин-эозином [47].

Окрашивание по Ван - Гизону обеспечивает визуализацию волокон соединительной ткани и дифференциальную окраску мышечных и волокнистых соединительных тканей в срезах (парафиновых, целлоидиновых, криостатных, изготовленных на замораживающем микротоме). Основными компонентами окраски являются пикриновая кислота и кислый фуксин. На первом этапе данной окраски, срезы окрашивают железным гематоксилином Вейгерта (он образует поляризованный комплекс, который связывается с ядром и окрашивает его в черный цвет) в течении 3—4 мин., далее следует промывать их в воде 2—4 мин. После чего окрашивают пикрофуксином (смесь из 100 мл насыщенного при комнатной температуре водного раствора пикриновой к-ты и 10 мл 1% водного раствора кислого фуксина). Промывают срез в воде, удаляющей избыток фуксина, споласкивают в 96% спирте, извлекающем избыток пикриновой к-ты, и, проведя через карбол-ксилол и ксилол, заключают в канадский (пихтовый) бальзам [15].

Ядра клеток окрашиваются в черный (коричнево-черный) цвет; соединительнотканые волокна, отложения гиалина, амилоида — в рубиново-красный; поперечнополосатые мышечные волокна и клетки гладкой мышечной ткани, эпителиальные клетки, эритроциты — в желтый с зеленоватым оттенком, глия — в желтый цвет с сероватым оттенком.

Окраска гематоксилином—эозином является наиболее распространённым методом окрашивания срезов. Метод позволяет выявить клеточные элементы и некоторые неклеточные структур. Эта окраска является двойной: гематоксилин, представляет собой экстракт древесины кампешевого дерева, произрастающего в Америке, как основной краситель - окрашивает ядра клеток, а эозин это искусственная краска и он является

кислым красителем — окрашивает протоплазму клеток и в меньшей степени различные неклеточные структуры [44].

Порядок окрашивания срезов гематоксилин - эозином следующий [19]:

- 1) срезы переносят в дистиллированную воду;
- 2) окрашивают гематоксилином Эрлиха 2-5 мин;
- 3) промывают в дистиллированной воде;
- 4) затем промывают в водопроводной воде 3-5 мин;
- 5) осуществляют контроль под микроскопом;
- 6) дифференцируют 1% раствором хлористоводородной кислоты в 70° спирте 1—2 с;
- 7) быстро переносят срезы в водопроводную воду на 30 мин при частой смене; в водопроводной воде вишневая окраска ядер сменяется синей;
- 8) осуществляют контроль под микроскопом; если хроматин и ядрышко видны недостаточно четко, то дифференцировку следует повторить (срезы можно смотреть под большим увеличением, накрыв их покровным стеклом);
- 9) промывают в дистиллированной воде;
- 10) 1% водный раствор эозина 0,5-1 мин;
- 11) промывают в дистиллированной воде (и дифференцируют, так как вода смывает эозин); время промывки контролируют по цвету среза;
- 12) проводят обезвоживание, осветляют в ксилоле, заключают в бальзам. В спиртах эозин также отмывается, так что проводить срезы по спиртам следует быстро. Время окрашивания в гематоксилине нужно установить на первых 2-3 срезах и затем все срезы данного блока окрашивать одинаково. Дифференцировку в растворе хлористоводородной кислоты в спирте можно не проводить, но в этом случае структуры ядра будут менее четкими и в цитоплазме может быть синеватый фон.

2.3 Моделирование кальцификации образцов внеклеточного коллагенового матрикса *in vitro*

В ходе исследования содержание кальция и соотношение кальций/фосфор определяли в образцах внеклеточного коллагенового матрикса, изготовленного из перикарда крупного рогатого скота и подслизистой тонкой кишки свиньи с различной обработкой до и после инкубации в модельной среде (раствор Рингера — Тироде) [15].

Раствор Рингера — Тироде это сложный физиологический раствор, применяемый в медицине и физиологии для изучения деятельности тканей вне органов, а также для перфузии изолированных органов. В состав раствора входит: 8 г NaCl, 0,2 г KCl, 0,2 г CaCl₂, 0,1 г MgCl₂, 0,1 г NaHCO₃, 0,05 г NaH₂PO₄, 1 г глюкозы и до 1 л дистиллированной воды [19].

В эксперименте участвовали следующие группы образцов:

- ВКМ на основе подслизистой тонкой кишки свиньи:
 - 1 группа – ВКМ на основе подслизистой тонкой кишки свиньи без обработки сшивающим агентом (1-Этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимид)
 - 2 группа – ВКМ на основе подслизистой тонкой кишки свиньи, обработка 0,05 мМ раствором сшивающего агента (1-Этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимид)
 - 3 группа - ВКМ на основе подслизистой тонкой кишки свиньи, обработка 0,1 мМ раствором сшивающего агента (1-Этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимид)
 - 4 группа - ВКМ на основе подслизистой тонкой кишки свиньи, обработка 0,2 мМ раствором сшивающим агентом (1-Этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимид)
 - 5 группа - ВКМ на основе подслизистой тонкой кишки свиньи, обработка 0,3 мМ раствором сшивающим агентом (1-Этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимид)

6 группа - ВКМ на основе подслизистой тонкой кишки свиньи, обработка 0,4 мМ раствором сшивающим агентом (1-Этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимид)

7 группа - ВКМ на основе подслизистой тонкой кишки свиньи, обработка 0,5 мМ раствором сшивающим агентом (1-Этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимид)

- ВКМ на основе ксеноперикарда:

1 группа – ВКМ на основе ксеноперикарда крупного рогатого скота без обработки сшивающим агентом (1-Этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимид)

2 группа - ВКМ на основе ксеноперикарда крупного рогатого скота, обработка 0,05 мМ раствором сшивающего агента (1-Этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимид)

3 группа - ВКМ на основе ксеноперикарда крупного рогатого скота, обработка 0,1 мМ раствором сшивающего агента (1-Этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимид)

4 группа - ВКМ на основе ксеноперикарда крупного рогатого скота, обработка 0,2 мМ раствором сшивающим агентом (1-Этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимид)

5 группа - ВКМ на основе ксеноперикарда крупного рогатого скота, обработка 0,3 мМ раствором сшивающим агентом (1-Этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимид)

6 группа - ВКМ на основе ксеноперикарда крупного рогатого скота, обработка 0,4 мМ раствором сшивающим агентом (1-Этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимид)

7 группа - ВКМ на основе ксеноперикарда крупного рогатого скота, обработка 0,5 мМ раствором сшивающим агентом (1-Этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимид)

Для оценки кальцификации материалов *in vitro* из каждой группы отбирали 10 образцов размером 20×20 мм и примерно одинаковой толщины.

Образцы нанизывали на нить (5 шт. в каждой группе), делая прокол в центре, таким образом, чтобы они не касались друг друга. Нить с образцами погружали в раствор Рингера — Тироде, фиксировали оба конца, чтобы образцы не касались дна и стенок тары. Остальные 5 образцов использовали для контрольного определения начального содержания кальция и фосфора. Инкубация образцов в растворе Рингера — Тироде проводилась при 37°C в течение 4 недель с еженедельной сменой раствора. Для предотвращения роста микрофлоры в раствор добавляли азид натрия.

По окончании срока инкубации образцы извлекались из модельного раствора, промывались в дистиллированной воде, высушивались в сушильном шкафу при 105°C до постоянной массы (24 часа), взвешивались на аналитических весах, подвергались сухому озолению в течение 6 ч в муфельной печи при 525°C. Золу растворяли в 1 М растворе HCl, добавляли равный объем 1М NaOH для нейтрализации раствора, определяли количественное содержание кальция и фосфора. Определяли соотношение Ca/P в образцах.

2.4 Метод фотометрического определения содержания кальция в образцах биоматериала

Сущность метода определения кальция состоит в том, что окрезолфталеинкомплексон (КФК) образует с кальцием в щелочной среде комплекс красно-фиолетового цвета, интенсивность окраски которого при 575 нм пропорционально концентрации кальция и измеряется фотометрически при длине волны 575 нм (560-580 нм). В реакционную смесь добавляют 8-оксихинолин, который связывает металлы, мешающие определению кальция (в частности, магний) и образуется кальций менее прочный комплекс, чем КФК [28]. Схема проведения анализа представлена в таблице 1.

Таблица – 1. Схема проведения анализа на кальций

Объем, мл	Опытная проба	Контрольная (холостая) проба
Исследуемый раствор	0,02	-
Буфер	0,50	0,50
Хромоген	0,50	0,50
Дистиллированная вода	1,00	1,02

2.5 Метод фотометрического определения содержания фосфора в образцах биоматериала

Сущность метода определения фосфора состоит в том, что метод основан на способности фосфат-ионов образовывать в кислой среде в присутствии детергента с молибдатом аммония фосфорномолибденовый комплекс, оптическая плотность которого при длине волны 340 нм пропорциональна концентрации неорганического фосфора в исследуемом образце [28]. Схема проведения анализа представлена в таблице 2.

Таблица – 2. Схема проведения анализа на фосфор

Объем, мл	Опытная проба	Контрольная (холостая) проба
Исследуемый раствор	0,02	-
Рабочий раствор	2	2
Дистиллированная вода	-	0,02

2.6 Методы статистической обработки данных

При соответствии нормальному закону распределения признака, в исследуемых выборках, проверку гипотезы о равенстве средних выборочных величин проводили с использованием t -критерия Стьюдента. А для обнаружения промахов использовался $3s$ -критерий. Сравнение значений каждой из подгрупп дисперсионного комплекса проводили по методике Ньюмена-Кейлса. Различия считались статистически значимыми при уровне достоверности $p < 0,05$ [22].

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Характеристика внеклеточного коллагенового матрикса

Модифицированная ксеногенная ткань, полученная способом согласно патентам (патент РФ № 2542432, РФ № 2197818 правообладатель ООО «Кардиоплант») представляет собой внеклеточный коллагеновый матрикс (ВКМ). Он является матрицей для заселения клеток. Матрица представляет собой внеклеточный каркас и окружает клетки почти во всех тканях. Биоматериал получен путем химико-биологической обработки тканей ксеногенного происхождения. Запатентованная технология химико-биологической обработки сырья позволяет эффективно удалить клеточные элементы и сохранить природную архитектуру фибриллярных протеинов. Состоит из фибриллярных белков (преимущественно коллаген I типа и эластин), которые обеспечивают упругую и прочную пространственную архитектуру. Содержит в своем составе активные биологические молекулы, которые наделяют изделие биоактивными свойствами. Гликопротеины (фибронектин и ламинин) способствуют адгезии, пролиферации и миграции клеток. Гликозаминогликаны (гиалуроновая кислота и хондроитин-сульфат А) уменьшают воспаление, обеспечивают связывание и прикрепление клеток. Протеогликаны (декорин и гепаран-сульфат) препятствуют образованию рубцовой ткани, участвуют в фибриллярной регуляции коллагена, стимулируют ангиогенез.

3.2 Гистологические техники окраски

Гистологические исследования проводятся для определения наличия клеток и определения структуры коллагеновых волокон после этапа химико-ферментативной обработки материала. На рисунке 1 изображена

подслизистая до обработки, а на рисунке 2 изображена подслизистая тонкой кишки после обработки.

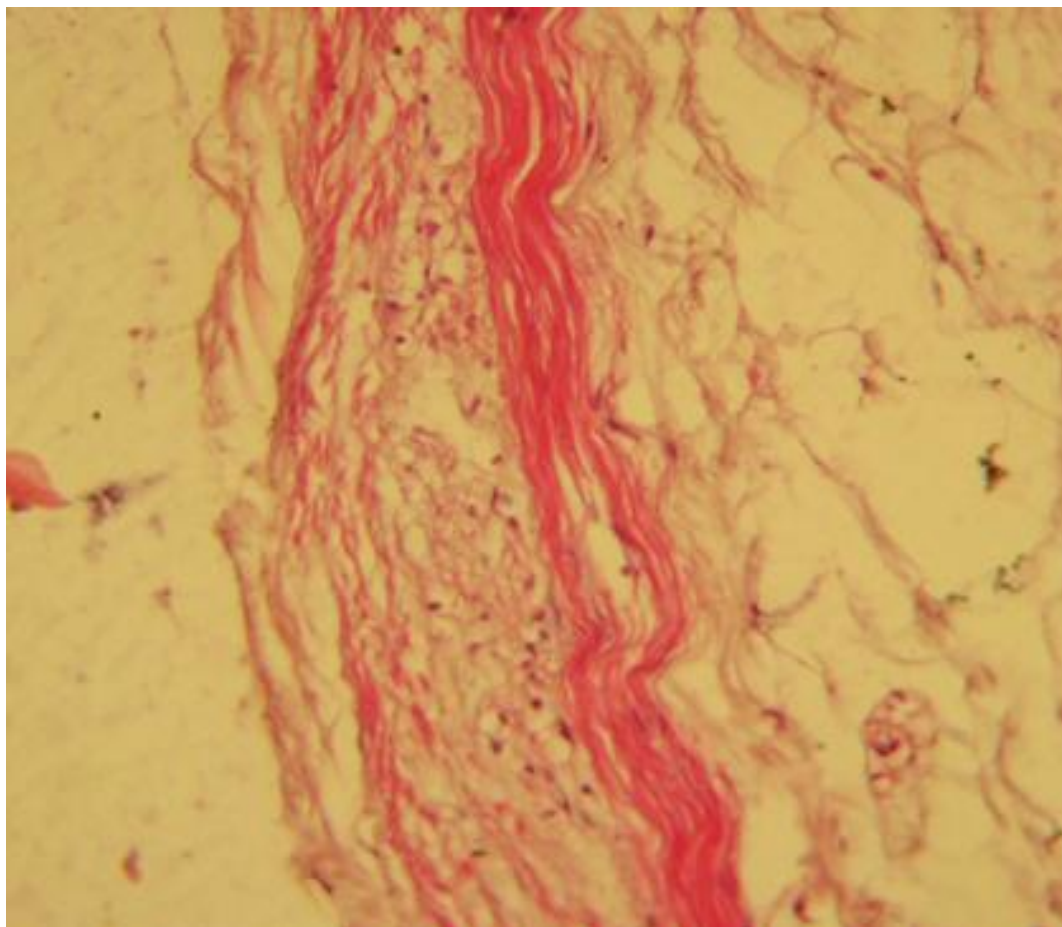
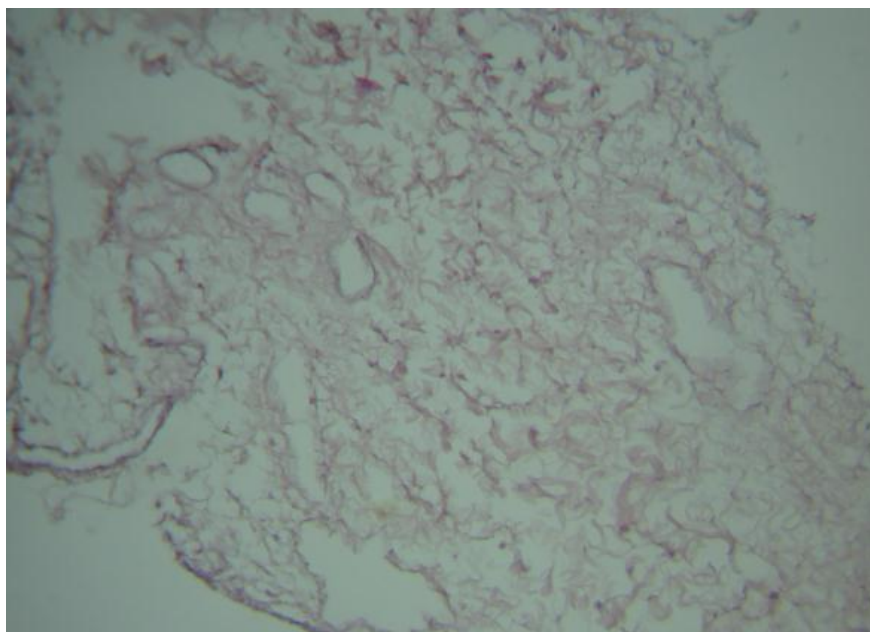
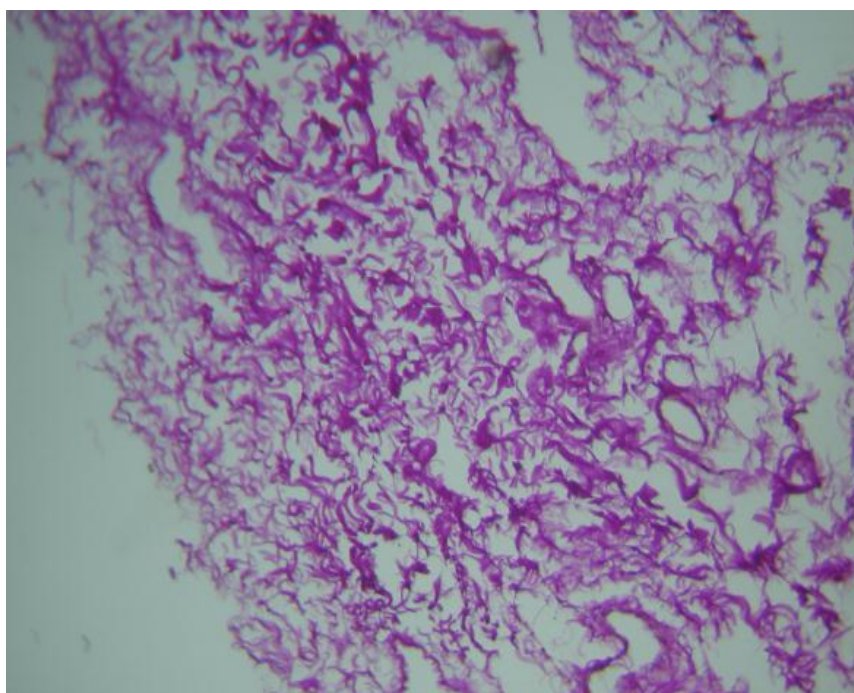


Рисунок 1. Результаты гистологического исследования внеклеточного коллагенового матрикса до химико-ферментативной обработки

На данном рисунке мы можем, четко увидеть наличие клеточные элементы и нативную коллагеново-эластическую структуру ткани.



А)



Б)

Рисунок 2. Подслизистая тонкой кишки свиньи после химико-ферментативной обработки.

А) Окраска гематоксилин-эозин, x200. Б) Окраска по Вейгерт-Ван-Гизону, x200.

Представленные на рисунке 2 результаты говорят об отсутствии в материале клеточных элементов, а также о сохранности коллагеновых и

эластических волокон после ферментативной обработки подслизистой основы тонкой кишки свиньи.

3.3 Результаты определения содержания кальция и фосфора в образцах внеклеточного коллагенового матрикса

Особенное внимание следует уделить определению состава и локализации кальцийсодержащих отложений при исследований патогенеза кальцификации. Выделяют внутреннюю и внешнюю локализации отложений

При внутренней локализации, отложения расположены внутри материала, например, для биотканей - внутри коллагенового волокна (внутрифибриллярного). При наружной, отложения образуются в межфибриллярном пространстве биоткани или непосредственно на поверхности материалов.

Большую роль в месторасположении отложений играет механическая нагрузка. Обычно в местах интенсивных механических нагрузок обнаруживаются фосфаты кальция, независимо от типа биоматериала (естественного или искусственного происхождения)

Интенсивность кальцификации так же зависит и от следующих причин:

- тип материала;
- удаления клеток из материала;
- обработка и тип трансплантации;

При анализе кальцийсодержащих отложений много внимания уделяется соотношению органических и неорганических компонентов.

Для оценки склонности полученных образцов на основе ксеноперикарда и подслизистой тонкой кишки свиньи к кальцификации и влияния концентрации сшивающего агента, применяемого для стабилизации биологического материала, на интенсивность кальцификации, изучали количественное содержание кальция и фосфора в образцах биоматериалов после моделирования кальцификации *in vitro*.

Содержание кальция и фосфора, выраженное в миллиграммах на массу образца, для полученных экспериментальных групп внеклеточного коллагенового матрикса на основе подслизистой тонкой кишки и ксеноперикарда представлено в таблице 3.

Таблица – 3. Содержание кальция и фосфора в образцах внеклеточного коллагенового матрикса на основе подслизистой тонкой кишки и ксеноперикарда до моделирования кальцификации in vitro в мг на г ткани ($M \pm m$, $n=5$)

№	Группа	До инкубации, мг кальция на г ткани	До инкубации, мг фосфора на г ткани
Внеклеточный коллагеновый матрикс на основе подслизистой тонкой кишки			
1	ВКМ на основе ПТК без сшивающего агента	$12,08 \pm 0,66$	$8,13 \pm 0,38$
2	ВКМ на основе ПТК + 0,05 мМ 1-Этил-3-(3- диметиламинопропил) карбодиимид	$10,06 \pm 0,6$	$7,57 \pm 0,48$
3	ВКМ на основе ПТК + 0,1 мМ 1-Этил-3-(3- диметиламинопропил) карбодиимид	$11,74 \pm 0,74$	$9,23 \pm 0,36$
4	ВКМ на основе ПТК + 0,2 мМ 1-Этил-3-(3- диметиламинопропил) карбодиимид	$12 \pm 0,43$	$8,12 \pm 0,5$

5	ВКМ на основе ПТК + 0,3 мМ 1-Этил-3-(3- диметиламинопропил) карбодиимид	$9,48 \pm 0,56$	$7,49 \pm 0,49$
6	ВКМ на основе ПТК + 0,4 мМ 1-Этил-3-(3- диметиламинопропил) карбодиимид	$9,26 \pm 0,6$	$9,74 \pm 0,41$
7	ВКМ на основе ПТК + 0,5 мМ 1-Этил-3-(3- диметиламинопропил) карбодиимид	$10,37 \pm 0,5$	$8,73 \pm 0,45$
Внеклеточный коллагеновый матрикс на основе ксеноперикарда			
1	ВКМ на основе КП без сшивающего агента	$24,25 \pm 1,05$	$16,81 \pm 0,75$
2	ВКМ на основе КП + 0,05 мМ 1- Этил-3-(3- диметиламинопропил) карбодиимид	$23,72 \pm 1,19$	$16,01 \pm 0,83$
3	ВКМ на основе КП + 0,1 мМ 1- Этил-3-(3- диметиламинопропил) карбодиимид	$23,48 \pm 1,21$	$15,35 \pm 0,81$
4	ВКМ на основе КП + 0,2 мМ 1- Этил-3-(3- диметиламинопропил) карбодиимид	$20,95 \pm 1,08$	$16,36 \pm 0,7$
	ВКМ на основе КП + 0,3 мМ 1-	$23,69 \pm 1,01$	$14,49 \pm 0,78$

5	Этил-3-(3- диметиламинопропил) карбодиимид		
6	ВКМ на основе КП + 0,4 мМ 1- Этил-3-(3- диметиламинопропил) карбодиимид	$20,96 \pm 1,06$	$16,77 \pm 0,73$
7	ВКМ на основе КП + 0,5 мМ 1- Этил-3-(3- диметиламинопропил) карбодиимид	$20,87 \pm 1,22$	$16,62 \pm 0,77$

3.3.1 Результаты определения содержания кальция в образцах биоматериала после моделирования кальцификации *in vitro*

Результаты исследования содержания кальция в образцах биоматериала после моделирования кальцификации *in vitro* представлены на рисунках 3-5.

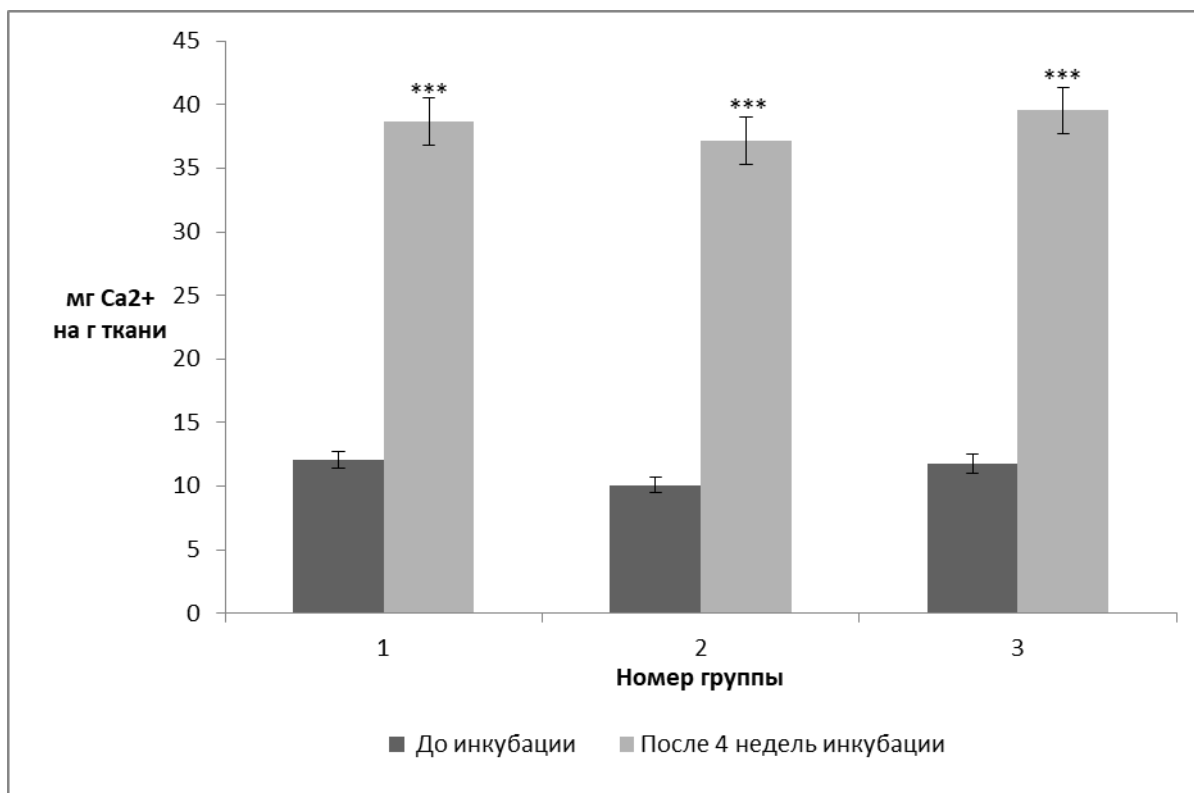


*Рисунок 3. Сравнительное содержание кальция в образцах внеклеточного коллагенового матрикса на основе подслизистой тонкой кишки 1,2,3 групп (мг на г ткани, $M \pm m$, $n=5$) Здесь: *** - $p < 0,005$ относительно содержания кальция до инкубации*

Группы 1, 2, 3 отличались между собой концентрацией сшивающего агента, используемого для стабилизации биоматериала. Инкубация в растворе Рингера — Тироде приводила к увеличению содержания кальция в образцах всех экспериментальных групп. Достоверных отличий в количественном содержании кальция до инкубации не обнаружено. Достоверных отличий в содержании кальция в образцах 1,2,3 групп после инкубации также не обнаружено.

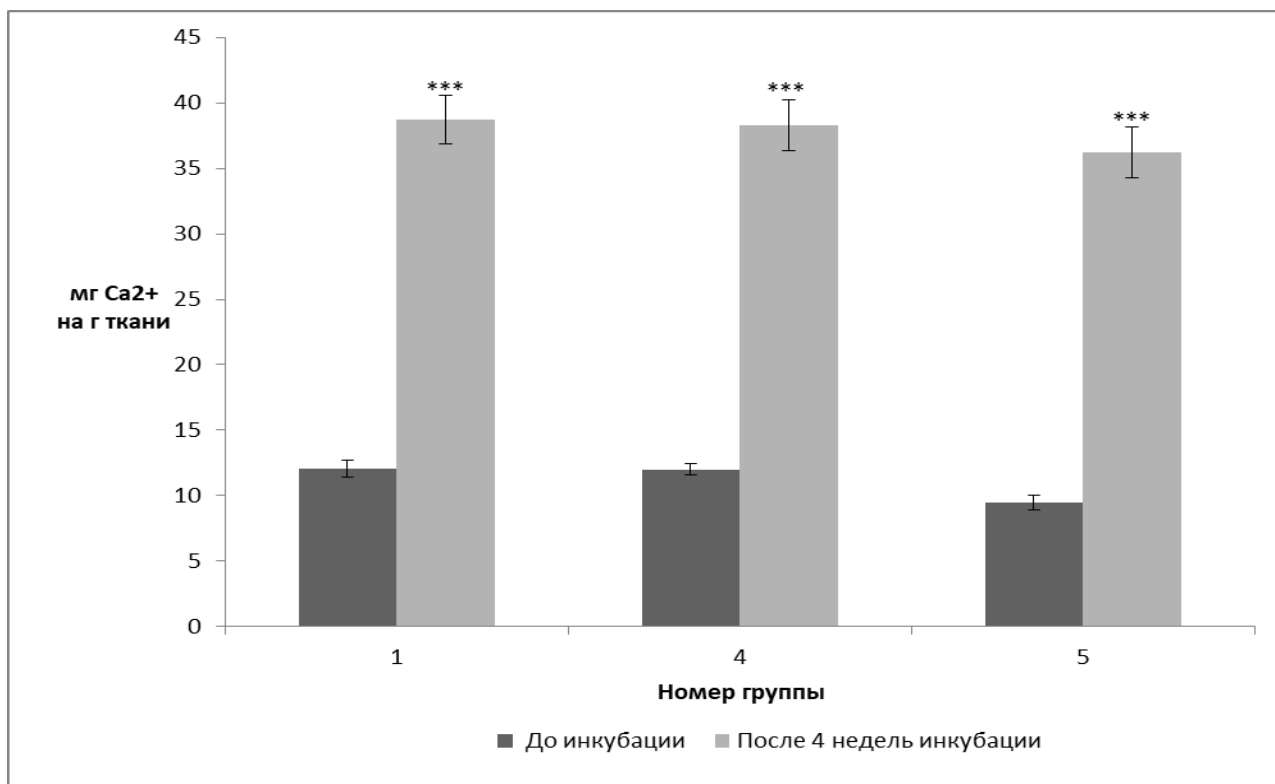


*Рисунок 4. Сравнительное содержание кальция в образцах внеклеточного коллагенового матрикса на основе подслизистой тонкой кишки 1,4,5 групп (мг на г ткани, $M \pm t$, $n=5$) Здесь: *** - $p < 0,005$ относительно содержания кальция до инкубации*

Группы 1, 4, 5 отличались между собой концентрацией сшивающего агента, используемого для стабилизации биоматериала. Инкубация в растворе Рингера — Тироде приводила к увеличению содержания кальция в образцах всех экспериментальных групп. Достоверных отличий в количественном содержании кальция до инкубации не обнаружено. Достоверных отличий в содержании кальция в образцах 1, 4, 5 групп после инкубации также не обнаружено.

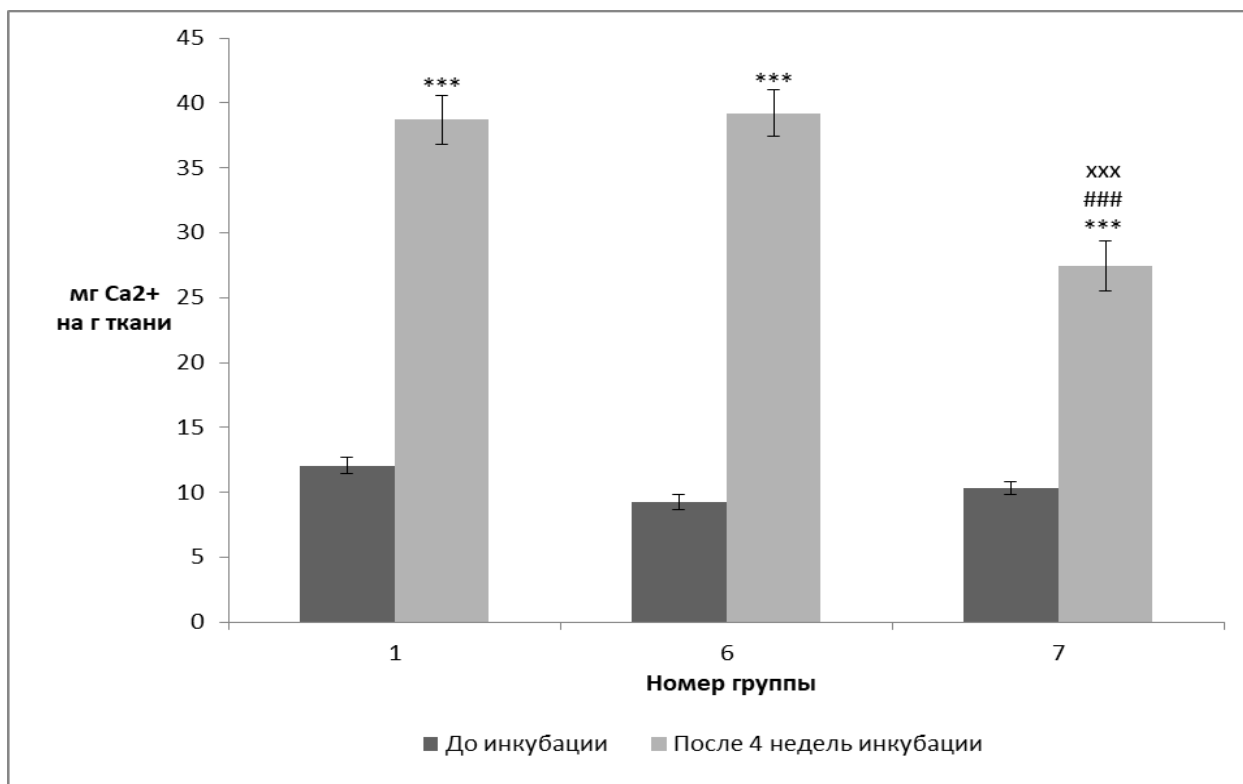


*Рисунок 5. Сравнительное содержание кальция в образцах внеклеточного коллагенового матрикса на основе подслизистой тонкой кишки 1,6,7 групп (мг на г ткани, $M \pm m$, $n=5$) Здесь: *** - $p < 0,005$ относительно содержания кальция до инкубации; ### - $p < 0,005$ относительно содержания кальция в 1 группе после моделирования кальцификации; xxx - $p < 0,005$ относительно содержания кальция в 6 группе после моделирования кальцификации*

Данные группы, также отличались между собой концентрацией сшивающего агента, используемого для стабилизации биоматериала. Достоверных отличий в количественном содержании кальция до инкубации не обнаружено. После инкубации наблюдалось снижение содержания кальция в 7 группе на 29% и 30% относительно 1 и 6 групп соответственно.

Результаты исследования содержания кальция в образцах биоматериала после моделирования кальцификации *in vitro* представлены на рисунках 6-8.

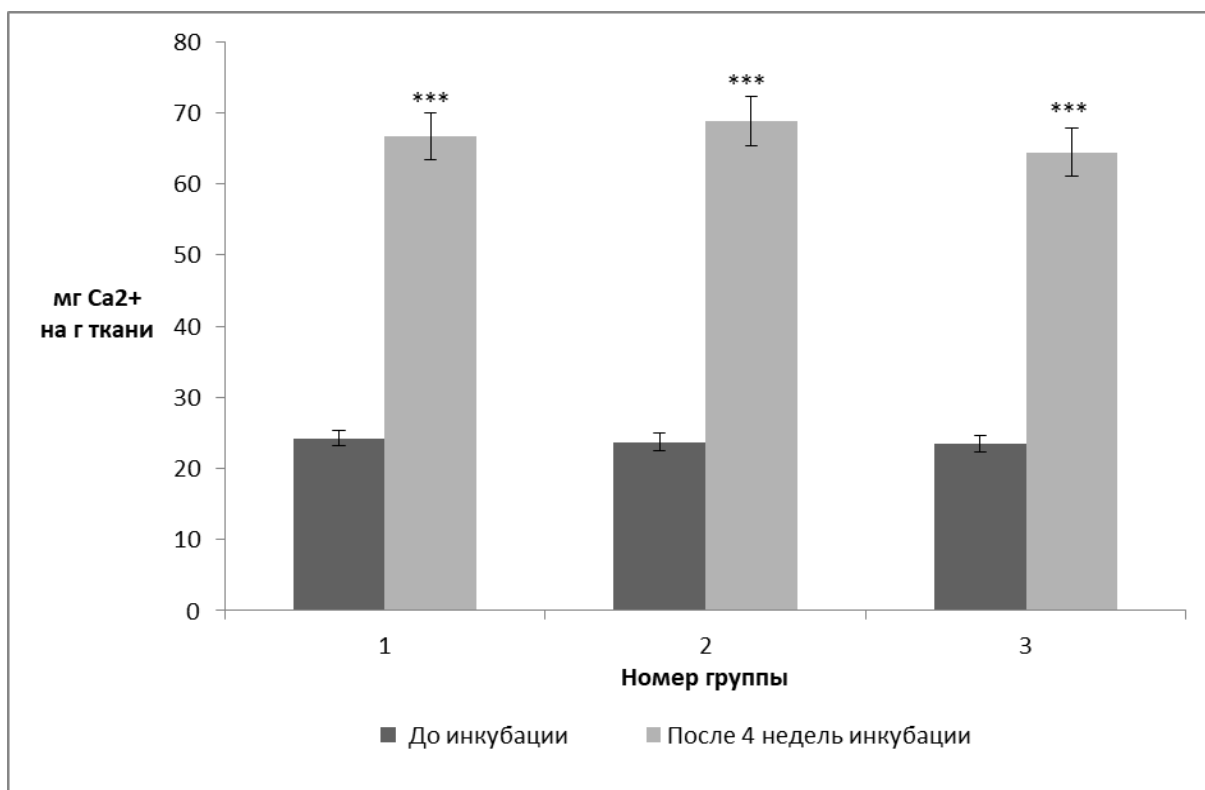


*Рисунок 6. Сравнительное содержание кальция в образцах внеклеточного коллагенового матрикса на основе ксеноперикарда 1,2,3 групп (мг на г ткани, $M \pm m$, $n=5$) Здесь: *** - $p < 0,005$ относительно содержания кальция до инкубации*

Группы 1, 2, 3 отличались между собой концентрацией сшивающего агента, используемого для стабилизации биоматериала. Инкубация в растворе Рингера — Тироде приводила к увеличению содержания кальция в образцах всех экспериментальных групп. Достоверных отличий в количественном содержании кальция до инкубации не обнаружено. Достоверных отличий в содержании кальция в образцах 1,2,3 групп после инкубации также не обнаружено.

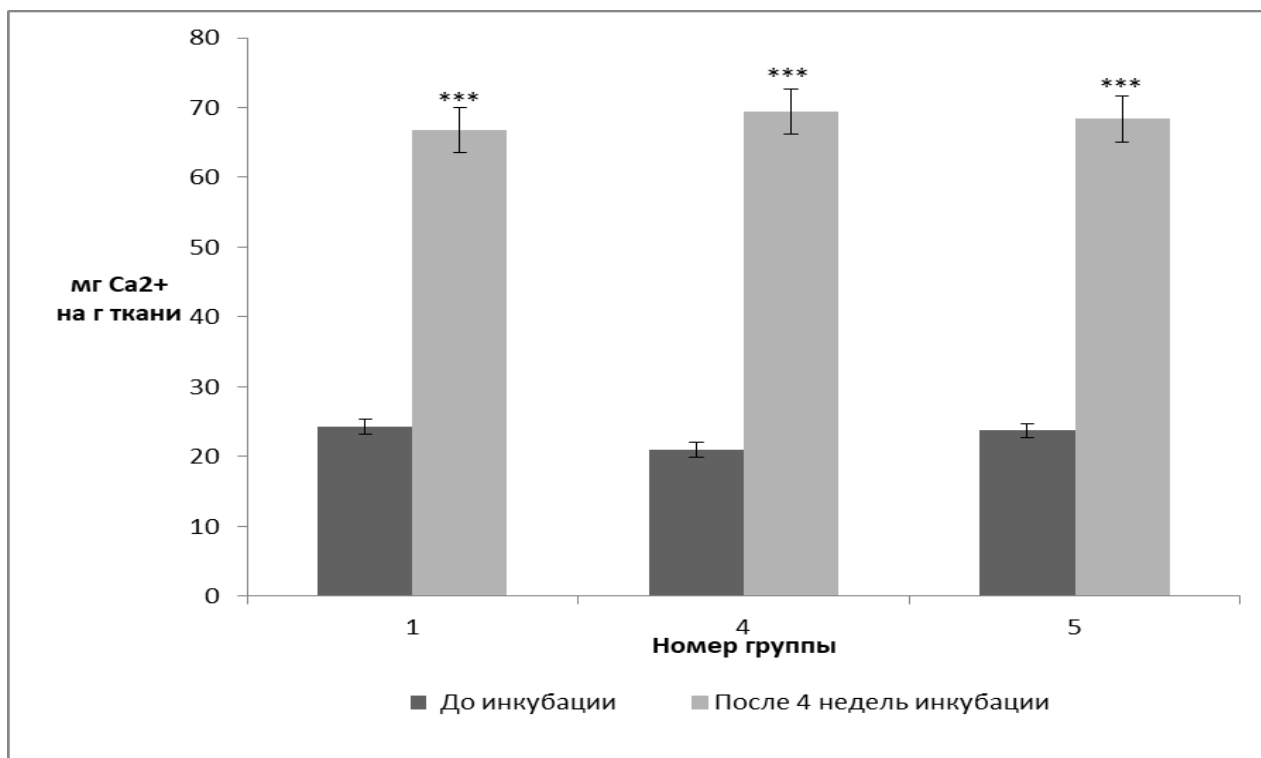


*Рисунок 7. Сравнительное содержание кальция в образцах внеклеточного коллагенового матрикса на основе ксеноперикарда 1,4,5 групп (мг на г ткани, $M \pm m$, $n=5$) Здесь: *** - $p < 0,005$ относительно содержания кальция до инкубации*

Группы 1, 4, 5 отличались между собой концентрацией сшивающего агента, используемого для стабилизации биоматериала. Инкубация в растворе Рингера — Тироде приводила к увеличению содержания кальция в образцах всех экспериментальных групп. Достоверных отличий в количественном содержании кальция до инкубации не обнаружено. Достоверных отличий в содержании кальция в образцах 1, 4, 5 групп после инкубации также не обнаружено.

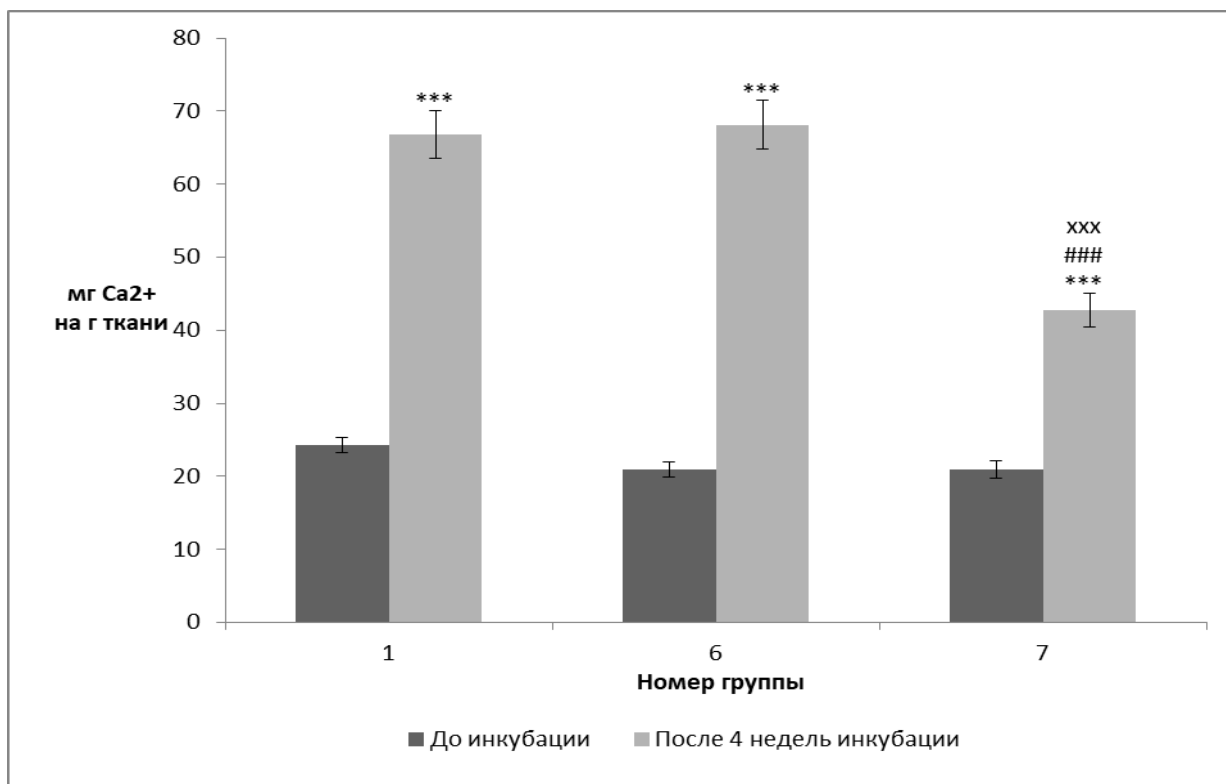


*Рисунок 8. Сравнительное содержание кальция в образцах внеклеточного коллагенового матрикса на основе ксеноперикарда 1,6,7 групп (мг на г ткани, $M \pm m$, $n=5$) Здесь: *** - $p < 0,005$ относительно содержания кальция до инкубации; ### - $p < 0,005$ относительно содержания кальция в 1 группе после моделирования кальцификации; xxx - $p < 0,005$ относительно содержания кальция в 6 группе после моделирования кальцификации*

Данные группы, также отличались между собой концентрацией сшивающего агента, используемого для стабилизации биоматериала. Достоверных отличий в количественном содержании кальция до инкубации не обнаружено. После инкубации наблюдалось снижение содержания кальция в 7 группе на 35% и 37% относительно 1 и 6 групп соответственно.

3.3.2 Результаты определения содержания фосфора в образцах биоматериала после моделирования кальцификации *in vitro*

Результаты исследования содержания фосфора в образцах биоматериала после моделирования кальцификации *in vitro* представлены на рисунках 9-11.

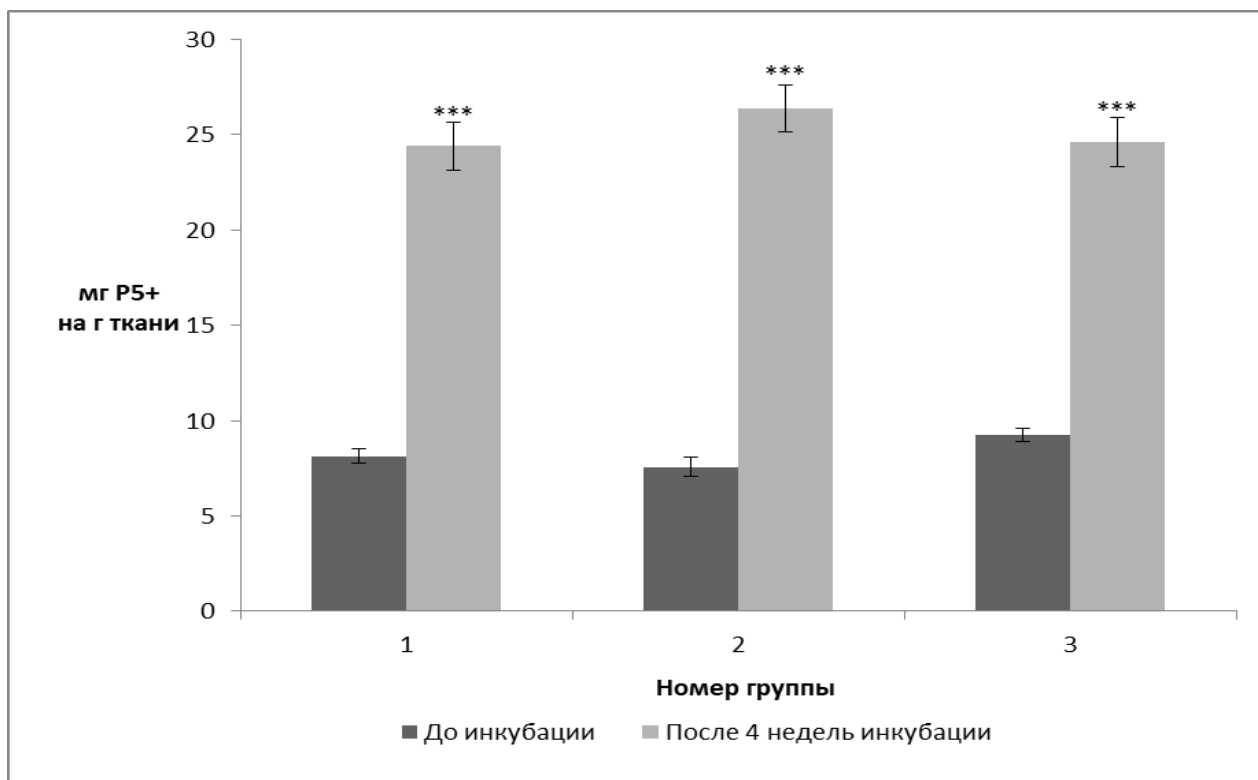


*Рисунок 9. Сравнительное содержание фосфора в образцах внеклеточного коллагенового матрикса на основе подслизистой тонкой кишки 1,2,3 групп (мг на г ткани, $M \pm m$, $n=5$) Здесь: *** - $p < 0,005$ относительно содержания фосфора до инкубации*

Группы 1, 2, 3 отличались между собой концентрацией сшивающего агента, используемого для стабилизации биоматериала. Инкубация в растворе Рингера — Тироде приводила к увеличению содержания фосфора в образцах всех экспериментальных групп. Достоверных отличий в количественном содержании фосфора до инкубации не обнаружено.

Достоверных отличий в содержании фосфора в образцах 1,2,3 групп после инкубации также не обнаружено.

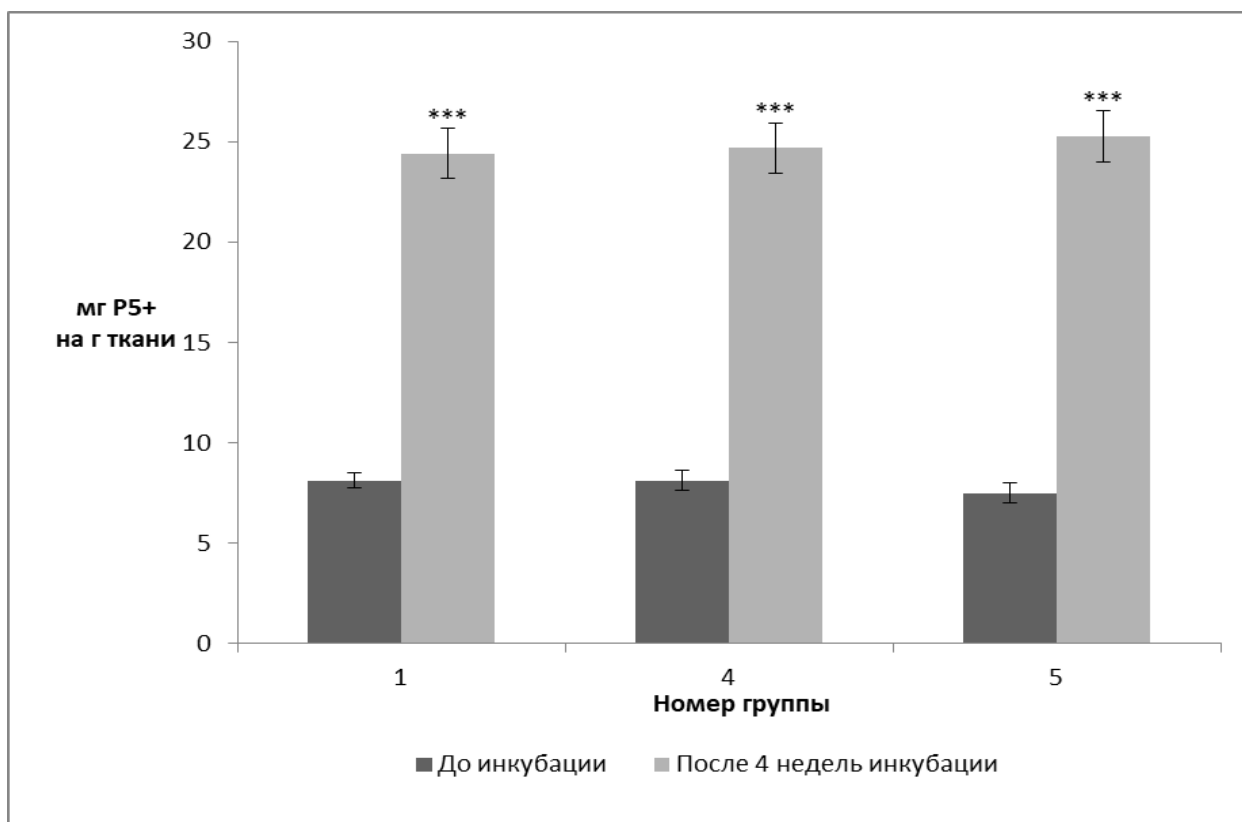


*Рисунок 10. Сравнительное содержание фосфора в образцах внеклеточного коллагенового матрикса на основе подслизистой тонкой кишки 1,4,5 групп (мг на г ткани, $M \pm t$, $n=5$) Здесь: *** - $p < 0,005$ относительно содержания фосфора до инкубации;*

Группы 1, 4, 5 отличались между собой концентрацией сшивающего агента, используемого для стабилизации биоматериала. Инкубация в растворе Рингера — Тироде приводила к увеличению содержания фосфора в образцах всех экспериментальных групп. Достоверных отличий в количественном содержании фосфора до инкубации не обнаружено. Достоверных отличий в содержании фосфора в образцах 1, 4, 5 групп после инкубации также не обнаружено.

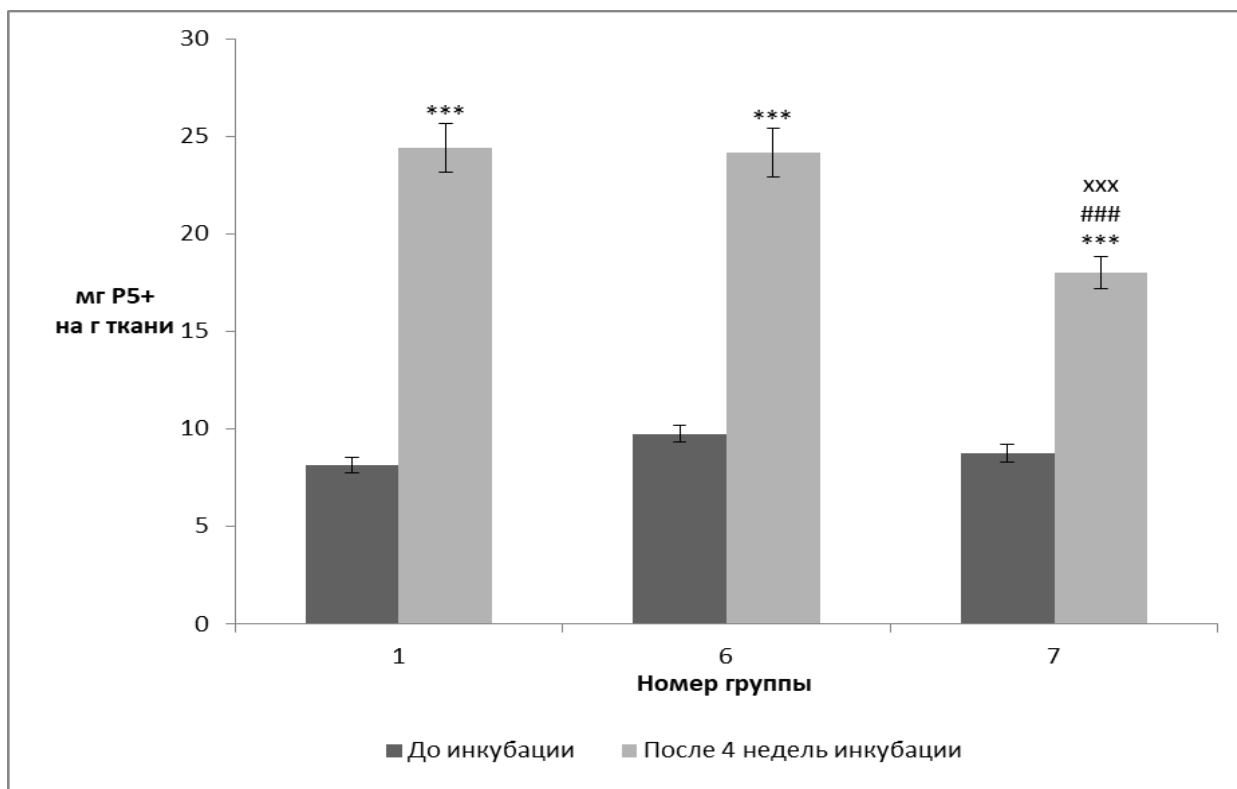


*Рисунок 11. Сравнительное содержание фосфора в образцах внеклеточного коллагенового матрикса на основе подслизистой тонкой кишки 1,6,7 групп (мг на г ткани, $M \pm m$, $n=5$) Здесь: *** - $p < 0,005$ относительно содержания фосфора до инкубации; ### - $p < 0,005$ относительно содержания фосфора в 1 группе после моделирования кальцификации; xxx - $p < 0,005$ относительно содержания фосфора в 6 группе после моделирования кальцификации*

Данные группы, также отличались между собой концентрацией сшивающего агента, используемого для стабилизации биоматериала. Достоверных отличий в количественном содержании фосфора до инкубации не обнаружено. После инкубации наблюдалось снижение содержания фосфора в 7 группе на 26% и 25% относительно 1 и 6 групп соответственно.

Результаты исследования содержания фосфора в образцах биоматериала после моделирования кальцификации *in vitro* представлены на рисунках 12-14.

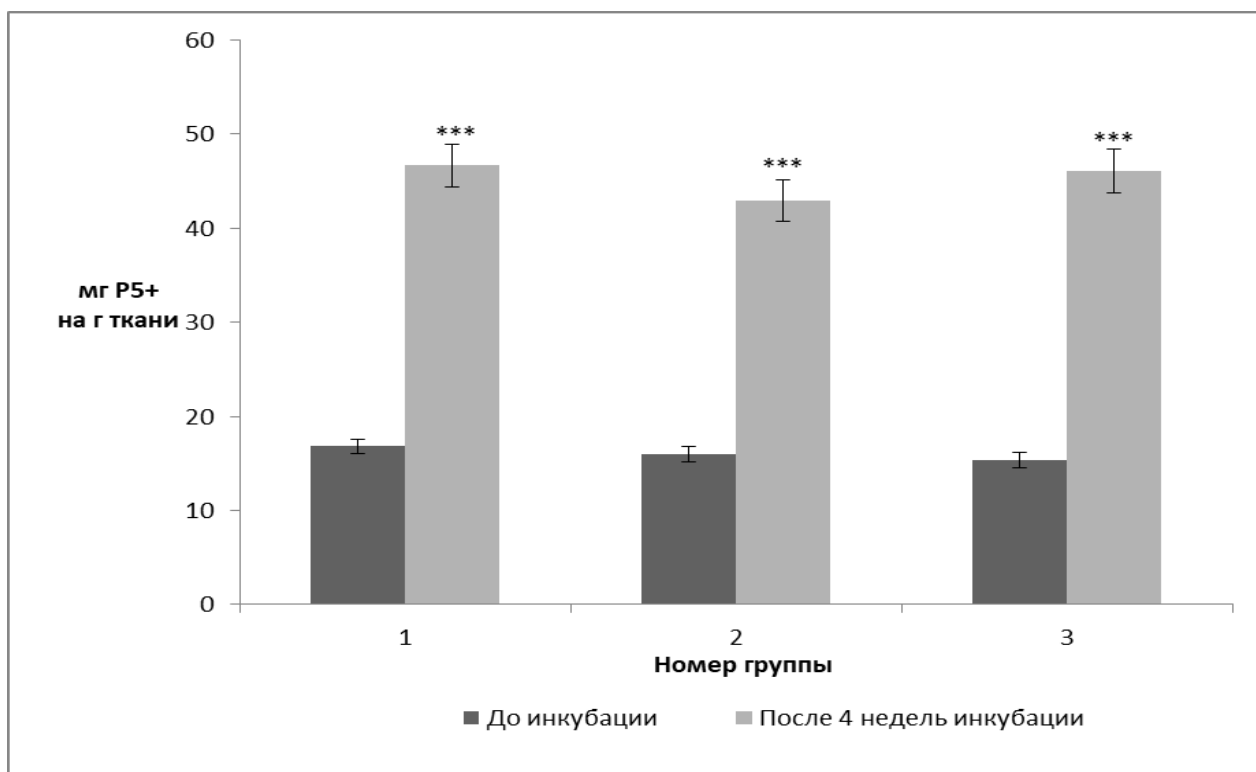


*Рисунок 12. Сравнительное содержание фосфора в образцах внеклеточного коллагенового матрикса на основе ксеноперикарда 1,2,3 групп (мг на г ткани, $M \pm m$, $n=5$) Здесь: *** - $p < 0,005$ относительно содержания фосфора до инкубации*

Группы 1, 2, 3 отличались между собой концентрацией сшивающего агента, используемого для стабилизации биоматериала. Инкубация в растворе Рингера — Тироде приводила к увеличению содержания фосфора в образцах всех экспериментальных групп. Достоверных отличий в количественном содержании фосфора до инкубации не обнаружено. Достоверных отличий в содержании фосфора в образцах 1,2,3 групп после инкубации также не обнаружено.

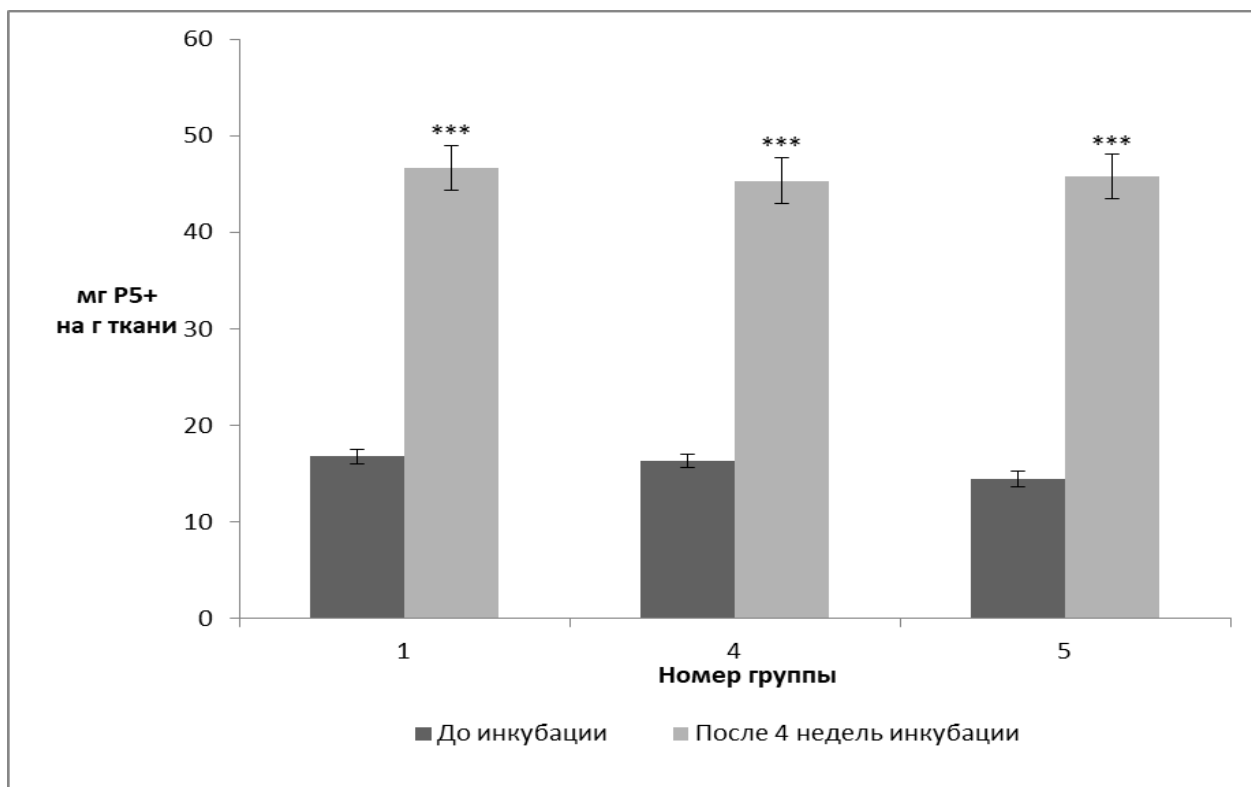


*Рисунок 13. Сравнительное содержание фосфора в образцах внеклеточного коллагенового матрикса на основе ксеноперикарда 1,4,5 групп (мг на г ткани, $M \pm m$, $n=5$) Здесь: *** - $p < 0,005$ относительно содержания фосфора до инкубации*

Группы 1, 4, 5 отличались между собой концентрацией сшивающего агента, используемого для стабилизации биоматериала. Инкубация в растворе Рингера — Тироде приводила к увеличению содержания фосфора в образцах всех экспериментальных групп. Достоверных отличий в количественном содержании фосфора до инкубации не обнаружено. Достоверных отличий в содержании фосфора в образцах 1, 4, 5 групп после инкубации также не обнаружено.

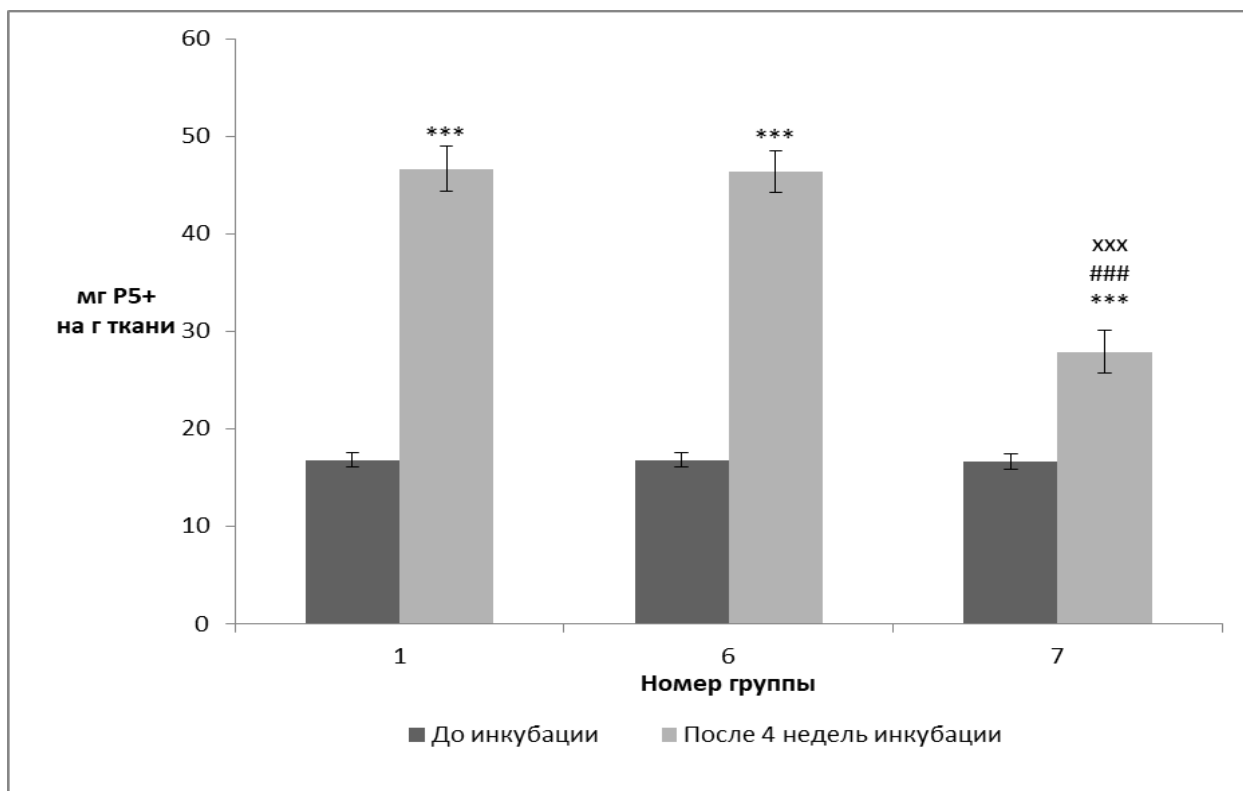


Рисунок 14. Сравнительное содержание фосфора в образцах внеклеточного коллагенового матрикса на основе ксеноперикарда 1,6,7 групп (мг на г ткани, $M \pm m$, $n=5$) Здесь: *** - $p < 0,005$ относительно содержания фосфора до инкубации; ### - $p < 0,005$ относительно содержания фосфора в 1 группе после моделирования кальцификации; xxx - $p < 0,005$ относительно содержания фосфора в 6 группе после моделирования кальцификации

Данные группы, также отличались между собой концентрацией сшивающего агента, используемого для стабилизации биоматериала. Достоверных отличий в количественном содержании фосфора до инкубации не обнаружено. После инкубации наблюдалось снижение содержания фосфора в 7 группе на 40% и 39% относительно 1 и 6 групп соответственно.

ВЫВОДЫ

1. Был получен внеклеточный коллагеновый матрикс на основе подслизистой тонкой кишки свиньи и ксеноперикарда путем химико-ферментативной обработки ткани ксеногенного происхождения.
2. Инкубация в модельном растворе Рингера - Тироде приводит к накоплению кальция и фосфора в образцах биоматериала.
3. Общее содержание кальция и фосфора до инкубации выше в образцах ксеноперекарда по сравнению с подслизистой тонкой кишки.
4. Обработка раствором сшивающего агента 1-Этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимид в концентрации 0,5 мМ приводит к снижению накопления кальция и фосфора в биоматериале.
5. Соотношение кальция/фосфора составило 3/2, что говорит о том что, не до конца сформированы кристаллы гидроксиапатита.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Акатов, В.С. Изучение биосовместимости трансплантата клапанов сердца, девитализированных антикальцинозным способом / В.С. Акатов, Р.М. Муратов, И.С. Фадеева // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2010. – т. 5, №2. – С.36-41
2. Акатов, В. С. Подавление кальцификации трансплантатов клапанов сердца путем их девитализации / В. С. Акатов, Н. И. Фесенко, В. В. Соловьев, И. Е. Фадеева, А. В. Чеканов, Р. М. Муратов, Д. В. Бритиков, А. С. Сачков // Гены и клетки. – 2010. – Т. 5, № 1. – С. 41-46.
3. Ахмедов, Ш. М. Эффективность краниопластики трансплантатами различного происхождения по данным гистологического исследования (экспериментальное исследование) / Ш. М. Ахмедов Е. З. Кочарян И.Т. Мухамедов, В. С. Корвяков, В. Д. Меланьин и др. // Российская оториноларингология. –2013. – № 5. – С. 8-13.
4. Барбараш, Л.С. Биологические протезы артерий: научное издание / Л.С. Барбараш, А.С. Криковцов, И.Ю. Журавлева. – Кемерово, 1996. – 46 с.
5. Бегун, П. И. Биохимическое моделирование объектов протезирования / П. И. Бегун. – СПб.: Политехника, 2011. – 464 с.
6. Билич, Г. Л. Анатомия человека / Г. Л. Билич, В. А. Крыжановский. – М.: Эксмо, 2012. – 224 с.
7. Богуславский, К.И. Эпитоп Gal- α -1,3-Gal: роль в биологии клетки и трансплантации / К.И. Богуславский, Г.А. Божок, Е.И. Легач, И.В. Фурда, Т.П. Бондаренко// Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2016. – Т. 26, №1. – С. 3-12
8. Бокерия, Л. А. Криосохраненные аллогraftы в реконструктивной хирургии пороков аортального клапана / Л. А. Бокерия, Р. М. Муратов, И. И. Скопин и др. – М.: НЦССХ им. А. Н. Бакулева РАМН, 2007. – 282 с.
9. Булгаков, В. Г. Трибохимический компонент развития окислительного стресса при имплантации искусственных суставов / В. Г.

Булгаков, Н. С. Гаврюшенко, А. Н. Шальнев, В. Ф. Цепалов // Вестник травматологии и ортопедии им. Н. Н. Приорова. – 2010. – № 1. – Ч. 1. С.44-48

10. Венедиктов, А. А. Разработка метода получения внеклеточного матрикса на основе ксеноперикардальной ткани и оценка его свойств / А. А. Венедиктов, В. К. Фуки, М. Т. Генгин, О. В. Калмин, Д. В. Никишин, Л. В. Живаева // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки. – 2013. – № 4 (27). – С. 12-25.

11. Волков, А. В. Тканевая инженерия тонкой кишки / А. В. Волков // Гены и клетки. – 2005. – № 1. – С. 38-39.

12. Волкова, Т. Г. Материалы для медицины, клеточной и тканевой инженерии / Т. Г. Волова, Е. И. Шишацкая, П. В. Миронов. – Красноярск : ИПК СФУ, 2009 – 262 с.

13. Дубова, Е.А. Морфологическая характеристика тканевой реакции при имплантации сетчатых эндопротезов : диссертация кандидата медицинских наук / Е.А. Дубова. – Москва, 2008. – 99 с.

14. Затолока, Д.А. Проблемы применения аллотрансплантатов в оториноларингологической практике / Д.А.Затолока, Т.А.Путилина, А.С.Затолока, В.В.Батов // Клинико–лабораторные аспекты метаболической терапии: Сб. ст. II Респ. конф.– Витебск, 1999.– С. 165-167

15. Калмин, О. В. Изучение in vivo свойств ксеноперикарда, прошедшего различную обработку химико-ферментативным методом / О. В. Калмин, Л. В. Живаева, А. А. Венедиктов, Д. В. Никишин, В. К. Фуки, М. Т. Генгин // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки. – 2013. – № 2 (26). – С. 15-26.

16. Кладов, С. Ю. Смертность от заболеваний сердечно-сосудистой системы и внешних причин в условиях среднеурбанизированной территории западной сибиря / С. Ю. Кладов // Сибирский медицинский журнал. – 2008. – № 1–2. – С. 43-46.

17. Коваленко, П.П. Пересадка тканей и органов / П. П. Коваленко. – Ростов н/Д, 1976. – 47 с.

18. Козлов, В.И. Анатомия сердечно-сосудистой системы / В.И. Козлов. – М.: Практическая Медицина, 2013. – 192 с.
19. Коржевский, Д. Э. Основы гистологической техники. Практическое руководство / Д. Э. Коржевский, А. В. Гиляров. – Спб.: СпецЛит, 2010. – 95 с.
20. Краев, А. В. Анатомия человека / А. В. Краев, О. В. Резцов – М.: Медкнига, 2007. – Т. 1. – 496 с.
21. Кудрявцева, Ю. А. Роль шовного материала в кальцификации кардиоваскулярных биопротезов / Ю. А. Кудрявцева, М. В. Насонова, Т. Н. Аментьева, А. Ю. Бураго, И. Ю. Журавлева // Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. – 2013. – № 4. – С. 22-27.
22. Лакин, Г. Ф. Биометрия: учебное пособие для вузов / Г. Ф. Лакин. – М.: Высшая школа, 1990. – 312 с.
23. Новицкий, В.В. Введение в методы культуры клеток, биоинженерия органов и тканей / В.В. Новицкий [и др.] – Томск, 2004. – 385 с.
24. Овечкин, А. М. Хирургический стресс–ответ, его патофизиологическая значимость и способы модуляции / А. М. Овечкин // Регионарная анестезия и лечение острой боли. – 2008. – Т.2. – № 2. – С.49-62.
25. Пальцев, М.А. Межклеточные взаимодействия / М.А. Пальцев, А.А. Иванов, С.Е. Северин. 2–е изд. – М.: Медицина, 2003. – 288 с.
26. Петрова, М. В. Апоптическая децеллюляризация, как способ предотвращения деструктивных изменений в биологических протезах сердечных клапанов / М. В. Петрова // Таврический медико-биологический вестник. – 2012. – Т. 15, №3 (ч.1). – С. 267-269.
27. Попандопуло, А. Г. Бесклеточный экстрацеллюлярный матрикс как основа тканеинженерного трансплантата сердечного клапана / А. Г. Попандопуло, М. В. Петрова // Клітинна та органна трансплантологія. – 2013. – Т.1, № 1. – С. 48-51.

28. Попандопуло, А. Г. Механизмы кальцификации сосудисто-клапанных биопротезов и методы её изучения / А. Г. Попандопуло, М. В. Петрова, Д. Л. Юдицкий, И. Ю. Мокрик // Сучасні медичні технології. – 2011. – № 3–4. – С. 313-316.
29. Розанова, И. Б. Кальцификация имплантов / И. Б. Розанова, С. Л. Васин // В кн.: Биосовместимость / В. И. Севастьянова. – М.: ИЦ ВНИИ геосистем., 1999. – С. 246-295.
30. Саркисов, Д.С. Общая патология человека / Д.С. Саркисов, М.А. Пальцев, Н.К. Хитров. – М.: Медицина, 1995. – 272 с.
31. Севастьянов, В. И. Биосовместимые материалы / В. И. Севастьянов, М. Т. Кирпичникова. – М.: «МИА», 2011. – 544 с.
32. Севастьянов, В. И. Методы исследования физико-химических и биологических свойств медицинских изделий / В. И. Севастьянов, С. Л. Василец, Н. В. Перова // В кн.: Биосовместимые материалы / В. И. Севастьянова. – М.: МИА, 2011. – С. 50-75.
33. Севастьянов, В.И. Биоматериалы, системы доставки лекарственных веществ и биоинженерия / В.И. Севастьянов // Вестн. трансплантологии и искусственных органов . – 2009. –Т. 9, №3. – С. 69-80.
34. Сурков, Н.А. Изучение особенностей тканевых реакций в зоне имплантации различных видов сетчатых эндопротезов. Значение результатов экспериментальных исследований для клинической хирургии / Н.А. Сурков [и др.] // Герниология . – 2005. – №1. С. 43-47.
35. Хиженок, В. Ф. Деформационно-прочностные характеристики полимерного протеза клапана сердца / В. Ф. Хиженок, С. В. Шилько // Российский журнал биомеханики. – 2006. – Т. 10, № 4. – С. 52-61.
36. Шехтер, А. Б. Воспаление и регенерация / А. Б. Шехтер, В. В. Серов // В кн.: Воспаление. – М.: Медицина, 1995. – С. 200-219.
37. Шехтер, А. Б. Тканевая реакция на имплантацию различных материалов / А. Б. Шехтер // Биосовместимые материалы / В. И. Севастьянова. – М.: МИА, 2011. – Р. 130-158.

38. Шумаков, В.И. Биополимерные матрицы для искусственных органов и тканей / В.И. Шумаков, В.И.Севастьянов // Здравоохранение и медицинская техника. – 2003 . – №4. – С. 30-33
39. Allman, A. J. Xenogeneic extracellular matrix elicits a TH2-restricted immune response / A. J. Allman, T. B. McPherson, S. F. Badylak, L. C. Merrill, B. Kallakury, C. Sheehan, R. H. Raeder, D. W. Metzger // Transplantation. – 2001. – № 71. – P. 1631-1640.
40. Ansaloni, L. Hernia repair with porcine small-intestinal submucosa / L. Ansaloni, F. Catena, S. Gagliardi, F. Gazzotti, L. D'Alessandro, A. D. Pinna // Hernia. – 2007. – № 11(4). – P. 321-326.
41. Badylak, S. Morphologic study of small intestinal submucosa as a body wall repair device / S. Badylak, K. Kokini, B. Tullius, A. Simmons-Byrd, R. Morff // J Surg Res. – 2002. – № 103 (2) – P. 190-202.
42. Badylak, S. Extracellular matrix for myocardial repair / S. Badylak, J. Obermiller, L. Geddes, R. Matheny // Heart Surg Forum. – 2003. – № 6(2) – P. 20-26.
43. Boyd, W. D. Pericardial reconstruction using an extracellular matrix implant correlates with reduced risk of postoperative atrial fibrillation in coronary artery bypass surgery patients / W. D. Boyd, W. E. Johnson, P. K. Sultan, T. F. Deering, R. G. Matheny // Heart Surg Forum. – 2010. – № 13(5). – P. 311-316.
44. Cobb, MA. Histology after dural grafting with small intestinal submucosa / MA. Cobb, SF. Badylak, W. Janas, FA. Boop // Surg Neurol. – 1996. – № 46. – P. 389-394.
45. Fallon, A. Remodeling of extracellular matrix patch used for carotid artery repair / A. Fallon, T. Goodchild, R. Wang, R. G. Matheny // J Surg Res. – 2012. – № 175 (1) – P. 25-34.
46. Holubec, T. Use of extracellular matrix patches in cardiac surgery / T. Holubec, E. Caliskan, S. H. Sündermann, C. T. Starck, A. Plass, D. Bettex, V. Falk, F. Maisano // J Card Surg. – 2015. – № 30(2). – P. 145-148.

47. Hurst, R. E. Mapping of the distribution of significant proteins and proteoglycans in small intestinal submucosa by fluorescence microscopy / R. E. Hurst, R. B. Bonner // *J Biomater Sci Polym Ed.* – 2001. – № 12. – P. 1267-1279.
48. Knoll, L. D. Use of porcine small intestinal submucosal graft in the surgical management of Peyronie's disease / L. D. Knoll // *Urology.* – 2001. – № 57. – P. 753-757.
49. Krumdorf, U. Incidence and clinical course of thrombus formation on atrial septal defect and patient foramen ovale closure devices in 1,000 consecutive patients / U. Krumdorf, S. Ostermayer, K. Billinger et al. // *J. Amer. Coll. Cardiol.* – 2004. – № 43. – P. 302-309.
50. Lam, M. T. Biomaterial applications in cardiovascular tissue repair and regeneration / M. T Lam, J. C Wu // *Expert Rev Cardiovasc Ther.* – 2012. – №10(8). – P. 1039-1049.
51. Lindberg, K. Porcine small intestinal submucosa (SIS): a bioscaffold supporting in vitro primary human epidermal cell differentiation and synthesis of basement membrane proteins / K. Lindberg, S. F. Badylak // *Burns.* – 2001. – № 27(3). – P. 254-266.
52. Marshall, M. An alternative to synthetic aortic grafts using jejunum / M. Marshall // *J Invest Surg.* – 2000. – № 32. – P. 333-341.
53. Schmidt, D. Tissue engineering of heart valves using decellularized xenogeneic or polymeric starter matrices / D. Schmidt, U. A. Stock, S. P. Hoerstrup // *Phil. Trans. R. Soc. B.* – 2007. – № 362. – P. 1505-1512.
54. Shi, L. Biochemical and biomechanical characterization of porcine small intestinal submucosa (SIS): a mini review / L. Shi and V. Ronfard // *Int J Burns Trauma.* – 2013. – №3(4). – P. 173-179.
55. Smith, R. M. Role of small intestine submucosa (SIS) as a nerve conduit: preliminary report / R.M. Smith, C. Wiedl, P. Chubb, C. H. Greene // *J Invest Surg.* – 2004. – № 17(6). – P. 339-344.
56. Thomazic, B. Physicochemical characterization of natural and bioprosthetic heart valve calcific deposits. Implication for prevention. / B.

Thomazic, W. Edwards, F. Schoen // Ann Thorac Surg. – 1995. – № 60 – P. 322–327.

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РФ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования

ПЕНЗЕНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

Факультет
физико-математических
и естественных наук

Кафедра
«Общая биология и биохимия»

Направление подготовки
06.03.01 Биология
Профиль подготовки «Биохимия»

Утверждаю:
Зав. кафедрой
 Г.А. Карпова
« 01 » 11 2017 г.

Задание

По ВКР студента Тимофеевой Юлии Алексеевны

Тема работы: «Исследование кальцификации внеклеточного коллагенового
матрикса in vitro».

Утверждена приказом по Университету от « 31 » 10 2017 г. № 1096 а/б

Срок сдачи студентом законченной работы « 25 » мая 2018 г.

КАЛЕНДАРНЫЙ ПЛАН ВКР

№ п/п	Перечень подлежащих разработке вопросов:	Сроки выполнения этапов	Примечания
1.	Собеседование с научным руководителем, обсуждение темы и структуры ВКР, формулировка цели, задач	ноябрь 2017	выполнено
2.	Поиск научной, справочной литературы по теме ВКР, анализ современных научных достижений в области исследования по теме ВКР	ноябрь 2017	выполнено
3.	Составление библиографического списка изученной литературы	ноябрь 2017	выполнено
4.	Поиск и изучение методов исследования в рамках ВКР	ноябрь - декабрь 2017	выполнено
5.	Подготовка главы «Обзор литературы»	декабрь 2017	выполнено
6.	Подготовка главы «Материалы и методы исследования»	январь 2018	выполнено
7.	Составление плана проведения эксперимента, подготовка к выполнению эксперимента	январь 2018	выполнено
8.	Проведение децеллюляризации биоматериала, подготовка образцов для исследования	февраль 2018	выполнено
9.	Моделирование кальцификации образцов биоматериалов in vitro	февраль 2018	выполнено
10.	Сжигание образцов после инкубации в модельной среде и подготовка проб к анализу	март 2018	выполнено
11.	Определение содержания кальция и фосфора в образцах биоматериала	март 2018	выполнено
12.	Обработка и анализ полученных результатов эксперимента. Собеседование с научным руководителем	март 2018	выполнено
13.	Оформление результатов исследования в виде графиков	апрель 2018	выполнено
14.	Подготовка главы «Результаты исследования и их обсуждение»	апрель 2018	выполнено
15.	Итоговое оформление ВКР	май 2018	выполнено
16.	Подготовка презентации на защиту ВКР, подготовка к защите ВКР	май 2018	выполнено

Дата выдачи задания « 01 » 11 2017 г.

Руководитель _____

Задание принял к исполнению _____

