

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

ПЕНЗЕНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

Факультет
физико-математических
и естественных наук

Кафедра
«Общая биология и биохимия»

Направление подготовки 06.04.01 Биология

Магистерская программа Биохимия и молекулярная биология

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

на тему:

**«ОЦЕНКА ОБЩЕГО ТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ МАТЕРИАЛА НА
ОСНОВЕ МОДИФИЦИРОВАННОЙ ПОДСЛИЗИСТОЙ ТОНКОЙ
КИШКИ СВИНЬИ»**

Студент  Байкач Анна Сергеевна

Руководитель  Кручинина А.Д.

Нормоконтролер  Кручинина А.Д.

Рецензент  Боряев Г.И.

Работа допущена к защите (протокол заседания кафедры от 03.06.17 № 13)

Заведующий кафедрой  Карпова Г.А.

Работа защищена с отметкой отлично (протокол заседания ГЭК от 22.06.17 № 3)

Секретарь ГЭК  Кручинина А.Д.

Пенза, 2017

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	10
1.1. Материалы, используемые в трансплантологии. Преимущества ксеноматериалов.	10
1.2 Требования, предъявляемые к имплантируемым материалам.....	15
1.3 Бесклеточный коллагеновый матрикс на основе подслизистой тонкой кишки свиньи.....	16
1.3.1 Состав и строение бесклеточного матрикса на основе подслизистой тонкой кишки свиньи.....	16
1.3.2 Области применение бесклеточного коллагенового матрикса на основе подслизистой основы тонкой кишки свиньи.....	18
1.3.3 Иммунный ответ	20
1.3.4 Тканевая реакция на имплантат	21
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	28
2.1 Материал и условия проведения эксперимента.....	28
2.2 Методы исследования биохимических показателей.	30
2.3 Методы гистологического исследования	34
2.3.1 Окраска гематоксилин-эозином	34
2.3.2 Окраска по методу Вейгер-Ван-Гизона	35
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	36
3.1 Влияние подкожной имплантации бесклеточного матрикса на основе подслизистой тонкой кишки свиньи на биохимические параметры сыворотки крови крыс	36

3.1.1 Влияние подкожной имплантации бесклеточного матрикса на основе подслизистой тонкой кишки свиньи на активность аспартатминотрансферазы в сыворотке крови крыс.....	36
3.1.2 Влияние подкожной имплантации бесклеточного матрикса на основе подслизистой тонкой кишки свиньи на активность аланинаминотрансферазы в сыворотке крови крыс.....	38
3.1.3 Влияние подкожной имплантации бесклеточного матрикса на основе подслизистой тонкой кишки свиньи на активность щелочной фосфатазы в сыворотке крови крыс.....	39
3.1.4 Влияние подкожной имплантации бесклеточного матрикса на основе подслизистой тонкой кишки свиньи на активность гамма-глутамилтрансферазы в сыворотке крови крыс.....	41
3.1.5 Влияние подкожной имплантации бесклеточного матрикса на основе подслизистой тонкой кишки свиньи на содержание глюкозы в сыворотке крови крыс	42
3.1.6 Влияние подкожной имплантации бесклеточного матрикса на основе подслизистой тонкой кишки свиньи на содержание альбумина в сыворотке крови крыс	44
3.1.7 Влияние подкожной имплантации бесклеточного матрикса на основе подслизистой тонкой кишки свиньи на концентрацию холестерина в сыворотке крови крыс	45
3.1.8 Влияние подкожной имплантации бесклеточного матрикса на основе подслизистой тонкой кишки свиньи на концентрацию триглицеридов в сыворотке крови крыс.....	46
3.1.9 Влияние подкожной имплантации бесклеточного матрикса на основе подслизистой тонкой кишки свиньи на концентрацию креатинина в сыворотке крови крыс.....	48

3.1.10 Влияние подкожной имплантации бесклеточного матрикса на основе подслизистой тонкой кишки свиньи на концентрацию мочевины в сыворотке крови крыс	49
3.1.11 Влияние подкожной имплантации бесклеточного матрикса на основе подслизистой тонкой кишки свиньи на концентрацию общего белка в сыворотке крови крыс	50
3.1.12 Влияние подкожной имплантации бесклеточного матрикса на основе подслизистой тонкой кишки свиньи на концентрацию калия в сыворотке крови крыс	51
3.1.13 Влияние подкожной имплантации бесклеточного матрикса на основе подслизистой тонкой кишки свиньи на концентрацию натрия в сыворотке крови крыс	52
3.1.14 Влияние подкожной имплантации бесклеточного матрикса на основе подслизистой тонкой кишки свиньи на концентрацию фосфатов и хлоридов в сыворотке крови крыс	53
3.1.15 Влияние подкожной имплантации бесклеточного матрикса на основе подслизистой тонкой кишки свиньи на концентрацию фосфатов и хлоридов в сыворотке крови крыс	54
3.2 Гистологическое исследование образцов до операции.....	55
3.3 Гистологическое исследование образцов после по истечении 2 и 4-недельного срока.....	57
3.3.1 Морфологические изменения в зоне имплантации бесклеточного матрикса подслизистой основы тонкой кишки свиньи по истечении 2 недель	57
3.3.2 Морфологические изменения в зоне имплантации бесклеточного матрикса подслизистой основы тонкой кишки свиньи по истечении 4 – недельного срока.....	58

ВЫВОДЫ.....	60
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	61
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	62

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время количество хирургических операций, проводимых с использованием имплантатов неуклонно растет.

В качестве имплантатов в клинической медицине для закрытия дефектов могут использоваться следующие виды материалов: аутокани, синтетические материалы, алломатериалы и ксеноматериалы. Каждый из перечисленных объектов имеет свои преимущества и недостатки.

Аутооттрансплантаты – это собственные ткани организма пациента. Основное преимущество этого материала заключается в его высокой биосовместимости. Но использование аутоканей также сопряжено с высокой травматичностью при заборе материала, в результате чего срок реабилитации пациента увеличивается [18].

В качестве аллотрансплантатов выступают ткани и органы, взятые от особи одного вида. Также при проведении операций может использоваться трупный материал. К преимуществам использования алломатериалов, в первую очередь, относится низкая иммуногенность. Но использование аллотканей сопряжено с риском заражения различными инфекциями, что является недопустимым в клинической медицине [33].

Синтетические материалы достаточно широко распространены в клинической практике, ввиду того, что имеют относительно небольшую стоимость. К недостаткам использования таких материалов относят малый уровень биоинтеграции. Также материалы довольно часто отторгаются, а продукты биodeградации синтетических материалов могут оказывать токсическое действие на организм человека [8].

Ксенотрансплантаты – это ткани и органы другого биологического вида. Использование нативных ксеноматериалов сопряжено с негативной реакцией организма, обусловленной иммунным ответом [14].

Попытки использования ксенотрансплантатов начались еще в конце XX века, но из-за того, что методика изготовления ксеноматериала была несовершенной, остались безуспешны.

Клетки, которые оставались в материале запускали иммунный ответ, тем самым способствуя отторжению имплантатов. Клетки ксеноматериала являются главной причиной антигенности. Именно поэтому в процессе подготовки материала необходимо удалить все клеточные элементы.

Метод децеллюризации способствует удалению клеточных элементов оставляя при этом нетронутыми коллагеновые волокна, что положительно сказывается на механических характеристиках образцов.

Согласно данным ЦИТО им. Н. Н. Приорова, многие современные материалы обладают таким недостатком, как способность к образованию свободных радикалов, что, в свою очередь способствует интенсификации окислительных процессов в окружающих тканях и, как следствие, ухудшению биосовместимости [6].

Поэтому, имплантат должен обладать следующими характеристиками:

- не приводить к воспалительной реакции;
- не оказывать токсического и иммуногенного действия;
- обладать способностью к биодegradации с образованием безопасных для организма продуктов;
- обладать необходимой скоростью деградации, соответствующей процессам образования новой соединительной ткани;
- давать возможность нанесения биологически активных веществ на его поверхность;
- должен обладать эффективной и универсальной возможностью стерилизации;
- иметь длительные сроки хранения [8].

Таким требованиям в отвечают материалы на основе бесклеточного матрикса подслизистой тонкой кишки свиньи, так как в большей мере реализуются биосовместимые и другие характеристики.

Материалы на основе подслизистой тонкой кишки нашли применение в ожоговой хирургии, реконструктивной хирургии, кардиохирургии, основными производителями являются такие зарубежные компании, как Cook Biotech и CorMatrix®.

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

О возможности применения нового материала должны говорить результаты обязательного тестирования готовых образцов на предмет соответствия требованиям, предъявляемым к материалам для эндопротезирования и имплантации, а именно: совместимость с биологическими средами и стабильное функционирование в месте имплантации [27].

Целью настоящей работы являлась оценка биологического действия материала бесклеточного матрикса на основе подслизистой тонкой кишки свиньи на организм животного на разных сроках после имплантации .

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

1. Провести подкожную имплантацию образцов на основе бесклеточного коллагенового матрикса подслизистой тонкой кишки свиньи
2. Оценить морфологические изменения в зоне имплантации образцов бесклеточного коллагенового матрикса на основе подслизистой тонкой кишки свиньи на разных сроках после операции
3. Определить биохимические параметры сыворотки крови крыс, рекомендованных ГОСТ Р ИСО 10993-11-2011 "Исследование

общетоксического действия" для оценки общей токсичности имплантируемых образцов бесклеточного коллагенового матрикса на основе подслизистой тонкой кишки свиньи в интактной, контрольной и экспериментальных группах.

4. Оценить влияние проведения хирургической операции и имплантации образцов бесклеточного коллагенового матрикса на основе подслизистой тонкой кишки свиньи на биохимические параметры сыворотки крови
5. Оценить изменения биохимических параметров сыворотки крови крыс на разных сроках после имплантации материала

Магистерская диссертация изложена на 73 страницах, иллюстрирована 21 рисунками. Список литературы содержит 93 наименования на русском и иностранных языках.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Материалы, используемые в трансплнтологии. Преимущества ксеноматериалов.

Тканевые трансплантаты, которые используются для пересадок, согласно международной терминологии трансплантации тканей, принятой в г. Вене в 1967 году, определяются как аутоматериалы, алломатериалы, ксенотрансплантаты, а также синтетические материалы [16].

Аутоматериалы - это собственные ткани организма. Основным преимуществом использования алломатериалов является низкая вероятность отторжения трансплантата. В хирургии широко применяется кожная аутопластика: с использованием окружающих тканей и свободными аутоматериалами [18].

В качестве аутоматериалов могут использоваться некоторые кровеносные сосуды: межреберные артерии, большая подкожная вена бедра, внутренние грудные артерии.

Сегмент большой подкожной вены бедра используется для создания соединения между восходящей аортой и венечной артерией сердца или ее ветвью при коронарном шунтировании.

Для восстановления пищевода используются собственные ткани тонкой и ободочной кишки. Также аутопластические операции выполняются на мочевых путях: мочеточнике, мочевом пузыре.

Для укрепления слабых мест и дефектов стенок полостей в клинической практике применяют аутогенную кость, а для замещения дефектов сухожилий используются плотные фасции, например широкую фасцию бедра [14].

Согласно статьям ряда исследователей, аутогенная кость является лучшим трансплантатом и основным типом костных трансплантатов,

широко используемых в виде маленьких фрагментов и кусочков. Развитие такой области медицины как микрохирургия позволило пересаживать костные аутотрансплантаты на сосудистой ножке, включая сегмент малоберцовой кости, ребра, подвздошной или лучевой кости, часто в сочетании с сопутствующими мягкими тканями [2, 15, 51].

К преимуществам использования аутоматериалов относят хорошую приживляемость. Данное обстоятельство обусловлено тем, что при проведении оперативного вмешательства с использованием аутоматериалов отсутствуют негативные реакции со стороны иммунной системы. Также нет необходимости в стерилизации материала и отсутствует вероятность заражения инфекционными агентами. Однако аутокани имеют следующие недостатки:

1. Взятие аутоматериала сопряжено с дополнительным оперативным вмешательством, что, в свою очередь, может повлечь за собой возможные осложнения и увеличение времени реабилитации пациента;
2. Дефицит пластического материала [29].

К алломатериалам относят ткани, взятые от другого организма одного вида. Основное преимущество аллотрансплантатов заключается в отсутствии дополнительного оперативного вмешательства для забора материала. Для пластических целей используют аллобрюшину, твердую мозговую оболочку, ткань мениска. Кроме этого, в клинической практике находят свое применение эндопротезы сухожилия, изготовленные из лиофилизированного трупного человеческого сухожилия [33].

Оптимальные результаты операций достигаются с применением аллогенных трансплантатов, или биоматериалов, вследствие того, что они вызывают наименьшую иммунную реакцию и стимулируют процессы репаративной регенерации тканей [80].

Использование алломатериалов в хирургической практике сопряжено с рядом трудностей:

1. Ограниченные ресурсы при получении достаточного количества исходного материала;
2. Вероятность заражения инфекционными агентами;
3. Недостаточность отечественного законодательства в области забора и коммерческой реализации подобной продукции [8].

Если в начале XX века для пластики дефектов применяли в основном ауто-, алло- и ксеноматериалы, то ,начиная с 50-х годов, вследствие бурного развития химии полимеров в клинике медицины стали появляться синтетические материалы. Однако с появлением новых материалов не удалось решить проблемы восстановительной хирургии, так как даже относительно инертные полимеры, оставаясь постоянным инородным телом в организме, поддерживали хроническую воспалительную реакцию, изменяя свои физические свойства. Это способствовало продолжению поиска пригодных материалов [13].

Сетчатые эндопротезы, выпускаемые серийно, разработаны из синтетических материалов, в основном полипропилена. Это эндопротезы типа «Cousin», «Vupro», «Ultrapro» (США). После того, как было выявлено большое количество осложнений (свищеобразование, нагноение, болевой синдром в раннем и отдаленном послеоперационном периоде, дискомфорт в результате чувства инородного тела) при использовании сетчатых эндопротезов из полипропилена, стали разрабатываться «облегченные» полимерных эндопротезов, которым могли бы применяться для пластики брюшной стенки. На сегодняшний день известно много вариантов неудачных попыток создания подобных эндопротезов [8].

Материалы медицинского назначения, используемые в реконструктивных медицинских технологиях фирмы «GFE Medzintech

GmbH», Германия), изготовленная из полипропиленовых мононитей с титановым покрытием диаметром 0,07 мм, имела низкую разрывную нагрузку (3,7 Н/см) вдоль петельного ряда, поэтому была снята с производства. Снижение материалоемкости при создании сетчатых эндопротезов попытались решать следующими способами: введением в состав эндопротеза волокон из синтетических полимеров и облегчением полипропиленовых сеток за счет уменьшения диаметра не рассасывающихся мононитей. Облегчение полипропиленовых сеток, достигаемое в результате специальной технологии производства, обеспечивает, с одной стороны, использование минимума полимерного материала, а с другой – оптимальные манипуляционные свойства и прочность. Можно выделить основные марки таких эндопротезов: «Optilene Mesh LP» (фирма «Braun», Германия), «Biomech light» («Cousin», США), «Эсфил легкий» («Линтекс», Россия) [8].

Ксеноматериалы - это ткани и органы, взятые от организма другого вида.

После первых попыток пересадки роговицы от животных человеку ксенотрансплантаты стали рассматриваться в качестве потенциальной альтернативы аллотрансплантатам. В дальнейшем, исследования были направлены на развитие ксенотрансплантации и изучение возможности использования отдельных клеток животных. Так, учеными были пересажены свинные островковые клетки животным с индуцированным сахарным диабетом. Исследование позволило установить межвидовую физиологическую активность и регулируемый метаболизм в тканях реципиента [32], также была отмечена нормализация показателей гликемии.

В последние десятилетия вызывают интерес биodeградируемые природные полимеры среди них: желатин, альгинаты, фиброины шелка, коллаген, хитозан, полиэфиры бактериального происхождения.

Биополимеры обладают высокой степенью биосовместимости с организмом и являются высокоэффективными биостимуляторами. Промежуточными продуктами биodeградации природных полимеров могут быть вещества, которые присутствуют в собственных тканях организма и участвуют в метаболических реакциях. К таким продуктам относятся : моносахара, молочная и гликолевая, кислоты. Но биополимеры могут выделять вещества, которые не метаболизируются клетками и тканями. В данном случае продукты не должны оказывать токсического воздействия и не должны превышать предельный уровень концентрации в кровяном русле. Продуктами полной деградации биополимеров являются углекислый газ и вода [3,7,28, 35].

Использование нативных ксеноматериалов сопряжено с риском для здоровья ввиду высоких антигенных свойств внеклеточного матрикса. Именно это обстоятельство послужило основной причиной отказа от использования немодифицированных ксенотрансплантатов в хирургии.

Разработки новых медико-биологических протезов способствовали созданию модифицированных ксеноматериалов с подавленными антигенными свойствами. Так например, модифицированный ксеноперикард много лет успешно используется в сердечно-сосудистой хирургии [4].

В настоящее время наиболее перспективным направлением в биоинженерии кардиоваскулярных протезов является использование в качестве скаффолдов децеллюризированных ксенотканей, что впервые было предложено Rosenberg [79].

При использовании ксенососудов в качестве скаффолдов для создания сосудистых трансплантатов необходимо проводить их химическую или физическую обработку нативного материала. Данные операции проводятся с целью сохранения биологического материала, путем повышения устойчивости к энзиматическому и химическому

разрушению. Кроме этого, методы химической и физической обработки тканей являются неотъемлемым компонентом при снижении иммуногенности биоматериала, а также стабилизации структуры ткани и поддержке адекватных механических свойств [81].

1.2 Требования, предъявляемые к имплантируемым материалам

Согласно данным ЦИТО им. Н. Н. Приорова, многие современные материалы обладают таким недостатком, как способность к образованию свободных радикалов, что, в свою очередь способствует интенсификации окислительных процессов в окружающих тканях и, как следствие, ухудшению биосовместимости. Имплантируемые материалы, в первую очередь, должны быть биосовместимыми: не оказывать токсического воздействия, не вызывать иммуногенных и аллерогенных свойств, должны обеспечивать прикрепление и рост клеток [6].

Биосовместимыми называют материалы, способные сосуществовать совместно с живым организмом, не нанося ему вреда. По определению академика Н. А. Платэ, биосовместимыми являются «...полимеры, способные к метаболизму...» [8].

На конференции по биосовместимости, состоявшейся в 1994 г. в Великобритании, было предложено под биосовместимостью «понимать способность материала, изделия или устройства выполнять свои функции и не вызывать отрицательных реакций в организме «хозяина».

Помимо перечисленных выше свойств, имплантируемый материал не должен вызывать воспалительную и дистрофическую тканевую реакцию и замещаться, в конечном итоге, собственными тканями организма. Кроме того, желательно, чтобы скаффолды обладали пористой структурой, обеспечивающей быстрое прорастание в него клеток и сосудов реципиента [8,28].

1.3 Бесклеточный коллагеновый матрикс на основе подслизистой тонкой кишки свиньи

Подслизистая основа тонкой кишки (ПТК) - слой свободной соединительной ткани, находящийся между мышечным слоем и слизистой оболочкой [1]. С момента открытия в 1987 году, многие исследователи определили структуру ПТК и продемонстрировали такие полезные свойства, как способность к биоинтеграции и регенерации тканей.

1.3.1 Состав и строение бесклеточного матрикса на основе подслизистой тонкой кишки свиньи

Различные формы неповрежденного экстрацеллюлярного матрикса (ЭЦМ) используются в качестве скаффолдов, чтобы способствовать восстановлению тканей и органов [89]. Скаффолды могут быть получены из тонкой кишки, кожи, печени, поджелудочной железы и мочевого пузыря. Но наиболее изучен экстрацеллюлярный матрикс (ЭЦМ) из подслизистой оболочки тонкой кишки [87]. Исследование состава, макроструктуры и микроструктуры, биомеханических свойства, скорость деградации в естественных условиях было показано многими авторами [38,77].

Экстрацеллюлярный матрикс на 90% состоит из коллагена. В основном представлен коллагеном I типа, но так же присутствуют коллагены III, IV, V и VI типов [44].

ПТК содержит множество гликозаминогликанов, включая гепарин, гепарин сульфат, хондроитин сульфат и гиалуроновую кислоту. Количество гликозаминогликанов, остающихся в ткани после децеллюризации, значительно зависит от метода удаления клеточных элементов [64].

Конечная цель любого метода децеллюризации - удаление всего клеточного материала. При этом должно отсутствовать негативное влияние на состав, механическую прочность и возможную биологическую активность ЭЦМ. Например, ионные детергенты, часто используемые в процессе децеллюризации, могут удалить гликозаминогликаны из ПТК [60].

Гликозаминогликаны являются важными компонентами ЕСМ и играют важные роли в закреплении ростовых факторов и цитокинов.

Исследования показали, что удаление гликозаминогликанов из скаффолдов может оказать отрицательное воздействие на вязкоупругие свойства скаффолдов [43,70].

Кроме вышеперечисленных компонентов, ПТК, как показывают исследования, содержит молекулы адгезии, такие как фибронектин и ламинин протеогликан [47]. Различные факторы роста также присутствуют в ПТК, включая фактора-роста-b, основной фактор роста и сосудистый фактор эндотелиального роста. Несколько из этих факторов роста, как показывают исследования, сохранили свою биологическую активность даже после предельной стерилизации и длительного хранения [43].

Механизмы, которыми скаффолды, состоявшие из естественного ЭЦМ, способствуют восстановлению тканей, не до конца понятны. Ясно, что биоиндуктивные, вязкоупругие свойства, биомеханические свойства скаффолдов играют очень важную роль в модернизации ткани.

Составляющие факторы роста, такие как сосудистый фактор эндотелиального роста, основной фактор роста фибробласта, и трансформирующий ростовой фактор, высвобождающиеся во время деградации скаффолдов проявляют свои биологические эффекты, поскольку они отделены от их связывающих белков и активированы. Эти факторы роста переживают обработку ткани и предельную стерилизацию и

способствуют развитию кровеносных сосудов и клеточному дифференцированию во время процесса восстановления [72].

Пептиды, которые модулируют развитие кровеносных сосудов и вербовку эндотелиальных клеток, облегчают развитие кровоснабжения к ткани в течение 6-8 недель [68].

Возможно, наиболее важной характеристикой ЭЦМ является способность быстро и полностью деградировать. Количественные исследования ПТК с меченым углеродом ^{14}C , используемые при реконструкции ахиллова сухожилия, показывают, что более 50% каркаса ЭЦМ деградируют и удаляются с места имплантации на 28 день, и фактически заменяются собственными тканями на 60 дней. Продукты деградации ПТК (95%) экскретируется с мочой, и не рециркулируют в другие ткани [42,59].

1.3.2 Области применение бесклеточного коллагенового матрикса на основе подслизистой основы тонкой кишки свиньи

Описано применение бесклеточного коллагенного матрикса на основе тонкой кишки свиньи в ветеринарной офтальмологии [48], для восстановления широкой фасции [52], тканей стенки артерии [39], крестовидных связок сустава [37].

Длительное исследование ПТК, которую имплантировали в мочевой пузырь собак показало, что на 4 неделю наблюдалось прорастание сосудов в имплантируемый материал. К 8 неделям наблюдались пучки гладких мышц и коллагена, клетки воспаления практически отсутствовали. К 12 неделям ПТК была полностью деградирована. При этом функции мочевого пузыря были сохранены [66].

Еще один эксперимент на собаках подтвердил, что материал на основе подслизистой тонкой кишки свиньи обладает биоинтегративными и регенеративными свойствами.

Один слой подслизистой тонкой кишки свиньи зашивали в созданный просвет (5 x 5 см) широкой фасции десяти взрослых беспородных собак для того, чтобы определить эффективность этого материала в стимуляции регенерации тканей больших фасциальных дефектов. Аналогичный дефект в контралатеральной конечности был оставлен пустой и служил в качестве отрицательного контроля. Были проведены гистологические исследования на 6 и 12 неделе. К 6 неделе, отмечены фиброплазия и ангиогенез по всей площади ПТК. Регенерированная ткань показала хорошую интеграцию с фасцией, в то время как контрольные образцы были заполнены рыхлой соединительной тканью. Через 12 недель экспериментальные дефекты были заполнены регенерированной тканью. Результаты этого исследования свидетельствуют о том, что ПТК способна поддерживать регенерацию тканей в больших фасциальных дефектах [52].

Многослойные скаффолды доказали эффективность в эксперименте на кроликах при закрытии дефектов вентральной грыжи. Продукт компании GraftPatch™ (Organogenesis Inc., Canton Massachusetts) 6-слойный бесклеточный матрикс был использован для закрытия созданного дефекта брюшной стенки кроликов [36]. 8-слойный бесклеточный матрикс был использован для закрытия экспериментально созданных брюшных грыж у собак и грызунов. Прочность материала сохранялась в течение двух лет. По сравнению с полипропиленовым материалом (Prolene), при использовании ПТК наименее выражена реакция воспаления [41, 50].

Многочисленные исследования показали, что этот биоматериал способен к стимулированию организменной пролиферации ткани,

ремоделирования и регенерация структур ткани после имплантации в естественных условиях.

Экстрацеллюлярный матрикс на основе подслизистой основы тонкой кишки свиньи использовался для восстановления множества тканей, включая наружный покров, стенки тела, мочевого пузыря, вращающую манжету плеча, кишечник, мочеточник и диафрагму.

Использование ПТК для лечения вращающей манжеты плеча показало положительные результаты в одних исследованиях и была неэффективной в других.

Одной из причин получения различных данных может являться разный выбор хирургической техники [40].

Предварительные отчеты показывают, что ПТК может быть полезным дополнением при закрытии дефекта паренхимы после частичной нефрэктомии у человека [75]. Теоретически, большие листы ПТК могут быть использованы для восстановления почки после частичной нефрэктомии или даже повреждения почек, как это было сделано с полиглактином (ВикрилTM или ДексонTM) сетки в прошлом [74].

В настоящее время ведется активный поиск новых направлений использования ПТК как перспективного для хирургии материала.

1.3.3 Иммунный ответ

Использование экстрацеллюлярного матрикса ксеногенного происхождения вызывает вопрос относительно иммунного ответа.

Одним из факторов, способных вызвать иммунный ответ, является наличие к ксеногенным материалам эпитопа Gal- α -1,3-Gal. Эпитоп Gal- α -1,3-Gal (α -Gal) – углеводная структура, которая экспрессируется на мембранах клеток в организме млекопитающих, кроме человека и некоторых видов обезьян.

Эпитоп α -Gal не экспрессируется на клетках человека и некоторых высших приматов ввиду потери активности фермента α -1,3-галактозилтрансферазы (1,3-GT). У человека антитела к α -Gal представлены в основном IgG и в меньшей степени – IgM и IgA [5].

При исследовании ПТК учеными было обнаружено наличие эпитопа α -Gal. Но реакции отторжения не происходило, по-видимому из-за небольшого количества и рассеянного распределения антигена [40].

В клинической практике популярны биопротезы сердечных клапанов и биоматрикс, полученные из подслизистой оболочки тонкой кишки и кожи. В данном случае проблемы гиперострого отторжения при использовании свиного биоматериала не существует, так как все биоимплантаты проходят обработку, в результате которой элиминируется слой клеток, несущих эпитоп α -Gal [82].

1.3.4 Тканевая реакция на имплантат

При тестировании имплантируемого материала на биосовместимость важно учитывать тканевую реакцию в зоне имплантации. При проведении эксперимента *in vivo* исследуемый материал (в виде пленок, губок, волокон, пластин) имплантирует внутрибрюшинно, подкожно, внутримышечно. Кроме этого также возможна имплантация в органы и сосуды на различные сроки в зависимости от поставленной задачи [21].

При контакте материала с внутренней средой организма после имплантации наблюдается взаимовлияние последних, как правило негативного характера. Степень выраженности и характер данного воздействия определяется следующими параметрами:

- химическая структура материала,
- стабильность (или нестабильность) в биологических средах,

- химические свойства продуктов биodeградации,
- форма и масса имплантата,
- место введения в организм

Со стороны живого организма характер воздействия определяется комплексом физиологических и биохимических реакций [34].

При имплантации в организм чужеродного материала неизбежно возникает клеточная реакция, которую обычно расценивают как асептическое воспаление. Ответная реакция со стороны собственных тканей организма возникает по типу реакции на инородное тело [8].

Имплантируемый материал, под воздействием организма, также подвержен различным изменениям, причем биофизиологические факторы, влияющие на имплантат различны [21].

По мнению некоторых авторов, на интенсивность воспалительного процесса в ране большей мере влияет степень травматизации ткани, обусловленной оперативным вмешательством [8].

Все раны заживают по общим закономерностям, несмотря на степень оперативного вмешательства. Эти закономерности представляют собой фазы течения раневого процесса [23].

После хирургического вмешательства и имплантации материала или испытуемого изделия, в месте имплантации развивается асептическое воспаление тканей. Последнее принято разделять на следующие стадии: альтерацию (повреждение), экссудацию и пролиферацию [8].

Экссудативную и пролиферативную стадию иногда подразделяют на нейтрофильную, макрофагальную и фибробластическую фазы.

Пусковым механизмом процесса воспаления является травматическое повреждение тканей, после чего клетки начинают продуцировать воспалительные медиаторы — цитокины. Кроме цитокинов стимулятором воспалительной реакции является кровотечение. В результате, из крови в близлежащие ткани выходят факторы гемостаза,

которые выполняют функцию хемоаттрактантов, т.е. способствуют миграции лейкоцитов из окружающих тканей и сосудов в рану [90].

В первые часы после хирургического вмешательства наступает нейтрофильная фаза. В этой фазе происходит миграция полиморфоядерных лимфоцитов из сосудов в сторону ранения, а через 6–12 ч образуют лейкоцитарный вал [21, 23].

В течение 24 часов наблюдается прекращение миграции нейтрофильных лейкоцитов, они начинают распадаться. В месте острого воспаления происходит накопление недоокисленных продуктов, в том числе молочной кислоты. В результате этого развивается ацидоз тканей, происходит перекисное окисление липидов.

В этой фазе наблюдается активация системы комплемента за счет продуктов секреции и распада нейтрофилов, кроме этого активируются системы свертывания и фибринолиза. Помимо перечисленных реакций продукты деградации нейтрофилов способствуют дегрануляции тучных клеток [8].

Почти одновременно (через 6-48 часов после травмы) происходит миграция в рану макрофагов (макрофагальная стадия). Последние внедряются в лейкоцитарный вал и фагоцитируют клеточный детрит, продукты распада тканей и имплантированного материала.

Затем макрофаги окружают инородное тело и формируют нейтрофильно-макрофагальный → макрофагальный → макрофагально - фибробластический барьеры. Комплекс данных реакций предшествуют образованию грануляционной ткани. К настоящему времени выделено свыше 40 секретируемых медиаторов через которые макрофаги взаимодействуют с другими клетками.

Прилипание моноцитов к эндотелию и их диапедез подчиняются тем же законам, которые действуют в случае миграции нейтрофильных гранулоцитов. Механизм миграции в рану последних является следствием

взаимодействия адгезивных рецепторов лейкоцита и клеток эндотелия. Нейтрофильные гранулоциты подходит к стенке сосуда под действием факторов хемотаксиса типа хемокинов (интерлейкин-8) и прикрепляются к эндотелиоцитам. На этом участке эндотелия фагоцит распластывается, принимает форму, которая облегчает его проникновение в межуточное пространство и диапедез в рану [8,31].

Когда рецепторы фагоцита взаимодействуют с адгезивными молекулами эндотелия и клеточного матрикса происходит миграция, взаимодействие рецепторов фагоцита с повышение антибактериальной активности фагоцита. Кроме этого повышается способность нейтрофила к распознаванию, поглощению и деградации инфекционных и неинфекционных агентов.

Таким образом, миграцию можно представить как двухстадийный процесс с участием хемокинов и рецепторов для них. Первая стадия - это остановка лейкоцита на поверхности эндотелия и адгезия к этой поверхности. Вторая - заключается в трансмиграции клеток через эндотелий в межуточную ткань [26].

Мигрировавшие нейтрофильные гранулоциты являются главным клеточным компонентом неспецифической иммунитета организма. Они направляются к месту внедрения чужеродного агента и под действием медиаторов воспаления и других факторов, присутствующих в поврежденной ткани, осуществляют следующие функции:

- адгезию,
- хемотаксис,
- респираторный взрыв,
- поглощение,
- дегрануляцию,
- экстрацеллюлярную секрецию,
- антимикробное и цитотоксическое действие;

- внутриклеточный и внеклеточный лизис поврежденных тканей и самих распадающихся нейтрофилов, приводящий к появлению биологически активных продуктов расщепления;
- синтез некоторых макромолекулярных веществ, в частности РНК [12].

Одна из основных ролей в определении биосовместимости имплантата отводится макрофагам.

На протяжении пролиферативной (или фибробластической) фазы делящиеся фибробласты мигрируют к имплантату под влиянием хемотаксиса, затем окружая его рядами. Известно, что фибробласты участвуют в образовании коллагеновых волокон. Спустя 5–10 суток от начала воспалительной реакции вокруг инородного тела наблюдается соединительнотканная капсула. Таким образом, инородное тело остается изолированным от окружающих тканей. Если материал является биосовместимым, то капсула, как правило, тонкая. При имплантировании материала с гистотоксическими свойствами вокруг образуется плотная капсула[8,12].

По мере увеличения количества фибробластов и коллагена их рост тормозится в результате взаимодействия волокон и клеток; последнее сопровождается синтезом в клетках ингибиторов роста (кейлонов), разрушением фибробластов, а также превращением их в неактивные фиброциты и фиброкласты, которые фагоцитируют коллагеновые волокна. В результате этих процессов происходит перестройка и инволюция соединительной ткани с истончением капсулы [21,23].

При имплантации биоактивных неразрушаемых материалов в ходе формирования капсулы реализуется стадия образования грануляционной ткани (5–10 суток), в ходе которой, помимо пролиферации, происходит активное образование капилляров, этому способствуют воспалительная реакция и тканевая гипоксия, усиливающие рост сосудов. Последующее

созревание и фиброзная трансформация грануляционной ткани ведут к регрессии капилляров и сокращению соединительной ткани. Зрелая капсула, как правило, сравнительно небольшой толщины с доминирующими зрелыми фибробластами и фиброцитами, с преобладанием волокнистых элементов матрикса над клетками, сравнительно небольшим количеством сосудов, со сформированным узким макрофагальным барьером на границе капсулы и имплантата с включением гигантских клеток[8,30].

При имплантировании биодеструктивных материалов процессы эволюции капсулы вокруг имплантата имеют иной характер. Макрофагальная реакция, следующая после нейтрофильной, не ослабевает, а наоборот усиливается. Это имеет место потому, что макрофаги и гигантские клетки инородных тел фагоцитируют и резорбируют биодеструктивные материалы. Ведущая роль в образовании гигантских многоядерных клеток принадлежит макрофагам, фагоцитирующим материал имплантата. Установлено, что гигантские клетки инородного тела (ГКИТ) образуются на поверхности или вокруг частиц имплантированного материала в результате слияния адгезированных макрофагов, а также при делении ядер макрофагов без клеточного деления. Реакция на инородное тело с временным развитием грануляционной ткани с последующим созреванием в фиброзную можно считать нормальной реакцией на относительно биосовместимый материал. Длительность этого процесса зависит от природы материала и кинетики его деструкции, и может протекать от нескольких дней и недель до нескольких лет и постепенно завершаться замещением имплантата соединительной тканью, которая в свою очередь подвержена частичной или полной инволюции. В итоге в месте имплантата формируется рубцовая ткань или полностью регенерированная исходная ткань. В случае неблагоприятного развития могут иметь место плохое кровоснабжение

толстой и плотной фиброзной капсулы и аккумуляция токсичных продуктов обмена, возникновение опухолей, кальцификация и инфицирование [8,27].

Основными факторами, определяющими течение процессов воспаления и капсулообразования, являются химический состав, структура материала, форма имплантата, а также место его имплантирования. Однако, несмотря на очевидную важность данных исследований для оценки биосовместимости биодеструктивных материалов, пока еще очень мало данных, характеризующих динамику течения тканевых процессов, включая учет и описания участвующих в этих процессах типов клеток, а также длительности отдельных фаз. В последние годы стали появляться результаты исследования отдельных факторов, определяющих картину воспаления и регенерации тканей в месте имплантации, хотя в целом картина протекания комплекса процессов в системе «имплантат – хозяин» нуждается в глубоких исследованиях. Показано, что низкомолекулярные и легко вымываемые продукты влияют на начальную стадию воспаления (лейкоцитарную), а механические нагрузки на имплантат определяют адгезию макрофагов и слияние их в ГКИТ. При морфометрических исследованиях реакции тканей на имплантат и течения регенеративных процессов показательными являются: среднее значение соединительной капсулы (параметр отражает интенсивность соединительнотканной реакции в зоне имплантации), индекс фиброзности (характеристика удельного объема коллагеновых волокон в новообразованной соединительной ткани), рядность фибробластов (показатель активности продукционной реакции в месте имплантации), профильный размер фибробластов (показатель их зрелости), макрофагально-капсулярные отношения (показатель интенсивности хронического воспаления), сосудистокапсулярные отношения (показатель интенсивности кровоснабжения в новообразованной ткани) [8,21,23,27].

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1.Материал и условия проведения эксперимента

Эксперимент проводили на 24 самцах белых беспородных крыс в возрасте 3-х месяцев массой 200-250 грамм. Животные содержались в стандартных условиях вивария при свободном доступе к воде и пище и сменной светового режима каждые 12 часов. За 24 часа до проведения оперативного вмешательства животные не получали пищи.

Для исследования воздействия бесклеточного коллагенового матрикса на основе подслизистой тонкой кишки свиньи на организм животного и изучения тканевой реакции на его имплантацию были определены этапы изучения отсроченного действия образцов: 2 недель и 4 недели после имплантации.

Нами были сформированы три группы животных: экспериментальная, контрольная и интактная. Экспериментальная группа, в свою очередь, была поделена на 2 подгруппы (n=12). В каждой серии эксперимента участвовало не менее 6 животных.

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

Контрольной группе животных (n=6) была проведена операция, но без имплантации исследуемого материала.

Животные из опытной группы (n=6) подвергались оперативному вмешательству с имплантацией внеклеточного коллагенового матрикса на основе подслизистой тонкой кишки свиньи.

Образцы пятислойного бесклеточного матрикса на основе подслизистой тонкой кишки имплантировали в организм животного по методу Fishbein M. et al., 1982 [57]. Перед операцией животных в течение 7 дней содержали в виварии. Содержание животных и условия проведения

экспериментов *in vivo* соответствовали ГОСТ Р ИСО 10993-2-2011«Требования к обращению с животными»[11].

Перед имплантацией исследуемых образцов с операционного поля удаляли шерсть. Оперативное вмешательство проводилось в стерильных условиях, под действием эфирного наркоза. Перед тем как провести имплантацию образца бесклеточного матрикса на основе подслизистой тонкой кишки 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, размером 10x10 мм, предварительно стерилизованные окисью этилена, дополнительно промывали дистиллированной водой непосредственно перед имплантацией и 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 [19].

Через 14 и 28 суток после операции животных выводили из эксперимента путем декапитации. Кровь собирали, центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 минут. Для сравнения групп между собой в полученной сыворотке определяли активность ферментов и концентрацию веществ, рекомендованных к анализу ГОСТ Р ИСО 10993-11-2011."Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 11. Исследование общетоксического действия" : аспартатаминотрансфераза (АСТ), щелочная фосфатаза, аланинаминотрансфераза (АЛТ), γ -глутамилтрансфераза, альбумин, креатинин, общий белок, фосфор неорганический, холестерин, хлориды, калий, кальций, натрий, мочевины, глюкоза, триглицериды [10].

Гистологическому исследованию подвергался комплекс тканей, включающий в себя образцы на основе подслизистой тонкой кишки свиньи.

Полученные данные обрабатывали статистически с привлечением $3s$ критерия и t критерия Стьюдента, методов дисперсионного анализа [20].

2.2 Методы исследования биохимических показателей.

Определение всех биохимических параметров проводили с использованием стандартных наборов реактивов для клинической лабораторной диагностики («Ольвекс диагностикум», Россия).

Активность аспаратаминотрансферазы и аланинаминотрансферазы определяли колориметрическим методом Райтмана-Френкеля. Фермент АСТ катализирует реакцию переаминирования между L-аспаратом и α -кетоглутаровой кислотой с образованием оксалоацетата. Фермент АЛТ также катализирует реакцию переаминирования, но между L-аланином и α -кетоглутаровой кислотой с образованием пировиноградной кислоты. Об активности фермента судят по приросту оксалоацетата или пирувата, образующего с 2,4-ДНФГ(2,4-динитрофенилгидразин) окрашенные гидразоны. Активность АСТ и АЛТ пропорциональна количеству образовавшихся гидразонов, которое определяется фотометрически при длине волны 537 нм [78].

Активность щелочной фосфатазы определяли методом по конечной точке. Щелочная фосфатаза (ЩФ) в щелочной среде катализирует реакцию дефосфорилирования субстрата p-нитрофенилфосфата с образованием окрашенного продукта p-нитрофенола. Количество образовавшегося p-нитрофенола определяется по увеличению оптической плотности реакционной среды при 405 нм и пропорционально активности щелочной фосфатазы [46].

Активность γ -глутамилтрансферазы сыворотке крови определяли методом по конечной точке. Метод основан на способности гамма-ГТ переносить γ -глутамиловую группу синтетического субстрата L- γ -глутамил-3-карбокси-4-нитроанилида на акцептор глицил-глицин, что сопровождается высвобождением в инкубационную среду 5-амино-2-нитробензоата. Активность фермента прямо пропорциональна количеству образовавшегося 5-амино-2-нитробензоата в пробе и измеряется фотометрически при длине волны 405 нм [86].

Количественное содержания общего белка проводили биуретовым методом. Белковые соединения способны образовывать в щелочной среде окрашенный комплекс с ионами меди, интенсивность окраски реакционной среды пропорциональна концентрации общего белка в пробе. Пробы фотоколориметрируют при длине волны 540 нм [91].

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. Пробы фотоколориметрируют при длине волны 505 нм [76].

Количественное содержание альбумина определяли колориметрическим методом с бромкрезоловым зелёным. Определение концентрации альбумина основано на образовании окрашенного комплекса альбумина с бромкрезоловым зелёным в слабокислой среде в присутствии детергента. Интенсивность окраски реакционной среды пропорциональна концентрации альбумина, которую измеряют фотометрически при длине волны 628 нм [54].

Содержание фосфора неорганического определяли UV- методом без депротеинизации. Данный метод заключается в том, что фосфат-ионы при наличии детергента способны в кислой среде образовывать с молибдатом аммония фосформолибденовый комплекс. Оптическая плотность прямо

пропорциональна концентрации неорганического фосфора в исследуемом образце. Пробы фотоколориметрируют при длине волны 340 нм [62].

Содержание общего холестерина в сыворотке крови определялось ферментативно-колориметрическим методом. Под действием фермента холестерол-эстеразы происходит высвобождение холестерина из состава эфиров. Далее при участии фермента холестеролоксидазы 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. Интенсивность окраски реакционной среды пропорциональна содержанию холестерина в исследуемом материале. Пробы фотоколориметрируют при длине волны 500 (490-520) нм [56].

Количественное содержание хлоридов определяли колориметрическим методом. Метод основан на способности тиоцианата ртути образовывать с ионами железа окрашенные комплексы в присутствии ионов хлора. Интенсивность окраски реакционной среды прямо пропорциональна концентрации хлоридов в анализируемой пробе. Пробы фотоколориметрируют при длине волны 540 нм [58].

Количественное содержание калия определяли турбидиметрическим методом без депротеинизации. Метод основан на взаимодействии ионов калия с тетрафенилборатом. В результате этой реакции образуется стабильная суспензия. Концентрации ионов калия в анализируемой пробе пропорциональна мутности суспензии. Пробы фотоколориметрируют при длине волны 578 нм [63].

Концентрацию натрия определяли колориметрическим методом. В результате связывания натрия ионами осаждающего реагента происходит образование нерастворимого комплекса. Ионы осаждающего агента, которые остались в растворе, образуют с тиогликолятом окрашенное соединение. Содержание натрия в исследуемой пробе обратно

пропорциональна содержанию интенсивности окраски реакционной среды. Пробы фотоколориметрируют при длине волны 405 нм [61].

Концентрация мочевины в сыворотке крови определялась ферментативно-колориметрическим методом набором реагентов Мочевина под действием фермента уреазы гидролизуетсся с образованием аммиака и двуокиси углерода. Ионы аммония в щелочной среде в присутствии нитропруссиды реагируют с фенол-гипохлоритным реагентом, образуя окрашенный комплекс индофенола синего цвета. Интенсивность окраски реакционной среды пропорциональна концентрации мочевины в анализируемом образце. Пробы фотоколориметрируют при длине волны 540 нм [55].

Глюкозу определяли энзиматическим колориметрическим методом без депротеинизации. β -D-глюкоза под действием фермента глюкозооксидазы окисляется с образованием эквимольного количества перекиси водорода. Перекись водорода, которая образуется в данной реакции при участии фермента пероксидазы способствует окислительномуазосочетанию 4-аминоантипирина и фенола. В результате образуется окрашенное соединение.

Содержание глюкозы в исследуемой пробе пропорциональна интенсивности окраски реакционной среды. Пробы фотоколориметрируют при длине волны 500 (490-540) нм [88].

Содержание триглицеридов определяли энзиматически колориметрическим методом. Определение концентрации триглицеридов основано на проведении ряда сопряжённых ферментативных реакций, катализируемых липазой, глицерокиназой в присутствии АТФ, глицеролфосфатоксидазой и пероксидазой. Перекись водорода, образующаяся в ходе данных реакций способствует окислительномуазосочетанию 4-аминоантипирина и фенола. В результате реакции образуется окрашенное соединение. Содержание триглицеридов в

исследуемом материале пропорционально интенсивности окраски реакционной среды. Пробы фотоколориметрируют при длине волны 500 нм [88].

Содержание кальция проводилось энзиматически колориметрическим методом. Ионы кальция в щелочной среде образуют окрашенный комплекс с о-крезолфталейн комплексом. Интенсивность окраски реакционной смеси пропорциональна концентрации кальция в пробе.

Пробы фотоколориметрировали при длине волны 570 (540- 590) нм [45].

2.3 Методы гистологического исследования

2.3.1 Окраска гематоксилин-эозином

Окрашивали срезы гематоксилином 7-10 минут, затем промывали в дистиллированной воде 5 минут. 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, двукратно в 96% этаноле для удаления воды из срезов. Экспозиция в каждой порции спирта – 2 минуты. Для просветления дважды промывали срезы в смеси расплавленного фенола и ксилола в соотношении 1:4 в течение 1 минуты. Окончательное обезвоживание срезов проводили промыванием ксилолом в течение 2 минут [17].

2.3.2 Окрашка по методу Вейгерта-Ван-Гизона

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

Полученные гистологические стекла изучали с помощью микроскопа в проходящем свете [17].

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Влияние подкожной имплантации бесклеточного матрикса на основе подслизистой тонкой кишки свиньи на биохимические параметры

3.1.1 Влияние подкожной имплантации бесклеточного матрикса на основе подслизистой тонкой кишки свиньи на активность аспартатаминотрансферазы в сыворотке крови крыс

На рисунке 1 представлены результаты определения активности АСТ в сыворотке крови крыс интактной, контрольной и опытной групп после декапитации по истечении 2 и 4 недель.

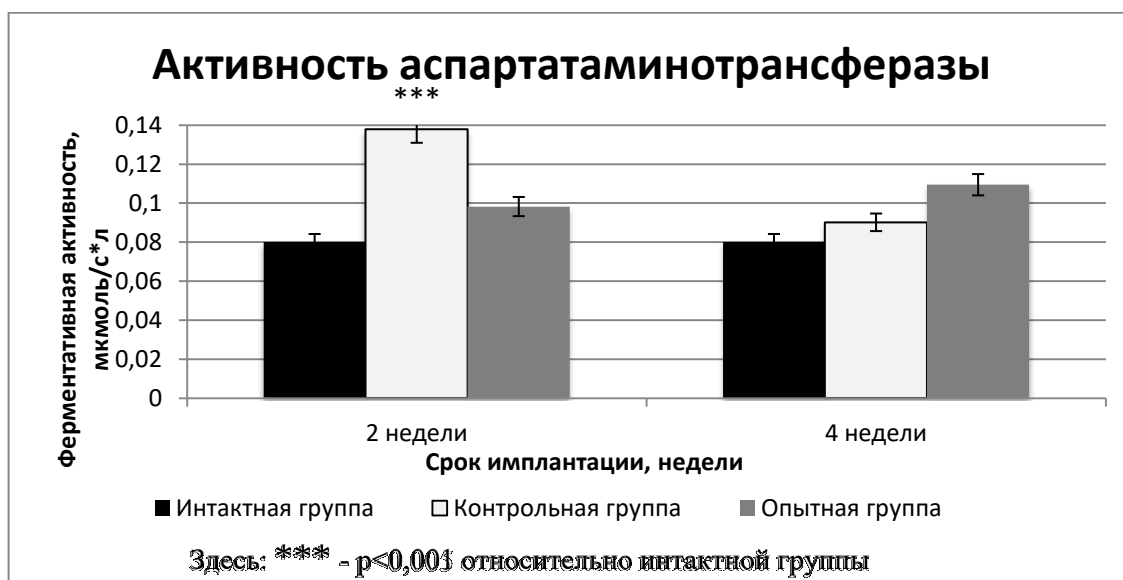


Рис.1. Активность аспартатаминотрансферазы после декапитации по истечении 2 и 4 недель (мкмоль/с*л, $M \pm m$, $n=6$, Здесь: *** - $p < 0,001$ относительно интактной группы)

Нами было установлено, что через 2 недели после операции наблюдалось достоверное увеличение активности АСТ в сыворотке крови контрольной группы в 1,72 раза относительно интактной. По истечении 4 - недельного срока активность исследуемого фермента не изменялась.

По-видимому, наблюдаемое увеличение активности АСТ может быть обусловлено оперативным вмешательством.

Известно, что любое оперативное вмешательство способствует активации нейро-гуморально-метаболических реакций, которые характерны для экстремальных состояний различного характера и подчиняющихся общим законам стресса [12, 53].

Хирургический стресс-ответ – комплекс изменений нейроэндокринного, метаболического и воспалительного характера, который развивается в результате оперативного вмешательства [53].

Нейроэндокринные изменения, индуцированные оперативным вмешательством, проявляются в первую очередь активацией гипоталамо-гипофизарной и симпатической нервной системы. Афферентные импульсы, исходящие из операционной раны и достигающие гипоталамуса, являются главной причиной эндокринных изменений, сопровождающих любое оперативное вмешательство [92].

В результате активации гипоталамических структур повышается выработка релизинг-факторов, которые способствуют усилению секреции гормонов передней и задней долей гипофиза [93]. Гипоталамическая активация симпатической нервной системы приводит к повышению секреции адреналина мозговым слоем надпочечников и высвобождению норадреналина из пресинаптических нервных окончаний. Концентрация циркулирующих катехоламинов существенно зависит от травматичности оперативного вмешательства [83]. Кроме того, симпатическая стимуляция и/или циркулирующие катехоламины оказывают влияние на функцию практически всех висцеральных органов (в первую очередь печени, поджелудочной железы, почек) и способствуют развитию метаболических нарушений [73].

Таким образом, повышение активности исследуемого фермента в сыворотке крови крыс контрольной группы после декапитации через 2

недели, вероятно, является следствием оперативного вмешательства, которое вызывает изменения нейроэндокринного, метаболического и воспалительного характера.

Отсутствие достоверных данных относительно изменения активности исследуемого фермента в сыворотке крови крыс опытной и контрольной групп после декапитации через 4 недели, по-видимому, обусловлено заживлением раны и нормализацией гипоталамо-гипофизарной оси и симпатической нервной системы.

3.1.2 Влияние подкожной имплантации бесклеточного матрикса на основе подслизистой тонкой кишки свиньи на активность аланинаминотрансферазы в сыворотке крови крыс

На рисунке 2 представлены результаты определения активности АЛТ в сыворотке крови крыс интактной, контрольной и опытной групп после декапитации по истечении 2 и 4 недель.

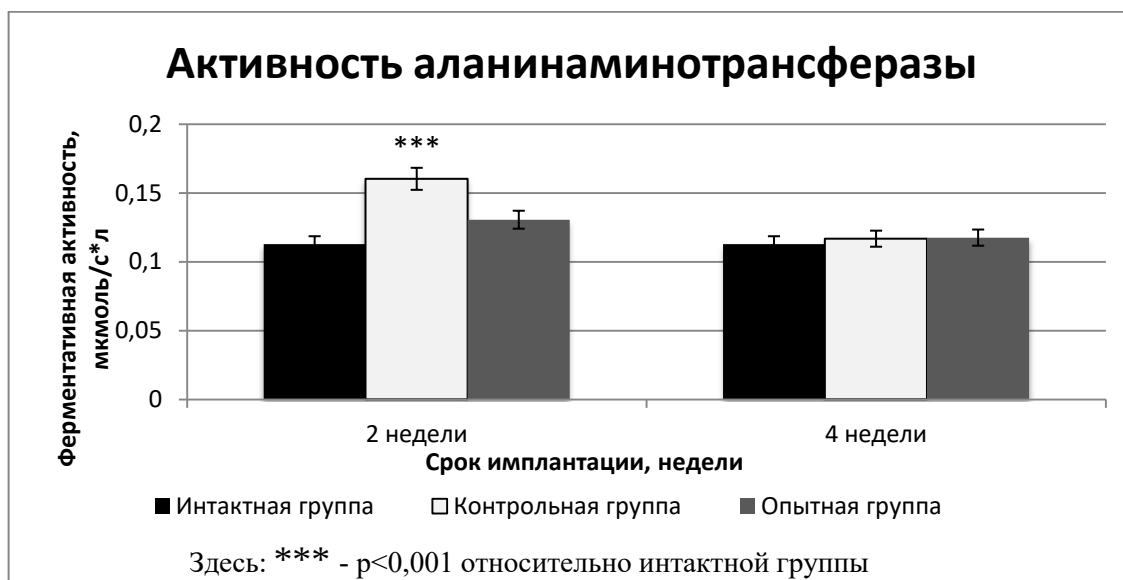


Рис. 2. Активность аланинаминотрансферазы после декапитации по истечении 2 и 4 недель (мкмоль/с*л, $M \pm m$, $n=6$, Здесь: *** - $p < 0,001$ относительно интактной группы)

Статистически значимым является повышение активности АЛТ в сыворотке крови крыс контрольной группы через 2 недели после оперативного вмешательства. Активность исследуемого фермента увеличилась в 1,4 раза относительно интактной группы. Через 4 недели активность фермента в сыворотке крови крыс контрольной и опытной групп не изменялась.

Изменение активности АЛТ, вероятно, является результатом оперативного вмешательства, которое может оказывать стрессорное воздействие на организм.

В настоящее время известно, что следствием стрессорного воздействия на организм могут являться патологические изменения печени различного характера[49]. Причиной данных изменений могут быть известные катаболические эффекты глюкокортикоидов, способные прямо или опосредованно оказывать влияние на морфологию и функциональную активность гепатоцитов [22].

За счет преимущественного расположения АЛТ в цитозоле печени его повышение считают более специфичным для заболеваний печени [67]. Но при повреждении или разрушении клеток, богатых АЛТ, происходит выброс этого фермента в кровяное русло, что приводит к повышению активности его в крови.

3.1.3 Влияние подкожной имплантации бесклеточного матрикса на основе подслизистой тонкой кишки свиньи на активность щелочной фосфатазы в сыворотке крови крыс.

На рисунке 3 представлены результаты определения активности щелочной фосфатазы в сыворотке крови крыс интактной, контрольной и опытной групп после декапитации по истечении 2 и 4 недель.

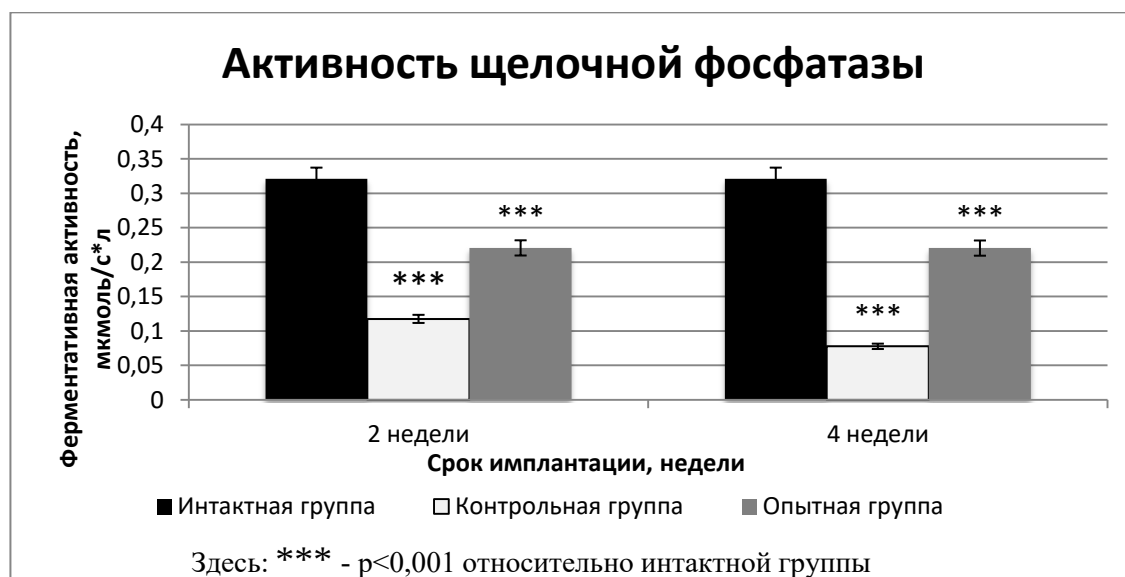


*Рис. 3. Активность щелочной фосфатазы после декапитации по истечении 2 и 4 недель (мкмоль/с*л, $M \pm m$, $n=6$, Здесь: *** - $p < 0,001$ относительно интактной группы)*

Установлено, что по истечении 2 и 4 недель активность щелочной фосфатазы в сыворотке крови крыс контрольной группы уменьшалась в 2,7 раза и в 4,12 раза соответственно. В опытной группе было отмечено снижение активности через 2 и 4 недели после операции в 1,4 раза относительно интактной группы.

Наблюдаемые изменения активности щелочной фосфатазы по истечении 2-недельного срока, по-видимому, являются следствием оперативного вмешательства, которое оказывает стрессорное воздействие.

Известно, что увеличение активности щелочной фосфатазы может свидетельствовать о поражениях печени. Тот факт, что по истечении 4-недельного срока определяемый показатель не превышал нормального значения, вероятно, говорит о том, что подкожная имплантация бесклеточного коллагенового матрикса на основе подслизистой тонкой кишки свиньи не оказывает токсического действия на организм животного.

3.1.4 Влияние подкожной имплантации бесклеточного матрикса на основе подслизистой тонкой кишки свиньи на активность гамма-глутамилтрансферазы в сыворотке крови крыс

На рисунке 4 представлены результаты определения активности гамма - глутамилтрансферазы в сыворотке крови крыс интактной, контрольной и опытной групп после декапитации по истечении 2 и 4 недель.

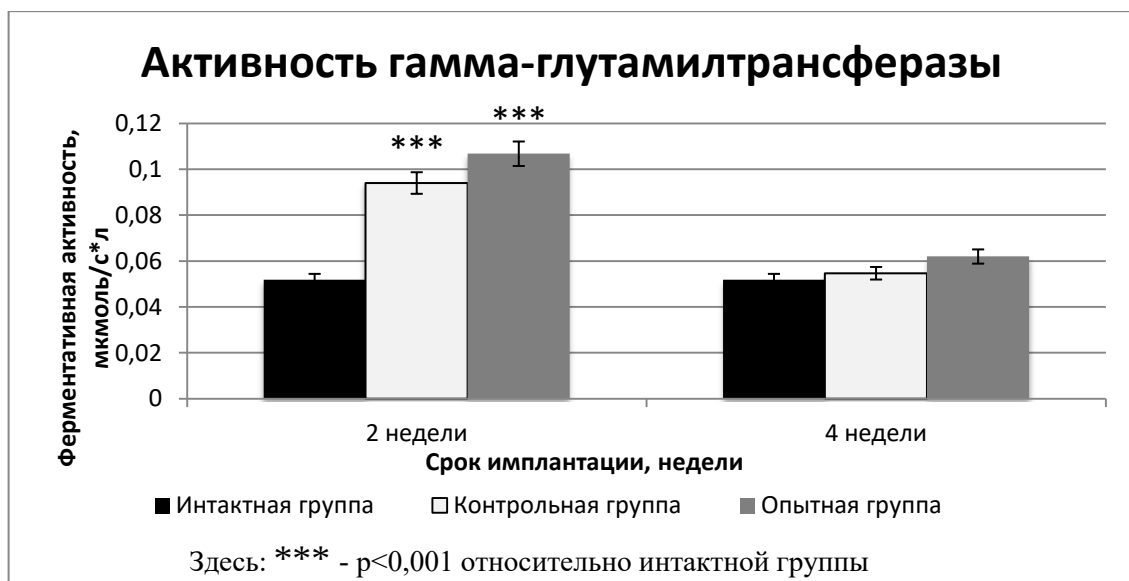


Рис. 4. Активность гамма- глутамилтрансферазы после декапитации по истечении 2 и 4 недель (мкмоль/с*л, $M \pm m$, $n=6$, Здесь: *** - $p < 0,001$ относительно интактной группы)

Согласно полученных данных, достоверным является увеличение активности гамма- глутамилтрансферазы через 2 недели после произведенной операции. Активность исследуемого фермента контрольной группы увеличивается в 1,88 раза, активность ГГТ опытной группы в 2,07 раза, по сравнению с животными интактной группы. Статистически значимых результатов относительно изменения активности исследуемого фермента в сыворотке крови крыс опытной и контрольной группы, по сравнению с интактными животными, выявлено не было.

Увеличение активности фермента, по-видимому, вызвано активацией гипоталамо-гипофизарной оси, вследствие стрессорного воздействия, которое заключалось в оперативном вмешательстве.

Нормализация активности исследуемого фермента в сыворотке крови крыс опытной и контрольной группы свидетельствует об отсутствии токсического действия имплантируемого материала.

3.1.5 Влияние подкожной имплантации бесклеточного матрикса на основе подслизистой тонкой кишки свиньи на содержание глюкозы в сыворотке крови крыс

На рисунке 5 представлены результаты определения активности щелочной фосфатазы в сыворотке крови крыс интактной, контрольной и опытной групп после декапитации по истечении 2 и 4 недель.

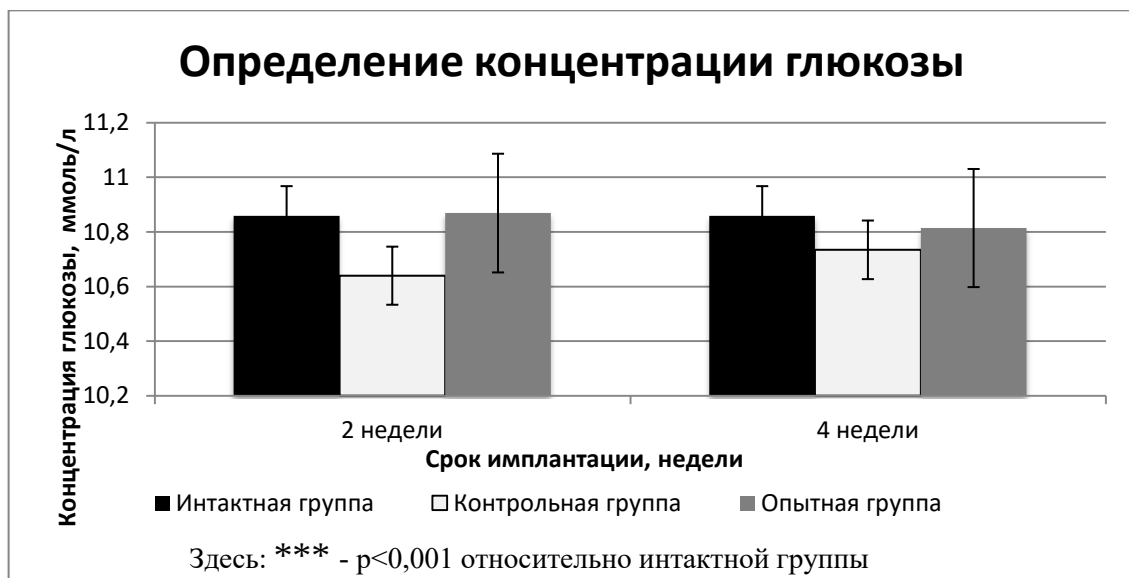


*Рис. 5. Концентрация глюкозы после декапитации по истечении 2 и 4 недель (ммоль/л, $M \pm m$, $n=6$, Здесь: *** - $p < 0,001$ относительно интактной группы)*

Достоверных изменений уровня глюкозы выявлено не было.

Согласно литературным данным, ответной реакцией на стрессорное воздействие со стороны углеводного обмена является повышение сывороточной концентрации глюкозы [9].

Уровень послеоперационной гипергликемии используется (наряду с катехоламинами и кортизолом) в качестве одного из критериев «классической стрессовой реакции» [12].

Развитие гипергликемии связано с посттравматической гиперпродукцией контринсулярных гормонов (катехоламинов, глюкагона, глюкокортикоидов, гормона роста) и цитокинов (фактора некроза опухоли- α , интерлейкинов) [53; 71]. Совместным действием катехоламинов и глюкагона достигается интенсификация гликогенолиза в печени, мышцах и сердце. Глюкагон при этом выделяется несколько позже, чем катехоламины, дублируя и подкрепляя эффект последних. Глюкокортикоиды стимулируют ферменты глюконеогенеза в печени (запасы гликогена в стрессовых ситуациях истощаются достаточно быстро, в течение 10-14 часов) [25]. Посттравматическая инсулинорезистентность периферических тканей под влиянием гормонов стресса, а также снижение синтеза и секреции инсулина приводит к ограничивают потребление глюкозы. Цитокины поддерживают инсулинорезистентность тканей и усиливают синтез контринсулярных гормонов. Немалую роль в поддержании гипергликемии играет повышение в крови концентрации предшественников глюконеогенеза - продуктов липолиза и протеолиза [24,71].

По литературным данным концентрация глюкозы в крови начинает увеличиваться в первые часы после начала операции и нормализуется не ранее, чем через сутки [53,71].

Поскольку определение концентрации глюкозы в сыворотке крови крыс опытных и контрольных групп проводилось после декапитации

через 2 и 4 недели, мы предположили, что углеводный обмен нормализовался.

3.1.6 Влияние подкожной имплантации бесклеточного матрикса на основе подслизистой тонкой кишки свиньи на содержание альбумина в сыворотке крови крыс

На рисунке 6 представлены результаты определения концентрации альбумина в сыворотке крови крыс интактной, контрольной и опытной групп после декапитации по истечении 2 и 4 недель.

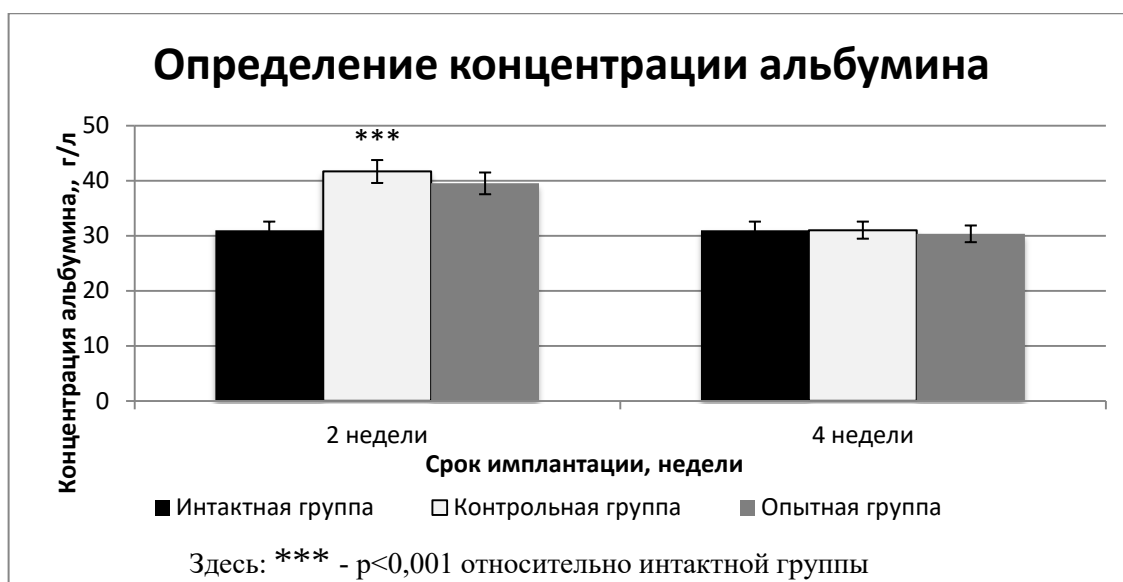


Рис. 6. Концентрация альбумина после декапитации по истечении 2 и 4 недель (г/л, $M \pm m$, $n=6$, Здесь: *** - $p < 0,001$ относительно интактной группы)

В результате эксперимента было установлено достоверное увеличение концентрации альбумина контрольной группы в сыворотке крови крыс через 2 недели после операции. Содержание альбумина в 1,34 раза выше, относительно интактной группы.

Наблюдаемое изменение концентрации альбумина контрольной группы животных может быть следствием воспалительной реакции в ответ на оперативное вмешательство.

3.1.7 Влияние подкожной имплантации бесклеточного матрикса на основе подслизистой тонкой кишки свиньи на концентрацию холестерина в сыворотке крови крыс

На рисунке 7 представлены результаты определения концентрации холестерина в сыворотке крови крыс интактной, контрольной и опытной групп после декапитации по истечении 2 и 4 недель.

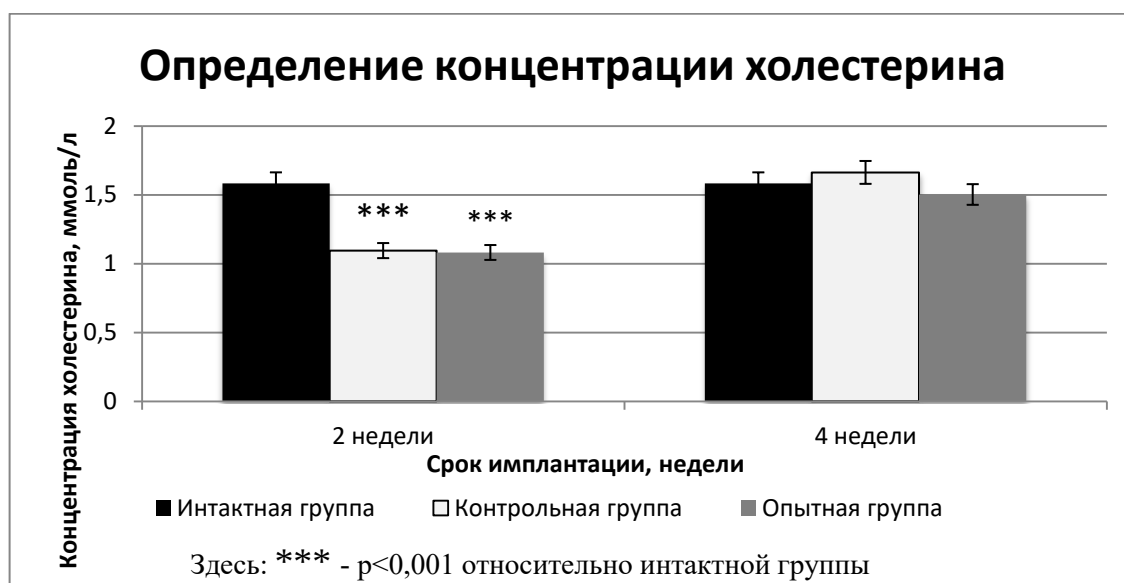


*Рис. 7. Концентрация холестерина после декапитации по истечении 2 и 4 недель (ммоль/л, $M \pm m$, $n=6$, Здесь: *** - $p < 0,001$ относительно интактной группы)*

Полученные результаты свидетельствуют о снижении концентрации холестерина в сыворотке крови крыс контрольных и опытных групп через 2 недели после операции в 1,45 раза и 1,46 раза соответственно.

Наблюдаемое изменение концентрации холестерина может быть следствием нарушения липидного обмена, вызванного оперативным вмешательством, которое, по-видимому, является стрессирующим фактором.

Нормализация концентрации определяемого параметра в сыворотке крови крыс опытной и контрольной групп свидетельствует об отсутствии

токсического действия имплантируемого материала на основе подслизистой тонкой кишки свиньи.

3.1.8 Влияние подкожной имплантации бесклеточного матрикса на основе подслизистой тонкой кишки свиньи на концентрацию триглицеридов в сыворотке крови крыс

На рисунке 8 представлены результаты определения концентрации альбумина в сыворотке крови крыс интактной, контрольной и опытной групп через после декапитации по истечении 2 и 4 недель.

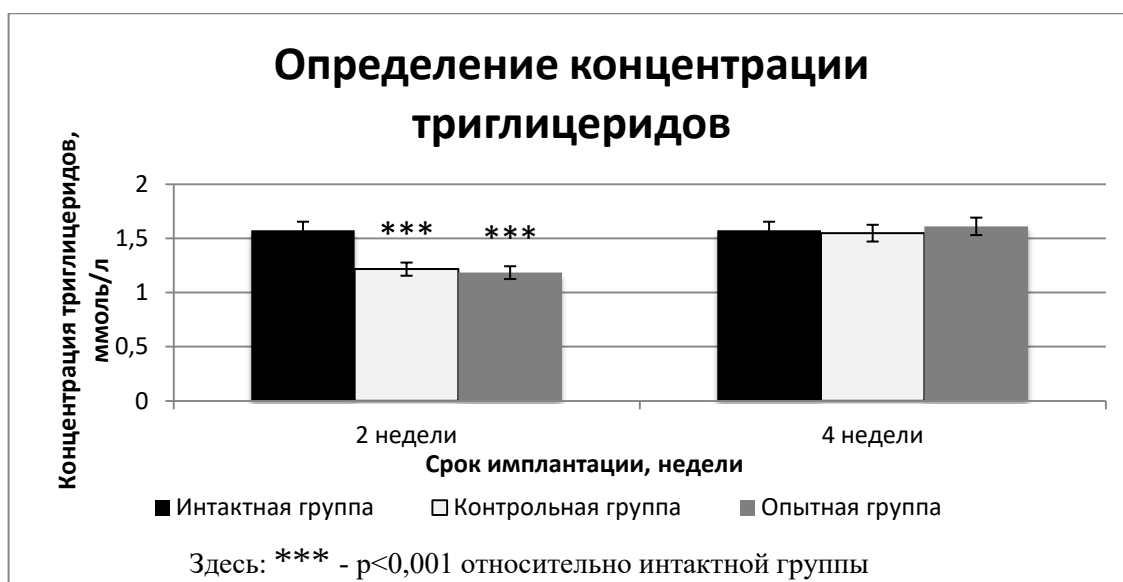


*Рис. 8. Концентрация триглицеридов после декапитации по истечении 2 и 4 недель (ммоль/л, $M \pm m$, $n=6$, Здесь: *** - $p < 0,001$ относительно интактной группы)*

По результатам исследования статистически значимым является уменьшение концентрации триглицеридов в сыворотке крови крыс контрольных и опытных групп в 1,29 раза и в 1,33 раза относительно интактной.

Изменения со стороны липидного обмена в критических состояниях выражаются, главным образом, в интенсификации липолиза. Активация тканевых липаз жировой ткани, скелетных мышц и сердца происходит под

влиянием катехоламинов, кортизола, гормона роста, глюкагона, и, возможно, цитокинов. Параллельно вазопрессин и паратгормон усиливают гидролиз триглицеридов крови. Как следствие, увеличивается сывороточная концентрация продуктов гидролиза триглицеридов - свободных жирных кислот и глицерола [24, 25, 53].

В литературе обычно упоминается повышение сывороточной концентрации липотропных гормонов, с одной стороны, и продуктов гидролиза липидов, с другой.

Отмечается, что уровень свободных жирных кислот в крови увеличивается достаточно быстро - через несколько часов после операции [85, 65].

Изменения со стороны триглицеридов крови в результате хирургического вмешательства выражаются в быстром снижении их уровня - тем отчетливее, чем травматичнее воздействие.

Статистически значимых результатов относительно изменения концентрации триглицеридов в сыворотке крови крыс опытной и контрольной групп через 4 недели после имплантации выявлено не было.

3.1.9 Влияние подкожной имплантации бесклеточного матрикса на основе подслизистой тонкой кишки свиньи на концентрацию креатинина в сыворотке крови крыс

На рисунке 9 представлены результаты определения концентрации креатинина в сыворотке крови крыс интактной, контрольной и опытной групп после декапитации по истечении 2 и 4 недель.



*Рис. 9. Концентрация креатинина после декапитации по истечении 2 и 4 недель (мкмоль/л, $M \pm m$, $n=6$, Здесь: *** - $p < 0,001$ относительно интактной группы)*

Было отмечено, что имплантация бесклеточного матрикса на основе подслизистой тонкой кишки свиньи через 2 недели вызывает достоверное снижение концентрации креатинина в 1,56 раза, а оперативное вмешательство без имплантации в 1,50 раза относительно интактной группы. По истечении 4 – недельного срока изменение концентрации креатинина обнаружено не было.

Наблюдаемое изменение концентрации креатинина по истечении 2 - недельного срока может быть обусловлено оперативным вмешательством.

3.1.10 Влияние подкожной имплантации бесклеточного матрикса на основе подслизистой тонкой кишки свиньи на концентрацию мочевины в сыворотке крови крыс

На рисунке 10 представлены результаты определения концентрации мочевины в сыворотке крови крыс интактной, контрольной и опытной групп через после декапитации по истечении 2 и 4 недель.

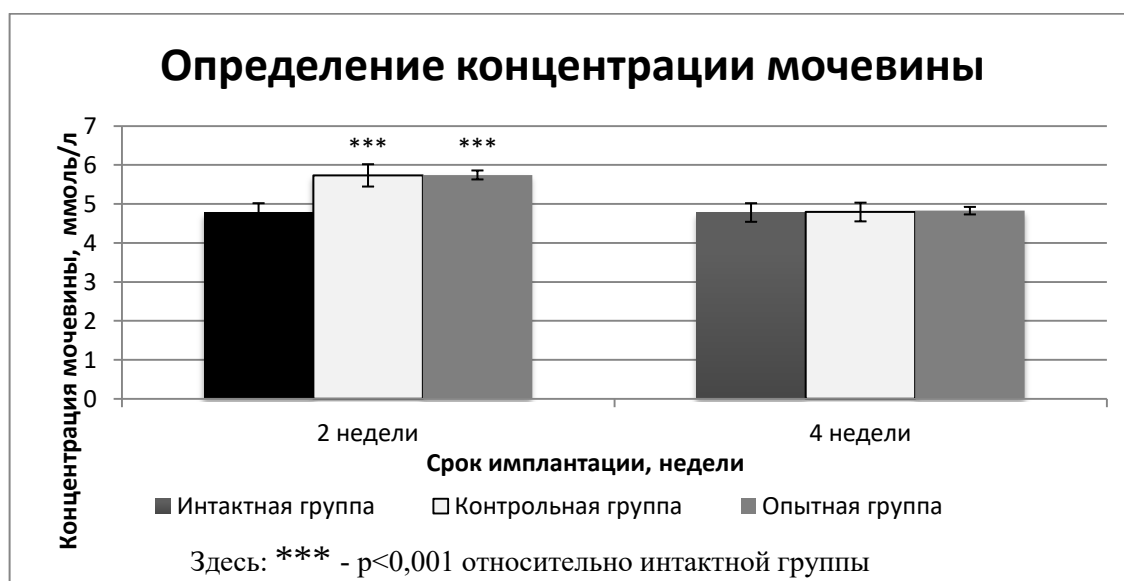


Рис. 10. Концентрация мочевины после декапитации по истечении 2 и 4 недель (ммоль/л, $M \pm m$, $n=6$, Здесь: *** - $p < 0,001$ относительно интактной группы)

Статистически значимым является повышение концентрации мочевины в сыворотке крови крыс опытной и контрольной групп через 2 недели в 1,2 раза и в 1,19 раза соответственно, относительно интактных животных.

Наблюдаемое изменение, вероятно, является следствием нарушения белкового обмена, вызванного оперативным вмешательством. Нормализация определяемого параметра по истечении 4 - недельного срока может свидетельствовать об отсутствии негативного влияния со стороны имплантируемого материала на организм животного.

3.1.11 Влияние подкожной имплантации бесклеточного матрикса на основе подслизистой тонкой кишки свиньи на концентрацию общего белка в сыворотке крови крыс

На рисунке 11 представлены результаты определения концентрации альбумина в сыворотке крови крыс интактной, контрольной и опытной групп после декапитации по истечении 2 и 4 недель.

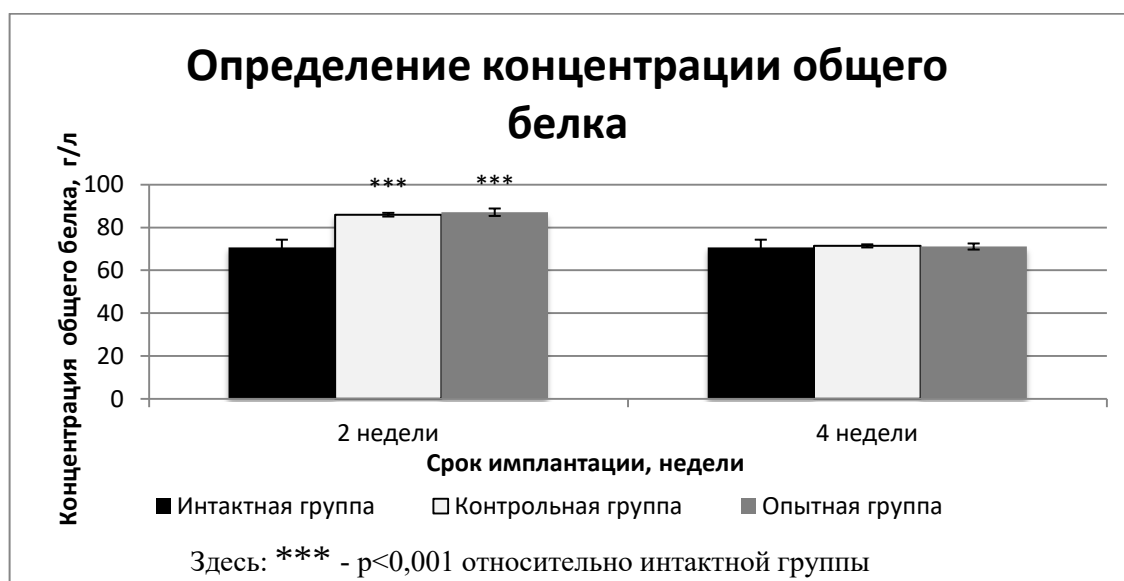


*Рис. 11. Концентрация общего белка после декапитации по истечении 2 и 4 недель (г/л, $M \pm m$, $n=6$, Здесь: *** - $p < 0,001$ относительно интактной группы)*

Через 2 недели в контрольной и опытной группе наблюдалось увеличение концентрации белка в 1,21 раза и в 1,23 раза соответственно. По истечении 4 – недельного срока изменения концентрации общего белка в сыворотке крови крыс опытной и контрольной групп отмечено не было.

Под влиянием "стрессовых" гормонов в послеоперационном периоде развивается катаболизм белков, аминокислоты используются в синтезе глюкозы, жирных кислот и белков острой фазы [84].

3.1.12 Влияние подкожной имплантации бесклеточного матрикса на основе подслизистой тонкой кишки свиньи на концентрацию калия в сыворотке крови крыс

На рисунке 12 представлены результаты определения концентрации калия в сыворотке крови крыс интактной, контрольной и опытной групп после декапитации по истечении 2 и 4 недель.

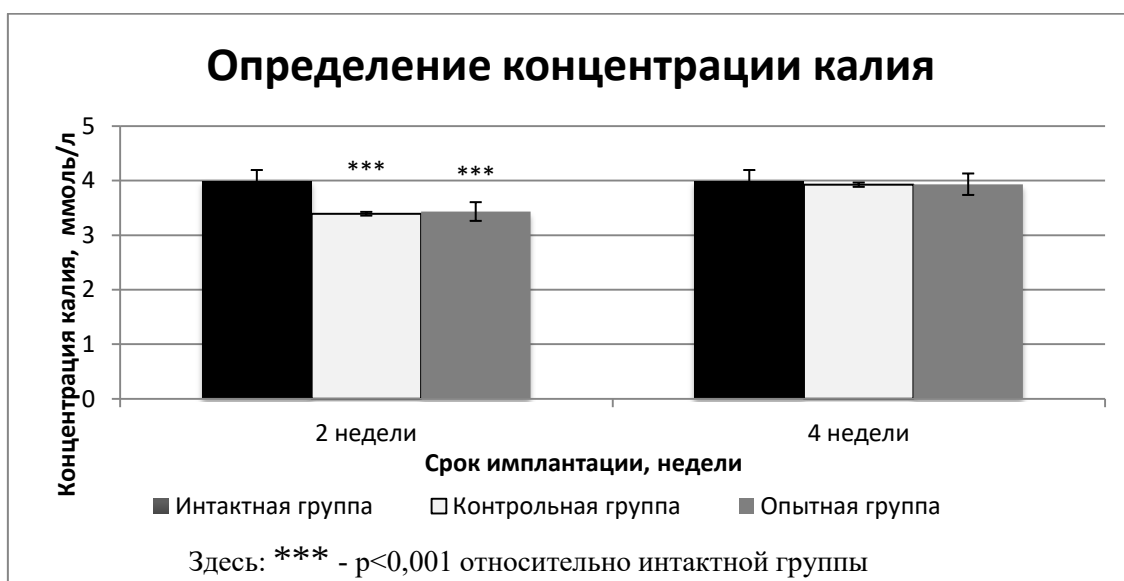


*Рис. 12. Концентрация калия после декапитации по истечении 2 и 4 недель (ммоль/л, $M \pm m$, $n=6$, Здесь: *** - $p < 0,001$ относительно интактной группы)*

Наблюдалось понижение концентрации калия в сыворотке крови крыс опытной и контрольной групп в 1,16 раза и 1,18 раза относительно интактной группы после декапитации по истечении 2-недельного срока.

Статистически значимых результатов относительно изменения концентрации калия в сыворотке крови крыс контрольной и опытной групп по истечении 4-недельного срока выявлено не было. Вероятно, изменение концентрации калия вызвано оперативным вмешательством, которая, по-видимому, является стрессирующим воздействием. Нормализация определяемого показателя может свидетельствовать об отсутствии токсического воздействия на организм животного.

3.1.13 Влияние подкожной имплантации бесклеточного матрикса на основе подслизистой тонкой кишки свиньи на концентрацию натрия в сыворотке крови крыс

На рисунке 13 представлены результаты определения концентрации альбумина в сыворотке крови крыс интактной, контрольной и опытной групп после декапитации по истечении 2 и 4 недель.



*Рис. 13. Концентрация натрия после декапитации по истечении 2 и 4 недель (ммоль/л, $M \pm m$, $n=6$, Здесь: *** - $p < 0,001$ относительно интактной группы)*

Полученные данные свидетельствуют о повышении уровня натрия в сыворотке крови крыс опытной и контрольной групп в 1,4 раза и 1,5 раза соответственно. Наблюдаемые изменения были отмечены через 2 недели после операции. Через 4 недели уровень натрия в сыворотке крови крыс не изменялся.

Типичной реакцией водно-электролитного обмена на хирургическую травму является задержка воды и натрия, направленная на поддержание объема циркулирующей крови. Это происходит за счет повышения секреции вазопрессина задней долей гипофиза и симпатической активации ренин-ангиотензин-альдостероновой системы [69].

3.1.14 Влияние подкожной имплантации бесклеточного матрикса на основе подслизистой тонкой кишки свиньи на концентрацию фосфатов и хлоридов в сыворотке крови крыс

На рисунке 14 представлены результаты определения концентрации фосфатов и хлоридов в сыворотке крови крыс интактной, контрольной и опытной групп через после декапитации через 2 и 4.

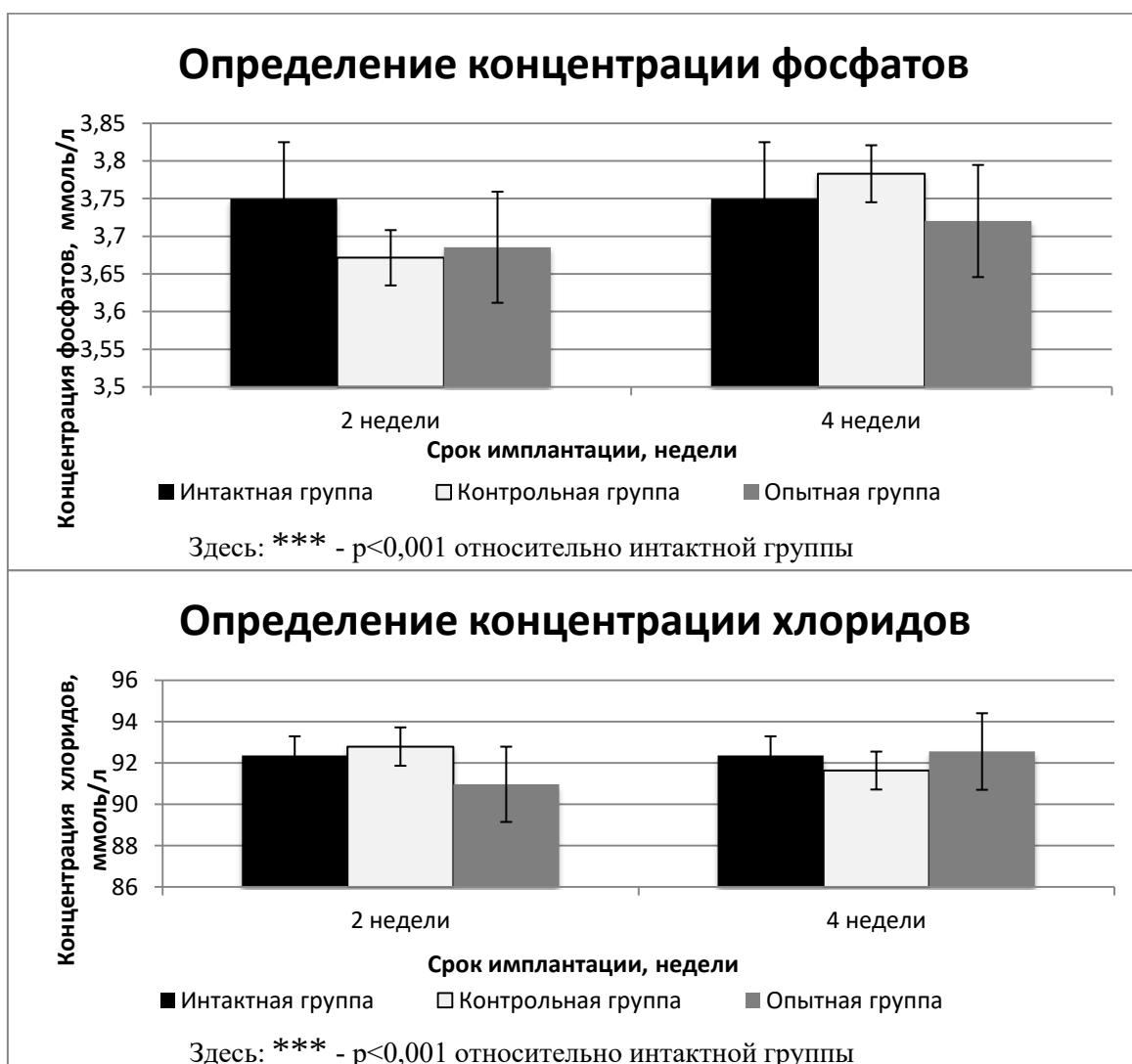


Рис. 14 . Концентрация фосфора и хлоридов после декапитации по истечении 2 и 4 недель (ммоль/л, $M \pm m$, $n=6$, Здесь: *** - $p < 0,001$ относительно интактной группы)

Статистически значимых результатов относительно изменения концентрации фосфора и хлоридов выявлено не было. Данное

обстоятельство может говорить о том, что имплантация бесклеточного коллагенового матрикса на основе подслизистой тонкой кишки свиньи не оказывает токсического действия на организм животного.

3.1.15 Влияние подкожной имплантации бесклеточного матрикса на основе подслизистой тонкой кишки свиньи на концентрацию фосфатов и хлоридов в сыворотке крови крыс

На рисунке 15 представлены результаты определения концентрации кальция в сыворотке крови крыс интактной, контрольной и опытной групп через после декапитации через 2 и 4.

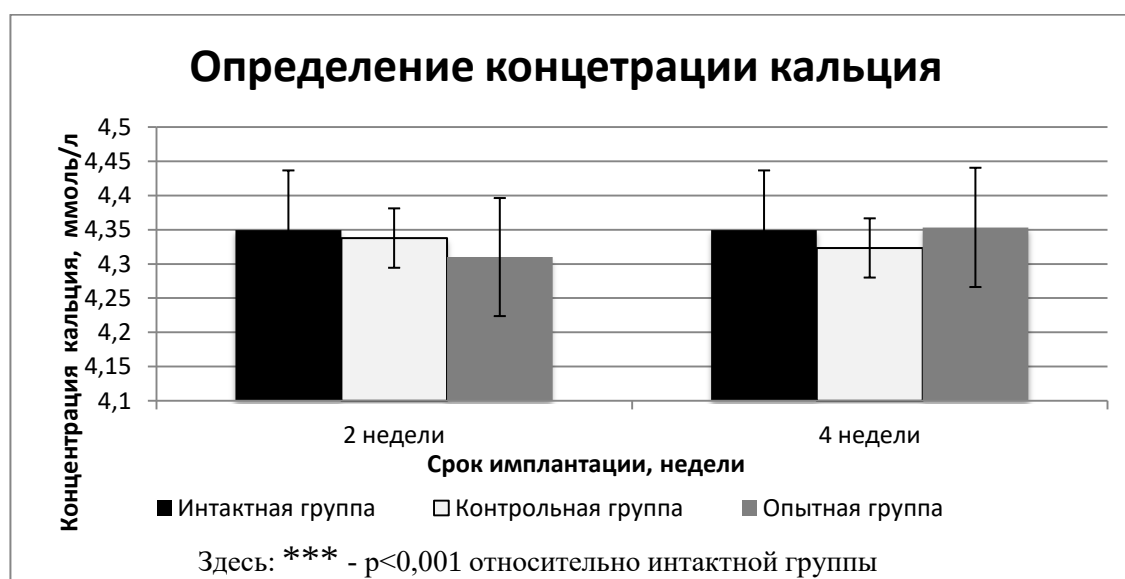


*Рис. 15 . Концентрация кальция после декапитации по истечении 2 и 4 недель (ммоль/л, $M \pm m$, $n=6$, Здесь: *** - $p < 0,001$ относительно интактной группы)*

Статистически значимых результатов относительно изменения концентрации кальция по истечении 2 и 4- недельного срока выявлено не было. По-видимому материал не оказывает негативного воздействия на организм животного.

3.2 Гистологическое исследование образцов до операции

На рисунке 16 и 17 изображены результаты гистологического исследования образцов бесклеточного матрикса подслизистой основы тонкой кишки свиньи.

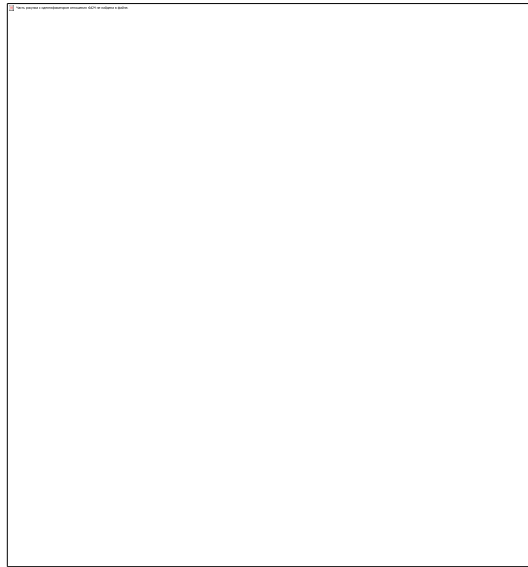


Рис. 16. Бесклеточный коллагеновый матрикс на основе подслизистой тонкой кишки, по Вейгерт-Ван-Гизону, x200

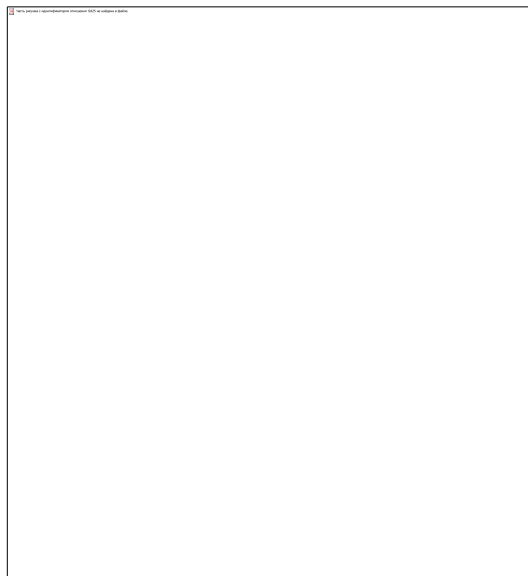


Рис. 17. Бесклеточный коллагеновый матрикс на основе подслизистой тонкой кишки, окраска гематоксилин-эозин, x200

Известно, что клеточные элементы ксеноматериалов провоцируют развитие иммунной реакции в ответ на имплантацию.

Нами было проведено гистологическое исследование образцов бесклеточного матрикса на основе подслизистой тонкой кишки до проведения операции.

Полученные результаты свидетельствуют об отсутствии клеточных элементов, сохранности коллагеновых и эластических волокон после ферментативной обработки подслизистой основы тонкой кишки свиньи. Материал представляет собой коллагеновый матрикс на основе подслизистой тонкой кишки, лишенный клеточных элементов.

3.3 Гистологическое исследование образцов после по истечении 2 и 4-недельного срока

3.3.1 Морфологические изменения в зоне имплантации бесклеточного матрикса подслизистой основы тонкой кишки свиньи по истечении 2 недель

На рисунках 18 и 19 представлены результаты гистологического исследования образцов на основе бесклеточного матрикса подслизистой тонкой кишки свиньи через 2 недели после имплантации.

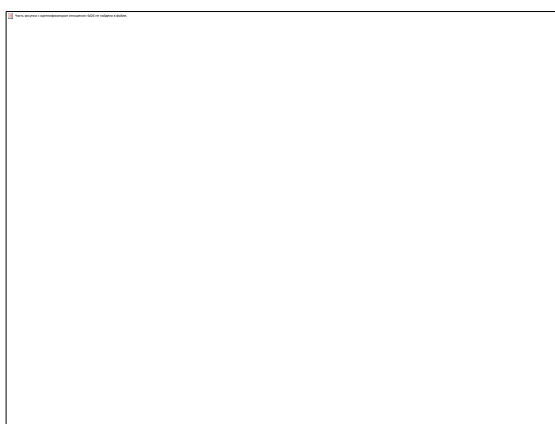


Рисунок 18. Бесклеточный коллагеновый матрикс на основе подслизистой тонкой кишки после 2- недельной подкожной имплантации, окраска по Вейгерт-Ван-Гизону, x200

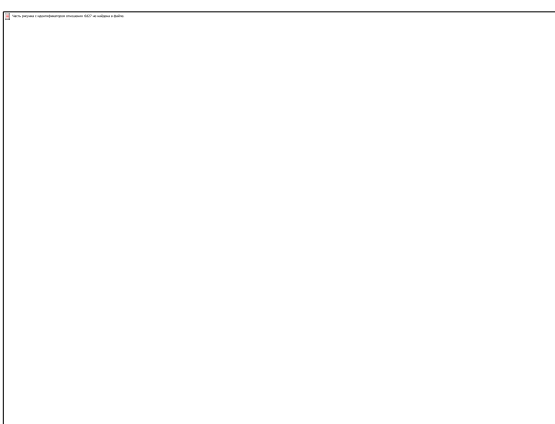


Рис. 19. Бесклеточный коллагеновый матрикс на основе подслизистой тонкой кишки после 2- недельной подкожной имплантации , окраска гематоксилин-эозин , x200

Гистологическое исследование пятислойных образцов бесклеточного коллагенового матрикса на основе подслизистой тонкой кишки свиньи после 2 недельной подкожной имплантации показало слабую биоинтеграцию. Вращение собственной соединительной ткани наблюдается только по краю образца.

Отсутствие ярко выраженной воспалительной реакции по всем полям зрения.

3.3.2 Морфологические изменения в зоне имплантации бесклеточного матрикса подслизистой основы тонкой кишки свиньи по истечении 4 – недельного срока

На рисунках 20 и 21 представлены результаты гистологического исследования образцов на основе бесклеточного матрикса подслизистой тонкой кишки свиньи через 4 недели после имплантации.

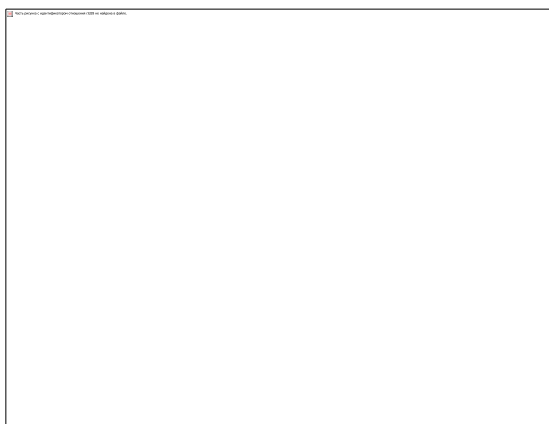


Рис. 20. Бесклеточный коллагеновый матрикс на основе подслизистой тонкой кишки после 4- недельной подкожной имплантации, окраска по Вейгерт-Ван-Гизону, x200

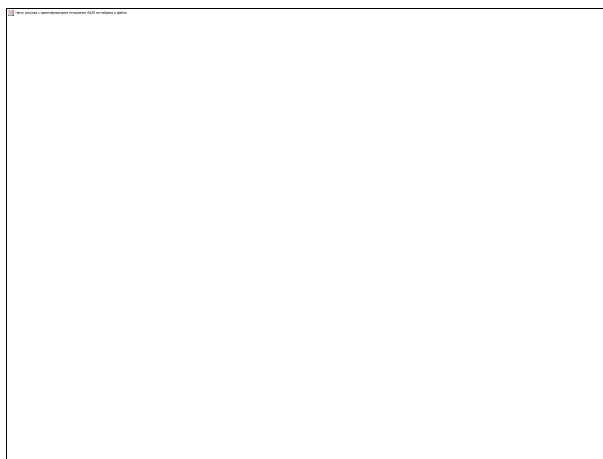


Рис. 21. Бесклеточный коллагеновый матрикс на основе подслизистой тонкой кишки после 4- недельной подкожной имплантации, окраска гематоксилин-эозин , x200

После морфологического исследования пятислойных образцов бесклеточного коллагенового матрикса на основе подслизистой основы тонкой кишки свиньи по истечении 4 - недельного срока, наблюдается активная биоинтергация. Вращение собственной соединительной ткани не только по краю образца, но и в центре, также выявляются новые кровеносные сосуды. Воспалительная реакция выражена слабо по всем полям зрения.

Полученные данные, относительно морфологического исследования образцов бесклеточного матрикса на основе подслизистой тонкой кишки свиньи, свидетельствуют о том, что материал не вызывает негативную реакцию организма в ответ на имплантацию и может использоваться в клинической практике.

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что бесклеточный коллагеновый матрикс на основе подслизистой тонкой кишки свиньи не вызывает ярко выраженную воспалительную реакцию и отторжение, обладает высокой способностью к биоинтеграции и биodeградации.
2. Отмечено достоверное изменение значений биохимических параметров сыворотки крови крыс в контрольной и опытной группах относительно интактной группы через 2 недели после имплантации, обусловленное проведением хирургической операции, которая является стрессирующим воздействием на организм животного.
3. Выявлено отсутствие достоверных изменений в значениях биохимических параметров контрольной и опытной групп, что свидетельствует об отсутствии негативного влияния на организм реципиента со стороны имплантируемых образцов бесклеточного коллагенового матрикса на основе подслизистой тонкой кишки свиньи
4. Установлено, что через 4 недели после имплантации значения биохимических параметров сыворотки крови животных контрольной и опытной групп не отличаются от интактной группы, что свидетельствует об отсутствии токсического воздействия со стороны имплантируемого материала и завершении репаративных процессов в организме реципиента.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АСТ- аспартатаминотрансфераза

АЛТ -аланинаминотрансфераза

ГКИТ- гигантские клетки инородного тела

ПТК- подслизистая тонкой кишки

ЭЦМ- экстрацеллюлярный матрикс

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Акатов, В.С. Изучение биосовместимости трансплантата клапанов сердца, девитализированных антикальцинозным способом / В.С. Акатов, Р.М. Муратов, И.С. Фадеева // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2010. – т. 5, №2. – С.36-41
2. Ардашев, И.П., Передний спондилодез в эксперименте / И.П. Ардашев, В.Т. Подорожная, И.А. Кирилова и др. // Хирургия позвоночника. – 2008. – № 1. – С. 66-73.
3. Ахмедов, Ш. М. Эффективность краниопластики трансплантатами различного происхождения по данным гистологического исследования (экспериментальное исследование) / Ш. М. Ахмедов Е. З. Кочарян И.Т. Мухамедов, В. С. Корвяков, В. Д. Меланьин и др. // Российская оториноларингология. – 2013. – № 5. – С. 8-13.
4. Барбараш, Л.С. Биологические протезы артерий: научное издание / Л.С. Барбараш, А.С. Криковцов, И.Ю. Журавлева. – Кемерово, 1996. – 46 с.
5. Богуславский, К.И. Эпитоп Gal- α -1,3-Gal: роль в биологии клетки и трансплантации / К.И. Богуславский, Г.А. Божок, Е.И. Легач, И.В. Фурда, Т.П. Бондаренко // Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2016. – Т. 26, №1. – С. 3-12
6. Булгаков, В. Г. Трибохимический компонент развития окислительного стресса при имплантации искусственных суставов / В. Г. Булгаков, Н. С. Гаврюшенко, А. Н. Шальнев, В. Ф. Цепалов // Вестник травматологии и ортопедии им. Н. Н. Приорова. – 2010. – № 1. – Ч. 1. С.44-48
7. Венедиктов, А.А. Разработка биоматериалов для реконструктивной хирургии на основе ксеноперикардальной ткани: диссертация ...

- кандидата медицинских наук / А.А. Венедиктов.– Москва, 2014.– 126 с.
8. Волова, Т. Г. Материалы для медицины, клеточной и тканевой инженерии [Электронный ресурс] : электрон. учеб. пособие / Т. Г. Волова, Е. И. Шишацкая, П. В. Миронов. Красноярск : ИПК СФУ, 2009.
 9. Горанчук, В.В. Биохимические детерминанты и механизмы развития экстремальной гипоксической гипоксии / В.В. Горанчук, Е.Б. Шустов, Л.И.Андреева, А.О. Иванов, Ф.А. Рустамов, Е.А. Баринов // Физиология человека. – 1999. –Т.25, №4. – С. 118-129.
 - 10.ГОСТ Р ИСО 10993–11–2011 "Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 11. Исследование общетоксического действия" .
 - 11.ГОСТ Р ИСО 10993–2–2011 "Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 2. Требования к обращению с животными".
 - 12.Дубова, Е.А. Морфологическая характеристика тканевой реакции при имплантации сетчатых эндопротезов : диссертация ... кандидата медицинских наук / Е.А. Дубова. – Москва, 2008. – 99 с.
 - 13.Затолока, Д.А. Проблемы применения аллотрансплантатов в оториноларингологической практике / Д.А.Затолока, Т.А.Путилина, А.С.Затолока, В.В.Батов // Клинико–лабораторные аспекты метаболической терапии: Сб. ст. II Респ. конф.– Витебск, 1999.– С. 165-167
 - 14.Каган, И.И. Топографическая анатомия и оперативная хирургия: учебник / И.И.Каган, С.В. Чемезов. – 2009. – 672 с.
 - 15.Кирилова, И.А. Костная ткань как основа остеопластических материалов для восстановления кости / И.А. Кирилова // Хирургия позвоночника. – 2011. – № 1. – С. 68-74.

- 16.Коваленко, П.П. Пересадка тканей и органов / П. П. Коваленко. – Ростов н/Д, 1976. – 47 с.
- 17.Коржевский, Д. Э. Основы гистологической техники. Практическое руководство / Д. Э. Коржевский, А. В. Гиляров. – Спб.: СпецЛит, 2010. – 95 с.
- 18.Короткова, Н.Л. Оперативное лечение больных с последствиями ожогов лица / Н.Л. Короткова, Г.И. Дмитриев// Вопросы травматологии и ортопедии . – 2011. – №1– С. 22- 25
- 19.Кручинина, А. Д. Влияние подкожной имплантации говяжьего ксеноперикарда на активность феррооксидазы и перекись разрушающих ферментов сыворотки крови крыс / А. Д. Кручинина, С. С. Гамзин, М. Т. Генгин // Известия ПГПУ им. В.Г. Белинского. – 2012. – № 29. – С. 29-32.
- 20.Лакин, Г. Ф. Биометрия: учебное пособие для вузов / Г. Ф. Лакин. – М.: Высшая школа, 1990. – 312 с.
- 21.Новицкий, В.В. Введение в методы культуры клеток, биоинженерия органов и тканей / В.В. Новицкий [и др.] – Томск, 2004. – 385 с.
- 22.Овечкин, А. М. Хирургический стресс–ответ, его патофизиологическая значимость и способы модуляции / А. М. Овечкин // Регионарная анестезия и лечение острой боли. – 2008. – Т.2. – № 2. – С.49-62.
- 23.Пальцев, М.А. Межклеточные взаимодействия / М.А. Пальцев, А.А. Иванов, С.Е. Северин. 2–е изд. – М.: Медицина, 2003. – 288 с.
- 24.Пшенникова, М.Г. Феномен стресса. Эмоциональный стресс и его роль в патологии / М.Г. Пшенникова // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2000.– №5.– С. 26–31.
- 25.Рябов, Г.А. Синдромы критических состояний / Г.А. Рябов. – М.: «Медицина», 1994.– 368 с.

- 26.Саркисов, Д.С. Общая патология человека / Д.С. Саркисов, М.А Пальцев, Н.К Хитров.– М.: Медицина, 1995. – 272 с.
- 27.Севастьянов, В. И. Биосовместимые материалы/ В. И Севастьянов, М. Т. Кирпичникова. – М.: «МИА», 2011. – 544 с.
- 28.Севастьянов, В. И. Методы исследования физико-химических и биологических свойств медицинских изделий / В. И. Севастьянов, С. Л. Василец, Н. В. Перова // В кн.: Биосовместимые материалы / В. И. Севастьянова. – М.: МИА, 2011. – С. 50-75.
- 29.Севастьянов, В.И. Биоматериалы, системы доставки лекарственных веществ и биоинженерия / В.И. Севастьянов // Вестн. трансплантологии и искусственных органов . – 2009. –Т. 9, №3. – С. 69-80.
- 30.Сурков, Н.А. Изучение особенностей тканевых реакций в зоне имплантации различных видов сетчатых эндопротезов. Значение результатов экспериментальных исследований для клинической хирургии / Н.А. Сурков [и др.] // Герниология . – 2005. – №1. С. 43-47.
- 31.Фрейдлин, И.С. Система мононуклеарных фагоцитов / И.С. Фрейдлин. – М.: Медицина, 1984. – 272 с.
- 32.Хрыщанович, В.Я. Ксеногенная клеточная терапия: современное состояние проблемы и перспективы свиной клеточной трансплантации / В.Я. Хрыщанович, С.И. Третьяк, А.А. Глинник // Журнал гродненского государственного медицинского университета. –2012. –Т.1. – №37 – С. 14-23.
- 33.Шангина, О.Р. Радиационная устойчивость биологических структур / О.Р Шангина // Морфология. Научно-теоретический медицинский журнал. - Санкт-Петербург. –2002. –Т.12. – № 1– С.176-177.

34. Шишацкая, Е.И. Биотехнология полигидроксиалканоатов : научные основы медико-биологического применения : диссертация ... доктора биологических наук / Е.И. Шишацкая. – Красноярск, 2009. – 259 с.
35. Шумаков, В.И. Биополимерные матриксы для искусственных органов и тканей / В.И. Шумаков, В.И. Севастьянов // Здоровоохранение и медицинская техника. – 2003 . – №4. – С. 30-33
36. Abraham, G.A. Evaluation of the porcine intestinal collagen layer as a biomaterial / G.A. Abraham, J. Murray, K. Billiar, S.J. Sullivan // J Biomed Mater Res. – 2000. – N. 51. – P. 442-452.
37. Aiken, S.W. Small intestinal submucosa as an intra-articular ligamentous graft material: a pilot study in dogs / S.W. Aiken, S.F. Badylak, J.P. Toombs, K.D. Shelbourne, M.C. Hiles, G.C. Lantz & D. Van Sickle // Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology. – 1994. – N.7. – P. 124-128.
38. Alpert, S.A. Bladder neck fistula after the complete primary repair of exstrophy: a multi-institutional experience / S.A. Alpert, E.Y. Cheng, W.E. Kaplan, W.T. Snodgrass, D.T. Wilcox, B.P. Kropp // J Urol. – 2005. – Vol.174, N. 4. – P. 1687-1690 [discussion 1689-90].
39. Badylak S.F. Small intestinal submucosa as a large diameter vascular graft in the dog / S.F. Badylak, G.C. Lantz, A. Coffey & L.A. Geddes // Journal of Surgical Research. – 1989. – N. 47. – P. 74-80.
40. Badylak, S. F. The extracellular matrix as a biologic scaffold material / S. F. Badylak // Biomaterials. – 2007. – N.28. – P. 3587-3593.
41. Badylak, S. Morphologic study of small intestinal submucosa as a body wall repair device / S. Badylak, K. Kokini, B. Tullius, A. Simmons-Byrd, R. Morff // J. Surg Res. – 2002, N.103. – P.190-202.
42. Badylak, S. Resorbable bioscaffold for esophageal repair in a dog model / S. Badylak, S. Meurling, M. Chen, A. Spievack, A. Simmons-Byrd // J Pediatr Surg. – 2000. – Vol. 35, N.7. – P. 1097-1103.

43. Badylak, S.F. Extracellular matrix as a biological scaffold material: structure and function/ S.F. Badylak, D.O. Freytes, T.W. Gilbert // *Acta Biomaterialia*. – 2009. – Vol. 5, N. 1. – P. 1-13.
44. Badylak, S.F. The use of xenogeneic small intestinal submucosa as a biomaterial for Achilles tendon repair in a dog model / Badylak, S.F. et al. // *J. Biomed Mater Res*. – 1995. – Vol. 29, N. 8. – P. 977-985.
45. Barnett, R.N. Performance of “Kits” Used for Clinical Chemical Analysis of Calcium in Serum / R.N. Barnett // *Amer. J. Clin. Path.* – 1973. – Vol. 59, N. 6. – P. 836-845
46. Bessey, O. A. A method for the rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic milliliters of serum / O. A. Bessey, O. H. Lowry, M. J. Brock // *J. biol. Chem.* – 1941. – Vol. 164. – P. 321-329.
47. Brown, B. The basement membrane component of biologic scaffolds derived from extracellular matrix / B. Brown, K. Lindberg, J. Reing, D.B. Stolz, S.F. Badylak // *Tissue Eng.* – 2006. – Vol. 12, N. 3. – P. 519-526.
48. Bussieres, M. The use of porcine small intestinal submucosa for the repair of full-thickness corneal defects in dogs, cats and horses / M. Bussieres, S.G. Krohne, J. Stiles & W.M. Townsend // *Veterinary Ophthalmology*. – 2004. – Vol. 7. – P. 352-359.
49. Christiansen, J.J. Effects of Cortisol on Carbohydrate, Lipid, and Protein Metabolism: Studies of Acute Cortisol Withdrawal in Adrenocortical Failure / J.J. Christiansen, C.B. Djurhuus, C.H. Gravholt, P. Iversen, J.S. Christiansen, O. Schmitz, J. Weeke, J.O. Jorgensen, N. Moller // *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. – 2007. – Vol. 92, N. 9. – P. 3553-3559.
50. Clarke, K.M. Intestine submucosa and polypropylene mesh for abdominal wall repair in dogs / K.M. Clarke, G.C. Lantz, S.K. Salisbury, S.F. Badylak, M.C. Hiles, S.L. Voytik // *J. Surg Res*. – 1996. – Vol. 60. – P. 107-114.

51. De Long, W.G. Bone grafts and bone graft substitutes in orthopaedic trauma surgery / W.G. De Long, T.A. Einhorn, K. Koval, et al . // J. Bone Joint Surg Am. – 2007. – Vol. 89. – P. 649-658.
52. DeJardin, L.M. Use of small intestinal submucosal implants for regeneration of large fascial defects: an experimental study in dogs / L.M. DeJardin, S.P. Arnoczky, R.B. Clarke // J. Biomed Mater. Res. – 1999. – Vol. 46, N.2. – P. 203-211.
53. Desborough, J.P. The stress response to trauma and surgery /J.P. Desborough // Br. J. Anaesth. –2000. – Vol.85, N.1. – P.109-117.
54. Dumas, B. T. Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromocresol green/ B. T. Dumas // Clin. Chim. Acta. – 1971. – Vol. 31. – P.87.
55. Fawcett, J.K. A rapid and precise method for the determination of urea / J.K. Fawcett, J.E. Scott // J. Clinical Pathology. – 1960. – Vol.13. – P. 156-159.
56. Fishbach, F. A manual of laboratory diagnostic tests / F. Fishbach, M. Dunning // Lippincott Williams & Wilkins. – 2004. –P. 1291.
57. Fishbein, M.C. Calcifications of cardiac valve bioprostheses. Biochemical, histologic, and ultrastructural observations in a subcutaneous implantation model system / M.C. Fishbein, R.J. Levy, V.J. Ferrans, L.C. Dearden, A. Nashef, A.P Goodman, A. Carpentier // J. Thorac Cardiovasc Surg. – 1982. – Vol. 83, N.4. – P. 602-609.
58. Fried, R. A new, highly sensitive method for the determination of chloride in body fluids without protein precipitation / R. Fried // Clin. Chem. Clin. Biochem. – 1972. – Vol. 10. – P. 280.
59. Gilbert, T.W. Degradation and remodeling of small intestinal submucosa in canine achilles tendon repair / T.W. Gilbert, A.M. Stewart-Akers, A.Simmons-Byrd, S.F. Badylak // JBJS. – 2007. – Vol.89, N.3. – P. 621-30.

60. Gilbert, T.W. Decellularization of tissues and organs / T.W. Gilbert, T.L. Sellaro, S.F. Badylak // *Biomaterials*. – 2006. – Vol.27, N.19. – P. 3675-3683.
61. Guder, W. Normalbereiche Rlin. Chem. 1982: Weissman N., Pilegg V. J., *Clinical Chemistry – Principle and Technics*. – 1974. – P. 642 - 643
62. Henry, R. J. *Clinical Chemistry, Principles and Techniques*, 2nd Edition / R. J. Henry// Harper and Row, 1974. –P. 525.
63. Hillmann, G. Rapid determination of serum potassium by turbidity measurement with kalignost after protein precipitation / G. Hillmann, G. Beyer // *J. Clin .Chem. and Clin. Biochem*. – 1967.– Vol.5. – P.93-94 .
64. Hodde, J.P. Glycosaminoglycan content of small intestinal submucosa: a bioscaffold for tissue replacement / J.P. Hodde, S.F. Badylak, A.O. Brightman, S.L. Voytik-Harbin // *Tissue Eng* .– 1996. – Vol.2, N.3. – 209-217.
65. Kotani, G. The relationship of IL-6 to hormonal mediators, fuel utilization, and systemic hypermetabolism after surgical trauma / G. Kotani, M. Usami, Y. Saitoh // *Kobe J. Med. Sci*. – 1996. – Vol.42, N.3. – P.187-205.
66. Kropp, B.P. Regenerative urinary bladder augmentation using small intestinal submucosa: urodynamic and histopathologic assessment in long-term canine bladder augmentations / B.P. Kropp, M.K. Rippy, S.F. Badylak, M.C. Adams, M.A. Keating, R.C. Rink // *J. Urol*. – 1996. – Vol. 155. – P. 2098-2104.
67. Kundrotas, L.W. Serum alanine aminotransferase (ALT) elevation in asymptomatic US AiForce basic trainee blood donors / L.W. Kundrotas, D.J. Clement // *Dig. Dis. Sci*. – 1993. – Vol.38. – P. 2145-2150.
68. Li, F. Low-molecularweight peptides derived from extracellular matrix as chemoattractants for primary endothelial cells / F. Li, W. Li, S.A.

- Johnson, D.A. Ingram, M.C. Yoder // *Endothelium*. – 2004. – Vol.11. – P. 199-206.
- 69.Lobo, D. N. Fluid, electrolytes and nutrition: physiological and clinical aspects / D. N. Lobo // *Proceedings of the Nutrition Society*. – 2004. – Vol. 63, N.3. –P. 453-466.
- 70.Lovekamp, J.J. Stability and function of glycosaminoglycans in porcine bioprosthetic heart valves / J.J. Lovekamp, D.T. Simionescu, J.J. Mercuri, B. Zubiarte, M.S. Sacks, N.R. Vyavahare // *Biomaterials*. – 2006. – Vol.27, N.8. – P. 1507-1518.
- 71.McCowen, K.C. Stress-induced Hyperglycemia / K.C. McCowen, A. Malhotra, B.R. Bistrian // *Critical Care Clinics*. 2001. – Vol. 17, N.1. – P. 15- 27.
- 72.McDevitt, C.A.Transforming growth factor-beta1 in a sterilized tissue derived from the pig small intestine submucosa / C.A. McDevitt, G.M. Wildey, R.M. Cutrone // *J. Biomed Mater. Res*. – 2003. –Vol. 67A, N.2.- P.637-640.
73. McGuinness, O. P. Role of epinephrine and norepinephrine in the metabolic response to stress hormone infusion in the conscious dog / O. P. McGuinness, V. Shau , E. M. Benson // *American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism*. – 1997. – Vol.273, N.4. – P. E674 -E681.
- 74.Mounzer, A.M. Polyglycolic acid mesh in repair of renal injury / A.M. Mounzer, J.W. McAninch, R.A. Schmidt // *Urology*. – 1986. – Vol. 28. – P. 127-130.
- 75.O'Connor, R.C. Novel modification of partial nephrectomy technique using porcine small intestine submucosa / R.C. O'Connor, J.N. Harding, G.D. Steinberg // *Urology*. – 2002. – Vol.60. – P. 906-909.
- 76.Popper ,Y. Determination of creatinine in blood / H. Popper, E. Mandel, H Mayer // *Biochem. Z*. – 1937. – Vol. 291. – P. 354-367.

77. Pu, L.L. Small intestinal submucosa (Surgisis) as a bioactive prosthetic material for repair of abdominal wall fascial defect / L.L. Pu // *Plast Reconstr Surg* . – 2005. – Vol.115, N.7. – P. 2127-2131.
78. Reitman, S. A. Colorimetric Method for the Determination of Serum Glutamic Oxalacetic and Glutamic Pyruvic Transaminases / S. Reitman, S. Frankel // *Amer. J. Clin. Pathol.* – 1957. – Vol.28. – P. 56-63.
79. Rosenberg, N. Tanned collagen arterial prosthesis of bovine carotid origin in man / N. Rosenberg, A. Martinez, P. Sawyer N. et al. // *Ann. Surg.* – 1966. – Vol. 164, N 2. – P. 247-256.
80. Salamon, A. Development of collagenous fibres in autologous and preserved homologous tendon grafts / A. Salamon, J. Hamori // *Acta Morphol. Acad. Sci. Hung.* – 1976. – Vol. 24, N. 1-2. – P. 11-22.
81. Schmidt, C. E. Acellular vascular tissues: natural biomaterials for tissue repair and tissue engineering / C. E. Schmidt, J. M. Baier // *Biomaterials*. – 2000. – Vol. 21, N. 22. – P. 2215-2231.
82. Schoen, F.J. Calcification of tissue heart valve substitutes: progress toward understanding and prevention / F.J. Schoen, R.J. Levy // *Ann Thorac Surg* . – 2005. – Vol.79, N.3. – P. 1072-1080.
83. Schricker, T. Influence of vaginal versus abdominal hysterectomy on perioperative glucose metabolism / T. Schricker, A. Berroth , U. Pfeiffer// *Anesthesia & Analgesia*. – 1996. – Vol.83, N. 5. – P. 991- 995.
84. Schricker, T. Strategies to attenuate the catabolic response to surgery and improve perioperative outcomes / T. Schricker, R. Lattermann // *Canadian Journal of Anesthesia*. – 2007. – Vol.54, N.6. –P. 414-419.
85. Svedjeholm, R. Dopamine and high-dose insulin infusion (glucose-insulin-potassium) after a cardiac operation: effects on myocardial metabolism/ R. Svedjeholm, S. Hallhagen, R. Ekroth, P.O. Joachimsson, G. Ronquist // *Ann. Thorac. Surg.* – 1991. – Vol.51. – P. 262-270.

- 86.Szasz, G. New substrates for measuring gamma-glutamyl transpeptidase activity / G. Szasz, J. P. Persijn, et al. // Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.-1974. – Vol. 12. – P. 228.
- 87.Tian, X.H. Effect of small intestinal submucosa on islet recovery and function in vitro culture / X.H. Tian, W.J. Xue, X.L. Pang, Y. Teng, P.X. Tian, X.S. Feng // Hepatobiliary Pancreat Dis. Int . – 2005. – Vol.4, N. 4.-P.524-529.
- 88.Trinder, P. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor / P. Trinder // Ann. clin. Biochem. –1969. –Vol. 6. –P. 24-27.
- 89.Valentin, J.E. Extracellular matrix bioscaffolds for orthopaedic applications: a comparative histologic study/ J.E. Valentin, J.S. Badylak, G.P.McCabe, S.F. Badylak //J Bone Joint Surg Am 2006. –Vol.88, N.12. –P. 2673-2686.
- 90.Van den Berg ,W.B. Role of growth factors and cartilage repair / W.B. van den Berg, P.M. van der Kraan, H.M. van Beuningen // Osteoarthritis. Clinical and experimental aspects. Springer. – 1999. – P. 188-209.
- 91.Weichselbaum, T.E. An accurate and rapid method for the determination of proteins in small amounts of blood serum and plasma / T.E. Weichselbaum // Am. J. Clin. Pathol. – 1946. – Vol.7. – P.40.
- 92.White, P. F. The role of the anesthesiologist in fast-track surgery: from multimodal analgesia to perioperative medical care / P. F. White, H. Kehlet , J. M. Neal // Anesthesia & Analgesia. – 2007. – Vol. 104, N. 6.-P. 1380-1396.
- 93.Yoo, K. Y. Anesthetic requirements and stress hormone responses in spinal cord-injured patients undergoing surgery below the level of injury / K. Y. Yoo, J. H. Hwang , S. T. Jeong // Anesthesia & Analgesia. – 2006. – Vol.102, N. 4. –P. 1223-1228.

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

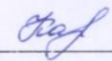
ПЕНЗЕНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

Факультет
физико-математических
и естественных наук

Кафедра
«Общая биология и биохимия»

Направление подготовки
06.04.01 Биология
Магистерская программа
«Биохимия и молекулярная биология»

Утверждаю:
Зав. кафедрой

 Г.А. Карпова

« 10 » 11 2015 г.

Задание

По ВКР студента Байкач Анны Сергеевны

Тема работы: «Оценка общего токсического действия материала на основе
модифицированной подслизистой тонкой кишки свиньи».

Утверждена приказом по Университету от « 30 » октября 2015 г. № 1168/0

Срок сдачи студентом законченной работы « 22 » мая 2017 г.

КАЛЕНДАРНЫЙ ПЛАН ВКР

№ п/п	Перечень подлежащих разработке вопросов:	Сроки выполнения этапов	Примечания
1	Написание главы: "Материалы, используемые в трансплантологии. Преимущества ксеноматериалов"	декабрь 2015 – январь 2016	Выполнено
2	Написание главы: "Требования, предъявляемые к имплантируемым материалам"	январь – февраль 2016	Выполнено
3	Написание главы: "Бесклеточный коллагеновый матрикс на основе подслизистой тонкой кишки свиньи"	февраль – март 2016	Выполнено
4	Подготовка имплантируемого материала, проведение имплантации бесклеточного матрикса белым беспородным самцам крыс. Забор сыворотки крови и образцов ткани для определения биохимических параметров и гистологического исследования	март – апрель 2016	Выполнено
5	Определение биохимических параметров сыворотки крови крыс интактной, контрольной опытных групп, проведение гистологического исследования	апрель – май 2016	Выполнено
6	Оформление и обработка экспериментальных данных	май – ноябрь 2016	Выполнено
7	Написание Главы 2. Материалы и методы исследования	ноябрь – декабрь 2016	Выполнено
8	Написание Главы 3. Результаты и их обсуждение	декабрь 2016 – февраль 2017	Выполнено
9	Оформление ВКР и представление в комиссию для защиты	февраль – май 2017	Выполнено

Дата выдачи задания «10» ноября 2015 г.Руководитель Задание принял к исполнению 