

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 06.04.01 Биология

Магистерская программа Биохимия и молекулярная биология

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

на тему

**«ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ДОДЕЦИЛСУЛЬФАТА НАТРИЯ И
ПОЛИМЕРНОГО ГЛУТАРОВОГО АЛЬДЕГИДА НА
ИНТЕНСИВНОСТЬ КАЛЬЦИФИКАЦИИ БИОМАТЕРИАЛА»**

Студент

Митякина Ольга Сергеевна

Научный руководитель

Венедиктов А.А.

Нормоконтролер

Кручинина А.Д.

Рецензент

Сорокина Л.А.

Работа допущена к защите (протокол заседания кафедры от 04.06.18 № 13)

Заведующий кафедрой

Карпова Г.А.

Работа защищена с отметкой отлично (протокол заседания ГЭК от 25.06.18 № 6)

Секретарь ГЭК

Кручинина А.Д.

Пенза, 2018

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	7
1.1 Общая характеристика перикарда	7
1.2 Перикард как биоматериал	7
1.3 Области применения перикардимальной ткани	9
1.3.1 Кардиохирургия.....	9
1.3.2 Офтальмология	12
1.3.3 Стоматология.....	14
1.3.4 Урология и гинекология	15
1.4 Сшивающие агенты	17
1.4.1 Химизм процесса сшивки.....	18
1.4.2 Механизм кальцификации ГА-фиксированной ткани	19
1.5 Основные детергенты, используемы для децеллюляризации	20
1.5.1 Додecilсульфат натрия.....	21
1.5.2 Дезоксихолат натрия.....	22
1.5.3 Трипсин	23
1.5.4 Тритон X-100	24
1.6 Тканевый ответ на имплантацию.....	25
1.7 Кальцификация	27
ГЛАВА 2. ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	31
2.1 Способ получения биологического материала.....	31
2.2 Гистологический контроль обработки	32
2.2.1 Окраска гематоксилин-эозином.....	33
2.2.2 Окраска по методу Вейгер-Ван-Гизона	34
2.3 Изучение кальцификации in vitro	34
2.4 Изучение кальцификации in vivo	35
2.5 Методы статистической обработки данных	36
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЯ	37

3.1	Результаты получения биологического материала	37
3.2	Гистологическое исследование образцов	39
3.3	Результаты исследования кальцификации материалов <i>in vitro</i>	45
3.4	Результаты исследования кальцификации материалов <i>in vivo</i>	52
ЗАКЛЮЧЕНИЕ		57
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ		58
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ		59

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. В настоящее время, в различных областях реконструктивной медицины активно используются биологические пластические материалы [6]. Широкое применение данных биоматериалов обусловлено их преимуществами, по сравнению с синтетическим:

- естественное происхождение;
- способность повторять пространственную архитектуру ткани;
- высокая степень биосовместивости;
- вещества, которые являются промежуточными продуктами биодеструкции таких материалов, могут быть включены в метаболизм клеток [31].

Одним из наиболее часто используемых материалов является перикард ксеногенного происхождения. Получаемая после обработок ксеноперикардальная ткань обладает такими свойствами как пластичность, высокая прочность, удобство при использовании. Особенно актуальным является ее использование в сердечно-сосудистой хирургии. Примером может служить изготовление биологических протезов клапанов сердца на основе ксеноперикардальной ткани [2].

При использовании биопротезов в медицине, основными осложнениями являются разрушение створок клапанов и их кальцификация. Разрушение створок происходит в результате контакта имплантируемой биоткани с кровью реципиента и является результатом отторжения биопротеза организмом [88]. С целью предотвращения появления иммунного ответа и воспалительной реакции на имплантат было предложено проведение децеллюляризации с последующей обработкой сшивающим агентом. В качестве агентов для децеллюляризации часто используются такие вещества, как дезоксихолат натрия, додецилсульфат натрия, трипсин, тритон X-100, а также большое число других реагентов [18]. В роли

сшивающего агента, используется глутаровый альдегид, поскольку он является более доступным, дешевым и легче растворяется в воде [65].

Перед проведением процесса сшивки клапана сердца, необходимо очистить материал от химических реагентов, которые использовались на этапе его подготовки. Поэтому проводят тщательную отмывку материала с использованием детергентов, в том числе и додецилсульфат натрия.

Так как кальцификация является одной из важных проблем в использовании сердечных клапанов, актуальным является исследование влияния различных этапов обработки биоматериала для изготовления протезов на процесс кальцификации в условиях *in vitro* и *in vivo*.

Целью данной работы является оценка влияния полимерного глутарового альдегида и додецилсульфата натрия на кальцификацию ксеноперикардальной ткани *in vitro* и *in vivo*.

Для достижения цели поставлены следующие **задачи**:

1. Провести анализ литературных источников по теме исследования;
2. Провести механическую очистку и обработку перикарда;
3. Смоделировать кальцификацию материалов *in vitro* и *in vivo*;
4. Определить содержание кальция в образцах до и после моделирования кальцификации;
5. Обработать полученные данные с привлечение методов статистики.
6. Проанализировать влияние проведения обработки полимерным глутаровым альдегидом на интенсивность кальцификации;
7. Проанализировать влияние проведения обработки раствором додецилсульфата натрия на интенсивность кальцификации;
8. Проанализировать влияние стерилизующего и консервирующего раствора на интенсивность кальцификации.

Магистерская диссертация написана на 70 листах, содержит 22 рисунка, 4 таблицы и список литературы на русском и английском языках из 97 источников.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Общая характеристика перикарда

Перикард (*pericardium*) – это замкнутый фиброзно-серозный мешок, в котором располагается сердце [34]. Перикард фиксирует сердце на крупных сосудах. Он защищает сердце, уменьшает его трение и способствует пассивному расширению камер в фазе диастолы [8].

Наружный слой – фиброзный перикард – сформирован плотной волокнистой соединительной тканью, в которой содержится много перекрещивающихся слоев коллагеновых волокон [29]. Со всех сторон фиброзный перикард сращен с окружающими структурами: а) с сухожильным центром диафрагмы снизу; б) со средостенной плеврой по бокам; в) с передней грудной стенкой спереди, образуя грудино-перикардиальные связки. Сзади фиброзный перикард ограничен от бронхов бронхоперикардиальной мембраной.

Серозный перикард построен из однослойного плоского эпителия (мезотелия) и слоя рыхлой соединительной ткани и состоит из двух слоев: париетального и висцерального. Париетальная пластинка выстилает изнутри фиброзный перикард. Висцеральная пластинка (эпикард) покрывает миокард сердца извне [34].

1.2 Перикард как биоматериал

Ксеногенный перикард обычно получают от крупного рогатого скота, свиней и, в меньшей степени, от лошадей. Ткани, полученные от данных источников, доступны в большом объеме.

Перикард, в основном, состоит из коллагеновых волокон и обладает эластичными свойствами, что обеспечивает соответствие сложной анатомии. Перикардиальная ткань обладает исключительными свойствами,

позволяющими управлять ею и сохранять равномерный шов. Кроме того, данный материал является нетромбогенным и устойчив против инфекций [60].

Для уменьшения вероятности неблагоприятного иммунного ответа, перикард децеллюляризируют одним из многих возможных способов, в результате чего образуется внеклеточный коллагеновый матрикс. Тканевая морфология и коллагеновая структура зависит от выбранного способа децеллюляризации [51]. После удаления клеточного содержимого, ткань обычно сшивают с использованием глутарового альдегида для сохранения и увеличения прочности биоматериала.

Существуют небольшие различия между перикардом полученным от разных источников. Телячий перикард обладает более высоким содержанием коллагена, по сравнению с перикардом свиного происхождения [60]. Клапаны, изготовленные из бычьего перикарда, показывают меньшую непроходимость, чем клапаны, изготовленные из перикардимальной ткани свиньи, хотя оба клапана имеют схожие результаты гемодинамики [46]. Ткани, полученные от крупного рогатого скота и свиней, не показали существенного различия в степени кальцификации при различных методах обработки [85].

Перикард крупного рогатого скота характеризуется как нелинейный, анизотропный, многослойный, гибкий материал, который обычно подвергается крупным деформациям во время выполнения его физиологической функции в качестве имплантата. Он состоит из сети коллагеновых и эластиновых волокон, встроенных в аморфную матрицу. Коллаген типа I составляет 90% от общего содержания белка, в матрице также присутствуют протеогликаны и гликозаминогликаны, содержащиеся в волокнах, клетках и интерстициальной жидкости [38].

Для получения внеклеточного коллагенового матрикса на основе ксеноперикардимальной ткани, в качестве детергента, в основном, используются додецилсульфат натрия, а в качестве стабилизирующего

сшивающего агента – глутаровый альдегид. Данные соединения оказывают определенное влияние на свойства получаемого материала.

1.3 Области применения перикардальной ткани

Ксеноперикардальная ткань, в настоящее время, находит широкое применения в реконструктивно-восстановительной хирургии. Далее мы подробнее рассмотрим применения данного биоматериала в различных областях медицины.

1.3.1 Кардиохирургия

Перикардальная ткань исторически была выбрана для использования в сердечно-сосудистых устройствах, благодаря ее доступности, присущей прочности и эластичным свойствам. В дополнение к желаемому механическому поведению, природные ткани часто демонстрируют превосходные динамические свойства, а по сравнению с синтетическими материалами требуют меньшей антикоагулянтной терапии [44].

Ксеноперикардальная ткань является основным биоматериалом, используемым в биологических протезах клапанов сердца [49], в закрытие дефекта межжелудочковой и межпредсердной перегородок [69], в устранение сосудистых дефектов и в других отраслях данной области [40].

Для реконструкции сосудов используют заплатки, изготовленные из перикардальной ткани крупного рогатого скота. Данный материал имеет ряд преимуществ по сравнению с аллопластическими материалами: высокая прочность материала [90], низкий уровень риска заражения и тромбоза, кроме того, он не требует долговременной антикоагуляции [73,81]. Его биосовместимость значительно выше, чем у аллопластических материалов, что объясняется структурой коллагенового волокна, которая обладает

идеальной средой для миграции фибробластов и других рецепторных клеток, тем самым способствуя быстрой интеграции и эпителизации [90].

При использовании ксеноперикардальной ткани наблюдается низкий уровень развития инфекций, что объясняется его устойчивостью к данному явлению, и, как следствие, перикард является подходящим материалом для клинического использования [64].

Уже в 1997 году группа, возглавляемая Pirrelli, опубликовала 5 случаев, в которых была проведена замена инфицированных инфарктальных трансплантатов на перикардальные трубки *in situ* [70]. В 2009 году Motokawa и другие сообщили об использовании перикардального трансплантата, полученного от лошади, для замены грудной аорты с аортобронхиальной фистулой [96] и интразональной аорты с микотической аневризмой [97]. Также, в 2011 году, была опубликована серия опытов по замене инфицированных трансплантатов, возникших в результате открытой или эндоваскулярной терапии, на перикардальные трубки [47].

Существует возможность комбинирования перикардальных заплаток с другими трансплантатными материалами, такими как биосинтетические трансплантаты, вены или гомографы [87].

Компанией ООО «Кардиоплант» (г. Пенза) налажен серийный выпуск ксеноперикардальной пластины – это биологический материал, который подходит для лечения пораженных участков органов и тканей. Данный материал имеет две поверхности: серозную (гладкую) и фиброзную (ворсинчатую). Децеллюлированный ксеноперикард обладает высокими прочностными свойствами, пластичностью, удобством применения. Данное изделие применяют для пластики дефектов межпредсердной и межжелудочковой перегородки, для пластики сосудистой стенки, аорты, стенки предсердий, реконструкции створок митрального и аортального клапанов. Также ксеноперикардальные пластины используют в таких областях медицины, как герниология, травматология и ортопедия, урология и гинекология [3].

Наиболее популярно применение кспеноперикарда в изготовление биопротезов клапанов сердца [5]. Большой интерес представляют биологические протезы отечественного производства, которые используют в своей основе перикард природного происхождения. Рассмотрим наиболее популярные и хорошо зарекомендованные себя модели.

Весьма распространенным является каркасный протез «ПериКор» [16], созданный и запущенный в серийное производство лабораторией «НеоКор» (г. Кемерово) в 2001 г [5]. Створчатая часть данного биопротеза сделана из створок аортального клапана свиньи, смонтированных на полипропиленовом каркасе, а облицовка каркаса и манжета изготовлены из перикарда крупного рогатого скота [23].

Также широкое распространение в России получила продукция отдела биомедицинской технологии НЦССХ им. А. Н. Бакулева: каркасные и бескаркасные ксеноперикардимальные и криосохраненные трансплантаты «БиоЛаб», в зависимости от модели, предназначенные для применения практически во всех позициях при самых разнообразных типах приобретенных и врожденных пороков сердца [9].

Биопротезы клапанов сердца компании ООО «Кардиоплант», входящей в состав ЗАО НПП «МедИнж» (г. Пенза) – крупного российского производителя изделий медицинского назначения, пользуются большой популярностью среди кардиохирургов. В них воплощены современные технологические достижения, новейшие материалы, уникальная конструкция, защищенная патентами США, Европы, России. В изготовлении биопротезов используют монолитный изотропный пиролитический углерод, что обеспечивает надежность и долговечность клапана. Биоинертность и тромбрезистентность достигается путем применения материалов, которые проявили безопасность в использовании и специальным дизайном, исключающим образования застойных зон при прохождении через клапан потока крови.

1.3.2 Офтальмология

Перикардальная ткань также находит широкое применение в области офтальмологии. Рассмотрим подробнее примеры использования данного материала.

Глаукома является основной причиной необратимой слепоты в мире [77]. Основное лечение глаукомы направлено на снижение внутриглазного давления, чтобы замедлить или предотвратить дальнейшую потерю зрения. Внутриглазное давление можно снизить с помощью медикаментов и лазерных или хирургических процедур.

Трабекулэктомия являлась преобладающим методом хирургического лечения глаукомы, по сравнению с другими методами. Исторически, это было предпочтительнее, чем имплантация трубки-шунта. Однако более высокая оценка эффективности шунтирования и длительные осложнения, возникающие в результате трабекулэктомии, повлияли на выбор в пользу использования шунтов [89].

Но имеются данные, что процедура шунтирования также вызывает некоторые осложнения, такие как гипотония в послеоперационный период, фиброзное инкапсулирование с уменьшением проницаемости капсулы вокруг пластины, эрозия трубок/пластин, инфекции, декомпенсация роговицы, косоглазие и закупорка трубок [50,54,39]. Был описан ряд причин эрозии трубок/пластин, включая воспаление, вызывающие разрушение трансплантата, чрезмерное напряжение или механическое трение ткани, плохую перфузию и ишемическое повреждение конъюнктивы [54,39,45,86].

Хирургическое вмешательство, с использованием трансплантата, в основном, требуется для лечения или профилактики данных осложнений. Различные авторы успешно продемонстрировали использование аутологичной [95] или человеческой донорской склеры [48], перикарда, твердой мозговой оболочки [89], донорской роговицы [42], подслизистой тонкой кишки свиньи [68], политетрафторэтилена [55], биоразлагаемых

имплантатов в качестве трансплантатов, применяемых в хирургическом лечении глаукомы.

Новые методы, такие как использование трансплантатов для увеличения площади поверхности пластины и поперечная сшивка коллагена роговицы для реконструкции переднего сегмента, открывают новые возможности в хирургическом лечении глаукомы [89].

Quaranta и другие использовали перикардальный трансплантат крупного рогатого скота во время выполнения процедуры имплантации Клапана Ахмеда у 20 пациентов. Перикардальную мембрану разрезали с использованием обычного трепана для роговицы глаза, переднюю часть трубки покрывали трансплантатом и закрепляли на месте с помощью фибринового клея. В течение 24 месяцев наблюдения не было замечено конъюнктивальной эрозии, разрушения перикардального трансплантата и признаков эндофтальмита [76].

Перфорация роговицы – это экстренная ситуация, которая требует своевременного закрытия, в целях предотвращения потери зрения. В некоторых случаях из-за отсутствия доноров роговицы, немедленная кератопластика является невозможной. Следовательно, необходимо воспользоваться альтернативной тканью или материалом для герметизации или закрытия перфораций до появления донорской роговицы. При небольших перфорациях ($d < 2,0$ мм) часто эффективен тканевой клей; при больших перфорациях ($d > 2,0$ мм) обычно требуется заплатка. В качестве заплатки для закрытия крупных перфораций роговицы используется консервированный перикард крупного рогатого скота [58].

Консервированный человеческий перикард, твердая мозговая оболочка, аутологичный хрящ и фасция – это некоторые из обычных материалов, используемых для устранения перфораций роговицы [75].

Перикард крупного рогатого скота использовался в глазной хирургии для орбитальных имплантатов, для покрытия открытых устройств, используемых в дренажной хирургии глаукомы, и только недавно в качестве

импланта при перфорациях роговицы. Преимущества телячьего перикарда заключаются в его прочности и иммуногенной инертности.

Существуют данные об успешном использовании перикарда крупного рогатого скота для закрытия перфораций роговицы сроком до 12 недель, прежде чем была выполнена кератопластика с донорскими роговицами.

По результатам данного эксперимента, сделали вывод, что перикард крупного рогатого скота можно использовать в качестве эффективного и недорогого способа временного закрытия крупных перфораций роговицы до появления донорской [58].

1.3.3 Стоматология

В данной области перикард используют для изготовления биорезорбируемых барьерных мембран. В настоящее время существуют несколько производителей данных изделий.

Компания ООО «Кардиоплант» (г. Пенза) выпускает два вида коллагеновых барьерных мембран: Membrane Barrier и Membrane Barrier Fit. Это барьерные двухслойные коллагеновые мембраны на основе ксеноперикарда. Данные изделия обладают хорошими физико-механическими свойствами и умеренными растяжимыми свойствами. Функция данных мембран заключается в восстановлении мягких тканей и регенерации костной ткани [11].

Мембрана Jason от производителя Botiss (Италия) изготавливается из перикарда свиного происхождения и используется для регенерации зубной ткани. Она обладает широкой ветвящейся структурой, состоящей из отдельных слоев коллагена, образующих взаимосвязанную систему пор [80]. Данная мембрана обладает длительным барьерным эффектом, примерно в течение 12-24 недель. Плюс ко всему данное изделие обладает высокой эластичностью и прочностью [71].

Мембрана Bio-Gide от производителя GEISTLICH (Швейцария) – это биорезорбируемая коллагеновая мембрана, полученная из свиного коллагена, используемая для регенерации кости и мягких тканей. Она обеспечивает барьерную функцию, благодаря двухслойной структуре, и обладает хорошими данными по безопасности применения в области стоматологии [41].

Все описанные коллагеновые мембраны, изготовленные из перикарда природного происхождения, имеют положительные результаты по использованию в области стоматологии. Мембраны обладают необходимой скоростью биodeградации, хорошими физико-механическими и эластичными свойствами и быстрой биоинтеграцией. Они выполняют барьерную функцию и способствуют регенерации пародонтальной ткани.

1.3.4 Урология и гинекология

Применение ксеноперикарда, в рассматриваемой области, возможно в следующих случаях: нефроптоз, закрытие дефектов тазового дна, укрытия культы почек, протезирование стенки влагалища, реконструкция мочевого пузыря, Болезнь Пейрони.

Когда происходит серьезное поражение стенки мочевого пузыря или заметное снижение его сократительной способности, урологи обычно используют кишечник в качестве замены стенки слизистой оболочки. Однако такая цистопластика дополняется метаболическим ацидозом, рецидивирующей инфекцией мочевых путей и риском развития рака [92]. Поэтому было предложено при закрытии фистул мочевого пузыря использовать перикард крупного рогатого скота, благодаря его высокой прочности и минимальной склонности к воспалению [62].

Supple Peri-Guard®, используемый в этом случае, представляет собой телячий перикард, состоящий из многонаправленных волокон коллагена, сшитых глутаровым альдегидом. Supple Peri-Guard® обычно используется в

качестве протеза для хирургического ремонта дефектов мягких тканей, включая брюшную и грудную стенку, желудочные связки.

Исследования, по применению данного изделия в закрытии фистул мочевого пузыря, показали положительные результаты. Телячий перикард является подходящим имплантатом для замещения стенки мочевого пузыря [66].

Болезнь Пейрони характеризуется локальным фиброзом белочной оболочки полового члена, приводящим к укорочению полового члена за счет искривления и развитию эректильной дисфункции [14].

Javier Romero Otero и др. в своем исследовании предлагают использование перикардialного трансплантата фирмы Peri-Guard, для исправления данного дефекты. В результате проведенного ими эксперимента, было выяснено, что материал является безопасным и эффективным, что делает перспективным его применение при Болезни Пейрони [72].

Ксеноперикардialная пластина компании ООО «Кардиоплант», о которой уже упоминалось выше, также находит широкое применение в данной области. Пластина представляет собой ферментативно обработанные листы телячьего перикарда. Применение изделия зависит от вида хирургической операции. Пластина имеет две поверхности: гладкую и ворсинчатую. Гладкая поверхность препятствует адгезии, а ворсинчатая активно срастается с тканями организма.

Данное изделие имеет большое число преимуществ, по сравнению с синтетическими материалами, чем обуславливается его применение при нефроптозе с хорошим функциональным результатом [21].

Также есть примеры использования ксеноперикардialной пластины в закрытие дефектов тазового дна. Гладкую поверхность пластины предварительно обрабатывают противоспаечным гелем. Фиброзную поверхность пластины ориентируют к мягким тканям промежности. Адаптируют пластину по размеру дефекта, создавая умеренное натяжение, избегая складок. Отсекают избыток пластины и дополнительно фиксируют ее

по периметру непрерывным швом нерассасывающейся нитью. Ушивают ишиоректальную клетчатку и кожу промежности. Способ обеспечивает восстановление анатомической целостности диафрагмы таза, уменьшает риск послеоперационных осложнений при сокращении времени проведения пластики за счет оптимизации тканевой регенерации [Патент № 2636417 РФ, МПК А61L27/58 А61В17/00. Способ закрытия дефекта тазового дна после экстралеваторной брюшно-промежностной экстирпации прямой кишки с использованием пластины ксеноперикардальной "Кардиоплант" / Клычева О.Н., Шинкарев С. А., Латышев Ю. П.; Оpubл. 23.11.2017].

1.4 Сшивающие агенты

Наиболее часто используемыми сшивающими агентами являются альдегидные соединения (глутаровый альдегид, формальдегид), карбодиимиды, эпоксисодержащие вещества, генипин, субериновая кислота и др [56].

Подробнее рассмотрим глутаровый альдегид, так как его наиболее часто используют при сшивании коллагеновых матриц, таких как телячий перикард или свиные клапаны, для увеличения их механических и биологических свойств, с целью применения в сердечно-сосудистой области [98].

Глутаровый альдегид (ГА), линейный, 5-углеродный диальдегид, представляет собой прозрачную, бледно соломенную, едкую маслянистую жидкость, растворимую во всех пропорциях в воде и спирте, а также в органических растворителях. Он, в основном, доступен в виде кислых водных растворов (рН 3,0-4,0) с концентрацией от менее 2% до 70%. Глутаральдегид обладает большим успехом применения из-за его коммерческой доступности, низкой стоимости и высокой реактивности. Он быстро реагирует с аминогруппами при нейтральном рН и более

эффективен, чем другие альдегиды, при получении термически и химически стабильных сшивок [65].

1.4.1 Химизм процесса сшивки

Глутаральдегид используется в течение нескольких десятилетий в качестве эффективного сшивающего агента в таких областях применения, как фиксация образцов для цитохимии и электронной микроскопии, иммобилизация ферментов и целых клеток, стабилизация кристаллов белка для рентгеновской кристаллографии. Несмотря на свою широкую применимость и высокую эффективность в качестве сшивающего агента, механизм и химизм этого процесса до конца не понятен [94].

Поведение глутарового альдегида в водных растворах интенсивно изучалось. Согласно накопленным данным, глутаровый альдегид подвергается полимеризации в щелочных растворах в процессе, включающем конденсацию альдола, и в результате получается смесь полимерных цепей, состоящих из $-\text{CH}=\text{C}(\text{CHO})$ -группы [65].

Хотя во время сшивания молекул белка, глутаральдегид или его продукты полимеризации могут взаимодействовать с несколькими функциональными группами, присутствующими на поверхности белка, например аминами, тиолами, фенолами и имидазолами, в его сшивающем эффекте преобладают реакции с ε -аминогруппами лизиновых остатков.

Предложенные механизмы реакции сшивания мономерной формы глутаральдегида с этими ε -аминовыми группами, включают нуклеофильную атаку на альдегидные группы с образованием неконъюгированных Шиффовых оснований (Рис.1а), которые считаются неустойчивыми в кислых условиях. При проведении реакции сшивания, при щелочном pH, мономерный глутаровый альдегид полимеризуется (Рис.1b). Было высказано предположение, что полученный полимерный глутаровый альдегид может влиять на сшивание посредством двух реакций: (I) образование основания

Шиффа между его альдегидными группами и ϵ -аминогруппами белков и (II) добавление других ϵ -аминогрупп к двойной связи, сопряженной с альдегидными группами полимерного глутаральдегида (Рис.1с) [94].

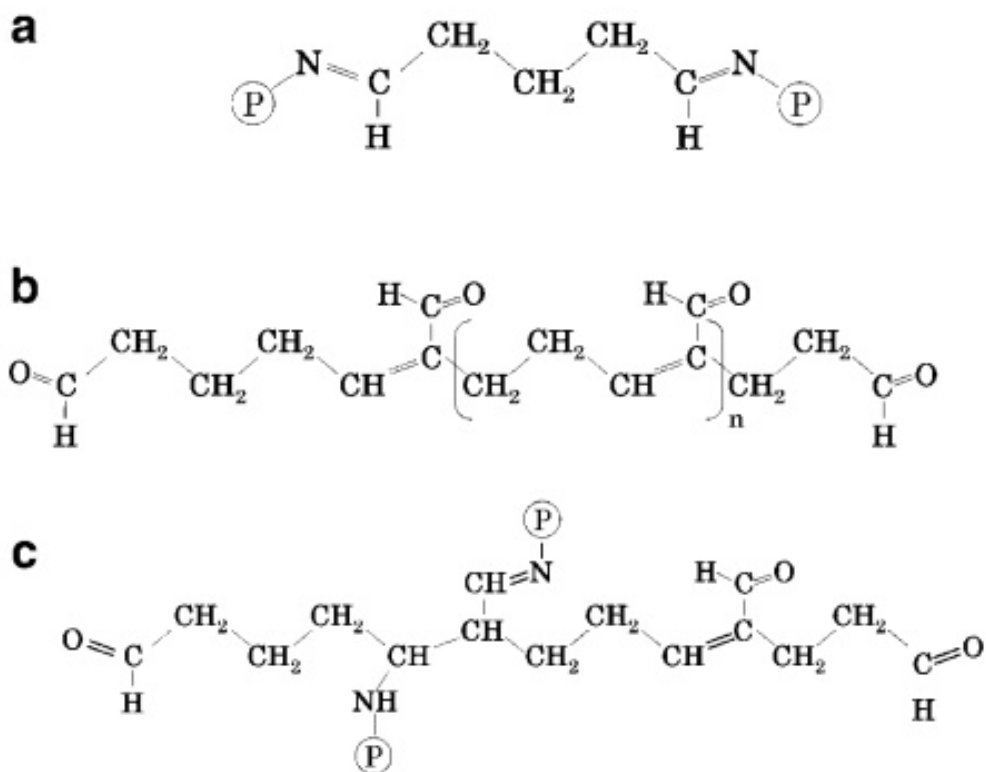


Рисунок 1. а. Образование основания Шиффа, полученное путем сшивания лизиновых остатков от двух белковых молекул глутаровым альдегидом. б. Структура полимерного глутаральдегида. с. Предлагаемый конечный продукт, полученный из реакции между полимерным глутаровым альдегидом и лизиновыми остатками из сшитых белков

1.4.2 Механизм кальцификации ГА-фиксированной ткани

Все природные ткани, включая перикард, могут вызывать воспалительный и иммунный ответ хозяина. Для борьбы с этими неизбежными событиями, перикардальную ткань обычно консервируют в глутаровом альдегиде, который химически сшивает молекулы коллагена ткани. Этот процесс сшивания эффективен для стабилизации ткани против

химического и ферментативного разложения, а также для уменьшения проявления антигенных детерминант [44].

Однако ГА-фиксированные биопротезы подвержены кальцификации, после долговременной имплантации у людей, и это один из ограничивающих факторов долговечности биопротезов [61].

Механизм кальцификации ГА-фиксированной биопротезной ткани является сложным. Существуют данные о том, что важную роль в нем играют тканевые фосфолипиды, свободные альдегидные группы ГА и остаточная антигенность биопротезной ткани [84,59,63]. Фосфор, в основном, в виде связанных с клеточной мембраной фосфолипидов, может связывать кальций и служить в качестве нуклеаторов образования кристаллов фосфата кальция. Остаточные несвязанные альдегидные группы ГА могут задерживать кальций в плазме, способствуя кальцификации тканей [61].

Были исследованы различные способы удаления тканевых фосфолипидов или свободных альдегидных групп, и снижения антигенности биопротезной ткани, чтобы предотвратить кальцинирование биопротезов. Этанол или другие спиртовые растворы использовали для извлечения тканевых фосфолипидов [61,74], для удаления свободных альдегидных групп ГА использовали различные аминокислоты или другие аминосоединения [57,91]. Модификации метода фиксации с использованием высококонцентрированной ГА оказались эффективными в предотвращении кальцификации, по-видимому, путем подавления остаточной антигенности биопротезной ткани [61].

1.5 Основные детергенты, используемы для децеллюляризации

ГА-фиксированные клапаны, на основе биоматериала, выходят из строя в течение 12-15 лет после имплантации, что связано с кальцификацией и дегенерацией ткани [88]. В последние 15 лет для предотвращения

появления данных осложнений предлагают различные методы децеллюляризации [1].

Децеллюляризация — это процесс, направленный на удаление клеток из ткани с сохранением внеклеточного матрикса [10]. Основной задачей децеллюляризации является устранение клеток и клеточного дебриса при полном сохранении структуры экстрацеллюлярного матрикса и его биофизических свойств.[18].

Для проведения децеллюляризации могут использоваться различные способы: физические, ферментативные и химические. Под физическими подразумеваются: механическое воздействие, циклы замораживания-оттаивания, обработка ультразвуком. При ферментативном используются трипсин, эндонуклеазы, экзонуклеазы. Каждый химический агент воздействует на ткань определенным образом [10].

Детергенты, используемые большинством исследователей, включают в себя анионные (SDS – додецилсульфат натрия), цвиттерионные (SDC – дезоксихолат натрия, натриевая соль дезоксихолиевой кислоты), неионные (Тритон X-100, bigCHAP), ферменты (трипсин), а также большое число других реагентов [18].

1.5.1 Додецилсульфат натрия

Додецилсульфат натрия (*sodium dodecylsulphate, SDS*) [греч. *dodeka* — двенадцать и лат. *sulphur* — сера; греч. *nitron* — сода] — натриевая соль додецилсульфоукислоты, анионактивное поверхностно-активное вещество, получаемое сульфатированием алифатических спиртов; сильный анионный детергент, который связывается с белками и маскирует собственный заряд белковых молекул (Рис. 2) [33].

Додецилсульфат натрия является анионным детергентом, который может модифицировать биопротезную ткань различными способами,

включая, экстрагирование различных компонентов липидов или белков, денатурацию белка или модификацию заряда [53].

Данный детергент используют для предотвращения кальцификации материала. Ингибирующее действие SDS на процессы кальциноза биоткани связывают с почти полной экстракцией фосфолипидов из биопротезов, что, свою очередь, приводит к подавлению кальцификации [93].

При использовании додецилсульфат натрия для создания бесклеточных матриц сосудов многие исследователи отмечают удовлетворительные механические характеристики, хорошие результаты по удалению клеток и сохранению структуры экстрацеллюлярного матрикса [18].

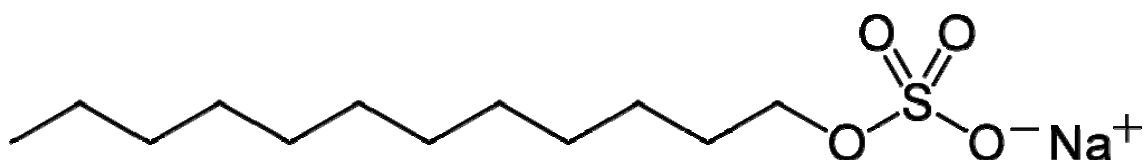


Рисунок 2. Формула додецилсульфата натрия

1.5.2 Дезоксихолат натрия

Дезоксихолат натрия (SDC) — производное желчных кислот — образуется из холиевых кислот в кишечнике при помощи энзимов кишечных бактерий. В биохимических производствах применяется как водорастворимый ионный детергент, используемый для лизиса клеточных мембран (Рис. 3) [18].

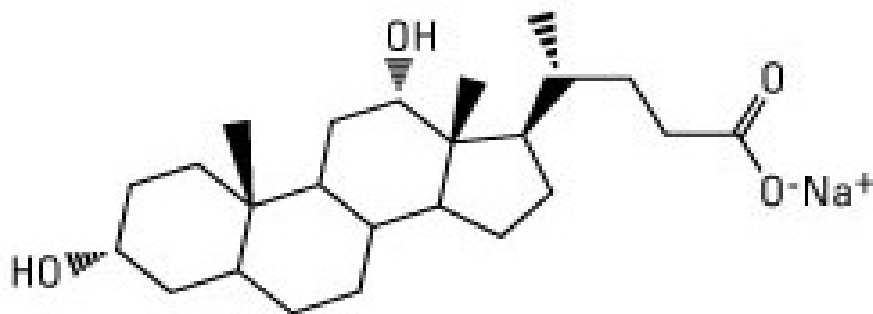


Рисунок 3. Формула дезоксихолата натрия

В последнее десятилетие появилось большое количество протоколов, сообщающих об успешном применении этого детергента для производства бесклеточных матриц. Впервые дезоксихолат натрия применил в практике С. Booth с соавт [43]. После этого, на фоне сообщений о недостатках применения других детергентов, использование SDC получило широкое распространение. Применение дезоксихолевой кислоты выглядит обнадеживающим и с точки зрения влияния ее на механические свойства ксенографтов [67].

1.5.3 Трипсин

Существует много работ посвященных использованию трипсина как детергента. В некоторых из них, показаны положительные результаты использования данного фермента [78]. Но во многих, авторы говорят о деструкции коллагеновых и эластиновых волокон, что приводит к кальцификации и сокращает срок службы клапана [18]. Кроме того, использование трипсина негативно влияет на репопуляцию клапана клетками хозяина как *in vitro*, так и *in vivo*. Деструктивных эффект трипсина объясняется тем, что большую часть клапана составляет коллаген I типа, который в денатурированной форме является субстратом трипсина. Кроме того, трипсин разрушает нефибриллярные белки, гликозаминогликаны и

протеогликаны. Потеря гликозаминогликанов ведет к потере тургора тканей [82].

Использование ферментативного метода децеллюляризации показывает худшие результаты, по сравнению с использованием детергентов [18].

1.5.4 Тритон X-100

Тритон X-100 (октилфенилполиоксиэтилен) — неионный детергент, используемый в биохимических реакциях как вещество для солюбилизации мембран (Рис. 4) [18].

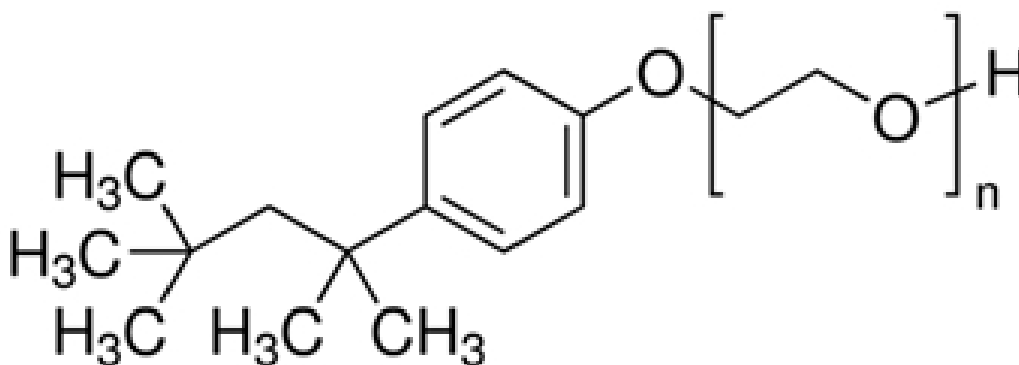


Рисунок 4. Формула Тритона X-100

При воздействии Тритон X-100 достигается практически полное отсутствие клеток на матриксе. Однако данный способ обработки губителен по отношению к эластическим волокнам матрикса, и, как следствие, вызывает потерю тканями возможности к растяжению. Также тритон оказывают пагубное влияние и на коллагеновые волокна, отвечающие в большей степени за прочность матрикса клапана. Кроме того, и трипсин, и Тритон X-100 отрицательно воздействует на состояние гликозаминогликанов, что приводит к деформации клапана и, как следствие, к нарушению реализации им своих функций [52].

Существуют данные, об использовании тритона X-100 совместно с додецилсульфатом натрия, которые показывают положительные результаты по удалению клеток и по сохранности структуры внеклеточного коллагенового матрикса [79].

1.6 Тканевый ответ на имплантацию

Количество хирургических операций, проводимых с использованием имплантатов, в последние годы постоянно увеличивается [32].

Имплантация – хирургическая операция вживления в ткани чуждых организму материалов [22]. Имплантация в организм любого чужеродного материала, в том числе биологических тканей, вызывает воспалительно-репаративную реакцию, которая является выражением защитной и репаративной функций соединительной ткани. Воспалительный процесс в окружающей ткани ведет к пролиферации фибробластов, которые продуцируют коллагеновые волокна и другие компоненты экстрацеллюлярного матрикса. Формируется соединительнотканная капсула, изолирующая инородное тело [36].

Воспаление – сложная эволюционно выработанная реакция организма, которая возникает в ответ на внедрение в организм механических, химических или бактериальных агентов, вызывающих более или менее выраженное повреждение тканей [37]. Воспаление, возникающее в ответ на имплантацию биоматериала, называют асептическим в отличие от септического, при котором в очаг воспаления попадают микробы и считают вполне допустимым [15].

Интенсивность воспаления зависит от степени биосовместимости имплантируемых материалов [20]. Именно поэтому биоматериалы, предназначенные для медицинской практики, обязательно проходят токсикологические и морфологические исследования в условиях, максимально приближающихся к их конкретному использованию [36]. При

наличии биосовместимости местная реакция на инородное тело зависит от поверхностных свойств материала, формы имплантата, соотношения между площадью поверхности биоматериала и объемом имплантата [20].

С 1994 г. под термином "биосовместимость" было предложено понимать способность материала, изделий или устройств выполнять свои функции и не вызывать отрицательных реакций в организме "хозяина" [30].

Биосовместимый материал не может быть полностью «инертным», каждое изделие медицинского назначения обладает определенной реактогенностью, т.е. вызывает реакцию окружающих тканей, и направленность реакции организма хозяина должна являться решающей в вопросах выбора материала при медицинском использовании. При имплантации биоматериалов, прежде всего, необходимо считаться с их возможным общим, генерализованным влиянием на организм в целом, а также функционированием удаленных от импланта органов и систем [26].

Биосовместимые материалы, которые предназначены для временного функционирования в организме, также должны обладать таким явлением, как контролируемая биодеструкция с образованием и удалением из организма биологически безопасных продуктов распада и постепенным замещением их естественными тканями [27].

Модифицируя свойства биоматериала (химические, поверхностные, физические и др.), можно вмешиваться в течение вызываемой ими реакции, приспособлявая ее к тем задачам, ради которых проводится имплантация биоматериала, тем самым, изменяя его биосовместимость [26].

На сегодняшний день существуют методы оценки биологического действия медицинских изделий, зафиксированные в ГОСТ 10993-2016.

В целом необходимо выделить следующие факторы, связанные с конструкцией имплантата, которые определяют его интегративную способность:

1. Общий объем имплантационного материала.
2. Общая площадь поверхности имплантационной конструкции.

3. Биосовместимость поверхности имплантационного материала.
4. Биомеханическая совместимость имплантационной конструкции и ее элементов.
5. Трехмерность конструкции [35].

1.7 Кальцификация

В России ежегодно увеличивается количество реконструктивных вмешательств на сердце и сосудах [4]. Использование биологических протезов лимитировано проблемой кальцификации. Одной из возможных причин, вызывающих данное осложнение, является использование раствора глутарового альдегида [17].

Кальцификация – это образование кальцийсодержащих отложений на поверхности или в объеме имплантируемых изделий. Зачастую это приводит к потере функциональных свойств протезов и необходимости повторных операций. В то же время данный процесс играет положительную роль в восстановительной хирургии костных тканей, когда кальцификации подвергаются имплантированные конструкции (штифты, протезы суставов и др.) [24].

Патологической кальцификации подвергаются искусственные материалы и изделия, используемые не только в сердечно-сосудистой хирургии, а также в офтальмологии, в урологии, при операциях на брюшной полости. Различают несколько видов патологической кальцификации, к основным из которых относятся метастатическая и дистрофическая. Метастатическая кальцификация связана с гиперкальциемией и гиперфосфатемией, в то время как дистрофическая кальцификация характеризуется отложениями солей кальция (в основном фосфатов) в местах повреждения или дегенерации тканей при нормальной концентрации в крови ионов кальция и фосфора. Полагают, что кальцификация инородных

поверхностей, контактирующих с кровью и мягкими тканями, является дистрофической.

Широкое клиническое применение протезов в сердечно-сосудистой хирургии определяет повышенный интерес к кальцификации материалов, контактирующих с кровью [28].

На накопление кальция влияет целый ряд факторов, в том числе и физико-химические свойства материала имплантата. С увеличением его гидрофобности и шероховатости увеличивается количество адсорбированных белков и липидов, а это влияет на избирательность к адсорбции и десорбции комплексов кальция [23].

Также вызывает интерес изучение химического состава кальцийсодержащих отложений, соотношение органических и неорганических компонентов в их составе и роли органической матрицы в процессе кальцификации. Так, при помощи трансмиссионной электронной микроскопии с применением декальцификации фиксированных срезов и последующей их окраски удалось обнаружить, что органический материал в кальцинированных отложениях состоит из структур, воспроизводящих форму и ориентацию растворенного кристалла, называемых «тенями кристалла». Во многих исследованных тканях «тень кристалла» обнаруживается в областях ранней кальцификации и в меньшей степени детектируется в районах полной кальцификации. Состав органических компонент зависит от типа минерализованных тканей. Основу кальциевых отложений составляют фосфаты кальция [24].

При исследовании причин и течения процесса кальцификации необходимо учитывать состав кальцийсодержащих отложений и их локализацию, которая бывает внутренней и внешней [83]. В первом случае отложения располагаются в толще материала, например, внутри коллагенового волокна (внутрифибрилярно), а при внешней локализации отложения формируются в межфибрилярном пространстве или на поверхности материалов. Существенную роль в месторасположении

отложений играют механические нагрузки, которым подвержен имплантат. Так, фосфаты кальция, как правило, обнаруживаются в местах интенсивных механических нагрузок независимо от типа биоматериала протеза. Это обусловлено, по-видимому, изменением энергетических характеристик поверхности при динамических нагрузках и появлением областей с возросшей внутренней энергией. При использовании для изготовления протезов материалов естественного происхождения возможно разрыхление структуры материала и повреждение самих волокон. Это сопровождается образованием так называемых «ловушек» для клеток или макрокомплексов, содержащих кальций, что в последующем стимулирует появление мест кристаллизации [25].

Кальцификация биоматериалов представляет собой сложный и многообразный процесс. Поэтому для его исследования привлекают различные физические, биохимические, иммунологические методы, используют эксперименты как в условиях *in vivo*, так и в условиях *in vitro* [28].

В настоящее время мировая наука предлагает ряд теоретических обоснований механизма кальцификации биоматериалов. Существуют теории, согласно которым ведущая роль в процессе физиологической и патологической кальцификации отводится клеткам. Предполагается, что [23] кальцификация начинается с гибели клеток. Некротическая гибель клеток приводит к локальному изменению концентрации кальция, фосфатов, белков, липидов, ферментов, что вызывает отложение растворимых форм фосфатов кальция и при определенных условиях переход их в нерастворимые. Помимо этого, гибель клеток способствует появлению в среде фрагментов клеточных мембран, образующих везикулы. Кристаллы фосфатов формируются внутри такой структуры, а места их адсорбции на поверхности имплантата служат центрами последующей кальцификации. Кроме того, с гибелью клеток связано и появление в районе кальцификации обогащенных кальцием митохондрий [7].

Чтобы исключить возникновение кальцификации трансплантатов, и как следствие их разрушение, в настоящее время, используются различные методы децеллюляризации ткани до имплантации [1].

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Способ получения биологического материала

В качестве материала для эксперимента, использовали два вида ксеноперикардальной ткани: свиного и телячьего происхождения.

Процесс обработки ксеноперикардальной ткани включает в себя первичную обработку, которая заключается в заборе материала, механической очистке и отбраковке, и химико-ферментативную обработку.

Процесс химико-ферментативной обработки ксеноперикарда является многостадийным. Суть его заключается в том, что ткань выдерживают определенное время в гипертонических растворах солей, и затем подвергают воздействию фермента. В результате, происходит полное разрушение клеточных элементов ткани, но при этом сохраняется коллагено-эластиновая структура. После завершения этапа химико-ферментативной обработки, проводится стабилизация материала сшивающим агентом – глутаровым альдегидом. Глутаровый альдегид используют в качестве сшивающего агента для улучшения биологических и механических свойств материала. За счет образования дополнительных сшивок между волокнами коллагена прочность материала повышается, а интенсивность его деструкции в организме реципиента снижается. Обработка полимерным глутаровым альдегидом проводится для снижения интенсивности кальцификации материала. Отмывка материала выполняется с помощью раствора додецилсульфата натрия, с целью удаления остатков химических реагентов, которые использовались для обработки материала. Стерилизация проводится в SV растворе, либо в растворе глутарового альдегида.

2.2 Гистологический контроль обработки

Целью гистологического исследования является подтверждение отсутствия клеточных элементов и сохранности коллагеновых и эластиновых волокон в полученном материале.

Гистологическое исследование мягких соединительных тканей состоит из следующих этапов:

- Подготовка образцов для гистологического исследования.
- Проводка фрагментов по возрастающим концентрациям спиртов и пропитка парафином с последующим изготовлением парафиновых блоков.
- Изготовление парафиновых срезов.
- Окрашивание гистологических срезов гематоксилин-эозином и по методу Вейгерт-Ван-Гизона.
- Заключение окрашенных срезов под покровное стекло.
- Изучение срезов под микроскопом в проходящем свете.

После проведения химико-ферментативной обработки образец биоматериала помещали в 4% раствор нейтрального формалина не менее, чем на 24 ч, после чего помещали в емкость с подведенной к ней холодной водопроводной водой, не менее чем на 6 ч. После этого приступали к изготовлению парафиновых блоков. При этом извлеченные из воды фрагменты погружали в емкость с 50% раствором этилового спирта на 4-6 ч, далее в емкость с 60% раствором этилового спирта на 4-6 ч, далее в емкость с 70% раствором этилового спирта на 8-12 ч, далее в емкость с 80% раствором этилового спирта на 8-12 ч, далее в емкость с 90% раствором этилового спирта на 8-12 ч, далее в емкость с 96% раствором этилового спирта на 12-24 ч. После этого помещали образцы в хлороформ на 1,5 часа. После извлечения фрагментов из хлороформа помещали их в смесь хлороформа с парафином в термостат при температуре 37°C на 3-6 ч (соотношение 1:1). Далее пропитывали фрагменты на водяной бане парафином при температуре 57°C

на протяжении 1,5 ч. Залитые фрагменты приклеивали к деревянным колодкам.

Для изготовления парафиновых срезов парафиновый блок зажимали в держателе микротомы, устанавливали на микротом нож и выставляли толщину среза на 5-7 мкм. Полученный срез переносили при помощи колющих игл в чашку Петри с теплой водой (38 ± 2)°С, далее на предметное стекло, предварительно обработанное смесью белка куриного яйца с глицерином. Высушивали стекло в термостате при температуре (38 ± 2)°С.

Перед проведением окрашивания проводили депарафинизацию срезов в орто-ксилоле, после чего выдерживали в спиртах с нисходящими концентрациями и доводили до воды (две порции ксилола – 3-5 минут, 96° этанол – 3 минуты, 80° этанол – 3 минуты, 70° этанол – 3 минуты, дистиллированная вода – 5 минут) [13].

2.2.1 Окрашка гематоксилин-эозином

Окрашивали срезы гематоксилином 7-10 минут, после чего промывали в дистиллированной воде 5 минут. Выдерживали в 1% растворе соляной кислоты на 70% этаноле до побурения срезов. Далее промывали дистиллированной водой, а затем слабым (0,5 %) раствором аммиака до посинения срезов. После этого окрашивали водным раствором эозина в течение 1 минуты. Далее образцы трехкратно промывали в дистиллированной воде для удаления избытка эозина, однократно в 70 % растворе этанола, двукратно в 96% этаноле для удаления воды из срезов. Экспозиция в каждой порции спирта – 2 минуты. Для просветления дважды промывали срезы в смеси расплавленного фенола и ксилола в соотношении 1:4 в течение 1 минуты. Окончательное обезвоживание срезов проводили промыванием ксилолом в течение 2 минут [13].

2.2.2 Окраска по методу Вейгерт-Ван-Гизона

Наносили на срез 10 капель раствора йодной кислоты на 5 мин. Промывали срезы в дистиллированной воде, после чего помещали срезы в раствор Вейгерта и инкубировали 12 часов. После промывания в дистиллированной воде наносили на срез 10 капель дифференцирующего кислотного буфера на 10 минут, промывали дистиллированной водой, наносили 10 капель железного гематоксилина Вейгерта 1 и добавляли 5 капель железного гематоксилина Вейгерта 2, оставляли на 10 минут. В течение 10 минут промывали образцы в проточной воде, далее наносили на срезы 10 капель пикрофуксина по Ван-Гизону, оставляли на 7 минут. Промывали срезы в дистиллированной воде. После погружали препараты в 70% раствор этилового спирта на 10 секунд, далее в 96% раствор этилового спирта на 2 мин. Далее препараты погружали в ксилол. После их извлечения помещали на предметное стекло, наносили на окрашенный срез 2 капли пихтового бальзама с последующим укрыванием его покровным стеклом.

Полученные гистологические стекла изучали с помощью микроскопа в проходящем свете [13].

2.3 Изучение кальцификации *in vitro*

Эксперименты *in vitro* по кальцификации биоматериалов и имплантатов привлекают для оценки склонности биоматериалов к кальцификации и возможности минерализации органических матриц при образовании природных кристаллов.

Моделирование кальцификации проводили в растворе, общим объемом 5 л, который содержал: 0,9% HCl (0,154 М), 1,15% KCl (0,154 М), 1,22% CaCl₂ (0,11 М), 2,11% KH₂PO₄ (0,154 М), 3,8% MgSO₄*7H₂O (0,154 М), 0,1 М фосфатный буфер, pH 7,4.

Из каждой группы материалов вырезали образцы, размером 2×2 см по 10 шт, их нанизывали на нить, делая прокол в центре, таким образом, чтобы они не касались друг друга. Нить с образцами погружали в раствор, фиксировали оба конца так, чтобы образцы не касались дна и стенок тары. Далее образцы инкубировали в данном растворе при температуре 37°C в течение 4 недель. Смена раствора производилась каждые 7 дней, также в раствор добавляли 2 ампулы гентамицина для предотвращения роста патогенной микрофлоры.

После извлечения из раствора, образцы высушивали до постоянной массы, определяли ее значение и затем подвергали их сухому озолению в муфельной печи при температуре 525°C. Далее остатки растворяли в 0,25 мл 1н соляной кислоты и в 0,25 мл 1н гидроксида натрия, с последующим количественным определением кальция в образцах с использованием наборов клинико-лабораторной диагностики. Метод основан на взаимодействии о-крезолфталейнкомплексона с кальцием в щелочной среде и образовании комплекса красно-фиолетового цвета, интенсивность окраски которого при 575 нм пропорционально концентрации кальция и измеряется фотометрически при длине волны 575 нм (560-580 нм) [12].

2.4 Изучение кальцификации in vivo

Экспериментальная работы была проведена на половозрелых самцах белых беспородных крыс. Средний вес животных составил 250-300 грамм. Животных содержали в стандартных условиях вивария при постоянном доступе к воде и пище, 12-часовой смене светового режима.

Для эксперимента из каждой группы отбирали 10 образцов примерно одинаковой толщины размером 10×10 мм. Упаковка производилась в асептических условиях.

Операцию проводили под ингаляционным наркозом (диэтиловый эфир). Образцы биоматериала имплантировались под кожу крысам в

карманы, сформированные вдоль средней линии спины, на время, равное 4 неделям. По истечении данного срока имплантаты удаляли и проводили анализ на количественное содержание кальция.

После извлечения образцы промывали в 0,9% растворе хлорида натрия, отделяли от соединительной ткани, высушивали в сушильном шкафу при 105°C до постоянной массы (24 часа). Далее образцы взвешивались на аналитических весах и подвергали сухому озолению в течение 6 ч в муфельной печи при 525°C . Далее остатки растворяли в 0,25 мл 1н соляной кислоты и в 0,25 мл 1н гидроксида натрия, с последующим количественным определением кальция в образцах с использованием наборов клинико-лабораторной диагностики.

2.5 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 $p < 0,05$ [19].

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЯ

3.1 Результаты получения биологического материала

Химико-ферментативная обработка материала проводилась с использованием фермента и гипертонических растворов солей, её целью являлось полное удаление клеточных элементов ткани, при этом коллагено-эластиновая структура должна была оставаться сохранной. Это необходимо для обеспечения хорошей биосовместимости материала с организмом реципиента и снижения его кальцификации. В результате данной обработки, мы получаем биматериал на основе ксеноперикардальной ткани, состоящий на 90%, от общего содержания белка, из коллагена типа I [38].

В эксперимент была использована ксеноперикардальная ткань крупного рогатого скота и свиньи.

Фото перикардальной ткани крупного рогатого скота и свиньи до химико-ферментативной обработки показаны на рисунках 5 и 6.



*Рисунок 5. Перикардальная ткань крупного рогатого скота до проведения
технологического цикла обработок*

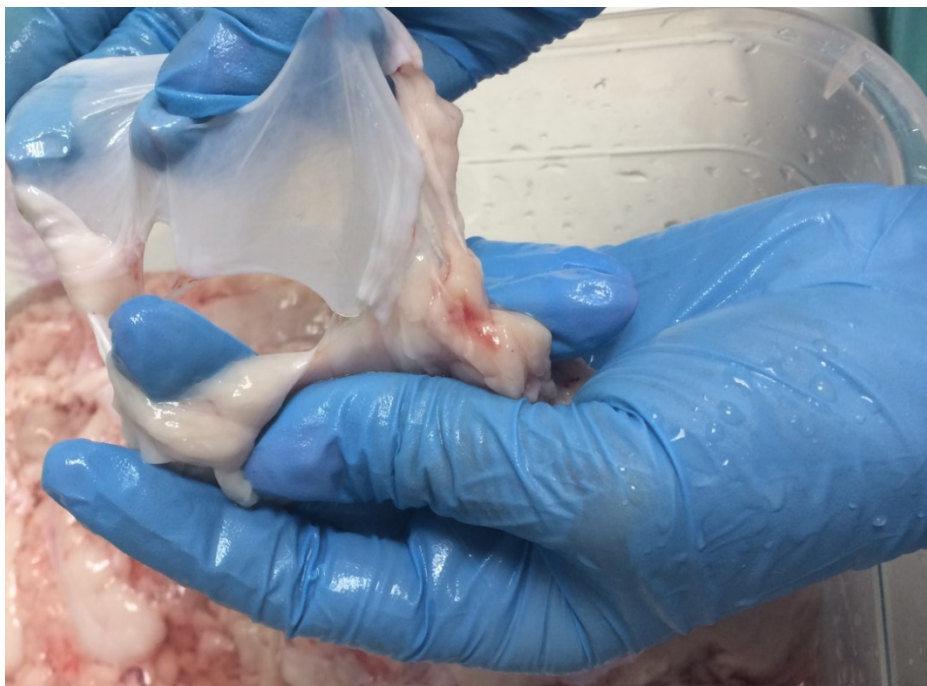


Рисунок 6. Перикардальная ткань свиньи до проведения технологического цикла обработок

Фото перикардальной ткани крупного рогатого скота и свиньи после химико-ферментативной обработки показаны на рисунках 7 и 8.

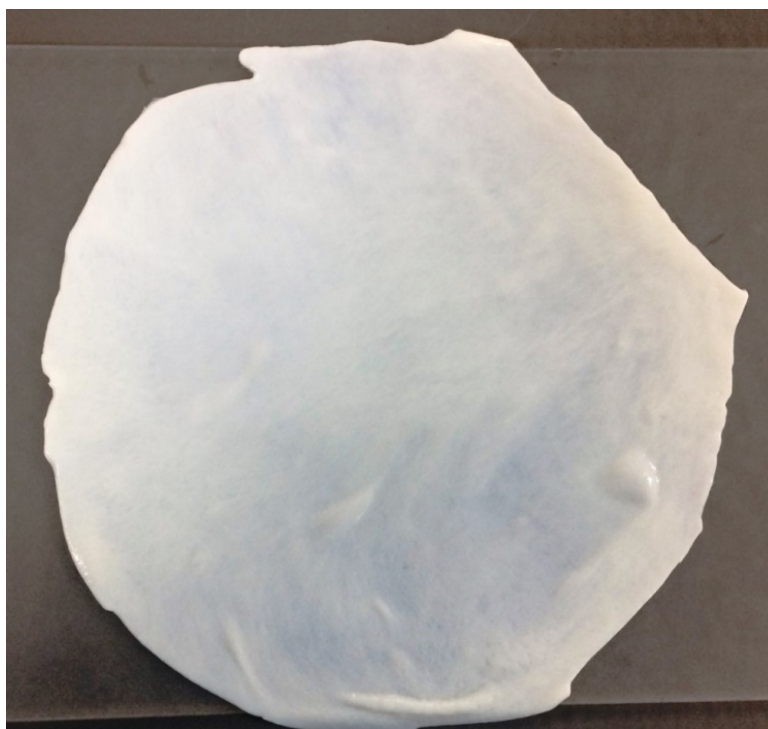


Рисунок 7. Перикардальная ткань крупного рогатого скота после проведения технологического цикла обработок

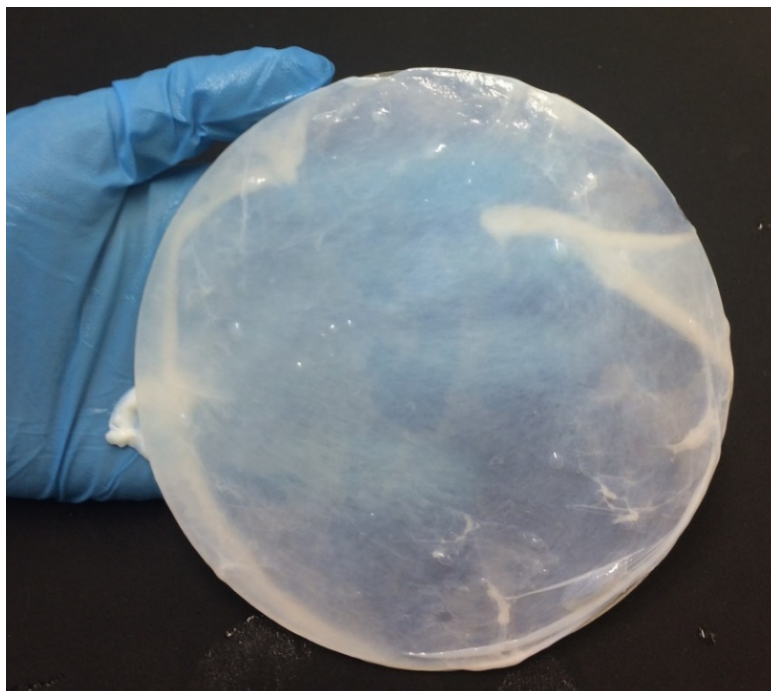


Рисунок 8. Перикардальная ткань свиньи после проведения технологического цикла обработок

Об эффективности прохождения этапа химико-ферментативной обработки, мы можем судить по результатам гистологического контроля материала.

3.2 Гистологическое исследование образцов

Гистологическое окрашивание производили двумя способами:

- окраска гематоксилин-эозином для обнаружения клеточных элементов;
- окраска по Вейгерт-Ван-Гизону для изучения структуры соединительной ткани.

Целью гистологического исследования является подтверждение того, что после проведения этапа химико-ферментативной обработки, произошло полное удаление клеточных элементов ткани, а структура коллагеновых и эластических волокон осталась без изменений.

Результаты гистологического контроля представлены на рисунках 9-12.

На рисунках 9 и 10 изображены ксеноперикардальная ткань крупного рогатого скота и свиньи до химико-ферментативной обработки. Присутствие клеточных элементов, мы можем отчетливо наблюдать на рисунках 9А, 10А, а на рисунках 9Б, 10Б показана нативная коллагено-эластиновая структура ткани.

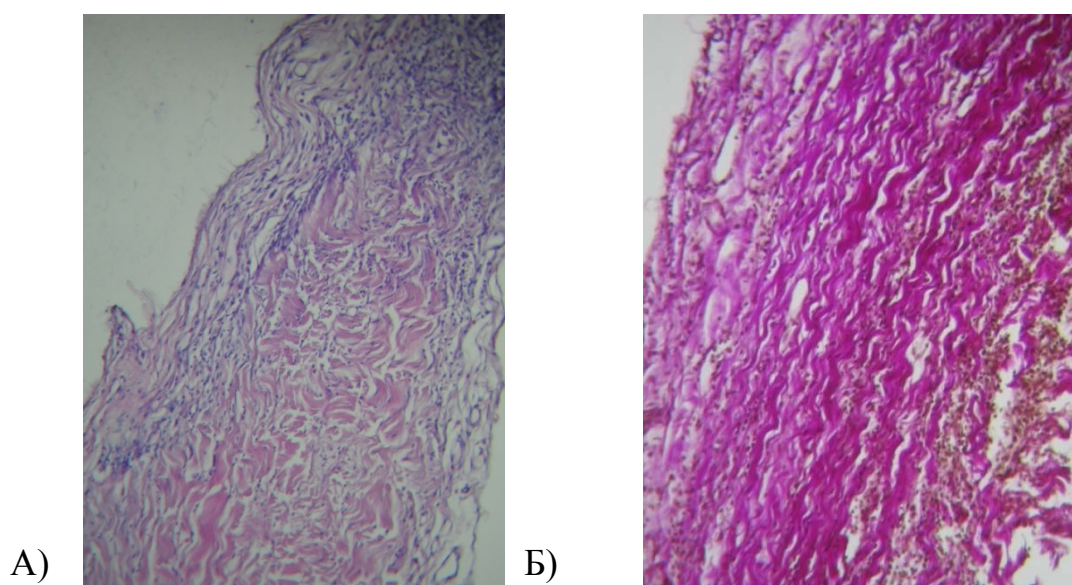


Рисунок 9. Ксеноперикардальная ткань крупного рогатого скота до химико-ферментативной обработки. А) Окраска гематоксилин-эозин, x200. Б) Окраска по Вейгерт-Ван-Гизону, x200

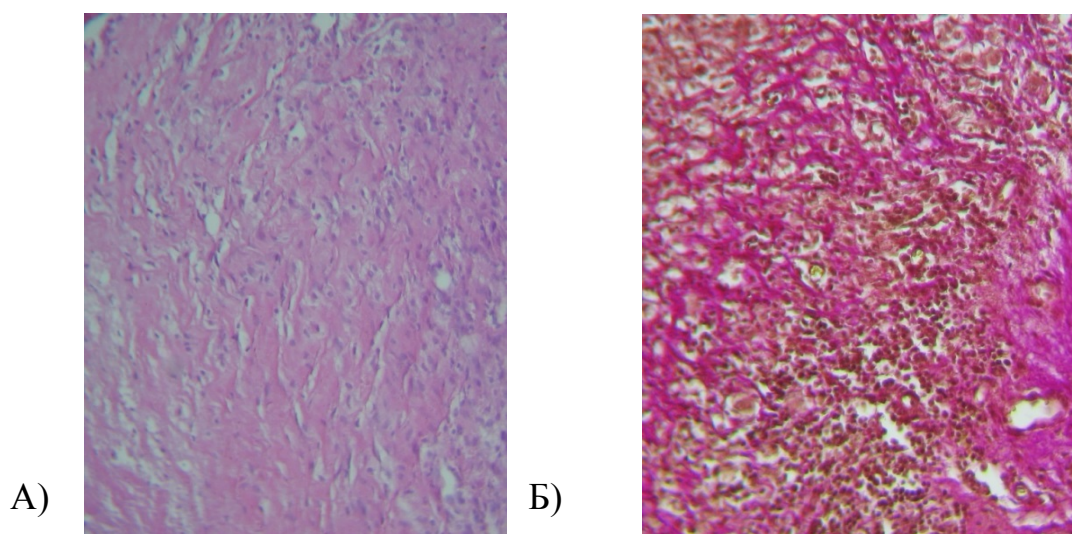


Рисунок 10. Ксеноперикардальная ткань свиньи до химико-ферментативной обработки. А) Окраска гематоксилин-эозин, x200. Б) Окраска по Вейгерт-Ван-Гизону, x200

На рисунках 11 и 12 показан материал, прошедший этап химико-ферментативной обработки. Данные изображения показывают полное отсутствие клеток (Рис. 11А, 12А) и сохранение коллагеновых и эластиновых волокон ткани после этапа обработки (Рис. 11Б, 12Б).

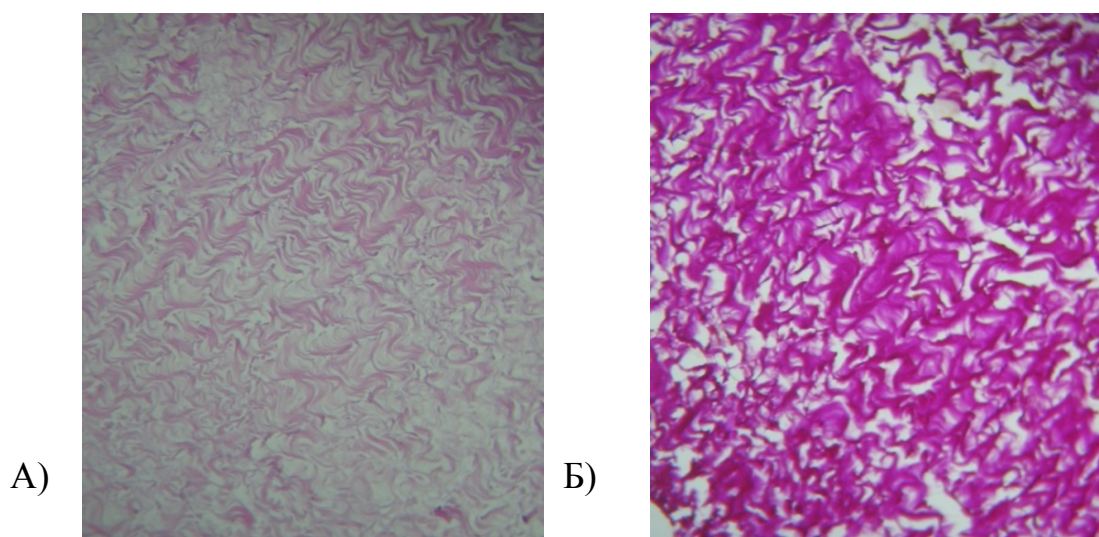


Рисунок 11. Ксеноперикардальная ткань крупного рогатого скота после химико-ферментативной обработки. А) Окраска гематоксилин-эозин, х200. Б) Окраска по Вейгерт-Ван-Гизону, х200

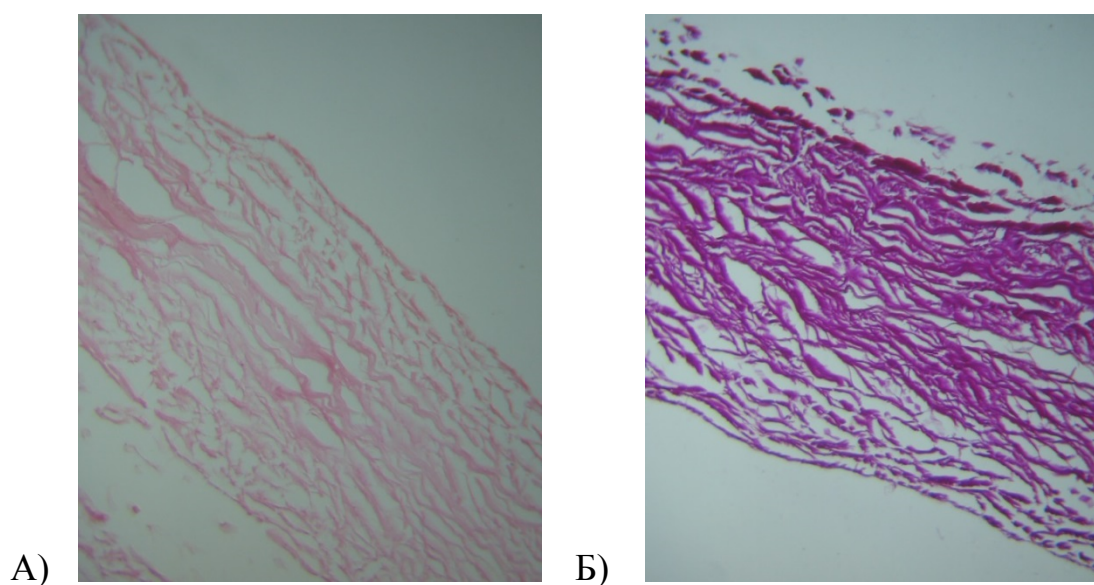


Рисунок 12. Ксеноперикардальная ткань свиньи после химико-ферментативной обработки. А) Окраска гематоксилин-эозин, х200. Б) Окраска по Вейгерт-Ван-Гизону, х200

По полученным результатам гистологического контроля можно сделать вывод, что с помощью проведенной химико-ферментативной обработки материала, удалось добиться полного удаления клеточных элементов, без нарушения коллагено-эластиновой структуры ткани.

Далее полученный материал на основе перикарда крупного рогатого скота и свиньи обрабатывали раствором полимерного глутарового альдегида, с последующей отмывкой в растворе додецилсульфата натрия. После данных операций, материал подвергался стерилизации. Раствор для стерилизации пропускали через бактериальный фильтр, с размерами пор 0,22 мкм, и оставляли в термостате при 37°C. Консервацию материала проводили в том же растворе.

На рисунках 13 и 14 показана ксеноперикардальная ткань после обработки глутаровым альдегидом.

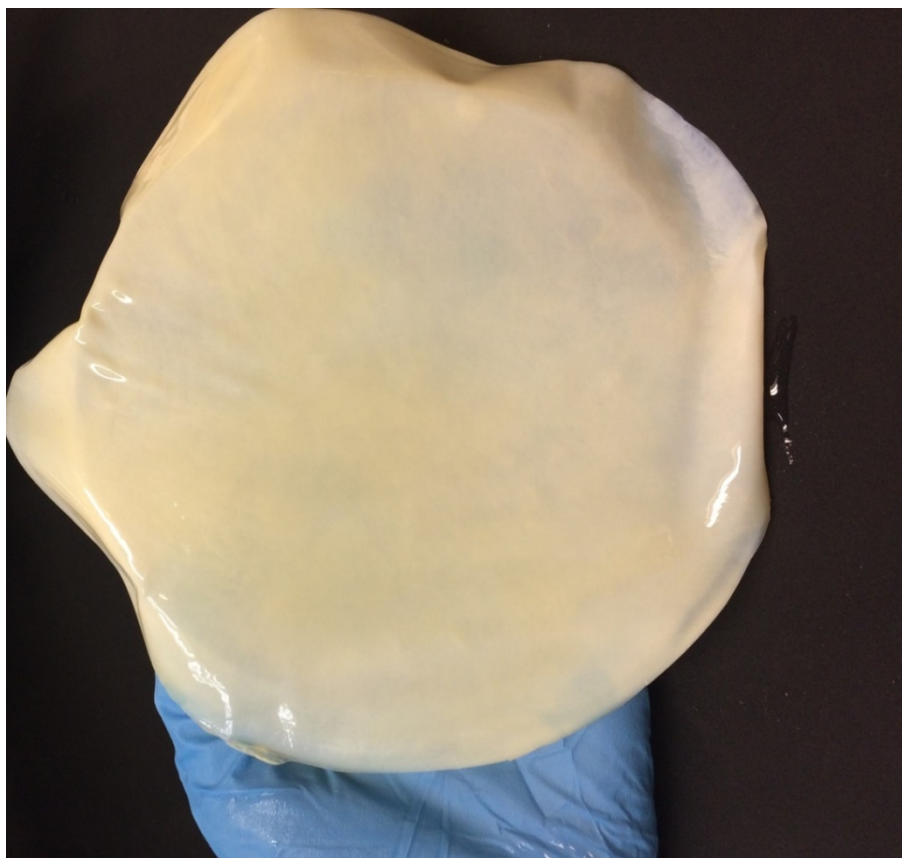


Рисунок 13. Ксеноперикардальная ткань крупного рогатого скота после обработки глутаровым альдегидом

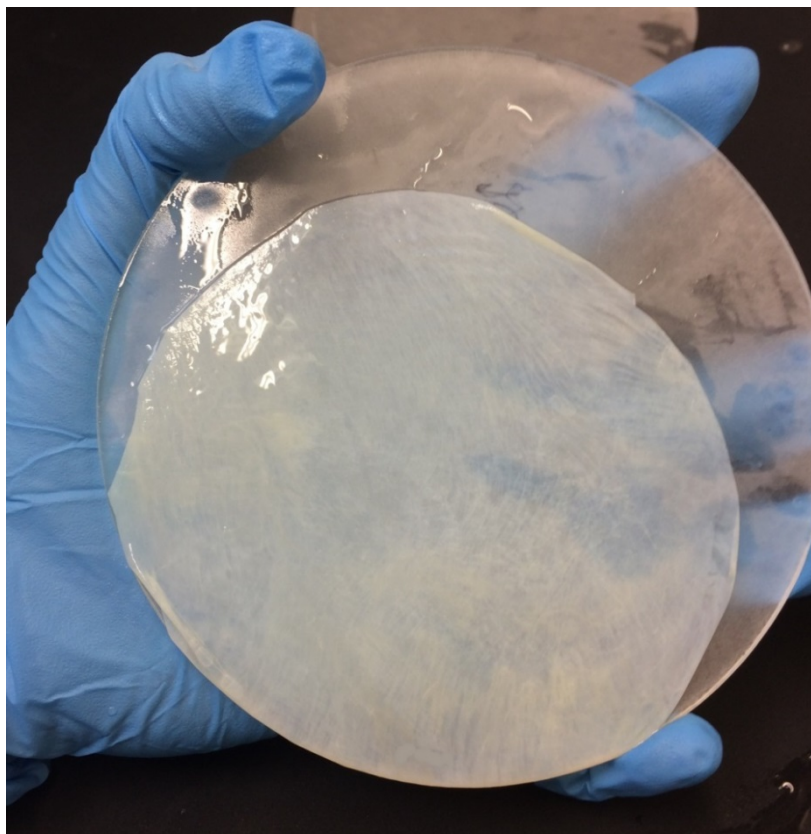


*Рисунок 14. Ксеноперикардальная ткань свиньи после обработки
глутаровым альдегидом*

В результате проведенных обработок, мы получили 8 групп материала на основе ксеноперикарда крупного скота, которые отличались между собой технологией обработкой и видом консервирующим раствором:

- 1) Говяжий перикард (обработка без полимерного глутарового альдегида, без отмывки в додецилсульфате натрия), стерилизация в SV растворе;
- 2) Говяжий перикард (обработка без полимерного глутарового альдегида, с отмывкой в додецилсульфате натрия), стерилизация в SV растворе;
- 3) Говяжий перикард (обработка без полимерного глутарового альдегида, без отмывки в додецилсульфате натрия), стерилизация в 0,25% глутаровом альдегиде;

4) Говяжий перикард (обработка без полимерного глутарового альдегида, с отмывкой в додецилсульфате натрия), стерилизация в 0,25% глутаровом альдегиде;

5) Говяжий перикард (обработка без полимерного глутарового альдегида, без отмывки в додецилсульфате натрия), стерилизация в 0,5% глутаровом альдегиде;

6) Говяжий перикард (обработка без полимерного глутарового альдегида, с отмывкой в додецилсульфате натрия), стерилизация в 0,5% глутаровом альдегиде;

7) Говяжий перикард (обработка с полимерным глутаровым альдегидом, без отмывки в додецилсульфате натрия), стерилизация в 0,5% глутаровом альдегиде;

8) Говяжий перикард (обработка с полимерным глутаровым альдегидом, с отмывкой в додецилсульфате натрия), стерилизация в 0,5% глутаровом альдегиде.

В результате проведенных обработок с материалом, на основе ксеноперикарда свиньи, также получилось 8 экспериментальных групп:

1) Свиной перикард (обработка без полимерного глутарового альдегида, без отмывки в додецилсульфате натрия), стерилизация в SV растворе;

2) Свиной перикард (обработка без полимерного глутарового альдегида, с отмывкой в додецилсульфате натрия), стерилизация в SV растворе;

3) Свиной перикард (обработка без полимерного глутарового альдегида, без отмывки в додецилсульфате натрия), стерилизация в 0,25% глутаровом альдегиде;

4) Свиной перикард (обработка без полимерного глутарового альдегида, с отмывкой в додецилсульфате натрия), стерилизация в 0,25% глутаровом альдегиде;

5) Свиной перикард (обработка без полимерного глутарового альдегида, без отмывки в додецилсульфате натрия), стерилизация в 0,5% глутаровом альдегиде;

6) Свиной перикард (обработка без полимерного глутарового альдегида, с отмывкой в додецилсульфате натрия), стерилизация в 0,5% глутаровом альдегиде;

7) Свиной перикард (обработка с полимерным глутаровым альдегидом, без отмывки в додецилсульфате натрия), стерилизация в 0,5% глутаровом альдегиде;

8) Свиной перикард (обработка с полимерным глутаровым альдегидом, с отмывкой в додецилсульфате натрия), стерилизация в 0,5% глутаровом альдегиде.

3.3 Результаты исследования кальцификации материалов *in vitro*

Существует теория о том, что на процесс кальцификации, помимо гибели клеток [23], существенное влияние оказывает глутаровый альдегид [17]. Предполагается, что несвязанные группы ГА могут связывать ионы кальция, тем самым способствуя его накоплению [61]. Имеются данные о некоторой зависимости интенсивности кальцификации от концентрации ГА.

Во время подготовки биоматериала, одной из стадий обработки является обработка полимерным глутаровым альдегидом. Полимерный глутаровый альдегид – это глутаровый альдегид, прошедший полимеризацию по механизму альдольной конденсации, в условиях щелочного катализа. Данный процесс обеспечивает необходимые дополнительные химические сшивки.

ПГА обеспечивает сшивание с помощью двух реакций: образование основания Шиффа между его альдегидными группами и ϵ -аминогруппами

белков и добавление других ε -аминогрупп к двойной связи, сопряженной с альдегидными группами полимерного глутаральдегида [94].

Также в обработке биоматериала предполагается использование детергента додецилсульфата натрия для улучшения отмывки материала.

Поэтому необходимо исследовать влияние ПГА и SDS на интенсивность процесса кальцификации. Так как данный процесс ограничивает время функционирования клапана и приводит к разрушению имплантата [17].

Полученные, в результате эксперимента, значения содержания кальция в образцах говяжьего перикарда до и после инкубации в растворе для моделирования кальцификации представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Значения содержания кальция в образцах говяжьего перикарда до и после моделирования кальцификации in vitro ($M \pm m$, $n=10$)

Группа	До инкубации, мг $[Ca^{2+}]$ на г ткани	Инкубация 4 недели, мг $[Ca^{2+}]$ на г ткани
1	25,48 $\pm$ 1,35	85,72 $\pm$ 9,44
2	25,4 $\pm$ 1,5	84,9 $\pm$ 10,4
3	25,54 $\pm$ 1,41	84 $\pm$ 10,53
4	25,5 $\pm$ 1,38	85,2 $\pm$ 10,53
5	27 $\pm$ 3,46	59 $\pm$ 5,8
6	27,4 $\pm$ 5,3	62,5 $\pm$ 5,5
7	25 $\pm$ 3,4	47,5 $\pm$ 4,8

Продолжение таблицы 1

Группа	До инкубации, мг $[Ca^{2+}]$ на г ткани	Инкубация 4 недели, мг $[Ca^{2+}]$ на г ткани
8	25,5±3,8	49,5±3,6

Результаты исследования по изучению кальцификации материала, на основе говяжьего перикарда, после инкубации в растворе для моделирования кальцификации в течение 4 недель, представлены на рисунках 15, 16.

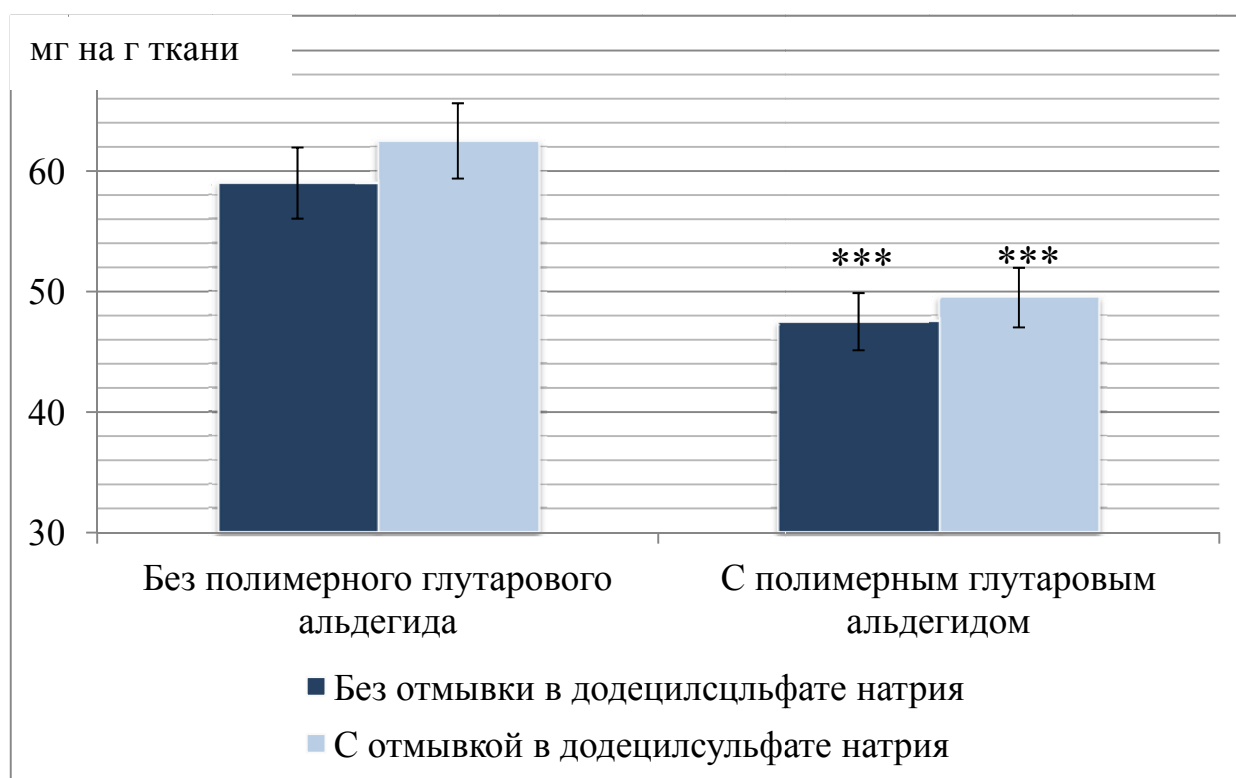


Рисунок 15. Содержание Ca^{2+} в образцах модифицированного ксеноперикарда крупного рогатого скота, после моделирования кальцификации *in vitro* (мг на г ткани, $M \pm m$, $n=10$). Здесь: *** – $p < 0,001$ относительно обработки без полимерного глутарового альдегида

По полученным данным, мы можем сделать вывод о том, что использование полимерного глутарового альдегида снижает интенсивность

кальцификации материала на 20%, относительно обработки без его использования. По-видимому, антикальцевое действие ПГА заключается в уменьшение числа центров связывания кальция за счет образования дополнительных сшивок при полимеризации глутарового альдегида.

В ходе исследования, не было выявлено статистически значимых различий в накоплении кальция в образцах биоматериала, обработанных додецилсульфатом натрия и без него.

Следующий этап обработки заключается в проведения процесса стерилизации материала и погружении в консервирующий раствор. Раствор для стерилизации пропускали через бактериальный фильтр, с размерами пор 0,22 мкм, и оставляли в термостате при 37°C. Консервацию материала проводили в том же растворе.

Для эксперимента было выбрано три вида раствора: SV раствор, 0,25% раствор глутарового альдегида, 0,5% раствор глутарового альдегида.

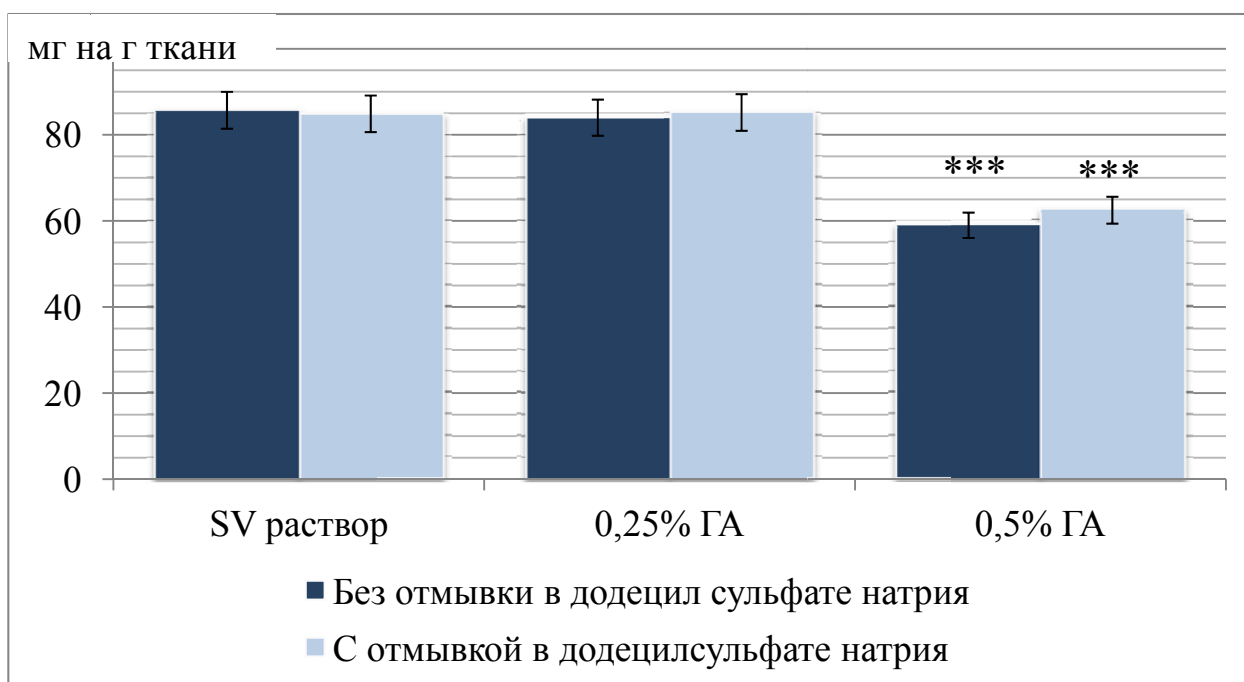


Рисунок 16. Содержание Ca^{2+} в образцах модифицированного ксеноперикарда крупного рогатого скота, после моделирования кальцификации *in vitro* (мг на г ткани, $M \pm m$, $n=10$). Здесь: *** – $p < 0,001$ относительно SV раствора

В ходе эксперимента, было выяснено, что консервация биоматериала, на основе говяжьего перикарда, в 0,5% растворе глутарового альдегида снижает процесс кальцификации на 29% относительно SV раствора. По полученным в ходе эксперимента данным, мы также можем сделать вывод, что высокие концентрации ГА снижают интенсивность кальцификации, по-видимому, путем подавления остаточной антигенности биопротезной ткани [61].

В ходе исследования, не было выявлено статистически значимых различий в накоплении кальция в образцах биоматериала, обработанных додецилсульфатом натрия и без него. Поэтому, можно предположить, что использование данного вещества в подготовке биоматериала, не влияет на интенсивность кальцификации.

Также, эксперимент проводился с биоматериалом на основе свиного перикарда. Здесь использовались аналогичные обработки. Полученные значения содержания кальция в образцах перикарда свиньи, до и после инкубации в растворе для моделирования кальцификации, представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Значения содержания кальция в образцах свиного перикарда до и после моделирования кальцификации in vitro ($M \pm m$, $n=10$)

Группа	До инкубации, мг $[Ca^{2+}]$ на г ткани	Инкубация 4 недели, мг $[Ca^{2+}]$ на г ткани
1	65,12 $\pm$ 5,54	194,52 $\pm$ 22,15
2	65,4 $\pm$ 5,5	194,9 $\pm$ 20,2
3	65,83 $\pm$ 6,41	175,3 $\pm$ 20,6
4	64,9 $\pm$ 5, 41	178,3 $\pm$ 20,33

Продолжение таблицы 2

Группа	До инкубации, мг $[Ca^{2+}]$ на г ткани	Инкубация 4 недели, мг $[Ca^{2+}]$ на г ткани
5	64,7±5,56	149±14,8
6	67,4±5,37	148,7±15,5
7	65,92±5,41	117,6±10,8
8	65,55±5,8	119,4±8,6

Результаты исследования по изучению кальцификации материала, на основе свиного перикарда, после инкубации в растворе для моделирования кальцификации в течение 4 недель, представлены на рисунках 17, 18.

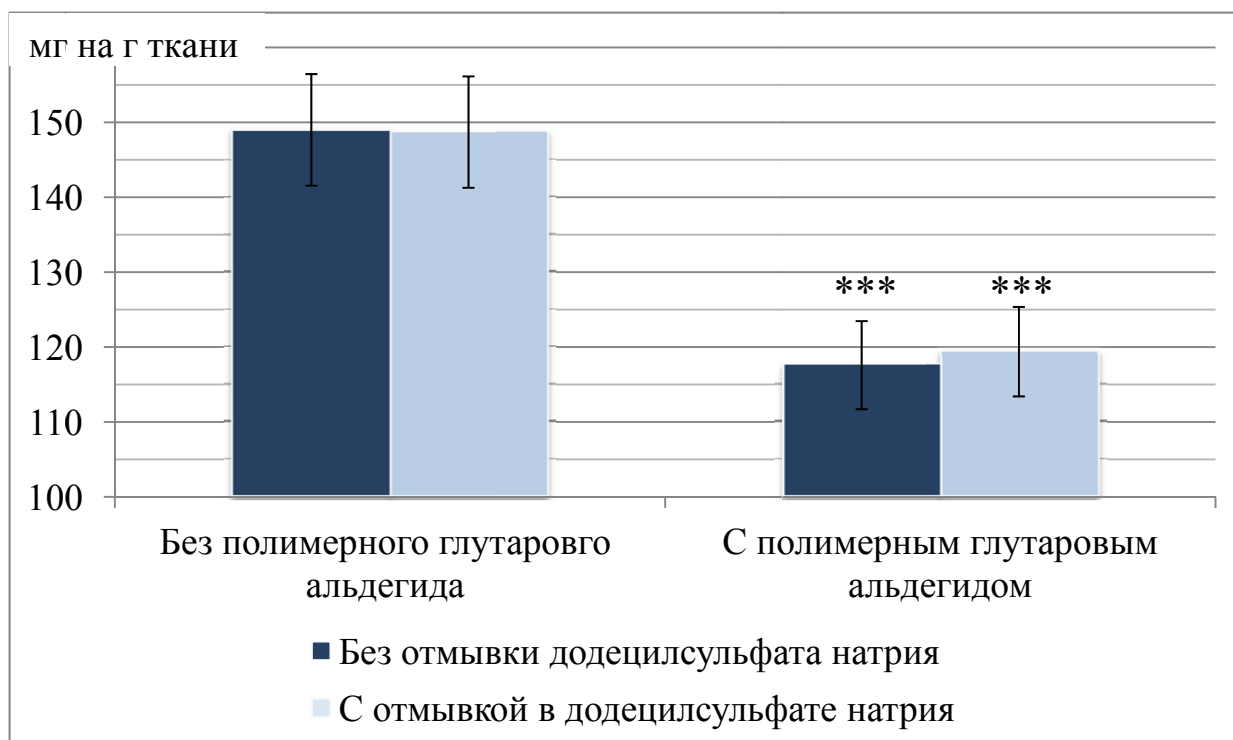


Рисунок 17. Содержание Ca^{2+} в образцах модифицированного ксеноперикарда свиньи, после моделирования кальцификации *in vitro* (мг на г ткани, $M \pm m$, $n=10$). Здесь: *** – $p < 0,001$ относительно обработки без полимерного глутарового альдегида

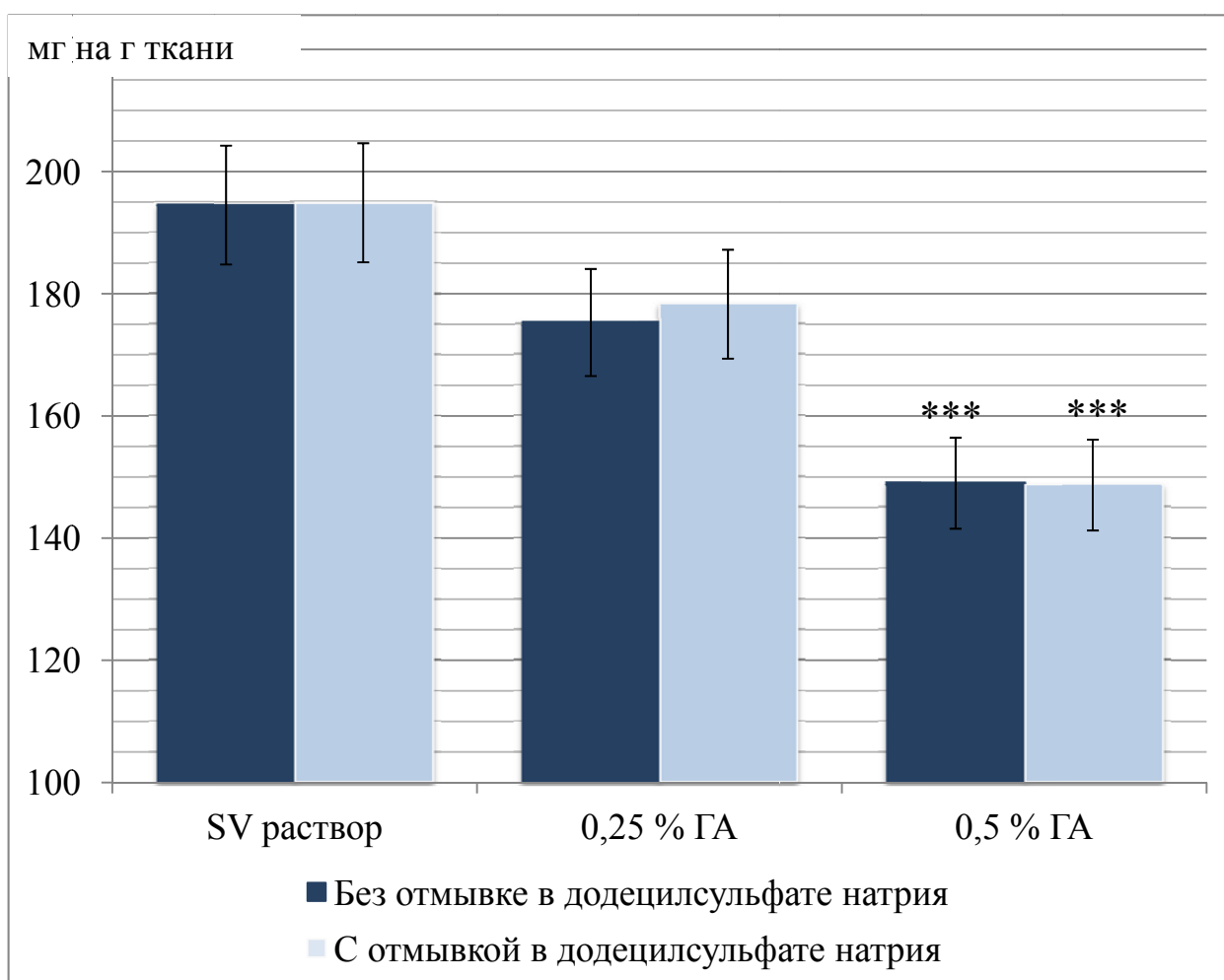


*Рисунок 18. Содержание Ca^{2+} в образцах модифицированного ксеноперикарда свиньи, после моделирования кальцификации *in vitro* (мг на г ткани, $M \pm m$, $n=10$). Здесь: *** – $p < 0,001$ относительно SV раствора*

В результате экспериментов, проведенных с образцами свиного перикарда, мы также можем сделать вывод, о том, что использование полимерного глутарового альдегида, в качестве агента для антикальцевой обработки, снижает уровень кальция в материале на 20% относительно обработки без него. Влияние обработки раствором додецилсульфата натрия на процесс кальцификации не обнаружено. А высокие концентрации глутарового альдегида снижают интенсивность кальцификации примерно на 23%, относительно результатов в SV растворе.

3.4 Результаты исследования кальцификации материалов *in vivo*

Показано, что биохимические и морфологические особенности образующихся кальцийсодержащих отложений в образцах биоматериалов, имплантируемых под кожу крысам и кроликам, аналогичны таковым для протезов сосудов или клапанов, имплантируемым ортотопически в экспериментальных или клинических условиях [28]. Поэтому, существует необходимость проведения экспериментов *in vivo*, с целью получения максимально достоверных данных о реакции ткани.

Была проведена имплантация материалов, на основе ксеноперикарда крупного рогатого скота и свиньи, под кожу крысам, в карманы, сформированные вдоль средней линии спины. Срок имплантации составил – 4 недели.

В данном эксперименте использовались аналогичные группы образцов говяжьего и свиного перикарда.

Полученные, в результате эксперимента, значения содержания кальцификации в образцах говяжьего и свиного перикардов до и после имплантации представлены в таблицах 3 и 4.

*Таблица 3 – Значения содержания кальция в образцах говяжьего перикарда до и после моделирования кальцификации *in vivo* ($M \pm m$, $n=10$)*

Группа	До имплантации, мг $[Ca^{2+}]$ на г ткани	Имплантация 4 недели, мг $[Ca^{2+}]$ на г ткани
1	$25,48 \pm 1,35$	$60,1 \pm 5,8$
2	$25,4 \pm 1,5$	$61,3 \pm 6,2$

Продолжение таблицы 3

Группа	До имплантации, мг $[Ca^{2+}]$ на г ткани	Имплантация 4 недели, мг $[Ca^{2+}]$ на г ткани
3	25,54±1,41	59±6,4
4	25,5±1,38	60±5,41
5	27±3,46	45±5,4
6	27,4±5,3	43±4,7
7	25±3,4	38,4±2,8
8	25,5±3,8	37,6±2,5

Таблица 4 – Значения содержания кальция в образцах свиного перикарда до и после моделирования кальцификации in vivo ($M \pm m$, $n=10$)

Группа	До имплантации, мг $[Ca^{2+}]$ на г ткани	Имплантация 4 недели, мг $[Ca^{2+}]$ на г ткани
1	65,12±5,54	158,4±15,6
2	65,4±5,5	156,3±16,7
3	65,83±6,41	129±16,4
4	64,9±5, 41	126,7±15,78
5	64,7±5,56	115±10,7

Продолжение таблицы 4

Группа	До имплантации, мг $[Ca^{2+}]$ на г ткани	Имплантация 4 недели, мг $[Ca^{2+}]$ на г ткани
6	67,4±5,37	113,4±9,87
7	65,92±5,41	98,3±8,84
8	65,55±5,8	97,9±8,6

Результаты исследования по изучению кальцификации материала, на основе говяжьего и свиного перикардов, после проведения имплантации в течение 4 недель, представлены на рисунках 19-22.

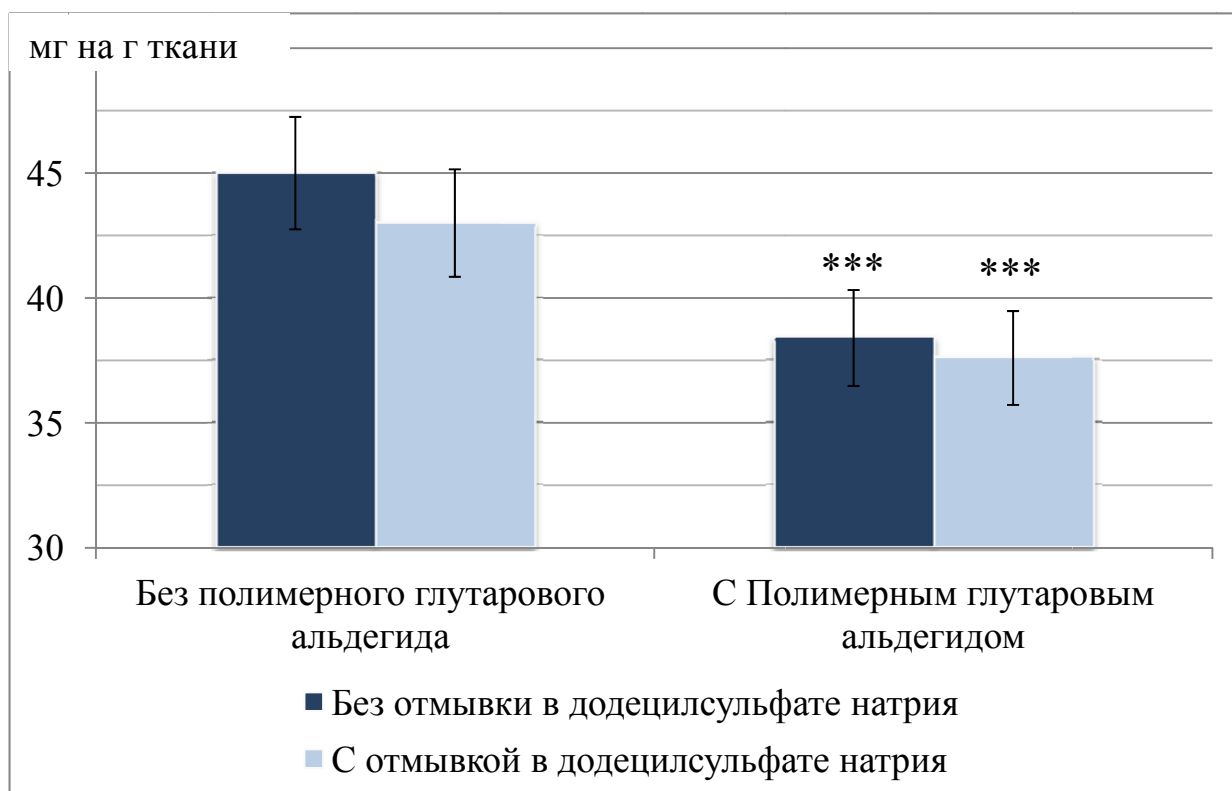


Рисунок 19. Содержание Ca^{2+} в образцах модифицированного ксеноперикарда крупного рогатого скота после моделирования кальцификации *in vivo* (мг на г ткани, $M \pm m$, $n=10$). Здесь: *** – $p < 0,001$ относительно обработки без полимерного глутарового альдегида

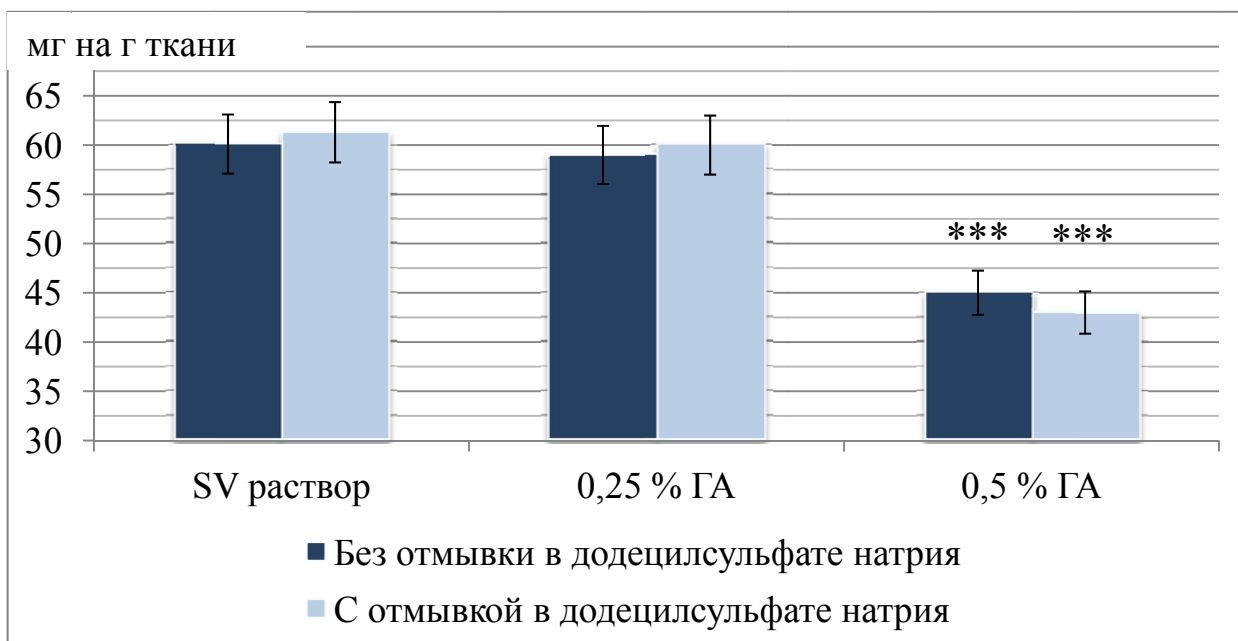


Рисунок 20. Содержание Ca^{2+} в образцах модифицированного ксеноперикарда крупного рогатого скота после моделирования кальцификации *in vivo* (мг на г ткани, $M \pm m$, $n=10$). Здесь: *** – $p < 0,001$ относительно SV раствора

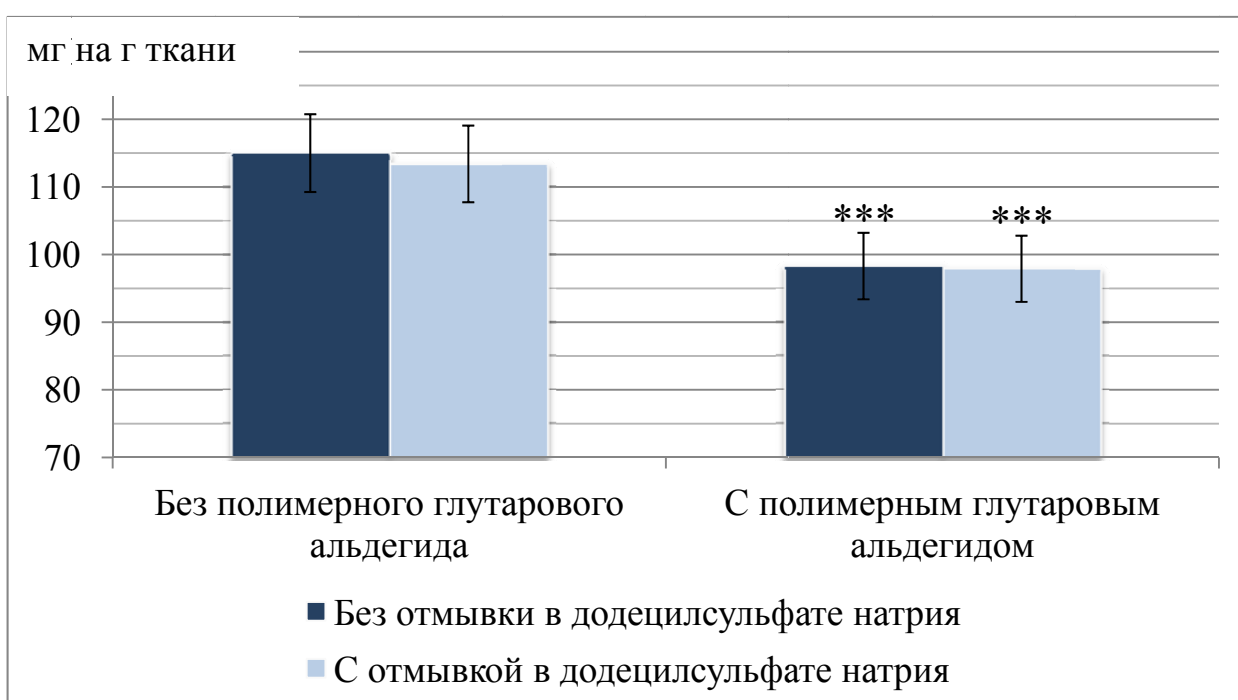


Рисунок 21. Содержание Ca^{2+} в образцах модифицированного ксеноперикарда свиньи после моделирования кальцификации *in vivo* (мг на г ткани, $M \pm m$, $n=10$). Здесь: *** – $p < 0,001$ относительно обработки без полимерного глутарового альдегида

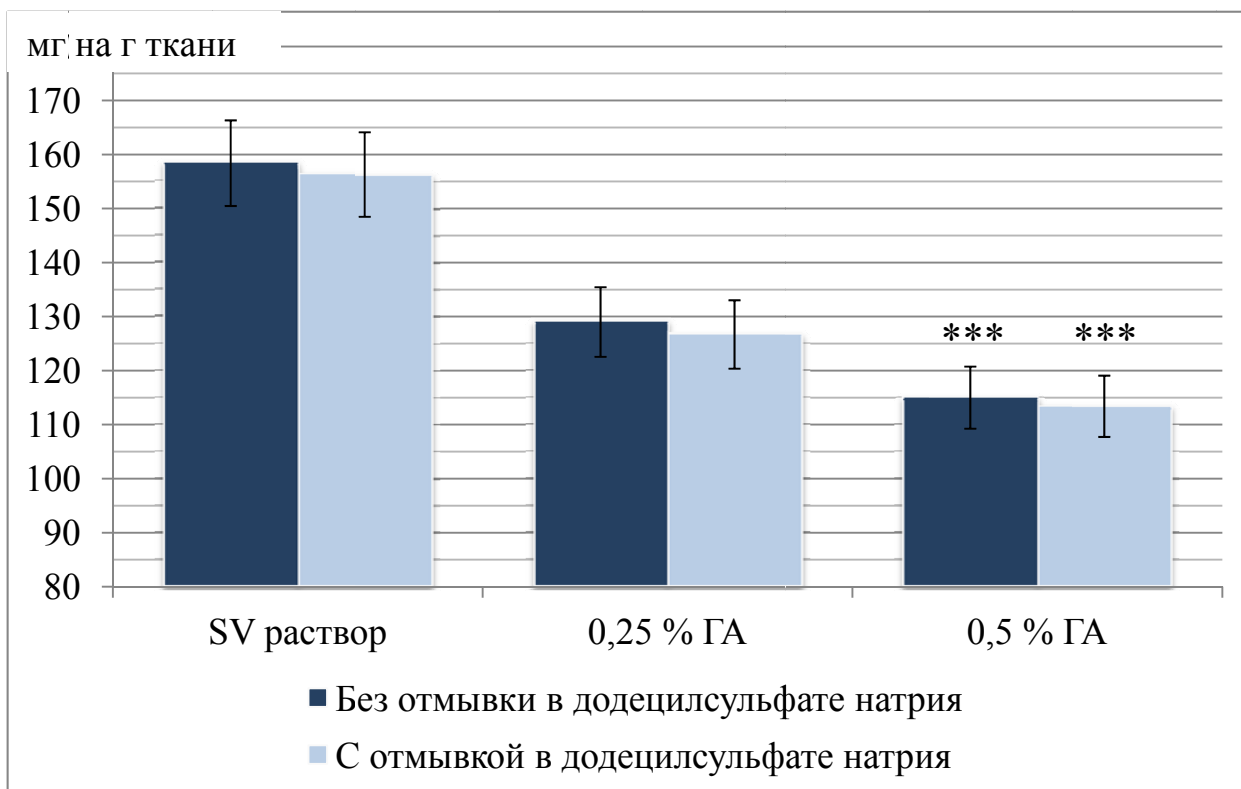


Рисунок 22. Содержание Ca^{2+} в образцах модифицированного ксеноперикарда свиньи после моделирования кальцификации *in vivo* (мг на г ткани, $M \pm m$, $n=10$). Здесь: *** – $p < 0,001$ относительно SV раствора

Полученные, при изучении кальцификации образцов *in vivo*, данные показали схожие результаты с экспериментом, проводимым *in vitro*.

Интересующие нас вещества, такие как полимерный глутаровый альдегид и додецилсульфат натрия проявляют себя так же, как и в эксперименте *in vitro*. Использование полимерное глутарового альдегида снижает интенсивность накопления кальция примерно на 14% как в случае с телячьим, так и со свиным перикардом. Обработка додецилсульфатом натрия не оказывает влияние на степень кальцификации материала.

Полученные данные еще раз доказывают, что 0,5% глутаровый альдегид влияет на снижения уровня кальцификации материала, примерно на 28% в эксперименте *in vivo*, как в случае с телячьим, так и со свиным перикардом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в ходе эксперимента нами были получены биоматериалы на основе тканей природного происхождения. Данный материал может найти широкое применение в различных областях медицины, особенно актуально его использование для изготовления биологических протезов клапанов сердца. Ксеноперикард проходит ряд обработок, с целью получения биосовместимого неиммуногенного материала с низкой способностью к кальцификации. Различные этапы обработки включают в себя, использование полимерного глутарового альдегида, в качестве агента для антикальцевой обработки, отмывку материала в растворе додецилсульфата натрия, и итоговую консервацию и стерилизацию в SV растворе и растворе ГА. Поэтому актуальным для нас являлось определение влияния данных веществ на интенсивность кальцификации.

Согласно результатам можно сделать следующие **выводы**:

- 1) Применение полимерного глутарового альдегида в обработке перикарда ксеногенного происхождения приводит к снижению уровня кальцификации;
- 2) Додецилсульфат натрия, который планируется применять для дополнительной очистки биоматериала, не оказывает существенного влияния на интенсивность кальцификации;
- 3) Применение в качестве стерилизующего и консервирующего раствора 0,5% глутарового альдегида способствует снижению кальцификации.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ГА – глутаровый альдегид

ПГА – полимерный глутаровый альдегид

SDS – додецилсульфат натрия

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. 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.
2. Барбараш, Л. С. Эволюция биопротезов клапанов сердца: достижения и проблемы двух десятилетий / Л. С. Барбараш, И. Ю. Журавлева // Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. – 2012. – № 1. – С. 4-11.
3. Баулин, А. В. Разработка новых способов герниопластики / А.В. Баулин, С. А. Середин, А. Н. Митрошин и др. // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки.– 2012. – № 2 (22). – С. 33–41.
4. Бокерия, Л. А. Сердечно-сосудистая хирургия-2011. Болезни и врожденные аномалии системы кровообращения / Л. А. Бокерия, Р. Г. Гудкова. – М.: НЦССХ им. А.Н. Бакулева РАМН, 2012. – 196 с.
5. Борисов, И. А. Биологические протезы клапанов сердца в современной кардиохирургии / И. А. Борисов, А. Н. Блеткин, Д. Д. Савичев // Клиническая медицина. – 2012. – № 2. – С. 4-8.
6. 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.
7. Волова Т. Г. Материалы для медицины, клеточной и тканевой инженерии / Т. Г. Волова, Е. И. Шишацкая, П. В. Миронов. – Красноярск: СФУ, 2009. – С.168-170.
8. Гайворонский, И. В. Нормальная анатомия человека / И. В. Гайворонский. – СПб.: СпецЛит, 2013. – Т. 1. – 561 с.

9. Гариленков, Д. В. Биомеханические и потоковые характеристики бескаркасных и каркасных биопротезов аортального клапана / Д. В. Гариленков, А. Д. Маслевцов, А. Д. Юхнев и др. // Вестн. хир. – 2004. – № 163 (5). – Р. 25-30.
10. Губарева, Е. А. Морфологическая оценка качества децеллюляризации сердца и диафрагмы крыс / Е. А. Губарева, А. С. Сотниченко, И. В. Гилевич, П. Маккиарини // Гены и клетки. – 2012. – № 4. – С. 38-45.
11. Долгалева, А. А. Экспериментально-гистологический анализ результатов гетеротопических имплантаций резорбируемых коллагеновых мембран / А. А. Долгалева, В. А. Зеленский, И. А. Базилов, Д. А. Брусницын, Ю. А. Юдичева, А. В. Бондаренко, Р. А. Парфенце // Медицинский алфавит. – 2016. – № 21 (284). – С. 52-56.
12. Елисеев, Ю. Ю. Анализы. Полный справочник / Ю. Ю. Елисеев, Г. Р. Колоколов, Е. В. Герасина, О. Л. Ананьев, С. Ю. Шашлова, В. Н. Шилов, О. В. Ананьева, А. Ю. Полянина. – М.: Эксмо, 2009. – 768 с.
13. Коржевский, Д. Э. Основы гистологической техники. Практическое руководство / Д. Э. Коржевский, А. В. Гиляров. – СПб.: СпецЛит, 2010. – 95 с.
14. Котов, С. В. Первый опыт заместительной корпоропластики буккальным лоскутом у больных с болезнью Пейрони / С. В. Котов, А. Г. Юсуфов // Медицинский вестник Башкортостана. – 2013. – № 8 (2). – С. 304-306.
15. Кручинина, А. Д. Влияние подкожной имплантации говяжьего ксеноперикарда на активность ферроксидазы и перекись разрушающих ферментов сыворотки крови крыс / А. Д. Кручинина, С. С. Гамзин, М. Т. Генгин // Известия Пензенского государственного педагогического университета им. В. Г. Белинского. – 2012. – № 29. – С. 29-32.

16. Кудрявцева, Ю. А. Биологические протезы клапана сердца. От идеи до клинического применения / Ю. А. Кудрявцева // Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. – 2015. – № 4. – С. 6-16.
17. Кудрявцева, Ю. А. Роль шовного материала в кальцификации кардиоваскулярных биопротезов / Ю. А. Кудрявцева, М. В. Насонова, Т. Н. Акентьева, А. Ю. Бураго, И. Ю. Журавлева // Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. – 2013. – № 4. – С. 22-27.
18. Курапеев, Д. И. Тканевая инженерия клапанов сердца: децеллюляризация алло и ксенографтов / Д. И. Курапеев, А. В. Лаврешин, С. В. Анисимов // Гены и клетки. – 2012. – № 1. – С. 34-38.
19. Лакин, Г. Ф. Биометрия: учебное пособие для вузов / Г. Ф. Лакин. – М.: Высшая школа, 1990. – 312 с.
20. Масленников, Е. Ю. К вопросу о реакции биологических тканей на имплантаты для на костного остеосинтеза / Е. Ю. Масленников, Д. Е. Росторгуев, Е. А. Герасименко // Кубанский научный медицинский вестник. – 2013. – № 1 (136). – С. 121-125.
21. Никольский, А. В. Лапароскопическая нефропексия ксеноперикардом / А. В. Никольский, Д. А. Демидов, М. С. Александров // Урологические ведомости. – 2015. – № 5(1). – С. 68-69.
22. Ожегов, С. И. Словарь русского языка: Ок. 53 000 слов / Под общ. ред. проф. Л. И. Скворцова. – 24-е изд., испр.. – М.: Оникс, Мир и Образование, 2007. – 1200 с.
23. 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.
24. 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.

25. 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.
26. Рожнова, О. М. Биологическая совместимость медицинских изделий на основе металлов, причины формирования патологической реактивности (обзор иностранной литературы) / О. М. Рожнова, В. В. Павлов, М. А. Садовой // Бюллетень сибирской медицины. – 2015. – № 4 (14). – С. 110-118.
27. Розанова, И. Б. Биодеструкция имплантатов / И. Б. Розанова // В кн.: Биосовместимые материалы / Под ред. В. И. Севастьянова. – М.: МИА, 2011. – С. 212-245.
28. Розанова, И. Б. Кальцификация имплантов / И. Б. Розанова, С. Л. Васин // В кн.: Биосовместимость / Под ред. В. И. Севастьянова. – М.: МИА, 2011. – С. 246-295.
29. Сапин, М. Р. Анатомия человека / М. Р. Сапин, Д. Б. Никитюк, В. Н. Николенко, С. В. Чава. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2012. – Т. 2. – 456 с.
30. Севастьянов, В. И. Биосовместимые материалы / В. И. Севастьянов, М. П. Кирпичников. – М.: МИА, 2011. – 544 с.
31. Севастьянов, В. И., Методы исследований биоматериалов и медицинских изделий / В. И. Севастьянов, С. Л. Васин, Н. В. Перова // В кн.: Биосовместимость / Под ред. В. И. Севастьянова. – М.: МИА, 2011. – С. 47-87.
32. Соловьев, В. Б. Морфологические изменения в зоне имплантации углеродсодержащих материалов / В. Б. Соловьев, М. Г. Федорова, О. Д. Любченко, В. Ф. Татаринов, А. С. Купрюшин // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки. – 2014. – № 1 (29). – С. 27-34.
33. Тарантул, В. З. Толковый биотехнологический словарь. Русско-английский / В.З. Тарантул. – М.: Языки славянских культур, 2009. – 936 с.

34. Черкасов, В. Г. Анатомия человека: учебное пособие / В. Г. Черкасов, С. Ю. Кравчук. – Винница: Нова Книга, 2014. – 584 с.
35. Чернов, А. В. Исследование особенностей интеграции различных биоматериалов в мягких и костной тканях организма / А. В. Чернов, Ю. М. Ирьянов, С. А. Радченко, В. Ф. Чернов, Т. Ю. Ирьянова // Гений ортопедии. – 2012. – № 1. – С. 97-101.
36. Шехтер, А. Б. Тканевая реакция на имплантацию различных материалов / А. Б. Шехтер // В кн.: Биосовместимые материалы / Под ред. В. И. Севастьянова. – М.: МИА, 2011. – С. 130-158.
37. Шехтер, А. Б. Воспаление и регенерация / А. Б. Шехтер, В. В. Серов // В кн.: Воспаление. – М.: Медицина, 1995. – С. 200-219.
38. Aguiari, P. Mechanical testing of pericardium for manufacturing prosthetic heart valves / P. Aguiari, M. Fiorese, L. Iop, G. Gerosa, A. Bagno // Interact Cardiovasc Thorac Surg. – 2016. – № 22 (1). – P. 72-84.
39. Al-Torbak, A. A. Endophthalmitis associated with the Ahmed glaucoma valve implant / A. A. Al-Torbak, S. Al-Shahwan, I. Al-Jadaan, et al // Br J Ophthalmol. – 2005. – № 89. – P. 454-458.
40. Aroz, S. G. The use of bovine pericardial patch for vascular reconstruction in infected fields for transplant recipients / S. G. Aroz, M. Spaggiari, H. Jeon, J. Oberholzer, E. Benedetti, I. Tzvetanov // J Vasc Surg Cases Innov Tech. – 2017. – № 3 (1). – P. 47-49.
41. Atherton, D. D. Use of a purified collagen membrane to aid closure of palatal fistulae / D. D. Atherton, J. G. Boorman // J Plast Reconstr Aesthet Surg. – 2016. – № 69 (7). – P. 1003-1007.
42. Bochmann, F. Corneal patch graft for the repair of late-onset hypotony or filtering bleb leak after trabeculectomy: a new surgical technique / F. Bochmann, C. Kaufmann, A. Kipfer, et al // J Glaucoma. – 2014. – № 23. – P. 76-80.
43. Booth, C. Tissue engineering of cardiac valve prostheses I: development and histological characterization of an acellular porcine scaffold /

C. Booth, S. A. Korossis, H. E. Wilcox et al // J. Heart Valve Dis. – 2002. – № 11(4). P. 457-462.

44. Bracaglia, L. G. Reinforced Pericardium as a Hybrid Material for Cardiovascular Applications / L. G. Bracaglia, L. Yu, N. Hibino, J. P. Fisher // Tissue Eng Part A. – 2014. – № 20. – P. 2807-2016.

45. Chaku, M. Risk factors for tube exposure as a late complication of glaucoma drainage implant surgery / M. Chaku, P. A. Netland, K. Ishida, et al // Clin Ophthalmol. – 2016. – № 10. P. 547-553.

46. Chambers, J. B. Bovine pericardial versus porcine stented replacement aortic valves: early results of a randomized comparison of the Perimount and the Mosaic valves / J. B. Chambers, R. Rajani, D. Parkin, et al. // J Thorac Cardiovasc Surg. – 2008. – № 136 (5). – P. 1142-1148.

47. Czerny, M. Self-made pericardial tube graft: a new surgical concept for treatment of graft infections after thoracic and abdominal aortic procedures / M. Czerny, R. von Allmen, P. Opfermann, G. Sodeck, F. Dick, A. Stellmes, V. Makaloski, R. Bühlmann, U. Derungs, M. K. Widmer, T. Carrel, J. Schmidli // Ann Thorac Surg. – 2011. – № 92 (5). – P. 1657-1662.

48. Dubey, S. Heterologous, human donor sclera as the patch graft in glaucoma drainage device surgery / S. Dubey, K. Rajurkar, N. Kapur, et al // J Glaucoma. – 2017. – № 26 (3). – P. 128-129.

49. Gates, K. V. Antigenicity of Bovine Pericardium Determined by a Novel Immunoproteomic Approach / K. V. Gates, A. J. Dalglish, L. G. Griffiths // Sci Rep. – 2017. – № 7 (1). – P. 2446.

50. Giovingo, M. Complications of glaucoma drainage device surgery: a review / M. Giovingo // Semin Ophthalmol. – 2014. – № 29. – P. 397-402.

51. Goissis, G. Preparation and characterization of an acellular bovine pericardium intended for manufacture of valve bioprostheses / G. Goissis, Ade F. Giglioti, D. M. Braile // Artif Organs. – 2011. – № 35 (5). – P. 484-489.

52. Grauss, R. Decellularization of rat aortic valve allografts reduces leaflet destruction and extracellular matrix remodeling / R. Grauss, M. Hazekamp, S. Vliet et al. // J. Thorac. and Cardiovasc. Surg. – 2003. – № 126. – P. 63-82.
53. Hirsch, D. Inhibition of calcification of glutaraldehyde pretreated porcine aortic valve cusps with sodium dodecyl sulfate: preincubation and controlled release studies / D. Hirsch, J. Drader, T. J. Thomas, F. J. Schoen, J. T. Levy, R. J. Levy // J Biomed Mater Res. – 1993. – № 27 (12). – P. 1477-1484.
54. Huddleston, S. M. Aqueous shunt exposure: a retrospective review of repair outcome / S. M. Huddleston, R. M. Feldman, D. L. Budenz, et al // J Glaucoma. – 2013. – № 22. – P. 433-438.
55. Hwang, J. M. The effect of surface area expansion with pericardial membrane (preclude) in Ahmed glaucoma valve implant surgery / J. M. Hwang, C. Kee // J Glaucoma. – 2004. – № 13. – P. 335-339.
56. Jang, W. A Comparative Study on Mechanical and Biochemical Properties of Bovine Pericardium After Single or Double Crosslinking Treatment / W. Jang, S. Choi, S. H. Kim, E. Yoon, H. G. Lim, Y. J. Kim // Korean Circ J. – 2012. – № 42 (3). – P. 154-163.
57. Jee, K. S. A novel chemical modification of bioprosthetic tissues using L-arginine / K. S. Jee, Y. S. Kim, K. D. Park, Y. H. Kim // Biomaterials. – 2003. – № 24. – P. 3409-3416.
58. Koay, A. C. The Use of Preserved Bovine Pericardium for Emergency Temporizing Graft in Corneal Perforation / A. C. Koay, Y. H. Yew, C. T. Ngo, V. P. Loo, G. Intan, C. N. Chua // Med J Malaysia. – 2008. – № 63 (5). – P. 421-422.
59. Konakci, K. Z. Alpha-GAL on bioprostheses: xenograft immune response in cardiac surgery / K. Z. Konakci, B. Bohle, R. Blumer, W. Hoetzenecker, G. Roth, B. Moser, G. Boltz-Nitulescu, M. Gorlitzer, W. Klepetko, E. Wolner, H. J. Ankersmit // Eur J Clin Invest. – 2005. – № 35. – P. 17-23.
60. 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. 7

61. Lee, C. High-concentration glutaraldehyde fixation of bovine pericardium in organic solvent and post-fixation glycine treatment: in vitro material assessment and in vivo anticalcification effect / C. Lee, S. H. Kim, S. H. Choi, Y. J. Kim // *Eur J Cardiothorac Surg.* – 2011. – № 39 (3). – P. 381-387.
62. Limpert, J. N. Repair of abdominal wall defects with bovine pericardium / J. N. Limpert, A. R. Desai, A. L. Kumpf, M. A. Fallucco, D. L. Aridge // *Am J Surg.* – 2009. – № 198. – P. 60-65.
63. Manji, R. A. Glutaraldehyde-fixed bioprosthetic heart valve conduits calcify and fail from xenograft rejection / R. A. Manji, L. F. Zhu, N. K. Nijjar, D. C. Rayner, G. S. Korbitt, T. A. Churchill, R. V. Rajotte, A. Koshai, D. B. Ross // *Circulation.* – 2006. – № 114. – P. 318—327.
64. McMillan, W.D. Bovine pericardial patch repair in infected fields / W. D. McMillan, C. D. Leville, C. N. // *J Vasc Surg.* – 2012. – № 55. – P. 1712-1715.
65. Migneault, I. Glutaraldehyde: Behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking / I. Migneault, C. Dartiguenave, M. J. Bertrand, K. C. Waldron // *Biotechniques.* – 2004. – № 37 (5). – P. 798-802.
66. Moon, S. J. Bladder Reconstruction Using Bovine Pericardium in a Case of Enterovesical Fistula / S. J. Moon, D. H. Kim, J. K. Jo, J. H. Chung, J. Y. Lee, S. Y. Park, Y. T. Kim, H. K. Park, H. Y. Choi, H. S. Moon // *Korean J Urol.* – 2011. – № 52 (2). – P. 150-153.
67. Murase, Y. Evaluation of compliance and stiffness of decellularized tissues as scaffolds for tissue-engineered small caliber vascular grafts using intravascular ultrasound / Y. Murase, Y. Narita, H. Kagami, K. Miyamoto, Y. Ueda, M. Ueda // *ASAIO J.* – 2006. – № 52 (4). – P. 450-455.
68. Nagi, K. S. Short-term outcomes of KeraSys patch graft for glaucoma drainage devices: a case series / K. S. Nagi, R. J. Cumba, N. P. Bell, et al // *J Ophthalmol.* – 2013. – № 2013. – P. 1-6.

69. Nishida, H. Outcomes of Totally Endoscopic Atrial Septal Defect Closure Using a Glutaraldehyde-Treated Autologous Pericardial Patch / H. Nishida, D. Nakatsuka, Y. Kawano, N. Hiraiwa, S. Takanashi, M. Tabata // *Circ J.* – 2017. – № 81 (5). – P. 689-693.
70. Odero, A. The crimped bovine pericardium bioprosthesis in graft infection: preliminary experience / A. Odero, A. Argentero, M. Cugnasca, S. Pirrelli // *Eur J Vasc Endovasc Surg.* – 1997. – № 14. – P. 99-101.
71. Ortolani, E. Mechanical qualification of collagen membranes used in dentistry / E. Ortolani, F. Quadrini, D. Bellisario, L. Santo, A. Polimeni, A. Santarsiero // *Ann Ist Super Sanita.* – 2015. – № 51 (3). – P. 229-235.
72. Otero, J. R. Use of a lyophilized bovine pericardium graft to repair tunical defect in patients with Peyronie's disease: experience in a clinical setting / J. R. Otero, B. G. Gomez, J. M. Polo, C. P. Mateo, S. G. Barreras, E. G. Cruz, A. R. Antolín // *Asian J Androl.* – 2017. – № 19 (3). – P. 316-320.
73. Papakostas, J. C. Use of the Vasca-Guard bovine pericardium patch for arteriotomy closure in carotid endarterectomy. Early and long-term results / J. C. Papakostas, S. Avgos, E. Arnaoutoglou, C. Nassis, M. Peroulis, C. Bali, et al. // *Ann Vasc Surg.* – 2014. – № 28 (5). – P. 1213-1218.
74. Pathak, C. P. Treatment of bioprosthetic heart valve tissue with long chain alcohol solution to lower calcification potential / C. P. Pathak, A. K. Adams, T. Simpson, Jr R. E. Phillips, M. A. Moore // *J Biomed Mater Res.* – 2004. – № 69. – P. 140-144.
75. Portnoy, S. L. Surgical management of corneal ulceration and perforation / S. L. Portnoy, M. S. Insler, H. E. Kaufman // *Surv Ophthalmol.* – 1989. – № 34 (1). – P. 47-58.
76. Quaranta, L. Outcomes of using a sutureless bovine pericardial patch graft for Ahmed glaucoma valve implantation / L. Quaranta, I. Riva, I. C. Floriani // *Eur J Ophthalmol.* – 2013. – № 23. – P. 738-742.

77. Quigley, H. A. The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020 / H. A. Quigley, A. T. Broman // *Br J Ophthalmol.* – 2006. – № 90. P. 262-267.
78. Rahman, S. Optimising the decellularization of human elastic cartilage with trypsin for future use in ear reconstruction / S. Rahman, M. Griffin, A. Naik, M. Szarko, P. E. M. Butler // *Sci Rep.* – 2018. – № 8. – P. 3097.
79. Rieder, E. Decellularization protocols of porcine heart valves differ importantly in efficiency of cell removal and susceptibility of the matrix to recellularization with human vascular cells / E. Rieder, M. T. Kasimir, G. Silberhumer et al // *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* – 2004. – № 127(2). – P. 399-405.
80. Rothamel, D. Clinical aspects of novel types of collagen membranes and matrices: Current issues in soft- and hard- tissue augmentation / D. Rothamel, R. Torök, J. Neugebauer, T. Fienitz, M. Scheer, M. Kreppel, R. Mischkowski, J. E. Zöller // *EDI Journal.* – 2012. – № 1. – P. 8.
81. Saporito, W. F. Bovine pericardium retail preserved in glutaraldehyde and used as a vascular patch / W. F. Saporito, A. C. Pires, S. H. Cardoso, J. A. Correa, L. C. de Abreu, V. E. Valenti, et al. // *BMC Surgery.* – 2011. – № 11. – P. 37.
82. Schenke-Layland, K. Impact of decellularization of xenogeneic tissue on extracellular matrix integrity for tissue engineering of heart valves / K. Schenke-Layland, O. Vasilevski, F. Opitz et al // *J. Struct. Biol.* – 2003. – № 143(3). P. 201-208.
83. Schmidt D., Stock U. A., Hoerstrup S. Tissue engineering of heart valves using decellularized xenogeneic or polymeric starter matrices // *Phil. Trans. R. Soc. B.* – 2007. – 362. – P. 1505–1512.
84. Schoen, F. J. Calcification of tissue heart valve substitutes: progress toward understanding and prevention / F. J. Schoen, R. J. Levy // *Ann Thorac Surg.* – 2005. – № 79. – P. 1072-1080.

85. Sinha, P. Effects of glutaraldehyde concentration, pretreatment time, and type of tissue (porcine versus bovine) on postimplantation calcification / P. Sinha, D. Zurakowski, T. K. Kumar, D. He, C. Rossi, R. A. Jonas // *J Thorac Cardiovasc Surg.* – 2012. – № 143 (1). – P. 224-227.

86. Smith, M. F. A comparison of glaucoma drainage implant tube coverage / M. F. Smith, J. W. Doyle, Jr. J. W. Ticerney // *J Glaucoma.* – 2002. – № 11. P. 143-147.

87. Stöckl, K. Operative Therapie bei Infekt einer aortobifemorale Y-Prothese sowie Reinfekt eines femoropoplitealen (P1) Silberkunststoffbypasses links / K. Stöckl, M. Steinbauer // *Gefasschirurgie.* – 2015. – № 20. – P. 385–388.

88. Tam, H. A novel crosslinking method for improved tear resistance and biocompatibility of tissue based biomaterial / H. Tam, W. Zhang, K. R. Feaver, N. Parchment, M. S. Sacks, N. Vyavahare // *Biomaterials.* – 2015. – № 66. – P. 83-91.
Thakur, S. Grafts in Glaucoma Surgery: A Review of the Literature / S. Thakur, P. Ichhpujani, S. Kumar // *Asia Pac J Ophthalmol (Phila).* – 2017. – № 6 (5). – P. 469-476.

89. Töpel, I. Xenografts in septic vascular surgery / I. Töpel, C. Uhl, I. Ayx, M. Steinbauer // *Gefasschirurgie.* – 2016. – № 21. – P. 55-58.

90. Trantina-Yates, A. E. Detoxification on top of enhanced, diamine-extended glutaraldehyde fixation significantly reduces bioprosthetic root calcification in the sheep model / A. E. Trantina-Yates, P. Human, P. Zilla // *J Heart Valve Dis.* – 2003. – № 12. – P. 93-101.

91. Venn, S. Bladder reconstruction: urothelial augmentation, trauma, fistula / S. Venn, T. Mundy // *Curr Opin Urol.* – 2002. – № 12. – P. 201-203.

92. Vyavahare, N. R. Current Progress in Anticalcification for Bioprosthetic and Polymeric Heart Valves / N. R. Vyavahare, W. Chen, R. R. Joshi, C. H. Lee, D. Hirsch, J. Levy, F. J. Schoen, R. J. Levy // *Cardiovasc Pathol.* – 1997. – № 6 (4). – P. 219-229.

93. Wine, Y. Elucidation of the Mechanism and End Products of Glutaraldehyde Crosslinking Reaction by X-Ray Structure Analysis / Y. Wine, N.

Cohen-Hadar, A. Freeman, F. Frolov // *Biotechnol Bioeng.* – 2007. – № 98 (3). – P. 711-718.

94. Wolf, A. Use of autologous scleral graft in Ahmed glaucoma valve surgery / A. Wolf, Y. Hod, G. Buckman, et al // *J Glaucoma.* – 2016. – № 25. – P. 365-370.

95. Yamamoto, H. In situ replacement of the thoracic aorta using an equine pericardial roll graft for an aortobronchial fistula due to aortic rupture / H. Yamamoto, F. Yamamoto, K. Ishibashi, Y. Chida, Y. Minamiya, H. Nanjo // *Gen Thorac Cardiovasc Surg.* – 2009. – № 57 (8). – P. 413-417.

96. Yamamoto, H. In situ replacement with equine pericardial roll grafts for ruptured infected aneurysms of the abdominal aorta / H. Yamamoto, F. Yamamoto, K. Ishibashi, M. Motokawa // *J Vasc Surg.* – 2009. – № 49 (4). – P. 1041-1045.

97. Yoshioka, S. A. Thermal and spectrophotometric studies of new crosslinking method for collagen matrix with glutaraldehyde acetalsn / S. A. Yoshioka, G. Goissis // *J Mater Sci Mater Med.* – 2008. – № 19 (3). – P. 1215-1223.

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

06.04.01 Биология

Магистерская программа «Биохимия и
молекулярная биология»

Утверждаю

Зав. кафедрой

 Г. А. Карпова
« 1 » декабря 2016 г.

Задание

По ВКР студента Митякиной Ольги Сергеевны

Тема работы: «Оценка влияния додецилсульфата натрия и полимерного
глутарового альдегида на интенсивность кальцификации биоматериала»

Утверждена приказом по Университету от « 6 » декабря 2016 г. № 1192 а

Срок сдачи студентом законченной работы « 17 » мая 2018 г.

КАЛЕНДАРНЫЙ ПЛАН ВКР

№ п/п	Перечень подлежащих разработке вопросов:	Сроки выполнения этапов	Примечания
1.	Формулировка целей и задач магистерской диссертации, составление плана работы	Декабрь 2016	Выполнено
2.	Поиск и анализ научной литературы по теме работы «Оценка влияния додецилсульфата натрия и полимерного глутарового альдегида на интенсивность кальцификации биоматериала», изучение информации о действии додецилсульфата натрия и глутарового альдегида на биоматериал; о природе кальцификации биоматериалов	Декабрь 2016-март 2017	Выполнено
3.	Подбор и оформление библиографического списка	Март 2017	Выполнено
4.	Изучение методов получения биологического материала	Март-апрель 2017	Выполнено
5.	Изучение методов гистологического исследования	Апрель 2017	Выполнено
6.	Изучения методов моделирования кальцификации	Май-июнь 2017	Выполнено
7.	Изучение методов определения кальция в пробе	Июнь-июль 2017	Выполнено
8.	Оформление первой и второй главы магистерской диссертации	Сентябрь-ноябрь 2017	Выполнено
9.	Подготовка и проведение исследования по теме «Оценка влияния додецилсульфата натрия и полимерного глутарового альдегида на интенсивность кальцификации биоматериала»	Ноябрь 2017-май 2018	Выполнено
10.	Подготовка необходимого практического биоматериала	Ноябрь 2017	Выполнено
11.	Проведение обработки биологического материала	Декабрь 2017-январь 2018	Выполнено
12.	Проведение гистологического контроля обработки биоматериала	Февраль 2018	Выполнено
13.	Моделирование кальцификации in vitro и in vivo	Март-апрель 2018	Выполнено
14.	Фотометрическое определение кальция	Апрель 2018	Выполнено

15.	Проведение статистической обработки полученных результатов	Апрель-май 2018	Выполнено
16.	Оформление полученных результатов в виде таблиц, схем, диаграмм	Апрель-май 2018	Выполнено
17.	Оформление третьей главы магистерской диссертации	Май 2018	Выполнено
18.	Подведение итогов исследования, написание выводов и оформление магистерской диссертации	Май 2018	Выполнено
19.	Подготовка доклада и графического материала	Май 2018	Выполнено

Дата выдачи задания « 01 » 12 2016г.

Руководитель
Венедиктов А. А., к.б.н.,
управляющий ООО "Кардиоплант"

Задание принял к исполнению
Митякина О. С.