

ПЕРЕВОЗЧИКОВ

Петр Арсентьевич

**МЕДИКО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ И МЕТОДОЛОГИЧЕСКИЕ
АСПЕКТЫ ИЗУЧЕНИЯ РЕГЕНЕРАТИВНЫХ ПРОЦЕССОВ
В СКЛЕРЕ ПРИ ИМПЛАНТАЦИИ НАНОДИСПЕРСНОЙ ПЛАЦЕНТЫ
В ЭКСПЕРИМЕНТЕ**

14.01.07 – глазные болезни

03.03.04 – клеточная биология, гистология и цитология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

доктора медицинских наук

Москва - 2019

Работа выполнена в ФГБОУ ВО «Ижевская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научные консультанты: БОРЗЕНОК Сергей Анатольевич
доктор медицинских наук, академик РАЕН,
руководитель Центра фундаментальной
офтальмологии ФГАУ «НМИЦ «МНТК
«Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Фёдорова»
Минздрава России

ВАСИЛЬЕВ Юрий Геннадьевич
доктор медицинских наук, профессор, заведующий
кафедрой анатомии и физиологии и зоогигиены
ФГБОУ ВО «Ижевская ГСХА»

Официальные оппоненты: СИДОРЕНКО Евгений Иванович
член-корреспондент РАМН, доктор медицинских
наук, профессор, заведующий кафедрой
офтальмологии педиатрического факультета
ФГБОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова»
Минздрава России

МИЛЮДИН Евгений Сергеевич
доктор медицинских наук, заведующий
отделением ГБУЗ «СОКОБ им. Т.И.
Ерошевского»

МИХАЙЛОВА Наталья Аркадьевна
доктор биологических наук, заведующая Центром
клеточных технологий Института цитологии РАН

Ведущая организация: Государственное бюджетное учреждение «Уфимский
научно-исследовательский институт глазных
болезней Академии наук Республики Башкортостан»

Защита состоится «___» _____ 2019 года в _____ часов на заседании
диссертационного совета Д 208.014.01 при Федеральном государственном
автономном учреждении «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» имени
академика С.Н. Фёдорова» Минздрава России по адресу: г. Москва,
Бескудниковский бульвар, д. 59а.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГАУ «НМИЦ «МНТК
«Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Фёдорова» Минздрава России

Автореферат разослан _____

Ученый секретарь
диссертационного совета, доктор медицинских наук

И.А. Мушкова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Совершенствование технологий, направленных на лечение дегенеративно-дистрофических заболеваний фиброзной оболочки глазного яблока, имеет не только большое научное, но и медицинское значение в виду высокой частоты данных нарушений и отсутствия тенденции к их снижению (Борзенко С.А. с соавт., 2007, 2011; Либман Е.С., Шахова Е.В., 2006; Либман Е.С., 2010; McBrien N., Gentle A., 2003; Rada J. et al., 2006). Эктазии и стафиломы склеры, формирующиеся на рубцово-измененных и истонченных её участках в результате предшествующих травм или воспалительного процесса (Астафьев И.В. с соавт., 2017), а также задняя стафилома склеры при миопии высокой степени, приводящая к изменениям глазного дна, занимают одно из ведущих мест среди инвалидности по зрению лиц трудоспособного возраста (Кожевникова Т.М. с соавт., 2016; Либман Е.С., Рязанов Д.П., 2014; Рыкова А.Н. с соавт., 2008; Iwase A. et al., 2006; Zhang Z. et al., 2013). Рост больных миопией и её прогрессирование, связанное с развитием дегенеративно-дистрофического состояния склеры, а также наследственная предрасположенность, обуславливает социальную значимость проблемы и требует поиска более эффективных методов её лечения (Holden V.A. et al., 2016; McFadden S.A., 2016).

При истончении склеры и её выпячиваниях применяют различные склероукрепляющие операции, в основе которых заложен принцип бандажирующей методики. Используемые при этом макроскопические биологические имплантаты, укладываемые на фиброзную оболочку глазного яблока, после своего введения постепенно подвергаются резорбции и замещаются новообразованной соединительной тканью (Ишмаматьев И.И. с соавт., 2013; Ишмаматьев И.Л. с соавт., 2010; Канюков В.Н. с соавт., 2005; Канюков В.Н., Стадников А.А., 2009; Messner K., 1999; Onișor-Gligor F. et al., 2015; Rokn A.R. et al., 2015). Однако репаративные процессы происходят только на поверхности склеры, а интрамуральная регенерация самой

фиброзной оболочки не наблюдается (Васильев Ю.Г. с соавт., 2012), так как отсутствует проникновение в неё биологического материала.

Известно, что уменьшение дисперсности имплантата не только увеличивает его взаимодействие с тканями реципиента за счёт значительного увеличения удельной поверхности, но и повышает его проникающую способность в соединительнотканые структуры, тем самым усиливая биологические эффекты в зоне имплантации (Амирбигишвилли М.М., 1985; Муслимов С.А., 2000; Нигматуллин Р.Т., 1996).

Однако грубо измельченный биологический материал с размерами частиц более 45 мкм (взвесь плаценты, полиэфир с коллагеном и др.) не проникает в толщу склеры, что приводит лишь к формированию грануляционного вала в зоне введения и разрастанию новой соединительнотканной оболочки на поверхности склеры (Галимова В.У. с соавт., 2013; Муслимов С.А., 2000; Хасанов Р.А., Шангина О.Р., 2012). При переводе размеров имплантируемого материала в нанометровый диапазон, как показали предварительные исследования, принципиально изменялась как его проникающая способность в ткани реципиента, так и его биологическая активность (Карбань О.В. с соавт., 2011).

В последние годы в мире резко возрос интерес к использованию нанодисперсных материалов в медицине и биохимии. Разработки в этой области являются приоритетными в национальных программах разных стран, в том числе в России. В настоящее время нанотехнологии используются в медицине для создания новых лекарственных препаратов или модификации используемых с целью повышения их терапевтических свойств (Болдырев В.В. с соавт., 2009; Канунникова О.М. с соавт., 2015; Карбань О.В. с соавт., 2014; Коньгин Г.Н. с соавт., 2005; Рыбин Д.С. с соавт., 2013; Boldyreva E. et al., 1999), получения нанодисперсных порошков в качестве носителей биологически активных веществ (Sapsford K.E. et al., 2008), создания имплантатов на основе наноструктурированных металлов, сплавов или керамических композитов (Валиев Р.З., Александров И.В., 2000; Кононенко

В.И. с соавт., 2012; Рерих В.В. с соавт., 2016; Фомин А.А., с соавт., 2017; Gou Z., Chang J., 2004; Rasouli R., 2018).

Создание нанодисперсных имплантатов из биологических материалов, способных глубоко проникать, вызывать регенерацию и васкуляризацию в строме подлежащих тканей, тем самым восстанавливать их трофику и функцию, является актуальной задачей, может значительно расширить возможности медицины, в том числе в комплексном лечении дегенеративно-дистрофических заболеваний фиброзной оболочки глазного яблока. При этом биоткани в нанодисперсном состоянии будут обладать такими же, как и макроимплантаты, низкими антигенными свойствами и высокой биологической совместимостью.

Отсутствие в отечественной и зарубежной литературе сведений о работах, направленных на получение и применение биологических нанодисперсных материалов в эксперименте с целью совершенствования технологии лечения дегенеративно-дистрофических заболеваний фиброзной оболочки глазного яблока, а также анализ представленных данных позволил сформулировать тему и задачи исследования.

Цель работы – разработка технологии изготовления биоимплантата на основе фрагмента пуповины и нанодисперсной плаценты и изучение закономерностей регенеративных процессов при имплантации изделия в эксперименте для усиления прочностных свойств склеры при её заболеваниях.

Задачи исследования:

1. Разработать методику изготовления нанодисперсной плаценты методом механоактивации и изучить биофизические свойства и структуру полученной нанодисперсной плаценты.

2. Разработать технологию имплантации нанодисперсной плаценты и методику изготовления биоимплантата на основе фрагмента пуповины и нанодисперсной плаценты для экстрабульбарного введения в эксперименте.

3. Определить оптимальные способы и объёмы введения нанодисперсной плаценты в эксперименте.

4. Изучить биологические эффекты и глубину распространения нанодисперсной плаценты в тканях глаза экспериментальных животных при имплантации изделия.

5. Разработать методику оценки степени зрелости коллагенового волокна как маркера пролиферативной активности соединительной ткани на основе изучения показателя механической жёсткости коллагеновых волокон и степени организации их поперечной D-периодичности.

6. Оценить степень трофического обеспечения тканей глаза экспериментальных животных при имплантации изделия.

7. Изучить морфологические механизмы регенеративных процессов в тканях глаза экспериментальных животных при имплантации нанодисперсной плаценты.

8. Изучить биомеханические характеристики склеры экспериментальных животных при имплантации изделия.

Научная новизна:

1. Впервые разработана технология имплантации нанодисперсной плаценты в эксперименте и создан биоимплантат на основе фрагмента пуповины, содержащий нанодисперсную плаценту, для введения экстрабульбарно с целью ускорения фибробластических процессов в лечении офтальмопатологий.

2. Впервые разработан способ получения нанодисперсной плаценты путём механоактивации в шаровой планетарной мельнице для дальнейшего применения её в качестве индуктора процессов регенерации.

3. Впервые показано, что механоактивация лиофилизированной плаценты вследствие перехода в нанодисперсное состояние изменяет её биофизические свойства, усиливает гидрофильность, проникающую способность в ткани реципиента в отличие от крупнодисперсного аналога.

4. Впервые показано, что экстрабульбарное введение нанодисперсной плаценты в виде биомплантата приводит к проникновению её частиц в склеру реципиента, где индуцирует процессы коллагеногенеза и ремоделирования.

5. Впервые методом атомно-силовой микроскопии произведена оценка степени зрелости коллагенового волокна, как маркёра регенераторной активности соединительной ткани, по изучению его механической жёсткости и степени разрешённости поперечной D-периодичности.

Практическая значимость:

1. В опытах на животных разработан клинический алгоритм применения в офтальмологии нанодисперсной плаценты как в виде биоимплантата, так и в виде суспензии через иглу с минимальным диаметром 29 G, что позволяет значительно уменьшать объём введения донорского материала, снижать травматичность техники имплантации и длительно сохранять максимально выраженные биологические эффекты *in vivo*.

2. Разработанные в эксперименте технологии имплантации нанодисперсной плаценты могут послужить основой для дальнейших разработок в клинической практике новых микроинвазивных и менее травматичных методик стимуляции процессов регенерации при лечении дегенеративно-дистрофических заболеваний фиброзной оболочки глаза, а также иных изделий медицинского назначения.

3. Разработана методика измельчения биологического материала путём механоактивации в шаровой планетарной мельнице на примере лиофилизированной плаценты человека, что позволило создать на его основе биоимплантат для стимулирования фибробластических процессов в фиброзной оболочке глаза с последующим применением в лечении офтальмопатологии.

4. Разработана методика определения степени зрелости коллагенового волокна как маркёра репаративной активности соединительной ткани на основе изучения показателя механической

жёсткости коллагеновых волокон и организации их поперечной D-периодичности, что позволило применять её при исследовании соединительнотканых образований.

Апробация диссертации. Основные положения диссертации были доложены и обсуждены на следующих конференциях, симпозиумах и съездах: Российской научно-практической конференции офтальмологов с международным участием «Ижевские родники-2008» (Ижевск, 2008); XXII Российской конференции по электронной микроскопии (Черноголовка, 2008); VIII Всероссийской конференции «Физикохимия ультрадисперсных наносистем» (Белгород, 2008); II Всероссийской конференции с международным интернет участием «От наноструктур, наноматериалов, нанотехнологий к наноиндустрии» (Ижевск, 2009); IV Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых с участием иностранных специалистов «Актуальные проблемы офтальмологии» (Москва, 2009); Научно-практической конференции с международным участием «Российский общенациональный офтальмологический форум» (Москва, 2009); Втором Международном форуме по нанотехнологиям Rusnanotech-2009 (Москва, 2009); VI Всероссийском съезде анатомов, гистологов и эмбриологов (Саратов, 2009); III Российской конференции по электронной микроскопии (Черноголовка, 2010); IX Съезде офтальмологов России (Москва, 2010); IX Всероссийской конференции «Физикохимия ультрадисперсных (нано-) систем» (Ижевск, 2010); Научно-практической конференции «Актуальные вопросы офтальмологии» (Кемерово, 2010); Научно-практической конференции по офтальмохирургии с международным участием «Восток-Запад» (Уфа, 2011); IX Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Федоровские чтения-2011» (Москва, 2011); Научно-практической конференции «Организационные аспекты модернизации здравоохранения и подготовки медицинских кадров в Российской Федерации» (Ижевск, 2011); XXII Межрегиональной научно-практической конференции с международным участием «Новые технологии

микрохирургии глаза» (Оренбург, 2011); IV Всероссийской научной конференции с международным участием «Микроциркуляция в клинической практике» (Москва, 2012); Научной конференции с международным участием «Структурные преобразования органов и тканей на этапах онтогенеза в норме и при воздействии антропогенных факторов. Экология и здоровье человека. Актуальные проблемы биологии и медицины» (Астрахань, 2012); Международной конференции «Методологические аспекты сканирующей зондовой микроскопии» (Минск, 2012); Межрегиональной научно-практической конференции офтальмологов «Актуальные вопросы офтальмологии» (Оренбург, 2013); XII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Федоровские чтения-2014» (Москва, 2014); II Международного конгресса по заболеваниям органов головы и шеи (Москва, 2014); межкафедральном заседании научного медицинского общества анатомов, гистологов и эмбриологов (Ижевск, 2014); X Съезде офтальмологов России (Москва, 2015); XIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Федоровские чтения-2016» (Москва, 2016); VIII Всероссийском съезде трансплантологов (Москва, 2016); Научно-клинической конференции ФГАУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Фёдорова» Минздрава России (Москва, 2017).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 49 печатных работ, в том числе 35 статей в реферируемых отечественных (34) и зарубежных (1) журналах, рекомендуемых Высшей аттестационной комиссией Минобрнауки РФ – 24. Издана 1 монография. Новизна разработанных предложений подтверждена тремя патентами РФ на изобретение: № 2367448 от 09.01.2008 г., № 2369361 от 04.04.2008 г. и № 2446398 от 18.05.2009 г.

Структура и объём работы. Текст диссертации изложен на 316 страницах, содержит 18 таблиц, 160 рисунков. Работа состоит из введения, 6 глав, включающих обзор литературы, материалы и методы исследования,

результаты собственных исследований, содержит общее заключение, выводы и практические рекомендации. Список литературы состоит из 470 источников, включающих 271 отечественную и 199 иностранных публикаций.

Все исследования проводились в 2008-2018 годах на базе кафедры офтальмологии ФГБОУ ВО «Ижевская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации (г. Ижевск) и отделения заготовки и консервации трупных тканей «Биопласт» БУЗ УР «Республиканская офтальмологическая клиническая больница МЗ УР» (г. Ижевск), под руководством руководителя кафедры ФГБОУ ВО «ИГМА» Минздрава России, главного врача БУЗ УР «РОКБ МЗ УР» д.м.н., профессора В.В. Жарова при постоянном консультировании руководителя Центра фундаментальных и прикладных медико-биологических проблем (ЦМБП) ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Фёдорова» Минздрава России (г. Москва) д.м.н. С.А. Борзенка.

Иммуногистохимические исследования проводились на базе кафедры гистологии, эмбриологии и цитологии ФГБОУ ВО «ИГМА» Минздрава России (г. Ижевск) под руководством д.м.н., профессора Ю.Г. Васильева.

Физико-химические исследования проводились на базе ФГБУ науки «Физико-технический институт Уральского отделения РАН» (г. Ижевск) под руководством старшего научного сотрудника д.ф.-м.н. О.В. Карбань.

Положения, выносимые на защиту:

1. Нанодисперсная плацента, обладая высокой проникающей способностью при её имплантации в соединительнотканые структуры глаза реципиента разработанным способом в виде биоимплантата экстрабульбарно, либо в виде вводимой инъекционно суспензии, стимулирует регенеративные фибропластические процессы в интактной склере, играя при этом роль индуктора.

2. При стимуляции коллагеногенеза в склере нанодисперсная плацента значительно улучшает её прочностно-упругие характеристики.

3. При стимуляции регенерации тканей нанодисперсная плацента усиливает степень трофического обеспечения соединительной ткани за счет активации функции эндотелиобластов.

4. Предложенный способ механоактивации плаценты позволяет получать ультрадисперсный порошок с размерами зёрен 40-100 нм, что вследствие уменьшения размерности изменяет её биофизические свойства (гидрофильность, проникающую способность) в сторону повышения и усиления биологической активности при введении экстрабульбарно.

СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ

Материалы и методы экспериментальных исследований

Экспериментальные исследования проведены на 72 половозрелых кроликах (144 глаза) породы шиншилла в возрасте от 1 года до двух лет обоего пола с массой тела от 3,0 до 3,5 кг, а также 184 беспородных белых крысах (368 глаз) массой тела от 200 до 350 гр. Все работы проведены с соблюдением «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных». Все манипуляции с животными проводились в состоянии медикаментозного сна (кролики – Sol. Thiopental natrium 30 мг/кг внутримышечно, Sol. Zoletil 0,15 мл внутримышечно, местно Sol. Alcaini 0,5%). Кроликов выводили из эксперимента методом воздушной эмболии, крыс – методом декапитации.

Экспериментальное исследование представляло собой два этапа исследований (предварительного и основного), состоящего из пяти серий экспериментов и соответствовало восьми поставленным задачам:

- две предварительные серии,
- три основные серии.

Целью **предварительного этапа исследования** явилась разработка как методики получения нанодисперсной плаценты (НП), с последующей оценкой её структуры и биофизических свойств, так и технологии её имплантации.

Забранная стандартизовано плацента при рождении доношенного ребенка в условиях отделения заготовки и консервации трупных тканей «Биопласт» БУЗ УР «РОКБ МЗ УР» (г. Ижевск) после предварительной обработки и отмывки от компонентов крови подвергалась лиофилизации в установке для сублимационной сушки LZ-9.2 (Чехия). В дальнейшем лиофилизированную плаценту человека измельчали механически до консистенции порошка крупнодисперсной структуры (размеры частиц в диаметре более 45 мкм) в устройстве, сконструированном по типу кофемолки. Затем порошок крупнодисперсной плаценты измельчался повторно методом механоактивации в шаровой планетарной мельнице «Pulverezette 7» (Fritsch, Германия) при температуре не более 60 °С и величине подведенной удельной энергии менее 15 кДж/г в течение 60 минут (отдел физики и химии наноматериалов в ФГБУ ФТИ УрО РАН, г. Ижевск). Время измельчения определено экспериментальным путём.

Полученная нанодисперсная плацента изучалась физико-химическими методами атомной эмиссионной спектроскопии на предмет её химического состава на приборе Spectroflame Modula (Spectra Analytical Instruments, Германия). Структурное её состояние изучалось структурно-фазовым анализом на дифрактометре ДРОН-3 (Россия). Рельеф поверхности НП в нанометровом диапазоне исследовали атомно-силовой микроскопией (АСМ) в полуконтактном режиме на воздухе на сканирующей зондовой лаборатории ИНТЕГРА Прима (НТ-МДТ, Россия).

Для последующей имплантации НП приготавливали суспензию методом растворения порошка НП в физиологическом растворе для введения через иглу не менее 29 G, а также изготавливали биоимплантат, представляющий собой фрагмент сосуда пуповины (вены), который заполняли порошком НП. Концы биоимплантата завязывали биологической нитью. Консервировали

биоимплантат в 0,2% спиртовом растворе тимола, содержащего хлорид лития.

I предварительная серия (24 крысы, 48 глаз) – изучение реакции тканей глаза на имплантацию вышеописанных изделий (2 равные группы). *Первая опытная группа* (n = 12) – разрез конъюнктивы глаза животного в верхне-наружном квадранте в 2 мм от лимба, введение под конъюнктиву на склеру биоимплантата, заполненного НП. *Вторая опытная группа* (n = 12) – аналогичный разрез конъюнктивы глаза животного, имплантация биоимплантата с содержанием нанодисперсного титана. Наноструктурированный титан, являющийся одним из металлов, официально разрешённых для применения в медицинской практике, применяли с целью оценки реакции глаза на материал небиологического происхождения. При этом морфологические исследования тканей глазного яблока животных выполняли через 3, 7, 30 и 60 суток после имплантации.

Сроки экспериментального исследования определялись видовыми особенностями исследуемых животных – у крыс период, ограниченный 60 сутками, соответствует 102-104 месяцам (8,5-8,6 лет) жизни у человека (Гелашвили О.А., 2008).

Энуклеированные глазные яблоки животных, а также биоимплантат фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина, затем промывали проточной водой, обезвоживали в спиртах восходящей концентрации и заливали в парафин. Парафиновые срезы окрашивали гематоксилин-эозином, изучали под микроскопом Leica DM 2500 (Leica, Германия) с камерой DFC 450 при x50, x100, x200, x400-кратном увеличении с последующим фотографированием. Срезы также подвергали химической депарафинизации и в полуконтактном режиме на воздухе изучали на сканирующей зондовой лаборатории ИНТЕГРА Прима (НТ-МДТ, Россия).

II предварительная серия (80 крыс, 160 глаз) – определение объёма введения НП в виде суспензии инъекционно через иглу 29 G.

Введение суспензии производилось в верхне-наружном квадранте глазного яблока под конъюнктиву с помощью иглы диаметром 0,35 мм (29

G). Животных разделили на 4 группы. В *первой опытной группе* ($n = 20$) вводили суспензию нанодисперсной плаценты под конъюнктиву глазного яблока животного из расчёта 5 мг сухого вещества, разведенного в $0,08 \pm 0,01$ мл физиологического раствора (0,9 % раствор натрия хлорида). Во *второй опытной группе* ($n = 20$) произведено введение суспензии нанодисперсной плаценты из расчёта 15 мг сухого вещества. В *третьей опытной группе* ($n = 20$) произведено введение суспензии нанодисперсной плаценты из расчёта 25 мг сухого вещества. В *четвёртой группе* животных (*контроль*, $n = 20$) под конъюнктиву вводили физиологический раствор в равном объёме, как и животным опытных групп. Морфологические исследования произведены через 3, 7, 14 и 30 суток после манипуляций.

Парафиновые срезы окрашивали гематоксилин-эозином, изучали оптической микроскопией при $\times 50$, $\times 100$, $\times 200$, $\times 400$ -кратном увеличении с последующим фотографированием.

Целью **основного этапа исследования** явилась оценка биологических эффектов при введении НП, глубины её распространения, степени трофического обеспечения тканей и механизмов регенеративных процессов зоны имплантации, а также изучение биомеханических характеристик склеры в зоне введения НП.

I основная серия (72 кролика, 144 глаза) – сравнительная оценка биологических эффектов и глубины распространения НП в 4 равных группах. *Первая опытная группа* ($n = 18$) – разрез конъюнктивы глаза животного в верхне-наружном квадранте в 3-4 мм от лимба, введение под конъюнктиву на склеру биоимплантата на основе фрагмента сосуда пуповины, заполненного НП. *Вторая опытная группа* ($n = 18$) – аналогичный разрез конъюнктивы глаза животного, имплантация биоимплантата с крупнодисперсной плацентой (исходной, до механоактивации). *Первая контрольная группа* ($n = 18$) – введение биоимплантата, представленного фрагментом сосуда пуповины, без его предварительного наполнения. При этом использовался биоимплантат размерами $(10,0 \pm 1,0) \times (2,0 \pm 0,5)$ мм. *Вторая контрольная группа* ($n = 18$) – разрез конъюнктивы без введения биоимплантата.

Морфологические исследования тканей глазного яблока животных выполняли через 3, 7, 14, 30, 60 и 90 суток после имплантации.

У кроликов исследовалась реакция на имплантат в течение 90 суток, что приблизительно соответствует 10 годам жизни человека (URL: <http://www.threelittleladiesrabbitry.com/rabbityears.php/> дата обращения 07.10.2016). Таким образом, полученные результаты позволяют судить о возможных отдаленных реакциях тканей реципиента на введение биоимплантата.

Энуклеированные глазные яблоки животных также фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина. Парафиновые срезы изучались общегистологическими методами и сканирующей зондовой лабораторией ИНТЕГРА Прима (НТ-МДТ, Россия). Размеры структурных фрагментов изучаемых материалов были оценены по анализу АСМ-изображений с помощью программы Image Analysis 3 (НТ-МДТ, Россия).

Для изучения глубины проникновения в ткани реципиента были получены флуоресцентные спектры от НП и тканей реципиента, в частности, склеры, и оценивалось нахождение зёрен и частиц НП в тканях реципиента методом наложения спектров друг на друга при помощи конфокальной микроскопии на ИНТЕГРА Спектра (НТ-МДТ, Россия).

Оценивалось трофическое обеспечение тканей зоны имплантации, как фактора активности протекания биологических реакций, путём определения удельной длины сосудов на единицу объёма, а также подсчитывали количество сосудов в поле зрения равном $0,01 \text{ мм}^2$, диаметр сосуда и площадь сечения.

Морфометрию клеток, диаметра капилляров, площади сечения сосуда проводили с помощью компьютерной программы Scion Image for Windows.

Реакцию клеток мезенхимальной ткани изучаемой зоны исследовали иммуногистохимическим маркером – виментином.

Распределение экспериментального материала по количеству объектов и основных методов, применённых при исследовании, представлено в Таблице 1.

Таблица 1 – Методы и объём экспериментальных исследований у кроликов

Сроки	Методика исследования (количество животных)					
	Окраска гематоксилин-эозином	Окраска по Ван-Гизон	Иммуно-гистохимическое исследование (экспрессия виментин)	АСМ-исследование	Лазерная конфокальная микроскопия	Биомеханическое исследование
3 суток	12	12	—	4	—	—
7 суток	12	12	12	4	2	—
14 суток	12	12	—	—	—	—
30 суток	12	12	12	4	2	12
60 суток	12	12	—	2	—	12
90 суток	12	12	—	1	—	12
Всего	72	72	24	14	4	36

II основная серия (80 крыс, 160 глаз) – оценка механизмов регенеративных процессов зоны имплантации иммуногистохимическими методами.

Животных разделили на 4 группы по аналогии с кроликами. *Первая опытная группа* (n = 20) – имплантация биоимплантата с НП под конъюнктиву на склереу глаза крысы. *Вторая опытная группа* (n = 20) – аналогичная имплантация изделия с крупноизмельчённой плацентой. *Первая контрольная группа* (n = 20) – имплантация изделия без предварительного заполнения биологическим материалом. *Вторая контрольная группа* (n = 20) – ложнооперированные. Морфологические исследования производили через 3, 7, 30 и 60 суток после манипуляций.

Распределение экспериментального материала по количеству объектов и основных методов, применённых при исследовании, представлено в Таблице 2.

Таблица 2 – Методы и объём экспериментальных исследований у крыс

Сроки	Методика исследования (количество животных)				
	Окраска гематоксилин-эозином	Окраска по Ван-Гизон	Иммуно-гистохимическое исследование (экспрессия Ki-67)	Иммуно-гистохимическое исследование (экспрессия Caspase-3)	АСМ-исследование
3 суток	45	45	20	20	4
7 суток	45	45	20	20	—
14 суток	20	20	—	—	—
30 суток	45	45	20	20	2
60 суток	25	25	20	20	—
Всего	180	180	80	80	6

Для изучения активности репаративных процессов (митотическая и апоптотическая активность клеток соединительной ткани глаза животного) срезы окрашивали на ряд иммуногистохимических маркеров (специфический маркер митозов – Ki-67; маркер необратимого апоптоза – Caspase-3). Срезы изучали под микроскопом Leica DM 2500 с камерой DFC 450 при x50, x100, x200, x400-кратном увеличении с последующим фотографированием. При этом индекс пролиферации высчитывался как процентное отношение количества пролиферирующих клеток (Ki-67+-клетки) к общему количеству клеток соединительной ткани глаза крысы на площади 0,01 мм². Индекс апоптотической активности рассчитывался как процентное отношение количества клеток, находящихся в состоянии апоптоза, к 100 клеткам соединительной ткани глаза крысы.

III основная серия (36 кроликов, 36 глаз) – оценка биомеханических характеристик склеры экспериментальных животных при экстрабульбарном введении имплантата с нанодисперсной плацентой в сравнении с имплантатами с крупнодисперсной плацентой, отрезком сосуда пуповины и ложноперирированными животными.

Для биомеханического тестирования применялись методы исследования изолированной склеры кролика ($n = 36$). Для этого изучалась склера из каждой группы животных исследуемых в I основной серии работы, к концу 30-, 60- и 90-х суток после хирургического вмешательства.

Биомеханические испытания образцов склеральной ткани проводили в режиме однократного нагружения с целью получения таких показателей, как предел прочности (ПП) и модуля Юнга (МЮ). С помощью микрохирургического лезвия вырезали образцы склеры шириной 5 мм в меридиане введения биоимплантата экстрабульбарно. Для транспортировки фрагментов склеры в лабораторию для биомеханических испытаний использовалась среда Борзенка-Мороз для хранения роговицы.

Исследования проводили на испытательной машине Инстрон-3322 в лаборатории прочности и пластичности металлических и композиционных материалов и наноматериалов № 10 ФГБУ ИМЕТ РАН им. А.А. Байкова (г. Москва). Для работы в режиме одноосного нагружения вплоть до разрыва для образцов склеры глаза кролика устанавливали тензиометрический датчик на 20 Н. Использовали постоянную скорость нагружения 1 мм/мин. Исходя из записанной кривой на мониторе, искомые биомеханические показатели вычислялись автоматически.

После проведения биомеханических испытаний, склеральная ткань погружалась в 10% раствор нейтрального формалина. Полученные гистологические срезы изучались световой оптической микроскопией и на сканирующей зондовой лаборатории ИНТЕГРА Прима (НТ-МДТ, Россия).

Результаты собственных исследований

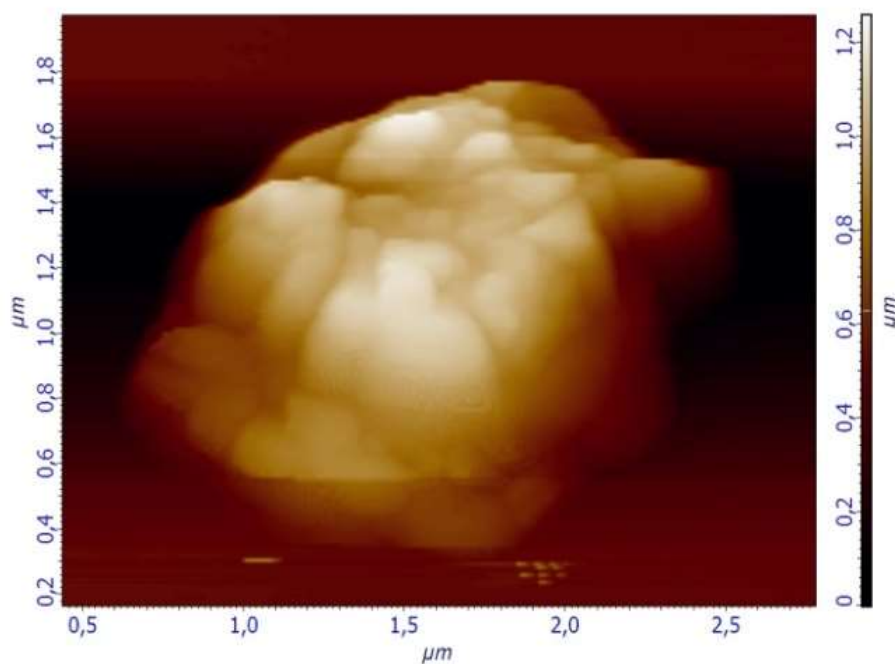
Результаты разработки методики получения нанодисперсной плаценты, оценки её структуры и физико-химических свойств.

Разработанная в настоящей работе методика получения НП отличается от известной тем, что в процессе приготовления использовались метод механоактивации в шаровой планетарной мельнице «Pulverezette 7» и

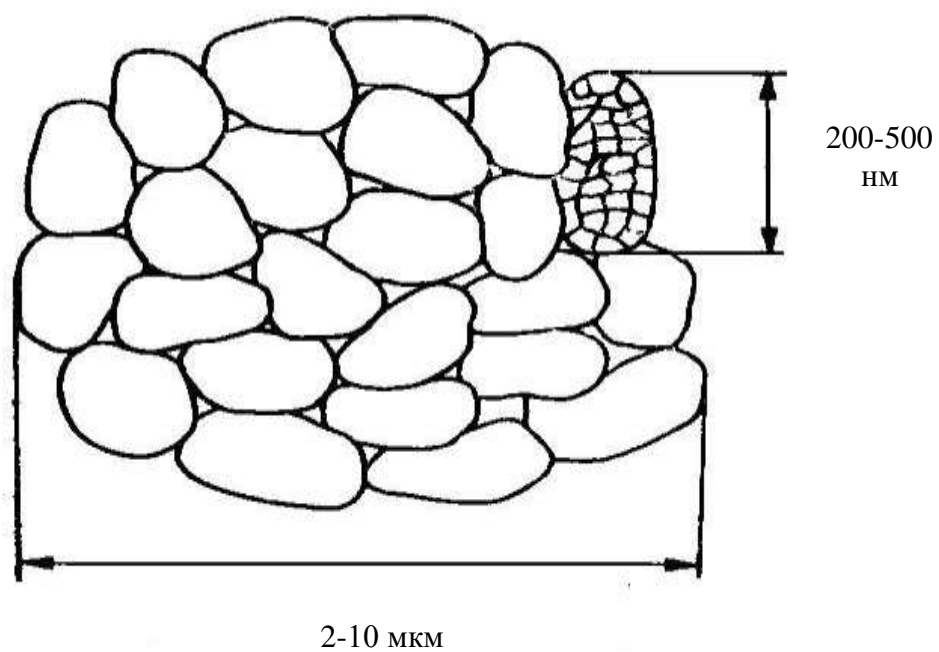
биологический материал в виде лиофильно высушенной и предварительно измельчённой в крупнодисперсный порошок плаценты, при этом получалась плацента ультрадисперсной структуры с размерами отдельных зёрен 40-100 нм (Патент РФ на изобретение № 2367448 от 09.01.2008 г.).

Экспериментальным путём для получения зёрен плаценты размерами чуть меньшими, чем размер пор в склере глаза равный 100-200 нм (Nickerson J.M. et al., 2006), определено время механоактивации в шаровой планетарной мельнице «Pulverezette 7» – 60 минут, что соответствовало подведённой механической энергии менее 15 кДж/г. При этом получали порошок НП, который состоял из отдельных частиц размером от 200 до 500 нм, сформированных зёрнами размером от 40 до 100 нм, частицы в свою очередь за счёт физической адгезии образовывали слабосвязанные агломераты размером от 2 до 10 мкм (Рисунки 1, 2).

В процессе механоактивации плаценты происходила деструкция как внутримолекулярных, так и межмолекулярных водородных связей с последующим освобождением большого количества ионов H^+ , что значительно усиливало гидрофильность НП.

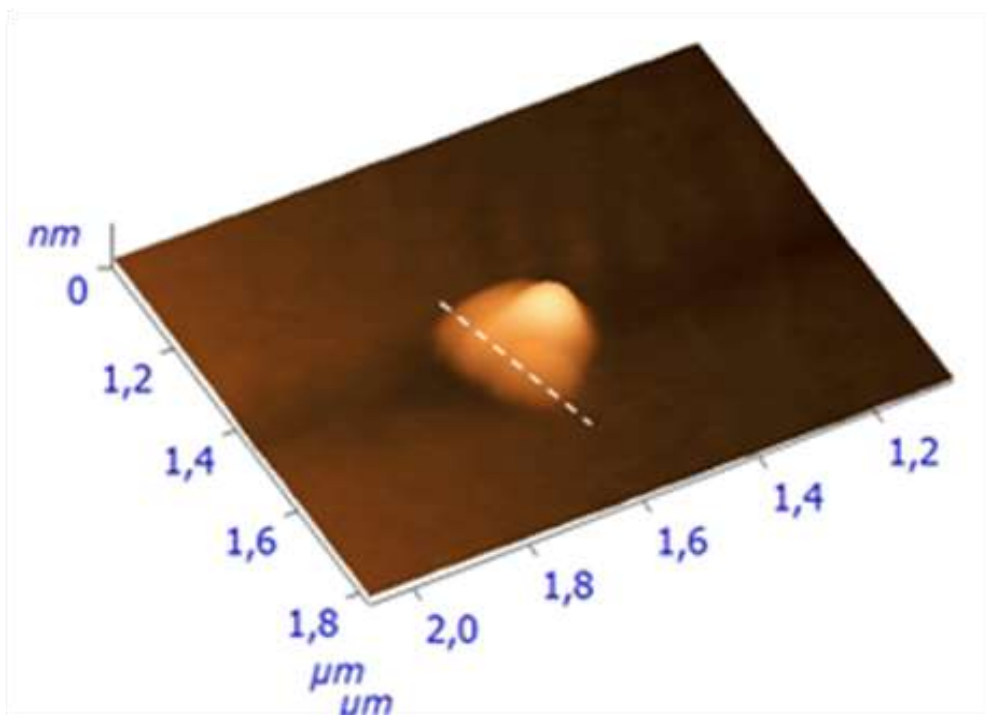


а

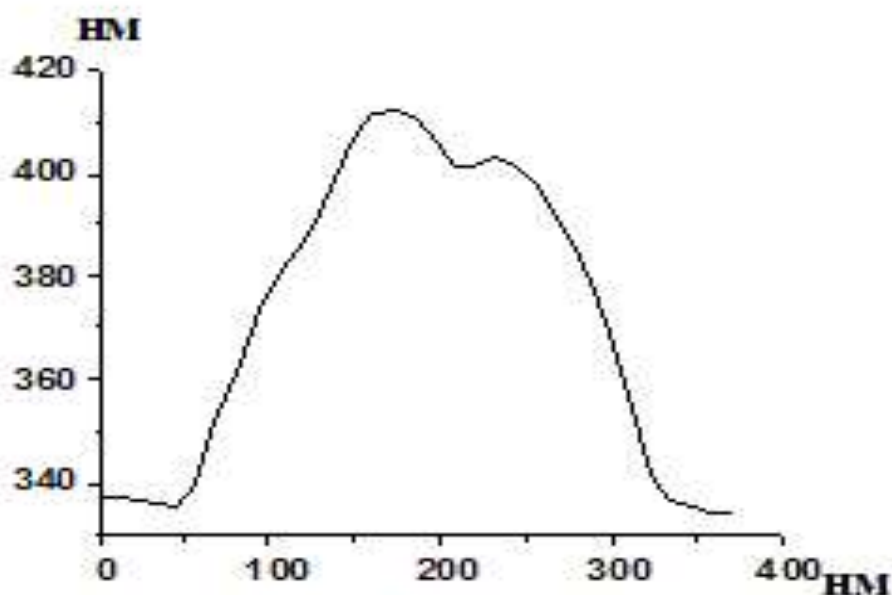


б

Рисунок 1 – Изображение агломерата нанодисперсной плаценты:
 а) метод отображения рельефа (АСМ-топография); б) схема агломерата



а



б

Рисунок 2 – Изображение зерна в частице агломерата НП с размерами от 40 до 100 нм: а) АСМ-топография; б) профиль сечения вдоль линии на Рисунке 1а

Растворимость нанодисперсной и крупнодисперсной плаценты изучалась путем растворения 1 грамма порошка в 100 мл дистиллированной воды при комнатной температуре 18-20 °С в течение 10 минут. При этом порошок крупноизмельченной плаценты равномерно распространялся по поверхности воды, наиболее же крупные и более тяжелые частицы, смоченные водой, опускались на дно стакана в виде осадка. Порошок же НП активно смешивался с дистиллированной водой, в результате чего получалась суспензия НП, которая и применялась в дальнейшей работе.

Липофильность порошка НП изучалась на рефлектометре ИРФ-454Б2М (Россия) в условиях ФГБУ ФТИ УрО РАН (г. Ижевск). При этом она практически не менялась в процессе механоактивации (коэффициенты показателя преломления крупнодисперсного и нанодисперсного порошка плаценты были равными 1,3506 и 1,3508 соответственно), что, по своей сути, не играло особой роли, так как липофильность не влияет на проникновение изучаемого вещества в склеру (Cheruvu N.P., Kompella U.V., 2006).

Таким образом, экспериментальным путем установлено, что оптимальное время получения НП с размером зерна 40-100 нм методом механоактивации составляло 60 минут, что соответствовало подведенной удельной энергии менее 15 кДж/г. При этом НП обладала повышенной растворимостью в воде, что объяснялось освобождением большого количества ионов водорода в полипептидных цепочках коллагена вследствие механоактивации и их активным взаимодействием с ионами гидроксида (ОН⁻) воды при неизменных показателях липофильности.

Результаты разработки технологии изготовления биоимплантата на основе фрагмента пуповины и нанодисперсной плаценты для эпibuльбарного введения и сравнение с небιологическим аналогом (нанодисперсным титаном). Биоимплантат представлял собой отрезок сосуда пуповины размерами $(3,0 \pm 0,5) \times (1,0 \pm 0,2)$ мм, который был заполнен в первом случае порошком НП (Патент РФ на изобретение № 2369361 от 04.04.2008 г.), во втором – нанодисперсным титаном.

В ходе проведенных экспериментальных исследований отмечено, что в ранние сроки (3-7-е сутки) послеоперационный период у крыс протекал без видимых осложнений. Наблюдалась умеренная гиперемия конъюнктивы глазного яблока животного, в единичных случаях незначительное слизистогнойное отделяемое, которые в последующие сроки исчезали.

На 3-и сутки эксперимента наблюдались умеренная клеточная инфильтрация зоны имплантации в основном клетками макрофагальной активности, выход частиц и нанодисперсного титана за пределы стенки биоимплантата вследствие её частичного лизиса, и частиц НП. При этом нанодисперсные частицы представленных веществ образовывали скопления либо диффузно распределялись в соединительнотканых структурах конъюнктивы глаза животного.

На 7-е сутки макрофагальная активность клеточного инфильтрата зоны имплантации сохранялась, при этом частицы нанодисперсного титана и НП обнаруживались как в цитоплазме макрофагов, так и в межуточном веществе соединительнотканной основы конъюнктивы глаза.

На 30-е сутки эксперимента макрофагальная активность в зоне имплантации уменьшалась, при этом обнаруживались клетки фибробластической активности. Очажки скоплений нанодисперсного титана сохранялись в соединительнотканной структуре конъюнктивы глаза крысы разрозненными участками во второй опытной группе. Наблюдались явления начальной пролиферативной активности в соединительной ткани вокруг зоны имплантации. Стенка биоимплантата полностью рассасывалась.

На 60-е сутки эксперимента в зоне имплантации преобладали клетки фибробластического ряда, при этом четко прослеживалась тенденция к формированию соединительнотканной капсулы вокруг скоплений частиц нанодисперсного титана с явлениями отграничений от здоровых соединительнотканых структур глазного яблока животного. Тогда как в группе животных с НП формирование грубой соединительнотканной капсулы не отмечено, наблюдались признаки ремоделирования соединительной ткани, с формированием дополнительных мостиков (сшивок) между коллагеновыми волокнами (КВ) в склере, подлежащей зоне имплантации, выявляемых методом атомно-силовой микроскопии.

Таким образом, введение биоимплантата с НП в соединительнотканые структуры глаза стимулирует процессы ремоделирования в них, в частности в склере. Тогда как, несмотря на официальное разрешение по применению нанотитана в медицинской практике, применение наночастиц титана в виде порошка, заключённого биоимплантат, представляется малоперспективным в качестве стимулятора регенеративной активности по причине их инкапсуляции в соединительнотканых структурах конъюнктивы глаза.

Результаты оценки регенеративной активности соединительнотканых структур глаза в зависимости от объёмов введенной нанодисперсной плаценты. Проведённый наружный осмотр показал отсутствие каких-либо местных воспалительных реакций в ответ на вмешательство у всех наблюдаемых животных.

На 3-и сутки в контрольной группе животных при введении физиологического раствора местные изменения проявлялись в виде

умеренного асептического воспаления. В первой опытной группе в зоне введения 5 мг суспензии НП лейкоцитарные реакции в окружающей конъюнктиве были более выражены по сравнению с контролем. Преобладали клетки лимфоцитарного ряда, выявлялись единичные нейтрофильные и эозинофильные гранулоциты. Наблюдалось умеренное расширение микрососудов. Во второй опытной группе при введении 15 мг у всех животных проявления воспалительного ответа были более выражены, при этом наблюдалось преобладание нейтрофильно-клеточных ответов. Существенно увеличивалась толщина конъюнктивы за счёт признаков экссудации. Возникали проявления умеренного отёка межклеточного вещества в конъюнктиве и поверхностных участках склеры, с разволокнением коллагеновых пластинок последней. Наблюдалось расширение микрососудов. В третьей опытной группе при введении 25 мг морфологические изменения были ещё более выражены, чем во второй опытной группе.

На 7-е сутки начинались процессы ранней реэпителизации раневой зоны во всех группах животных. В первой опытной группе отмечались умеренные лимфоцитарно-моноцитарные клеточные ответы. Выявлялось умеренное расширение сосудов микроциркуляторного русла. Отмечались также пролиферативно-фибробластические ответы в виде клеточных тяжей из фибробластов. У животных второй и третьей опытных групп проявления асептических экссудативно-клеточных реакций были более выражены в виде преобладания моноцитарно-макрофагических и нейтрофильно-клеточных ответов.

На 14-е сутки у животных в контрольной и первой опытной группах в конъюнктиве признаки реэпителизации продолжались. В первом опыте на фоне инфильтрации немногочисленных мононуклеаров обнаруживалось значительное число клеток фибробластического ряда с наличием фигур митозов. Отмечено увеличение числа функционирующих кровеносных микрососудов, появление эндотелиально-клеточных тяжей и эндотелиальных почек роста, указывающих на активацию репаративного ангиогенеза в

рассматриваемый срок. В поверхностных участках склеры, в зоне введения суспензии НП формировались обильные сети нежных коллагеновых волокон, указывающих на активный коллагеногенез. У животных второй и третьей опытных групп сохранялись проявления локальных асептических экссудативно-пролиферативных реакций. Имелось множество клеток моноцитарно-макрофагического и фибробластического рядов. В поверхностных участках склеры наблюдались признаки отёка с увеличением объёма аморфного компонента межклеточного вещества и разобщением пластинок коллагеновых волокон. Отмечались гипертрофированные фибробласты, что косвенно указывало на значительное повышение их функциональной активности, что подтверждалось усилением коллагенообразования, значимо превышающим аналогичные явления в контрольной и первой опытной группах. Имелось много функционирующих кровеносных капилляров.

На 30-е сутки в первой опытной группе по сравнению с контрольной толщина фиброзной оболочки глазного яблока была увеличена за счёт новообразованных коллагеновых волокон с множеством вновь сформированных сосудов, активных фибробластов. Новообразованная соединительная ткань по плотности приближалась к отдаленной от зоны имплантации. Макромолекулярная организация вновь образованных коллагеновых волокон указывала на высокую степень их морфологической зрелости. Волокнистая организация межклеточного вещества склеры приобретала упорядоченный характер. Во второй и третьей группах по сравнению с первой процесс коллагенообразования имел более диффузный и выраженный характер.

Проведённые морфометрические исследования количества делящихся клеток в поле зрения равном $0,01 \text{ мм}^2$ показывало достоверно значимое прямопропорциональное нарастание количества клеток на единицу площади от одной группы к другой по мере увеличения дозы сухого вещества НП ($p < 0,001$, U-критерий).

Таким образом, увеличение дозы вводимого в ткани реципиента сухого вещества НП прямопропорционально усиливало клеточный ответ соединительнотканной структуры конъюнктивы глаза крысы. Оптимальной в данной ситуации следует считать дозу вводимого сухого вещества НП равной 5 мг, так как достоверно значимо усиливался клеточный ответ соединительнотканых структур конъюнктивы глаза крысы, а негативного (избыточного) ответа не наблюдалось.

Результаты оценки биологических эффектов и морфологических механизмов регенеративных процессов в тканях глаза опытных животных при введении биоимплантата с нанодисперсной плацентой и определения глубины её проникновения в склеру. В ходе эксперимента отмечено, что послеоперационный период у кроликов всех четырех исследуемых групп протекал без видимых осложнений (n = 72, 144 глаза). В единичных случаях (n = 9) в первых опытных и во второй контрольной группах наблюдалось незначительное слизисто-гнойное отделяемое из конъюнктивального мешка глаза животных, особенно в ранние сроки послеоперационного периода (3-7-е сутки), которое в последующие сроки исчезало. На 3-и сутки исследования отмечалась умеренная смешанная инъеция конъюнктивы глазного яблока животного в зоне оперативного вмешательства, интенсивность которой уменьшалась в зависимости от удаленности от места введения биоимплантата. Степень инъеции значительно снижалась к 30-м суткам исследования и исчезала на 60-е сутки эксперимента. У ложнооперированных животных инъеция была незначительная и заканчивалась на 14-е сутки исследования.

В ранние сроки введения (3-7-е сутки) в первых опытных и во второй контрольной группах животных отмечалось выстояние биоимплантата с приподнятой над ним слизистой оболочкой над склерой опытного глаза животного на 1,5-2,0 мм в сравнении со слизистой с противоположной стороны глаза. При этом отмечалось полнокровие эписклеральных сосудов в зоне введения изделия. Степень выстояния уменьшалась по мере рассасывания вводимого биоимплантата и нивелировалась к концу

экспериментального исследования, также исчезало полнокровие приближённых к месту введения эписклеральных сосудов. Степень выраженности таких реакций в первой контрольной группе была ниже, чем у животных первых двух опытных групп.

Отёк слизистой оболочки наблюдался больше в сегменте глаза в зоне введения изделия в ранние сроки исследования (3-14-е сутки), затем отёк слизистой исчезал. У ложноперированных животных отёка конъюнктивы не наблюдалось.

Оптические среды глаза животных были прозрачные ($n = 72$), офтальмоскопия не выявила какую-либо патологию глазного дна.

На 3-и сутки во всех рассматриваемых группах животных наблюдалась умеренная воспалительная инфильтрация зоны оперативного вмешательства и стенки биоимплантата макрофагами и лимфоцитами, которая была более выражена у кроликов в опытных группах и в первой контрольной группе.

При исследовании методом АСМ в первой опытной группе коллагеновые волокна в межклеточном веществе соединительнотканной основы конъюнктивы и в поверхностных слоях склеры были разрыхлены, теряли равномерный характер толщины, менее четко различались характеристики изотропных и анизотропных дисков. Во второй опытной и в первой контрольной группах разрыхлённость коллагеновых волокон в межклеточном веществе конъюнктивы была незначительной, в склере коллагеновые волокна не изменялись. В группе животных с разрезом конъюнктивы изменения коллагеновых волокон не отмечалось.

На 7-е сутки во всех рассмотренных случаях биоимплантат ещё сохранялся. Отмечалась умеренная лимфоцитарно-моноцитарная инфильтрация как стенки биоимплантата в первой опытной группе, так и окружающей конъюнктивы. При этом во второй опытной группе проявления клеточных реакций были менее выражены. Прилегающий участок склеры реципиента в первой опытной группе характеризовался разрыхлением стромы, между коллагеновыми волокнами которой были видны нейтрофилы и лимфоциты. Такой картины в толще склеры во второй опытной группе, так

же как и в случае имплантации отрезка сосуда пуповины, не наблюдалось, а клеточная реакция присутствовала только на поверхности склеры. Во второй контрольной группе признаки клеточной инфильтрации в зоне хирургической манипуляции были минимальны, подлежащая склера была интактна.

Методом конфокальной флуоресцентной микроскопии (ИНТЕГРА Спектра, НТ-МДТ, Россия) в режимах флуоресценции и конфокального лазерного изображения изучены НП в биоимплантате и склера в зоне вмешательства. Подтвержден глобулярный характер организации НП, в то время как склера имела более гомогенный характер организации в силу близких химических характеристик объекта. При изучении содержимого биоимплантата получен специфический спектр НП, который был в дальнейшем взят в качестве контроля при оценке глубины распространения биологического материала в толщу склеры глаза реципиента. Также получен спектр от интактной склеры, пики которой были в другом диапазоне, чем у НП (Рисунок 3).

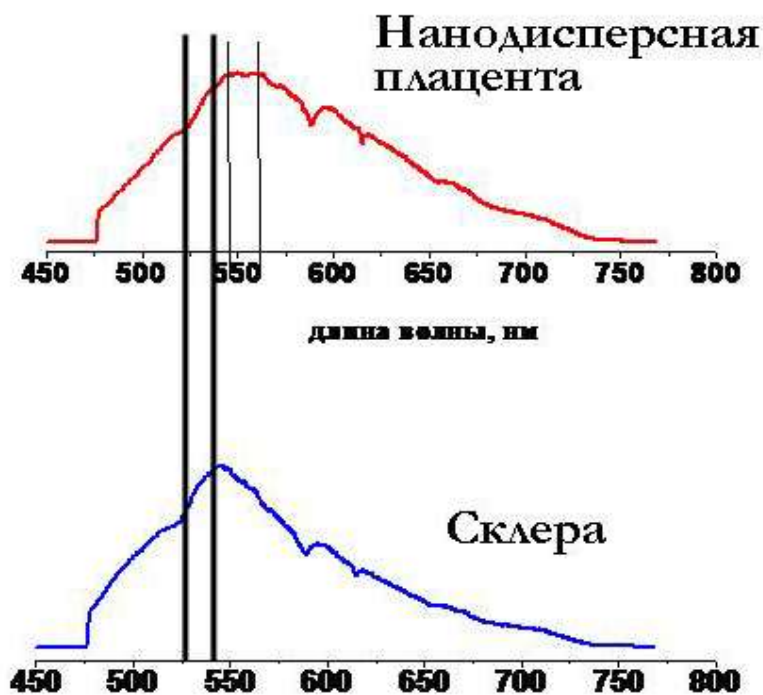


Рисунок 3 – Флуоресцентный спектр НП и интактной склеры

Для исследования глубины проникновения НП в толщу склеры были проведены спектроскопические исследования поперечного среза склеры по точкам с шагом 400 мкм и биоимплантата на 7-е сутки после его введения. Спектр интактной склеры был использован в качестве контроля.

Анализ флуоресцентных спектров показал, что на 7-е сутки имплантации в опытной группе наблюдается проникновение зёрен НП в глубину склеры на 2/3 её толщины, что можно было объяснить облегченной диффузионной миграцией наноразмерных элементов НП через аморфное вещество плотноволкнистой соединительной ткани склеры и поры склеры в связи с их меньшей размерностью.

На 14-е сутки в обеих опытных группах, а также в первой контрольной группе в зоне имплантации наблюдались остатки стенки биоимплантата, инфильтрированные лимфоцитарно-макрофагальными клетками. Инфильтрация также наблюдалась вокруг биоимплантата в соединительнотканых структурах конъюнктивы, при этом её степень была более выраженной в первой опытной группе, менее выраженной – во второй опытной группе, умеренно выраженной – в первой контрольной группе и незначительной – во второй контрольной группе. В первой опытной группе сохранялось разволокнение и набухание коллагеновых волокон в прилегающей к зоне имплантации склере практически до глубоких её слоев с наличием клеточных элементов макрофагально-моноцитарного звена. Такого изменения склеры в зоне хирургической манипуляции в других исследуемых группах животных отмечено не было.

На 30-е сутки биоимплантат как в опытных, так и в первой контрольной группах в значительной степени рассасывался. В зоне его имплантации наблюдались лимфоцитарные скопления с примесью пролиферирующих фибробластов, эпителиоидных клеток и отдельные эозинофильные гранулоциты. Фибробласты формировали тонкую соединительнотканную капсулу с множеством гемокapилляров и наличием эпителиоидных клеток. Природа клеток подтверждалась иммуногистохимическим методом с применением белка виментина. В первой

опытной группе в склере инфильтрата практически не было, при этом отмечалось небольшое разволокнение волокон стромы её поверхностных слоёв. Во второй опытной группе склера интактна, ангиогенез менее выражен. В обеих контрольных группах отмечалась умеренная фибробластическая реакция в зоне вмешательства с формированием стандартного рубца.

На 60-е сутки в первой опытной группе вокруг донорских структур образовалась капсула, состоящая в частности из эпителиоидных клеток и крупных макрофагов, содержащих внутри себя мелкие пылевидные частицы. Строма склеры была несколько разрыхлена, по периферии склеры определялось множество юных фибробластов. Вблизи наблюдался высокий уровень микроциркуляции соединительнотканной структуры конъюнктивы. Во второй опытной группе крупнодисперсные частицы плаценты находились свободно в конъюнктиве, располагаясь между клетками лимфоидного ряда. Склера была интактна, наблюдалась умеренно-выраженная васкуляризация конъюнктивы. В первой контрольной группе отмечалось также развитие соединительнотканной капсулы в зоне хирургической манипуляции, васкуляризация конъюнктивы была незначительная. Во второй контрольной группе в зоне оперативного вмешательства отмечалась практически полностью сформированная рубцовая зона без признаков васкуляризации.

На 90-е сутки на месте биоимплантата в первой опытной группе была четко видна хорошо выраженная грануляционная ткань с эпителиоидными клетками и макрофагами, содержащими в цитоплазме ультрадисперсные частицы. Вокруг – хорошо оформленная соединительнотканная капсула, подтверждаемая также АСМ-исследованием. В наружных слоях склеры также наблюдалось увеличение числа активных фибробластов, окружённых новообразованными коллагеновыми волокнами, что хорошо выявлялось при окраске пикрофуксином по методике Ван-Гизон. Методом АСМ также отмечалось формирование мостиков между параллельно лежащими волокнами коллагена в строме склеры под зоной введения биоимплантата с НП, что, на наш взгляд, доказывало коллагеногенез и объясняло повышение

биомеханических характеристик прилежащей склеры (Рисунок 4). При использовании биоимплантата с крупнодисперсной плацентой, так же как и при имплантации отрезка сосуда пуповины в первой контрольной группе, наблюдалась новообразованная грануляционная ткань на поверхности склеры, однако образование коллагеновых волокон в самой склере отмечено не было. Во второй контрольной группе зона хирургического вмешательства представляла собой рубец, ничем по своей сути не отличающийся от рубца другой этиологии.

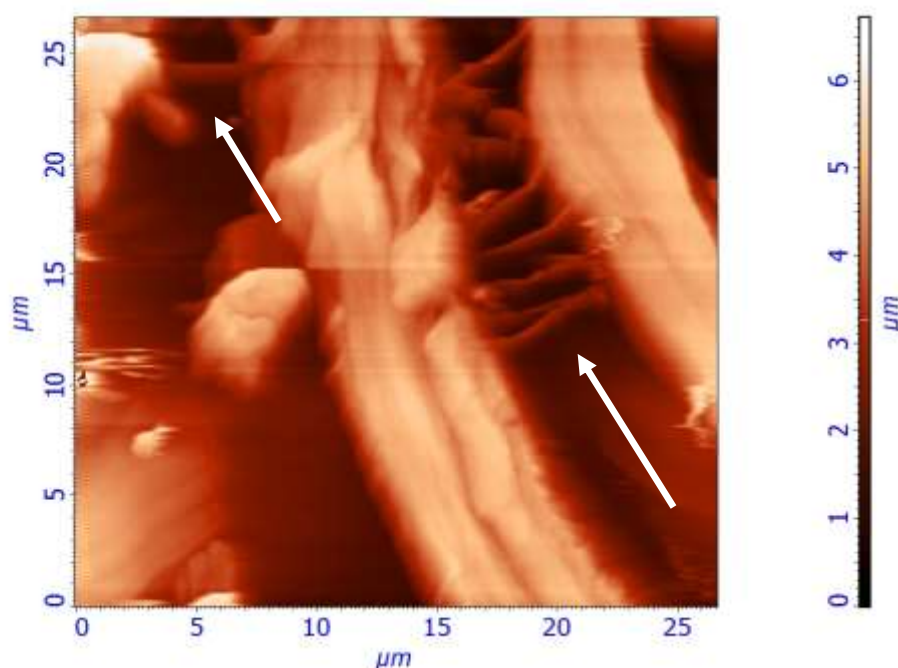
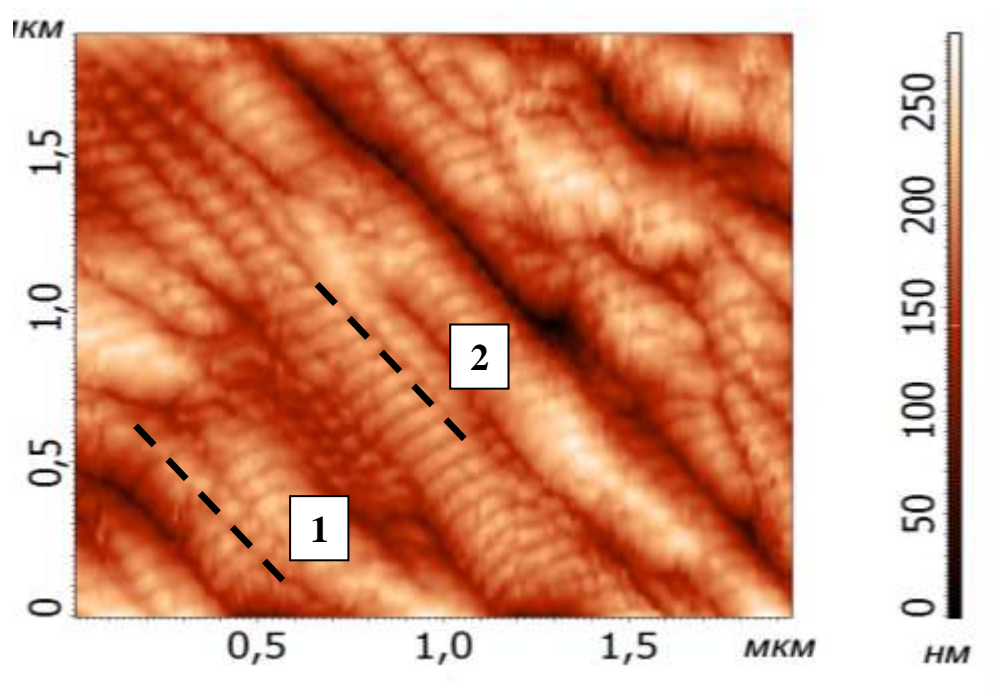


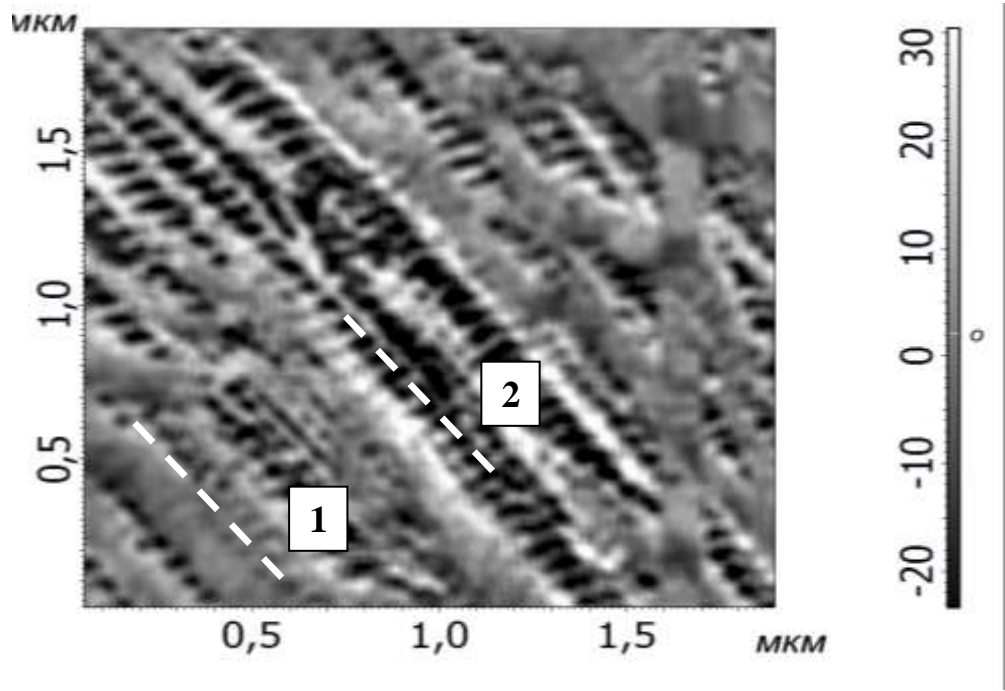
Рисунок 4 – АСМ-изображение на 90-е сутки зоны введения НП в первой опытной группе (указано стрелками формирование мостиков между волокнами коллагена)

По оценке механической жёсткости и степени разрешённости поперечной D-периодичности методом АСМ изучалась степень зрелости коллагенового волокна – КВ (Патент РФ на изобретение № 2446398 от 18.05.2009 г.) за весь период наблюдения в первой опытной группе. Методом АСМ было отмечено, что для незрелых и зрелых коллагеновых волокон, период исчерченности составлял 69,7 нм. На рисунке 5а представлены разные КВ по степени жёсткости и виду поперечной D-периодичности: КВ №

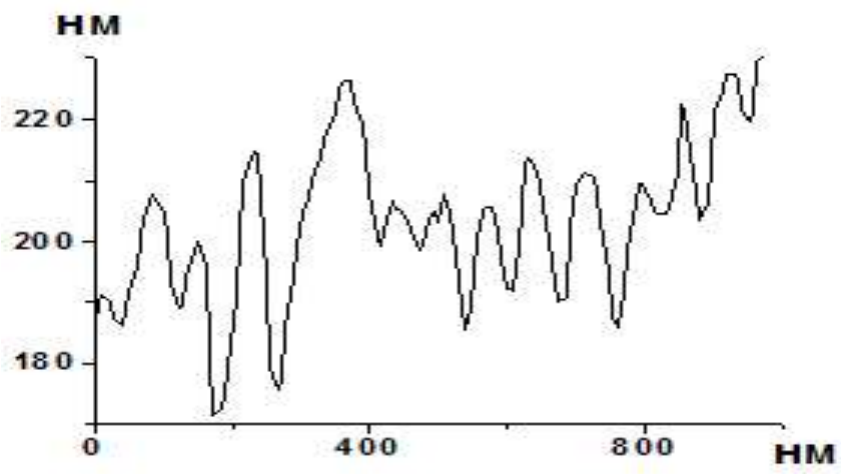
1 и КВ № 2. У коллагенового волокна № 1 на спектре выявлялась неправильная лонгитудинальная поперечная D-периодичность, при этом величина шага была не постоянной и изменялась в широком диапазоне значений от 14 до 24 нм (Рисунок 5в). Кроме того, КВ № 1 было менее жёсткое в методе изображения рельефа, что говорило о незрелости коллагенового волокна (Рисунок 5б). Тогда как у коллагенового волокна № 2 поперечная D-периодичность была правильной и высота шага между щелью и зоной перекрытия составляла 28-29 нм (Рисунок 5г); оно было более жёсткое, что говорило о зрелости коллагенового волокна. При этом новообразованных коллагеновых волокон в склере глаза животного в других группах исследования не было выявлено, а процесс ремоделирования склеры заканчивался на 90-е сутки наблюдения (Рисунок 6).



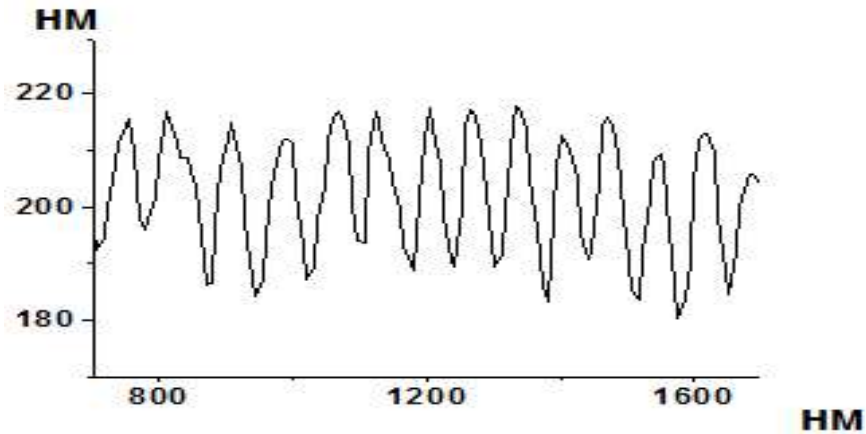
а



б



в



г

Рисунок 5 – АСМ-изображение склеры глаза кролика на 30-е сутки имплантации биоимплантата с НП: а) в методе изображения рельефа; б) в методе фазового контраста: 1 – незрелое КВ, 2 – зрелое КВ; в) профиль поверхности новообразованного КВ № 1; г) профиль поверхности зрелого КВ № 2

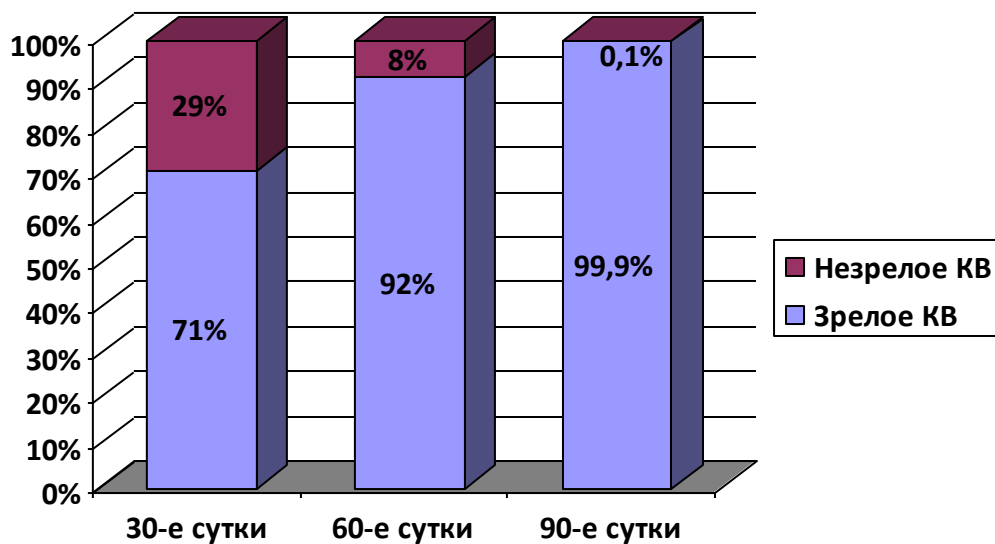


Рисунок 6 – Формирование коллагеновых волокон в склере при введении биоимплантата с нанодисперсной плацентой в первой опытной группе

Изучено трофическое обеспечение соединительнотканых структур конъюнктивы глаза кролика во всех четырех группах животных. Отмечено

повышение как количества сосудов в поле зрения равном $0,01 \text{ мм}^2$ в 1,5 раза, так и удельной длины сосудов в единице объёма за период наблюдения ($\text{мм}/\text{мм}^3$) в группе животных с НП, чем в первой контрольной группе с введением отрезка сосуда пуповины без его наполнения ($p < 0,05$, t-критерий). При этом не отмечалась достоверная разница в трофическом обеспечении зоны вмешательства в случае применения биоимплантатов с НП и крупнодисперсным аналогом, что, на наш взгляд, было связано с реакцией соединительнотканых структур глаза лабораторного животного на введение биологического материала плацентарной природы происхождения, независимо от его размерности, так как химический состав плаценты (до и после механоактивации) оставался неизменным.

Таким образом, механоактивация плаценты вследствие разрушения макромолекулярных комплексов и изменения их стереометрических параметров повышала гидрофильность и проницаемость (биодоступность) НП в ткани глаза экспериментального животного, даже в такие плотноволокнистые, как склера глазного яблока. А при введении биоимплантата с НП значительные биологические эффекты происходили не только на границе контакта склера – биоимплантат, а практически во всей толще склеры в зоне его введения. При этом наблюдалось как ремоделирование собственно склеры реципиента на $2/3$ её толщины, так и формирование плотного соединительнотканного образования в зоне имплантации на поверхности склеры, а также ангиогенез зоны имплантации, что значимо превосходило аналогичные изменения с применением макродисперсных аналогов.

Результаты оценки степени регенеративной активности соединительнотканых структур глаза в зоне имплантации биоимплантата с нанодисперсной плацентой. На 7-е сутки эксперимента иммуногистохимическое исследование с определением экспрессии к белку Ki-67 ПАП методом (пероксидаза антипероксидаза) показало выраженную пролиферативную активность клеток соединительнотканной основы конъюнктивы глаза крысы вокруг биоимплантата с НП в первой опытной

группе, умеренно-выраженную пролиферативную активность – в зоне имплантации биоимплантата с крупноизмельчённой плацентой и отрезком сосуда пуповины и низкую пролиферативную активность – в зоне разреза конъюнктивы во второй контрольной группе. Указанное коррелировало с высоким уровнем апоптозов клеток соединительнотканной основы конъюнктивы глаза вокруг биоимплантата в первой опытной группе, умеренно-выраженной апоптотической активностью в зоне имплантации биоимплантата с крупнодисперсной плацентой и отрезком сосуда пуповины и низким уровнем апоптозов в зоне разреза конъюнктивы во второй контрольной группе при исследовании с определением экспрессии к белку Caspase-3.

Данные реакции наблюдались и на 30-е и 60-е сутки исследования, с аналогичным распределением по группам, однако их интенсивность значительно снижалась к поздним срокам наблюдения. Индекс пролиферативной активности за весь период наблюдения составил в среднем ($M \pm \sigma$) соответственно в первой опытной группе – $39,3 \pm 1,5\%$, во второй опытной группе – $28,1 \pm 1,1\%$, в первой контрольной группе – $24,1 \pm 0,7\%$, во второй контрольной группе – $15,3 \pm 0,7\%$ (Таблица 3). В свою очередь индекс апоптотической активности за весь период наблюдения составил в среднем ($M \pm \sigma$) соответственно в первой опытной группе – $0,43 \pm 0,009\%$, во второй опытной группе – $0,34 \pm 0,008\%$, в первой контрольной группе – $0,20 \pm 0,007\%$, во второй контрольной группе – $0,14 \pm 0,008\%$ (Таблица 4).

Таблица 3 – Индекс пролиферативной активности клеток в поле зрения 0,01 мм²

Срок наблюдения	Индекс пролиферации (% , М ± σ)			
	1-я опытная группа	2-я опытная группа	1-я контрольная группа	2-я контрольная группа
7 суток	45,63 ± 1,55	34,09 ± 0,93*	28,99 ± 0,57**	20,73 ± 0,83**
30 суток	38,59 ± 1,74	28,11 ± 1,3**	24,41 ± 0,63**	15,33 ± 0,73**
60 суток	33,56 ± 1,22	22,07 ± 1,16**	18,81 ± 0,91**	9,78 ± 0,65**

*различия достоверны в сравнении с 1-й опытной группой (p < 0,01, t- критерий);

**различия достоверны в сравнении с 1-й опытной группой (p < 0,001, t-критерий).

Таблица 4 – Индекс апоптотической активности клеток конъюнктивы зоны хирургической манипуляции на 100 клеток соединительной ткани

Срок наблюдения	Индекс апоптотической активности (% , М ± σ)			
	1-я опытная группа	2-я опытная группа	1-я контрольная группа	2-я контрольная группа
7 суток	0,56 ± 0,009	0,44 ± 0,007*	0,29 ± 0,006**	0,22 ± 0,009**
30 суток	0,48 ± 0,009	0,40 ± 0,009*	0,23 ± 0,009**	0,12 ± 0,007**
60 суток	0,26 ± 0,008	0,18 ± 0,009*	0,10 ± 0,007**	0,09 ± 0,007**

*различия достоверны в сравнении с 1-й опытной группой (p < 0,05, t- критерий);

**различия достоверны в сравнении с 1-й опытной группой (p < 0,01, t-критерий).

Таким образом, НП значительно усиливает процессы пролиферации в соединительнотканых структурах реципиента и повышает репаративные свойства склеры в зоне её введения, несмотря на изначально низкую пролиферативную активность. При этом пролиферативная активность соединительной ткани в зоне имплантации биоимплантата с НП в первой опытной группе была выше на 11,2% (p < 0,001, t-критерий), чем во второй

опытной группе при имплантации биоимплантата с крупнодисперсной плацентой, на 15,2% выше ($p < 0,001$, t-критерий), чем в первой контрольной группе при введении отрезка сосуда пуповины, и на 24% выше ($p < 0,001$, t-критерий), чем при выполнении разреза конъюнктивы глаза крысы во второй контрольной группе.

Результаты оценки биомеханических характеристик склеры опытных животных при введении имплантата с нанодисперсной плацентой экстрабульбарно. Деформационно-прочностные характеристики фрагментов склеральной ткани глаза кролика свидетельствовали, что прочность склеральной ткани возрастала в течение срока наблюдения и её показатели были достоверно выше в первой опытной группе животных при введении биоимплантата с НП (Таблица 5). Введение биоимплантата с НП также положительно сказывалось на упругих характеристиках склеральной ткани экспериментального животного. Отмечено достоверное повышение модуля упругости в рассматриваемые сроки в сравнении с животными из других исследуемых групп (Таблица 6).

Таблица 5 – Влияние введения биоимплантата на прочностные характеристики склеры в эксперименте

Группы животных	Предел прочности (ПП, мПа)			Интактная склера (М ± σ)
	срок наблюдения			
	30 суток (М ± σ)	60 суток (М ± σ)	90 суток (М ± σ)	
Первая опытная	8,1 ± 0,3*	8,7 ± 0,3*	10,6 ± 0,4*	7,1 ± 0,8
Вторая опытная	7,6 ± 0,5	7,8 ± 0,5**	8,0 ± 0,4**	
Первая контрольная	7,4 ± 0,5	7,4 ± 0,5	7,6 ± 0,4	
Вторая контрольная	7,1 ± 0,4	7,4 ± 0,7	7,3 ± 0,5	

*различия между 1-й и 2-й опытными группами достоверны ($p < 0,05$, U-критерий);

**различия между 2-й опытной группой и 1-й контрольной группой достоверны ($p < 0,05$, U-критерий).

Таблица 6 – Влияние введения биоимплантата на упругие характеристики склеры в эксперименте

Группы животных	Модуль упругости (МЮ, мПа)			
	срок наблюдения			Интактная склера (М ± σ)
	30 суток (М ± σ)	60 суток (М ± σ)	90 суток (М ± σ)	
Первая опытная	24,4 ± 4,4*	25,4 ± 4,6*	29,6 ± 4,4*	17,3 ± 2,9
Вторая опытная	18,9 ± 3,3	19,7 ± 3,6	20,0 ± 3,2	
Первая контрольная	18,2 ± 2,6	19,7 ± 2,7	19,5 ± 2,8	
Вторая контрольная	17,4 ± 1,9	17,8 ± 2,4	18,1 ± 2,5	

*различия между 1-й и 2-й опытными группами достоверны ($p < 0,05$, U-критерий).

Полученные результаты демонстрировали высокую корреляционную связь в первой опытной группе с введением биоимплантата с НП между прочностью склеры и модулем Юнга на всех сроках наблюдения. Тогда как во второй опытной группе при введении биомплантата с крупнодисперсной плацентой и в первой контрольной при введении фрагмента отрезка сосуда пуповины корреляционная связь также была высокой в первые сроки наблюдения, а в отдаленном периоде (90-е сутки) связь уменьшилась до уровня средней.

Таким образом, введение биомплантата из фрагмента отрезка сосуда пуповины с НП под конъюнктиву на склеру глаза кролика оказывало положительное влияние на деформационно-прочностные показатели склеральной ткани. При этом достоверно улучшались как прочностные (предел прочности), так и упругие характеристики (модуль Юнга) склеры глаза животного в зоне введения биомплантата с НП в рассматриваемые сроки наблюдения. Всё это дополняло наши предположения об индуцировании частицами НП в склеральной ткани процессов репарации в виде коллагенообразования с последующим ремоделированием.

ВЫВОДЫ

1. Методом механоактивации в шаровой планетарной мельнице при температуре не более 60 °С и величине подведенной удельной энергии менее 15 кДж/г в течение 60 минут получена нанодисперсная плацента человека, имеющая ультрадисперсную структуру с размерами зерна вещества 40-100 нм. При этом установлено, что в результате механоактивации химический состав плаценты не изменялся, а нанодисперсная плацента приобретала новые биофизические свойства: повышенную гидрофильность, проницаемость и биодоступность, а также способность усиливать пролиферацию при минимальных объёмах введения.

2. В опытах на экспериментальных животных разработан клинический алгоритм применения нанодисперсной плаценты как в виде биоимплантата на основе фрагмента сосуда пуповины, так и в виде суспензии через иглу с минимальным диаметром 29 G, что позволяло значительно уменьшить объём введения донорского материала, травматичность техники имплантации и длительно сохранить максимально выраженные биологические эффекты *in vivo*.

3. Показано, что оптимальный объём введения нанодисперсной плаценты соответствовал количеству 5 мг сухого вещества. При указанном объёме введения нанодисперсной плаценты вызывались значительные биологические эффекты в зоне имплантации в виде умеренного макрофагально-клеточного ответа и активации фибробластических и эндотелиобластических реакций в соединительнотканых структурах глаза реципиента.

4. Показано, что нанодисперсная плацента с агломератами размером 2-10 мкм стимулирует клеточный ответ соединительнотканых структурах глаза реципиента, повышает макрофагальную активность и является пусковым механизмом индуцирования регенеративных процессов: коллагеногенеза, ангиогенеза и неоваскуляризации в зоне имплантации и на

значительном удалении от неё (до 400 мкм и более). Диффузия нанодисперсной плаценты к 7-м суткам после имплантации вызывает регенеративный фибробластический процесс в интактной склере в виде коллагеногенеза на 2/3 глубины склеры с последующим ремоделированием в течение 90 суток.

5. На основании полученных результатов экспериментальных исследований разработана методика оценки степени зрелости коллагенового волокна как маркера репаративной активности соединительной ткани с учётом механической жёсткости и степени организации D-периодичности методом атомно-силовой микроскопии.

6. Отмечено, что введение изделия в эксперименте усиливает трофическое обеспечение тканей в зоне имплантации не только на границе имплантат – соединительнотканная основа конъюнктивы, но и на удалении до 400 мкм и более: увеличение количества сосудов в 1,2 раза ($p < 0,05$, t-критерий), удельной длины сосудов в 1,2 раза ($p < 0,05$, t-критерий), что достоверно выше, чем при имплантации отрезка сосуда пуповины без наполнения его нанодисперсной плацентой.

7. Установлено, что введение биоимплантата с нанодисперсной плацентой усиливает регенеративные процессы в соединительнотканых структурах глазного яблока в 1,4 раза ($p < 0,05$, t-критерий) в сравнении с крупнодисперсным аналогом, а также индуцирует фибробластические процессы в интактной склере.

8. В результате экспериментальных исследований показано, что введение биоимплантата с нанодисперсной плацентой экстрабульбарно оказывает положительное влияние на деформационно-прочностные показатели склеральной ткани. При этом достоверно улучшаются как прочностные (предел прочности, МПа) с $8,1 \pm 0,3$ до $10,6 \pm 0,4$ ($p < 0,05$, U-критерий), так и упругие характеристики (модуль Юнга, МПа) с $24,4 \pm 4,4$ до $29,6 \pm 4,4$ ($p < 0,05$, U-критерий) в сроки наблюдения до 3 месяцев.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для получения нанодисперсной плаценты необходимо использовать разработанный новый способ получения биологического материала с ультрадисперсной структурой, который заключается в применении механоактивации с использованием шаровой планетарной мельницы с подведённой удельной энергией менее 15 кДж/г в течение 60 минут при температуре не более 60 °С.

2. Для стимулирования процессов коллагеногенеза в склере глаза реципиента следует применять биоимплантат с нанодисперсной плацентой, вводимый экстрабульбарно либо инъекционно в виде суспензии субконъюнктивально через иглу диаметром не менее 29 G при однократном введении в дозе не более 5 мг.

3. Для подтверждения процессов репарации целесообразно применять разработанную новую методику оценки степени зрелости коллагенового волокна как маркера репаративной активности соединительной ткани, с использованием атомно-силовой микроскопии и изучаемых гистологических парафиновых срезов по учёту механической жёсткости и степени организации D-периодичности коллагенового волокна при помощи компьютерной программы Image Analysis 3 (НТ-МДТ, Россия).

4. Порошок нанодисперсной плаценты обладает вновь приобретёнными в процессе механоактивации ценными биофизическими свойствами: повышенной гидрофильностью, проницаемостью и биодоступностью, и удобен для изготовления разнообразных изделий медицинского назначения.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Zharov V.V., Lyalin A.N., Karban O.V., Perevozchikov P.A., Samartseva N.N., Konygin G.N., Leesment S.S. Atomic Force Microscopy in

Studying Regeneration of Tissues in Sclera Plasty in Ophthalmology // Journal of surface investigation. X-ray, synchrotron and neutron techniques. – 2009. – Vol. 3, № 5. – P. 804-808.

2. Перевозчиков П.А., Васильев Ю.Г., Жаров В.В., Карбань О.В. Изучение механизмов регенерации тканей при имплантации наноструктурированных биологических материалов в офтальмологии // Морфология. – 2009. – Т. 136, № 4. – С. 111.

3. Ишмаматьев И.Л., Ишмаматьев И.И., Старостина В.В., Жаров В.В., Перевозчиков П.А., Точилова Е.Р. Некоторые особенности выбора аллохрящевого трансплантата и способа его фиксации при коррекции седловидной деформации носа // Анналы пластической, реконструктивной и эстетической хирургии. – 2009. – № 4. – С. 34-40.

4. Ишмаматьев И.Л., Ишмаматьев И.И., Старостина В.В., Жаров В.В., Перевозчиков П.А., Точилова Е.Р. Опыт использования аллоамниона в эстетической блефаропластике // Анналы пластической, реконструктивной и эстетической хирургии. – 2009. – № 3. – С. 33-37.

5. Ишмаматьев И.Л., Ишмаматьев И. И., Старостина В.В., Жаров В.В., Перевозчиков П.А., Точилова Е.Р. Применение аллотрансплантата из твердой мозговой оболочки для хирургического устранения и профилактики неровностей спинки носа // Анналы пластической, реконструктивной и эстетической хирургии. – 2010. – № 1. – С. 23-33.

6. Карбань О.В., Васильев Ю.Г., Жаров В.В., Перевозчиков П.А., Леесмент С.И., Тимофеев С.В. Сканирующая зондовая микроскопия как метод определения свойств механоактивированных биологических материалов и реакции на них тканевых структур глаза // Известия ЮФУ. Технические науки. – 2011. – Т. 117, № 4. – С. 199-206.

7. Жаров В.В., Перевозчиков П.А., Карбань О.В., Самарцева Н.Н. Перспективы применения нанодисперсной плаценты человека в офтальмологии // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2011. – Т. 133, № 14. – С. 116-119.

8. Перевозчиков П.А., Васильев Ю.Г., Карбань О.В. Морфологические особенности репаративной регенерации при имплантации нанодисперсного биологического материала плацентарного происхождения // Морфологические ведомости. – 2011. – № 4. – С. 37-42.

9. Перевозчиков П.А., Васильев Ю.Г., Карбань О.В. Вторичный ангиогенез в передней стенке глаза в условиях аллопластики биоконтейнера с механоактивированным биологическим материалом плацентарного происхождения // Ангиология и сосудистая хирургия. – 2012. – Т. 18. – С. 36-37.

10. Перевозчиков П.А. Особенности ранних ответов передней стенки глаза при имплантации взвеси нанодисперсной плаценты в зависимости от дозировки // Морфологические ведомости. – 2012. – № 4. – С. 48-53.

11. Перевозчиков П.А., Васильев Ю.Г., Карбань О.В. Стимуляция коллагеногенеза в склеральной ткани в эксперименте // Астраханский медицинский журнал. – 2013. – Т. 8, № 1. – С. 187-190.

12. Перевозчиков П.А., Васильев Ю.Г., Карбань О.В., Самарцев В.С. Морфологические проявления взаимодействия нанодисперсной плаценты с соединительно-тканными структурами глаза в зависимости от введенной дозы // Фундаментальные исследования. – 2012. – Ч. 1, № 12. – С. 121-124.

13. Стрелков Н.С., Жаров В.В., Перевозчиков П.А., Васильев Ю.Г., Карбань О.В., Самарцев В.С. Эффекты микроинъекций нанодисперсной плаценты человека в условиях эксперимента // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2012. – Т. 148, № 12. – С. 197-200.

14. Васильев Ю.Г., Красноперов Д.И., Перевозчиков П.А., Карбань О.В. Модуляция механизмов стромальных репаративных клеточных реакций в зонах раневого повреждения // Вестник Ижевской ГСХА. – 2012. – Т. 31, № 2. – С. 52-53.

15. Перевозчиков П.А., Ишмаметьев И.И., Ишмаметьев И.Л., Васильев Ю.Г., Карбань О.В., Самарцев В.С. Биологические эффекты инъекций нанодисперсной плаценты человека, лежащие в основе эндогенно-индуцированной ревитализации // Анналы пластической, реконструктивной и эстетической хирургии. – 2013. – № 1. – С. 79-85.

16. Жаров В.В., Лялин А.Н., Перевозчиков П.А., Васильев Ю.Г., Карбань О.В. Применение имплантата-носителя наночастиц в условиях эксперимента // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2013. – Т. 153, № 4. – С. 87-89.

17. Перевозчиков П.А., Карбань О.В., Самарцев В.С. Механоактивация как метод получения наномодифицированных биологических материалов // Фундаментальные исследования. – 2013. – Ч. 3, № 9. – С. 429-434.

18. Ишмаметьев И.И., Ишмаметьев И.Л., Самарцева Н.Н., Старостина В.В., Перевозчиков П.А. Тканевая реакция на трансплантацию аллогенной твердой мозговой оболочки и аллоамниона в эксперименте // Анналы пластической, реконструктивной и эстетической хирургии. – 2013. – № 3. – С. 17-21.

19. Карбань О.В., Жаров В.В., Лялин А.Н., Перевозчиков П.А., Васильев Ю.Г., Коныгин Г.Н., Порсев В.Е. Наноструктурный биологический трансплантат для склеропластических операций // Нанотехнологии: наука и производство. – 2013. – № 1. – С. 9-14.

20. Васильев Ю.Г., Перевозчиков П.А., Самарцев В.С., Карбань О.В. Модуляция регенеративных ответов при взаимодействии склеры с нанодисперсной плацентой в условиях эксперимента // Вестник Ижевской ГСХА. – 2013. – Т. 35, № 2. – С. 43-45.

21. Перевозчиков П.А. Репаративная регенерация передней стенки глаза в ответ на имплантацию нанодисперсной плаценты // Фундаментальные исследования. – 2014. – Ч. 1, № 4. – С. 144-148.

22. Кузнецова Г.Е., Перевозчиков П.А., Лялин А.Н., Самарцев В.С., Турченко Е.В. Экспериментальное исследование взаимодействия нанодисперсной плаценты и кожи // Онкохирургия. – 2014. – № 6. – С. 7.

23. Перевозчиков П.А. Стимуляция коллагеногенеза в склеральной ткани в эксперименте // Медицинский вестник Башкортостана. – 2014. – Т. 9, № 2. – С. 72-75.

24. Перевозчиков П.А. Эффекты ревитализации в коже в условиях эксперимента // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2014. – № 12. – С. 252-254.

25. Перевозчиков П.А., Васильев Ю.Г., Карбань О.В. Реакция мезодермальной ткани глазного яблока при имплантации механоактивированного биологического материала // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2015. – Т. 187, № 12. – С. 177-180.

26. Перевозчиков П.А., Борзенко С.А., Карбань О.В. Имплантация наноструктурированного титана и механоактивированной плаценты человека в соединительнотканые структуры глаза // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2016. – Т. 18, № 5. – С. 208.

27. Перевозчиков П.А., Борзенко С.А., Васильев Ю.Г., Карбань О.В. Регенеративные процессы в тканях глаза при имплантации механоактивированного биологического материала // Офтальмохирургия. – 2017. – № 1. – С. 83-87.

28. Перевозчиков П.А., Борзенко С.А., Карбань О.В., Васильев Ю.Г. Модуляция репаративных процессов с помощью имплантации нанодисперсной плаценты: Монография. – Ижевск: ФГБОУ ВО Ижевская ГСХА, 2017. – 192 с.

ИЗОБРЕТЕНИЯ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Жаров В.В., Лялин А.Н., Коньгин Г.Н., Перевозчиков П.А., Точилова Е.Р. Способ приготовления биофункционального трансплантата в виде наночастиц. – Патент РФ на изобретение № 2367448, приоритет от 09 января 2008 г.; зарегистрировано 20 сентября 2009 г.

2. Жаров В.В., Перевозчиков П.А., Лялин А.Н., Прозоровский В.А., Самарцева Н.Н. Биологический контейнер для реваскуляризации соединительной ткани. – Патент РФ на изобретение № 2369361, приоритет от 04 апреля 2008 г.; зарегистрировано 10 октября 2009 г.

3. Жаров В.В., Перевозчиков П.А., Карбань О.В., Васильев Ю.Г., Леесмент С.И. Способ определения степени зрелости коллагеновых волокон. – Патент РФ на изобретение № 2446398, приоритет от 18 мая 2009 г.; зарегистрировано 27 марта 2012 г.

СПИСОК УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АСМ	атомно-силовая микроскопия
КВ	коллагеновое волокно
МЮ	модуль Юнга
НП	нанодисперсная плацента
ПП	предел прочности