

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ 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

Форма обучения очная

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

на тему:

**«ИЗУЧЕНИЕ БИОХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КРОВИ ПРИ
ИМПЛАНТАЦИИ МОДИФИЦИРОВАННОГО КСЕНОМАТЕРИАЛА
НА ОСНОВЕ ПЕРИКАРДА»**

Студент Капустина Капустина Оксана Алексеевна

Руководитель Кручинина Кручинина А.Д.

Нормоконтролер Кручинина Кручинина А.Д.

Работа допущена к защите (протокол заседания кафедры от 15.06.20 № 16)

Заведующий кафедрой Карпова Карпова Г.А.

Работа защищена с отметкой отлично
(протокол заседания ГЭК от 24.06.20 № 4)

Секретарь ГЭК Клычков Клычков С.В.

Пенза, 2020

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	6
1.1 Материалы для реконструктивной медицины	6
1.2 Ксеноперикард как материал для реконструктивной медицины	9
1.2.1 Особенности строения ткани	9
1.2.2 Способы обработки ксеноперикардальной ткани	10
1.2.3 Биомедицинские требования к ксеноматериалу	14
1.3 Области клинического применения ксеноперикарда	15
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	17
2.1 Материалы исследования	17
2.2 Методы исследования	17
2.2.1 Оценка антибактериальной активности модифицированного ксеноперикарда диско-диффузионным методом	17
2.2.2 Исследование динамики высвобождения лекарственного препарата	18
2.2.3 Исследование биохимических показателей после имплантации ксеноматериала	20
2.2.4 Гистологическое исследование	28
2.2.5 Методы статистической обработки результатов	30
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ	31
ОБСУЖДЕНИЕ	31
3.1 Результаты исследования антибактериальной активности модифицированного ксеноперикарда диско-диффузионным методом.	31
3.2 Результаты исследования динамики высвобождения лекарственного ..	31
препарата	31
3.3 Результаты исследования биохимических показателей после имплантации ксеноматериала	34
3.3.1 Общий белок	34
3.3.2 Альбумин	35
3.3.3 Креатинин	36

3.3.4 Аланинаминотрансфераза.....	37
3.3.5 Аспартатаминотрансфераза	38
3.3.6 Лактатдегидрогеназа	39
3.3.7 Гамма-глутамилтрансфераза	40
3.3.8 Глюкоза.....	41
3.4 Результаты гистологических исследований	41
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	45
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	46

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. На сегодняшний день существует острая необходимость в биоматериалах с заданными и контролируемыми характеристиками для применения в реконструктивной хирургии. Модификация биоматериалов в первую очередь проводится с целью снижения риска развития воспалительных процессов и повышения уровня регенерации тканей организма. Имплантаты, сделанные из синтетических материалов, несомненно, имеют множество достоинств, но все же обладают низким уровнем биологической интеграции, что приводит к частому отторжению организмом.

Главные требования к биоимплантату:

- биосовместимость с другими тканями организма;
- резорбция, сопровождающаяся образованием безвредных продуктов распада;
- длительная устойчивость при хранении.

Для предотвращения инфекционного поражения на границах поверхностей тканей и самого имплантата применяются различные способы угнетения данного процесса с помощью локального применения лекарственных препаратов. Вопросы рационального применения антибактериальных препаратов при профилактике инфекционных осложнений до настоящего момента не имеют конкретных заключений.

Так как использование ксеноматериалов в хирургии должно отвечать требованию абсолютной безопасности для организма, необходимым является исследование ответной реакции организма, как в острый период, так и в последующее время. Важным является оценка тканевой реакции на имплантацию материалов, проведение гистопатоморфологических исследований, анализ изменений гематологических и биохимических показателей после имплантации.

Целью работы является изучение антибактериального действия и динамики высвобождения ванкомицина из модифицированного ксеноматериала на основе перикарда крупного рогатого скота, а также определение биохимических параметров крови животных после подкожной имплантации.

В соответствии с целью были поставлены следующие **задачи**:

- 1) провести анализ литературы по теме исследования;
- 2) Оценить антибактериальное действие модифицированного ксеноперикарда на культурах *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli*;
- 3) Оценить динамику высвобождения ванкомицина из модифицированного ксеноперикарда;
- 4) Изучить влияние имплантации модифицированного ксеноперикарда на биохимические параметры крови;
- 5) Оценить морфологические изменения в зоне имплантации экспериментальных образцов на разных сроках после операции (2 и 4 недели).

Выпускная квалификационная работа написана на 52 листах, содержит 15 рисунков, 4 таблицы и список литературы на русском и английском языках из 55 источников.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Материалы для реконструктивной медицины

Подбор биоматериалов для использования в реконструктивной хирургии даже на современном этапе развития медицины, все также является одной из наиболее острых проблем.

Специалисты уже давно ответили на вопрос, какой должен быть «идеальный» трансплантат. Биотрансплантат обязан соответствовать следующим условиям :

- не вызывать воспалительную реакцию;
- не оказывать токсического и иммуногенного воздействия;
- должен сохранять заявленные свойства до и после имплантации;
- иметь безопасные продукты распада в результате физиологической деградации;
- иметь нужную скорость деградации для процессов образования новой соединительной ткани;
- возможность нанести биологически активные вещества на его поверхность;
- возможность универсальной стерилизации;
- Возможность длительного хранения.

Наиболее распространенные в реконструктивной хирургии являются следующие разновидности материалов:

- аутотрансплантаты;
- аллотрансплантаты;
- ксенотрансплантаты;
- синтетические материалы.

Аутотрансплантаты . Для данного материала используют собственные ткани организма пациента. Это является неоспоримым достоинством, так как он высоко биосовместим, но это дополнительно травмирует больного и

увеличивает период его реабилитации, что является недостатком данного вида трансплантата [2].

Аллотрансплантаты. Используют ткани и органы донора (человека), возможно использование и трупного материала. Большими минусами данного метода является то, что он труднодоступен, а также может нести в себе риск инфекционного заражения [3].

Синтетические материалы широко распространены в практической медицине, имеют относительно небольшую стоимость. Имплантаты, сделанные из синтетических материалов, несомненно, имеют множество достоинств, но все же обладают низким уровнем биологической интеграции, что приводит к частому отторжению организмом. В настоящее время они применяются в качестве механической поддержки [15].

Ксенотрансплантаты. Используют ткани и органы животных. Этот вид материала начали использовать еще в конце прошлого столетия, однако нет совершенной методики его изготовления. Главная проблема заключается в оставшихся в материале клетках, которые запускают иммунный ответ, что способствует отторжению организмом имплантата [10].

В области реконструктивной хирургии более перспективными из всех видов трансплантатов оказались те, которые были получены на основе биологических полимеров животного и растительного происхождения, в частности те, что имеют общие биологические особенности с тканями организма человека. В последние десятилетия непрерывно растет интерес к биodeградируемым природным (биологическим) полимерам, или биополимерам (альгинаты, коллаген, желатин, хитозан, фиброины шелка, полиэферы бактериального происхождения – полигидроксibuтираты и их сополимеры). В настоящее время внимание к себе привлекли биodeградируемые природные полимеры, так называемые биополимеры, например, альгинаты, коллаген, желатин и т.п. Одними из главных достоинств биополимеров являются высокая степень биосовместимости, а также их высокоэффективная биостимуляция. Моносахара, молочная,

гликолевая, кислота, либо вещества, не метаболизируемые клетками и тканями являются промежуточными продуктами биodeградации таких биоматериалов. Концентрация этих продуктов в крови не должна превышать допустимый уровень, иначе их нужно считать токсичными для организма. Углекислый газ и вода будут являться продуктами при полной деградации природный полимеров [25].

Клетки ксеноматериала и глизоамингликаны являются главными причинами возникновения антигенности. По этой причине существуют методики разрушения клеток с последующим выведением их из биоматериала. Наиболее часто применяемый метод обработки ксеноперикарда, заключается в разрушении носителя антигенности ферментом с дальнейшей обработкой ткани гипертоническими растворами хлорида натрия, что приводит к удалению клеток из биоматериала. При данном способе волокна соединительной ткани остаются невредимыми, что позволяет сохранить собственную структуру, а обработка глутаровым альдегидом поможет превратить ткань ксеноматериала в биополимер. Но этот метод не является совершенным, имеет также множество недостатков, поэтому в настоящее время все еще идет его развитие и оптимизация [13].

Благодаря соблюдению положений стандартов серии ISO 10993 "Оценка биологического действия медицинских изделий" можно обеспечить системный подход к исследованию биологического действия медицинских изделий. Объектом типизации данной части считаются методы исследования, которые связаны непосредственно с взаимодействием изделий с кровью в зависимости от вида и длительности контакта в процессе использования изделия в реконструктивной практике. Чтобы получить статистические правдивые результаты нужно провести достаточно исследований. Для повышения значимости результатов некоторые методики должны проводиться многократно. Знания о взаимосвязи результатов и продолжительности использования изделия можно получить только благодаря исследованиям в течение длительного времени [8].

Продвижение в медицине биопротезов синтетического происхождения сильно повлияло на уровень лечения больных, но при этом привело к множеству осложнений при имплантации. Даже не взирая на то, что сейчас большой упор делается на изготовление и внедрение синтетических материалов, в практическом применении интерес к биоматериалам значительно выше [5].

1.2 Ксеноперикард как материал для реконструктивной медицины

1.2.1 Особенности строения ткани

Перикард – фибро-серозный замкнутый мешочек; двухслойная оболочка, которая окружает сердце. Наружный слой – фиброзный, окружающий все сердце полностью, переходящий в наружную сердечнососудистую оболочку. Внутренний слой – серозный, представляющий полностью закрытую полость. Этот слой делится на два листка: висцеральный – эпикард, прилегающий к сердцу и сосудам и париетальный, сращенный с фиброзным слоем[7].

Ткань перикарда, как и ткань сухожилий, подкожной клетчатки, относится к разновидностям соединительной ткани. Ткань околосердечной «сумки» представляет собой поочередно расположенных слоев коллагеновых волокон: поперечно и продольно. В составе этих слоев располагаются эластические волокна, параллельно расположенные к коллагеновым. Коллагеновые волокна, в свою очередь, благодаря своей прочности составляют жесткую матрицу биоткани. Эластические волокна, наоборот, обладают таким свойством как упругость, что позволяет обратно деформироваться благодаря механическим воздействиям. Эластические волокна удлиняются при растяжении, а будучи освобожденными резко укорачиваются, что напоминает действие резиновой ленты. Данные свойства ткани зависят от состояния структурных белков [26].

1.2.2 Способы обработки ксеноперикардальной ткани

Большой интерес в реконструктивной медицине на сегодняшний момент уделяется разработке способов модификации биоматериала, что придает ему специфические свойства. Оценивая клинические исследования за прошлые года, результаты имплантации, можно выявить основную причину дисфункции биопротезов – кальцификация биологического материала. Для того , чтобы избежать эту причину, учеными разрабатываются различные методики обработки материала, которые могут поспособствовать выработке собственной антибактериальной активности [18].

Известно, что ксеноперикардальная ткань имеет приоритет при выборе материала для создания различных эндопротезов. Существуют самые различные химико-ферментативные методы обработки ксеноперикарда. Целью модификации является создание биоматериалов с заданными и контролируемыми характеристиками, таких как:

- иммуноинертность,
- резистентность биоткани к кальцификации,
- низкий риск тромбоэмболий,
- сохранение структуры коллагеновых волокон,
- высокая плотность поперечной сшивки коллагена,
- возможность имплантации пациентам молодого и даже детского возраста,
- максимальная гемосовместимость,
- наилучшее моделирование в месте имплантации,
- минимальный уровень хирургической порозности,
- хорошие деформативные характеристики,
- проявление адгезивных свойств в наименьшей степени,
- устойчивость к инфекции,
- способность к эндотелизации.

Главные минусы биоимплантантов:

- биорезорбция или кальцификация;
- проявление ненужных иммунных реакций;
- возможность инфицирования [16,23].

Главная задача методик обработки ксеноперикарда состоит в том, чтобы добиться полного удаления из материала клеточных элементов, водорастворимых белков и концевых теллопептидов коллагена, так как они являются основными антигенами, а но при этом сохранить коллаген и эластин [12]. После этого обязательно проводят антикальциевую обработку биотрансплантата (чаще всего применяют глутаровый альдегид) [50].

Методы обработки биоматериала для реконструктивной медицины в качестве эндопротеза с использованием глутарового альдегида (ГА) защищены патентами [22,53]. Приготовление глутарового альдегида возможно с использованием различных буферов, например, фосфатного (рН=7.4), но чаще применяется HEPES-буфер (рН=7.4) с последующей стабилизацией поверхностно-активными веществами. Функцией поверхностно-активных веществ (додецилсульфат натрия, лаурил-сульфат натрия, тритон X-100) в этой технологии является предупредить кальцификацию ксеноперикарда [19,34].

Известно, что клетками животного-донора можно вызвать острую иммунную реакцию-отторжение в организме реципиента. Это тоже одна из главных проблем, возникающая после протезирования. Поэтому необходимо еще на этапе приготовления протеза избежать возникновения иммунопатологии удалением всех клеток из биоматериала. Для этого применяют глутаровый альдегид для фиксации ткани; используют дистиллированную воду для отмывки биоткани или же возможно применение гипотонических растворов, что приводит к лизису клеток [55].

Но все же использование глутарового альдегида не обходится без побочных эффектов, которые заключаются в его высокой токсичности. Но стоит отметить, что все отрицательные стороны обработки давно изучены, что позволяет эффективно бороться с ними. Исходя из этого, можно уверенно

сказать, что все недостатки обработки глутаровым альдегидом никак не сказываются на потребности его применения в биологической медицине [29,52].

Существуют и другие методы обработки биологических тканей для ингибирования кальциноза, описанные в современной литературе. Например, раствором четвертичной аммонийной соли, в составе которой есть хотя бы один из алкильных радикалов при этом содержащих 7-15 атомов углерода. Но стоит сказать, что данная методика имеет свои минусы, главный из которых это то, что данный раствор в целом только экранирует поверхность биоткани, что в свою очередь не пропускает кальциевые и фосфатные соединения. При незначительных сбоях этого "экрана" процесс кальциноза развивается в разы быстрее. Помимо этого, без ферментативной обработки не происходит снижение уровня иммуногенности. Хотя именно благодаря ей разрушаются иммуногенные компоненты [45].

К концу XX века выдвинули новый способ обработки эндопротеза, в котором использовали террилитин в фосфатном буферном растворе. Но и он не оказался идеальным. Главными его минусами оказались: высокая концентрация фермента, что способствует разрушению коллагеново-эластической основы биоматериала; высокая температура ферментативной обработки, приводящая к снижению активности фермента; использование фосфатного буфера в качестве растворителя фермента и лимонной кислоты для создания кислой среды при отмывке, это привело к возникновению нерастворимых фосфатов и цитратов и процессу кальциноза биопротеза [44].

Также стоит упомянуть еще один метод обработки ксенперикарда 2-5%-ным раствором диглицидилового эфира этиленгликоля с последующей обработкой раствором гепарина с концентрацией не менее 100 МЕ/мл, диэпоксисоединениями, который также часто упоминается во многих источниках. Достоинствами данного способа является то, что с его помощью можно достичь высокий уровень прочности биоткани, при этом не затрагивая

его естественную пластичность и биосовместимость , что также свойственно для эндопротезов, которые обрабатывается глутаровым альдегидом [30].

Важной задачей также является то, что при имплантации необходимо предотвращать инфекционное поражение на границах поверхностей тканей и самого имплантата. По данной причине применяются различные способы угнетения данного процесса с помощью локального применения лекарственных препаратов. Для того, чтобы подавить рост микроорганизмов, которые вызывают инфекционные процессы организма, ученые также проводят множество исследований в данном направлении, чтобы выяснить к каким антибактериальным покрытиям микроорганизмы проявляют наибольшую чувствительность. Экспериментальным путем можно показать как высокоэффективность препарата в борьбе с микроорганизмами, так и, наоборот, и устойчивость культуры, что требует изменения схемы лечения данным антибиотиком или использования для другого, более эффективного антибактериального препарата[54].

Ванкомицин является уникальным гликопептидом, структурно не связанным с любым доступным в настоящее время антибиотиком. Действие данного антибиотика заключается в ингибировании им синтеза клеточных стенок микроорганизмов, но при этом его механизм уникален и отличается от такового у пенициллинов и цефалоспоринов. Присутствие довольно большой молекулы ванкомицина на звене предшественника гарантирует предотвращение его действия в качестве субстрата для пептидогликан-синтетазы. Исходя из этого, синтез пептидогликана блокируется, и мембраносвязанные липидные интермедиаты накапливаются в присутствии ванкомицина [39].

Необходимо сказать , что современная литература полна данными о самых разных подходах и методов, связанные с обработкой ксеноткани, которую в дальнейшем используют в качестве биопротеза. Это позволит сделать вывод о том, что на сегодняшний момент идет активное изучение данного направления, поэтому единого решения не существует [31].

1.2.3 Биомедицинские требования к ксеноматериалу

Совместимость биопротезов с тканями реципиента по биосвойствам является важным критерием в реконструктивной медицине, но также необходимо не забывать о физико-механических характеристиках ксеноткани. Исследование данных свойств биоткани, предназначенных для использования в медицинском назначении является непосредственно важным этапом оценки безопасности и клинической эффективности медизделия [9]. При заключении о соответствии клиническим требованиям биоматериала имеет большую значимость рассмотрение этих критерий. Но нельзя сказать, что данное направление полностью изучено в настоящее время, поэтому исследования взаимосвязи между физико-механическими характеристиками и биосовместимостью биотканей, используемых в реконструктивной хирургии, все еще довольно актуальны. Эти исследования очень важны для клинической медицины, так как физико-механические критерии дают возможность получить более полную информацию о структуре и свойствах ксеноматериала, что поможет более четко сформулировать рекомендации к его применению в различных операциях [6,28,46].

Так же не стоит забывать, чем больше ксеноматериал находит свое применение в хирургической области, тем больше будет предъявляемых требований к нему. Примером может быть ксеноткань, которая применяется в качестве заплат. В данном случае требования к физикомеханическим параметрам минимальны. Но если взять случай применения ксеноперикарда в таких медицинских отраслях как ортопедия и травматология, где возможна пластика сухожильно-связочного аппарата, тогда физико-механические параметры играют одну из главных ролей [27].

Именно от направленности белковых волокон ткани зависят его механические параметры, то есть можно сказать, что ксеноперикард имеет ярко выраженные анизотропные свойства. Механические характеристики у образцов, выкроенных вдоль направления волокон структурных белков, значительно лучше механических свойств образцов с поперечным. Различне

виды ксеноткани , а также методы ее обработки, будут непосредственно влиять на показатели механической прочности и будут отличаться в разных источниках [36].

Существует ряд основных прочностных параметров ксеноперикардальной ткани, которые должны быть обязательно изучены в ходе исследования:

- максимальное напряжение/прочность на разрыв
- относительное удлинение
- модуль упругости.

Кроме изучения прочностных свойств биоткани, обязательно нужно обратить внимание на гистологические и гистохимические исследования. Немало важными являются контроль структур соединительной ткани и анализ содержания солей кальция. Известно, что в современной биомедицине исследуются методы обработки перикарда, а также применение покрытия ткани различными антибактериальными препаратами, что наталкивает на более тщательное изучение всех возможных реакций. Особенности иммунного ответа на что-либо чужеродное вызывает необходимость детального исследования реакций окружающих тканей на имплантат [20].

1.3 Области клинического применения ксеноперикарда

В настоящее время ксеноперикард очень актуален в реконструктивной хирургии.

Медицинские эндопротезы, сделанные из синтетических материалов , несомненно, имеют множество достоинств, но все же обладают низким уровнем биологической интеграции, что приводит к частому отторжению организмом, а также они не могут полностью повторить строение и свойства биологических материалов. Конечно, большая часть исследователей делают акцент на разработку синтетических эндопротезов, но в последнее время увеличился интерес и к биоматериалам, разработке на их основе

медицинских изделий. Нельзя не отметить множество достоинств биологических материалов, например, их высокую степень биосовместимости с организмом, а также, что они высокоэффективные биостимуляторы. Продукты биодеградации биоматериалов безопасны. Интерес к таким эндопротезам растет, сфера применения расширяется, поэтому необходимо создание изделий на их основе с широким спектром свойств [32].

В последнее время ксеноперикард широко применяется в клинических и экспериментальных разработках в кардиохирургии. Ксеноперикардальная ткань используется в хирургии сердца и сосудов для закрытия дефектов межпредсердной и межжелудочковой перегородок, создания искусственных клапанов сердца, протезирования сосудов, протезирования и пластики клапанов сердца и во многом другом, при этом показав высокую эффективность применения [40].

Возможность применения ксеноматериалов рассматривается в абдоминальной хирургии. Пластика вентральных грыж до сих пор одна из самых распространённых операций и остаётся наиболее сложной проблемой современной герниологии из-за высокого числа рецидивов [47].

Также ксеноперикард применяется при протезировании сухожилий, укреплении связочного аппарата суставов [15].

Существует возможность применения эндопротезов на основе ксеноперикардальной ткани при операциях в урологии и гинекологии [43].

Кроме вышеуказанных областей реконструктивной хирургии возможно применение ксеноматериала в таких областях медицины: детская хирургия (например, лечение пороков развития брюшной и грудной стенки, гастрошизис); торакальная хирургия (например, закрытие дефектов грудной стенки и укрытие культи легкого/бронха при резекции); офтальмология (например, восстановление стенок глазницы при травмах); нейрохирургия (например, пластика твердой мозговой оболочки); хирургическая стоматология и челюстно-лицевая хирургия (например, косметологические операции на лицевом черепе) [41].

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материалы исследования

Важной задачей при имплантации биоматериалов является предотвращение распространения инфекции на границе контакта поверхностей тканей и имплантата. Одним из способов, способствующих угнетению инфекционного процесса и повышающих эффективность лечения инфекции, является локальное применение лекарственных средств.

Образцы перикарда изготавливались по запатентованной методике (патентообладатель ООО «Кардиоплант»).

Дальнейшая модификация поверхности проводилась путем погружения и выдерживания пластин в растворе ванкомицина (50 мг/мл) в течение 1 часа при комнатной температуре. Итоговое содержание ванкомицина – 0,1-0,4 мг/г ткани.

2.2 Методы исследования

2.2.1 Оценка антибактериальной активности модифицированного ксеноперикарда диско-диффузионным методом

Для оценки антибактериального действия модифицированного ксеноперикарда использовался диско-диффузионный метод.

Основой данного метода исследования является подавление антибиотиком поверхностного, видимого роста микроорганизмов на специальных плотных питательных средах. В качестве стандартной питательной среды используются питательные среды на основе агара (агар МюллераХинтон (МХА), среда АГВ).

После внесения инокулята (суспензия микроорганизмов) на плотную питательную среду на нее помещается образец с нанесенным антибактериальным препаратом. В последствии на приготовленной

питательной среде начинается рост микроорганизмов и диффузия антибиотика.

Инокулят представлен либо 18 – 20-ти часовой агаровой, либо 5 – 6-ти часовой бульонной культурой исследуемого микроорганизма. Приготовленный инокулят наносят в количестве 1 – 2 мл на поверхность чашки Петри с питательной средой, равномерно распределяют по поверхности покачиванием и удаляют избыток жидкости пипеткой. Приоткрытые чашки подсушивают при комнатной температуре в течение 10 – 15 мин.

В данном исследовании аппликация образцов проводилась на поверхности агара Мюллера-Хинтона, инокулированного тестовыми культурами в концентрации 10^6 КОЕ/мл. Образцы в форме кругов диаметром 6 мм² помещали на поверхность агара, плотно прижимая каждый диск, обеспечивая постоянную диффузию антибиотика. Исследования проводили при 37°C. После окончания инкубации (через 18 часов) чашки помещали кверху дном на темную матовую поверхность так, чтобы свет настольной лампы падал на них под углом в 45° (учет в отраженном свете). Диаметр зон задержки роста с учетом диаметра самого диска измеряли с точностью до 1 мм. Оценка антибиотической активности производится согласно МУК 4.2.1890-04.

2.2.2 Исследование динамики высвобождения лекарственного препарата

Спектрофотометрический метод анализа основан на поглощении монохроматического излучения, т. е. излучения с длиной волны в видимой и УФ-областях спектра [24]. Большинству АБП свойственен УФ-спектр поглощения, для ванкомицина максимум поглощения соответствует длине волны 280 нм.

Образцы материала выдерживали в 10 мл 0,1 М рН=7,4 фосфатного буфера (ГОСТ ISO 10993-13-2011) при температуре 37°C в индивидуальных емкостях. Анализ содержания ванкомицина в модельном растворе проводили

спектрофотометрическим методом на длине волны 280 нм, в кювете с длиной оптического пути 1 см.

Для построения калибровочной прямой готовили серию растворов ванкомицина в воде с концентрациями 6 мкг/мл, 12 мкг/мл, 18 мкг/мл, 24 мкг/мл, 30 мкг/мл, 36 мкг/мл, 42 мкг/мл, 48 мкг/мл, 54 мкг/мл, 60 мкг/мл, 70 мкг/мл, 80 мкг/мл, 90 мкг/мл, 100 мкг/мл. Данные представлены в таблице 1 и на рисунке 1.

Таблица 1– Приготовление стандартных растворов ванкомицина в воде

№	V воды, мл	V <u>ванкомицина</u>, мл	C, мкг/мл	ΔD
1	0,54	0,06	6	0,03
2	0,48	0,12	12	0,04
3	0,42	0,18	18	0,07
4	0,36	0,24	24	0,09
5	0,3	0,3	30	0,1
6	0,24	0,36	36	0,13
7	0,18	0,42	42	0,15
8	0,12	0,48	48	0,17
9	0,06	0,54	54	0,2
10	0,4	0,6	60	0,21
11	0,3	0,7	70	0,25
12	0,2	0,8	80	0,3
13	0,1	0,9	90	0,34
14	0	1	100	0,37
15	1	0	0	0

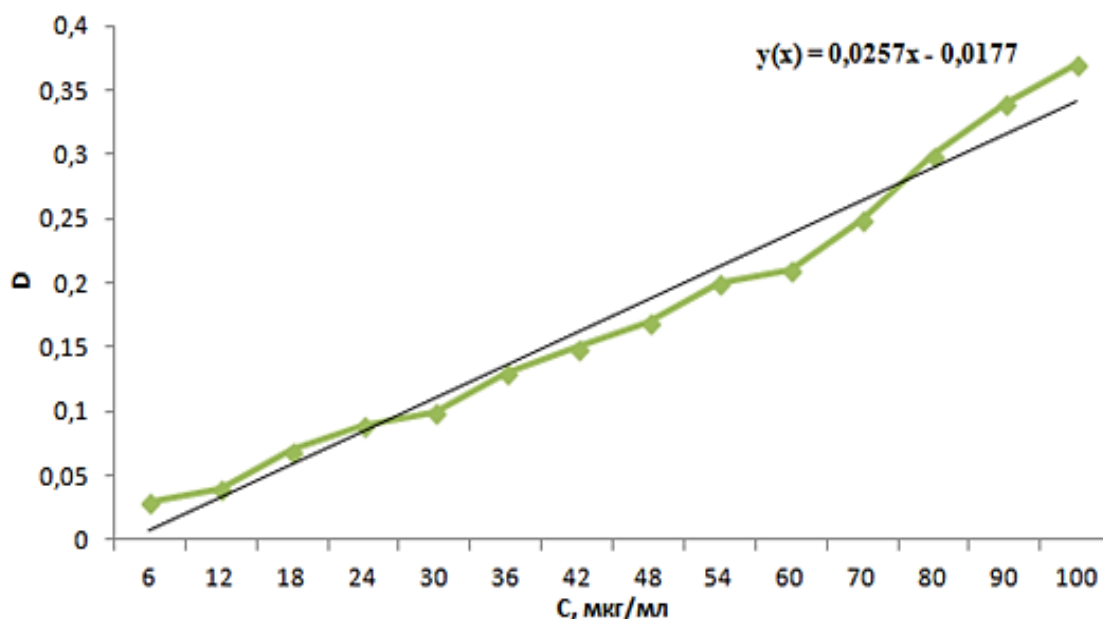


Рисунок 1. Калибровка по ванкомицину, $\lambda=280$ нм ($M \pm m$, $n=6$)

2.2.3 Исследование биохимических показателей после имплантации ксеноматериала

Были сформированы три группы животных: экспериментальная, контрольная и интактная. В каждой серии эксперимента участвовало не менее 6 животных.

В опытной группе ($n=6$) животные подверглась оперативному вмешательству с имплантацией опытного образца с антибактериальным покрытием;

Контрольной группа ($n=6$) состояла из животных, которым проводилась операция без имплантации исследуемого материала;

Интактная группа ($n=6$) состояла из животных, которые не подвергались оперативному вмешательству.

Образцы ксеноперикарда были имплантированы в подкожно-жировую клетчатку крыс. Были использованы половозрелые животные – крысы линии Wistar массой 200–250 г. Имплантация проводилась по методу Fishbein M.

etal., 1982. Перед операцией животные в течение 7 дней содержались в виварии для акклиматизации. Содержание животных и условия проведения экспериментов *in vivo* соответствовали ГОСТ Р ИСО 10993-2-2009 «Требования к обращению с животными». Перед процедурой имплантации удаляли шерсть с операционного поля. Операцию проводили под наркозом в стерильных условиях. Перед имплантацией образца ксеноперикарда, участок кожи в месте разреза обеззараживали 0,05 % раствором хлоргексидина, излишки антисептика удаляли стерильными салфетками. Для имплантации делали 3 разреза длиной 1 см каждый на спине животного. Подкожные карманы формировали с помощью заостренного шпателя, отделяя подкожные ткани от мышечного слоя. Образцы помещали в образовавшуюся полость с помощью стерильного пинцета. Разрез закрывали рассасывающейся нитью кетгута, накладывая простые узелковые хирургические швы. Рану обрабатывали антисептиком и закрывали клеем медицинским БФ-6 [17]. После пробуждения животные были активны и не проявляли признаков дискомфорта. На 14 и 28 сутки проводили забор крови путем пункции хвостовой вены, центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 минут. Плазму крови использовали для определения биохимических показателей. Как следует из методических материалов по токсиколого-гигиеническим исследованиям полимерных материалов и изделий на их основе медицинского назначения, на этапе доклинических испытаний в обязательном порядке должна быть исследована белково-ферментообразующая и дезинтоксикационная функция печени, которая включает определение общего белка, альбумина, креатинина, АЛТ, АСТ, ЛДГ, ГГТ, глюкозы. Оценивали показатели с использованием реагентов фирмы Ольвекс - Диагностикум.

После этого животных декапитировали, извлекали имплантированные образцы с прилежащими тканями реципиента для гистологического исследования. Оценивали воспаление и степень фиброза, степень

дегенерации в морфологии ткани, некроз, состояние тканевого ложа и поверхности имплантата.

Определение показателя общего белка.

Принцип метода заключается в том, что белок образует окрашенный комплекс с ионами меди в щелочной среде. Интенсивность окраски пропорциональна концентрации белка в пробе.

Для проведения анализа подготавливаются пробы следующего состава:

- опытная проба (1 мл рабочего реактива и 20 мкл плазмы);
- калибровочная проба (1 мл рабочего реактива и 20 мкл калибратора);
- контрольная проба (1 мл рабочего реактива и 20 мкл дистиллированной воды).

Пробы перемешать. Инкубировать 15 мин при 37 °С. Измерить оптические плотности проб при длине волны 540 нм.

Концентрация белка определяется отношением оптической плотности опытной пробы к оптической плотности калибровочной пробы, умноженным на концентрацию белка в калибраторе. Концентрация белка в калибраторе равна 70 г/л.

Нормальные показатели 65–85 г/л.

Определения концентрации альбумина

Принцип метода заключается в образовании окрашенного комплекса с бромкрезоловым зеленым в слабокислой среде в присутствии детергента. Интенсивность окраски пропорциональна концентрации альбумина в пробе.

Для проведения анализа подготавливаются пробы следующего состава:

- опытная проба (1 мл монореагента и 5 мкл плазмы);
- калибровочная проба (1 мл монореагента и 5 мкл калибратора);

- контрольная проба (1 мл монореагента и 5 мкл дистиллированной воды).
- Пробы перемешать. Инкубировать 5 мин при 20 °С. Измерить оптические плотности проб при длине волны 568 нм.

Концентрация альбумина определяется отношением оптической плотности опытной пробы к оптической плотности калибровочной пробы, умноженным на концентрацию белка в калибраторе. Концентрация белка в калибраторе равна 60 г/л.

Нормальные показатели 35-50 г/л.

Определение уровня креатинина

Уровень креатинина определяли унифицированным методом. Креатинин образует окрашенный комплекс с пикриновой кислотой в щелочной среде. Концентрация креатинина в анализируемой пробе прямо пропорциональна интенсивности окраски комплекса с пикриновой кислотой. В состав набора входит:

Реагент №1. Пикриновая кислота.

Реагент №2. Натр едкий.

Реагент №3. Депротеинизатор.

Калибратор – раствор креатинина 177 мкмоль/л, согласно процедуре анализа.

Подготовительный этап для образцов:

- опытная проба (0,5 мл реагента № 1, 1 мл дистиллированной воды и 0,5 мл плазмы);
- контрольная проба (0,5 мл реагента № 3 и 1,5 мл дистиллированной воды).

Для проведения анализа подготавливаются пробы следующего состава:

- Опытная проба(1 мл супернатанта, 0,5 мл реагента № 1 и 0,5 мл реагента № 2)

- Калибровочная проба(1 мл калибратора, 0,5 мл реагента № 1 и 0,5 мл реагента № 2)
- Контрольная проба (1 мл контрольного раствора, 0,5 мл реагента № 1 и 0,5 мл реагента № 2)

Пробы перемешать. Инкубировать 20 минут при 20 °С. Измерить оптические плотности проб при длине волны 505 нм.

Концентрация креатинина определяется отношением оптической плотности опытной пробы к оптической плотности калибровочной пробы, умноженным на концентрацию креатинина в калибраторе. Концентрация белка в калибраторе равна 177 мкмоль/л.

Нормальные показатели 43,3 мкмоль/л.

Определения активности аланинаминотрансферазы

Под действием фермента аланинаминотрансферазы происходит перенос аминокетогруппы с аланина на α -кетоглутарат. Активность АЛТ пропорциональна количеству образовавшихся динитрофенилгидразонов пирувата в щелочной среде.

В состав набора входит:

Реагент № 1.– буфер-субстратный раствор.

Реагент № 2– раствор 2,4-ДНФГ.

Реагент № 3–натрий едкий.

Калибратор (раствор пирувата натрия)

Для проведения анализа подготавливаются пробы следующего состава:

- опытная проба (0,25 мл реагента № 1 и 50 мкл плазмы);
- контрольная проба (0,25 мл реагента № 1).

Пробы перемешать. Инкубировать 20 мин при 37 °С.

В опытную пробу добавить 0,25 мл реагента № 2; в контрольную пробу добавить 0,25 мл реагента № 2 и 50 мкл плазмы.

Пробы перемешать. Инкубировать 20 минут при 20 °С.

Далее в пробирки добавить по 2,5 мл разведенного реагента № 3, перемешать реакционную смесь и через 10 минут измерить оптические плотности проб при длине волны 537 нм.

Активность фермента определяется произведением разности оптических плотностей опытной и калибровочной проб на коэффициент, рассчитанный по калибровочному графику.

Нормальные показатели – до 0,19 мкмоль/(с*л) или до 0,68 ммоль/(час*л).

Определения активности аспаратаминотрансферазы

Под действием фермента аланинаминотрансферазы происходит перенос аминогруппы с аланина на α -кетоглутарат. Активность АЛТ пропорциональна количеству образовавшихся динитрофенилгидразонов пирувата в щелочной среде.

В состав набора входит:

Реагент № 1.– буфер-субстратный раствор.

Реагент № 2– раствор 2,4-ДНФГ.

Реагент № 3–натрий едкий.

Калибратор (раствор пирувата натрия)

Для проведения анализа подготавливаются пробы следующего состава:

- опытная проба (0,25 мл реагента № 1 и 50 мкл плазмы);
- контрольная проба (0,25 мл реагента № 1).

Пробы перемешать. Инкубировать 20 мин при 37 °С.

В опытную пробу добавить 0,25 мл реагента № 2; в контрольную пробу добавить 0,25 мл реагента № 2 и 50 мкл плазмы.

Пробы перемешать. Инкубировать 20 минут при 20 °С.

Далее в пробирки добавить по 2,5 мл разведенного реагента № 3, перемешать реакционную смесь и через 10 минут измерить оптические плотности проб при длине волны 537 нм.

Активность фермента определяется произведением разности оптических плотностей опытной и калибровочной проб на коэффициент, рассчитанный по калибровочному графику.

Нормальные показатели – до 0,19 мкмоль/(с х л) или до 0,68 ммоль/(час х л).

Определения активности лактатдегидрогеназы

Принцип метода заключается в окислении пировиноградной кислоты до молочной кислоты. Скорость окисления НАДН в НАД⁺ пропорциональна активности ЛДГ.

В кювете, заранее прогретой при 37 °С, с длиной оптического пути 1 см смешать рабочий реагент и плазму крови в соотношении 100:1.

Через минуту измерить величину экстинкции при длине волны 340 нм. Произвести повторные измерения через 1, 2 и 3 мин. Рассчитать среднее значение экстинкции за 1 минуту.

Активность фермента определяется произведением среднего значения экстинкции и постоянной величины. Постоянная величина равна 16 030.

Нормальные показатели – 225-450 Ед/л.

Определения активности гамма-глутамилтрансферазы

Определяли методом по конечной точке. Принцип метода заключается в способности гамма-ГТ переносить γ -глутамиловую группу синтетического субстрата L- γ -глутамил-3-карбокси-4-нитроанилида на акцептор глицил-глицин. Активность фермента прямо пропорциональна количеству образовавшегося 5-амино-2-нитробензоата в пробе.

В состав набора входит:

Реагент № 1. Буфер.

Реагент № 2. Раствор уксусной кислоты.

Реагент № 3. Субстрат.

Рабочий реагент: смешайте необходимое количество реагента № 1 и № 3 в соотношении 4:1

Калибровочный раствор р-нитроанилина - 518 мг/л.

Для проведения анализа подготавливаются пробы следующего состава:

- опытная проба (0,5 мл реагента № 1 и 50 мкл плазмы);
- контрольная проба (0,5 мл рабочего реагента).

Пробы перемешать. Инкубировать 20 мин при 37 °С.

В опытную пробу добавить 1 мл реагента № 2 и 2 мл дистиллированной воды ; в контрольную пробу добавить 0,5 мл реагента № 2, 2 мл дистиллированной воды и 50 мкл плазмы.

Пробы перемешать. Измерить оптическую плотность опытных проб против соответствующих контрольных проб при длине волны 405 нм.

Нормальные показатели –7,4 Ед/л

Определение содержания глюкозы

Принцип метода заключается в окислении β-D-глюкозы под действием фермента глюкозооксидазы до D-глюконолактона. Образуется перекись водорода, которая способствует окислительному азосочетанию 4-аминоантипирина и фенола, что приводит к образованию окрашенного соединения – хинониминового красителя. Интенсивность окраски пропорциональна содержанию глюкозы в исследуемом материале.

Для проведения анализа подготавливаются пробы следующего состава:

- опытная проба (1 мл рабочего реактива и 5 мкл плазмы);
- калибровочная проба (1 мл рабочего реактива и 5 мл калибратора);
- контрольная проба (1 мл рабочего реактива и 5 мкл бидистиллированной воды).

Пробы перемешать. Инкубировать 20 мин при 37 °С. Измерить оптические плотности проб при длине волны 500 нм.

Концентрация белка определяется отношением оптической плотности опытной пробы к оптической плотности калибровочной пробы, умноженным

на концентрацию глюкозы в калибраторе. Концентрация глюкозы в калибраторе равна 10 ммоль/л.

Нормальные показатели 4,2 - 6,1 ммоль/л.

2.2.4 Гистологическое исследование

Гистологическое исследование мягких соединительных тканей состояло из следующих этапов:

- 1) Подготовка образцов для гистологического исследования.
- 2) Проводка фрагментов по возрастающим концентрациям спиртов и пропитка парафином с последующим изготовлением парафиновых блоков.
- 3) Изготовление парафиновых срезов.
- 4) Окрашивание гистологических срезов гематоксилин-эозином и гематоксилин-пикрофуксином (метод Вейгерта-Ван-Гизона).
- 5) Заключение окрашенных срезов под покровное стекло.
- 6) Изучение срезов под микроскопом в проходящем свете.

1. Метод окраски гематоксилин-эозином. Гематоксилин – это природный краситель растительного происхождения, растворимый в воде, спирте и глицерине. Его основные свойства позволяют выявлять структурные компоненты ядра. Эозин – это искусственный краситель, растворимый в воде и спиртах, окрашивает цитоплазму клеток в розовый цвет.

Методика окрашивания гематоксилин-эозином предполагает приготовление стекол со срезами, удаление излишка влаги с препарата и накапывание пипеткой раствор красителя до полного покрытия препарата. Через 7-10 минут сливают красящий раствор со стекол и помещают в на 5 минут в дистиллированную воду для отмывания излишков красителя. После этого 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, двухкратно 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. После этого, предварительно протерев предметное стекло, препарат рассматривают под микроскопом, накрыв препарат покровным стеклом.

2) Метод Вейгерта-Ван-Гизона (окрашивание гематоксилин-пикрофуксином). При окраске данным методом применяют два раствора: железный гематоксилин Вейгерта и кислую смесь пикрофуксина. Коллагеновые волокна соединительной ткани после окраски пикрофуксином имеют ярко-красный цвет, а мышечные и эластические волокна – буровато-красный или желто-зеленый. Железный гематоксилин Вейгерта окрашивает ядра в темно-коричневый или буровато-черный цвет.

При окрашивании, в первую очередь, на срез наносили 10 капель раствора йодной кислоты. По истечении 5 минут промывали срезы в дистиллированной воде, а потом поместили в гематоксилин Вейгерта и инкубировали 12 часов. После инкубации срезы ополаскивали в дистиллированной воде и 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 [3].

2.2.5 Методы статистической обработки результатов

Для оценки полученных экспериментальных данных были применены методы проверки статистических гипотез, методы статистического описания, использующиеся в стандартных пакетах программы Statistica 6.0.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ

ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Результаты исследования антибактериальной активности модифицированного ксеноперикарда диско-диффузионным методом.

Результаты испытаний антибактериальной активности представлены в Таблице 2.

Таблица 2 – Антибактериальная активность модифицированного ксеноперикарда ($M \pm m$, $n=5$)

Вид бактериальной культуры	Зона задержки роста, мм
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	23
<i>Staphylococcus aureus</i>	22
<i>Enterococcus faecalis</i>	17
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	23
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	18
<i>Escherichia coli</i>	21

Согласно полученным результатам, образцы модифицированного ксеноперикарда обладают антибактериальной активностью по отношению к культурам *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli*.

3.2 Результаты исследования динамики высвобождения лекарственного препарата

Динамика высвобождения ванкомицина из исследуемых образцов представлена в таблице 3-4 и на рисунках 2-3.

Таблица 3 – Высвобождение ванкомицина в первые сутки эксперимента

Время	Оптическая плотность (280 нм)	С ванкомицина в растворе, мкг/мл	Количество высвободившегося ванкомицина, мг	Количество высвободившегося ванкомицина, (%)
15 мин	0,17456	0,2299	2,2993	22,99
30 мин	0,13312	0,1744	1,7438	17,44
60 минут	0,11466	0,1492	1,4916	14,92
2 часа	0,11074	0,1449	1,4494	14,49
24 часа	0,11375	0,1491	1,4913	14,91

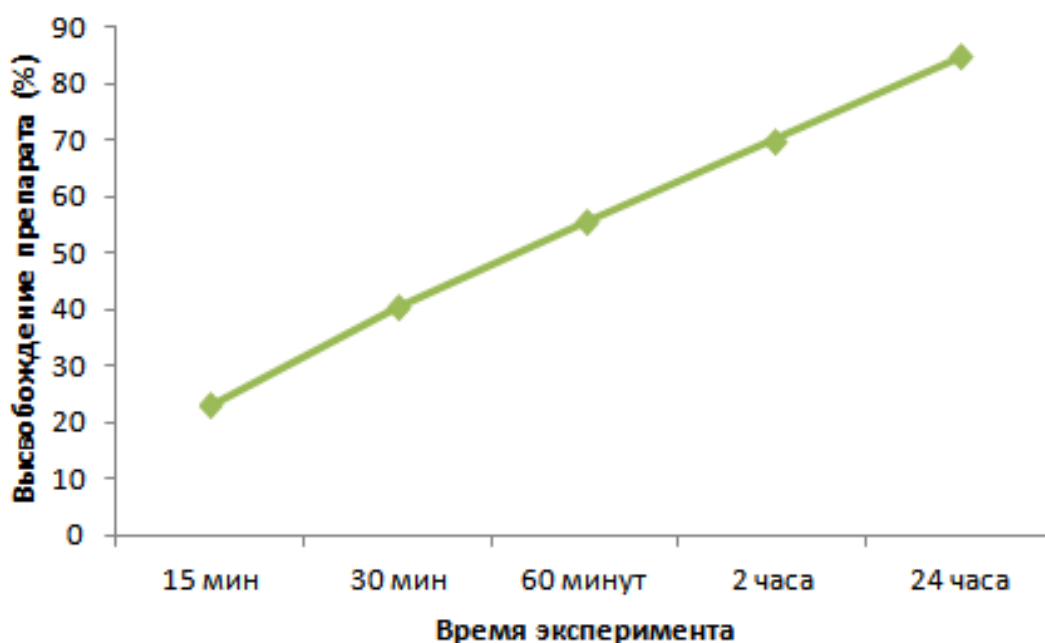


Рисунок 2. Суммарное высвобождение ванкомицина в первые сутки эксперимента, % ($M \pm m$, $n=6$)

Можно отметить постепенное высвобождение ванкомицина в раствор. Максимальное высвобождение обнаружено в течение первых 15 минут. Всего за первые сутки эксперимента из образцов высвободилось более 84 % от общего содержания лекарственного препарата.

Таблица 4 – Высвобождение ванкомицина в течение 5 дней

Время (сут)	Оптическая плотность (280 нм)	С ванкомицина в растворе, мкг/мл	Количество высвободившегося ванкомицина, мг	Количество высвободившегося ванкомицина, (%)
1	0,6339	0,8468	8,47	84,7
2	0,092	0,0607	1,5	15,3
3	0,0787	0,0256	0,00	0,0
4	0,0541	0,0035	0,00	0,0
5	0,0080	0,0004	0,00	0,0

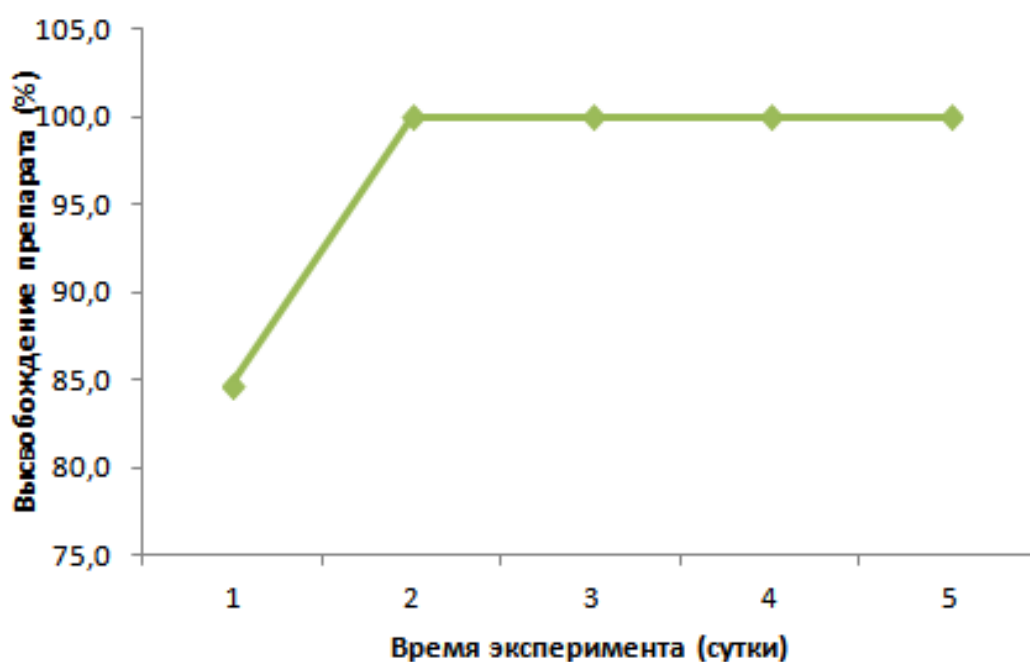


Рисунок 3. Суммарное высвобождение ванкомицина в течение 5 дней эксперимента, % ($M \pm m$, $n=6$)

Результаты исследования динамики высвобождения ванкомицина свидетельствуют о том, что модификация ксеноперикарда путем погружения в раствор ванкомицина до обработки сшивающим агентом не позволяет обеспечить задержку антибактериального препарата на поверхности материала. Большая часть лекарства вымывается в течение первых суток. Для профилактики послеоперационных осложнений это является неэффективным.

3.3 Результаты исследования биохимических показателей после имплантации ксеноматериала

3.3.1 Общий белок

На рисунке 4 представлены результаты определения концентрации общего белка в сыворотке крови крыс интактной, контрольной и опытной групп по истечении 14 и 28 дней.

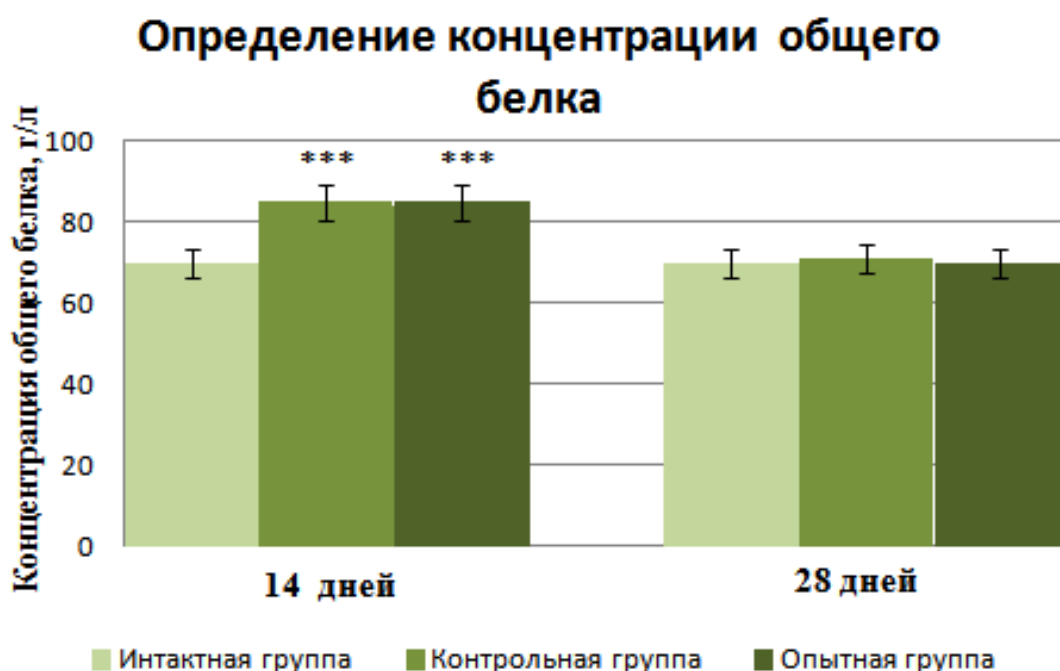


Рисунок 4. Концентрация общего белка через 14 и 28 дней после имплантации (г/л, $M \pm m$, $n=6$, Здесь: *** - $p < 0,001$ относительно интактной группы)

Через 14 дней после имплантации отмечено повышение концентрации общего белка относительно интактной группы на 24% и 22% в контрольной и опытной группах соответственно.

Данные изменения могут быть результатом развития хирургического стресс-ответа после оперативного вмешательства [21,51].

3.3.2 Альбумин

На рисунке 5 представлены результаты определения концентрации альбумина в сыворотке крови крыс интактной, контрольной и опытной групп по истечении 14 и 28 дней.

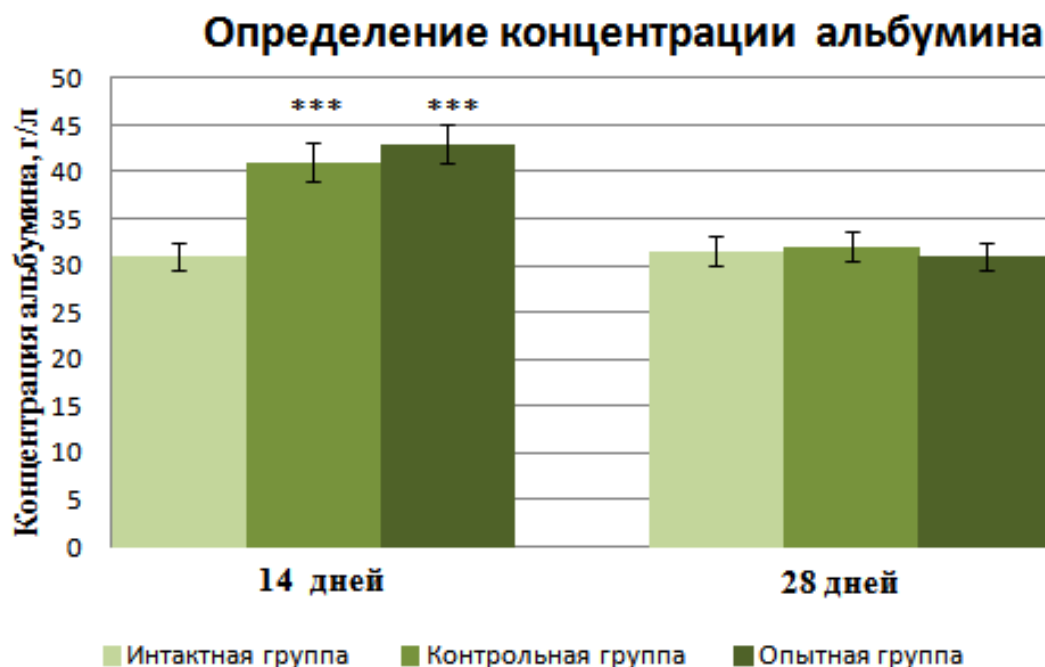


Рисунок 5. Концентрация альбумина через 14 и 28 дней после имплантации (г/л, $M \pm m$, $n=6$, Здесь: *** - $p < 0,001$ относительно интактной группы)

Через 14 дней после имплантации отмечено увеличение концентрации альбумина в контрольной и опытной группах относительно интактной на 27% и 32%. Через 28 дней после имплантации достоверных отличий между группами не обнаружено. Данное изменение концентрации альбумина может свидетельствовать о развитии воспалительной реакции в ответ на оперативное вмешательство, что является нормальным в ранний послеоперационный период [38].

3.3.3 Креатинин

На рисунке 6 представлены результаты концентрации креатинина в плазме крови крыс опытной, контрольной и интактной групп после декапитации по истечении 14 и 28 недель.

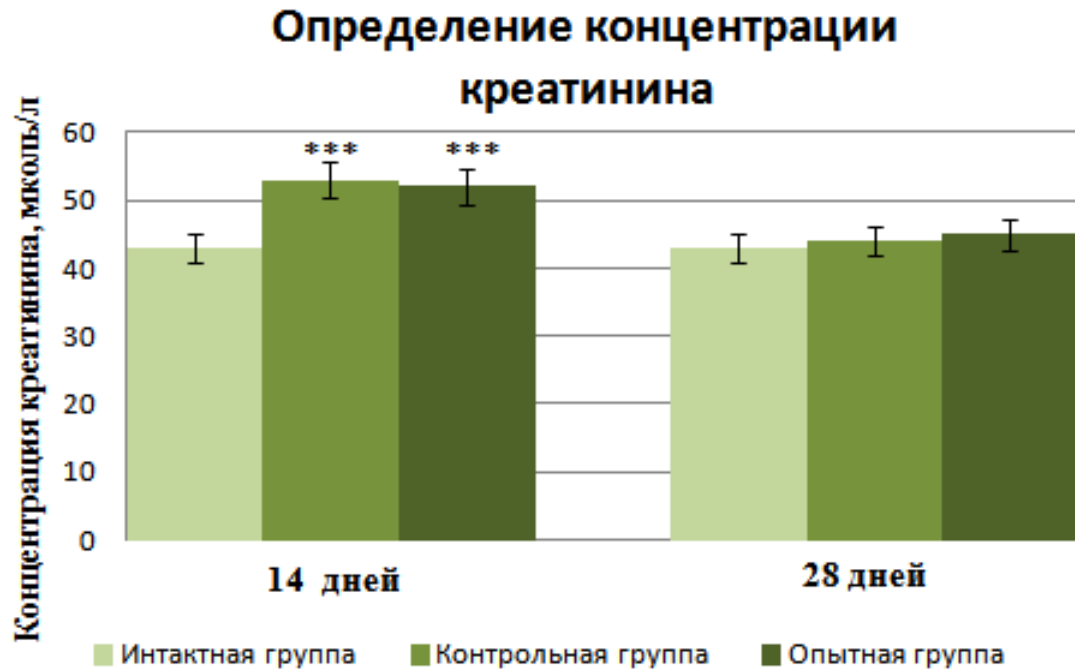


Рисунок 6. Концентрация креатинина после декапитации по истечении 14 и 28 дней (мкмоль/л, $M \pm m$, $n=6$, Здесь: *** - $p < 0,001$ относительно интактной группы)

Через 2 недели после оперативного вмешательства в сыворотке крови крыс опытной и контрольной групп наблюдается повышение концентрации креатинина на 22% и 26% относительно интактной группы. Через 4 недели после операции концентрация креатинина в сыворотке крови крыс контрольной и опытной групп достоверно не отличалась от значений интактной группы.

3.3.4 Аланинаминотрансфераза

На рисунке 7 представлены результаты определения активности АЛТ в сыворотке крови крыс интактной, контрольной и опытной групп по истечении 14 и 28 дней.

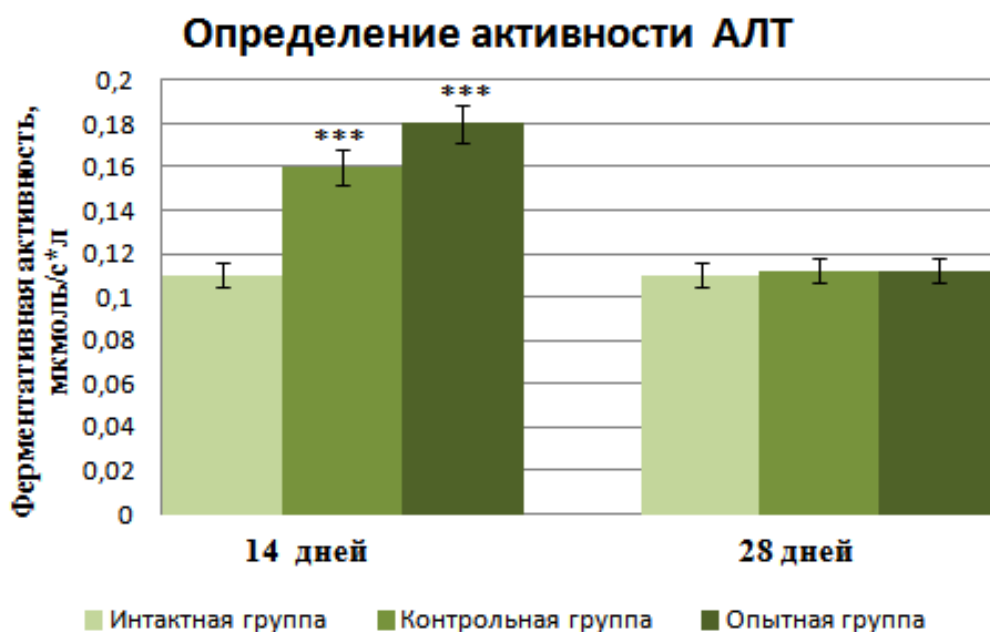


Рисунок 7. Активность аланинаминотрансферазы через 14 и 28 дней после имплантации (мкмоль/с*л, $M \pm m$, $n=6$, Здесь: *** - $p < 0,001$ относительно интактной группы)

Через 14 дней после имплантации отмечено увеличение активности аланинаминотрансферазы относительно интактной группы на 41% и 45% в контрольной и опытной группах соответственно. Через 28 дней после имплантации достоверных отличий между группами не обнаружено.

Поскольку фермент преимущественно локализован в цитозоле клеток печени [35], их повреждение приводит к увеличению концентрации фермента в крови. Данные изменения могут быть результатом стрессового для организма оперативного вмешательства. Причинами изменений могут быть известные катаболические эффекты глюкокортикоидов, способные прямо

или опосредованно оказывать влияние на морфологию и функциональную активность гепатоцитов [14, 48].

3.3.5 Аспартатаминотрансфераза

На рисунке 8 представлены результаты определения активности АСТ в сыворотке крови крыс интактной, контрольной и опытной групп по истечении 14 и 28 дней.

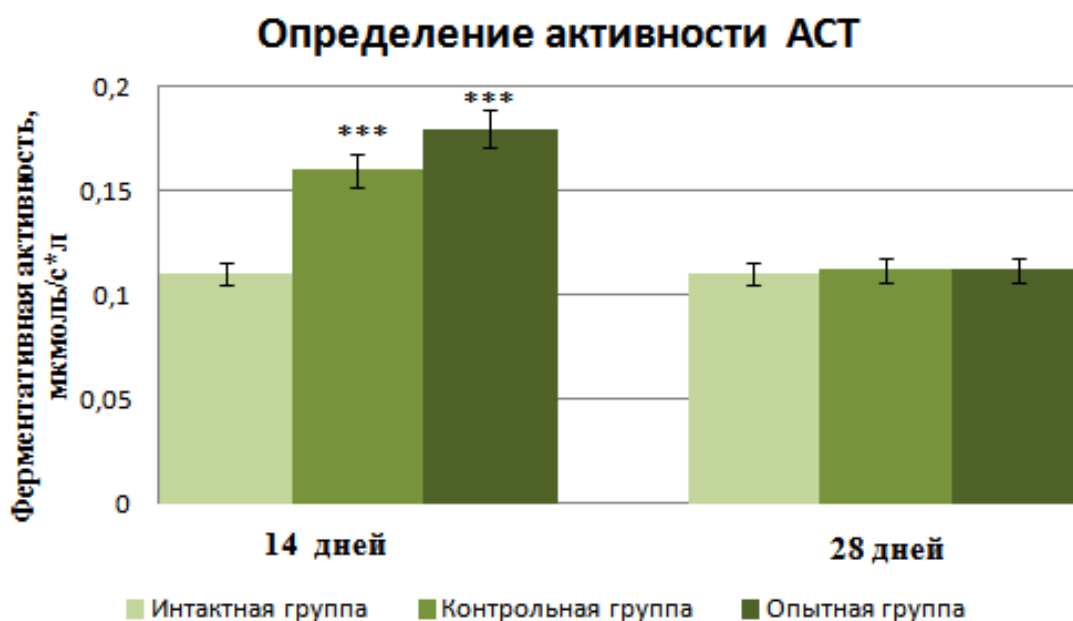


*Рисунок 8. Активность аспартатаминотрансферазы через 14 и 28 дней после имплантации (мкмоль/с*л, $M \pm m$, $n=6$, Здесь: *** - $p<0,001$ относительно интактной группы)*

Через 14 дней после имплантации отмечено увеличение активности аспартатаминотрансферазы относительно интактной группы в 1,83 раза и в 1,91 раз в контрольной и опытной группах соответственно. Через 28 дней после имплантации достоверных отличий между группами не обнаружено.

Данные изменения могут быть результатом стрессового для организма оперативного вмешательства, способствующего активации нейро-гуморально-метаболических реакций [11,37]. Причинами изменений могут

быть известные катаболические эффекты глюкокортикоидов, способные прямо или опосредованно оказывать влияние на морфологию и функциональную активность гепатоцитов [14, 48].

3.3.6 Лактатдегидрогеназа

На рисунке 9 представлены результаты определения активности ЛДГ в сыворотке крови крыс интактной, контрольной и опытной групп по истечении 14 и 28 дней.

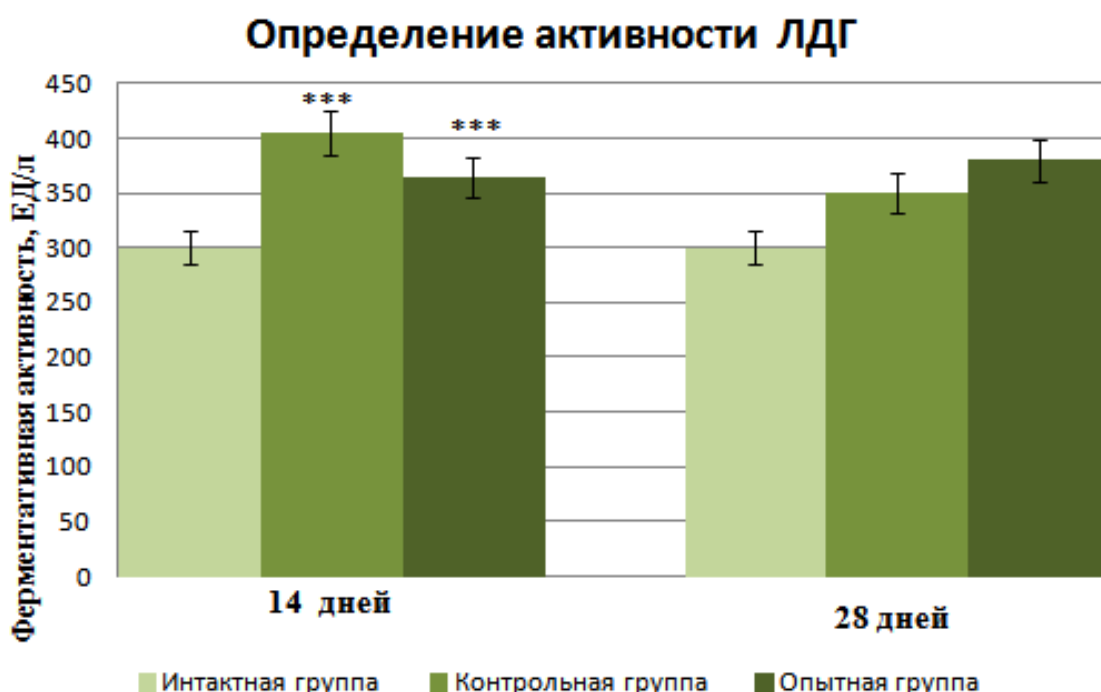


Рисунок 9. Активность лактатдегидрогеназы через 14 и 28 дней после имплантации (мкмоль/с*л, $M \pm m$, $n=6$, Здесь: *** - $p < 0,001$ относительно интактной группы)

Через 14 дней после имплантации отмечено увеличение активности лактатдегидрогеназы в контрольной группе относительно интактной на 35%. Через 28 дней после имплантации достоверных отличий между группами не обнаружено.

Лактатдегидрогеназа содержится практически во всех тканях, и повышение активности ЛДГ не имеет большого значения для дифференциальной диагностики заболеваний внутренних органов. Активность фермента значительно повышается при различных хирургических патологиях, сопровождающихся шоковым состоянием [1].

3.3.7 Гамма-глутамилтрансфераза

На рисунке 10 представлены результаты активности гамма-глутамилтрансферазы в плазме крови крыс опытной, контрольной и интактной групп после декапитации по истечении 14 и 28 недель.

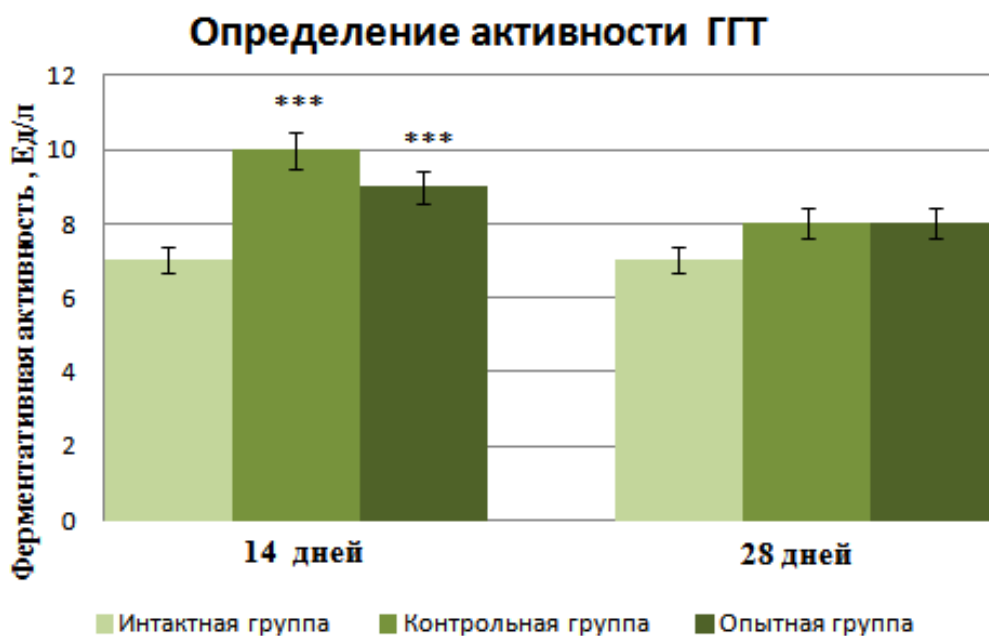


*Рисунок 10. Активность гамма-глутамилтрансферазы после декапитации по истечении 14 и 28 дней (Ед/л, $M \pm m$, $n=6$, Здесь: *** - $p < 0,001$ относительно интактной группы)*

Через 14 дней после имплантации отмечено увеличение активности гамма-глутамилтрансферазы в контрольной и опытной группах относительно интактной на 49% и 45%. Через 28 дней после имплантации достоверных отличий между группами не обнаружено.

3.3.8 Глюкоза

На рисунке 11 представлены результаты определения концентрации глюкозы в сыворотке крови крыс интактной, контрольной и опытной групп по истечении 14 и 28 дней.

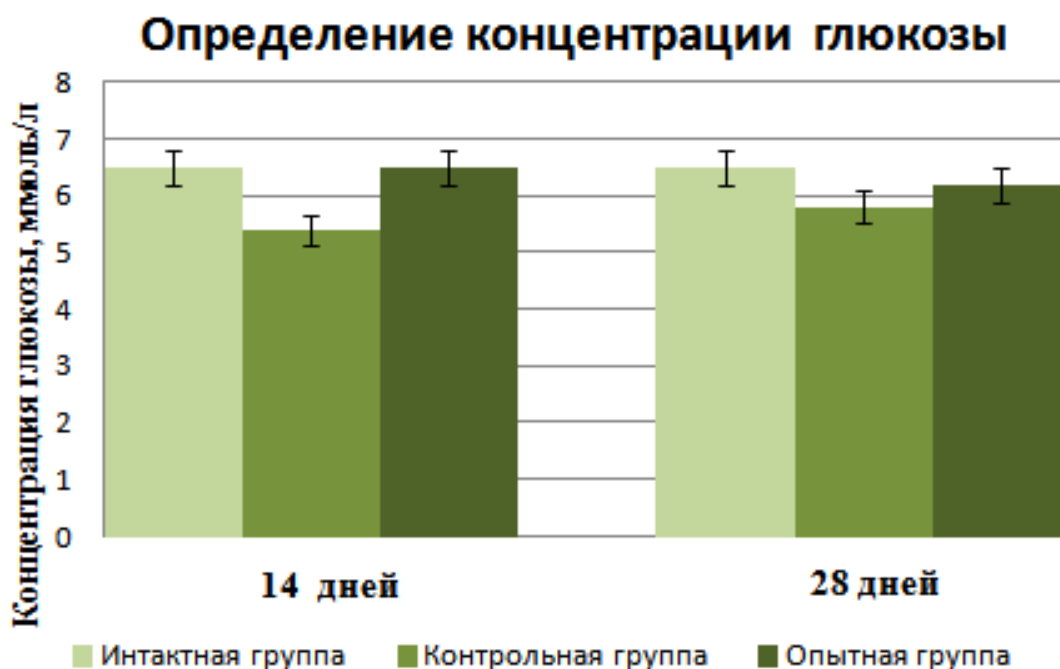


Рисунок 11. Концентрация глюкозы через 14 и 28 дней после имплантации (ммоль/л, $M \pm m$, $n=6$, Здесь: *** - $p < 0,001$ относительно интактной группы)

Достоверных отличий в уровнях глюкозы в интактной, контрольной и опытных группах не выявлено. Все показатели находятся в пределах нормальных значений (4,2 - 6,1 ммоль/л) [49].

3.4 Результаты гистологических исследований

Для оценки морфологических изменений тканей в зоне имплантации через 14 и 28 дней после операции животных выводили из эксперимента

путем декапитации и осуществляли забор имплантируемого материала вместе с прилежащими к имплантату тканями реципиента.

Результаты гистологического исследования после 2 недель имплантации материалов представлены на рисунках 12-15.

На рисунках 12 и 13 представлены результаты гистологического исследования образцов через 2 недели после имплантации.

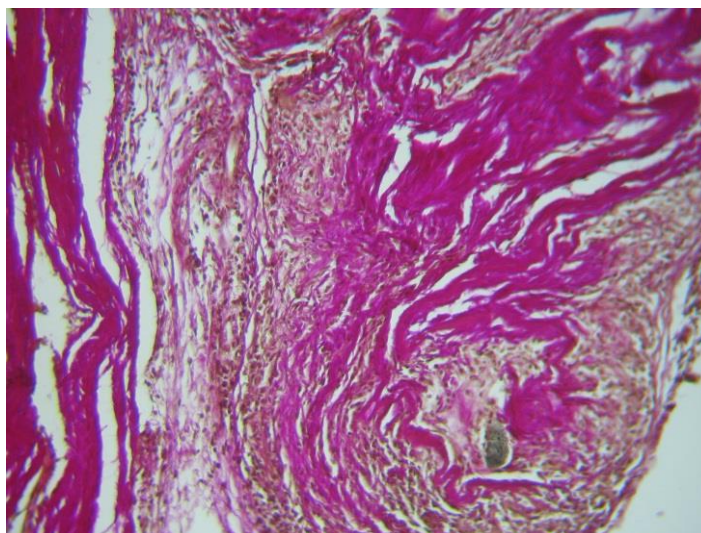


Рисунок 12. Результат гистологического исследования через 2 недели после имплантации, окраска по Вейгерт-Ван-Гизону, x200

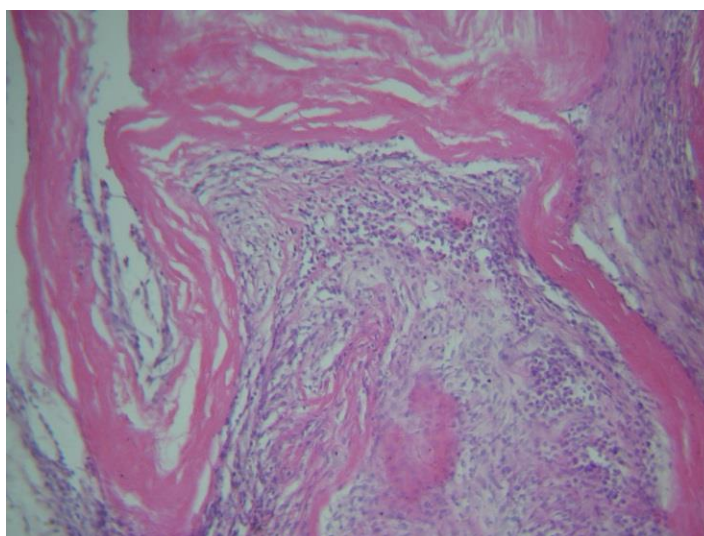


Рисунок 13. Результат гистологического исследования через 2 недели после имплантации, окраска гематоксилин-эозин, x200

Гистологическое исследование образцов через 2 недели после имплантации показало отсутствие выраженной воспалительной реакции и отсутствие биоинтеграции.

На рисунках 14 и 15 представлены результаты гистологического исследования образцов через 4 недели после имплантации.

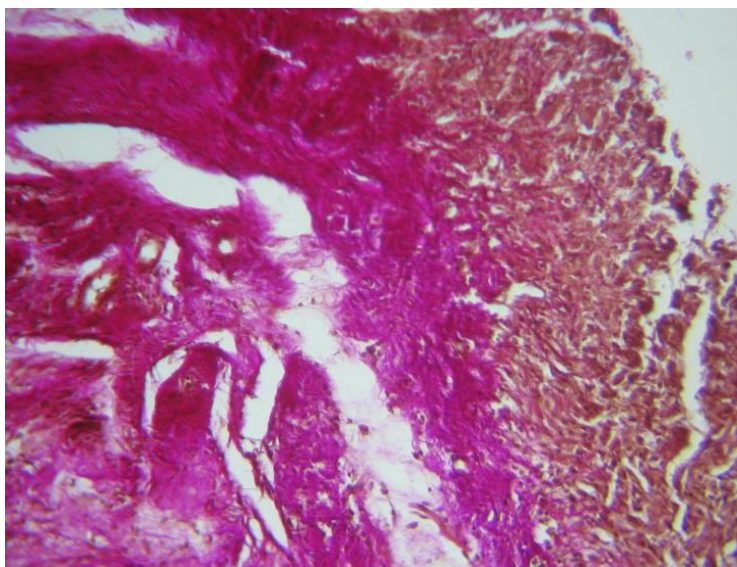


Рисунок 14. Результат гистологического исследования через 4 недели после имплантации, окраска по Вейгерт-Ван-Гизону, x200

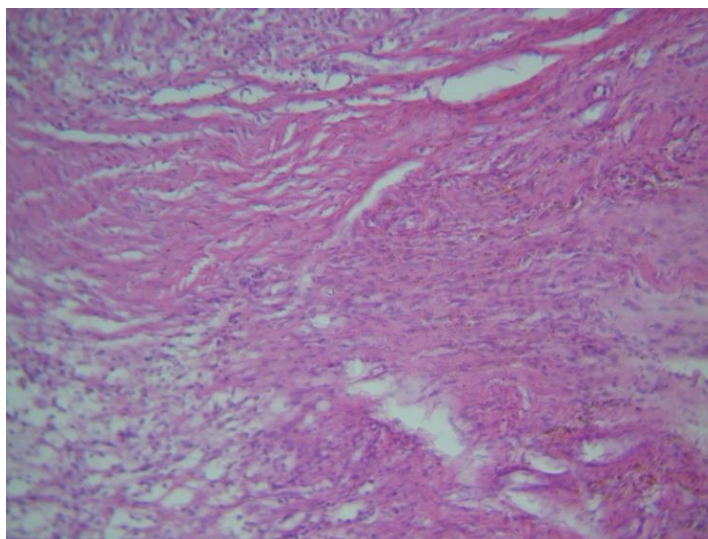


Рисунок 15. Результат гистологического исследования через 4 недели после имплантации, окраска гематоксилин-эозин, x200

Гистологическое исследование образцов через 4 недели после имплантации показало отсутствие выраженной воспалительной реакции, формирование фиброзной капсулы вокруг образца и слабую степень биоинтеграции по краю.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в ходе выполнения бакалаврской работы были изучены антибактериальное действие перикарда, модифицированного лекарственным препаратом, динамика выхода препарата, а также биохимические показатели плазмы крови и морфологические изменения в зоне имплантации экспериментальных образцов на разных сроках после операции.

Исходя из результатов, можно сделать следующие **выводы**:

- 1) Установлено, что образцы модифицированного ксеноперикарда обладают антибактериальной активностью по отношению к культурам *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli*;
- 2) Отмечено, что модификация ксеноперикарда путем погружения в раствор ванкомицина до обработки сшивающим агентом не позволяет обеспечить задержку антибактериального препарата на поверхности материала;
- 3) Через 14 дней после имплантации модифицированного ксеноперикарда, отмечено достоверное изменение биохимических показателей плазмы крови в контрольной и опытной группах относительно интактной группы, что может быть обусловлено оперативным вмешательством, которое является стрессирующим воздействием на организм животного. Отсутствие достоверных отличий в значениях биохимических показателей в 3-х группах через 28 дней после имплантации свидетельствуют о завершении репаративных процессов после хирургических вмешательств;
- 4) Гистологическое исследование образцов через 2 и 4 недели после имплантации показало отсутствие выраженной воспалительной реакции и отсутствие биоинтеграции, а также формирование фиброзной капсулы вокруг образца через 4 недели после имплантации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Адамян А. А. Основные направления и перспективы в создании и клиническом применении полимерных имплантатов // Современные подходы к разработке эффективных перевязочных средств, шовных материалов и полимерных имплантатов. 1995. №92. С.177-179.
2. Афанасьев Д.С., Скороглядов А.В., Копенкин С.С., Бут-Гусаим А.Б., Зинченко А.В., Розаев В.Ю. Сравнительный анализ использования аутотрансплантата из связки надколенника и учетверенного сухожильного трансплантата *m. semitendinosus* и *m.gracilis* для пластики ПКС // VIII конгресс Российского артроскопического общества: программа и тезисы. 2009. С. 104.
3. Батпенов Н.Д., Баймагамбетов Ш.А., Раймагамбетов Е.К. Реконструкция передней крестообразной связки свободным ауто сухожилием связки надколенника // VIII конгресс Российского артроскопического общества: программа и тезисы. 2009. С. 104.
4. Баулин А. В., Середин С. А., Квасов А. Е., Митрошин А. Н., Баулин В. А., Венедиктов А. А., Лембас А. Н., Никишин Д. В. Ксеноперикардальная герниопластика: возможности и перспективы // Бюллетень медицинских интернет-конференций. 2011. Т. 1. № 5. С. 11–15
5. Баулина О.А., Баулин А.В., Вихрев Д.В., Федорова М. Г., Баулин В.А., Венедиетов А.А., Баулина Н.В. Внедрение ксенобиоматериалов в герниологию и урогинекологию // Фундаментальные исследования. № 10. 2012. С.228-230.
6. Бритиков Д.В., Новиков С.П., Салохединова Р.Р., Соркомов М.Н. Исследование свойств модифицированного перикарда для изготовления биопротезов клапанов сердца // Бюллетень НЦССХ им. А.Н. Бакулева РАМН. Сердечно-сосудистые заболевания. 2017. Т. 18. № 3. С. 170.
7. Гамзазаде А.И., Бакулева Н.П., Белавцева Е.М., Галлямов М.О. Исследование морфологии покрытия ткани перикарда ионогенными

производными хитозана методами электронной микроскопии // Известия Российской академии наук. Серия физическая. 2009. Т. 73. № 4. С. 492-495.

8. ГОСТ ISO 10993. Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 1. Оценка исследования. 2011.

9. ГОСТ ISO 10993. Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 19. Исследование физико-химических, морфологических и топографических материалов. 2011.

10. Гуляев В.А., Хубутя М.Ш., Новрузбеков М.С., Миронов А.С., Олисов О.Д., Луцык К.Н., Журавель С.В., Магомедов К.М., Ахметшин Р.Б., Яремин Б.И. Ксенотрансплантация: история, проблемы и перспективы развития // Трансплантология. 2019. Т. 11. № 1. С. 37-54.

11. Дубова, Е.А. Морфологическая характеристика тканевой реакции при имплантации сетчатых эндопротезов // диссертация кандидата медицинских наук . 2008. С.99.

12. Иванов А. С. Балоян Г. М. Тараян М. В. Лебедева А. В. Рудаков А. С. Непрямая истмопластика коарктации аорты ксеноперикардом. Ближайшие и отдаленные результаты хирургической коррекции // Кардиология и сердечно сосудистая хирургия. 2007. №1. С. 73-77.

13. Калмин О.В. , Венедиктов А.А. , Никишин Д.В. , Живаева Л.В. Изучение свойств ксеноперикардальной пластины, обработанной модифицированным химикоферментативным методом // Бюллетень медицинских интернет-конференций. 2015. С. 1038-1039

14. Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике // Мн. 2000. Т.1. С. 446.

15. Каплунов О.А. К истории оперативного восстановления крестообразных связок коленного сустава. // Травматология и ортопедия России. 2007. №5. С.76

16. Кармадонов А.В. Применение модифицированного ксеноперикарда в хирургическом лечении грыж передней брюшной стенки // Автореф. дисс. канд. мед. наук. 2009. С.22

17. Кручинина А. Д., Гамзин С. С., Генгин М. Т. Влияние подкожной имплантации говяжьего ксеноперикарда на активность ферроксидазы и перекись разрушающих ферментов сыворотки крови крыс // Известия Пензенского государственного педагогического университета им. В.Г. Белинского. 2012. № 29. С. 30
18. Кудрявцева Ю.А. Биологические протезы клапана сердца. От идеи до клинического применения // Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. 2015. № 4. С.8
19. Кудрявцева Ю.А., Насонова М.В., Глушкова Т.В., Акентьева Т.Н., Бураго А.Ю. Сравнительный анализ биоматериала, потенциально пригодного для создания протеза аортального клапана сердца для транскатетерной имплантации // Сибирский медицинский журнал (Иркутск). 2013. Т. 120. № 5. С. 66-69.
20. Марков А.А., Сергеев К.С., Тимофеева Н.В., Маслова Е.Н. Особенности гистологических методов исследования соединительной ткани в экспериментах// Медицинская наука и образование урала. 2018. С. 191
21. Мельников В.В. Руководство по клинической лабораторной диагностике // М. Медицина . 1982. С.148-240
22. Патент РФ № 2120212 Способ предимплантационной обработки биологических протезов сосудов и клапанов сердца
23. Подолужный В. И., Гордеев М. С., Павленко В. В. Использование модифицированного ксеноперикарда при хирургическом лечении // Политравма. 2011. № 4. С. 51–54.
24. Саушкина А.С., Булавина О.В. Изучение возможности выявления контрафактной продукции методом спектрофотометрии // Разработка исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции. 2010. № 65. С.390-392.
25. Севастьянов В.И., Васин С.Л., Перова Н.В. Методы исследований биоматериалов и медицинских изделий // М.: ИЦ ВНИИ геосистем,. 1999. С. 87.

26. Синельников Р.Д. Атлас анатомии человека // М. : Медицина. 1996. С.319
27. Соркомов М., Бритиков Д.В., Муратов Р.М., Сачков А.С. Сравнительная оценка биомеханических и иммуногенных свойств децеллюляризованного ксеногенных (свиной и бычий) и аллогенного перикардов // Бюллетень НЦССХ им. А.Н. Бакулева РАМН. 2017. Т. 18. № 6. С. 220.
28. Хлусов И. А. Основы биомеханики биосовместимых материалов и биологических тканей // Томск: Издательство Томского политехнического университета. 2007. С. 149
29. Храпунов В.Н., Захарова В.П., Пищулин А.А., Горячев А.Г. Структуральные изменения ксеноперикарда в зависимости от метода обработки (эксперимент *in vivo* с последующим патоморфологическим исследованием) // Ежегодник научных трудов Ассоциации сердечно-сосудистых хирургов Украины. 2012. № 18. С. 121-128.
30. Чернявский А.М, Ларионов П.М., Столяров М.С., Стародубцев В.Б.. Структурная трансформация ксеноперикарда после имплантации в сонную артерию // Патология кровообращения и кардиохирургия. 2007. №4. С. 37-40
31. Чернявский А.М., Столяров М.С., Стародубцев В.Б., Виноградова Т.Е., Альсов С.А. Сравнительные долгосрочные результаты операций каротидной эндартерэктомии с пластикой заплаты из ксеноперикарда, обработанного диэпоксидсоединениями, и аутоветены // Патология кровообращения и кардиохирургия. 2007 . № 4. С. 46-50.
32. Шумаков В.И., Севастьянов В.И. Биополимерные матрицы для искусственных органов и тканей // Здравоохранение и медицинская техника. 2003. №4. С. 30-33.
33. Bell D, Prabhu S, Betts K, Justo R, Venugopal P, Karl TR, Alphonso N. Durability of tissue-engineered bovine pericardium (CardioCel) for a minimum

of 24 months when used for the repair of congenital heart defects // J. Interact Cardiovasc Thorac Surg. 2019. № 10. P. 284-290.

34. Chang Y., Tsai C. C., Liang H. C., Sung H. W. In vivo evaluation of cellular and acellular bovine pericardia fixed with a naturally occurring crosslinking agent (genipin) // Biomaterials. 2002. Vol.23. № 12. P. 2447–57.

35. Christiansen, J.J. Effects of Cortisol on Carbohydrate, Lipid, and Protein Metabolism: Studies of Acute Cortisol Withdrawal in Adrenocortical Failure // The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 2007. Vol. 92. №. 9. P. 3553-3559.

36. Crofts C. E., Trowbridge E. A. The tensile strength of natural and chemically modified bovine pericardium // J Biomed Mater Res. 1988. Vol. 22. № 2. P. 89–98

37. Desborough, J.P. The stress response to trauma and surgery // Br. J. Anaesth. 2000. Vol.85. № 1. P.109-117

38. Doumas, B. T. Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromocresol green // Clin. Chim. Acta. 1971. Vol. 31. №3 P.87.

39. Dryden M.S. Novel antibiotic treatment for skin and soft tissue infection // Curr Opin Infect Dis. 2014. №5 P.116-117

40. Goissis G, de Fatima Giglioti A, Ramirez V, Pereira NP, de Vasconcellos A, Basso-Frazzato GG, Braile DM. In Vivo evaluation of Vivere bovine pericardium valvular bioprosthesis with a new anti-calcifying treatment// J. Artif Organs. 2020. № 15. P.88.

41. Grebenik EA, Gafarova ER, Istranov LP, Istranova EV, Ma X, Xu J, Guo W, Atala A, Timashev PS. Mammalian Pericardium-Based Bioprosthetic Materials in Xenotransplantation and Tissue Engineering// J. Biotechnol. 2020.№13. P.158.

42. Grefen L, König F, Grab M, Hagl C, Thierfelder N. Pericardial tissue for cardiovascular application: an in-vitro evaluation of established and advanced production processes// J. Mater Sci Mater Med. 2018.№8. P.172.

43. Hosseini J, Hosseini S, Hosseini MA, Rezaei Y. Pericardium in Reconstructive Urologic Surgeries: A Systematic Review and Meta-Analysis//J. Urol Int. 2019. №3. P. 131-144.
44. Isenburg J.C., et al. Elastin stabilization in cardiovascular implants: improved resistance to enzymatic degradation by treatment with tannic acid. // Biomaterials. 2004; №25.P. 3293-3302.
45. Isenburg J.C., et al. Tannic acid treatment enhances biostability and reduces calcification of glutaraldehyde fixed aortic wall. // Biomaterials, 2005. №26. P. 1237-1245
46. Jang W., Choi S., Kim S. H., Yoon E., Lim H. G., Kim Y. J. A comparative study on mechanical and biochemical properties of bovine pericardium after single or double crosslinking treatment// Korean Circ J. 2012. Vol.42. № 3. P. 154–63.
47. Jara M, Malinowski M, Bahra M, Stockmann M, Schulz A, Pratschke J, Puhl G. Bovine pericardium for portal vein reconstruction in abdominal surgery: a surgical guide and first experiences in a single center// J. Dig Surg. 2015. №4. P. 135
48. Kundrotas, L.W. Serum alanine aminotransferase (ALT) elevation in asymptomatic US Air Force basic trainee blood donors / L.W. Kundrotas, D.J. Clement // Dig. Dis. Sci. 1993. Vol.38. P. 2145-2150
49. McCowen, K.C. Stress-induced Hyperglycemia // Critical Care Clinics. 2001. Vol. 17. № 1. P.15- 27.
50. Neethling WM, Hodge AJ, Clode P, Glancy R. A multi-step approach in anti-calcification of glutaraldehyde-preserved bovine pericardium. // J Cardiovasc Surg (Torino). 2006. № 47. P. 711
51. Schricker T. Strategies to attenuate the catabolic response to surgery and improve perioperative outcomes // Canadian Journal of Anesthesia. 2007. Vol.54. № 6. P. 414-419.

52. Umashankar P. R., Arun T., Kumari T. V. Short duration gluteraldehyde cross linking of decellularized bovine pericardium improves biological response // J Biomed Mater Res A. 2011. Vol. 97. № 3. P. 311.

53. US Patent 4402697 Method for inhibiting mineralization of natural tissue during implantation.

54. Watanakunakorn C. Mode of action and in-vitro activity of vancomycin // Journal of Antimicrobial Chemotherapy.1994.№2. P.7-8

55. Wollmann L, Suss P, Mendonça J, Luzia C, Characterization of Decellularized Human Pericardium for Tissue Engineering and Regenerative Medicine Applications // J. Arq Bras Cardiol. 2019. №5. P.11-17.



СПРАВКА

о результатах проверки текстового документа на наличие заимствований

Проверка выполнена в системе
Антиплагиат.ВУЗ

Автор работы	Капустина Оксана Алексеевна
Подразделение	кафедра "Общая биология и биохимия"
Тип работы	Выпускная квалификационная работа
Название работы	ВКР_Капустина О.
Название файла	ВКР_Капустина О..docx
Процент заимствования	26.16 %
Процент самоцитирования	0.00 %
Процент цитирования	19.51 %
Процент оригинальности	54.33 %
Дата проверки	12:01:54 06 июня 2020г.
Модули поиска	Модуль поиска ИПС "Адилет"; Модуль выделения библиографических записей; Сводная коллекция ЭБС; Модуль поиска "Интернет Плюс"; Коллекция РГБ; Цитирование; Модуль поиска переводных заимствований; Модуль поиска переводных заимствований по eLibrary (EnRu); Модуль поиска переводных заимствований по интернет (EnRu); Коллекция eLIBRARY.RU; Коллекция ГАРАНТ; Коллекция Медицина; Диссертации и авторефераты НББ; Модуль поиска перефразирований eLIBRARY.RU; Модуль поиска перефразирований Интернет; Коллекция Патенты; Модуль поиска "ПГУ"; Модуль поиска общепотребительных выражений; Кольцо вузов
Работу проверил	Кручинина Анастасия Дмитриевна ФИО проверяющего
Дата подписи	06 июня 2020 Подпись проверяющего



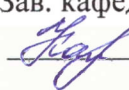
МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РФ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования

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
«05» ноября 2019 г.

Задание

По ВКР студента Капустиной Оксаны Алексеевны

Тема работы «Изучение биохимических показателей крови при имплантации
модифицированного ксеноматериала на основе перикарда»

Утверждена приказом по Университету от «29» октября 2019 г. № 1182а-0

Срок сдачи студентом законченной работы «28» мая 2020г.

КАЛЕНДАРНЫЙ ПЛАН ВКР

№ п/п	Перечень подлежащих разработке вопросов:	Сроки вы- полнения этапов	Примечания
1	Собеседование с научным руководителем, обсуждение темы и структуры ВКР, формулировка цели, задач	ноябрь 2019	<i>выполнено</i>
2	Поиск научной, справочной литературы по теме ВКР, анализ современных научных достижений в области исследования по теме ВКР	ноябрь- декабрь 2019	<i>выполнено</i>
3	Составление библиографического списка изученной литературы	ноябрь- декабрь 2019	<i>выполнено</i>
4	Поиск и изучение методов исследования в рамках ВКР	ноябрь- декабрь 2019	<i>выполнено</i>
5	Подготовка главы «Обзор литературы»	ноябрь- декабрь 2019	<i>выполнено</i>
6	Подготовка главы «Материалы и методы»	декабрь 2019	<i>выполнено</i>
7	Составление плана проведения эксперимента, подготовка к выполнению эксперимента	декабрь-март 2019-2020	<i>выполнено</i>
8	Подготовка экспериментальных образцов	декабрь-март 2019-2020	<i>выполнено</i>
9	Оценка антибактериальной активности перикарда с лекарственным препаратом диско-диффузионным методом	декабрь-март 2019-2020	<i>выполнено</i>
10	Исследование высвобождение лекарственного препарата спектрофотометрическим методом	декабрь-март 2019-2020	<i>выполнено</i>
11	Изучение общей токсичности перикарда, модифицированного ванкомицином	декабрь-март 2019-2020	<i>выполнено</i>
12	Исследование биохимических показателей после имплантации ксеноматериала	декабрь-март 2019-2020	<i>выполнено</i>

13	Обработка и анализ полученных результатов эксперимента. Собеседование с научным руководителем	декабрь-март 2019-2020	выполнено
14	Оформление результатов исследования в виде графиков и таблиц	декабрь-март 2019-2020	выполнено
15	Подготовка главы «Результаты исследования и их обсуждение»	декабрь-март 2019-2020	выполнено
16	Итоговое оформление ВКР	апрель-май 2020	выполнено
17	Подготовка презентации на защиту ВКР, подготовка к защите ВКР	май 2020	выполнено

Дата выдачи задания « 05 » ноября 2019 г.

Руководитель  Кручинина А.Д.

Задание принял к исполнению Капустина = Капустина О.А.

ОТЗЫВ
РУКОВОДИТЕЛЯ ВЫПУСКНОЙ КВАЛИФИКАЦИОННОЙ РАБОТЫ

Тема выпускной квалификационной работы «Изучение биохимических показателей крови при имплантации модифицированного ксеноматериала на основе перикарда»

Автор (студент/ка) Капустина Оксана Алексеевна

Факультет физико-математических и естественных наук

Кафедра «Общая биология и биохимия»»

Группа 16ФБ1(2)

Направление подготовки 06.03.01 Биология

Профиль подготовки Биохимия

Руководитель: доцент, к.б.н. Кручинина Анастасия Дмитриевна

Показатели оценки выпускной квалификационной работы

Показатель оценивания	Критерии			
	Отлично	Хорошо	Удовлетв.	Неудовл.
Актуальность и обоснование выбора темы		+		
Логика работы, полнота и соответствие теме		+		
Уровень владения предметными знаниями	+			
Самостоятельность	+			
Достоверность выводов		+		
Оформление ВКР	+			
Качество подготовленного доклада	+			
Литература	+			
Возможность внедрения	+			
Общая оценка	ОТЛИЧНО			

Отмеченные достоинства: возможно внедрение результатов исследования.

Отмеченные недостатки: в работе выявлены незначительные орфографические и стилистические ошибки.

Закключение: выпускная квалификационная работа Капустиной Оксаны Алексеевны выполнена в соответствии с требованиями к выпускным квалификационным работам, может быть допущена к защите и заслуживает положительной отметки.

Руководитель:

«06» июня 2020 г.