

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РФ

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования

"ПЕНЗЕНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ"

Факультет физико-математических
и естественных наук

Кафедра "Общая биология и
биохимия"

Направление подготовки 06.03.01 Биология

Профиль Биохимия

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

на тему:

«ОЦЕНКА ОБЩЕТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ПОЛИЭФИРНОЙ
ТКАНИ МАНЖЕТЫ СЕРДЕЧНОГО КЛАПАНА»

Студент  Лемаева Анна Александровна

Руководитель  Кручинина А.Д.

Нормоконтролёр  Кручинина А.Д.

Работа допущена к защите (протокол заседания кафедры от 13.06.17 № 14)

Заведующий кафедрой  Карпова Г.А.

Работа защищена с отметкой отлично (протокол заседания ГЭК от 20.06.17 № 11)

Секретарь ГЭК  Кручинина А.Д.

Пенза, 2017

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	6
1.1 Искусственные клапаны сердца ЗАО НПП «МедИнж»	6
1.1.1 Протезы клапанов сердца с редуцированной манжетой.....	7
1.1.2 Протезы клапанов сердца с защитной плёнкой из политетрафторэтилена	7
1.1.3 Протезы клапанов сердца с присоединяемой манжетой.....	8
1.1.4 Биологические протезы клапанов сердца.....	9
1.2 Материал для изготовления манжеты.....	10
1.2.1 Реакция организма на имплантацию синтетического материала..	11
1.2.2 Сиролимус как препарат для антипролиферативного покрытия...13	
1.2.3 Хлороформ как растворитель для сиролимуса.....	15
1.2.4 Этиленоксид как средство стерилизации манжеты.....	16
1.3 Биохимические параметры.....	17
1.3.1 Ферменты печени аланинаминотрансфераза, аспартатаминотрансфераза, гамма-глутамилтранспептидаза, щелочная фосфатаза.....	18
1.3.2 Аспартатаминотрансфераза и аланинаминотрансфераза.....	18
1.3.3 γ -Глутамилтранспептидаза.....	20
1.3.4 Щелочная фосфатаза.....	22
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	23
2.1 Имплантация образцов животным и забор крови.....	23

2.2	Определение активности аланинаминотрансферазы, аспаратаминотрансферазы, гамма-глутамилтранспептидазы, щелочной фосфотазы	24
2.3	Определение концентраций ионов натрия, калия, кальция, фосфатов и хлоридов.....	25
2.4	Определение концентраций альбумина, глюкозы, холестерина, креатинина, мочевины, триглицеридов и общего белка.....	26
2.5	Методы статистической обработки результатов.....	24
ГЛАВА 3.	РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	30
3.1	Тканевая реакция на имплантацию образцов полиэфирной ткани с антипролиферативным покрытием.....	35
3.2	Результаты определения концентрации ионов и активности ферментов в сыворотке крови.....	35
	ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	53
	СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	55
	СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	56

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. Заболевания сердечно – сосудистой системы стали основной причиной смертности и инвалидизации населения. Среди них особое место занимают пороки клапанов сердца. В связи с этим, одной из приоритетных задач медицинской промышленности РФ является разработка и производство современных качественных медицинских изделий.

В настоящее время имплантирование биологических и механических протезов является основным эффективным методом лечения пороков клапанов сердца [3]. При этом актуальным является создание протезов, не уступающих по качеству мировым лидерам, эффективных, долговечных и безопасных.

При разработке нового медицинского изделия необходимым этапом является проведение исследований согласно ГОСТ Р ИСО 10993-2015 «Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий» [13]. Соблюдение положений стандартов серии позволяет обеспечить системный подход к исследованию биологического действия медицинских изделий, так как они являются регламентирующими документами для прогнозирования и исследования на стадии выбора материалов, предназначенных для их изготовления, а также для исследований готовых изделий.

Манжету искусственных клапанов сердца ЗАО НПП «МедИнж» изготавливают из полиэфирной ткани с антитромбогенным и антибактериальным покрытием (ФГБУ «ННПЦССХ им. А.Н. Бакулева» Минздрава России). После имплантации вокруг полиэфирной ткани начинает формироваться соединительнотканная капсула, излишнее разрастание которой может приводить к нарушению нормальной работы протеза клапана сердца. В связи с этим актуальным является разработка антипролиферативного покрытия манжеты и оценка общего токсического

воздействия полученного материала на организм путем исследования изменений биохимических параметров крови после имплантации.

Целью данной работы является оценка общетоксического действия полиэфирной ткани с антипролиферативным покрытием для изготовления манжеты сердечного клапана ЗАО НПП «МедИнж».

Для достижения цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Проанализировать литературные источники по теме исследования.
2. Имплантировать подкожно крысам образцы полиэфирной ткани с антипролиферативным покрытием.
3. Оценить тканевую реакцию на имплантацию образцов полиэфирной ткани с антипролиферативным покрытием.
4. Определить основные биохимические параметры крови крыс с использованием наборов для лабораторной диагностики.
5. Оценить общетоксическое действие образцов полиэфирной ткани с антипролиферативным покрытием на организм животного.

Бакалаврская работа написана на 61 листе, содержит 28 рисунка, 1 таблица и список литературы на русском и английском языках из 65 источников.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Искусственные клапаны сердца ЗАО НПП «МедИнж»

Искусственные клапаны сердца ЗАО НПП «МедИнж» воплощают в себе новейшие материалы, технологические достижения, уникальную конструкцию, разработанную на основе клинических данных нескольких поколений клапанов сердца. Протезы получили широкое применение в медицинской практике и зарекомендовали себя как высококачественный продукт [62].

Клапан сердца МЕДИНЖ-2 позволяет достигнуть:

- 1) Быстрое восстановление гемодинамики пациента после операции, снижение градиента давления на протезах.
- 2) Благодаря мягкой, эластичной манжете, наличие держателя, у которого кривизну ручки можно менять и комплекта калибров, протезы удобно имплантировать. Впоследствии, используют индикаторы для проверки функции протеза.
- 3) Протез в сердце пациента работает бесшумно.
- 4) Элементы клапана и прилегающие сердечные структуры равномерно омываются потоками крови, благодаря тому, что клапан самостоятельно и постоянно вращает створки вокруг центральной оси корпуса [63].

В ЗАО НПП «МедИнж» разработано несколько видов клапанов:

- 1) Протезы клапанов сердца с редуцированной манжетой;
- 2) Протезы клапанов сердца с защитной пленкой из ПТФЭ;
- 3) Протезы клапанов сердца с присоединяемой манжетой [64].

1.1.1 Протезы клапанов сердца с редуцированной манжетой

На предприятии выпускаются клапаны с редуцированной манжетой посадочных размеров 19, 21, 23 мм для интра-аннулярной позиции и 17, 19, 21 мм для супра-аннулярной позиции. Данные манжеты при имплантации аортальных клапанов снижают риск перекрытия устьев коронарных артерий. Форма редуцированной манжеты сходна с формой фиброзного кольца, следовательно более компактна, по сравнению с другими манжетами (рисунок 1).

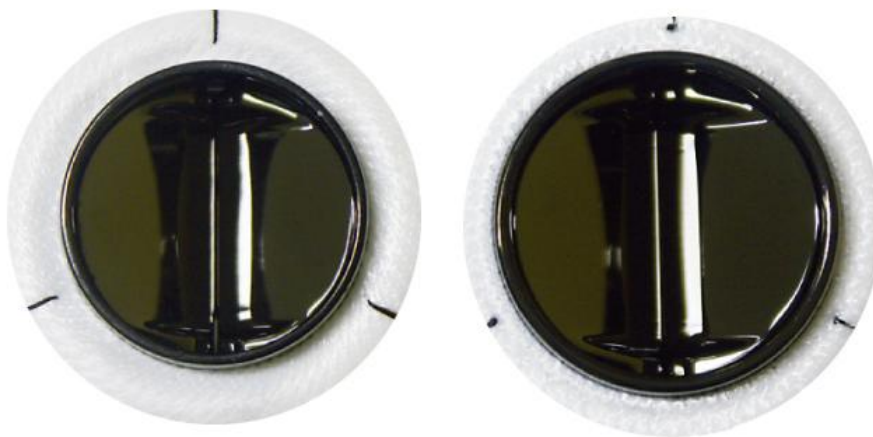


Рис. 1. Протез клапана сердца ЗАО НПП «МедИнж» с редуцированной манжетой

1.1.2 Протезы клапанов сердца с защитной плёнкой из политетрафторэтилена

Данные протезы клапанов сердца имеют защитную пленку из политетрафторэтилена (ПТФЭ) в митральном исполнении. Посадочные диаметры 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33 мм и супра – аннулярной формой манжеты (рисунок 2).

Предотвращению отторжения протеза клапана способствует тканевый материал, обеспечивающий прорастание манжеты естественной соединительной тканью. Политетрафторэтилен препятствует соединительной ткани нарастать на внешней поверхности манжеты в отверстие кольцеобразного корпуса. Для этого на участках манжеты, прилегающих к верхней части клапана – имплантата, наносят пленку ПТФЭ.



Рис. 2. Протезы клапанов сердца ЗАО НПП «МедИнж» с защитной плёнкой из политетрафторэтилена

1.1.3 Протезы клапанов сердца с присоединяемой манжетой

Система «Easy Change» позволяет облегчить имплантацию манжеты в фиброзное кольцо, с последующим установлением протеза клапана. Повреждение протеза минимальны. В комплект принадлежностей входит зеркало, которым можно контролировать состояние подкладочных структур. Возможна замена протеза в случае возникновения дисфункции. Клапан извлекают из манжеты с помощью экстрактора и устанавливают другой протез, того же размера.

Запирающие элементы и корпус протеза клапана сердца «МЕДИНЖ – ЕС» идентичны протезу клапана «МЕДИНЖ» (рисунок 3) [1].



Рис. 3. Протез клапана сердца с присоединяемой манжетой

1.1.4 Биологические протезы клапанов сердца

Наиболее перспективными заменителями клапанов сердца являются биологические протезы, изготавливающиеся из бычьего перикарда или аортального клапана свиньи (рисунок 4), химически обработанных для повышения устойчивости к воздействию коллагеназ.

Биологические протезы имеют меньшую тромбогенность, в отличие от механических искусственных клапанов, но менее долговечны. Подвергаясь дегенеративным изменениям, функции биопротезов нарушаются [61].

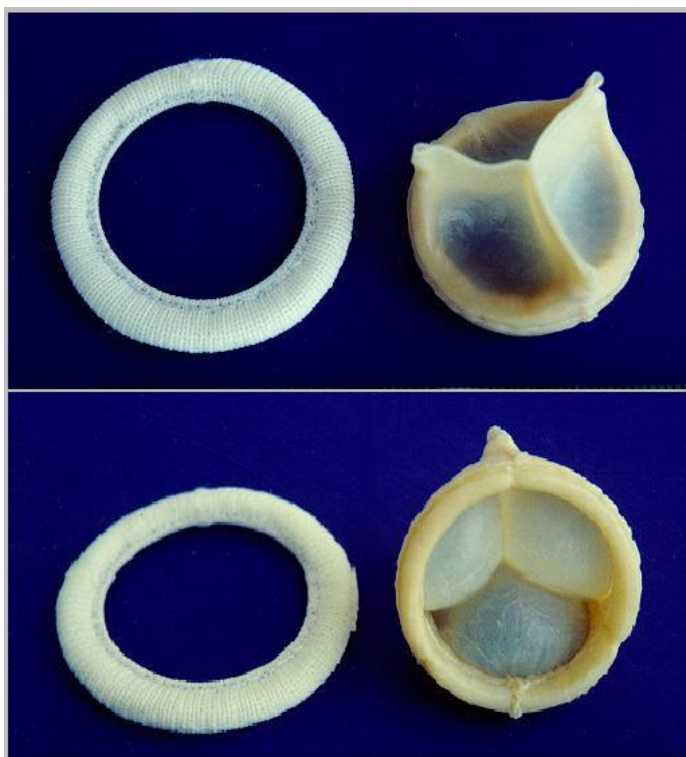


Рис. 4. Биологический протез клапана сердца

1.2 Материал для изготовления манжеты

Манжета для искусственных клапанов «МедИнж» изготавливается из полиэфирного волокна, являющегося одним из современных синтетических материалов, используемых в хирургической медицине.

Полиэфирное волокно — волокно, состоящее из сложных полиэфиров, наибольшее распространение получили волокна из полиэтилентерефталата (ПЭТ). Его получают из полиэтилениоксибензоата, жидкокристаллических полиэфиров, поликарбонатов, полисилилен — гликольтерефталата или модификации ПЭТ.

Полиэфирное волокно химически не агрессивно и считается экологически чистым [22]. Модуль деформации волокна составляет 2 – 6 ГПа, прочность 15 – 45 сН/текс, удлинение при разрыве 18 – 50%, термостойкость 130 – 160 °С. Волокно обладает биохимической стойкостью, не растворим в воде, устойчив к воздействию разбавленных

щелочей, кислот и органических растворителей. Полиэфирное волокно используют при производстве синтетических кровеносных сосудов и хирургических нитей [14, 20, 23, 24, 42, 50, 56].

1.2.1 Реакция организма на имплантацию синтетического материала

Любой чужеродный материал, имплантированный в организм вызывает воспалительно – репаративную реакцию, обусловленную защитной и репаративной функций соединительной ткани. Проплиферация фибробластов, вызванная воспалительным процессом, продуцирует коллагеновые волокна и другие составляющие экстрацеллюлярного матрикса. Инородное тело изолируется формирующейся соединительнотканной капсулой. От степени биосовместимости материалов – имплантатов зависит сила воспаления. Все биоматериалы, предназначенные для медицины, проходят морфологические и токсикологические исследования, испытания проводят в условиях максимально приближенных к их конкретному использованию [32].

Асептическое воспаление вызывают микробы, попадающие при имплантации, являющиеся дополнительным раздражителем [34].

Выделяют три стадии воспаления:

1) Альтерация. Этот патологический процесс, характеризуется нарушением жизнеспособности клеток, тканей и органов и их повреждением. Морфологически проявляется некрозом и дистрофией [27].

2) Экссудация. В воспаленную ткань через сосудистую стенку выходит жидкая часть крови. Экссудат - выходящая из сосудов жидкость, накапливается в полостях (перитонеальной, перикардиальной, плевральной), пропитываясь в воспаленную ткань [31].

3) Пролиферация – завершающая фаза воспаления, при которой размножившиеся клетки (мезенхимальные камбиальные, эндотелиальные и адвентициальные, ретикулярные, моноциты, В- и Т- лимфоциты из крови) отграничивают очаг воспаления, от ткани вокруг него [21]. В очаге воспаления в размножившихся клетках наблюдается их трансформация и дифференцировка.

Конечным этапом явления пролиферации является образование коллагеновых волокон (продукты деятельности фибробластов), которые совместно с клетками разрастаются, отграничивая очаг воспаления от здоровой ткани, постепенно замещая его [28].

Имплантация инородного тела вызывает повреждение тканей, и в результате некроза и дистрофии клеток и ткани выделяются токсические продукты, хемотаксические и вазоактивные вещества. В результате кровеносные сосуды расширяются, для жидкой части крови повышается проницаемость, развивается отёк, хемотаксис [34].

При имплантации в кровеносную систему синтетических протезов существуют общие закономерности:

- 1) Образование наружных и внутренних фибриновых выстилок;
- 2) Реакция воспаления тканей вокруг имплантата;
- 3) Формирование, вокруг протеза, гранулярной ткани, и в последствии наружной соединительнотканной капсулы;
- 4) При пористости материала происходит прорастание соединительной ткани и сосудов в поры протеза.
- 5) Частичная регенерация гладких мышц, эластичных волокон и постепенная регенерация эндотелиальной выстилки, вследствие прорастания фибринобластами внутренней фибриновой выстилки и образования соединительнотканной капсулы [33].

Факторы влияющие на общие закономерности:

- 1) Диаметр и длина протеза;

- 2) Химический состав модифицирующего покрытия и материала протеза (Прививка гепарина, полиамиды, политетрафторэтилены, коллаген, полипропилены, полиуретаны, углеродные покрытия и т.д.);
- 3) Место имплантации (калибр сосуда, артерия, вена);
- 4) Степень биодеструкции материала;
- 5) Структуры (тканый, цельный или вязаный, пористость, гофрированность, ворсинчатость);
- 6) Наличие инфекции в ложе протеза [33].

Для снижения интенсивности ответной реакции организма на имплантацию материала на поверхность полиэфирной ткани для изготовления манжет протезов сердечных клапанов планируется наносить сиролимус-содержащее антипролиферативное покрытие.

1.2.2 Сиролимус как препарат для антипролиферативного покрытия

Сиролимус (рапамицин) относится к фармакологической группе иммунодепрессивных препаратов, применяемых для предотвращения отторжения органов при трансплантации [61] и в качестве антипролиферативного покрытия коронарных стентов для снижения риска рестеноза.

Рапамицин блокирует передачу внутриклеточного кальция – независимого и кальция – опосредованного сигнала, ингибируя активацию Т – лимфоцитов. Связываясь с цитозольным специфическим белком иммунофилином и FK – связывающим белком – 12, сиролимус образует комплекс FKPB – 12 – сиролимус, который способствует подавлению активации – фермента киназы. В организме млекопитающих киназа занимает принципиальное значение в развитии клеточного цикла, являясь мишенью для Сиролимуса. Конечный итог – активация лимфоцитов, и

впоследствии иммуносупрессия, к которой приводит блокировка нескольких специфических путей передачи сигналов [46].

Сиролимус блокирует активацию В – клеток и Т – клеток за счет ингибирования их на интерлекин – 2 [46, 36].

Интерстициальный пневмонит. Побочный эффект наблюдается при использовании Рапамицина в трансплантации лёгких. Механизм действия интерстициальных заболеваний легких, вызванных Рапамицином и макролидами ингибиторами MTOR, неизвестен. Развитие заболевания от дозы не зависит [18, 36].

Риск развития онкологии. Теоретически Сиролимус может снизить противоопухолевую активность организма и приводит к развитию некоторых видов онкологии. Прием иммуносупрессивных препаратов увеличивает риск развития рака в 10 - 100 раз. Кожные лимфомы и опухоли развиваются у 10 % реципиентов цельных органов, после 70 месяцев применения ингибиторов кальциневрина. Правильный расчет дозы Сиролимуса усиливает ответ иммунной системы на опухоль, что вызывает ее деградацию [15].

При приеме Рапамицина животными в течение долгого времени, не менее 1 года, наблюдается уменьшение веса и объема сердца. Мыши, имеющие уменьшенное количество красных кровяных телец, принимающие Рапамицин, имеют увеличенное количество эритроцитов [43].

Рапамицин влияет на количество Т клеток, противодействуя возрастному изменению в их количестве.

Предполагается, что Сиролимус затормаживает общий метаболизм, увеличивая продолжительность жизни у мышей. Однако большие дозы подавляют иммунную систему человека, и он более подвержен инфекциям [43].

1.2.3 Хлороформ как растворитель для сиролимуса

Сиролимус наносится на поверхность манжеты в растворе хлороформа. Поскольку хлороформ относится ко 2-му классу (вещества высокоопасные) опасности по ГОСТ 12.1.007, его содержание в медицинском изделии должно быть минимальным. Даже невысокие концентрации хлороформа могут вызвать сильное, хроническое отравление с преимущественным поражением печени.

Хлороформ (метилтрихлорид, хладон 20, трихлорметан, CHCl_3) – при нормальных условиях бесцветная летучая жидкость, практически нерастворим в воде – образует с ней растворы с массовой долей до 0,23%, сладкий на вкус, с эфирным запахом, негорюч, но при смешивании с горючим веществом, будет гореть. Смешивается с большинством органических растворителей. Применяется в производстве некоторых алкалоидов, как растворитель лаков, жиров.

Получается в реакциях между хлорной известью и ацетоном, спиртом и ацетальдегидом, а также каталитическим хлорированием метана (вместе с хлористым метиленом и четыреххлористым углеродом) [7].

При воздействии хлороформа на организм могут возникнуть заболевания печени и почек. Смертельные дозы при ингаляции 40 мл, при приеме внутрь 20 мл. В крови токсическая концентрация составляет 70—250 мг/л, смертельной концентрацией является 390 мг/л [26].

Картина отравления:

При концентрации 0,0003 мг/л начинается порог восприятия запаха. Около 0,02 мг/л ощущается сладковатый запах. Наркотическая концентрация возникает при вдыхании 0,25—0,5 мг/л в течение 40 минут, начинает изменяться скорость развития рефлекторного мышечного напряжения. Концентрации хлороформа, близкие к тем, которые достигаются в венозной крови в условиях наркоза, могут вызывать существенные изменения в культуре клеток печени. Однократный наркоз

так же может вызывать глубокие изменения в обмене веществ, желудочно-кишечном тракте, стать причиной развития желтухи, расстройств сердечной деятельности (аритмия), олигурию, появление сахара в моче. В более легких случаях наблюдаются головокружение, желудочные боли, анемия, слабость, возбужденное состояние, лейкоз, рвота.

1.2.4 Этиленоксид как средство стерилизации манжеты

Манжеты биологического клапанов стерилизуют с помощью этиленоксида. В связи с токсическим действием окиси этилена, её остаточное содержание после стерилизации должно быть строго контролируемым [5].

Окись этилена (этиленоксид, C_2H_4O) – это бесцветный газ, с запахом эфира, используемый для стерилизации ряда медицинских изделий, при высоких концентрациях в воздухе вызывает раздражающий эффект на слизистые оболочки носа и горла, обладает сенсibiliзирующим и наркотическим действием.

Простерилизованные окисью этилена изделия могут адсорбировать значительное количество газа. Из практики использования окиси этилена для стерилизации в больницах известны случаи негативного воздействия на пациентов изделий, использованных для лечебных и диагностических манипуляций без достаточной дегазации после проведения газовой стерилизации. Перед использованием изделий после стерилизации окисью этилена они должны пройти дегазацию с целью максимального снижения остатков окиси этилена [4]. Десорбция газа представляет собой сложный процесс, который в обычных условиях производственной среды при комнатной температуре протекает крайне медленно (до 14 дней). Большое значение имеет тип материала, из которого изготовлено изделие. Примерами очень высоких адсорбентов окиси этилена являются поливинилхлорид и полиуретан. Десорбция газа из этих полимеров

занимает длительный промежуток времени. На скорость десорбции влияют также такие физические характеристики, как площадь поверхности и плотность материала, его толщина и форма [16].

Одной из главных характеристик окиси этилена является ее способность к диффузии, проникновению, в любые каналы и полости, а также в толщу пластиковых изделий. В целях обеспечения безопасности медицинских изделий (МИ) для пациентов и медицинских работников, проводится длительная постстерилизационная аэрация, если МИ контактирует с телом человека больше 30 минут, то время аэрации 24 часа [1].

1.3 Биохимические параметры

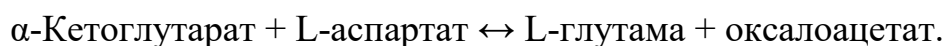
Важным этапом при разработке новых медицинских изделий или материалов для них является определение общего токсического действия на организм [8]. Для оценки белково-азотистого обмена в сыворотке крови определяют концентрации общего белка, альбуминов, мочевины. Изменение липидного обмена оценивают по уровню триглицеридов и общего холестерина. Углеводный обмен изучают по динамике изменения в крови содержания глюкозы. Минеральный и водно-солевой обмен оценивают по уровням кальция, калия, натрия, хлоридов, неорганического фосфата. Обмен компонентов костного матрикса оценивают, изучая динамику активности щелочной фосфатазы. Маркером поражения печени служат активности ферментов аланинаминотрансферазы, аспартатаминотрансферазы, гамма-глутамилтранспептидазы.

1.3.1 Ферменты печени аланинаминотрансфераза, аспартатаминотрансфераза, гамма-глутамилтранспептидаза, щелочная фосфатаза

В печени одновременно протекает множество биохимических процессов, катализируемых различными ферментами. Определение активности ряда ферментов позволяет определить состояние печени и организма человека в целом. Известно, что среди присутствующих в кровотоке нескольких тысяч различных ферментов, только два фермента могут указывать на различные патологии и симптоматику заболеваний. Их называют аминотрансферазы (синоним трансаминазы) – ферменты, катализирующие реакцию переноса аминогруппы (NH₂-группы) вместе с протоном (ионом водорода) и парой электронов от аминокислот или аминов к кетокислотам или другим соединениям, содержащим в составе своей молекулы карбонильную группу (СО-группу). Аминотрансферазы играют огромную биологическую роль, так как они участвуют в трансаминировании – процессе, имеющем важнейшее значение для энергетического и азотистого обмена.

1.3.2 Аспартатаминотрансфераза и аланинаминотрансфераза

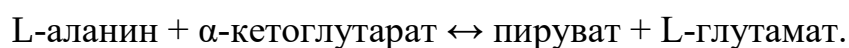
Аспартатаминотрансфераза (АСТ; глутамат-оксалоацетаттрансаминаза; GOT L-аспартат; 2-оксоглутаратаминотрансфераза, КФ 2.6.1.1) катализирует реакцию преаминирования (трансаминирования) между аспартатом и α-кетоглутаратом:



У млекопитающих наиболее высокая активность и концентрация АСТ отмечена в печени, нервной ткани, скелетной мускулатуре и миокарде. Незначительная активность АСТ определена и в крови здоровых

людей. В большинстве тканей существует как минимум два изофермента АСТ: митохондриальный изофермент (мАСТ), на всех поддерживающих средах движущийся к катоду, и растворимый в цитозоле изофермент АСТ (цАСТ), мигрирующий к аноду. Выделение изоферментов выявило существование нескольких изоформ со сходной кинетикой, но выраженными иммунологическими различиями. Изоферменты АСТ имеют некоторое различие кинетических характеристик: оптимум действия мАСТ более низкий, чем цАСТ [30].

Аланинаминотрансфераза (АЛТ; глутамат-пируваттрансаминаза; GPT; L-аланин: 2-оксоглутаратаминотрансаминаза, КФ 2.6.1.2) катализирует реакцию преаминирования между L-аланином и α -кетоглутаратом:



АЛТ – вторая активная аминотрансфераза, выделенная из тканей человека. АЛТ присутствует во многих органах: печени, почках, скелетных мышцах, миокарде, поджелудочной железе [29].

Увеличение активности АЛТ отмечено у пациентов при терапии некоторыми лекарственными средствами, особенно антибиотиками, гиполипидемическими препаратами, кетоацидозе, азотемии [25].

В остром периоде инфаркта миокарда повышение активности АСТ – достоверный диагностический тест. В то же время активность АСТ повышена в значительно меньшей степени, чем активность КК или ЛДГ. Ретроспективный дискриминационный анализ выявил хорошую клиническую чувствительность и специфичность исследования активности АСТ (на уровне 73%). Клинико-морфологические исследования показали, что динамику активности АСТ можно использовать для расчета объема поражения при инфаркте миокарда при небольших очагах некроза миоцитов столь же достоверно, как и на основании активности КК [29].

1.3.3 γ -Глутамилтранспептидаза

В последние годы в клинической химии подобающее место заняло определение активности у γ -глутамилтрансферазы (ГГТ; γ -глутамилтранспептидазы, КФ 2.3.2.2).

ГГТ катализирует перенос γ -глутамила на аминокислоту или пептид, на другую молекулу субстрата или воду. ГГТ – белок, состоящий из одной полипептидной цепи с молекулярной массой 90 кД. Фермент содержит гидрофильный и гидрофобный фрагменты. Активный центр расположен на гидрофильном участке полипептидной цепи. Гидрофобная область – часть цепи, которой фермент прикреплен к мембране. Если экстракцию фермента из тканей провести используя в качестве детергента желчные кислоты или тритон X-100, ГГТ вместе с гидрофобным участком может быть переведена в раствор. Если в экстрагирующую смесь включены только протеазы (папаин или трипсин), гидрофобный фрагмент ГГТ остается на мембране, а в растворе оказывается гидрофильная часть полипептида ГГТ. Гидрофильные фрагменты ГГТ, изолированные из печени или почек, иммунологически сходны, так же, как и гидрофобные фрагменты ГГТ, изолированные из разных органов [29].

ГГТ играет важную роль в метаболизме аминокислот. Комплекс биохимических реакций реабсорбции аминокислот из первичной мочи, профильтрованной через фильтрационный барьер почечных телец, называется глутаминовым циклом. Начинается данный процесс с действия ГГТ, расположенной на наружной поверхности клеточной мембраны и связывающей аминокислоту первичной мочи с клеткой эпителия канальцев при участии естественного субстрата глутатиона, образуя тройной комплекс: аминокислота-ГГТ-глутатион. Отмечается ингибирование реакции высокими концентрациями субстратов. Вследствие связывания 2 субстратов в активном центре фермента происходит перенос глутаминовой кислоты от глутатиона к аминокислоте.

В этой фазе цикла аминокислоту переносят в клетку, где происходят последующие реакции, в которых глутаминовая циклотрансфераза расщепляет связь между амино- и глутаминовой кислотой, потребляя молекулу АТФ. Роль ГГТ печени полностью не выяснена; предположительно фермент связывает молекулы веществ, которые необходимо экскретировать [30].

Биологическая роль фермента связана также с регуляцией уровня глутатиона в тканях. Именно этим можно дать объяснение высокому уровню глутатиона в плазме крови и моче пациентов с генетически детерминированным отсутствием синтеза ГГТ. Регулируя уровень глутатиона, ГГТ может влиять на синтез белка, что даёт объяснение повышенной удельной активности фермента в тканях с высокой скоростью метаболизма [35].

ГГТ содержится в основном в мембране клеток с высокой секреторной или адсорбционной способностью: эпителиальных клетках, выстилающих желчные пути, печеночных канальцах, панкреатической экзокринной ткани и выводных протоках, ворсинчатых клетках тонкой кишки. В порядке снижения удельной активности ГГТ ткани располагаются в следующей последовательности: почки, печень, поджелудочная железа, щеточная кайма клеток тонкой кишки. У взрослых высокая удельная активность ГГТ присутствует лишь в гепатоцитах периферической зоны печеночных долек, богатых билиарными эпителиальными клетками, тогда как у новорожденных отмечается высокая удельная активность ГГТ во всей ткани печени [30].

Зачастую, причиной повышения активности ГГТ в сыворотке крови является патология печени. Слабое токсическое воздействие на печень, вызывающее жировую инфильтрацию, прием алкоголя и лекарственных препаратов сопровождаются умеренным увеличением активности ГГТ [31].

Рост активности ГГТ отмечается у половины больных стенокардией и у части пациентов с коронарной недостаточностью и недостаточностью кровообращения; изменения активности ГГТ не имеют значения в диагностике инфаркта миокарда. При инфаркте миокарда остаются неясными механизмы увеличения активности ГГТ, так как она отсутствует в сердечной мышце [17].

Активность ГГТ в моче выше, чем в сыворотке крови. Присутствующая в моче ГГТ имеет почечное происхождение: фермент выделяется в мочу из разрушенных клеток проксимальных отделов канальцев, содержащих высокую концентрацию ГГТ [30].

В ходе изготовления манжеты клапана использовали хлороформ, а стерилизацию проводили окисью этилена, содержание этих веществ, оказывающих отрицательное воздействие на организм человека должно быть строго контролируемым. При оценке общего токсического действия медицинских изделий согласно ГОСТ Р ИСО 10993-11-2011, необходимым является определение активности ферментов АЛТ, АСТ, ГГТ [8].

1.3.4 Щелочная фосфатаза

Щелочная фосфатаза ключевой фермент в фосфорно – кальциевом обмене, способствует поступлению в клетки фосфора, необходимого для нормального метаболического процесса, отщепляя его от алкалоидов, нуклеотидов и белков. Наиболее активен фермент в щелочной среде.

Являясь катализатором некоторых биохимических реакций клеток желчевыводящих путей и печени, концентрация щелочной фосфатазы в крови позволяет выявить состояние систем организма, изменение ее уровня свидетельствует о патологических процессах в некоторых тканях [65]. Нормой фермента принято считать от 20 до 140 МЕ/л [49].

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Имплантация образцов животным и забор крови

Для оценки общего токсического действия полиэфирной ткани с антипролиферативным покрытием образцы материала размером 10×10 мм имплантировали подкожно.

Всего в эксперименте участвовало 30 самцов белых беспородных крыс в возрасте 3-х месяцев и массой 250-300 г. Они были разделены на 5 групп, в каждой группе по 6 животных: интактная, 2 контрольных, 2 опытных группы. Для исследования воздействия имплантов на окружающие ткани и организм животного в целом, были определены следующие имплантационные периоды: 1 неделя, 4 недели после операции. По окончании этого срока животных выводили из эксперимента путем декапитации, проводили забор биологического материала.

Интактным животным оперативное вмешательство не проводилась. Контрольным животным проводилось оперативное вмешательство без имплантации образцов. Опытным животным проводилось оперативное вмешательство с имплантацией образцов полиэфирной ткани с антипролиферативным покрытием.

Операция проводилась в стерильных условиях, под ингаляционным наркозом. Предварительно был удален волосяной покров в зоне операции, участок линии разреза обработан антисептическим раствором.

Скальпелем выполняли разрезы длиной до 1 см вдоль средней линии спины, формировали под кожей карманы, в которые помещали образцы полиэфирной ткани с антипролиферативным покрытием так, чтобы они друг с другом не соприкасались. Завершив хирургическую операцию, разрез закрыли с помощью стерильного шовного материала.

По окончании эксперимента в установленные сроки после имплантации образцов производили забор крови. Кровь центрифугировали

в течение 15 минут при 4000 об/мин для получения сыворотки. Для оценки белково– азотистого обмена в сыворотке крови определяли концентрацию общего белка, мочевины, альбуминов. Изменение липидного обмена оценивают по уровню общего холестерина и триглицеридов. Углеводный обмен изучали по динамическому изменению в крови содержанию глюкозы. Минеральный и водно – солевой обмен оценивают по уровням калия, магния, натрия, кальция, хлоридов, неорганического фосфата. Состояние скелетных мышц оценивали по сывороточной активности креатинина.

Все этапы работы проходили в соответствии с ГОСТ Р ИСО 10993 «Оценка биологического действия медицинских изделий» [9, 10, 8, 13].

- 1) ГОСТ Р ИСО 10993-1-2011 «Оценка и исследования»;
- 2) ГОСТ Р ИСО 10993-2-2011 «Требования к обращению с животными»;
- 3) ГОСТ Р ИСО 10993-11-2011 «Исследование общетоксического действия»;
- 4) ГОСТ Р ИСО 10993-12-2011 «Приготовление проб и стандартные образцы».

2.2 Определение активности аланинаминотрансферазы, аспартатаминотрансферазы, гамма-глутамилтранспептидазы, щелочной фосфатазы

Определение активности ферментов в сыворотке крови крыс проводили с использованием клинико-диагностических наборов «Ольвекс-Диагностикум».

Колориметрический динитрофенилгидразиновый метод Райтмана-Френкеля является унифицированным. Метод основан на том, что под действием фермента в результате переаминирования происходит перенос аминогруппы с аспартата на α -кетоглутарат (АСТ) и с аланина на α -

кетоглутарат (АЛТ). Активность фермента пропорциональна количеству образовавшихся динитрофенилгидразонов пирувата и оксалоацетата в щелочной среде, которое определяется фотометрически при длине волны 500-560 нм [30].

Определение активности γ -ГТ проводилось унифицированным методом по «конечной точке». В основе метода лежит реакция взаимодействия L- γ -глутамил-3-карбокси-4-нитроанилида с глицилглицином. В результате переноса глутамина образуется L- γ -глутамилглицилглицин и 5-амино-2-нитробензоат. Активность фермента пропорциональна количеству образовавшегося 5-амино-2-нитробензоата, которое определяется фотометрически при длине волны 405 нм [30].

Определение активности ЩФ основано на образовании, в щелочной среде, окрашенного p-нитрофенола, в реакции дефосфолирования субстрата p-нитрофенилфосфата. Увеличение концентрации p-нитрофенола пропорционально активности ЩФ, определяется фотометрически при длине волны 405 нм [30, 54, 53, 38].

2.3 Определение концентраций ионов натрия, калия, кальция, фосфатов и хлоридов

Определение концентраций ионов в сыворотке крови крыс проводили с использованием клинико-диагностических наборов «Ольвекс-Диагностикум».

Принцип метода определения калия основан на турбидиметрическом методе без депротеинизации. В реакции ионов калия с тетрафенил-боратом оптическую плотность образующейся стабильной суспензии измеряют фотометрически при 578 нм, оптическая плотность пропорциональна концентрации ионов калия [48] .

Определение фосфат-ионов основано на их способности к образованию в присутствии детергента в кислой среде фосфорномолибденового комплекса с молибдатом аммония. Оптическую плотность измеряют при 340 нм, значения пропорциональны концентрации фосфатов [47].

Концентрацию хлоридов измеряют фотометрически при 540 нм, в присутствии ионов хлора в кислой среде тиоцианат ртути образует тиоцианат-ионы, формирующие окрашенный комплекс с Fe^{3+} [44].

Метода определения концентрации ионов кальция основан на образовании окрашенного комплекса с хромогеном Арсеназо III, интенсивность окраски которого измеряют фотометрически при 650 нм [37].

Содержащийся в образце натрий осаждается уранилацетатом магния. Уранил-ионы, оставшиеся в растворе, образуют окрашенный комплекс с тиогликолятом аммония. Концентрация натрия пропорциональна разности между контрольной (без преципитации) и опытной пробами и определяется фотометрически при длине волны 405 нм [58, 45].

2.4 Определение концентраций альбумина, глюкозы, холестерина, креатинина, мочевины, триглицеридов и общего белка

Концентрацию основных органических компонентов сыворотки крови крыс определяли с использованием клинико-диагностических наборов «Ольвекс-Диагностикум».

Концентрацию альбумина определяли унифицированным колориметрическим методом с бромкрезоловым зелёным. Альбумин образует окрашенный комплекс с бромкрезоловым зеленым в слабокислой среде в присутствии детергента. Интенсивность окраски пропорциональна

концентрации альбумина в пробе и измеряется фотометрически при длине волны 630 нм [39].

Определение концентрации глюкозы в сыворотке крови происходило энзиматическим колориметрическим методом без депротеинизации.

Принцип метода состоит в то, что β -D-глюкоза под действием фермента глюкозооксидазы окисляется до D-глюконолактона. Образующаяся в данной реакции перекись водорода при участии фермента пероксидазы способствует окислительному азосочетанию 4-аминоантипирина и фенола с образованием окрашенного соединения (хинониминный краситель). Интенсивность окраски реакционной среды пропорциональна содержанию глюкозы в исследуемом материале и определяется фотометрически при длине волны 505 нм [55].

Определение креатинина в сыворотке крови проводилось методом Яффе с депротеинизацией. Креатинин в щелочной среде образует с пикриновой кислотой окрашенный комплекс. интенсивность окраски комплекса пропорциональна концентрации креатинина в пробе и измеряется фотометрически при длине волны 505 нм [52].

Концентрация мочевины в сыворотке крови определяли колориметрически, при этом аммиак и двуокись углерода, образовавшиеся из мочевины гидролизовавшейся под действием уреазы, взаимодействуют с фенол-гипохлоридным реагентом. Образовавшийся комплекс индофенола измеряют фотометрически при 540 нм против концентрации мочевины [40].

Определение концентрации общего белка в сыворотке крови биуретовым методом. Принцип метода основан на том, что белок образует окрашенный комплекс с ионами меди в щелочной среде. Интенсивность окраски пропорциональна концентрации белка в пробе и определяется фотометрически при длине волны 540 нм [57].

Определение концентрации триглицеридов в сыворотке крови проводилось энзиматическим колориметрическим методом. Липаза

катализирует гидролиз липидов до глицерина и жирных кислот. Глицерин запускает ряд сопряженных ферментативных реакций с участием ферментов глицерокиназы в присутствии АТФ и глицеролфосфатоксидазы. Образующаяся в ходе данных реакций перекись водорода при участии фермента пероксидазы способствует окислительному азосочетанию 4-аминоантипирина и фенола с образованием окрашенного соединения (хинониминный краситель). Интенсивность окраски реакционной среды пропорциональна содержанию триглицеридов в исследуемом материале и определяется фотометрически при длине волны 505 нм [55].

Определение концентрации общего холестерина в сыворотке крови животных проводилось энзиматическим колориметрическим методом. Холестерин из состава эфиров высвобождается под действием фермента холестерин-эстеразы. При участии фермента холестериноксидазы холестерин окисляется до 4-холестен-3-она. Образующаяся перекись водорода, при участии фермента пероксидазы, способствует окислительному азосочетанию 4-аминоантипирина и фенола с образованием окрашенного соединения (хинониминный краситель). Интенсивность окраски реакционной среды пропорциональна содержанию холестерина в исследуемом материале и определяется фотометрически при длине волны 505 (490-520) нм [41, 55].

2.5 Методы статистической обработки результатов

При оценке полученных экспериментальных данных были использованы методы статистического описания, а также методы проверки статистических гипотез, использующиеся в стандартных пакетах программы Statistica 6.0. Результаты выражали как среднее арифметическое $\bar{X}$, статистическую девиацию SD или ошибку среднего значения m . Для анализа имеющихся выборок данных использовали

гипотезу нормальности распределения (критерий Колмогорова–Смирнова). При соответствии нормальному закону распределения признака в исследуемых выборках проверку гипотезы о равенстве средних выборочных величин проводили с использованием t-критерия Стьюдента, дисперсионного анализа. Различия считались статистически значимыми при уровне достоверности $p < 0,05$ [19].

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Тканевая реакция на имплантацию образцов полиэфирной ткани с антипролиферативным покрытием

Для оценки тканевой реакции на имплантацию образцов полиэфирной ткани с антипролиферативным покрытием, разработанным ЗАО НПП «МедИнж», была проведена подкожная имплантация материала белым беспородным крысам. В качестве контроля служили образцы полиэфирной ткани без антипролиферативного покрытия.

Изменение структуры тканей, окружающих образцы полиэфирной ткани, изучали методом световой микроскопии с окраской препаратов гематоксилин-эозином и по Вейгерт-Ван-Гизону (рисунок 5-8).

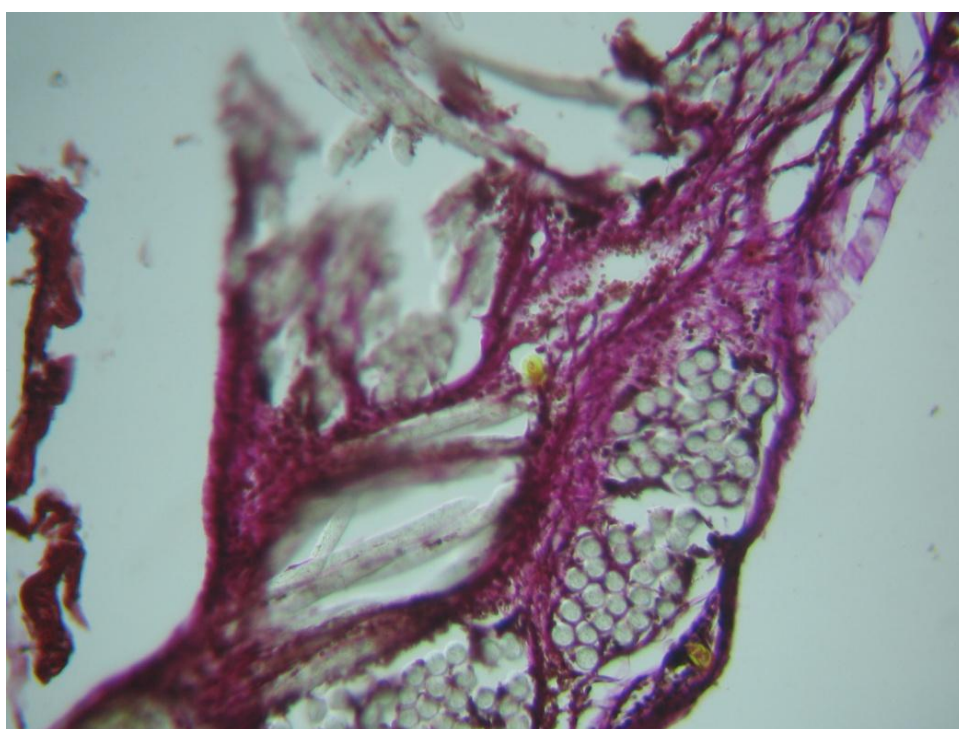


Рис. 5. Результаты гистологического исследования образцов полиэфирной ткани через 1 неделю после имплантации, окраска по Вейгерт-Ван-Гизону,

× 200

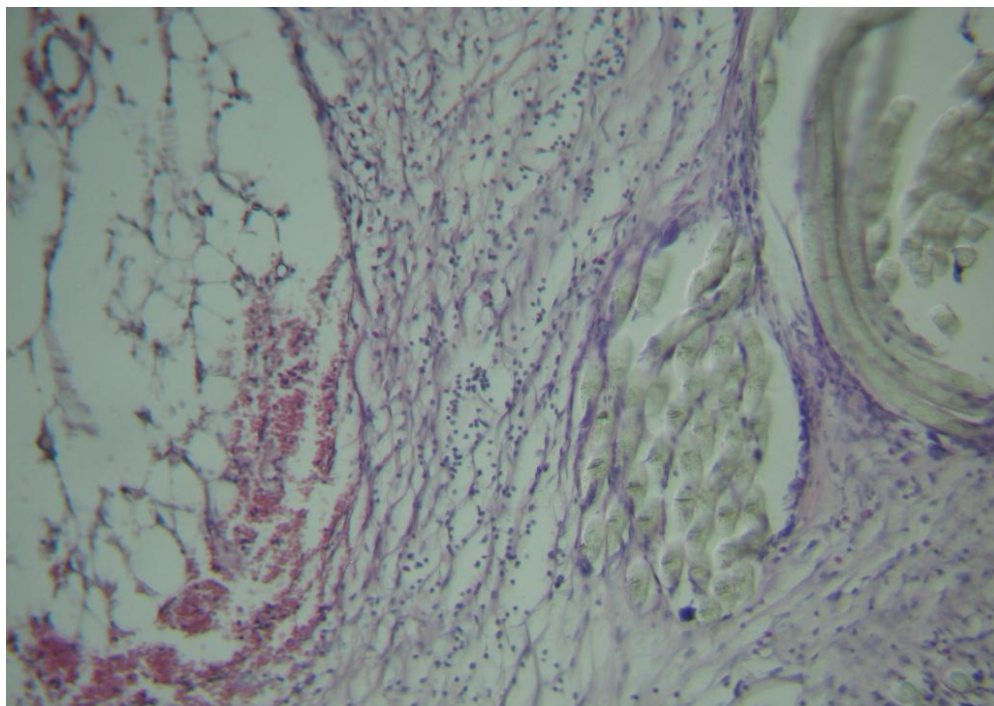


Рис. 6. Результаты гистологического исследования образцов полиэфирной ткани через 1 неделю после имплантации, окраска гематоксилин-эозином, $\times 200$

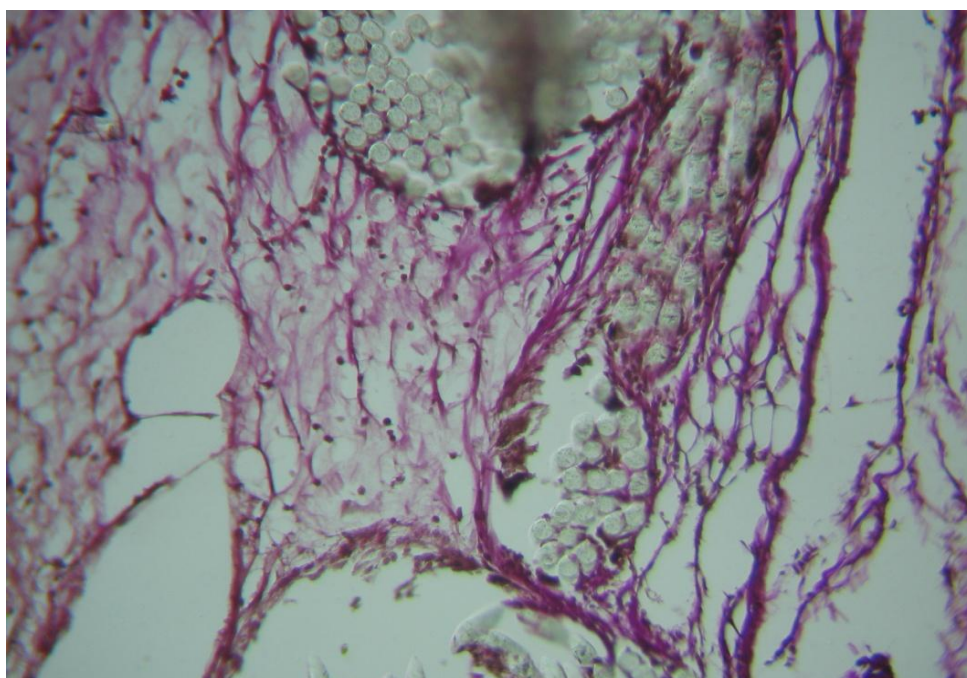


Рис. 7. Результаты гистологического исследования образцов полиэфирной ткани через 4 недели после имплантации, окраска по Вейгерт-Ван-Гизону, $\times 200$

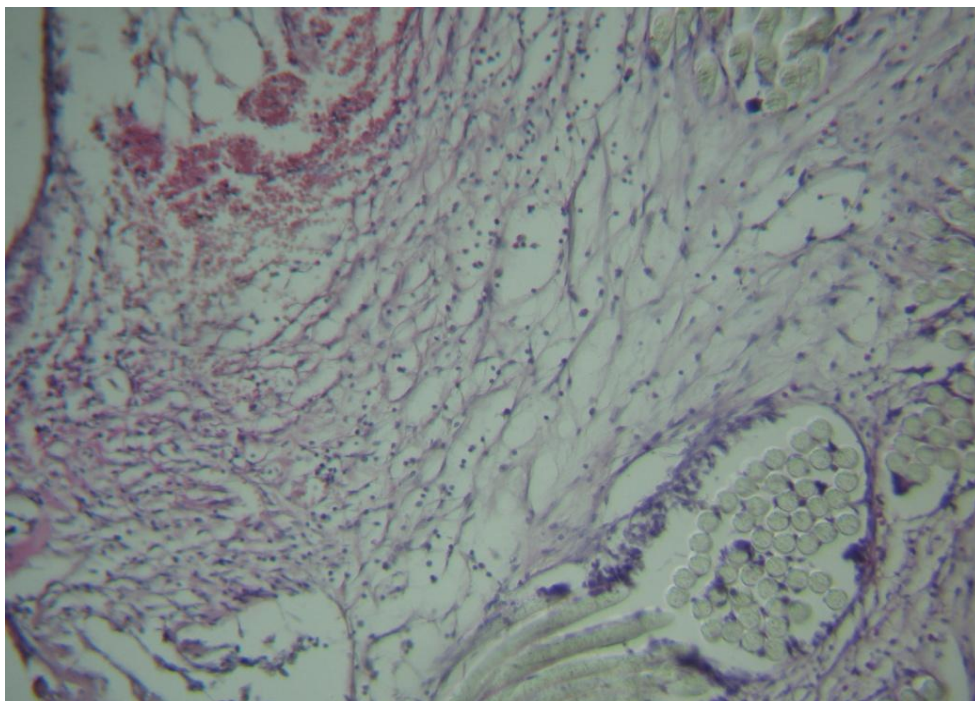


Рис. 8. Результаты гистологического исследования образцов полиэфирной ткани через 4 недели после имплантации, окраска гематоксилин-эозином, $\times 200$

При морфологическом исследовании зоны имплантации контрольных образцов (полиэфирная ткань без антипролиферативного покрытия) через 1 неделю после операции отмечена слабо выраженная воспалительная реакция и избыточное образование соединительной ткани, как между пучками волокон, так и между отдельными волокнами полиэфирной ткани.

Через 4 недели после оперативного вмешательства отмечено отсутствие воспалительной реакции вокруг образцов. Прирост соединительной ткани вокруг имплантата значительный. Отмечено большое новообразование сосудов, что свидетельствует об успешной регенерации.

Изменение структуры тканей, окружающих образцы полиэфирной ткани с антипролиферативным покрытием, изучали методом световой микроскопии с окраской препаратов гематоксилин-эозином и по Вейгерт-Ван-Гизону (рисунок 9-12).

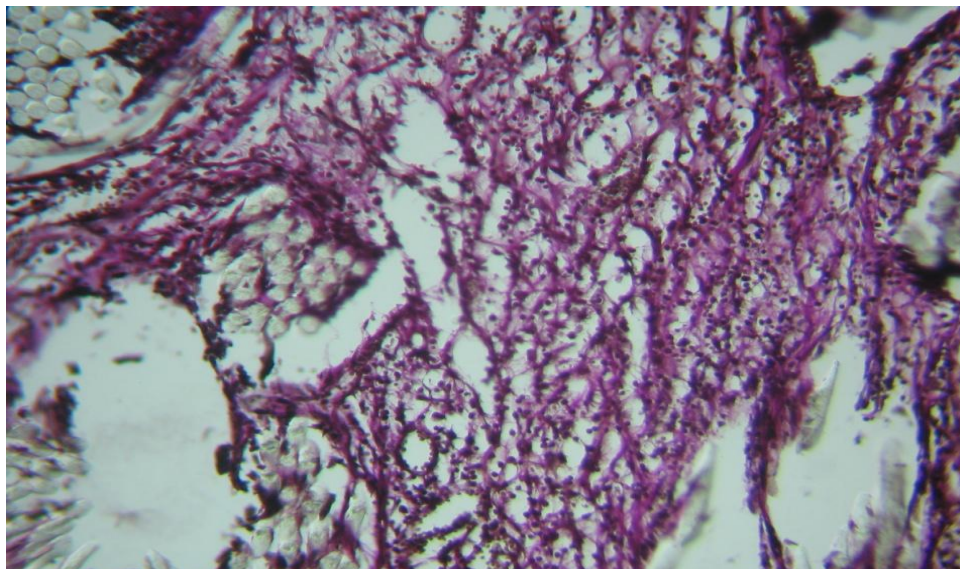


Рис. 9. Результаты гистологического исследования образцов полиэфирной ткани с антипролиферативным покрытием через 1 неделю после имплантации, окраска по Вейгерт-Ван-Гизону, x200

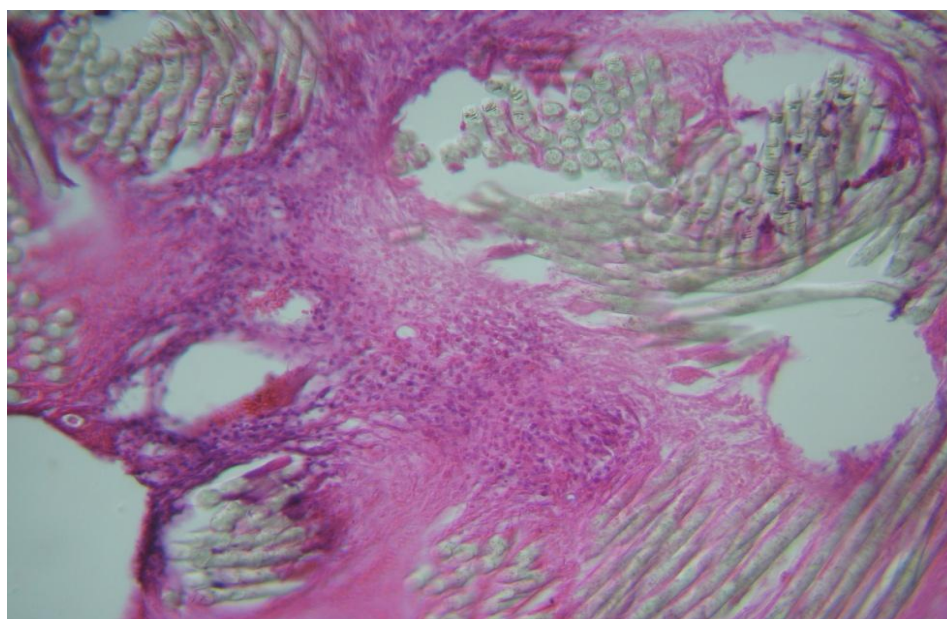


Рис. 10. Результаты гистологического исследования образцов полиэфирной ткани с антипролиферативным покрытием через 1 неделю после имплантации, окраска гематоксилин-эозин, x200

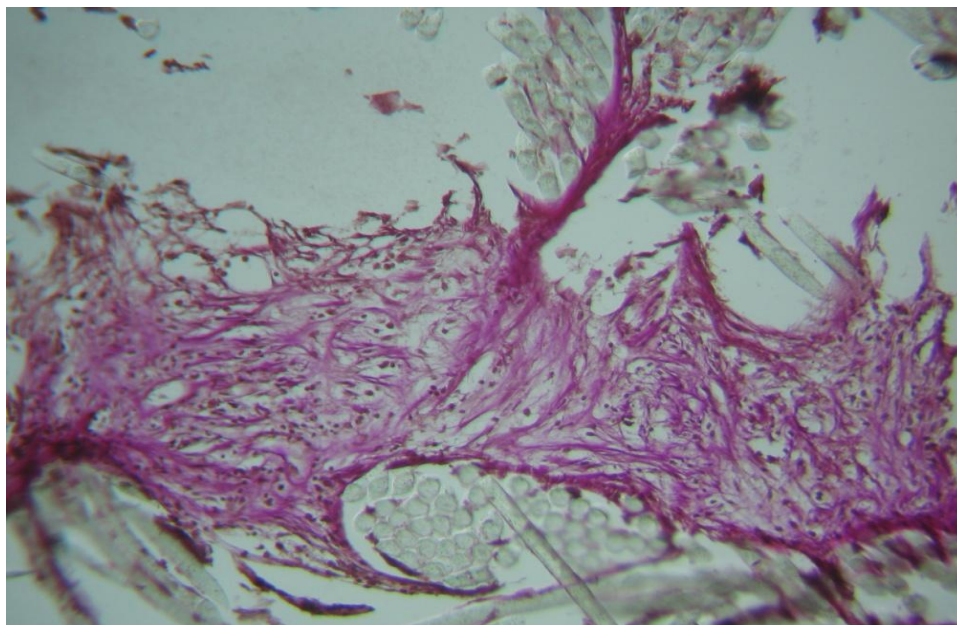


Рис. 11. Результаты гистологического исследования образцов полиэфирной ткани с антипролиферативным покрытием через 4 недели после имплантации, окраска по Вейгерт-Ван-Гизону, х200

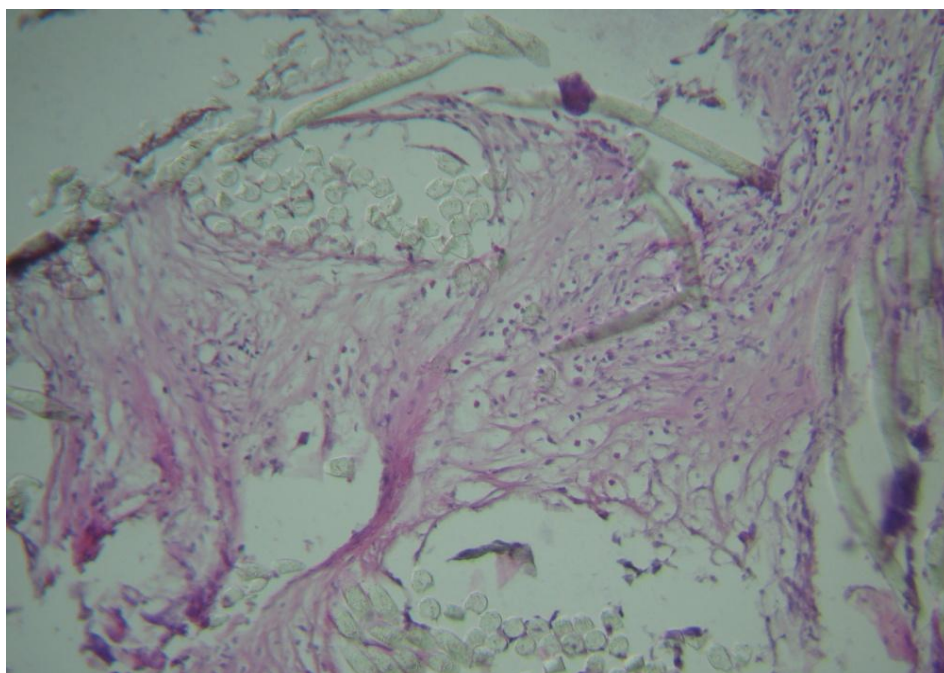


Рис. 12. Результаты гистологического исследования образцов полиэфирной ткани с антипролиферативным покрытием через 4 недели после имплантации, окраска гематоксилин-эозин, х200

Результаты морфологического исследования зоны имплантации через 1 неделю после операции при использовании имплантата из полиэфирной ткани с антипролиферативным покрытием показали отсутствие воспалительной реакции, образование тонкой соединительнотканной капсулы вокруг имплантата. Образование небольшого количества новых кровеносных сосудов можно расценить как признак регенерации. Через 4 недели в местах прилегания полиэфирной ткани к тканям реципиента отмечены активное формирование собственных коллагеновых и эластических волокон, ангиогенез.

Основной задачей антипролиферативного покрытия являлось подавление избыточного образования соединительной ткани вокруг образца полиэфирной ткани, результаты гистологического исследования показали эффективность данного покрытия.

3.2 Результаты определения биохимических параметров сыворотки крови крыс

Целью исследования биохимических параметров сыворотки крови белых беспородных крыс было выявление воздействия хирургического вмешательства и материала на организм реципиента, изменение значений биохимических параметров крови животных, а так же степень восстановления показателей до нормальных значений после операции.

Забор крови и определение биохимических параметров проводили до операции и по истечении одной и четырех недель после оперативного вмешательства.

Нормальные значения биохимических показателей сыворотки крови крыс представлены в таблице 1.

Таблица 1.

*Нормальные значения биохимических параметров сыворотки
крови крыс*

Биохимия крови	в наборе	min	max
АСТ	мкмоль/с*л	0,083	0,517
АЛТ	мкмоль/с*л	0,077	0,72
ЩФ	мкмоль/с*л	0,063	2,584
ГГТ	мкмоль/с*л	0	0,117
Альбумин	г/л	27	46
Глюкоза	ммоль/л	6,1	15,9
Холестерин	ммоль/л	0,91	1,67
Триглицериды	ммоль/л	1,4	1,8
Креатинин	мкмоль/л	44,2	141,4
Мочевина	ммоль/л	2,3	6,6
Общий белок	г/л	54	75
Калий	ммоль/л	3,7	5
Кальций	ммоль/л	2,4	4,2
Натрий	ммоль/л	135	147
Фосфор	ммоль/л	0,6	2,7
Хлориды	ммоль/л	92	112

Состояние экспериментальных животных до операции оценивали визуально. У всех животных определялись биохимические параметры сыворотки крови, которые соответствовали нормальным значениям, что свидетельствовало о нормальном состоянии животных на момент имплантации образцов полиэфирной ткани с антипролиферативным покрытием.

Данные о значениях биохимических параметров сыворотки крови крыс на разных сроках после оперативного вмешательства представлены на рисунках 13 - 28.

Результаты исследования активности аспаратаминотрансферазы в сыворотке крови крыс интактной, контрольной и опытной групп через 1 и 4 недели после операции представлены на рисунке 13.

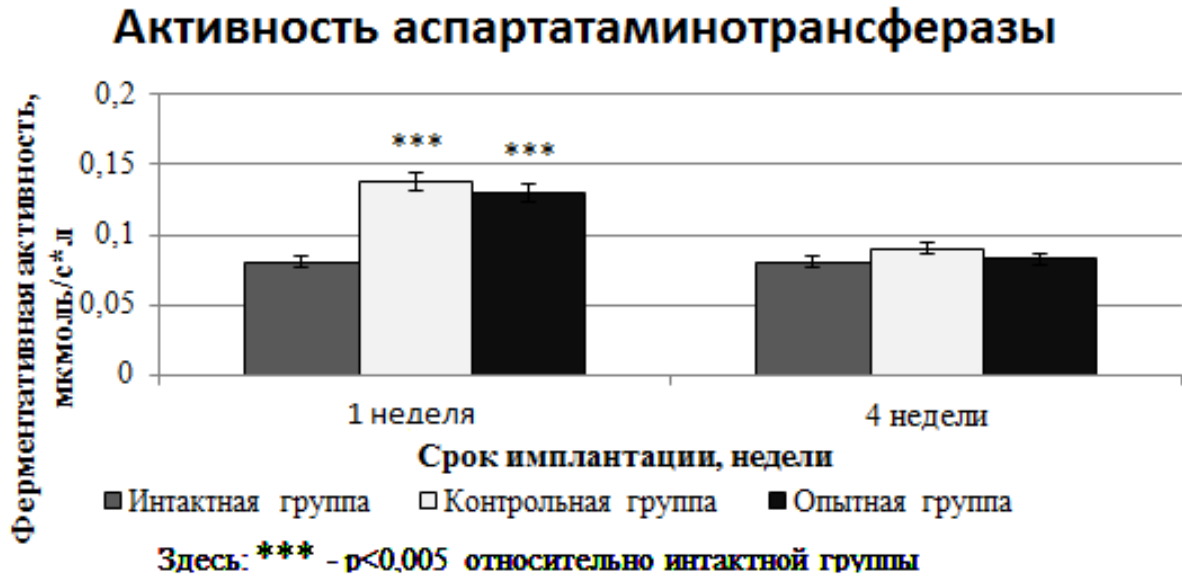


Рис. 13. Активность аспаратаминотрансферазы в сыворотке крови крыс через 1 и 4 недели после имплантации образцов полиэфирной ткани с антипролиферативным покрытием (нкат/л , $M \pm m$, $n=6$)

У интактных животных показатели активности АСТ соответствуют нормальным значениям. Через 1 неделю после операции наблюдается увеличение активности фермента на 71% в контрольной группе относительно интактной и на 63% в опытной группе относительно интактной. Достоверных отличий в ферментативной активности опытной и контрольной групп не обнаружено. Через 4 недели после оперативного вмешательства активность АСТ в контрольной и опытной группах соответствовала нормальным значениям, изменений относительно интактной группы не выявлено. Повышение активности АСТ через 1 неделю после имплантации материалов может быть следствием применения наркоза и проведения оперативного вмешательства, о чем также свидетельствует нормализация значений параметра к 4 неделе.

Результаты исследования активности аланинаминотрансферазы в сыворотке крови крыс интактной, контрольной и опытной групп через 1 и 4 недели после операции представлены на рисунке 14.

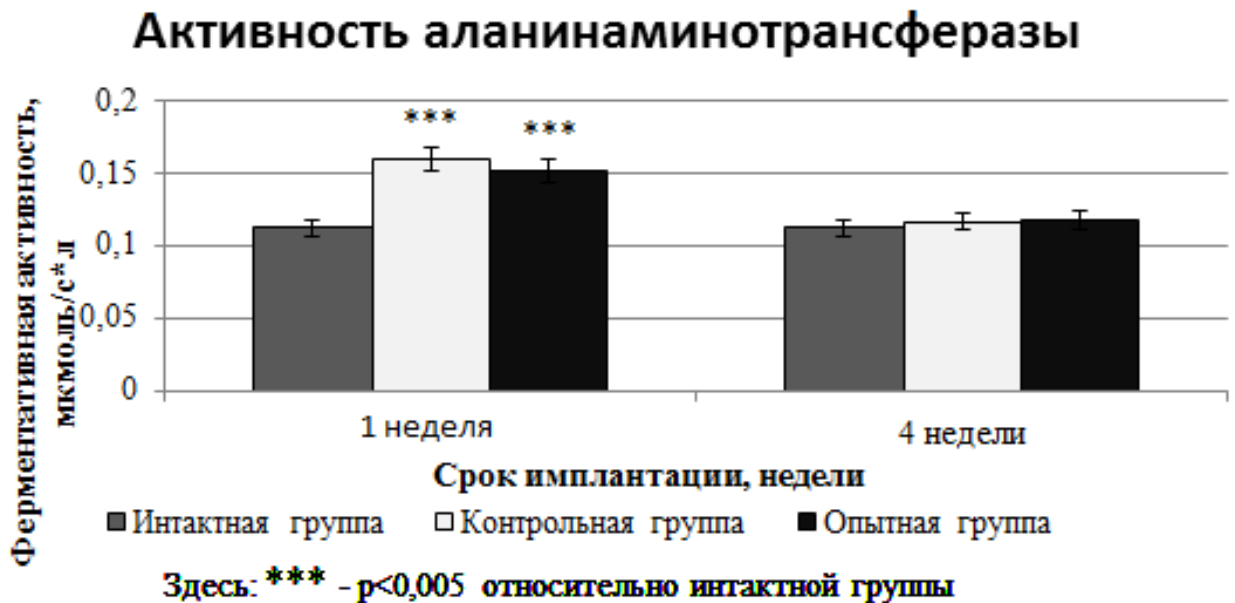


Рис. 14. Активность аланинаминотрансферазы в сыворотке крови крыс через 1 и 4 недели после имплантации образцов полиэфирной ткани с антипролиферативным покрытием (пкат/л , $M \pm m$, $n=6$)

У интактных животных показатели активности АЛТ соответствуют нормальным значениям. На первой неделе после операции обнаружено повышение активности АЛТ в контрольной группе относительно интактной на 42%, увеличение активности в опытной группе относительно интактной на 34%. Достоверных отличий в ферментативной активности опытной и контрольной групп не обнаружено. К четвёртой неделе значения ферментативной активности не отличаются от интактной группы. Данные изменения могут быть следствием применения наркоза и проведения оперативного вмешательства.

Результаты исследования активности гамма-глутамилтрансферазы в сыворотке крови крыс интактной, контрольной и опытной групп через 1 и 4 недели после операции представлены на рисунке 15.

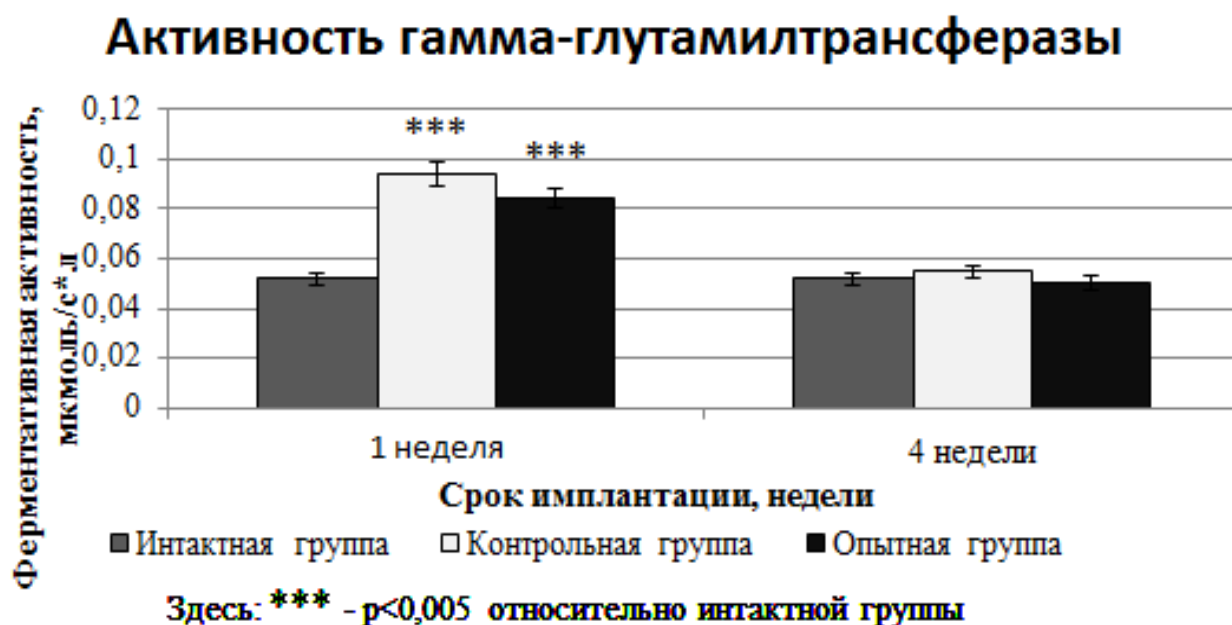


*Рис. 15. Активность гамма-глутамилтранспептидазы в сыворотке крови крыс через 1 и 4 недели после имплантации образцов полиэфирной ткани с антипролиферативным покрытием
(нкат/л , $M \pm m$, $n=6$)*

У интактных животных активность ГГТ соответствует нормальным значениям. Активность в контрольной группе относительно интактной увеличивалась на 81% через 1 неделю после операции, не изменялась через 4 недели. Активность в опытной группе относительно интактной также увеличивалась через 1 неделю на 63% и не изменялась через 4 недели. Достоверные изменения активности фермента между контрольной и опытной группами не выявлены.

Исследование активности АЛТ, АСТ, ГГТ показало одинаковую тенденцию в изменении данных биохимических параметров на разных

сроках после оперативного вмешательства: повышение активности в контрольной и опытной группах относительно интактной через 1 неделю, возвращение значений активности к дооперационным через 4 недели. При этом не выявлены достоверные отличия между контрольной и опытной группами.

Полученные данные свидетельствуют о влиянии применения наркоза и проведения оперативного вмешательства и об отсутствии выраженного токсического действия полиэфирной ткани с антипролиферативным покрытием на организм животного. Результаты согласуются с литературными данными о повышении активности АЛТ, АСТ, ГГТ после операций

Результаты исследования активности щелочной фосфатазы в сыворотке крови крыс интактной, контрольной и опытной групп через 1 и 4 недели после операции представлены на рисунке 16.



Рис. 16. Активность щелочной фосфатазы в сыворотке крови крыс через 1 и 4 недели после имплантации образцов полиэфирной ткани с антипролиферативным покрытием (pkat/l , $M \pm m$, $n=6$)

У интактных животных показатели активности ЩФ соответствуют нормальным значениям. На первой неделе после операции обнаружено снижение активности фермента в контрольной группе относительно интактной на 37% и в опытной относительно интактной на 34%. К четвёртой неделе значения активности в контрольной группе относительно интактной и в опытной относительно интактной по-прежнему остаются сниженными. Данные изменения могут быть следствием изменения характера питания и снижением количества фосфата в корме, также увеличением возраста животного.

Результаты исследования концентрации альбумина в сыворотке крови крыс интактной, контрольной и опытной групп через 1 и 4 недели после операции представлены на рисунке 17.

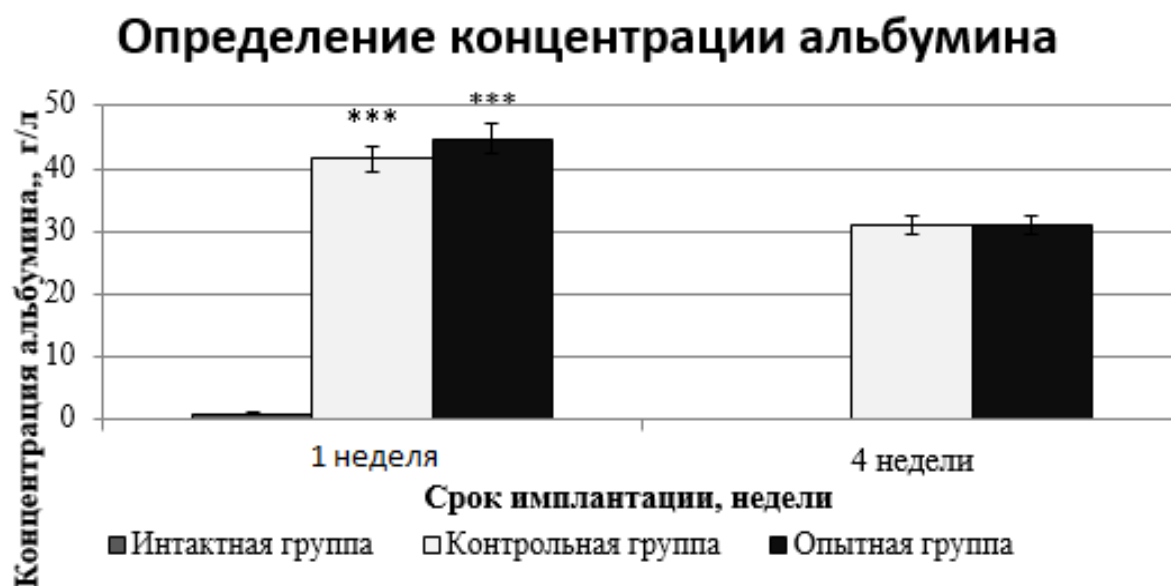


Рис. 17. Концентрация альбумина в сыворотке крови крыс через 1 и 4 недели после имплантации образцов полиэфирной ткани с антипролиферативным покрытием (пкат/л, $M \pm m$, $n=6$)

У интактных животных концентрация альбумина соответствует нормальным значениям. Концентрация в контрольной группе через 1 неделю, относительно интактной, увеличена на 34%, концентрация в опытной относительно интактной увеличена на 45%. Концентрация альбумина после 4 недели в контрольной и опытной группах относительно интактной не выявлены. Данные изменения могут быть следствием обезвоживания организма после проведения операции.

Результаты исследования концентрации глюкозы в сыворотке крови крыс интактной, контрольной и опытной групп через 1 и 4 недели после операции представлены на рисунке 18.

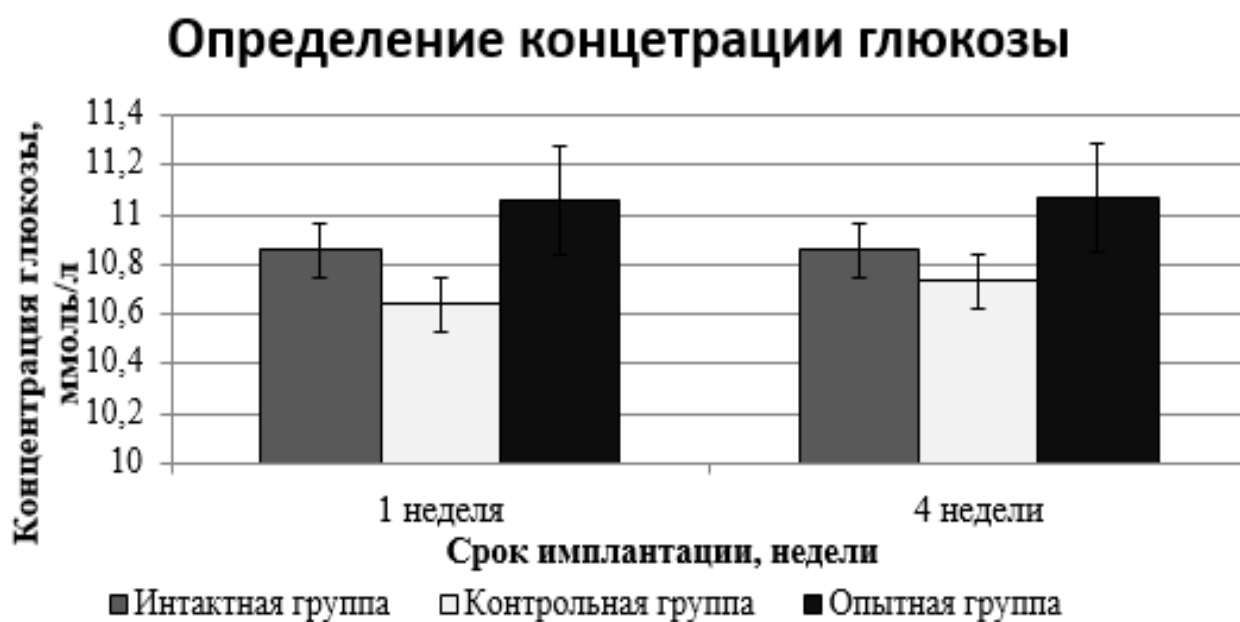


Рис. 18. Концентрация глюкозы в сыворотке крови крыс через 1 и 4 недели после имплантации образцов полиэфирной ткани с антипролиферативным покрытием ($mmol/L$, $M \pm m$, $n=6$)

У интактных животных концентрация глюкозы соответствует нормальным значениям. Достоверные отличия в значениях параметра у разных экспериментальных групп не обнаружены.

Результаты исследования концентрации глюкозы в сыворотке крови крыс интактной, контрольной и опытной групп через 1 и 4 недели после операции представлены на рисунке 19.

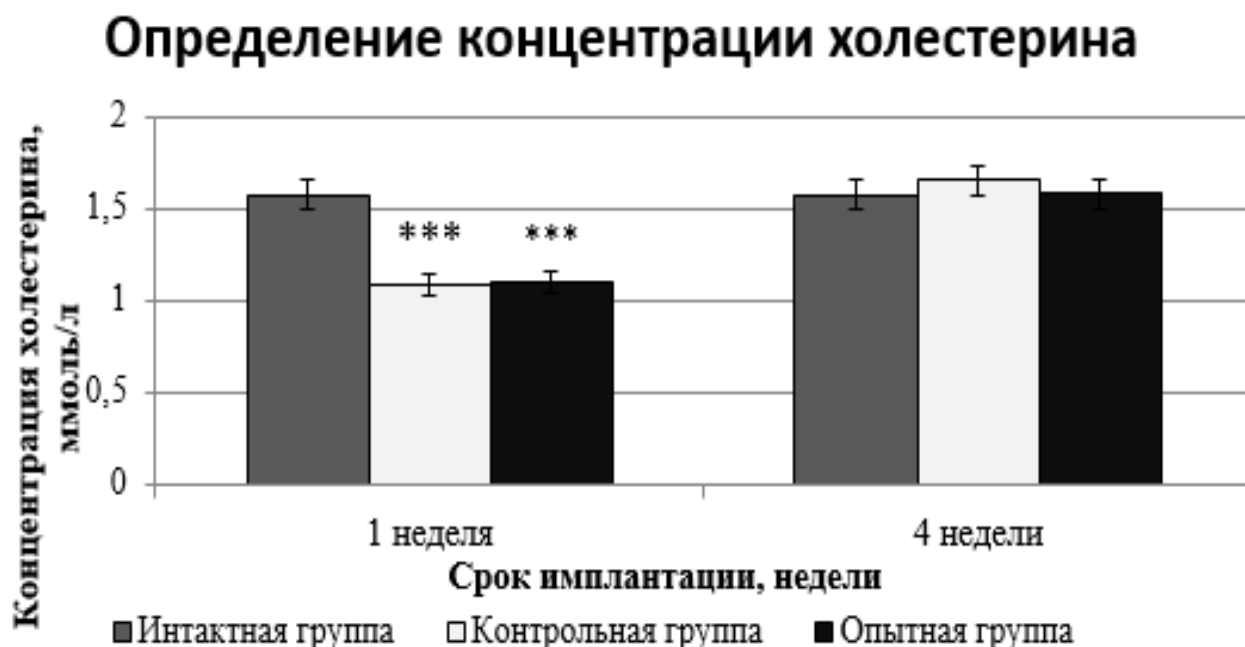


Рис. 19. Концентрация холестерина в сыворотке крови крыс через 1 и 4 недели после имплантации образцов полиэфирной ткани с антипролиферативным покрытием ($nmol/L$, $M \pm m$, $n=6$)

У интактных животных концентрация холестерина соответствует нормальным значениям. Концентрация в контрольной группе через 1 неделю увеличена на 69%, в опытной - на 70% относительно интактной группы.

Результаты исследования концентрации триглицеридов в сыворотке крови крыс интактной, контрольной и опытной групп через 1 и 4 недели после операции представлены на рисунке 20.

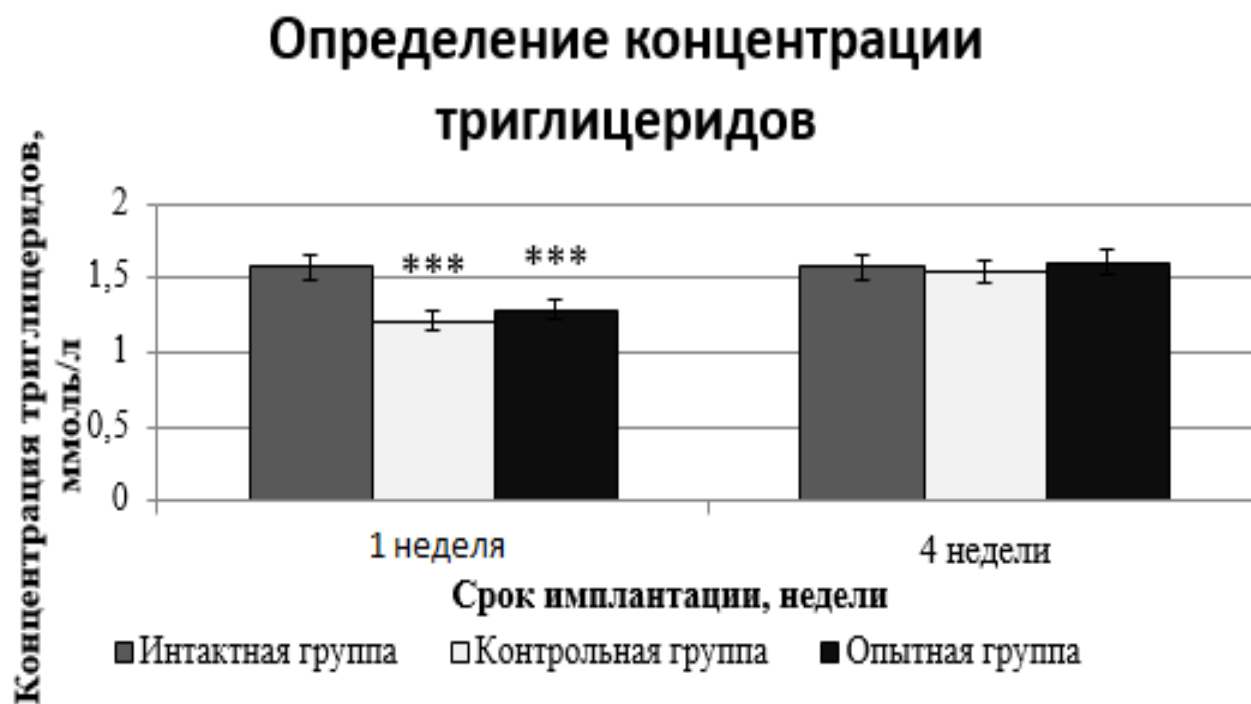


Рис. 20. Концентрация триглицеридов в сыворотке крови крыс через 1 и 4 недели после имплантации образцов полиэфирной ткани с антипролиферативным покрытием (mmol/L , $M \pm m$, $n=6$)

У интактных животных концентрация триглицеридов соответствует нормальным значениям. Концентрация в контрольной группе через 1 неделю после имплантации снижена на 77% относительно интактной группы, концентрация в опытной группе относительно интактной снижена на 81%. После 4 недель имплантации изменения в концентрации триглицеридов в контрольной и опытной группах относительно интактной не выявлены, что свидетельствует о восстановлении организма животного после оперативного вмешательства.

Результаты исследования концентрации креатинина в сыворотке крови крыс интактной, контрольной и опытной групп через 1 и 4 недели после операции представлены на рисунке 21.

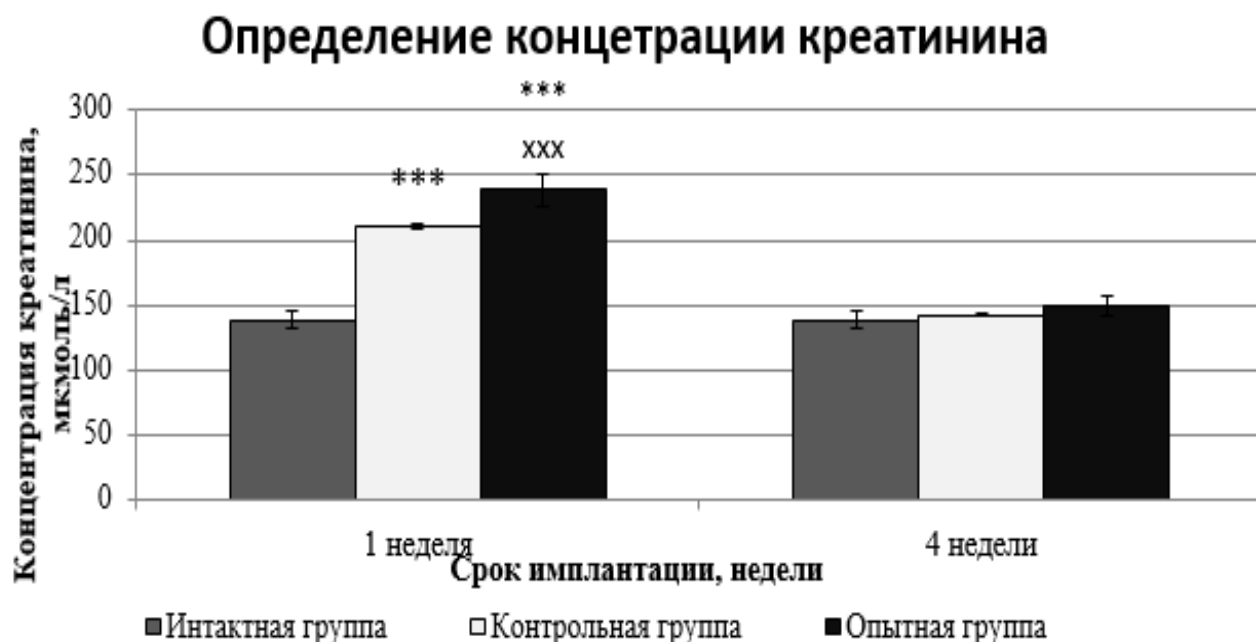


Рис. 21. Концентрация креатинина в сыворотке крови крыс через 1 и 4 недели после имплантации образцов полиэфирной ткани с антипролиферативным покрытием ($\mu\text{кат/л}$, $M \pm m$, $n=6$)

У интактных животных концентрация креатинина соответствует нормальным значениям. Концентрация креатинина в контрольной группе через 1 неделю после имплантации увеличена на 52% относительно интактной группы, концентрация в опытной группе относительно интактной увеличена на 72%. Изменения концентрации креатинина после 4 недели в контрольной и опытной группах относительно интактной не обнаружены. Возвращение показателей к значениям интактной группы говорит о восстановлении организма животного после хирургической операции.

Результаты исследования концентрации мочевины в сыворотке крови крыс интактной, контрольной и опытной групп через 1 и 4 недели после операции представлены на рисунке 22.

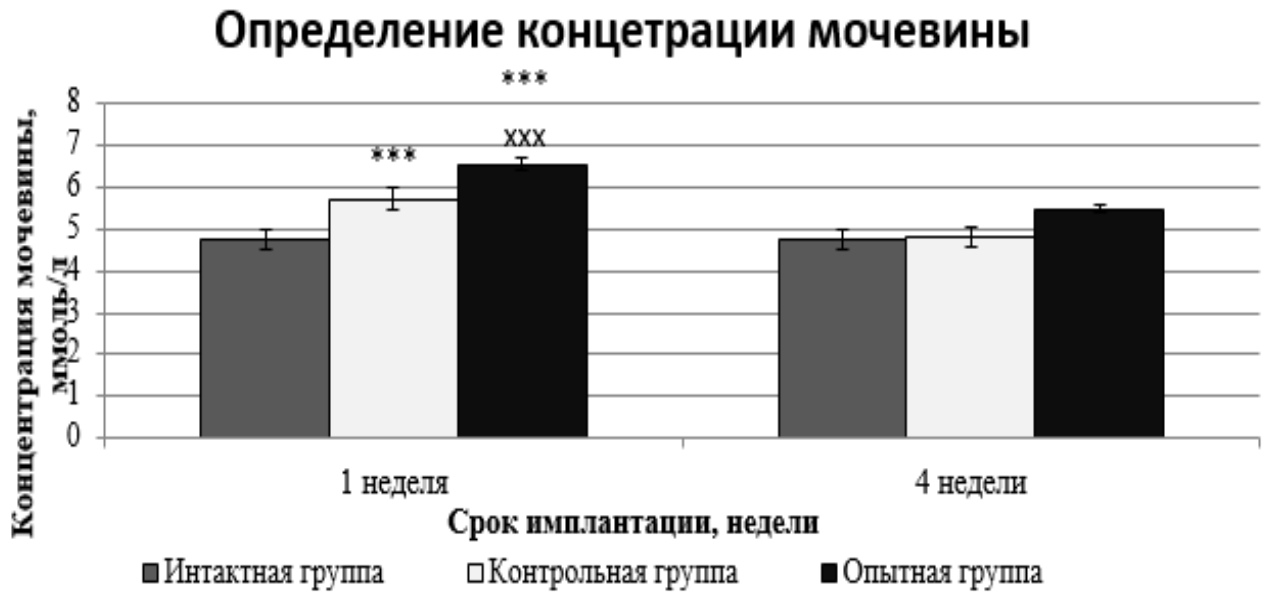


Рис. 22. Концентрация мочевины в сыворотке крови крыс через 1 и 4 недели после имплантации образцов полиэфирной ткани с антипролиферативным покрытием (mmol/L, $M \pm m$, $n=6$)

У интактных животных концентрация мочевины соответствует нормальным значениям. Концентрация в контрольной группе через 1 неделю относительно интактной увеличена на 19%, концентрация в опытной относительно интактной увеличена на 37%. Изменение концентрации мочевины после 4 недель в контрольной и опытной группах относительно интактной не выявлены. Данные изменения могут быть следствием сужения сосудов почек, в результате шокового состояния после операции, и замедлением фильтрации мочи. Так же вследствие хирургического вмешательства.

Результаты исследования концентрации общего белка в сыворотке крови крыс интактной, контрольной и опытной групп через 1 и 4 недели после операции представлены на рисунке 23.

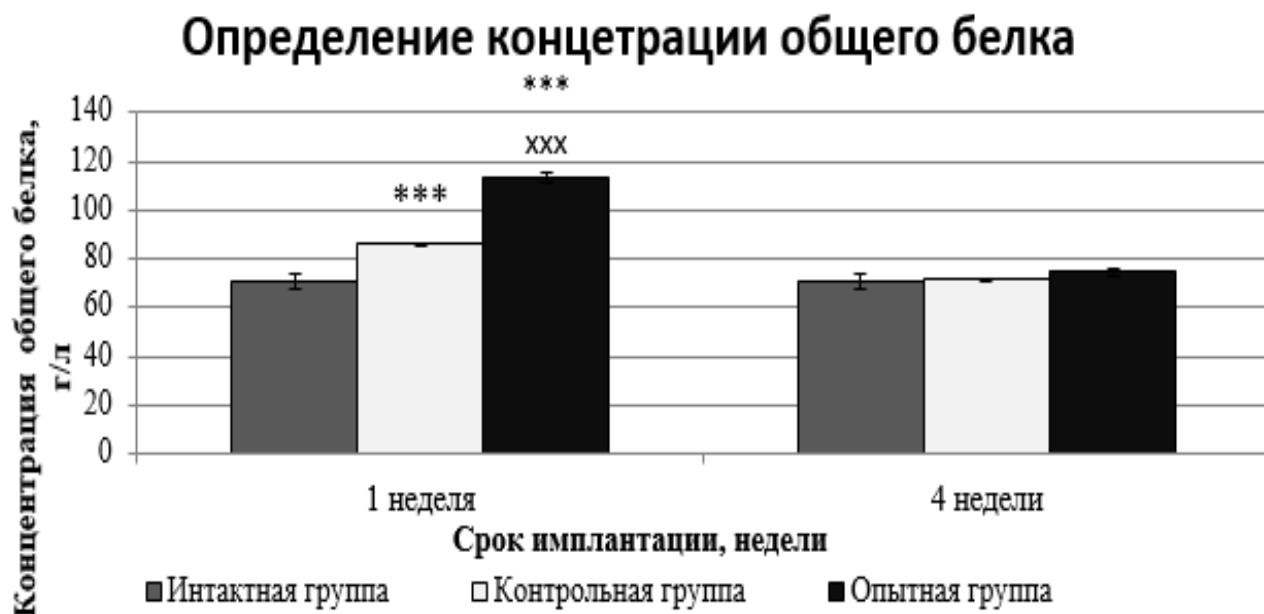


Рис. 23. Концентрация общего белка в сыворотке крови крыс через 1 и 4 недели после имплантации образцов полиэфирной ткани с антипролиферативным покрытием ($ngat/l$, $M \pm m$, $n=6$)

У интактных животных концентрация общего белка соответствует нормальным значениям. Концентрация в контрольной группе через 1 неделю после операции увеличена на 21% относительно интактной, концентрация в опытной увеличена на 60% относительно интактной. Изменения в концентрации общего белка после 4 недель имплантации в контрольной и опытной группах относительно интактной не выявлены. Данные результаты могут быть следствием хирургического вмешательства и обезвоживания после наркоза.

Результаты исследования концентрации калия в сыворотке крови крыс интактной, контрольной и опытной групп через 1 и 4 недели после операции представлены на рисунке 24.

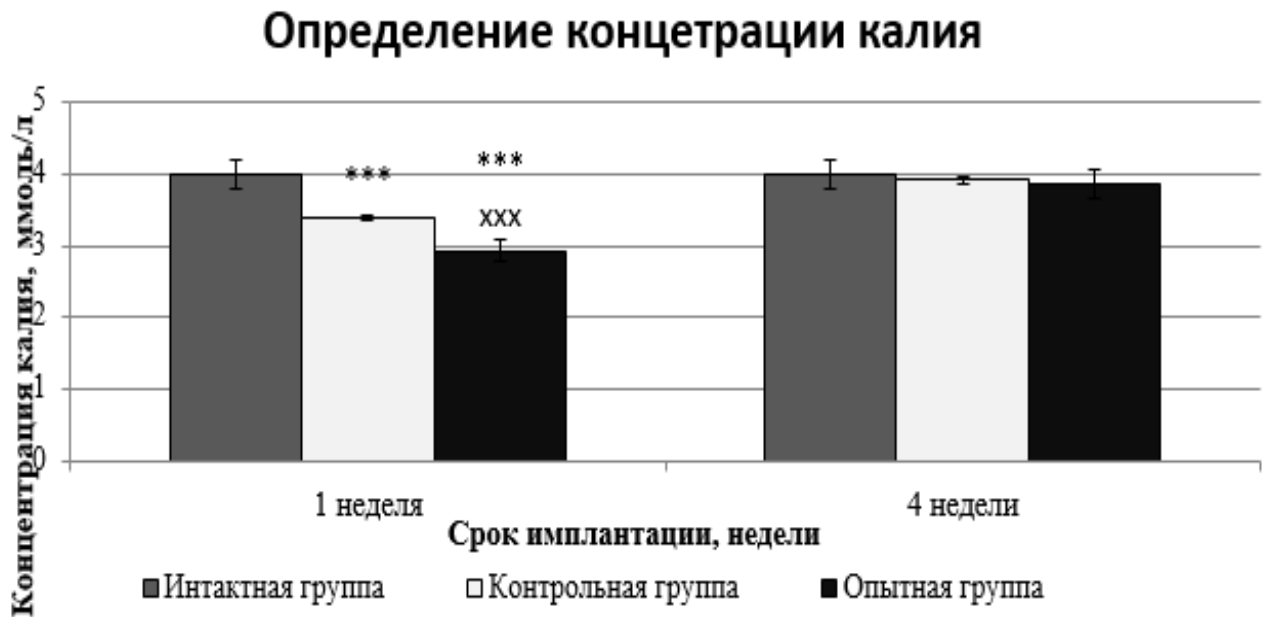


Рис. 24. Концентрация калия в сыворотке крови крыс через 1 и 4 недели после имплантации образцов полиэфирной ткани с антипролиферативным покрытием ($mmol/L$, $M \pm m$, $n=6$)

У интактных животных концентрация калия соответствует нормальным значениям. Концентрация в контрольной группе через 1 неделю, относительно интактной, уменьшена на 73%, концентрация в опытной относительно интактной уменьшена на 84%. Изменение концентрации калия после 4 недели в контрольной и опытной группах относительно интактной не выявлены. Данные результаты могут быть следствием травмирования тканей и развитием воспалительной реакции в послеоперационный период.

Результаты исследования концентрации кальция в сыворотке крови крыс интактной, контрольной и опытной групп через 1 и 4 недели после операции представлены на рисунке 25.



Рис. 25. Концентрация кальция в сыворотке крови крыс через 1 и 4 недели после имплантации образцов полиэфирной ткани с антипролиферативным покрытием (mmol/l, $M \pm m$, $n=6$)

У интактной группы животных концентрация кальция соответствует нормальным значениям. Изменений концентраций в контрольной и опытной группах относительно интактной через 1 и 4 недели после имплантации не выявлено.

Результаты исследования концентрации натрия в сыворотке крови крыс интактной, контрольной и опытной групп через 1 и 4 недели после операции представлены на рисунке 26.



Рис. 26. Концентрация натрия в сыворотке крови крыс через 1 и 4 недели после имплантации образцов полиэфирной ткани с антипролиферативным покрытием ($n_{кат}/л$, $M \pm m$, $n=6$)

У интактных животных концентрация натрия соответствует нормальным значениям. Концентрация в контрольной группе через 1 неделю, относительно интактной, увеличена на 45%, концентрация в опытной относительно интактной увеличена на 49%. Изменение концентрации натрия после 4 недели имплантации в контрольной и опытной группах относительно интактной не выявлены. Данные результаты могут быть следствием травмирования тканей и развитием воспалительной реакции в послеоперационный период.

Результаты исследования концентрации фосфатов в сыворотке крови крыс интактной, контрольной и опытной групп через 1 и 4 недели после операции представлены на рисунке 27.

Определение концентрации фосфатов

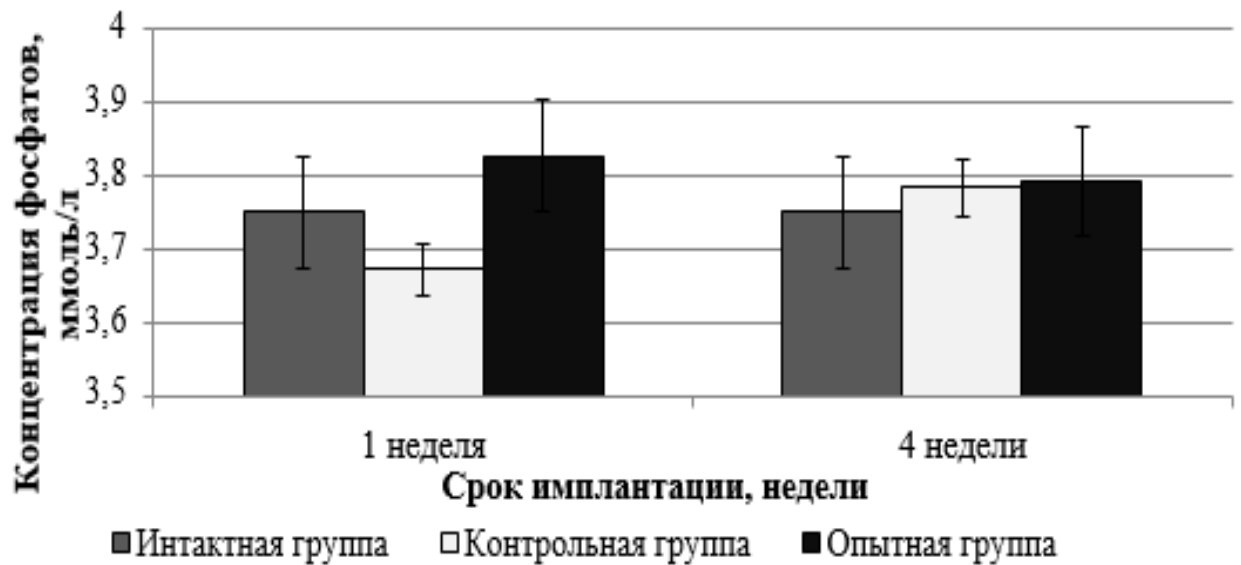


Рис. 27. Концентрация фосфатов в сыворотке крови крыс через 1 и 4 недели после имплантации образцов полиэфирной ткани с антипролиферативным покрытием ($nmol/l$, $M \pm m$, $n=6$)

У интактной группы животных концентрация фосфатов соответствует нормальным значениям. Концентрация фосфатов в контрольной и опытной группах через 1 и 4 недели после операции относительно интактной не изменяется, все значения в пределах нормы.

Результаты исследования концентрации хлоридов в сыворотке крови крыс интактной, контрольной и опытной групп через 1 и 4 недели после операции представлены на рисунке 28.



Рис. 28. Концентрация хлоридов в сыворотке крови крыс через 1 и 4 недели после имплантации образцов полиэфирной ткани с антипролиферативным покрытием (mmol/L, $M \pm m$, $n=6$)

У интактных животных концентрация хлоридов соответствует нормальным значениям. Изменений концентраций в контрольной и опытной группах относительно интактной на разных сроках имплантации не наблюдается.

Таким образом, на всех этапах исследования отмечается отсутствие системного токсического влияния полиэфирного волокна с антипролиферативным покрытием на организм животных. Полученные данные свидетельствуют о положительной динамике восстановления организма животного и об отсутствии негативной реакции на имплантат со стороны организма животного. Результаты проведенных исследований подтверждают соответствие материала требованиям, предъявляемым к медицинским изделиям, в части биологической безопасности и токсичности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе исследования была проведена оценка общетоксического действия полиэфирной ткани с антипролиферативным покрытием для изготовления манжеты протеза сердечного клапана ЗАО НПП «МедИнж».

Результаты морфологического исследования зоны имплантации свидетельствуют об отсутствии воспалительной реакции и о подавлении избыточного образования соединительной ткани вокруг имплантата, что говорит об эффективности антипролиферативного покрытия. Вместе с тем образование тонкой соединительнотканной капсулы вокруг имплантата и ангиогенез свидетельствует о нормальных регенеративных процессах.

Результаты биохимических исследований говорят об отсутствии токсического действия полиэфирной ткани с антипролиферативным покрытием на организм животного.

Несмотря на то, что анализ полученных данных свидетельствует об относительной безопасности полиэфирной ткани с антибактериальным покрытием, перед внедрением его в производство необходимо проведение дополнительных исследований материала на других моделях в условиях *in vitro* и *in vivo*.

Таким образом, по результатам исследования можно сделать следующие **выводы**:

1. Установлено, что антипролиферативное покрытие полиэфирной ткани подавляет избыточное образование соединительной ткани вокруг имплантата, не мешая нормальным процессам регенерации.

2. Выявлено, что изменения большинства биохимических параметров крови крыс на разных сроках после имплантации непосредственно связаны с проведением хирургического вмешательства и возвращаются к дооперационным значениям после полного восстановления организма животного

3. Установлено отсутствие выраженного токсического действия полиэфирной ткани с антипролиферативным покрытием на организм животного при подкожной имплантации.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АЛТ – аланинаминотрансфераза

АСТ – аспартатаминотрансфераза

ГГТ – гамма-глутамилтранспептидаза

ЩФ – щелочная фосфотаза

2,4-ДНФГ – 2,4-Динитрофенилгидразин

ПЭТ – полиэтилентерефталат

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Баторова, Т. М. Изменения системы глутатиона при токсическом действии ксенобиотиков и возможные методы их коррекции: диссертация кандидата биологических наук / Баторова Татьяна Матвеевна [Место защиты: ФГБУ «НИИ биохимии» СО РАМН]. – Новосибирск, 2012. – 22 с.
2. Березов, Т. Т. Биологическая химия: Учебник / Т. Т. Березов, Б. Ф. Коровкин. – М. : Медицина, 1998. – 680 с.
3. Вербова, Т. А. Разработка, техника имплантации и клиническое применение отечественных механических протезов клапанов сердца / под ред. Т. А. Вербова. – М. : Медицинские диссертации – Санкт – Петербург, 2009.
4. Ворохта, Ю. Н. Роль этиленоксидной стерилизации в практике инфекционного контроля / Ю. Н. Ворохта, С. А. Ганыкина, Л. В. Болотникова // Инфекционный контроль. – 2010. – №2. – С. 16-21.
5. ГОСТ 10993-7-2011 Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 7. Остаточное содержание этиленоксида после стерилизации. М. : Стандартиформ, 2011. – 8 с.
6. ГОСТ 12.1.007-76 ССБТ. Вредные вещества. Часть 1. Классификация и общие требования безопасности. М. : Стандартиформ, 2015. – 12 с.
7. ГОСТ 20015-88 Хлороформ. Технические условия. Введ. 2010-01-01. – М. : Стандартиформ, 2010. – 10 с.
8. ГОСТ Р ИСО 10993-11-2011 Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 11. Исследование общетоксического действия. М. : Стандартиформ, 2014. – 41 с.
9. ГОСТ Р ИСО 10993-11-2011 Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 11. Исследование общетоксического действия. М. : Стандартиформ, 2014. – 41 с.

10. ГОСТ Р ИСО 10993-1-2011 Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 1. Оценка и исследования. М. : Стандартиформ, 2014. – 17 с.

11. ГОСТ Р ИСО 10993-12-2011 Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 12. Приготовление проб и стандартные образцы. М. : Стандартиформ, 2014. – 32 с.

12. ГОСТ Р ИСО 10993-2-2011 Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 2. Требования к обращению с животными. М. : Стандартиформ, 2014. – 12 с.

13. ГОСТ Р ИСО 10993-6-2011 Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 6. Исследования местного действия после имплантации. М. : Стандартиформ, 2011. – 8 с.

14. Гусев, В. Е. Химические волокна в текстильной промышленности / В. Е. Гусев. – М. : Легкая индустрия, 1971. – 408 с.

15. Кёлер, Иммунодепрессанты : Лечение болезней Гомеопатия / Ergashaka. – 2013.

16. Корнев, И. И. Вопросы безопасности практического использования окиси этилена для стерилизации ИМН в лечебных учреждениях // Поликлиника. –2011. – № 6. – С. 28-30.

17. Кочетов, Г. А. Практическое руководство по энзимологии: Учеб. пособ. / Г. А. Кочетов. – М. : Высшая школа, 1989. – 272 с.

18. Кристал, Р. Дж. Интерстициальные заболевания лёгких: Внутренние болезни / под ред. Е. Браунвальда . – М. : Медицина, 1995. – Т. 6. – С. 111–126. – 416 с.

19. Лакин, Г. Ф. Биометрия: учебное пособие для вузов / Г. Ф. Лакин. – М. : Высшая школа, 1990. – 312 с.

20. Пакшвер, А. Б. Свойства и особенности переработки химических волокон / под ред. А. Б. Пакшвера. – М. : Химия, 1975. - 496 с.

21. Пасечник, Е. Г. Воспаление и метаболические нарушения: научная книга / Е. Г. Пасечник, Е. Г. Моисеева, В. А. Фролов. – М.: Патологическая физиология – 2011.
22. Перепелкин, К. Е. Современные химические волокна и перспективы их применения в текстильной промышленности: в печати / К. Е. Перепелкин. – М. : Химические волокна, 2002. - № 2.
23. Перепелкин, К. Е. Структура и свойства волокон: Учебник / К. Е. Перепелкин. – М. : Химия, 1985. – 208 с.
24. Перепелкин, К. Е. Химические волокна в текстильной промышленности: Химическая энциклопедия / К. Е. Перепелкин, В.Е. Гусев. – М. : Советская энциклопедия, 1988. – Т. 1. – 413 – 416 с.
25. Полунина, Т. Е. Лекарственные поражения печени / Т. Е. Полунина, И. В. Маев // Гастроэнтерология. Кафедра пропедевтики внутренних болезней лечебного факультета ММА им. И. М. Сеченова. – 2011. – №2. – С. 54-60.
26. Промышленные хлорорганические продукты. Справочник/Под ред. Л.А.Ошина. – М.: Химия, 1978. – 656 с.
27. Саркисов, Д. Большая медицинская энциклопедия. – 3-е. – М.: Советская энциклопедия, 1974. – Т.1. - 315 с.
28. Струков, А. И. Патологическая анатомия / В. В. Серов., 2010.
29. Ткачук, В. А. Клиническая биохимия: Учеб. для вузов / Под ред. В. А.Ткачука. – 2-е изд., испр. и доп. – М.: ГЭОТАР-МЕД, 2004. – 512 с.
30. Фёршт, Э. Структура и механизм действия ферментов: научная книга / Э. Фёршт. – М. : Мир., 1980. – с. 373-388.
31. Чеснокова, Н. П. Экссудация. Общая характеристика и механизмы развития / Н. П.Чеснокова, Т. А. Невважай и др. // Патогенез острого воспаления. Медицина– 2014.
32. Шехтер, А. Б. Тканевая реакция на имплантат / И. Б. Розанова //Под ред. В.И.Севастьянова – М.: Биосовместимость – 1999. – №4. – 174 с.

33. Шехтер, А. Б. Тканевая реакция на имплантат / И. Б. Розанова /Под ред. В.И.Севастьянова – М.: Биосовместимость – 1999. – №4.7 – 199 с.
34. Шехтер, А. Б. Тканевая реакция на имплантат / И. Б. Розанова /Под ред. В.И.Севастьянова – М.: Биосовместимость – 1999. – №4.3 – 182 с.
35. Шульпекова, Ю. О. Лекарственные поражения печени // Гастроэнтерология. Кафедра пропедевтики внутренних болезней лечебного факультета ММА им. И. М. Сеченова. – 2007. – №1.
36. Avnon, L.S. Acute Interstitial Pneumonia–Hamman-Rich Syndrome: Clinical Characteristics and Diagnostic and Therapeutic Considerations / L.S. Avnon, O. Pikovsky, N. Sion-Vardy, Almog Ya // Anesthesia&Analgesia. – 2009. –Fasc. 108(1). – P. 232-237.
37. Barnett, R.N. /et al J. Amer, Clin.Path. – 1973. – vol.59, P. 836.
38. Bessey, O. A. / J. biol. Chem. – 1940. – vol. 164, P. 321.
39. Dumas, B. T. / et al. Clin. Chim. Acta. – 1971. – vol. 31, P.87.
40. Fawcett, J. A. / E. J. Scott, J. Clin. Path. – 1960. – 13, P. 156 – 159.
41. Fishbach, F. Dunning M. A manual of laboratory diagnostic tests: 7th ed. Lippincott Williams & Wilkins. – 2004. – P. 1291.
42. Fourne, F. Synthetic Fibers. Munchen: Carl Hanser Ferlag / F. Fourne. – 1999. – P. 810.
43. Frauke, N. Rapamycin extends murine lifespan but has limited effects on aging: The Journal of Clinical Investigation // N. Frauke, Diana Flores-Dominguez, Devon P. Ryan, Marion Horsch, Susanne Schröder. – 2013-08-01. – T. 123, вып. 8. – С. 3272-3291.
44. Fried, R. / et al., J. Clin. Chem. Clin. Biochem. – 1972. – vol. 10, P. 280.
45. Guder, W. / et al. Normalbereiche Rlin. Chem. (1982): N. Weissman, V. J. Pilegg, Clinical Chemistry – Principle and Technics., 1974, p. 642 – 643

46. Habib, A. Sirolimus-FKBP12.6 impairs endothelial barrier function through protein kinase C- α activation and disruption of the p120-vascular endothelial cadherin interaction: Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. // A. Habib, / V. Karmali, R. Polavarapu, H. Akahori, Q. Cheng. – 2013-10-01. – Т. 33, вып. P - 10.
47. Henry, R. J. Clinical Chemistry: Principles and Techniques, 2nd Edition, Harper and Row. – 1974. – P. 525.
48. Hillmann, J. / et al. J. Clin .Chem. and Clin. Biochem. – 1967. – vol.5, P.93.
49. MedlinePlus Medical Encyclopedia: ALP isoenzyme test. Архивировано из первоисточника 30 апреля 2012.
50. Morton, W.E. Physical Properties of Textile Fibres / W.E.Morton, J.W.S. Hearle// The Textile Institute, Manchester. – 1993. – P. 725.
51. Oshiro, N. Dissociation of raptor from mTOR is a mechanism of rapamycin-induced inhibition of mTOR function / N. Oshiro, K.Yoshino, S.Hidayat, C. Tokunaga, K. Hara // Genes to Cells. — 2004-04-01. — Vol. 9, fasc. 4. — P. 359-366.
52. Popper, Y. / F.Mandel, Mayer H. Biochem.Z. – 1937. – vol. 291. P. 354.
53. Reitman, S. / Frankel S. Amer. J. Clin. Pathol. – 1957. – vol.28. P. 56.
54. Szasz, G. / J. P. Persijn. et al. Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. – 1974. – vol. 12. P.228.
55. Trinder, P. Ann. clin. Biochem. – 1969. – vol. 6. – P. 24.
56. Warner, S.B. Fiber Science. Englewood Chiffs: Prentice Hall / S.B. Warner. – 1995. – P. 316.
57. Weichselbaum T.E. Am.J.Clin.Pathol., 1946, vol.7, p.40
58. («Ольвекс диагностикум»: [сайт]. URL: <http://www.olvex-d.ru>)
59. (URL: <http://apps.who.int/medicinedocs/en/d/Js2266e/3.6.html>)

60. (URL: <http://kardio.lekmed.ru/biologicheskie-protezy-klapanov-serdca.html>)

61. (NCI Drug Dictionary – sirolimus: [сайт]. URL: <http://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-drug?cdrid=42555>)

62. (Искусственные протезы клапанов сердца: [сайт]. URL: <http://www.medeng.ru/production>)

63. (Технические характеристики [сайт]. URL: <http://www.medeng.ru/technical-characteristics>)

64. (URL: <http://www.medeng.ru/views>)

65. (URL: <https://www.health-ua.org/faq/gepatologiya/394.html>)

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

ПЕНЗЕНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

Факультет
физико-математических
и естественных наук

Кафедра
«Общая биология и биохимия»

Направление подготовки
06.03.01 Биология
Профиль подготовки «Биохимия»

Утверждаю:
Зав. кафедрой
 Г.А. Карпова
« 2 » 11 201 6 г.

Задание

По ВКР студента Лемаевой Анны Александровны

Тема работы: «Оценка общетоксического действия полиэфирной ткани
манжеты сердечного клапана».

Утверждена приказом по Университету от « 6 » декабря 201 6 г. № 1191 а/о

Срок сдачи студентом законченной работы « 26 » мая 201 7 г.

КАЛЕНДАРНЫЙ ПЛАН ВКР

№ п/п	Перечень подлежащих разработке вопросов:	Сроки выполнения этапов	Примечания
1	Анализ литературы по теме исследования, написание введения, глав обзора литературы («Искусственные клапаны сердца МЕДИНЖ»; «Протезы клапанов сердца «МЕДИНЖ» с редуцированной манжетой»; «Протезы клапанов сердца «МЕДИНЖ» с защитной пленкой из ПТФЭ (политетрафторэтилена)»; «Протезы клапанов сердца «МЕДИНЖ - ЕС» с присоединяемой манжетой» «Биологические протезы клапанов сердца»; «Материал для изготовления манжеты»; «Реакция организма на имплантацию синтетического материала»; «Сиролимус в качестве покрытия манжеты»; «Хлороформ как растворитель для Сиролимуса»; «Этиленоксид как средство стерилизации манжеты»; «Биохимические параметры»; «Ферменты печени аланинаминотрансфераза, аспаратаминотрансфераза, гамма-глутамилтранспептидаза, щелочная фосфатаза»)	ноябрь 2016-апрель 2017	Выполнено
2	Имплантация образцов животным и забор крови	ноябрь - декабрь 2016	Выполнено
3	Определение активности АЛТ, АСТ, γ -ГТ, ЩФ; определение концентраций ионов натрия, калия, кальция, фосфатов и хлоридов, альбумина, глюкозы, холестерина, креатинина, мочевины, триглицеридов и общего белка	декабрь 2016-февраль 2017	Выполнено
4	Методы статистической обработки результатов	март-апрель 2017	Выполнено
5	Статистическая обработка результатов исследования, анализ полученных данных	февраль-май 2017	Выполнено
6	Написание глав «Материалы методы исследования», «Результаты исследования и их обсуждение», «Заключение»	февраль-май 2017	Выполнено

Дата выдачи задания «2» ноябре 2016 г.

Руководитель _____

Задание принял к исполнению _____