

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

ПЕНЗЕНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

Факультет
физико-математических
и естественных наук

Кафедра
«Общая биология и биохимия»

Направление подготовки 06.03.01 Биология

Профиль подготовки Биохимия

Форма обучения очная

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА
на тему:
«ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОГО
ЛЕКАРСТВЕННОГО ПОКРЫТИЯ ИМПЛАНТИРУЕМЫХ
МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ ИЗ ТИТАНА IN VITRO И IN VIVO»

Студент



Иванова Валерия Эдуардовна

Руководитель



Кручинина А.Д.

Нормоконтролер



Кручинина А.Д.

Работа допущена к защите (протокол заседания кафедры от 17.06.21 № 15)

Заведующий кафедрой



Карпова Г.А.

Работа защищена с отметкой отлично

(протокол заседания ГЭК от 25.06.21 № 4)

Секретарь ГЭК



Клыченков С.В.

Пенза, 2021

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	3
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	5
1.1 Металлы биомедицинского применения	5
1.2 Возбудители перипротезных инфекционных осложнений	8
1.3 Способы снижения риска развития перипротезных инфекций	13
1.3.1 Биodeградируемые полимеры как матрицы для лекарственных препаратов	13
1.3.2 Лекарственные препараты	15
1.4 Гематологические показатели крови, применяемые для оценки безопасности покрытия	18
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	24
2.1 Материалы исследования	24
2.2 Методы исследования	24
2.2.1 Оценка антибактериального действия диско-диффузионным методом	25
2.2.2 Исследование высвобождения лекарственного препарата спектрофотометрическим методом	26
2.2.3 Исследования гематологических показателей после имплантации титановых блоков с антибактериальным покрытием.	29
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	31
3.1 Результаты оценки антибактериального действия лекарственного покрытия	31
3.2 Результаты исследования высвобождения лекарственного препарата спектрофотометрическим методом	31
3.3 Результаты исследования гематологических показателей после имплантации титановых блоков с антибактериальным покрытием	36
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	45
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	47

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования. Титановые изделия являются достаточно распространенными в биомедицинском применении, они широко используются в протезировании, ортопедии, для изготовления имплантов, хирургических инструментов, крепежных элементов.

Титан обладает рядом преимуществ. Это легкий, прочный и пластичный металл. Он имеет низкий коэффициент теплового расширения и высокую биосовместимость. Не вызывает аллергических реакций в организме, благодаря формированию на поверхности стабильной инертной оксидной пленки, она препятствует развитию патологических процессов на границе изделия и тканей. Титан способен быстро обтягиваться костно-мышечными тканями, не корродируя в организме. Структура ткани остаётся неизменной на протяжении всей жизни. Изделия из данного металла имеют коррозионную стойкость и выдерживают стерилизацию агрессивными химическими веществами при высоких температурах.

Несмотря на то, что рост числа операций с использованием изделий из титановых сплавов возрос, проблема развития перипротезных инфекционных осложнений до сих пор остается нерешенной. Один из методов покрытия титановых изделий – антибактериальное нанопокрытие, содержащее серебро 99,9 % чистоты. Такое покрытие показало надежное препятствие образования бактериальной биоплёнки на поверхности титанового имплантата и обеспечило высокую биосовместимость, но данный способ достаточно трудоёмок и требует высокоточного дорогостоящего оборудования. Перспективным является нанесение антибактериальных препаратов в комплексе с полимером на титановые изделия с целью снижения риска инфекционных осложнений.

Лекарственное покрытие обеспечивает доставку в область имплантации полимер-матрицу с заключенным в нее антибактериальным препаратом. Первый обеспечивает адресную доставку действующего

вещества к предполагаемому очагу инфекции, второй – направлен на борьбу с возбудителями. Биodeградируемые полимеры (PGA, PLA и PLGA) способны поддерживать концентрацию на одном уровне в течение длительного времени (от нескольких недель до нескольких месяцев). Полимеры, в зависимости от своих свойств и происхождения, обладают продолжительным периодом деградации в организме, что позволяет регулировать сроки и скорость высвобождения препарата.

Объектом исследования выступает антибактериальное покрытие на титановых блоках, содержащее ванкомицин в качестве лекарственного препарата, и полимер в качестве матрицы. Предмет исследования – свойства антибактериального покрытия.

Цель работы – исследование свойств антибактериального покрытия имплантируемых медицинских изделий из титана *in vitro* и *in vivo*.

Для реализации этой цели поставлены следующие задачи:

- нанести антибактериальное покрытие на поверхность титановых блоков;
- оценить динамику высвобождения лекарственных препаратов из покрытия;
- оценить антибактериальное действие лекарственного покрытия;
- изучить наличие влияния имплантации экспериментальных образцов на гематологические параметры крови мелких лабораторных животных на разных сроках после операции.

Выпускная квалификационная работа написана на 51 листе, содержит 16 рисунков, 6 таблиц и список литературы на русском и английском языках из 42 источников.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Металлы биомедицинского применения

Металлы, используемые для биомедицинских применений, должны обладать следующими специфическими характеристиками:

- нетоксичными;
- неиммуногенными;
- нетромбогенными;
- неканцерогенными;
- обладать высокими механическими и технологическими свойствами;
- коррозионная стойкость.

Выделяют три группы материалов, используемых для имплантации:

1. Биотолерантные материалы

— сплавы благородных металлов, сплавы кобальта, хрома и молибдена

2. Биоинертные материалы

— Ti и его сплавы, Al_2O_3 , углерод

3. Биоактивные материалы

— стеклокерамика с биоактивной поверхностью, керамика, гидроксилапатит

Для создания биотолерантных материалов для имплантов применяют кобальт-хром-никелевые сплавы. Примерное содержание компонентов в сплаве: 75 % кобальта, 15-30 % хрома, 3-7 % молибдена. Кобальт-хром-никелевые сплавы обладают высокой механической прочностью и устойчивостью к коррозии.

Оксидная пленка, которая образуется на поверхности сплава в биологической среде, утрачивает свои защитные свойства и подвергается электрохимической коррозии. Биотолерантные материалы проявляют удовлетворительную биосовместимость с тканями и не обладают osteoconductive свойствами [42]. На поверхности материала иногда может наблюдаться адгезия белков, но невозможно формирование плотного контакта с костной тканью по типу остеоинтеграции [17].

Вокруг внутрикостных имплантатов из кобальт-хром-никелевого сплава со временем образуется фиброзная капсула. Тем не менее высокая прочность КХС объясняет актуальность его применения для изготовления больших по размеру субпериостальных имплантатов.

Биоинертные материалы характеризуются выраженными остеокондуктивными свойствами. В отношении сплавов возможность контактного остеогенеза обусловлена формированием стойкой оксидной пленки. Невысокие механические характеристики биоактивных материалов не позволяют создавать крупные нагружаемые имплантаты [34].

Титан и его сплавы являются более устойчивыми к коррозии, чем другие металлы, включая нержавеющую сталь, кобальт-хром-молибденовые и кобальт-хром-никелевые сплавы.

Титан был открыт в 1794 году и относится к группе физиологически индифферентных металлов. Металлы этой группы являются наиболее приемлемыми материалами для изготовления имплантатов с позиции биосовместимости, они, как правило, даже при высоком содержании в пище, воде и окружающей среде длительное время могут не вызывать негативных явлений в тканях и органах.

Перспективность титана и его сплавов для изготовления имплантатов объясняется физико-механическими, химическими и биологическими свойствами [26].

Титановые имплантаты используются для стоматологических, ортопедических и других медицинских целей с начала 1980-х годов. Факторы, связанные с имплантацией, такие как характеристики поверхности, состав материала и химический состав, ответственны за интеграцию. В частности, наличие слоя оксида титана на поверхности имплантата считается решающим для поддержания остеоинтеграции и предотвращения коррозии титановой поверхности.

Если поверхность имплантата изменяется, деградируется или растворяется под воздействием кислых веществ или кислой среды, слой

оксида титана может быть потерян, и могут начаться коррозионные явления. Кроме того, при функциональной нагрузке сочетание механической и химической коррозии между поверхностью имплантата и прилегающей костью может способствовать высвобождению большего количества металлических частиц и ионов.

Когда поверхность титанового имплантата подвергается воздействию воздуха, на поверхности имплантата самопроизвольно образуется стабильная пленка оксида титана. Этот тонкий слой (толщина 1,5–10 нм) образуется благодаря высокому сродству Ti к кислороду. Он обеспечивает биосовместимость титана с тканями. Оксидный слой защищает материал от реакционноспособных частиц и состоит из TiO_2 , который является стабильным соединением. Устойчивость к коррозии титановых имплантатов берет свое начало в этом слое оксида титана.

Оксидный слой может быть изменен и поврежден различными экологическими и функциональными факторами. В случае повреждения оксидный слой может самопроизвольно реформироваться в нормальных физиологических условиях. Примерами экологических и функциональных факторов, которые могут изменять оксидный слой, являются аномальные циклические нагрузки, микродвижение имплантата, кислотные среды и комбинированное воздействие этих факторов. Продолжающееся воздействие этих факторов на поверхность импланта может привести к необратимому разрушению оксидной пленки, в результате чего основной объем металла подвергается воздействию электролитов. Изменяющиеся условия pH могут превратить среду импланта в более кислую среду и привести к активному растворению ионов металлов (коррозии) [31].

Титан в живом организме под действием механической деформации и коррозии частично биодеградирует и диффундирует в окружающей ткани. Токсических эффектов или алергизации при этом, в отличие от циркониевых и железохромовых сплавов, даже при достаточно высоком уровне содержания металла в тканях, как правило, не происходит. В

медицинских целях используют технически чистый титан, который применяют, изготавливается промышленностью в виде двух марок ВТ1-00 и ВТ1-0, отличающихся содержанием примесей (таблица 1). Общее содержание азота, кислорода, водорода, углерода и железа не должно превышать 10% массовой доли в соответствии с ГОСТ 19807-91 «Титан и сплавы титановые деформируемые. Марки» [4].

Увеличение прочности титанового сплава достигается за счет введения в его состав алюминия и ванадия, а вещества относящиеся к «чистому» титану имеют наилучшую биологическую совместимость [12].

Таблица 1 – Химический состав титана

Марка титана	Содержание примесей не более, %							
	Fe	Si	C	O	N	H	Al	Прочих примесей
ВТ1-00	0,20	0,08	0,06	0,10	0,04	0,008	0,30	0,10
ВТ1-0	0,30	0,10	0,07	0,20	0,04	0,010	0,7	0,30

1.2 Возбудители перипротезных инфекционных осложнений

Серьезной проблемой после операций с использованием изделий из титановых сплавов являются перипротезные инфекционные осложнения. Перипротезные инфекции относятся к частным случаям инфекций области хирургического вмешательства (ИОХВ). Риск развития инфекции в течение года с момента имплантации медицинского изделия наиболее велик и связан с образованием развитием локального и системного воспалительного процесса.

Согласно литературным данным частота развития перипротезных инфекционных осложнения в ортопедии при эндопротезировании крупных

суставов составляет от 0,5% до 3,0% после первичного протезирования и от 3 до 6% после ревизионного [20].

Имплантат как инородное тело повышает патогенность бактерий, а наличие биопленки делает диагностику и лечение достаточно трудными. Стадии развития формирования биопленки делятся на 4 фазы:

- Адгезия;
- Пролиферация;
- Созревание биопленки;
- Клеточная отслойка.

Способность расти и развиваться на поверхности импланта в виде биопленки, представляет собой основной механизм выживания, с помощью которого микроорганизмы сопротивляются факторам окружающей среды. После первого контакта с имплантом. Бактерия прилипает к материалу инородного тела, что является первым шагом. В первые часы после адгезии многослойная клеточная пролиферация, а также межклеточная адгезия приводят к образованию микроколоний и к первоначальному росту биопленки. Зрелым биопленкам требуется четыре недели для развития, они представляют собой сложные сообщества, где микроорганизмы одного или нескольких видов живут, сгруппированные вместе в высокогидратированном, самопроизводящемся внеклеточном матриксе, который образуется на поверхностях протезов [36].

Главным компонентом матрикса биопленки является вода – около 97%. А содержание бактерий составляет 10–50% от общего объема биопленки. Количество внеклеточных полимерных веществ колеблется в пределах 50–90% от общего количества органического углерода в биопленках.

Перипротезные инфекции возникают во время операции или после из-за микробного распространения по кровяному руслу, вследствие прямого или лимфогенного распространения из инфекционного очага или проникающей травмы [33].

Обзор литературы помог выявить микроорганизмы, которые чаще всего образуют биопленки на имплантатах. Основные позиции занимают два вида стафилококков *Staphylococcus aureus* – 33,1% и *Staphylococcus epidermidis* – 16,8%, далее следуют *Enterococcus faecalis* – 6,4% представители неферментирующих грамотрицательных бактерий *Acinetobacter spp.* – 5,9% и *Pseudomonas aeruginosa* – 5,1% и представители семейства энтеробактерий (*Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*) – 4,1% (рис.1) [3].

Staphylococcus aureus является грамположительной бактерией. Матрица биопленки *S. aureus* представляет собой сложный клей, который покрывает все клетки зрелой структуры и, состоит из факторов хозяина, секретируемых и лизируемых белков, полисахаридов и внеклеточную ДНК. При имплантации материал покрывается белками хозяина, а матриксосвязывающие белки на поверхности *S. aureus* способствуют прикреплению к этим белкам и развитию биопленки [30].

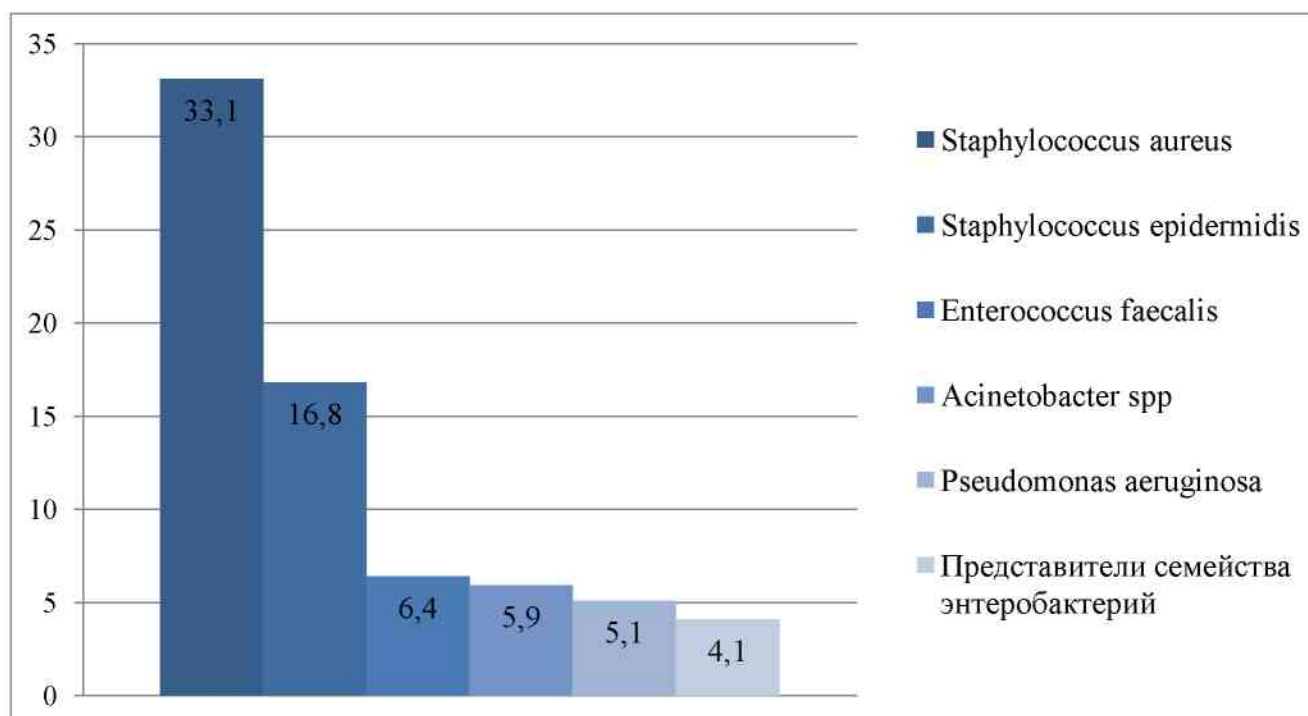


Рисунок 1. Наиболее часто встречающиеся микроорганизмы, образующие биопленки на поверхностях имплантов

В случаях инфицированных медицинских устройств удаление устройства часто необходимо для лечения инфекции.

Возникающие в результате инфекции весьма разнообразны и могут включать острые инфекции, такие как бактериемия и абсцессы, у 65% людей с инфекциями *S. aureus* колонизируются одним и тем же штаммом [37].

Staphylococcus epidermidis – грамположительная бактерия. *S. epidermidis* является значительной причиной инфекций протезных имплантатов.

Существуют патогенетическая связь между имплантацией инородного материала и инфекцией *S. epidermidis*. Обнаружено, что бактерии колонизируют искусственный материал, встроенных в аморфный материал. Специфический способ роста был назван “слизью” или биопленкой.

Традиционно процесс образования биопленки делится как минимум на три этапа. На этапе первичной привязки, бактерии прилипают к поверхности, чтобы создать колонию, а во время накопительной фазы, бактерии инициируют создание трехмерной многоклеточной структуры, в которой, большинство бактерий не имеют прямого контакта с поверхностью. *S. epidermidis*, таким образом, бактерии способны снова разобрать структуру биопленки, и освобожденные клетки, позволяют *S. epidermidis* колонизировать дополнительные участки тела. Процесс образования биопленки нуждается в широком спектре функциональных действий, опосредующих связывание с нативными или обусловленными (т. е. покрытыми внеклеточным матриксом) поверхностями, над клееподобными факторами, способствующими агрегации клеток, до действий, которые разрушают компоненты матрицы.

Огромное разнообразие специфических функциональных требований при формировании биопленки в значительной степени отражается на проявлении множества различных, узкоспециализированных факторов, характеризующихся весьма отчетливыми профилями биологических функций. Таким образом, в связи с их специализированными функциями в процессе морфогенеза биопленки *S. epidermidis* специфические факторы

отнесены к группам, представляющим механизмы, действующие либо при первичном прикреплении, либо при накоплении биопленки соответственно.

Биопленочный режим роста связан с общим персистирующим течением *S. epidermidis* инфекций чужеродных материалов, также возможно искоренении инфекций с помощью антимикробной терапии [27].

Enterococcus faecalis – грамположительный факультативный анаэробный кокк, который рассматривают как безвредный комменсал в желудочно-кишечном тракте человека. *E. faecalis* становится ведущим патогеном внутрибольничных инфекций, на долю которых приходится около 90% всех случаев опасных для жизни энтерококковых инфекций, таких как бактериальный эндокардит, инфекции мочевыводящих путей, раневые инфекции и бактериемия. Кроме того, *E. faecalis* также значительно ассоциируется с инфекциями корневых каналов в области стоматологии. Образование биопленок *E. faecalis* на имплантированных медицинских устройствах часто приводит к неудаче лечения.

Успех *E. faecalis* как клинического патогена заключается в его вирулентности, включая образование биопленки. *E. Faecalis* способен прилипать к поверхности и образовывать поверхностно-прикрепленные микробные сообщества, встроенные в матрицу внеклеточных полимерных веществ, известных как биопленки. По данным до 80% бактериальных инфекций связаны с биопленочным способом роста, который вносит значительный вклад в заболеваемость и смертность. Биопленочные инфекции *E. faecalis* чрезвычайно трудно поддаются лечению на имплантированных медицинских устройствах [40].

Исходя из этого, антибактериальное покрытие нанесенное на имплант может решить проблему перипротезных инфекций, вызванных образованием микробных биопленок на поверхности.

1.3 Способы снижения риска развития перипротезных инфекций

Инфекции, связанные с имплантатами, как известно, трудно поддаются лечению, поэтому важны первые несколько дней после операции, так как они являются наиболее критическим временем для предотвращения этих инфекций. Полное уничтожение микроорганизмов наиболее предпочтительный путь в послеоперационный период. Это важно для пациентов с нарушением иммунной системой, так как они подвергаются более высокому риску осложнений.

Трудность лечения многих бактериальных инфекций связана с формированием на поверхности имплантата микробных биоплёнок, которое начинается сразу после адгезии бактерий. Биопленки - это сложное сообщество микроорганизмов, встроенных во внеклеточный матрикс, который образуется на поверхностях. Местная доставка необходима для достижения полного уничтожения бактерий в биопленке с целью получения новых средств целенаправленной доставки лекарственных веществ к очагу инфекции и разработки антибактериальных покрытий для имплантатов [19].

В настоящее время для доставки лекарственных средств используются различные биodeградируемые полимеры, а в качестве действующего вещества могут применены препараты с антибактериальным действием [16].

1.3.1 Биodeградируемые полимеры как матрицы для лекарственных препаратов

Для локального применения антибактериальных препаратов разрабатываются специальные полимерные покрытия, с целью максимизации биологической доступности лекарственных средств с минимальными побочными эффектами, наносимые на имплант, которые служат матрицей для антибиотика. Данные полимеры биоразлагаемы, они обеспечивают контролируемое или пролонгированное высвобождение лекарственных

средств из полимерной матрицы. Время биodeградации того или иного полимера зависит от его состава и происхождения. Также данные материалы могут быть использованы как покрытие для эндопротезов с целью предотвращения ингибирования бактериальной адгезии и образования биопленки на материале.

В качестве биоразлагаемой матрицы широко применяются оксипроизводные монокарбоновые кислоты. Цепи этих полимеров образованы повторяющимися остатками короткоцепочечных кислот, в число которых входят молочная (PLA) и гликолиевая (PGA).

Полигликолид (PGA) – это линейный полимер гликолевой кислоты. Гликолевая кислота вырабатывается в процессе нормального обмена веществ в организме и известна как гидроксипропановая кислота[1]. PGA – это объемный деградирующий полимер с низкой растворимостью в воде. Дegradация PGA *in vivo* заключается в следующем: деградация и потеря прочности материала происходит примерно через 1-2 месяца, с полной деградацией общей массы к 6 месяцам[14]. PGA представляет высокое кристаллизованное соединение (45-55%), с температурой плавления 220-225°C и температурой перехода в стекловидное состояние порядка 35-40 °C. Его высокая кристаллизованность является основным фактором, приводящим к его низкой растворимости в органических растворителях. Полимер обладает относительно высокой прочностью. Нити PGA очень прочные, однако в силу их малой гибкости их практическое использование ограничивается применением в качестве армирующих структур либо в оплетке. Его нити очень прочные, но в организме он очень быстро разрушается, теряя до 50% прочности в течение 2 недель, период полной резорбции составляет 4 месяца[41].

Полилактид (PLA) это линейный алифатический полиэфир. Он синтезируется, начиная с молочной кислоты (LA; 2-гидроксипропановая кислота), которая представляет собой водорастворимый мономер, проявляющий две энантиомерные формы, а именно D и L изомеров.

L является изомером, представляющим интерес для биомедицинских применений, поскольку он участвует в клеточном метаболизме человеческого организма, это дает PLA внутреннюю биосовместимость, которая останавливает иммунные реакции. В среде *in vivo* L может быть либо включен в цикл Кребса, либо преобразован в гликоген в печени; в конечном итоге он выводится в виде воды и углекислого газа [28].

Поли(полилактид-ко-гликолиды) (PLGA) — это синтетический, биоразлагаемый полимер, который легко расщепляется *in vivo* путем гидролиза на молочную и гликолевую кислоты[25]. Эти мономеры биосовместимы и физиологически метаболизируются циклом трикарбоновой кислоты для окончательного выведения в легкие. PLGA в качестве носителя обладает минимальной системной токсичностью при использовании. PLGA сохраняет свойства обоих сополимеров, а также изменяя их состав и может получать разные продукты с определёнными биомеханическими характеристиками. Носители на основе PLGA теоретически обладают более эффективными специфическими для сайта свойствами доставки [32].

Биодеградируемые полимеры, особенно PLGA, используются, главным образом благодаря их хорошей биодеградируемости, биосовместимости и токсикологическим свойствам, в качестве систем доставки лекарственных средств в медицине и фармации.

1.3.2 Лекарственные препараты

Для лечения и профилактики перипротезных инфекций, применяются антимикробные лекарственные препараты. Подбор препаратов для лекарственных покрытий проводился на основе анализа главных возбудителей инфекционных возбудителей, представленных выше.

Ванкомицин – это трициклический гликопептидный антибиотик, был выделен в 1953 году из штамма *Amicolatopsis orientalis*, обнаруженного в образце почвы. Ванкомицин обладает как *in vitro*, так и *in vivo*

антибактериальной активностью в отношении клинически значимых патогенов *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Enterococcus spp.* и многих других видов грамположительных бактерий, которые являются этиологией тяжелых инфекций. В первую очередь используется в качестве средства для лечения для *Staphylococcus aureus* [2]. Антибиотик оказывает свое действие, образуя комплекс с липидом II бактериальной клеточной стенкой. Ванкомицин образует водородные связи с d-аланил -d-аланином, C-концевым пептидным мотивом предшественника пептидогликанов, предотвращая синтез и полимеризацию N-ацетилмурамовой кислоты и N-ацетилглюкозамина [35]. Ингибирует клеточную стенку, ее формирование и повышает проницаемость, нарушает синтез РНК. Оно ослабляет стенки бактериальных клеток и вызывает утечку внутриклеточных компонентов, это приводит к гибели бактериальных клеток [23].

Аминогликозиды представляют собой сложное семейство соединений, характеризующихся наличием аминоциклитового ядра, связанного с аминсахарами через гликозидные связи. Аминогликозиды в основном используются при лечении инфекций, вызванных грамотрицательными аэробными палочками, стафилококками и другими грамположительными микроорганизмами (в том числе *Staphylococcus* spp., устойчивый к пенициллину, метициллину). Однако при применении против грамположительных микроорганизмов аминогликозиды рекомендуются в комбинации с другими антибиотиками, такими как β -лактамы или ванкомицин, с которыми они оказывают синергический эффект, вероятно, за счет усиленного поглощения. Наиболее широко используемым аминогликозидом является амикацин, который является рефрактерным к большинству ферментов, модифицирующих аминогликозиды [39].

Амикацин – полусинтетический антибиотик широкого спектра действия из группы аминогликозидов. Действие основано на связи с 30S-рибосомами бактерий, что препятствует образованию матричной и транспортной РНК, тем самым блокируя синтез белка в бактериальной

клетке. Также способен негативно воздействовать на цитоплазматические мембраны бактерий. Амикацин отдельно или в комбинации с другими антибиотиками используется для лечения различных серьезных инфекций, вызываемых аэробными грамотрицательными бактериями, а также микобактериями [38].

Гентамицин – это аминогликозидный антибиотик, используемый при лечении грамотрицательных инфекций. Наиболее часто данный препарат применяют при лечении бактерий семейств Enterobacteriaceae (например, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia spp.* и *Enterobacter spp.*). Механизм действия начинается с прохождения гентамицина через грамотрицательную мембрану в активном кислородзависимом транспорте. Существует необходимость в кислороде, поэтому аминогликозиды не эффективны в отношении анаэробных бактерий.

Попав в цитоплазму, гентамицин и другие аминогликозиды связываются с 16s рРНК в 30s рибосомной субъединице, нарушая трансляцию мРНК, приводя к образованию усеченных или нефункциональных белков. Механизм бактерицидной активности гентамицина до сих пор полностью не выяснена, но предполагается, что нефункциональные белки помещаются в клеточную стенку, нарушая ее непроницаемость, в то время как существует другое предположение, что накопление активных форм кислорода, как следствие истощения белков, участвующих в окислительно-восстановительных реакциях, может привести к гибели бактерий [29].

Меропенем – новое антибактериальное средство с широким спектром действия против грамотрицательных, грамположительных, аэробных и анаэробных бактерий, включая метициллин-чувствительный *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*, *Enterococcus faecalis*, *Enterobacteriaceae*, фекальные бактерии, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, *Acinetobacter spp.*, *Hemophilus influenzae* и *Bacteroides fragilis*. Меропенем

устойчив к гидролизу большинством бета-лактамаз, продуцируемых грамотрицательными и грамположительными бактериями (в том числе пенициллиназы и цефалоспорины). Препарат оказывает свое бактерицидное действие, связываясь с пенициллин-связывающими белками в клеточной стенке бактерий и ингибируя сшивку пептидогликанов, связанную с синтезом клеточной стенки, что в конечном итоге приводит к гибели клеток.

Ципрофлоксацин – антибактериальный препарат широкого спектра действия из группы фторхинолонов. Препарат ингибирует фермент ДНК-гиразу бактерий, вследствие чего нарушаются репликация ДНК и синтез клеточных белков бактерий. Ципрофлоксацин действует как на размножающиеся микроорганизмы, так и на находящиеся в фазе покоя.

Наиболее важное значение для медицинской практики имеет высокая активность ципрофлоксацина в отношении практически всех патогенных и условнопатогенных грамотрицательных аэробных бактерий и стафилококков (Например, *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Citrobacter spp.*, *Enterobacter spp.* и другие.).

1.4 Гематологические показатели крови, применяемые для оценки безопасности покрытия

Имплантируемые биоматериалы оказывают длительное воздействие на ткани или на весь организм в целом. Местное применение антибактериального препарата обеспечивает повышение его концентрации в зоне предполагаемого инфекционного осложнения, снижает риск образования микроорганизмов. Обязательным этапом исследования материалов, медицинских изделий – является оценка их воздействия на организм животного, в том числе токсического, в ходе этой оценки мы исследуем гематологические параметры. Гематологические показатели являются важным критерием, так как кровь объединяет работу множества

физиологических систем организма. Лейкоциты служат индикатором физиологической нормы, а их динамика может свидетельствовать о развитии патологических процессов. Эритроцит являются не менее важным составляющим компонентом крови, который участвует в насыщении тканей кислородом, так как необходимым для интенсивности процессов регенерации в коже. В таблице приводятся нормальные значения гематологических показателей крови для крыс (таблица 3). Для получения достоверных результатов анализ крови проводится рано утром, строго натощак.

Таблица 3 – Нормальные показатели гематологии и гемостаза у беспородных крыс

Показатель	Единицы измерения	Норма у самцов	Норма у самок
Гемоглобин	г/л	118±4	129±3
Гематокрит	%	40±2	32±2
АЧТВ	сек.	19±1	17±1
ПВ	сек.	22±1	20±1
СОЕ	мм/час	2,0±0,1	2,3±0,1
Тромбоциты	*10 ⁹ /л	562±18	518±14
Эритроциты	*10 ¹² /л	8,3±0,5	7,0±0,5
Лейкоциты	*10 ⁹ /л	7,1±0,3	6,8 ±0,5
Лимфоциты	%	63±2	65±5
МID (эозинофилы, моноциты)	%	4,7±0,7	1,8±0,5
Гранулоциты (нейтрофилы, эозинофилы и базофилы)	%	25,8±2	33±5

Гемоглобин. Повышение уровня гемоглобина может наблюдаться при эритроцитозе, сгущении крови, врожденных пороках сердца, кишечной непроходимости, ожогах, сердечно-легочной недостаточности. Повышение гемоглобина в крови происходит после физической нагрузки, при гипоксии. Анемия может развиваться в результате потери гемоглобина при кровотечениях, при заболеваниях крови, сопровождающихся разрушением эритроцитов. Низкий гемоглобин возникает вследствие переливания крови.

Гематокрит. Снижение гематокрита свидетельствует об анемии. Также может быть вызван гиперпротеинемией или гипергидратацией. Повышение гематокрита происходит при эритремиях. Повышенный гематокрит, сопровождающийся усиленным синтезом эритропоэтина, может свидетельствовать о новообразованиях в почках, поликистозе и гидронефрозе почек. Уменьшение объема жидкой фазы крови может произойти при ожоговой болезни, перитоните, дегидратации организма, а также при лейкозах.

Активированное частичное (парциальное) тромбопластиновое время (АЧТВ). Удлинение АЧТВ выше нормальных значений свидетельствует о гипокоагуляции (склонности к кровотечениям) и может быть вызвано: введением гепарина, тяжелыми заболеваниями печени, при которых нарушается синтез белков, участвующих в свертывании крови, недостатком витамина К, врожденным дефицитом некоторых факторов свертывания крови, антифосфолипидным синдромом. Укорочение АЧТВ свидетельствует об ускорении образования протромбиназы по внутреннему механизму и рассматривается как фактор повышенного тромбообразования и может быть связано с: тромбозами любой локализации, некоторыми наследственными заболеваниями, наступлением первой стадии ДВС-синдрома.

Протромбиновое время (ПВ). Удлинение протромбинового времени отмечается при дефиците факторов, определяющих образование протромбиназы по внешнему пути. Наблюдается при недостатке факторов превращающих протромбин в тромбин (X, V, II), а также

при приеме непрямых антикоагулянтов, тяжелых поражениях паренхимы печени, недостаточности витамина К. Уменьшение протромбинового времени (укорочение ПВ) - свидетельство гиперкоагуляции, которое наблюдается при тромботических состояниях.

Скорость оседания эритроцитов (СОЭ). Наиболее частой причиной повышения СОЭ является увеличение содержания в плазме крупнодисперсных белков, а также уменьшение содержания альбуминов. Повышение СОЭ может быть связано с инфекциями, воспалительными заболеваниями, деструкцией тканей, злокачественными опухолями, парапротеинемиями, при инфаркте миокарда, пневмонии, заболеваниях печени и др. Также повышение СОЭ может наблюдаться при коллагенозах, заболеваниях эндокринной системы, анемии, травмах, а также при беременности. Снижению СОЭ способствуют три основных фактора: сгущение крови, ацидоз и гипербилирубинемия. Причиной понижения значения СОЭ может быть: полицитемия, серповидноклеточная анемия, сфероцитоз, гипофибриногенемия, гипербилирубинемия, голодание, снижение мышечной массы, прием кортикостероидов, беременность, гипергидратация, миодистрофии, выраженные явления недостаточности кровообращения.

Тромбоциты. Снижение тромбоцитов может быть вызвано повышенным потреблением тромбоцитов или иммунными нарушениями, из-за которых тромбоциты частично перестают вырабатываться или имеют неправильную структуру. Повышение тромбоцитов чаще всего вызвано сгущением крови.

Эритроциты. К физиологическому увеличению количества эритроцитов могут приводить интенсивные физические нагрузки, стрессы, обезвоживание, обильное потребление жидкости. Повышение эритроцитов наблюдается при заболеваниях крови, кислородном голодании, заболеваниях легких, врожденные пороки сердца, обезвоживание, недостаточность функции коры надпочечников. Понижение эритроцитов говорит

окровопотере, гемолизе, дефиците железа, дефиците витамина В-12, дефиците фолиевой кислоты.

Лимфоциты. Повышение лимфоцитов (лимфоцитоз) может говорить об инфекционных заболеваниях, бактериальных инфекциях, аутоиммунных заболеваниях, аллергических реакциях, появлении и росте злокачественных и доброкачественных опухолей и новообразований. Причиной понижения лимфоцитов (лимфопения) считаются инфекционные и аутоиммунные заболевания, злокачественные болезни крови, продолжительный стресс, может наблюдаться при дефиците белка.

Лейкоциты. Повышение уровня лейкоцитов может говорить о воспалении. Снижение уровня лейкоцитов является признаком угнетения кроветворения, истощения организма и иммунодефицита.

MID (эозинофилы, моноциты). MID увеличивается при повышении количества одной из групп клеток, входящих в его состав. Причиной повышения моноцитов часто становятся вирусные заболевания, такие как мононуклеоз, цитомегаловирусная инфекция. Моноциты могут повышаться при некоторых онкологических заболеваниях, а также раке крови. Уровень иммунных клеток растет также при тяжелых формах туберкулеза, сифилисе и ревматоидном артрите. Наиболее частыми причинами увеличения количества эозинофилов, а вместе с ними и ростом показателя MID являются паразитарные заболевания, лямблиоз, а также аллергические патологии (атопические и контактный дерматит, бронхиальная астма, крапивница). Уменьшение MID чаще всего наблюдается при снижении числа эозинофилов и моноцитов. К нему могут приводить такие патологии как: апластическая и гипопластическая анемия, лейкоз, лимфогранулематоз, лимфома. Содержание смеси моноцитов, эозинофилов и базофилов уменьшается при приеме цитостатиков, стероидов, иммуносупрессоров.

Гранулоциты. Для определения характера изменений, как правило, изучают процентное соотношение каждого вида клеток. Гранулоциты, как правило, повышены при наличии воспаления в организме. Снижение уровня

гранулоцитов встречается при апластической анемии, после приема некоторых лекарств, а также при системной красной волчанке [24].

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материалы исследования

Для удобства изучения свойств антибактериального покрытия для имплантируемых медицинских изделий из титана в качестве объектов исследования использовали титановые блоки диаметром 6 мм и высотой 1 мм. Нанесение антибактериального покрытия проводилось путем ультразвукового напыления раствора, содержащего ванкомицин и биоразлагаемый полимер полилактид-ко-гликолид с соотношением сополимеров (50:50, 65:35, 75:25, 85:15), на поверхность блока с последующей сушкой и аэрацией при комнатной температуре в течение 48 часов и стерилизацией окисью этилена.

Опытная группа 1: PLGA (50:50) в качестве матрицы ($M \pm m$, $n=10$);

Опытная группа 2: PLGA (65:35) в качестве матрицы ($M \pm m$, $n=10$);

Опытная группа 3: PLGA (75:25) в качестве матрицы ($M \pm m$, $n=10$);

Опытная группа 4: PLGA (85:15) в качестве матрицы ($M \pm m$, $n=10$).

В качестве контрольной группы выступали титановые блоки того же размера, но не имеющие покрытия.

Итоговое содержание ванкомицина на титановых блоках составила 30 ± 5 мкг на 1 мм^2 поверхности.

2.2 Методы исследования

Для достижения поставленных целей работы были использованы следующие методы:

- Диско-диффузионный метод;
- Спектрофотометрический метод;
- Общий анализ крови лабораторных животных.

2.2.1 Оценка антибактериального действия диско-диффузионным методом

Оценка антибактериального эффекта покрытия для имплантируемых медицинских изделий из титана по отношению к грамположительным микроорганизмам проводилась по стандартной методике диско-диффузионным методом. Выбор штаммов обусловлен частотой их встречаемости в качестве возбудителей перипротезных инфекционных осложнений. Были выращены культуры *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus epidermidis*.

Этот метод основан на том, что пропитанный антибиотиком диск, помещенный на плотную питательную среду, предварительно инокулированный тестируемой бактерией, антибиотик с диска диффундирует радиально наружу через агаровую среду, создавая градиент концентрации антибиотика. Концентрация антибиотика на краю диска высока и постепенно уменьшается по мере увеличения расстояния от диска до точки, где он больше не является ингибитором. Вокруг диска антибиотика после инкубации образуется прозрачная зона или кольцо, если агент ингибирует рост бактерий.

В качестве носителя антибактериального препарата использовали титановые блоки. Инокулят (в концентрации 10^6 КОЕ/мл) для дискового диффузионного метода культивировали на поверхности агара Мюллера-Хинтона при температуре 35-37°C, в течение 18-24 часов.

С помощью пинцета проводили аппликацию блоков. Расположение титановых блоков до края чашки и между должно быть не ближе 15-20 мм. Чтобы обеспечить плотный контакт между титановым блоком и поверхностью агара их необходимо прижать пинцетом. Важно не перемещать блок после того, как он соприкоснулся с поверхностью агара, так как некоторая диффузия препарата может происходить мгновенно. После

этого чашки Петри помещали в термостат кверху дном и инкубировали при температуре 37 °С в течение 18 часов.

Результаты оценивали по отсутствию или наличию роста микроорганизмов на поверхности питательной среды в чашке Петри. Диаметры зон ингибирования роста измеряли с точностью до 1 мм с помощью штангенциркуля. О наличии антибактериального эффекта судили по диаметру зоны ингибиции роста ≥ 15 мм. Оценка антибиотической активности производится согласно МУК 4.2.1890-04[18].

2.2.2 Исследование высвобождения лекарственного препарата спектрофотометрическим методом

Спектрофотометрический метод анализа основан на поглощении молекулами вещества монохроматического электромагнитного излучения в ультрафиолетовой (УФ) области спектра [22].

Была проведена оценка количества высвобождавшегося ванкомицина, определена способность полимера задерживать антибактериальное покрытие. При проведении исследования для каждого испытания была применена отдельная емкость для титановых блоков. Экспериментальные образцы полностью погружали в раствор [15].

Для изучения процессов гидролиза биполимера и оценки высвобождения лекарственных препаратов *in vitro* в качестве модельной биологической жидкости использовали 0,1М фосфатный буферный раствор pH 7,4 (ГОСТ ISO 10993-12-2011 [7]).

Анализ содержания ванкомицина определяли методом спектрофотометрии на длине волны 280 нм в кювете с длиной оптического пути 1см. После инкубации в фосфатном буфере содержание ванкомицина определяли путем растворения покрытия в смеси вода:хлороформ в течение 30 минут и последующего анализа полученного раствора

спектрофотометрическим методом на длине волны 280 нм в кювете при длине оптического пути 1 см [11].

Для построения калибровочного графика готовили серию стандартных растворов ванкомицина в воде (таблица 3, рис.2).

Таблица 3– Стандартные растворы ванкомицина в воде

№	V воды, мл	V ванкомицина, мл	C, мкг/мл	ΔD
1	0,94	0,06	6	0,03
2	0,88	0,12	12	0,04
3	0,82	0,18	18	0,07
4	0,76	0,24	24	0,09
5	0,7	0,3	30	0,1
6	0,64	0,36	36	0,13
7	0,58	0,42	42	0,15
8	0,52	0,48	48	0,17
9	0,46	0,54	54	0,2
10	0,4	0,6	60	0,21
11	0,3	0,7	70	0,25
12	0,2	0,8	80	0,3
13	0,1	0,9	90	0,34
14	0	1	100	0,37
15	1	0	0	0

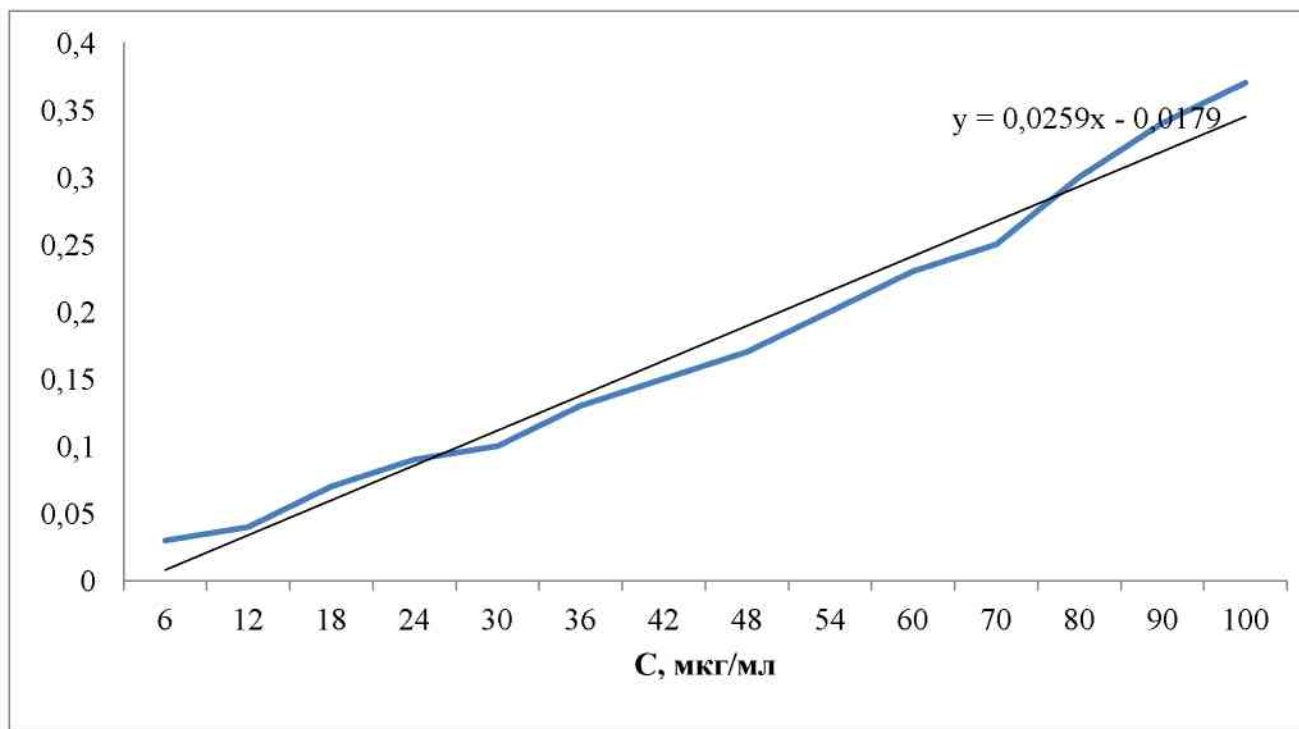


Рисунок 2. Калибровка по ванкомицину, $\lambda=280$ нм

Каждый экспериментальный образец выдерживался в 10 мл раствора при 37°C в течение 8 недель, замену буфера производили каждые 24 часа. Постоянство температуры обеспечивалось термостатом электрическим суховоздушным ТС-1/80 СПУ (Россия). Реактивы, используемые для приготовления растворов, соответствовали классификации «хч». Приготовление растворов проводили путем растворения точной навески, взвешенной на электронных весах GR-200 (Япония) с классом точности I (ГОСТ Р 53228-2008[5]), в мерной колбе необходимого объема. Для контроля pH использовали pH-метр pH-410 (Аквилон, Россия). В ходе эксперимента для определения высвобождения ванкомицина в раствор отбирались каждую неделю, высушивались в термошкафу при 37°C и хранились в холодильнике. Затем образцы растворялись в смеси вода:хлороформ, время экстракции 30 минут. Содержание ванкомицина определяли методом УФ-спектроскопии на длине волны 280 нм в кювете с длиной оптического пути 1 см [21].

2.2.3 Исследования гематологических показателей после имплантации титановых блоков с антибактериальным покрытием.

Исследование проводилось на 20 особях белых беспородных крысах массой 250-300 г в возрасте 12 недель. Перед операцией животные прошли карантин и акклиматизацию в условиях вивария, при свободном доступе к воде и пище и сменой светового режима каждые 12 часов, в течение 14 дней [8]. Условия содержания животных и проведения экспериментов *in vivo* соответствовали ГОСТ Р ИСО 10993-2 «Требования к обращению с животными» [9].

Для эксперимента были сформированы две группы (10 особей в каждой группе: 5 самцов и 5 самок):

- опытная (n=10), в которой животные подверглась оперативному вмешательству с имплантацией опытного образца с антибактериальным покрытием;
- контрольная (n=10), в которой животным проводилась операция блоков без антибактериального покрытия;

Оперативное вмешательство проводилось в стерильных условиях по стандартной методике в соответствии с ГОСТР ИСО 10993-6-2011 [10].

Оперативное вмешательство проводили с применением наркоза. Для этого применялись растворы тилетамина гидрохлорида, золазепам гидрохлорида (6 мг/кг, золетил 100 VirbacSanteAnimale, Франция) и ксилазина гидрохлорида (10 мг/кг, рометар, Bioveta, Чешская Республика). Для имплантации титанового блока делали разрезы и с помощью шпателя формировали подкожные карманы, отделяя подкожные ткани от мышечного слоя. В сформированные вдоль средней линии спины карманы крысам из опытных групп имплантировали титановые блоки, диаметром 6 мм и высотой 1 мм, с биополимером и соответствующей концентрацией ванкомицина в покрытии; крысам из контрольной группы – титановые блоки без покрытия [13].

В ходе исследования осуществлялся контроль гематологических показателей крыс до имплантации и через 1, 4 недели и 3 месяца после имплантации титановых блоков с антибактериальным покрытием. Забор крови для исследований осуществлялся из хвостовой вены в пробирки. Предварительно в пробирку добавлялся антикоагулянт содержащий ЭДТА.

Гематологическое исследование проводили с использованием анализатора BC-2800 Vet Auto Hematology Analyzer (Mindray, Китай) [6].

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Результаты оценки антибактериального действия лекарственного покрытия

Результаты испытаний антибиотической активности по отношению к тестовым культурам бактерий: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis* представлены в таблице 4.

Таблица 4– Антибиотическая активность

Вид бактериальной культуры	Зона задержки роста, мм
<i>Staphylococcus aureus</i>	30±
<i>Enterococcus faecalis</i>	26±
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	32±

Согласно полученным данным наблюдается подавления роста, в ходе эксперимента были получены диаметры зоны ингибиции, размером более 15 мм, что говорит о наличии антибактериального эффекта у лекарственного покрытия. Ванкомицин действует бактерицидно в отношении аэробных грамположительных микроорганизмов. Полимер, входящий в состав лекарственного покрытия на антибактериальный эффект не влияет.

3.2 Результаты исследования высвобождения лекарственного препарата спектрофотометрическим методом

В ходе эксперимента были получены результаты исследования по изучению влияния типа полимера на время высвобождения лекарственного препарата из антибактериального покрытия *in vitro*. В связи с небольшой дозировкой лекарственного препарата в покрытии, и сложностью его детекции в модельном растворе оценку проводим по остаточному содержанию препарата (рис.3-6).

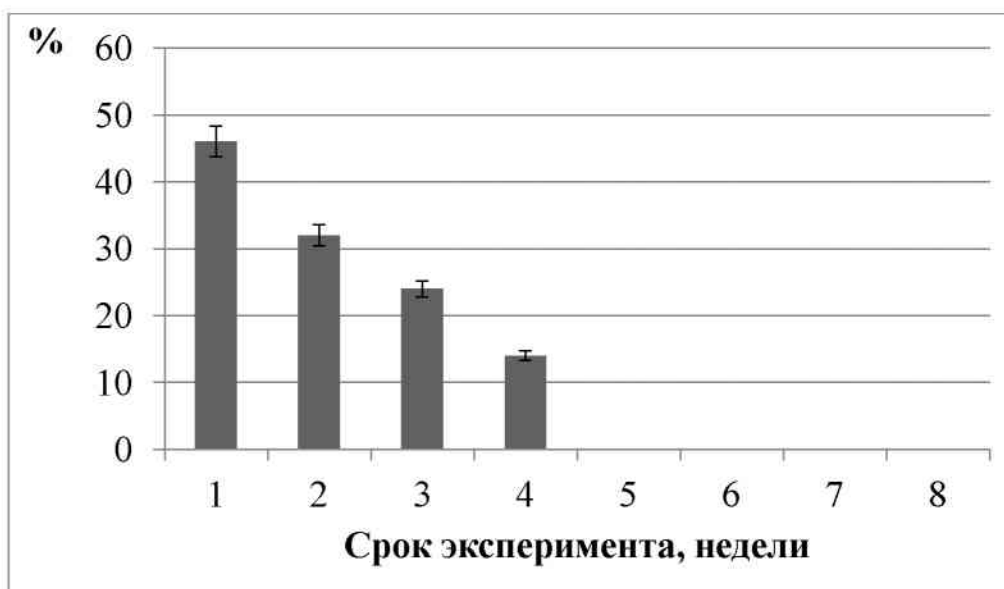


Рисунок 3. Остаточное содержание препарата в экспериментальных образцах с PLGA (50:50) в качестве матрицы на разных сроках эксперимента ($M \pm m$, $n=10$)

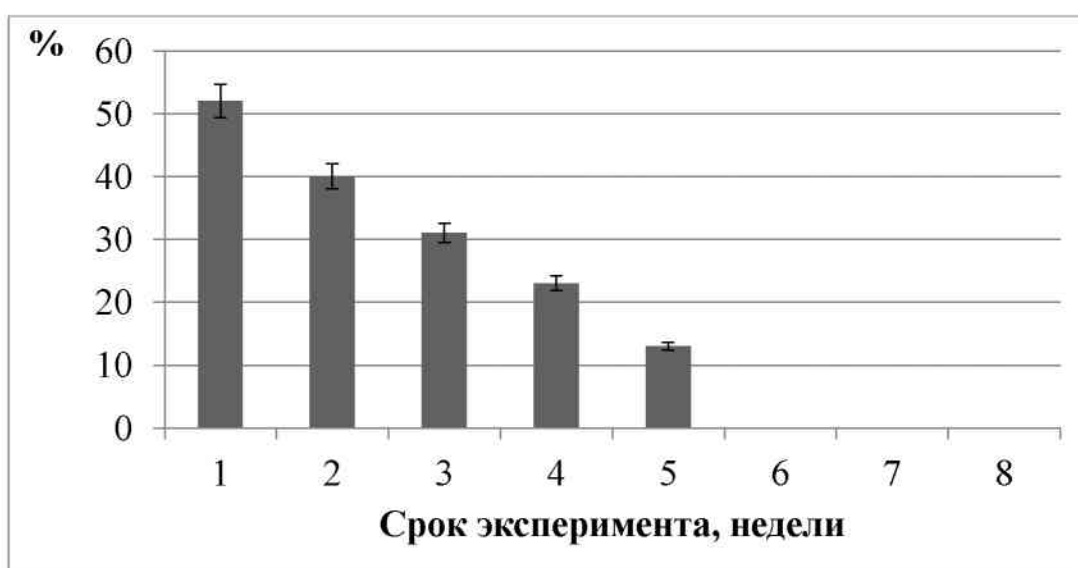


Рисунок 4. Остаточное содержание препарата в экспериментальных образцах с PLGA (65:35) в качестве матрицы на разных сроках эксперимента ($M \pm m$, $n=10$)

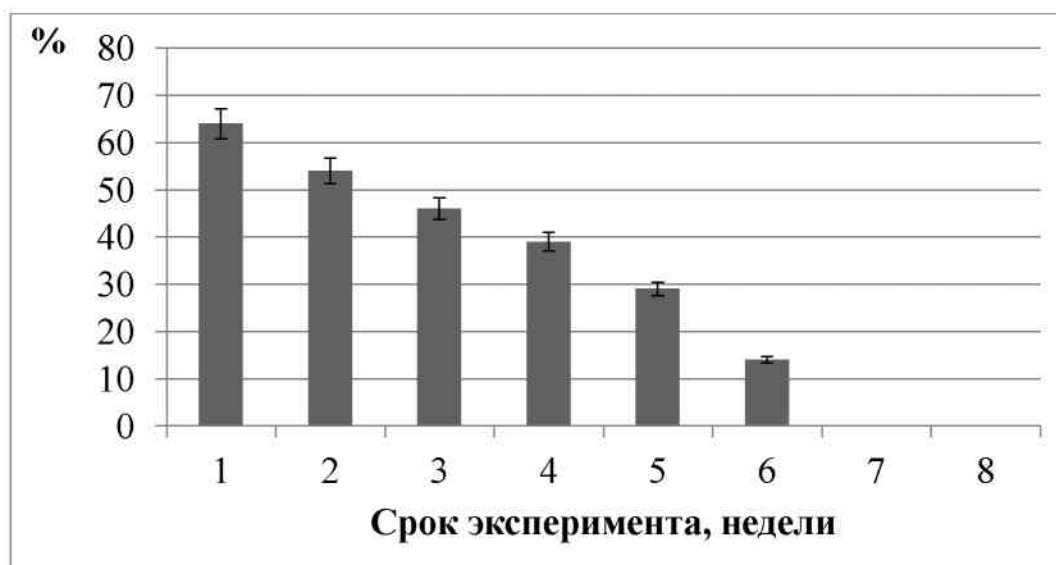


Рисунок 5. Остаточное содержание препарата в экспериментальных образцах с PLGA (75:25) в качестве матрицы на разных сроках эксперимента ($M \pm m$, $n=10$)

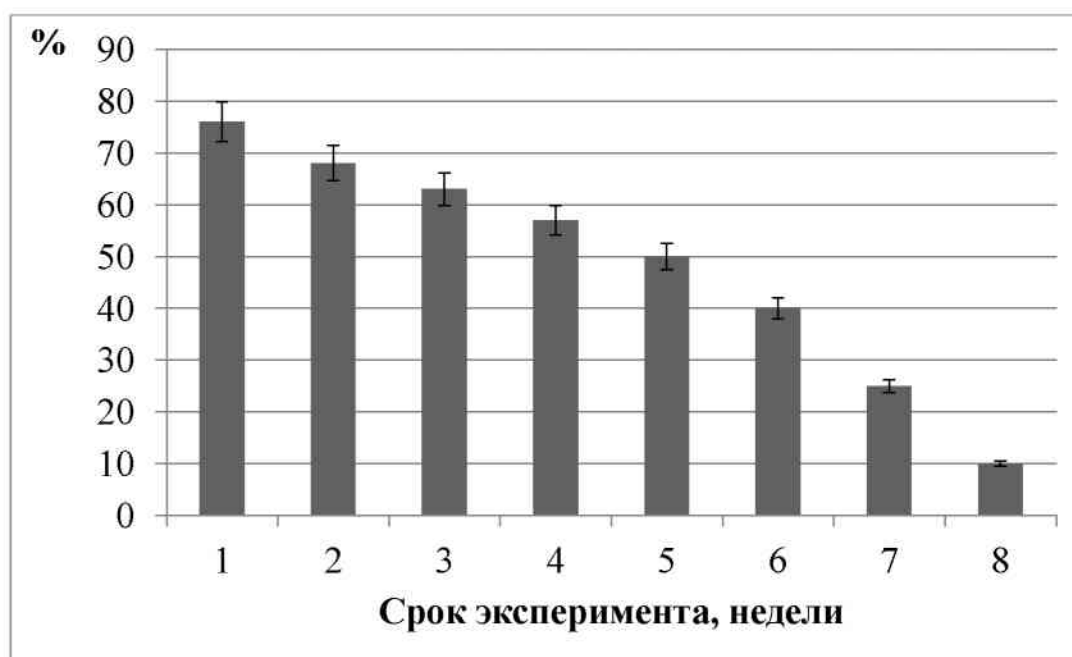


Рисунок 6. Остаточное содержание препарата в экспериментальных образцах с PLGA (85:15) в качестве матрицы на разных сроках эксперимента ($M \pm m$, $n=10$)

Были получены результаты, свидетельствующие о значительных изменениях сроков деградации покрытия и периодов высвобождения лекарственного препарата при использовании полимеров с разным

соотношением лактида и гликолида. При использовании в качестве матрицы для полимера PLGA (50:50) наблюдалось высвобождение препарата сроком до 5 недель, PLGA (65:35) – позволяет задержать препарат на поверхности титановых блоков на срок до 6 недель, PLGA (75:25) – до 7 недель. Максимальное сохранение лекарственного покрытия наблюдалось при использовании в качестве матрицы PLGA (85:15) – до 9 недель.

Таким образом, результаты эксперимента по изучению остаточного содержания ванкомицина в покрытии показывают зависимость типа полимера на срок дегарадации покрытия. Увеличение срока разрушения наблюдается при увеличении доли молочной кислоты.

Профили высвобождения антибактериального покрытия из экспериментальных образцов с PLGA (50:50), PLGA (65:35), PLGA (75:25) и PLGA (85:15) в качестве матриц (рис.7-10).

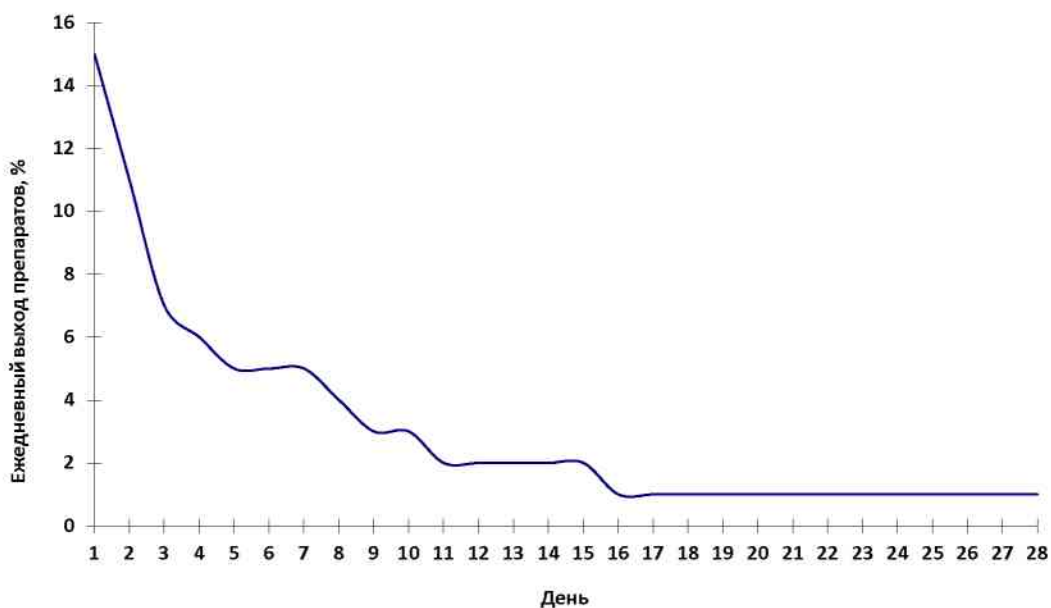


Рисунок 7. Профиль высвобождения препарата из экспериментальных образцов с PLGA (50:50) в качестве матрицы на разных сроках эксперимента ($M \pm m$, $n=10$)

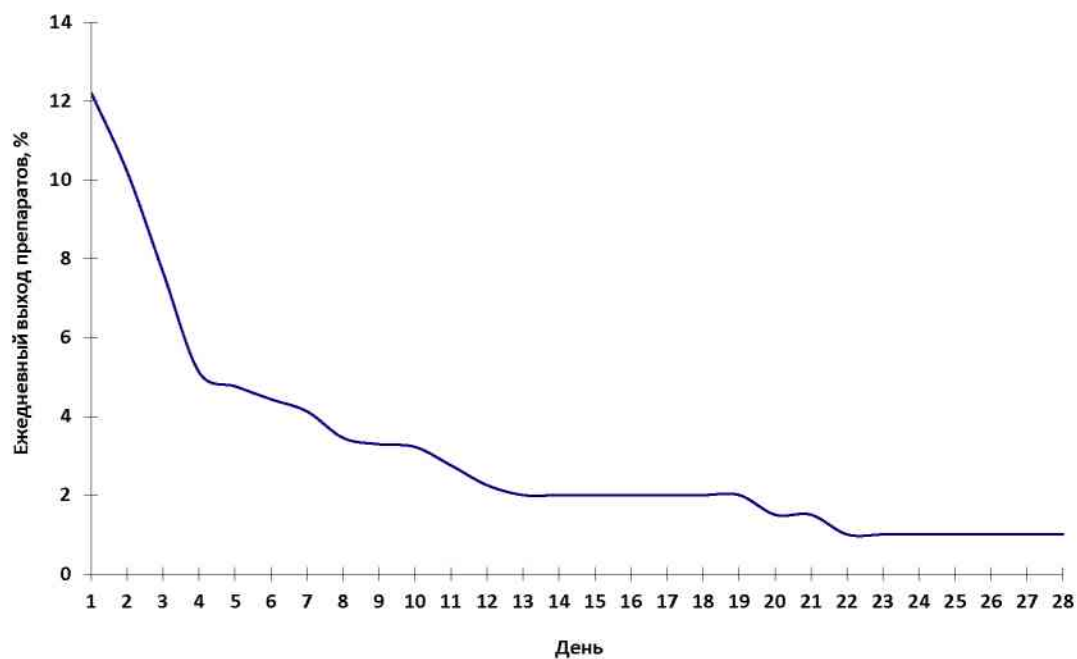


Рисунок 8. Профиль высвобождения препарата из экспериментальных образцов с PLGA (65:35) в качестве матрицы на разных сроках эксперимента ($M \pm m$, $n=10$)

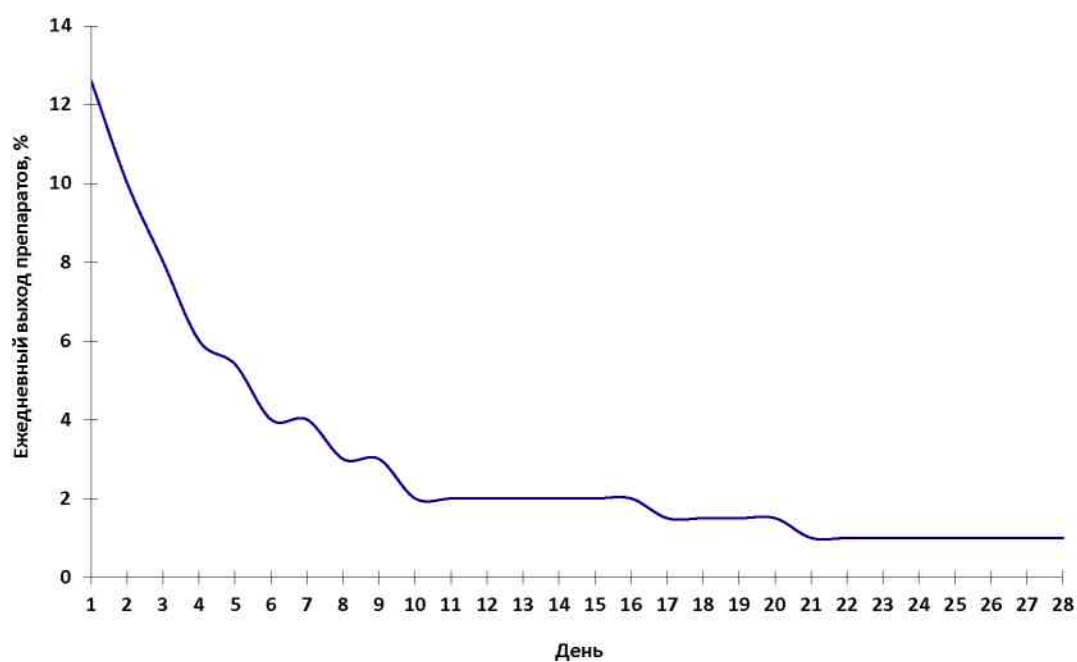


Рисунок 9. Профиль высвобождения препарата из экспериментальных образцов с PLGA (75:25) в качестве матрицы на разных сроках эксперимента ($M \pm m$, $n=10$)

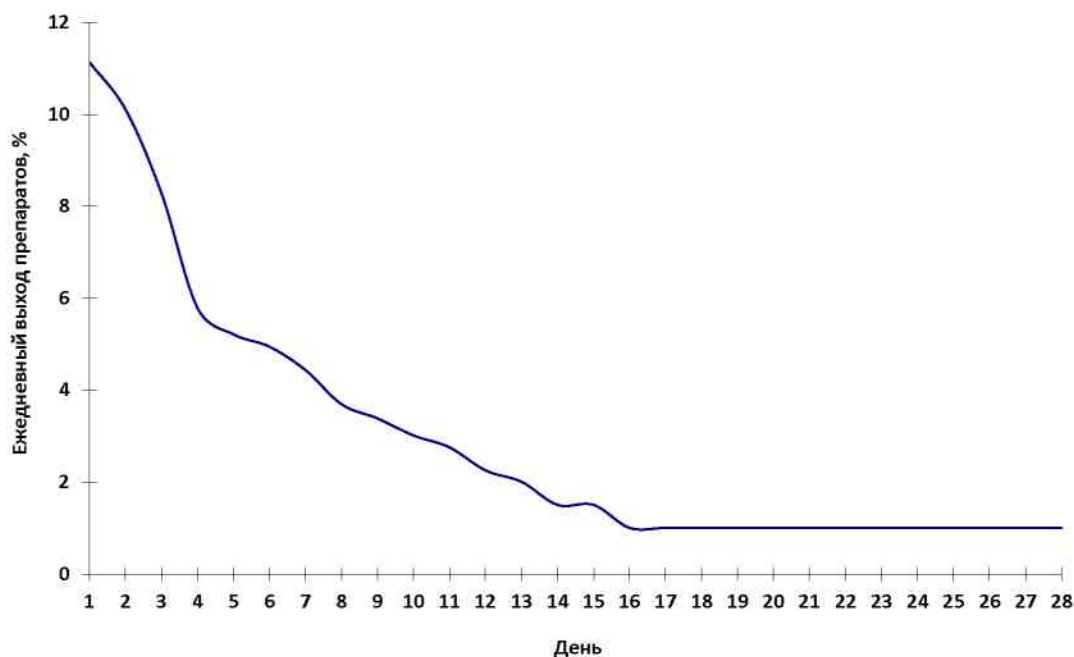


Рисунок 10. Профиль высвобождения препарата из экспериментальных образцов с PLGA (85:15) в качестве матрицы на разных сроках эксперимента ($M \pm m$, $n=10$)

Максимальное высвобождение лекарственного вещества наблюдается в первые сутки эксперимента во всех группах, вне зависимости от состава полимера. Далее ежедневный выход постепенно уменьшается, к концу первой недели достигает 1-3% от общего содержания, достигая минимальных значений. Суммарный выход составил для PLGA (50:50) – 87%, PLGA (65:35) – 83%, PLGA (75:25) – 80%, и PLGA (85:15) – 78%.

3.3 Результаты исследования гематологических показателей после имплантации титановых блоков с антибактериальным покрытием

В ходе исследования были изучены гематологические показатели крови беспородных крыс до и после подкожной имплантации титановых блоков с антибактериальным покрытием. Значимые отличия между значениями гематологических показателей крови самцов и самок выявлены не были. Получены показатели до имплантации, а также через 4 недели и 3 месяца после (таблица 5 и 6).

Таблица 5 – Гематологические показатели крыс до и после имплантации титановых блоков с антибактериальным покрытием на основе PLGA (50:50) и PLGA (65:25)

Показатель, единицы измерения	До имплант ации	После имплантации								
		1 неделя			4 недели			3 месяца		
		Опытная группа 1	Опытная группа 2	Контрольн ая группа	Опытная группа 1	Опытная группа 2	Контрольн ая группа	Опытная группа 1	Опытная группа 2	Контрольн ая группа
Гемоглобин, г/л	118±4	118±2,2	117±1,2	124±2,9	119±1,3	118±3,8	121±3,8	119±3,1	118±3,3	118±4
Гематокрит, %	40±2	41±3	41±4	42±2	40±3	41±2	41±1	40±2	40±3	40±2
Протромби- новое время, сек	22±1	20±1	21±2	22±2	21±2	21±2	22±1	22±1	22±1	23±1
АЧТВ, сек	19±1	20±1	21±1	21±1	18±1	19±1	20±1	19±1	19±1	19±1
Тромбоциты, *10 ⁹ /л	562±18	525±20	539±21	527±18	535±15	543±19	543±16	557±19	564±18	563±15
Эритроциты, *10 ¹² /л	8,3±0,4	8,1±0,5	8,2±0,6	8,1±0,5	8,2±0,4	8,2±0,6	8,2±0,5	8,3±0,3	8,2±0,3	8,3±0,3

Таблица 5 Продолжение

Лейкоциты, *10 ⁹ /л	7,1±0,1	12,3±0,7	12,8±0,5	11,7±0,7	7,2±0,4	7,8±0,5	7,9±0,5	7,1±0,2	7,1±0,1	7,2±0,1
Лимфоциты, %	65±0,5	52,7±1,7	52,9±1,5	52,2±2,1	60,3±0,5	62,1±0,8	62,8±0,7	63,5±0,7	65±0,5	64,6±0,4
Моноциты, %	6,5±0,3	4,2±0,4	4,3±0,5	4,0±0,5	4,8±0,3	5,4±0,3	5,1±0,5	6,5±0,3	6,2±0,4	6,4±0,5
Базофилы, %	0,7±0,1	0,8±0,1	0,8±0,1	0,9±0,1	0,8±0,1	0,7±0,1	0,8±0,1	0,7±0,1	0,7±0,1	0,7±0,1
Эозинофилы, %	2,0±0,1	2,2±0,2	2,1±0,1	2,2±0,2	2,2±0,2	2,1±0,1	2,1±0,1	2,1±0,2	2,1±0,1	2,0±0,1
Нейтрофилы, %	25,8±0, 4	38,9±0,7	39,4±0,6	40,2±0,7	29,2±0,3	27,8±0,4	32±0,7	26,1±0,5	25,3±0,7	26,1±0,3

Таблица 6 Гематологические показатели крыс до и после имплантации титановых блоков с антибактериальным покрытием на основе PLGA(75:25) и PLGA (85:15)

Показатель, единицы измерения	До имплант ации	После имплантации								
		1 неделя			4 недели			3 месяца		
		Опытная группа 3	Опытная группа 4	Контрольн ая группа	Опытная группа 3	Опытная группа 4	Контрольн ая группа	Опытная группа 3	Опытная группа 4	Контрольн ая группа
Гемоглобин, г/л	118±4	119±2,2	117±1,2	123±2,9	118±1,3	117±3,8	121±3,8	118±3	118±3,1	118±4
Гематокрит, %	40±2	41±4	41±3	42±2	41±3	40±3	41±1	40±1	40±2	40±2
Протромби- новое время, сек	22±1	21±1	20±2	22±1	21±2	21±2	22±1	22±1	23±1	23±1
АЧТВ, сек	19±1	18±1	20±1	21±1	19±1	20±1	20±1	19±1	19±1	19±1
Тромбоциты, *10 ⁹ /л	562±18	531±20	527±21	519±18	540±15	543±19	545±16	560±19	563±18	563±15
Эритроциты, *10 ¹² /л	8,3±0,4	8,2±0,5	8,1±0,6	8,1±0,5	8,2±0,4	8,3±0,6	8,2±0,5	8,3±0,7	8,2±0,4	8,3±0,3

Таблица 6 Продолжение

Лейкоциты, *10 ⁹ /л	7,1±0,1	12,9±0,7	13,8±0,5	12,7±0,7	7,8±0,4	8,2±0,5	8,0±0,5	7,1±0,2	7,1±0,1	7,2±0,1
Лимфоциты, %	65±0,5	51,7±1,7	50,9±2,5	51,2±2	61,3±0,6	63,1±0,9	62,9±0,6	63,5±0,7	66±0,3	64,6±0,4
Моноциты, %	6,5±0,3	4,2±0,4	4,3±0,5	4,0±0,5	4,8±0,3	5,4±0,3	5,1±0,5	6,5±0,3	6,2±0,4	6,4±0,4
Базофилы, %	0,7±0,1	0,7±0,1	0,8±0,1	0,9±0,1	0,8±0,1	0,7±0,4	0,7±0,3	0,7±0,2	0,7±0,1	0,7±0,1
Эозинофилы, %	2,0±0,1	2,1±0,2	2,2±0,1	2,2±0,2	2,1±0,2	2,1±0,2	2,1±0,1	2,1±0,2	2,1±0,1	2,0±0,1
Нейтрофилы, %	25,8±0,4	40,9±0,7	39,4±0,5	39,2±0,9	29,4±0,4	26,9±0,5	31±0,8	25,1±0,5	25,8±0,4	26,1±0,6

Гематологические параметры до имплантации, через 1, 4 недели и 3 месяца после имплантации титановых блоков с антибактериальным покрытием находятся в пределах физиологической нормы. Результаты, полученные через неделю после имплантации, говорят о незначительных отклонениях от нормальных значений, обусловленные воспалительным процессом, неизбежными после оперативного вмешательства.

В ходе эксперимента были выявлены отклонения значений некоторых показателей гематологических на разных послеоперационных сроках (рис. 11-16). Через 1 неделю после имплантации титановых блоков антибактериальным покрытием отмечено повышение уровня лейкоцитов на 88% в опытных группа 1 и 2 и на 76% в опытных группах 3 и 4. Уровня нейтрофилов на 52% в опытных группа 1 и 2 и на 56% в опытных группах 3 и 4. Отмечено снижение уровня лимфоцитов в 1 и 2, 3 и 4 опытных группах – на 22%. После 4 недель значения гематологических показателей приближались к дооперационным. Спустя 3 месяца после имплантации наблюдалось возвращение показателей к дооперационным значениям.

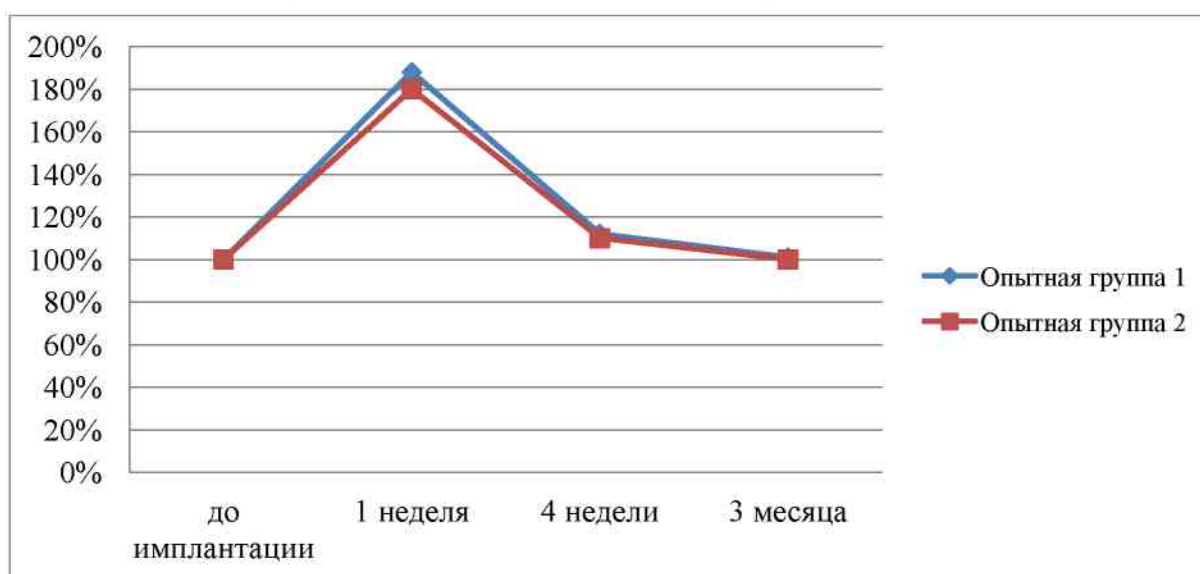


Рисунок 11. Динамика колебаний общего уровня лейкоцитов в крови крыс после подкожной имплантации титановых блоков с антибактериальным покрытием на основе PLGA (50:50) и PLGA (65:25) (опытные группы 1 и 2)

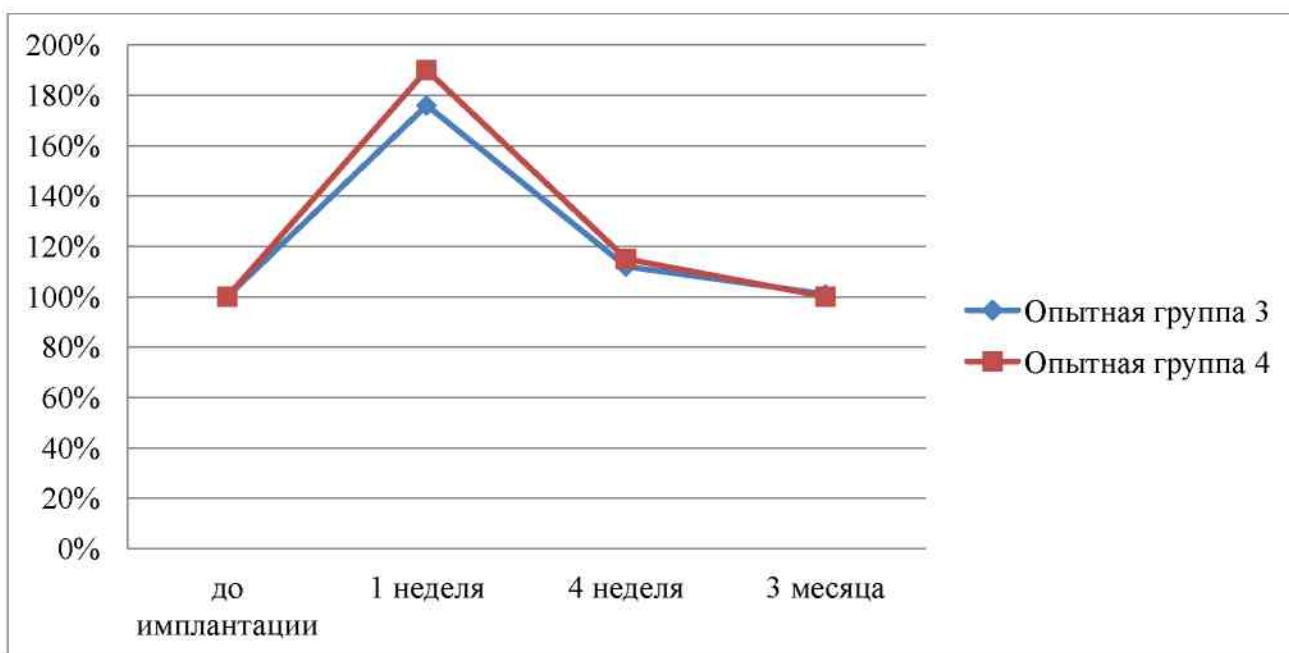


Рисунок 12. Динамика колебаний общего уровня лейкоцитов в крови крыс после подкожной имплантации титановых блоков с антибактериальным покрытием на основе PLGA (75:25) и PLGA (85:15) (опытные группы 3 и 4)

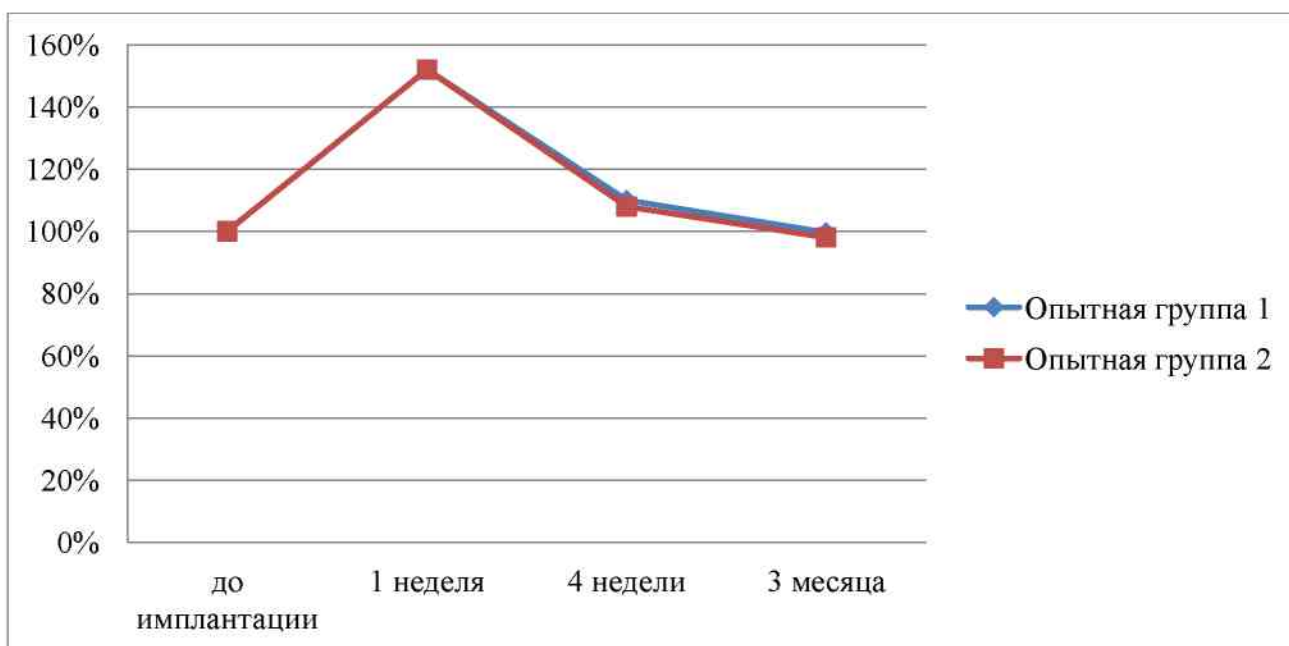


Рисунок 13. Динамика колебаний общего уровня нейтрофилов в крови крыс после подкожной имплантации титановых блоков с антибактериальным покрытием на основе PLGA (50:50) и PLGA (65:25) (опытные группы 1 и 2)

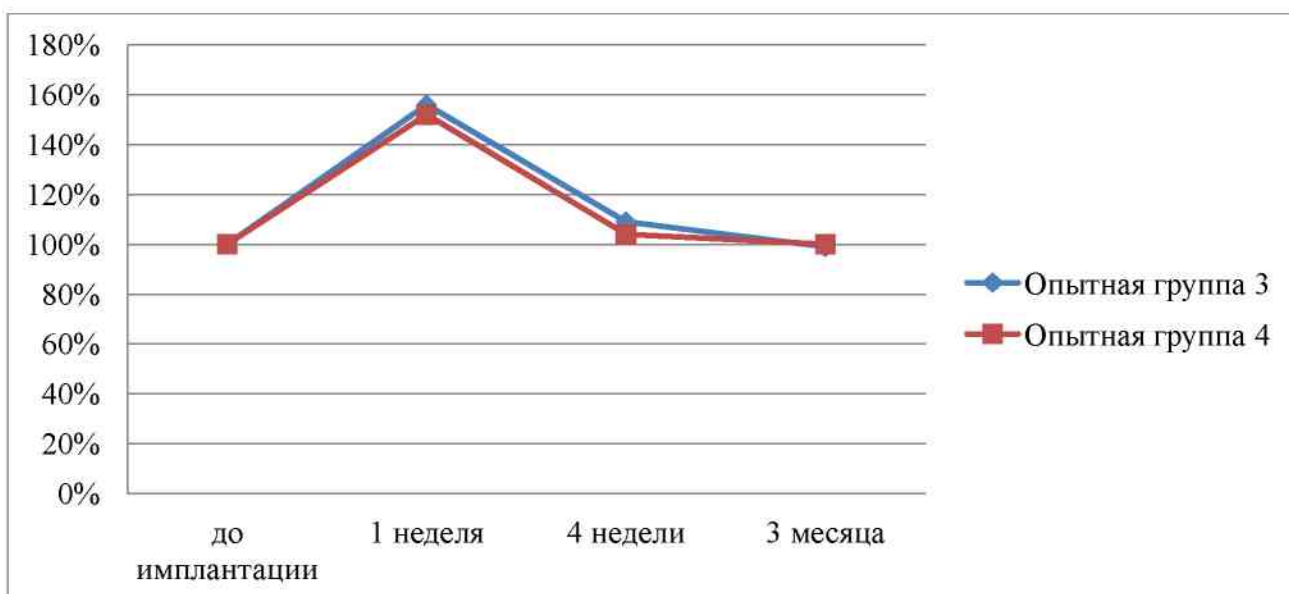


Рисунок 14. Динамика колебаний общего уровня нейтрофилов в крови крыс после подкожной имплантации титановых блоков с антибактериальным покрытием на основе PLGA (75:25) и PLGA (85:15) (опытные группы 3 и 4)

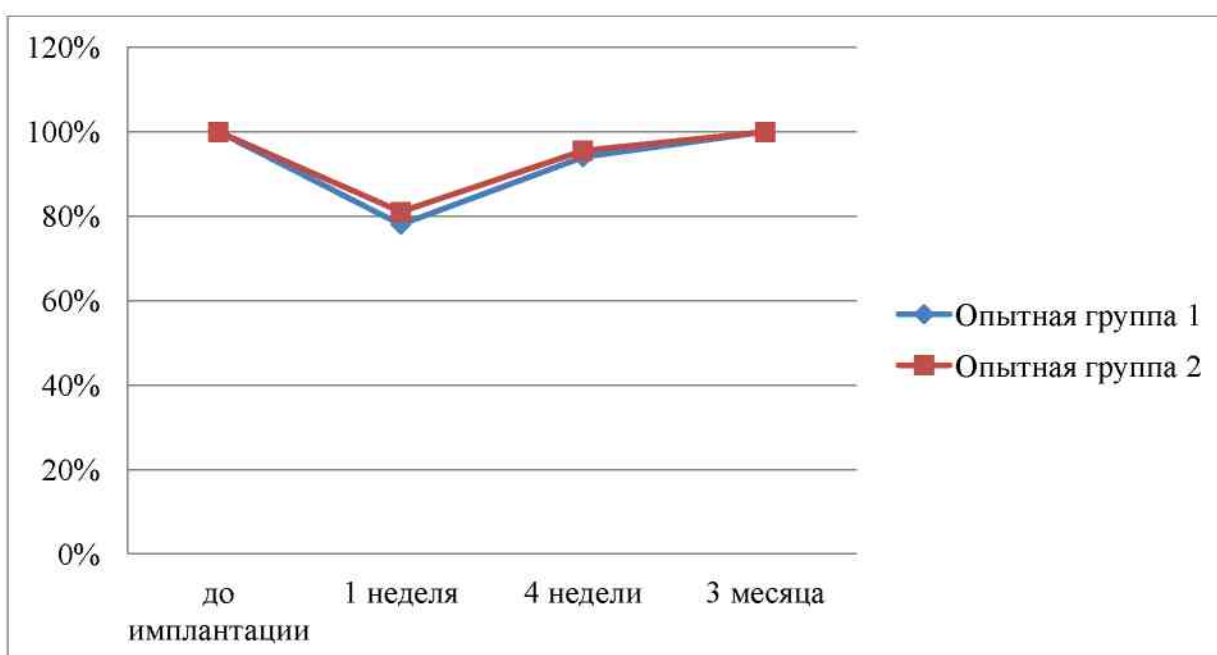


Рисунок 15. Динамика колебаний общего уровня лимфоцитов в крови крыс после подкожной имплантации титановых блоков с антибактериальным покрытием на основе PLGA (50:50) и PLGA (65:25) (опытные группы 1 и 2)

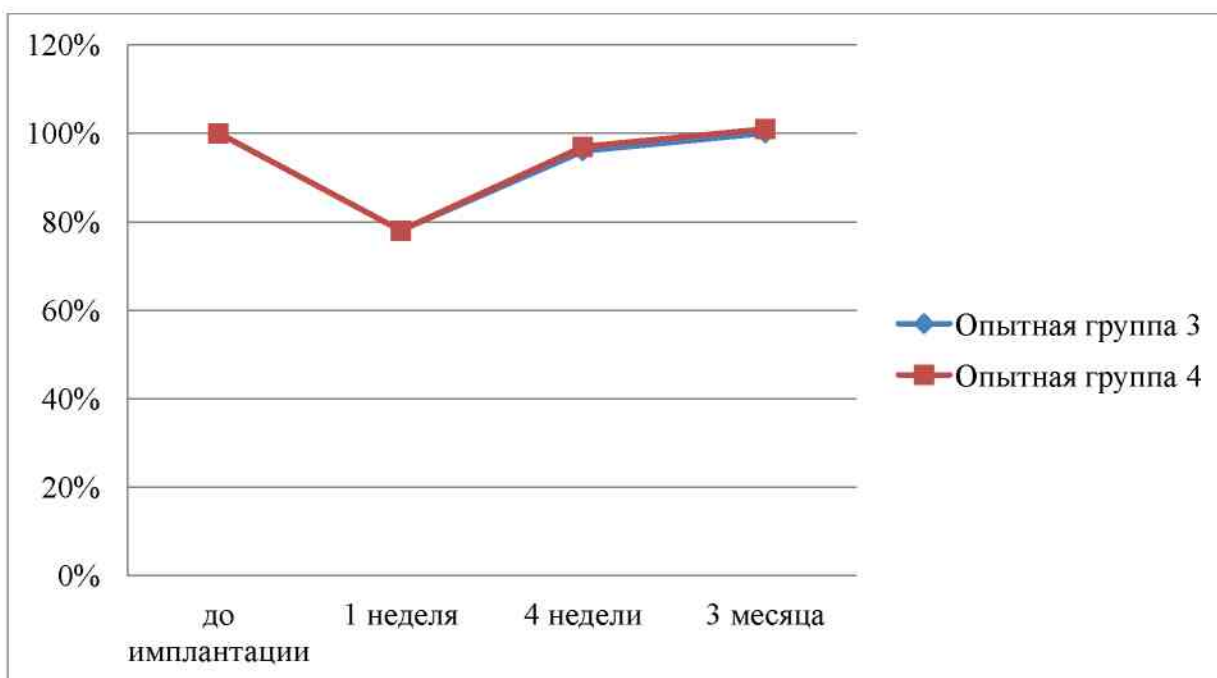


Рисунок 16. Динамика колебаний общего уровня лимфоцитов в крови крыс после подкожной имплантации титановых блоков с антибактериальным покрытием на основе PLGA (75:25) и PLGA (85:15) (опытные группы 3 и 4)

Лейкоцитоз возникает за счет увеличения количества нейтрофилов, что говорит о фагоцитозе и возникновения воспалительного ответа на имплантацию экспериментальных образцов. Снижение уровня лимфоцитов также говорит о воспалительном процессе. Возвращение на 3 месяц гематологических показателей, лейкоцитов, нейтрофилов и лимфоцитов в норму, свидетельствует о полном завершении регенерации организма после операции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в ходе выполнения бакалаврской работы были исследованы свойства антибактериального покрытия имплантируемых медицинских изделий из титана *in vitro* и *in vivo*: антибактериальное действия лекарственного покрытия титановых блоков, динамика высвобождения лекарственных препаратов из покрытия, влияние имплантации экспериментальных образцов на гематологические параметры крови мелких лабораторных животных.

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

1. Подготовлены экспериментальные образцы антибактериального покрытия для изделий из титана для 4 опытных групп. В качестве матриц использовались PLGA (50:50), PLGA (65:35), PLGA (75:25) и PLGA (85:15), а в качестве лекарственного препарата – ванкомицин. Покрытие осуществлялось ультразвуковым напылением, содержание ванкомицина на титановых блоках составила 30 ± 5 мкг на 1 мм^2 поверхности;

2. Установлено, с помощью диско-диффузионного метода, что антибактериальное покрытие на титановые блоки позволяет обеспечить антибиотическую активность по отношению к тестовым культурам бактерий: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, применение полимера в качестве носителя не влияет на антибактериальный эффект;

3. Оценка сроков высвобождения антибактериального препарата по остаточному содержанию показала, что тип полимера и процентное содержание в нём сополимеров влияют на время выхода препарата. Наиболее интенсивное выход препарата наблюдается в первые сутки эксперимента с последующим снижением. Применение с соотношением сополимеров молочной и гликолевой кислот 50:50 в качестве матрицы для ванкомицина позволяет задержать препарат на поверхности титановых блоков на срок до 4

недель, соотношением 65:35 – до 5 недель, с соотношением 75:25 – до 6 недель, соотношением 85:15 – до 8 недель. Увеличение доли молочной кислоты в соотношении сополимеров приводит к замедлению деградации покрытия, что обеспечивает наиболее длительную задержку действующего вещества на поверхности титанового блока. При необходимости увеличения времени задержки лекарственного препарата на поверхности эндопротеза в качестве матрицы предпочтительнее всего использовать ПЛГА (85:15), так как увеличение концентрации полимера приводит к увеличению времени разрушения покрытия.

4. Были проведены исследования биосовместимости антибактериального покрытия титановых блоков в организме подопытных животных. Исследования велись по оценке гематологических показателей крови. Были представлены результаты анализов животных опытной группы, которым проводилась имплантация титановых блоков, имеющее антибактериальное покрытие и контрольной группы – блоки без покрытия. Статистически значимых различий между животными из опытных групп и контрольной группы не обнаружено ни на одном из сроков. Все изменения гематологических показателей крови животных свидетельствуют о неинфекционном воспалительном процессе неизбежным после хирургического вмешательства. Возвращение к дооперационным значениям показателей крови через 4 недели после операции говорит об успешном протекании регенеративных процессов. Данные анализов, полученные через 3 месяца после операции, находятся в пределах физиологической нормы, что говорит о биосовместимости покрытия и импланта.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алексеев К.В., Грицкова И.А., Кедик С.А. Полимеры для фармацевтической технологии. М.: ЗАО ИФТ. 2011. С. 508-511.
2. Белоусов Д. Ю., Белоусов Ю. Б., Селютин О. А., Филиппова О. В. Сравнительная характеристика препаратов ванкомицина, зарегистрированных в РФ. Качественная Клиническая Практика. 2009. №4. 3-12 с.
3. Бузолева Л.С., Пузь А.В., Синебрюхов С.Л., Гнеденков С.В., Ким А.В., Еськова А.И., Пономарева А.Л. Имплантат-ассоциированные инфекции, связанные с проблемой биопленкообразования // Современные проблемы науки и образования. 2016. № 5. 333 с.
4. ГОСТ 19807-91 Титан и сплавы титановые деформируемые. Марки. Общероссийский Классификатор Стандартов. 2012. 3с.
5. ГОСТ Р 53228-2008. Национальный стандарт Российской Федерации. Весы неавтоматического действия. Часть 1. Метрологические и технические требования. Испытания. 2008. 133 с.
6. ГОСТ Р ИСО 10993-11-2009 Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 11 Исследования общетоксического действия. Москва: Стандартинформ. 2009. 21с.
7. ГОСТ Р ИСО 10993-12-2011. Изделия медицинские оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 12. Приготовление проб и стандартные образцы. Москва. Стандартинформ. 2014. 15 с.
8. ГОСТ Р ИСО 10993-2-2009. Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть

2. Требования к обращению с животными. Москва. Стандартинформ. 2009. 11 с.
9. ГОСТ Р ИСО 10993-2-2011 Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 2 Требования к обращению с животными. Москва: Стандартинформ. 2011. 12 с.
10. ГОСТ Р ИСО 10993-6-2011 Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 6 Исследование местного действия после имплантации. Москва: Стандартинформ. 2011. 19 с.
11. Казайкин В.Н., Пономарев В.О., Вохминцев А.С., Вайнштейн И.А. Определение концентрации ванкомицина в витреальной полости для оптимизации лечения острых бактериальных послеоперационных эндофтальмитов // Практическая медицина. 2016. №2 (94). Т.1. С. 85-89.
12. Корнилов И.И. Титан. Источники составы, свойства металлохимия и применение. М: Наука. 1975. 310 с.
13. Лакин Г.Ф. Биометрия: учебное пособие для вузов / М.: Высшая школа. 1990. 312 с.
14. Левченко Е. В., Чернышева Н. Л. Производство биоразлагаемого полимера полилактида // Вестник молодёжной науки. 2016. №4 (6). С. 22-27.
15. Любченко О.Д., Кручинина А.Д., Шатров А.Н. Кинетика деградации антипролиферативного полимерного покрытия стентов в условиях *in vitro* // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Естественные науки. 2015. С. 55-61.
16. Мамонова И.А., Бабушкина И.В., Пучиньян Д.М., Гладкова Е.В. Этиологическая роль возбудителей инфекционных осложнений

- после эндопротезирования крупных суставов // Фундаментальные исследования. 2015. № 8. С. 19-23.
- 17.Минина А.Н., Чернина Т.Н. Основы дентальной имплантации. / Учебно-методическое пособие . Витебск: ВГМУ. 2013 г. С. 5 -7.
- 18.МУК 4.2.1890-04 Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. М.: Федеральный центр госсанэпиднадзор Минздрав России. 2004. 9 с.
- 19.Оспанова А.К., Омарова Р.А., Абдуразаков У.А., Жартыбаев Р.Н., Исакова М.К., Савденбекова Б.Е., Амхадова М.А. Метод мультислойной сборки как альтернатива антибактериальным покрытиям медико-биологических имплантатов // Стоматология. 2016. №95(1). С. 9-13.
- 20.Павлов В.В., Садовой М.А., Прохоренко В.М. Современные аспекты диагностики и хирургического лечения пациентов с перипротезной инфекцией тазобедренного сустава (обзор литературы) // Травматология и ортопедия России. 2015. № 1 (75). С. 116-128.
- 21.Полякова Е.М., Божкова С.А. Сравнительная характеристика фенотипической и генотипической устойчивости к аминогликозидам штаммов *Staphylococcus aureus*, выделенных в травматолого-ортопедическом стационаре // Клиническая лабораторная диагностика, № 11. 2015. 50 с.
- 22.Сараева. С. Ю. Оптические методы в фармацевтическом анализе // Лабораторный практикум. 2015. 10 с.
- 23.Сидоренко С. В., Гучев И.А., Мелехина Е.В. Ванкомицин - перспективы применения в XXI веке // Клиническая фармакология и терапия. 2009. № 2. С. 16-22.
- 24.Справочник. Физиологические, биохимические и биометрические показатели нормы экспериментальных

- животных. / под ред. Макарова В.Г., Макаровой М.Н. Санкт-Петербург: ООО «Издательство ЛЕМА».2013. 116 с.
- 25.Тимченко Т.В. Щербакова Л.И. Компанцев В.А. Поли-d,l-лактидо-гликолид: методы получения, свойства и использование для разработки лекарственных препаратов со средствами микро- и нанодоставки // Современные проблемы науки и образования. 2015.№ 4. С. 1-11.
- 26.Трофимов В.В. Федчишин О.В., Клименов В.А. Титан, сплавы титана и их применение в стоматологии. Сибирский медицинский журнал. Иркутск. 2009. 10 с.
- 27.Büttner H., Mack D., RohdeH. Structural Basis of Staphylococcus Epidermidis Biofilm Formation: Mechanisms and Molecular Interactions //Frontiers in Cellular and Infection Microbiology.2015.14 p.
- 28.Casalini T. A. Perspective on Polylactic Acid-Based Polymers Use for Nanoparticles Synthesis and Applications/ T. Casalini, F.Rossi, A. Castrovinci, G. Perale // Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. 2019. 15 p.
- 29.Chaves B. J., Tadi P. Gentamicin. Treasure Island // StatPearls Publishing.2021. URL:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32491482/>
- 30.Cui L., Ma X., Sato K. Cell Wall Thickening is a Common Feature Resistance in Staphylococcus Aureus // Journal Clin. Microbiol. № 37. 2003. P. 5-7.
- 31.Delgado-Ruiz R, Romanos G. Potential Causes of Titanium Particle and Ion Release in Implant Dentistry: A Systematic Review // International Journal of Molecular Sciences.Vol. 19. 2018.Pp 3585-3548.

- 32.Essa D., Kondiah P. P. D., Choonara Y. E., Pillay V. The Design of Poly(lactide-co-glycolide) Nanocarriers for Medical Applications // Front Bioeng Biotechnol. №8.2020.48 p.
- 33.Gottschalk M. Streptococcus Suis Infections in Humans: the Chinese Experience and the Situation in North America / M. Gottschalk, M. Segura, J. Xu // Anim Health Res Rev. 2007. Vol.8. Pp 29-45.
- 34.Hench L.L. Bioceramics. J.Am.Ceram.Soc. 1998. № 81(7). 28 p.
- 35.Hermans P. E., Wilhelm, M. P. Vancomycin // Mayo Clinic Proceedings. 1987. № 62(10). Pp 901-905.
- 36.Izakovicova P., Borens O., Trampuz A. Periprosthetic Joint Infection: Current Concepts and Outlook //EFORT Open Rev.2019. Vol.4.Pp 482-494.
- 37.Lister J., Horswill A.R. Staphylococcus Aureus Biofilms: Recent Developments in Biofilm Dispersal // Front Cell Infect Microbiol. Vol. 9. 2014.Pp 4-5.
- 38.Ramirez M.S., Tolmasky M.E. Amikacin: Uses, Resistance, and Prospects for Inhibition // Molecules. 2017.12 p.
- 39.Ramirez M.S., Tolmasky M.E. Aminoglycoside Modifying Enzymes. Drug Resist Updat. 2010.Pp 151-162.
- 40.Suriyanarayanan T., Qingsong L., Kwang L., Mun L., Truong T. Quantitative Proteomics of Strong and Weak Biofilm Formers of *Enterococcus faecalis* // Molecular & cellular proteomics. Vol.17.2018.Pp643-654.
- 41.Xiaoyan T., Xiaojun Yu. Polymeric Biomaterials in Tissue Engineering and Regenerative Medicine in Natural and Synthetic Biomedical Polymers // Natural and Synthetic Biomedical Polymers. 2014. Pp 351-357.
- 42.Zor F., Selek F. N., Orlando G., Williams D. F. Biocompatibility in regenerative medicine // Nanomedicine (London). 2019. 13 p.

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РФ

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования

ПЕНЗЕНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

Факультет
физико-математических
и естественных наук

Кафедра
«Общая биология и биохимия»

Направление подготовки
06.03.01 Биология
Профиль подготовки «Биохимия»

Утверждаю:
Зав. кафедрой
 Г.А. Карпова
«05» июня 2020г.

Задание

По ВКР студента Ивановой Валерии Эдуардовны

Тема работы «Исследование свойств антибактериального покрытия
имплантируемых медицинских изделий из титана in vitro и in vivo»

Утверждена приказом по Университету от «25» июня 2020 г. № 883/0
Срок сдачи студентом законченной работы «31» мая 2021г.

КАЛЕНДАРНЫЙ ПЛАН ВКР

№ п/п	Перечень подлежащих разработке вопросов:	Сроки выполнения этапов	Примечания
1	Подбор и изучение литературы, составление библиографии по теме научного исследования.	Ноябрь 2020	выполнено
2	Составление содержания выпускной квалификационной работы, подготовка обзора литературы.	Декабрь 2020-апрель 2021	выполнено
3	Оформление теоретической части выпускной квалификационной работы (1 главы), исправление замечаний.	Апрель 2021-май 2021	выполнено
4	Выбор материалов, и базы исследования методов: диско-диффузионный, спектрофотометрический и общий анализ крови лабораторных животных.	Ноябрь 2020	выполнено
5	Выполнение экспериментальной части выпускной квалификационной работы Подготовка экспериментальных образцов титановых блоков с антибактериальным покрытием, исследование антибактериального действия лекарственного покрытия, динамики высвобождения лекарственных препаратов из покрытия, влияния имплантации экспериментальных образцов на гематологические параметры крови мелких лабораторных животных.	Декабрь 2020-апрель 2021	выполнено
6	Обработка полученных результатов, оформление таблиц, графиков, их описание.	Апрель 2021-май 2021	выполнено
7	Подготовка материалов исследования для апробации на научно-практических конференциях.	Май 2021-июнь 2021	выполнено
8	Оформление текста выпускной квалификационной работы. Подготовка доклада и презентации.	Май 2021-июнь 2021	выполнено
9	Проверка выпускной квалификационной работы на наличие заимствования в системе «Антиплагиат».	До 9 июня 2021	выполнено

Дата выдачи задания « 06 » ноября 2020 г.

Руководитель  Кручинина А.Д.

Задание принял к исполнению 