

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 ВЛИЯНИЯ ЛЕКАРСТВЕННОГО ПОКРЫТИЯ
СТЕНТ-ГРАФТА НА ЖИЗНЕДЕЯТЕЛЬНОСТЬ
МИКРООРГАНИЗМОВ»

Студент

Поп

Попова Полина Алексеевна

Руководитель

Анф

Кручинина А. Д.

Нормоконтролер

СВ

Клыченков С. В.

Работа допущена к защите (протокол заседания кафедры от 18.06.24 № 14)

Заведующий кафедрой

Кар

Карпова Г. А.

Работа защищена с отметкой

отлично
(протокол заседания ГЭК от 26.06.24 № 5)

Секретарь ГЭК

СВ

Клыченков С. В.

Пенза, 2024

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	3
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	5
1.1 Изделия для эндоваскулярной хирургии.....	5
1.2 Применение полимерных соединений для изготовления имплантируемых медицинских изделий	6
1.2.1 Использование желатина и коллагена для разработки покрытий имплантируемых медицинских изделий	9
1.2.2 Сшивающие агенты полимеров.....	11
1.3 Инфекционные осложнения после имплантации медицинских изделий .	12
1.4 Антимикробные препараты и их классификация	14
1.4.1 Использование антимикробных препаратов в эндоваскулярной хирургии.....	19
ГЛАВА 2. ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	21
2.1 Подготовка образцов к исследованию	21
2.2 Изучение влияния покрытия на жизнеспособность микроорганизмов диско-диффузионным методом	23
2.3 Изучение высвобождения лекарственных препаратов из покрытия в условиях <i>in vitro</i>	24
2.4 Статистическая обработка результатов	24
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	26
3.1 Результаты анализа информации об известных антибиотиках.....	26
3.2 Результаты исследования влияния лекарственного покрытия на жизнеспособность микроорганизмов.....	27
3.3 Результаты анализа УФ-спектров лекарственных веществ.....	30
3.4 Оценка времени гидролитической деградации лекарственного покрытия <i>in vitro</i>	34
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	44
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	45

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования. Заболевания сердечно-сосудистой системы представляют собой значительную проблему в современной медицине. В России отмечается высокий уровень смертности от сердечно-сосудистых заболеваний [9]. Тяжелыми патологиями системы кровообращения являются аневризмы – расширения кровеносного сосуда, вследствие растяжения и истончения сосудистой стенки. Разрыв аневризмы вызывает серьезные осложнения и зачастую приводит к смерти пациента [32]. Одним из возможных решений данной проблемы может быть использование стент-графтов, которые устанавливаются в пораженные сосуды с помощью малоинвазивной процедуры – стентирования.

Стент-графты представляют собой трубки, изготовленные из металла и биосовместимого полимера. Такой материал обеспечивает надежное крепление стент-графта к стенке сосуда, тем самым осуществляет защиту от повреждений. Данные эндоваскулярные медицинские изделия используются для восстановления поврежденных участков сосудов [38]. Одним из наиболее серьезных осложнений при использовании стент-графтов является его инфицирование. Микроорганизмы необратимо прикрепляются к внутренней поверхности медицинских изделий, тем самым вызывают тяжелое инфицирование, которое может приводить к летальному исходу [7].

Для предотвращения адгезии и роста микроорганизмов на поверхности медицинских изделий разрабатываются материалы или покрытия с антибактериальными свойствами. Для их изготовления используют полимерные матрицы, с закрепленным на их поверхности антимикробным агентом [16]. При этом поиск новых антимикробных препаратов в настоящее время остается актуальным, поскольку микроорганизмы становятся все более устойчивыми к антибиотикам. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) устойчивость к антибиотикам считается одной из крупнейших проблем [38].

При разработке лекарственного покрытия стент-графта важным этапом является оценка наличия антибактериального эффекта, который обеспечивает подавление жизнедеятельности микроорганизмов и их гибель.

Все вышесказанное позволило сформулировать цель и задачи данного исследования.

Цель работы: оценить влияние лекарственного покрытия стент-графта на жизнеспособность микроорганизмов.

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

1. Проанализировать наиболее известные зарегистрированные на территории Российской Федерации антимикробные препараты; отобрать наиболее подходящие для изготовления покрытия стент-графта;
2. Оценить антибактериальную активность экспериментальных образцов лекарственного покрытия;
3. Провести анализ УФ-спектров лекарственных веществ, выбрать характеристические длины волн для количественного определения;
4. Оценить время гидролитической деградации лекарственного покрытия в условиях *in vitro*.

Выпускная квалифицированная работа написана на 49 листах, содержит 20 рисунков, 2 таблицы и список литературы на английском и русском языках из 46 источников.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Изделия для эндоваскулярной хирургии

Эндоваскулярные методы хирургии являются наиболее предпочтительными при лечении сердечно-сосудистых заболеваний. Одной из серьезных патологий сосудов являются аневризмы. Аневризмы опасны для жизни человека, их разрыв зачастую приводит к мгновенному летальному исходу. Традиционным методом лечения аневризмы является хирургическое вмешательство. Несмотря на то, что лечение пациентов с помощью проведения операций имеет определенные успехи, частота сопутствующих сердечно-сосудистых заболеваний и непредсказуемость экстренного хирургического вмешательства продолжают создавать проблемы. Альтернативным способом лечения аневризм является использование эндоваскулярного стент-графта, процедура установки которого считается малоинвазивной, с меньшим риском, чем стандартное оперативное вмешательство [32]. Эндоваскулярное восстановление заключается в установке искусственного стент-графта, доставляемого через артериальный кровеносный сосуд в паху и фиксируемого над расширением [11]. Стент-графты обычно используют в эндоваскулярной хирургии для лечения аневризм практически любых сосудов [4].

Существует множество различных типов стент-графтов. Они могут различаться способом введения в кровеносный сосуд или получением к нему доступа, прикреплением к стенкам артерии, а также конструкцией и материалами, из которых они изготовлены.

Конструкция стент-графта представляет собой модульную систему тканевых трубок в основном из полиэстера или политетрафторэтилена (ПТФЭ) с расширяющимся металлическим каркасом стента из нержавеющей стали или нитинола. Процедуру стентирования можно выполнять под эпидуральной анестезией. Это позволяет осуществлять процедуру пациентам

из группы высокого риска для общей анестезии. Доступ к аорте осуществляется через разрезы в паху, при этом катетеры и в последующем система стент-графта вводятся через бедренную артерию. После установки имплантируемого изделия, оно формирует уплотнение, которое исключает аневризматический мешок из кровообращения.

Конструкция стент-графта достаточно быстро претерпела изменения со времени появления первых типов устройств. С ростом популярности эндоваскулярного восстановления в настоящее время увеличилось количество коммерчески доступных стент-графтов [36].

1.2 Применение полимерных соединений для изготовления имплантируемых медицинских изделий

Имплантируемые медицинские изделия — стент-графты, сердечно-сосудистые протезы, катетеры и другие устройства — безусловно являются неотъемлемой составляющей современной медицины, которая позволяет улучшить терапевтические результаты и потенциально спасти жизни людей [9]. Для изготовления таких изделий используются различные биоматериалы: синтетические полимеры, биоразлагаемые полимеры, биоактивные материалы, биополимеры, металлы и др. [26].

Биоматериалы — это материалы, которые взаимодействуют с биологическими системами для лечения и восстановления дефектных тканей, тем самым позволяют обеспечить правильное функционирование организма. Выбор биоматериала для разработки имплантируемого изделия должен основываться на различных факторах, среди которых можно выделить следующие:

- скорость коррозии/деградации;
- биосовместимость;
- токсичность;
- доступность;

- механические свойства [18].

Полимерные материалы зачастую используются из-за простоты их изготовления, гибкости и биосовместимости. Помимо этого, широкий спектр механических, химических и термических свойств полимерных материалов используется для создания композитов при комбинировании их с различными материалами.

Биосовместимые и биостабильные полимеры широко используются в качестве покрытий имплантируемых изделий, при этом основными критериями служат газопроницаемость и водопроницаемость покрытия для защиты изделия от влаги и ионов внутри организма человека [41]. Покрытие представляет собой тонкий слой материала, нанесенный на поверхность изделия с целью улучшения свойств поверхности или обеспечения защиты изделия от вредных внешних факторов. Благодаря изготовлению покрытий медицинских изделий значительно повышается их биосовместимость. Следовательно, это позволяет избежать побочных эффектов, таких как инфекции, воспаление, токсичность или канцерогенное действие. К тому же, покрытия могут придавать медицинским изделиям множество биологических функций, например, доставка лекарств, антибактериальные свойства. При разработке покрытия на основе полимеров важно учитывать предполагаемое медицинское применение, физико-химические свойства полимера и подложку, на которую будет наноситься покрытие [33]. Используемые полимерные материалы должны обладать значительной прочностью на разрыв и медленной скоростью биodeградации в течение предполагаемого срока службы [41]. Несмотря на то, что полимеры достаточно широко распространены, в настоящее время существует потребность в разработке более новых материалов с улучшенными свойствами.

Изготовление имплантируемых изделий не ограничивается каким-либо определенным полимером, поскольку в зависимости от области применения могут использоваться самые разнообразные материалы. Например, металлы широко используются для изготовления различных медицинских изделий.

Среди огромного разнообразия металлов и сплавов, наибольшее распространение получили нержавеющая сталь, технически чистый титан, сплавы на основе кобальта и титана. Несмотря на то, что металлы способны обеспечивать высокую прочность и пластичность, тем не менее, они могут иметь свои недостатки, среди которых низкая биосовместимость, а также склонность к коррозии [23].

Среди синтетических полимеров полиэфиры наиболее часто используются в медицине [33]. Такие полимеры как полиэтилен (PE), полиуретаны (PUR), полигликолид (PGA) и полилактиды (PLA) являются предпочтительными материалами для изготовления имплантируемых изделий и других медицинских устройств. PUR широко используются в качестве каркасных материалов для сосудистых трансплантатов, поскольку обладают превосходной гемосовместимостью. PGA обычно находит применение в качестве шовного материала при хирургических вмешательствах. Помимо этого, PGA-содержащие каркасы, смешанные с поликапролактоном (PCL), зачастую используются для систем доставки лекарств [40].

Полимолочная кислота благодаря своей биосовместимости, а также простоте производства и биоразлагаемости считается одним из лучших вариантов для биомедицинского применения. Полилактид (PLA) представляет собой биоразлагаемый термопластичный полимер, который получают из различных природных ресурсов, таких как кукурузный крахмал и сахарный тростник [33]. PLA полностью разлагается за 2–3 года, так как имеет гидролизуемые сложноэфирные связи. Этот материал часто используют для изготовления таких медицинских изделий, как имплантаты и сосудистые стенты [28].

Расширенный политетрафторэтилен (ePTFE) — также является часто используемым материалом для изготовления имплантируемых медицинских устройств, поскольку обладает превосходными механическими, химическими и биосовместимыми свойствами [14]. ePTFE представляет собой гидрофобный полимер, который образуется путем растяжения политетрафторэтилена

(PTFE). Расширение происходит в процессе производства, когда твердый материал преобразуется в пористую решетку [35]. В медицинской области данный материал, как правило, используется при изготовлении катетеров, ортопедических суставных имплантатов и при разработке покрытий сосудистых стентов. ePTFE является достаточно прочным и химически инертным материалом. Поэтому данный полимер применяется при изготовлении синтетических мембран, которые используются в качестве покрытий для металлических стент-графтов, необходимых для лечения различных сосудистых заболеваний, таких как аневризмы, артериальные перфорации и стеноз сосудов [21].

1.2.1 Использование желатина и коллагена для разработки покрытий имплантируемых медицинских изделий

Имплантируемое медицинское изделие, помимо механических свойств, должно обладать хорошей биосовместимостью. В качестве подложки для сосудистых трансплантатов ранее использовалась синтетическая полиэфирная ткань (ПЭТ) из-за своих отличных механических свойств. Однако, как показала практика, тканевые материалы из ПЭТ обладали плохой биосовместимостью, что приводило к серьезным проблемам, таким как попадание в кровь фрагментов материала и их коагуляция [45].

Для того чтобы преодолеть недостатки имплантируемых устройств на основе синтетических материалов, применяется комбинирование синтетических тканей с природными компонентами. Это позволяет медицинским изделиям обрести хорошие механические и биологические свойства. Обычно для улучшения совместимости синтетических полимеров используются природные биоактивные компоненты, такие как коллаген и желатин. Широкое применение данных природных материалов связано с их низкой стоимостью и отсутствием нежелательных побочных эффектов [12].

Коллаген является распространенным природным полимером, который часто находит применение в медицинской практике. Этот фибриллярный белок в основном получают путем переработки кожи и хрящей крупного рогатого скота, морских рыб. После выделения его обязательно подвергают очистке для удаления примесей, которые в дальнейшем могут привести к серьезным осложнениям [8]. Коллаген обладает необходимым биологическими свойствами: биосовместимостью, нетоксичностью и биоразлагаемостью. Однако основным его недостатком является то, что он имеет недостаточные механические и тромбогенные свойства из-за процесса деградации. Коллаген обычно применяется в хирургии, при разработке покрытий для медицинских изделий, при производстве перевязочных материалов и систем пролонгированной доставки лекарств, а также в тканевой инженерии [37]. Для придания механической прочности и улучшения свойств имплантируемых изделий используются комбинации коллагена с синтетическими полимерами, например, полиэтиленом, поливинилловым спиртом.

Желатин находит широкое применение в медицинской практике, является прекрасным материалом для разработки покрытий имплантируемых изделий, поскольку обладает уникальными свойствам, такими как биоразлагаемость, биосовместимость, низкая иммуногенность, а также способность стимулировать клеточную адгезию и пролиферацию [12]. Желатин является волокнистым белком, который образуется путем распада коллагена. Его источниками являются шкуры крупного рогатого скота, бычки и свиные кости, а также рыба. Желатин характеризуется высокой впитывающей способностью, может поглощать в пять-десять раз больше воды, чем его первоначальный вес. Однако у него имеются свои недостатки, среди которых низкая термостабильность и недостаточные механические свойства. Желатин обычно используется в качестве перевязочного материала, при производстве мягких и твердых капсул, систем доставки лекарств, а также при разработке покрытий медицинских изделий [37]. Покрытия на основе

желатина получили широкое применение, за счет их способности образовывать маловязкие гидрогели, которые при высыхании образуют тонкую пленку на поверхности пористого материала протеза [45]. Существуют различные методы разработки желатинового покрытия, но все они добиваются того, чтобы покрытие было однородным по толщине, эластичным, прочно скреплялось с поверхностью изделия и не отслаивалось при процедуре имплантации [6].

1.2.2 Сшивающие агенты полимеров

Биоматериалы, изготовленные из натуральных или синтетических полимеров, являются предпочтительными для создания имплантируемых изделий. Однако они не обладают достаточной целостностью и стабильностью в водной среде что, ограничивает их медицинское применение. Сшивка биополимеров является одним из способов технологического процесса, который позволяет улучшить свойства биоматериалов для более широкого их применения в медицинской практике [30].

Сшивка представляет собой простой метод, который часто применяется для улучшения механических, биологических и деградационных свойств различных полимеров. Процесс сшивки основан на реакции функциональных групп полимерной цепи ($-OH$, $-COOH$, $-NH_2$) с сшивающими агентами, что приводит к образованию новых химических или физических связей. В результате сшивки между цепями полимеров могут образовываться ковалентные, ионные и водородные связи. Несмотря на то, что сшивание улучшает свойства биоматериалов, большинство используемых с этой целью веществ, вызывают нежелательные побочные эффекты, например, токсические реакции [34].

Обычно для процесса сшивки используются такие химические соединения, как глутаральдегид, глиоксаль и полиэтиленгликоль. Данные вещества обуславливают эффективное сшивание полимеров и в конечном

итоге оказывают положительное влияние на свойства материалов. Наиболее часто используемым сшивающим агентом для медицинских изделий на основе коллагена является глутаровый альдегид [10]. Сшивание коллагена с помощью глутарового альдегида осуществляется в результате реакции альдегидной группы с аминогруппами, которые образуются из остатков лизина и гидроксилизина коллагена [37]. Основными преимуществами, обуславливающими широкое применение данного сшивающего агента, являются легкая доступность, низкая стоимость и высокая реакционная способность. Однако, несмотря на все достоинства глутарового альдегида и других химических сшивающих агентов, имеются данные о их цитотоксичности. Поэтому существует потребность в разработке более эффективных, нетоксичных сшивающих агентов и методов получения сшитых каркасов с превосходными свойствами [2].

По причине высокой токсичности химических соединений, в качестве альтернативы можно использовать сшивающие агенты природного происхождения, таких как лимонная кислота, дубильная кислота, ванилин, генипин. Данные вещества обладают гораздо меньшей цитотоксичностью и в процессе сшивки создают стабильные материалы с высокой биосовместимостью [37].

1.3 Инфекционные осложнения после имплантации медицинских изделий

Имплантация медицинских изделий является неотъемлемой составляющей практически во всех областях медицины. Однако использование медицинских устройств зачастую связано с определенным риском бактериальных инфекций [44]. Инфицирование патогенными микроорганизмами представляет собой серьезную проблему для здравоохранения, поскольку это является одной из причин смерти людей [46]. Для лечения бактериальных инфекций обычно используют антибиотики,

которые вводятся в организм энтеральным и парентеральным путем. Однако образование биопленки на поверхности медицинского изделия в несколько раз снижает эффективность антибиотикотерапии [19]. Способность образовывать биопленки является универсальным свойством бактерий.

Биопленка представляет собой совокупность бактериальных клеток, которая необратимо связана с поверхностью и заключена в матрицу, состоящую преимущественно из полисахаридов [22]. Для микробных клеток существование в биопленке является достаточно выгодным, поскольку она обеспечивает защиту, поддерживает гомеостаз и создает такой барьер, который изолирует бактерии от окружающей среды. Между бактериями биопленки осуществляется эффективный горизонтальный перенос генов устойчивости и вирулентности, которые делают бактерии очень устойчивыми. Таким образом, бактериальные клетки, находящиеся в составе биопленки, обладают устойчивостью к веществам, выделяемым компонентами иммунной системы, и антибиотикам [13].

Образование биопленок в настоящее время представляет собой огромную проблему в области медицины. Биопленки могут встречаться на поверхности различных медицинских изделиях, например, стентов, катетеров и многих других имплантируемых устройств. Высокая устойчивость биопленки к антимикробным препаратам приводит к большому риску инфицирования, следовательно, создает опасность для жизни и здоровья пациентов. Имплантируемые изделия, подвергшиеся инфицированию, необходимо удалять из тела пациента. Повторное оперативное вмешательство является дорогостоящей и опасной для человека процедурой, поскольку может вызывать ряд сопутствующих осложнений [38].

Установлено, что имплантат-ассоциированные инфекции могут вызывать как грамположительные, так и грамотрицательные бактерии, которые отличаются друг от друга структурными свойствами липидной мембраны [19]. Наиболее распространенными микроорганизмами, выделенными из инфицированных внутрисосудистых устройств, являются

стафилококки, обычно *Staphylococcus epidermidis*, немного реже встречается *Staphylococcus aureus*. Другими важными, но менее распространенными патогенными микроорганизмами являются виды *Enterococcus*, *Candida* и *Escherichia coli*. Бактерии могут находиться свободно плавающими в растворе (т.е. планктонными) или образовывать биопленку. Так, например, *E. Coli* и *S. epidermidis* в биопленке имеют более медленный рост и, как следствие, более сниженную чувствительность к антимикробным препаратам по сравнению с теми же штаммами, свободно плавающими в растворе. Следовательно, это представляет собой огромную проблему, связанную с инфицированием имплантируемых устройств [43].

Таким образом, в настоящее время растет потребность в разработке покрытия для медицинских изделий, которые смогут предотвращать бактериальную адгезию и образование биопленки. Довольно быстрое развитие нанотехнологий и их огромный потенциал в медицине открывают большое количество возможностей для создания поверхностей с необходимыми свойствами, которые в дальнейшем будут использоваться в медицинской практике [19].

1.4 Антимикробные препараты и их классификация

Первоначально антибиотиками считались органические соединения, вырабатываемые микроорганизмами, которые оказывали токсичное воздействие на другие микроорганизмы. Однако в настоящее время значение термина «антибиотик» изменено, поскольку существуют антимикробные препараты, которые частично или полностью производятся синтетическим путем [3]. Одни антибиотики способны полностью уничтожать другие бактерии, в то время как другие способны только подавлять их рост. Антимикробные препараты, которые уничтожают бактерии, называются бактерицидными, а препараты, которые лишь подавляют рост бактерий, называются бактериостатическими [24].

Первым антибиотиком является пенициллин, который в 1929 году открыл британский микробиолог Александр Флеминг. Антибиотик был получен в результате жизнедеятельности обитающего в почве плесневого грибка *Penicillium notatum*. Клинические испытания впервые были проведены в 1940 году, когда препарат удалось получить в кристаллическом виде [5].

Существует несколько подходов к классификации антибиотиков. Наиболее часто группы антибиотиков выделяют на основе их молекулярной структуры, способа действия и спектра активности [24]. Известны следующие группы антибиотиков, различающихся по химическому строению: β -лактамы, макролиды, тетрациклины, хинолоны, аминогликозиды, сульфаниламиды, гликопептиды, линкозамиды [3].

1) Бета-лактамы. Представители этого класса антибиотиков содержат β -лактамное кольцо, обладающее высокой реакционной способностью. β -лактамы являются бактерицидными агентами, которые либо уничтожают бактерии путем ингибирования синтеза клеточной стенки, либо подавляют их рост [24]. Наиболее известными представителями данного класса являются пенициллины, цефалоспорины, монобактамы и карбапенемы. Они являются наиболее распространенными антимикробными препаратами, которые используются для лечения бактериальных инфекций, благодаря своей высокой активности, широкому спектру действия и низкой токсичности [3].

2) Макролиды. Химическая структура макролидов характеризуется крупным лактонным кольцом, содержащим от 12 до 16 атомов, к которому посредством гликозидных связей присоединены один или несколько углеводных остатков. Представители данного класса обладают более широким спектром антимикробной активности, чем β -лактамы и часто назначаются пациентам с аллергией на пенициллины. К ним относятся, например, эритромицин, азитромицин и кларитромицин [24].

3) Тетрациклины. Тетрациклины представляют собой класс антибиотиков, способных ингибировать синтез белка как у

грамположительных, так и у грамотрицательных бактерий [15]. Представители этого класса сгруппированы в различные поколения на основе метода их синтеза. Тетрациклины, полученные путем биосинтеза, считаются первым поколением, к ним относятся: хлортетрациклин, окситетрациклин, демеклоциклин. Такие представители, как доксициклин, лимециклин, меклоциклин, метациклин, миноциклин и ролитетрациклин являются производными полусинтеза, поэтому считаются препаратами второго поколения. Тигециклин относится к препаратам третьего поколения, так как получен в результате полного синтеза [25].

4) Хинолоны. Первым разработанным хинолом является налидиксовая кислота, которая была получена в качестве примеси при производстве хинина. Существует две основные группы соединений: хинолоны и нафтиридоны, к которым относятся циноксацин, норфлоксацин, офлоксацин, ципрофлоксацин, темафлоксацин, налидиксовая кислота. Ципрофлоксацин является наиболее эффективным хинолоном против *Pseudomonas aeruginosa*. Хинолоны быстро ингибируют синтез ДНК, способствуя расщеплению бактериальной ДНК, что приводит к быстрой гибели бактерий [24].

5) Аминогликозиды. Среди представителей данного класса антибиотиков первым был открыт препарат стрептомицин, который получил широкое применение в борьбе с *Mycobacterium tuberculosis*, возбудителем туберкулеза у человека. Аминогликозиды представляют собой соединения, которые состоят из 3-аминосахаров, соединенных гликозидными связями. Данные соединения получают из почвенных *Actinomycetes* [3]. Аминогликозиды обладают широким спектром антимикробной активности. Они способны ингибировать синтез белка в бактерий путем связывания с одной из субъединиц рибосом. Представителями данного класса являются следующие препараты: стрептомицин, гентамицин, неомицин, тобрамицин и амикацин. Они эффективны против аэробных грамотрицательных и некоторых грамположительных бактерий [24].

6) Сульфаниламиды. Сульфаниламиды – это синтетические антимикробные средства, являются производными амида сульфаниловой кислоты. К данному классу антибиотиков относятся следующие препараты: сульфазин, сульфадимезин, стрептоцид и др. [3]. Они ингибируют как грамположительные, так и грамотрицательные бактерии. Широко используются для лечения различных инфекций, включая тонзиллит, септицемию, менингококковый менингит, бациллярная дизентерия и некоторые инфекции мочевыводящих путей [24].

7) Гликопептиды. Гликопептиды представляют собой гликозилированные циклические или полициклические нерибосомальные пептиды, продуцируемые различными группами актиномицетов. Ванкомицин и тейкопланин являются представителями данного класса антибиотиков. Они применяются для лечения опасных для жизни инфекций, вызванных грамположительными патогенами человека, такими как *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus spp.* и *Clostridium difficile* [20]. Тейкопланин и ванкомицин обладают сходным действием по многим химические и микробиологические свойства, но у тейкопланина более длительный период полувыведения и возможность введения путем внутримышечной инъекции [29].

8) Линкозамиды. Линкозамиды представляют собой небольшую группу антибиотиков, химическая структура которых состоит из аминокислот и фрагментов сахаров. К данному классу антибиотиков относится линкомицин и его полусинтетическое хлорированное производное – клиндамицин. Оба антибиотика обладают бактериостатическим действием, то есть ингибируют синтез белка у чувствительных бактерий, однако, в более высоких концентрациях они могут оказывать бактерицидное действие. При лечении бактериальных инфекций, особенно вызванных анаэробными видами, клиндамицин обычно оказывает более эффективное действие, нежели линкомицин [39].

9) Нитрофураны. Нитрофураны представляют собой синтетические антибактериальные препараты, применяемые для лечения патогенов с

множественной лекарственной устойчивостью. Данный класс включает в себя такие препараты, как нитрофуразон, нитрофурантоин, фурацилин, фуразолидон, фуразидин [1]. Нитрофуразон применяется для лечения местных инфекций и покрытия мочевых катетеров, нитрофурантоин для лечения инфекций мочевыводящих путей, фуразолидон для лечения бактериальной диареи и инфекций, вызванных грамотрицательной бактерией *Helicobacter pylori* [31].

10) Полимиксины. Полимиксины представляют собой полипептидные антибиотики, синтезируемые *Bacillus polymyxa*. Из данной группы антибиотиков наиболее часто используются полимиксин В и колистин (полимиксин Е). Они являются весьма эффективными препаратами против грамотрицательных бактерий, среди которых *Pseudomonas aeruginosa*, а также большинство представителей семейства *Enterobacteriaceae* [17]. Использование полимиксинов в клинической практике было прекращено в 1960-х годах из-за их нефротоксичности и открытия менее токсичных препаратов, относящихся к другим классам антибиотиков. Однако в настоящее время полимиксины вновь используются в клинической практике против крайне полирезистентных штаммов, но уже в гораздо меньших дозах, чем те, которые необходимы для оптимальной эффективности [42].

11) Антибиотики других классов. В данную группу можно отнести антимикробные препараты, которые не относятся ни к одному из вышеперечисленных классов соединений. Например, липофильный антибиотик рифампицин, применяемый для лечения туберкулеза, вызываемого главным образом микобактерией *Mycobacterium tuberculosis*. Антимикробная активность данного препарата обусловлена ингибированием бактериальной РНК-полимеразы [3]. Еще одним наиболее эффективным препаратом против туберкулеза является изониазид. Однако, из-за длительного и широкого использования данного препарата образуется огромное количество устойчивых бактериальных штаммов. Поэтому

существует потребность в разработке новых противотуберкулезных препаратов [27].

1.4.1 Использование антимикробных препаратов в эндоваскулярной хирургии

Антибиотикотерапия используется в эндоваскулярной хирургии для снижения риска инфекций после процедуры имплантации медицинского изделия. Поэтому особенно важно проводить предварительную обработку сосудистого протеза антимикробным препаратом с целью уменьшения бактериальной адгезии. Эта процедура является эффективной периоперационной профилактикой инфекций сосудистого трансплантата, позволяет обеспечить необходимую защиту материала протеза [7].

Для предотвращения инфицирования на начальном этапе антимикробные препараты необходимо добавлять в покрытие имплантируемого изделия. Существует огромное разнообразие антимикробных препаратов, однако антибиотики, применяемые для разработки покрытия должны соответствовать определенным требованиям, среди которых доступность, невысокая стоимость, пролонгированное действие, хорошо изученные физические и химические свойства. При соблюдении всех вышеперечисленных критериев остается небольшое разнообразие кандидатов для создания покрытия имплантируемого изделия с антимикробными свойствами [9].

Антибактериальные препараты для создания покрытия сосудистого протеза можно использовать двумя способами: первый способ заключается в погружении и замачивании трансплантата в растворе антибиотика, второй способ осуществляется путем введения препарата в состав герметизирующего раствора, например желатина. Оба метода обеспечивают антибактериальный эффект, однако при замачивании запас антимикробного препарата истощается достаточно быстро. Используя второй способ, антибиотик связывается с

основным компонентом раствора герметика, что обеспечивает пролонгированное высвобождение препарата в кровоток. При этом скорость выделения может зависеть от типа антибиотика и состава покрытия. Существуют данные о том, что желатиновые герметики задерживают выход антимикробного препарата более длительное время по сравнению с коллагеновыми [16].

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Подготовка образцов к исследованию

Объектом исследования являлись фрагменты стент-графтов с различными лекарственным покрытием.

Покрытие стент-графта предназначено для целенаправленной и эффективной доставки лекарственного средства с антибактериальным эффектом к месту поражения.

Подготовку образцов к исследованию проводили в несколько этапов, представленных на рисунке 1.

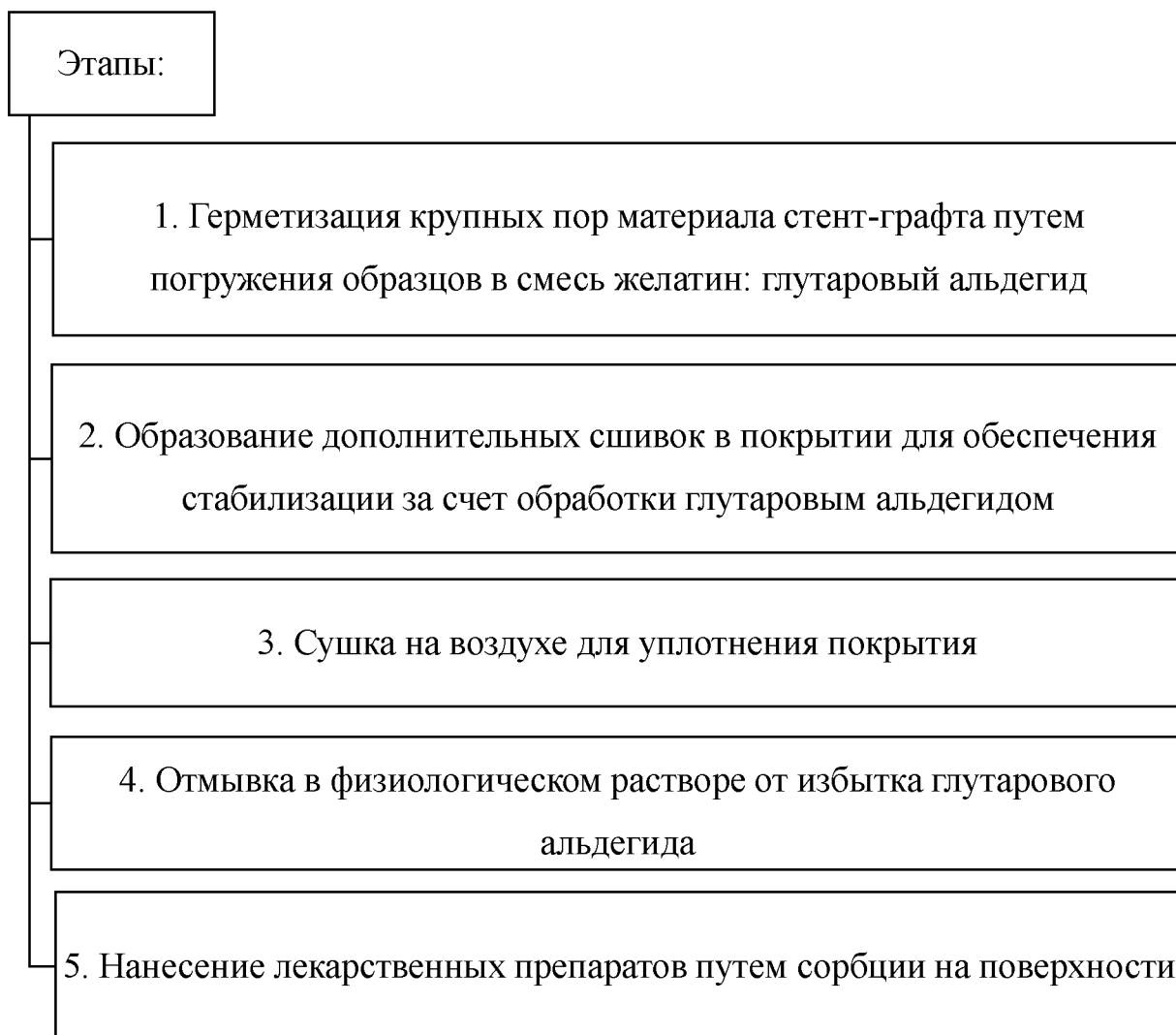


Рисунок 1. Основные этапы подготовки образцов для проведения исследования

Проведение этапов № 1-4 представляли собой один цикл. Циклы повторяли многократно до достижения необходимых значений водопроницаемости. После их осуществления образцы отправляли на сушку в течение 24 часов при температуре 40 °С.

После нанесения лекарственных веществ на поверхность образцы высушивали при температуре 40 °С в течение 24 часов.

При анализе литературных данных об эффективности различных лекарственных препаратов против основных возбудителей инфекционных осложнений после имплантации стент-графтов, для исследования были выбраны следующие лекарственные вещества: ванкомицин, цiproфлоксацин, рифампицин, линкомицин, хлоргексидин.

Для проведения дальнейших исследований были подготовлены следующие группы образцов.

Группа 1 – содержание ванкомицина 9,5-10,5 мкг/мм².

Группа 2 – содержание ванкомицина 9,5-10,5 мкг/мм², хлоргексидина 0,095-0,105 нг/мм².

Группа 3 – содержание ванкомицина 9,5-10,5 мкг/мм², 2% желатин в качестве матрицы для антимикробного агента.

Группа 4 – содержание цiproфлоксацина 0,38-0,42 мкг/мм².

Группа 5 – содержание цiproфлоксацина 0,38-0,42 мкг/мм², хлоргексидина 0,095-0,105 нг/мм².

Группа 6 – содержание цiproфлоксацина 0,38-0,42 мкг/мм², 2% желатин в качестве матрицы для антимикробного агента.

Группа 7 – содержание рифампицина 11,4-12,6 мкг/мм².

Группа 8 – содержание рифампицина 11,4-12,6 мкг/мм², хлоргексидина 0,095-0,105 нг/мм².

Группа 9 – содержание рифампицина 11,4-12,6 мкг/мм², 2% желатин в качестве матрицы для антимикробного агента.

Группа 10 – содержание линкомицина 57-63 мкг/мм².

Группа 11 – содержание линкомицина 57-63 мкг/мм², хлоргексидина 0,095-0,105 нг/мм².

Группа 12 – содержание линкомицина 57-63 мкг/мм², 2% желатин в качестве матрицы для антимикробного агента.

Для оценки времени гидролитической деградации покрытия и изучения высвобождения лекарственных веществ использовали фрагменты стент-графтов размером 10 x 10 мм.

Для исследования влияния лекарственного покрытия стент-графта на жизнеспособность микроорганизмов изготавливали круги диаметром 6 мм с помощью лазера, что сопоставили с размером коммерческих дисков, используемых в диско-диффузионном методе.

2.2 Изучение влияния покрытия на жизнеспособность микроорганизмов диско-диффузионным методом

Диско-диффузионный метод — наиболее распространенный способ проверки чувствительности бактерий к антимикробным препаратам. Он заключается в ингибировании роста микроорганизмов, находящихся на поверхности питательной среды, путем диффузии антибактериального препарата из диска в среду. Метод является универсальным, поскольку пригоден для тестирования большинства бактериальных возбудителей и не требует специального оборудования.

Для проведения исследования использовали агаровую питательную среду Мюллера-Хинтона и три бактериальных штамма. Инокулят штриховыми движениями наносили на поверхность агаровой питательной среды в трех направлениях. После инокуляции не позднее чем через 15 минут на поверхность питательной среды с помощью пинцета наносили пропитанные антимикробным препаратом диски. Помещая диск в чашку Петри, его плотно прижимали к поверхности агаровой среды, обеспечивая равномерную и постоянную диффузию антибиотика.

После нанесения дисков чашки Петри переворачивали и помещали в термостат для инкубации при 37 °С в течение 24 часов. По истечении времени инкубации перевернутые чашки Петри помещали на темную поверхность так, чтобы свет лампы падал на них под углом 45° (отраженный свет). Диаметры зон ингибирования роста микроорганизмов измеряли с помощью линейки с точностью до 1 мм. Оценку антибактериальной активности производили согласно МУК 4.2.1890-04.

2.3 Изучение высвобождения лекарственных препаратов из покрытия в условиях *in vitro*

Для изучения времени гидролитической деградации покрытия в качестве модельной среды использовали физиологический раствор (0,9% раствор NaCl). Общее количество образцов в каждой группе лекарственного покрытия – 5 штук. Каждый образец находился в индивидуальной пробирке в 5 мл раствора при температуре 37 °С. Замену раствора проводили через 5, 15, 30, 50, 75, 105, 140, 180 минут от начала эксперимента. Во всех растворах определяли количественное содержание лекарственных препаратов спектрофотометрическим методом на характеристических длинах волн. Для оценки количественного содержания веществ в растворе использовали метод калибровочного графика. Измерение оптической плотности проводили на спектрофотометре Varian Cary 50 в кварцевой кювете с длиной оптического пути 1 см.

2.4 Статистическая обработка результатов

Результаты исследования представляли в виде среднего значения $\pm$ стандартное отклонение ($m \pm SD$), опыты проводили не менее чем в трех повторях ($n \geq 3$). Статистическую значимость различий определяли с использованием U-критерия Манна-Уитни. Достоверными считали различия

при уровне значимости $p < 0,05$. Для статистического анализа использовали программу SigmaPlot 12.5 (Systat Software Inc, США).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Результаты анализа информации об известных антибиотиках

При разработке лекарственного покрытия важное значение играет выбор лекарственного вещества в качестве антимикробного агента: подбор дозировки, оценка времени высвобождения. Лекарственные вещества должны быть доступны для покупки, иметь относительно невысокую стоимость, удобную для использования форму выпуска в виде порошка или раствора; широкий спектр действия, в особенности по отношению к основным возбудителям имплантат-ассоциированных инфекционных осложнений.

В таблице 1 приведены результаты анализа соответствия известных лекарственных веществ из различных групп антибиотиков критериям выбора.

Таблица 1 – Анализ соответствия известных антимикробных препаратов критериям выбора

Критерии отбора	Доступность	Невысокая стоимость	Форма выпуска препарата: в виде порошка или раствора
Антимикробные препараты			
1. Ванкомицин	+	+	+
2. Рифампицин	+	+	+
3. Ципрофлоксацин	+	+	+
4. Метронизадол	+	+	— (в виде таблеток)
5. Линкомицин	+	+	+
6. Клиндамицин	+	+	— (в виде капсул)

Продолжение таблицы 1

7. Амоксициллин	+	+	– (в виде таблеток)
8. Даптомицин	– (не найден в продаже)	+	+
9. Тобрамицин	– (не найден в продаже)	+	+
10. Хлоргексидин	+	+	+

Примечание к таблице 1: «+» – лекарственный препарат соответствует критерию, «–» не соответствует критерию.

По данным критериям было проанализировано 10 лекарственных препаратов, девять из них относятся к антибактериальным препаратам, хлоргексидин является антисептиком. По результатам анализа были выбраны наиболее предпочтительные варианты антибактериальных препаратов, которые потенциально можно использовать для изготовления лекарственного покрытия. Всем критериям соответствовали: ванкомицин, цiproфлоксацин, рифампицин, линкомицин и хлоргексидин в качестве антисептика.

3.2 Результаты исследования влияния лекарственного покрытия на жизнеспособность микроорганизмов

Оценку антимикробной активности лекарственного покрытия проводили с помощью диско-диффузионного метода. В качестве микроорганизмов для исследования были выбраны: грамположительные бактерии *Streptococcus viridans*, грамотрицательные палочковидные бактерии *Escherichia coli*, и грамположительные бактерии *Staphylococcus aureus*,

последние из которых являются основной причиной образования биопленок [43].

Результаты исследования антимикробной активности лекарственного покрытия представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Результаты исследования антимикробной активности образцов лекарственных покрытий стент-графтов

	Диаметр зон подавления роста, мм		
Вид бактериальной культуры	<i>Escherichia coli</i>	<i>Streptococcus viridans</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
№ группы			
Группа 1	—	20 мм	19 мм
Группа 2	10 мм	15 мм	18 мм
Группа 3	—	19 мм	18 мм
Группа 4	—	14 мм	18 мм
Группа 5	—	22 мм	21 мм
Группа 6	—	15 мм	18 мм
Группа 7	20 мм	22 мм	21 мм
Группа 8	22 мм	20 мм	20 мм
Группа 9	19 мм	22 мм	18 мм
Группа 10	—	18 мм	24 мм
Группа 11	—	14 мм	20 мм
Группа 12	—	16 мм	21 мм

Примечание к таблице 2: «—» зоны задержки роста микроорганизмов не наблюдалось.

Согласно полученным результатам исследования установили, что образцы с ванкомицином (группа 1) и образцы с ванкомицином и желатином (группа 3) обладали высокой антимикробной активностью против *Streptococcus viridans* и *Staphylococcus aureus*, в то время как образцы

лекарственного покрытия с ванкомицином в комбинации с хлоргексидином, добавок показали небольшой антибактериальный эффект и против грамотрицательной палочковидной бактерии *Escherichia coli*. Образцы лекарственного покрытия с цiproфлоксацином (группа 4) и цiproфлоксацином и желатином (группа 6) вызвали задержку роста грамположительных бактерий таких, как *Streptococcus viridans* и *Staphylococcus aureus*, причем в комбинации с хлоргексидином (группа 5) получили наибольшую зону ингибирования данных микроорганизмов. Рифампицин как отдельный препарат (группа 7), так и в комбинации с хлоргексидином (группа 8) и желатином (группа 9) вызвал наибольшую задержку роста всех используемых бактериальных штаммов. Линкомицин как отдельный препарат (группа 10), так и в комбинации с хлоргексидином (группа 11) и желатином (группа 12) оказался наиболее эффективным против *Staphylococcus aureus*. Кроме этого, образцы с линкомицином вызывали небольшую задержку роста такой бактерии, как *Streptococcus viridans*.

Таким образом, в ходе проведения исследования было выявлено различное влияние лекарственных препаратов, входящих в состав покрытия, на жизнеспособность микроорганизмов. Наличие желатина в составе лекарственного покрытия не влияло на жизнеспособность микроорганизмов, в то время как присутствие хлоргексидина в составе лекарственного покрытия в некоторых случаях оказывало воздействие на задержку роста микроорганизмов. Наличие зон задержки роста микроорганизмов свидетельствует о наличии антимикробной активности образцов лекарственных покрытий, что говорит о достаточном содержании лекарственного вещества на поверхности. Наиболее удачными вариантами лекарственного покрытия по критерию антимикробной активности признаны: рифампицин как отдельный препарат, так и в комбинации с хлоргексидином; ванкомицин, цiproфлоксацин в комбинации с хлоргексидином и линкомицин как отдельный препарат.

3.3 Результаты анализа УФ-спектров лекарственных веществ

Для каждого вещества характерен определенный спектр поглощения. Анализ УФ-спектров лекарственных веществ позволяет осуществлять выбор характеристических длин волн, на которой лекарственное вещество сильнее всего поглощает электромагнитное излучение, что позволяет использовать их для построения калибровочных графиков. Спектр поглощения ванкомицина и калибровочный график по ванкомицину представлены на рисунках 2,3 соответственно.

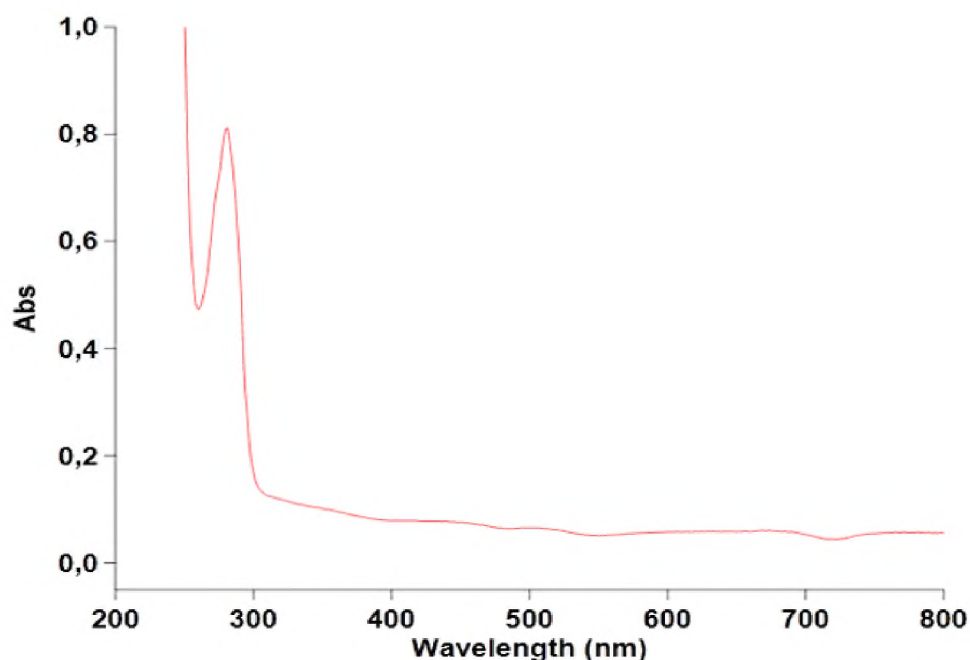


Рисунок 2. Спектр поглощения раствора ванкомицина

В результате анализа полученного спектра выявлен характеристический пик для ванкомицина на длине волны 280 нм. В ходе выполнения исследования был осуществлен выбор стандартных растворов с известным содержанием определяемого вещества для построения калибровочного графика: 10 мкг/мл, 20 мкг/мл, 30 мкг/мл, 40 мкг/мл, 50 мкг/мл, 60 мкг/мл, 70 мкг/мл, 80 мкг/мл, 90 мкг/мл, 100 мкг/мл.

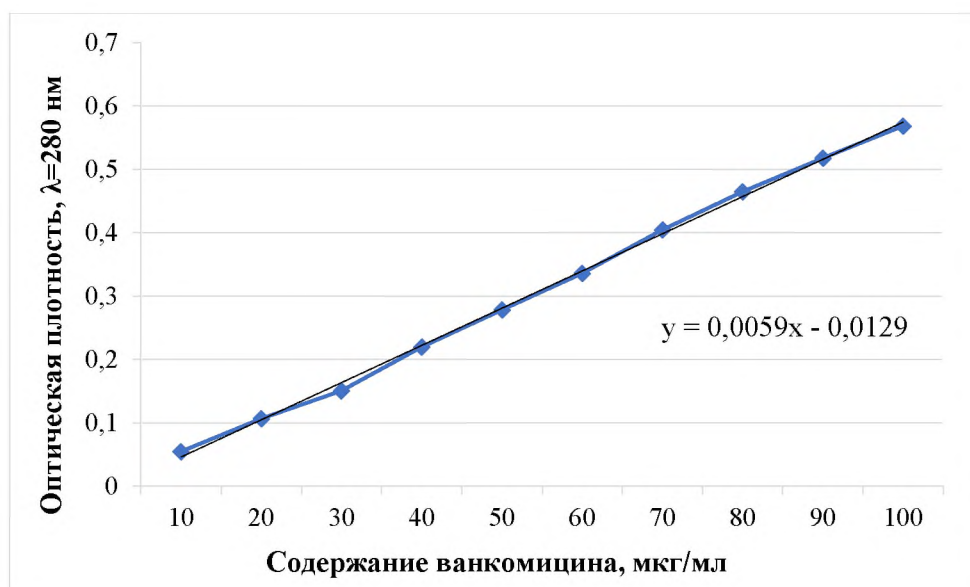


Рисунок 3. Калибровочный график для ванкомицина, $\lambda=280$ нм

Спектр поглощения ципрофлоксацина и калибровочный график по ципрофлоксацину представлены на рисунках 4,5 соответственно.

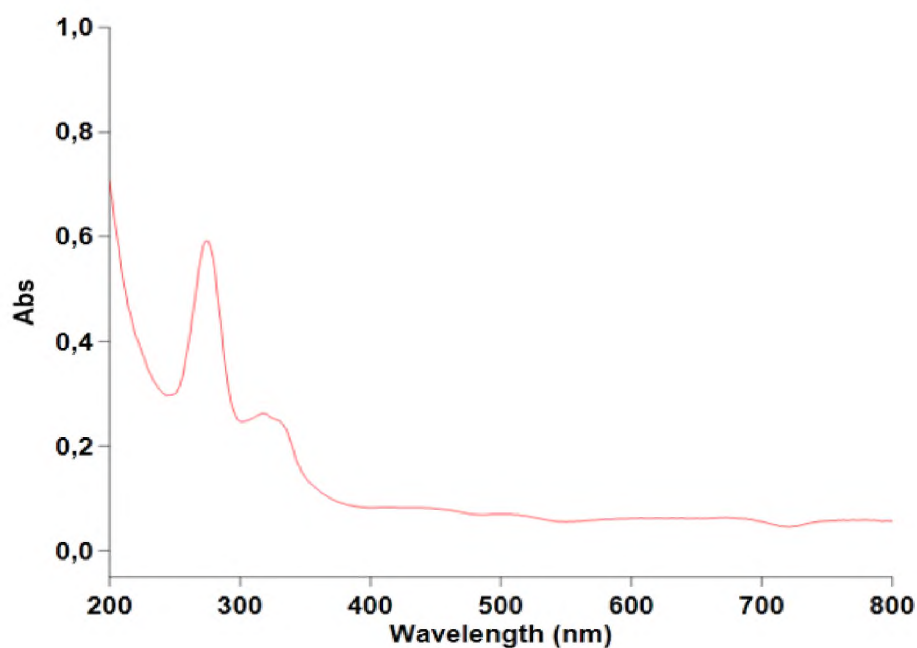


Рисунок 4. Спектр поглощения раствора ципрофлоксацина

В результате анализа полученного спектра выявлен характеристический пик для ципрофлоксацина на длине волны 274 нм. В ходе выполнения исследования был осуществлен выбор стандартных растворов с известным содержанием определяемого вещества для построения калибровочного

графика: 0,5 мкг/мл; 1 мкг/мл; 1,5 мкг/мл; 2 мкг/мл; 2,5 мкг/мл; 3 мкг/мл; 3,5 мкг/мл; 4 мкг/мл; 4,5 мкг/мл; 5 мкг/мл.

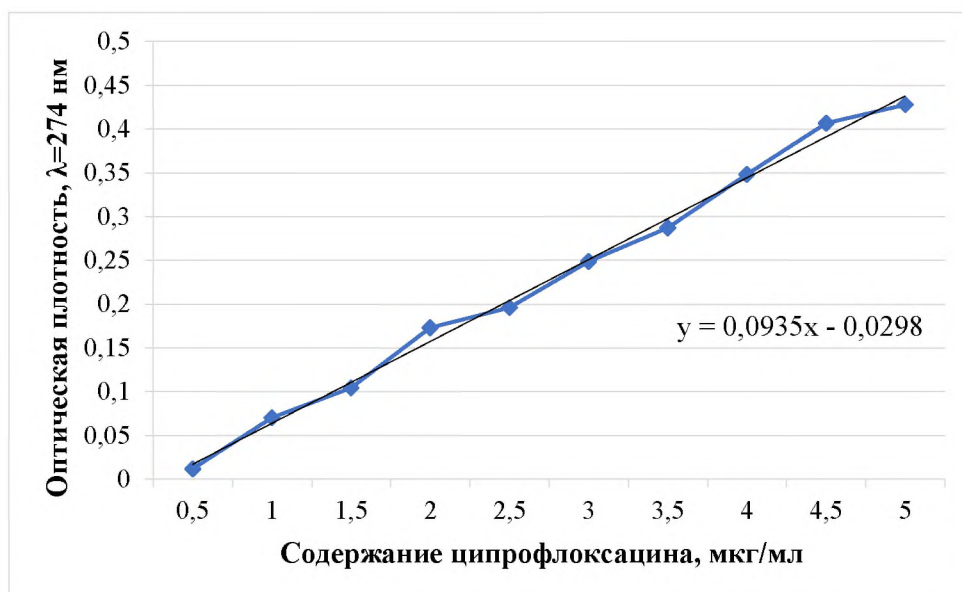


Рисунок 5. Калибровочный график для ципрофлоксацина, $\lambda=274$ нм

Спектр поглощения рифампицина и калибровочный график по рифампицину представлены на рисунках 6,7 соответственно.

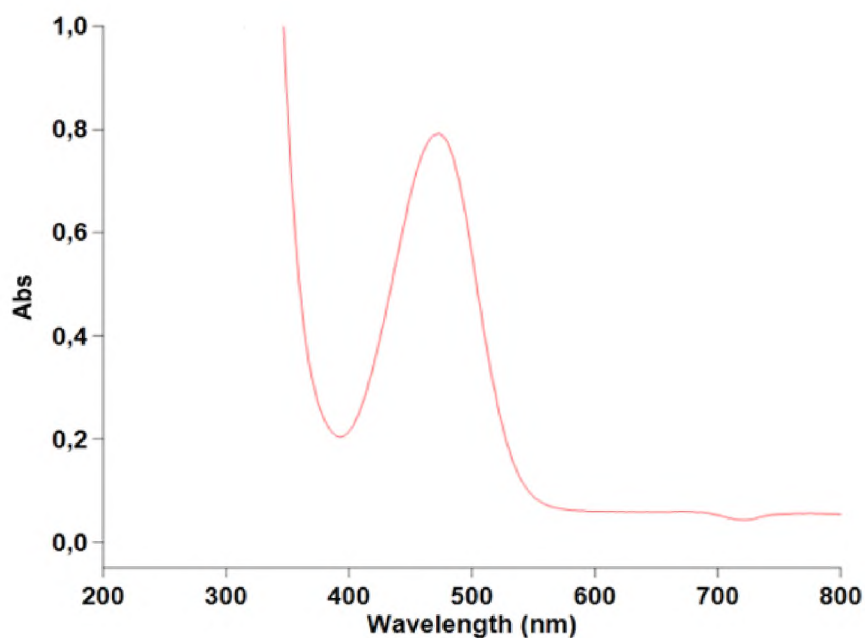


Рисунок 6. Спектр поглощения раствора рифампицина

В результате анализа полученного спектра выявлен характеристический пик для рифампицина на длине волны 470 нм. В ходе выполнения исследования был осуществлен выбор стандартных растворов с известным содержанием определяемого вещества для построения калибровочного графика: 5 мкг/мл, 10 мкг/мл, 15 мкг/мл, 20 мкг/мл, 25 мкг/мл, 30 мкг/мл, 35 мкг/мл, 40 мкг/мл, 45 мкг/мл, 50 мкг/мл.

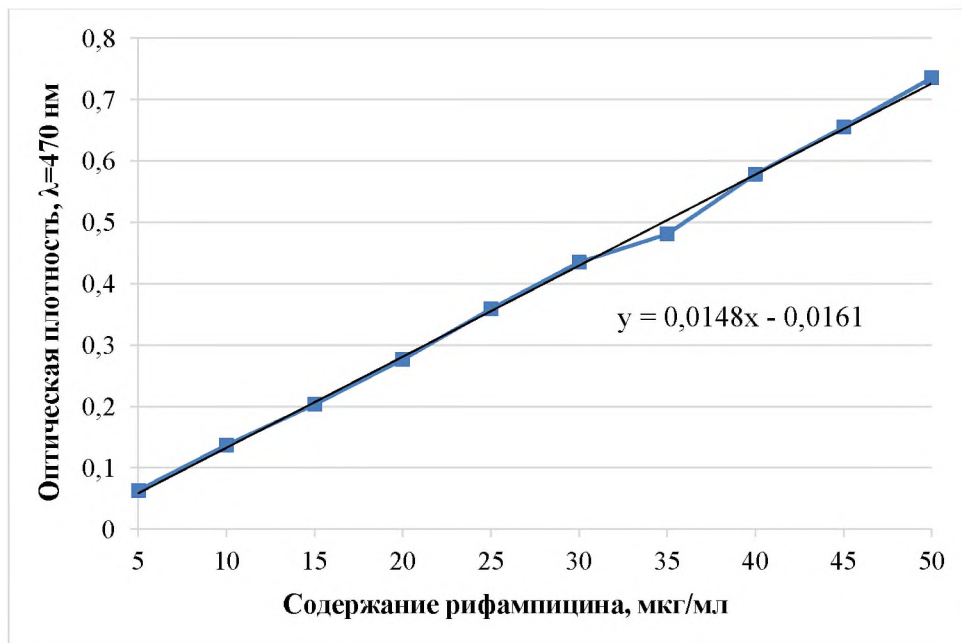


Рисунок 7. Калибровочный график для рифампицина, $\lambda=470$ нм

Количественное определение линкомицина спектрофотометрическим методом проводили на длине волны – 210 нм. При выборе длины волны для данного препарата использовали литературные данные. В ходе выполнения исследования был осуществлен выбор стандартных растворов с известным содержанием определяемого вещества для построения калибровочного графика: 10 мкг/мл, 20 мкг/мл, 30 мкг/мл, 40 мкг/мл, 50 мкг/мл, 60 мкг/мл, 70 мкг/мл, 80 мкг/мл, 90 мкг/мл, 100 мкг/мл (рисунок 8).

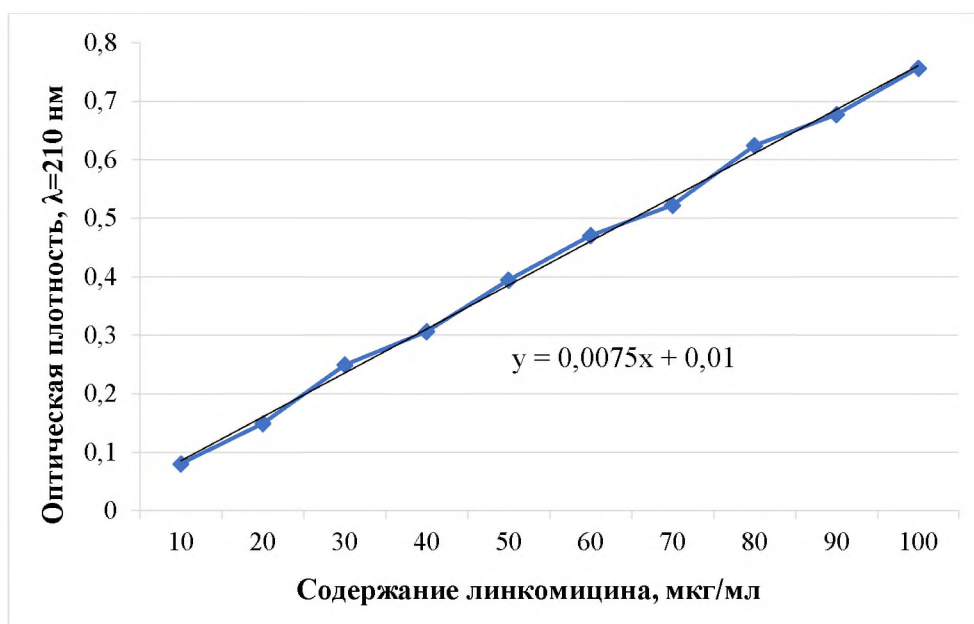


Рисунок 8. Калибровочный график для линкомицина, $\lambda=210$ нм

Полученные калибровочные кривые с известными концентрациями стандартных растворов антибиотиков использовали для расчета высвободившихся препаратов из лекарственных покрытий образцов.

3.4 Оценка времени гидролитической деградации лекарственного покрытия *in vitro*

Оценку времени деградации покрытия образцов определяли путем измерения содержания лекарственного препарата в модельной среде на разных временных промежутках эксперимента. Измерение проводили на спектрофотометре Varian Cary 50 в кварцевой кювете с длиной оптического пути 1 см на длине волны, экспериментально определенной для каждого препарата.

Профиль элюции ванкомицина при моделировании гидролитической деградации покрытия в условиях *in vitro* для образцов группы 1 представлен на рисунке 9.

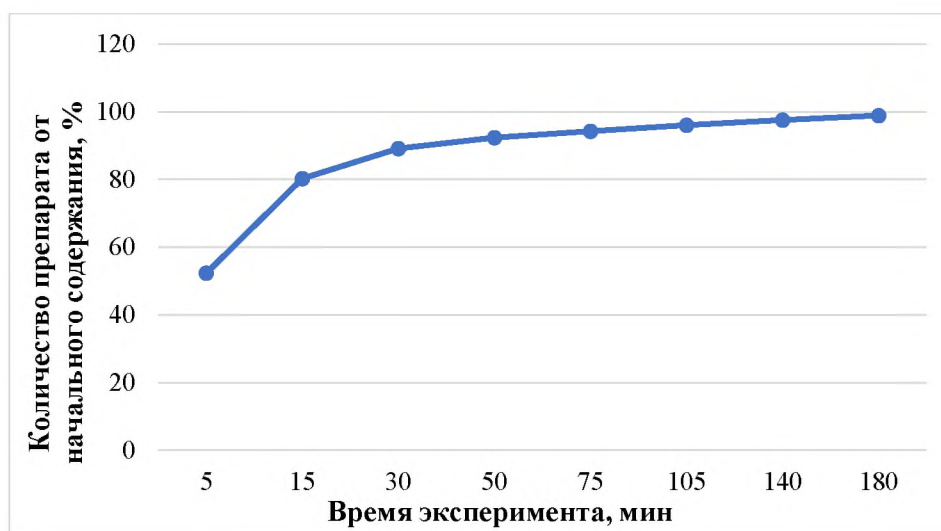


Рисунок 9. Профиль элюции ванкомицина при моделировании гидролитической деградации покрытия для образцов группы 1

Выход ванкомицина в первые 5 минут составил – 52%, через 15 минут – 80%, через 30 минут – 89%, через 50 минут – 92%, через 75 минут – 94%, через 105 минут – 96%, через 140 минут – 98%, через 180 минут – 99%. Практически полное высвобождение препарата из покрытия наблюдали спустя 3 часа от начала эксперимента.

Профиль элюции ванкомицина при моделировании гидролитической деградации покрытия в условиях *in vitro* для образцов группы 2 представлен на рисунке 10.

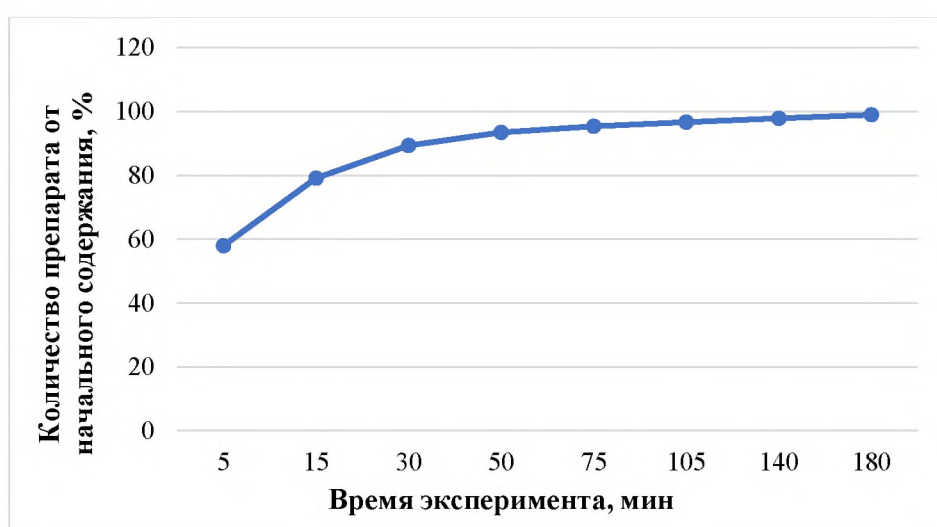


Рисунок 10. Профиль элюции ванкомицина при моделировании гидролитической деградации покрытия для образцов группы 2

По истечении 5 минут от начала эксперимента, вымылось 58% препарата от общего содержания ванкомицина в лекарственном покрытии. Спустя 15 минут выход ванкомицина составил 79%, через 30 минут – 89%, через 50 минут – 93%, через 75 минут – 95%, через 105 минут – 96%, через 140 минут – 98%, через 180 минут – 99%.

Профиль элюции ванкомицина при моделировании гидролитической деградации покрытия в условиях *in vitro* для образцов группы 3 представлен на рисунке 11.

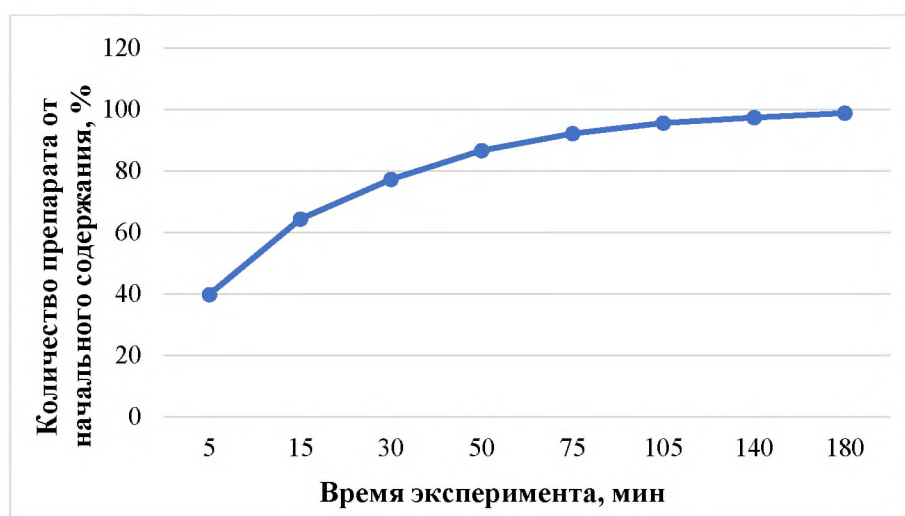


Рисунок 11. Профиль элюции ванкомицина при моделировании гидролитической деградации покрытия для образцов группы 3

Выход ванкомицина в раствор спустя 5 минут от начала эксперимента составил 40%. Через 15 минут выход препарата составил 64%, через 30 минут – 77%, через 50 минут – 87%, через 75 минут – 92%, через 105 минут – 96%, через 140 минут – 97%. На 180 минуте эксперимента ванкомицин практически полностью вымылся с поверхности покрытия, его содержание в растворе составило 99%. Более медленное высвобождение препарата в начале эксперимента может быть связано с наличием желатина в составе покрытия.

Профиль элюции ципрофлоксацина при моделировании гидролитической деградации покрытия в условиях *in vitro* для образцов группы 4 представлен на рисунке 12.

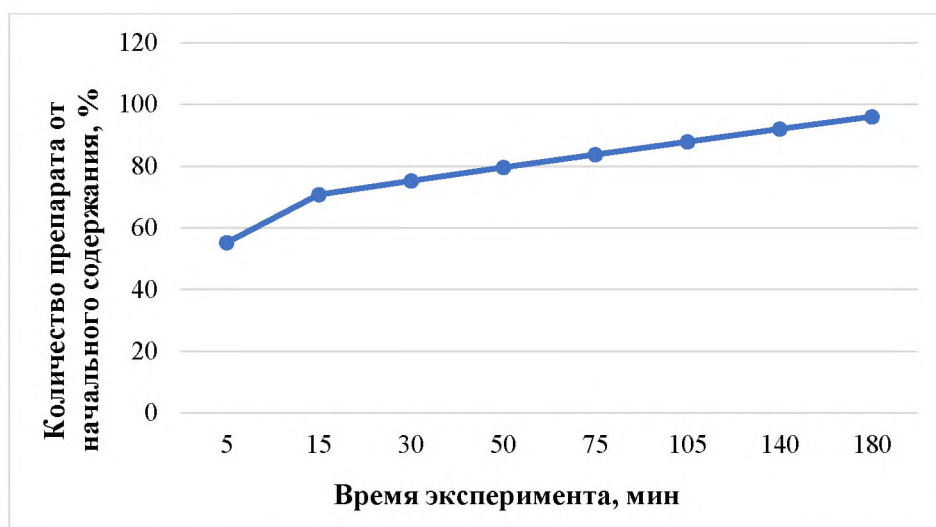


Рисунок 12. Профиль элюции ципрофлоксацина при моделировании гидролитической деградации покрытия для образцов группы 4

В течение 5 минут от начала эксперимента в раствор вымылось 55% ципрофлоксацина от общего его содержания в покрытии. Через 15 минут содержание препарата в растворе составило 71%, через 30 минут – 75%, через 50 минут – 80%, через 75 минут – 84%, через 105 минут – 88%, через 140 минут – 92%, через 180 минут – 96%.

Профиль элюции ципрофлоксацина при моделировании гидролитической деградации покрытия в условиях *in vitro* для образцов группы 5 представлен на рисунке 13.

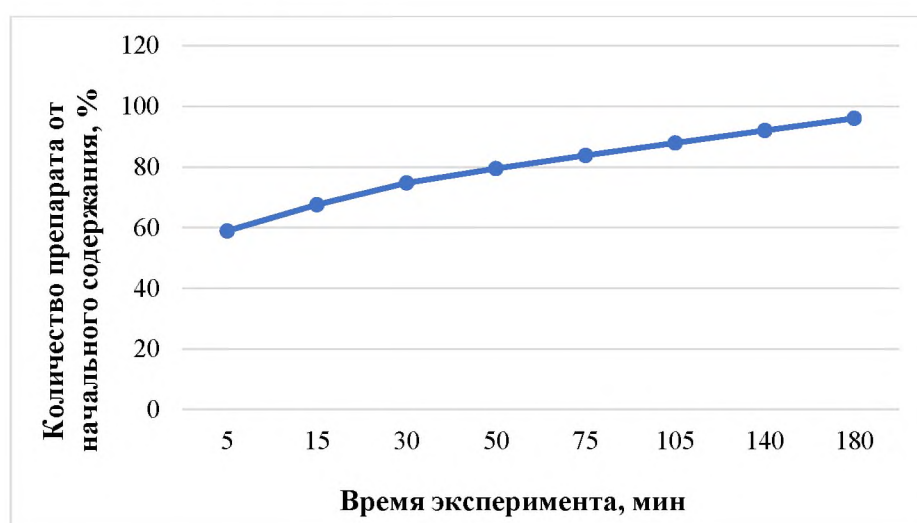


Рисунок 13. Профиль элюции ципрофлоксацина при моделировании гидролитической деградации покрытия для образцов группы 5

При моделировании деградации лекарственного покрытия в физиологический раствор спустя 5 минут от начала эксперимента высвободилось 59% ципрофлоксацина. Через 15 минут выход препарата составил 67%, через 30 минут – 74%, через 50 минут – 79%, через 75 минут – 84%, через 105 минут – 88%, через 140 минут – 92%. К концу эксперимента содержание ципрофлоксацина в растворе составляло 96%.

Профиль элюции ципрофлоксацина при моделировании гидролитической деградации покрытия в условиях *in vitro* для образцов группы 6 представлен на рисунке 14.

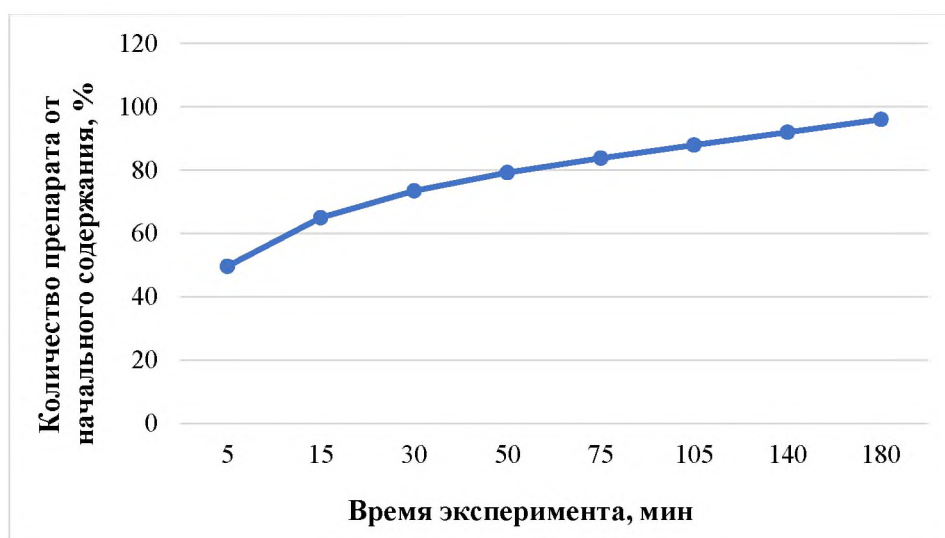


Рисунок 14. Профиль элюции ципрофлоксацина при моделировании гидролитической деградации покрытия для образцов группы 6

По прошествии 5 минут с начала эксперимента содержание ципрофлоксацина в растворе составило 50%. Спустя 15 минут выход препарата составил 65%, через 30 минут – 73%, через 50 минут – 79%, через 75 минут – 84%, через 105 минут – 88%, через 140 минут – 92%. В конечном итоге спустя 180 минут высвобождения препарата с покрытия, содержание ципрофлоксацина в растворе составило 96%.

Профиль элюции рифампицина при моделировании гидролитической деградации покрытия в условиях *in vitro* для образцов группы 7 представлен на рисунке 15.

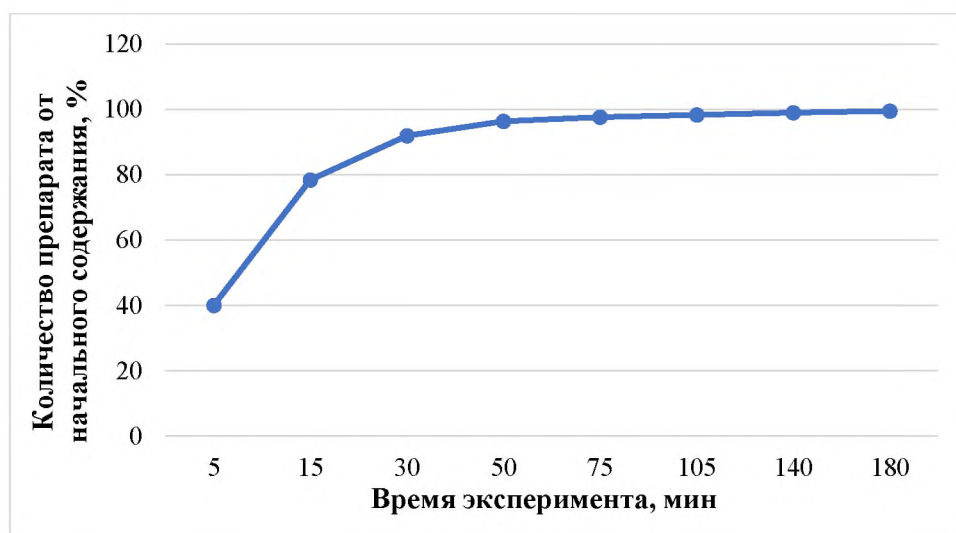


Рисунок 15. Профиль элюции рифампицина при моделировании гидролитической деградации покрытия для образцов группы 7

Спустя 5 минут от начала эксперимента содержание рифампицина в растворе составило 40%. В дальнейшем, спустя 15 минут выход препарата в раствор составил 78%, через 30 минут – 92%, через 50 минут – 96%, через 75 минут – 98%. К концу эксперимента рифампицин практически полностью высвободился с покрытия, его содержание в растворе составило 99%.

Профиль элюции рифампицина при моделировании гидролитической деградации покрытия в условиях *in vitro* для образцов группы 8 представлен на рисунке 16.

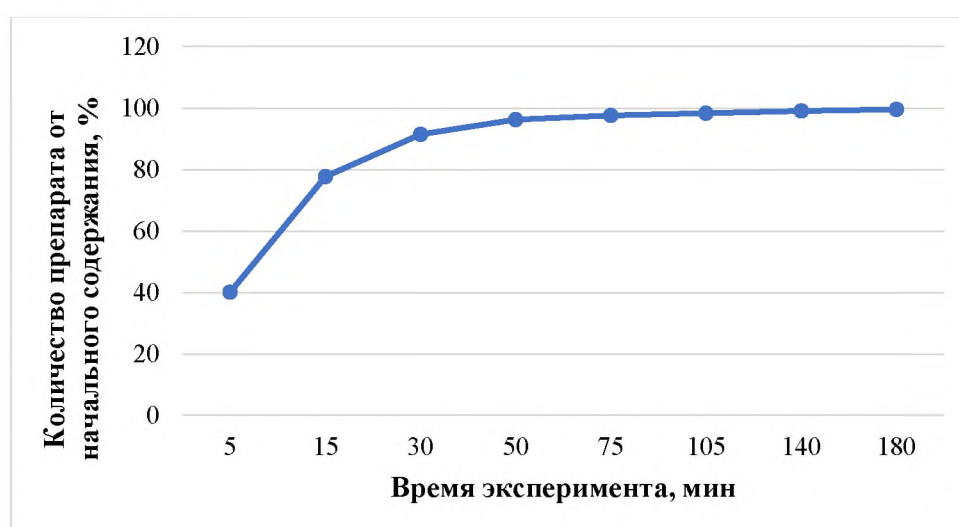


Рисунок 16. Профиль элюции рифампицина при моделировании гидролитической деградации покрытия для образцов группы 8

Спустя 5 минут от начала эксперимента с покрытия в физиологический раствор высвободилось 40% рифампицина. Через 15 минут выход препарата составил 77%, через 30 минут – 91%, через 50 минут – 96%, через 75 минут – 97%, через 105 минут – 98%, через 140 минут – 99%. В итоге, к концу эксперимента в раствор высвободилось 99% препарата от общего содержания рифампицина в покрытии.

Профиль элюции рифампицина при моделировании гидролитической деградации покрытия в условиях *in vitro* для образцов группы 9 представлен на рисунке 17.

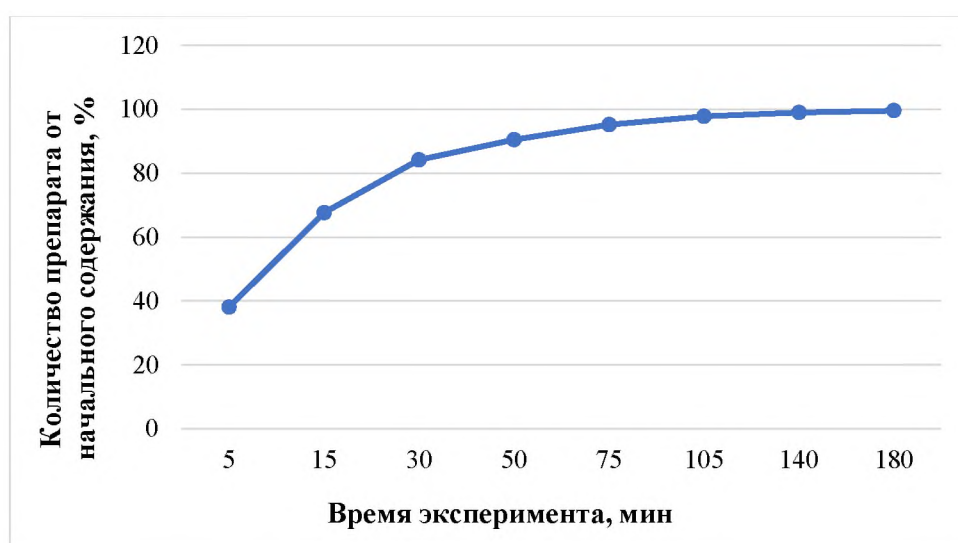


Рисунок 17. Профиль элюции рифампицина при моделировании гидролитической деградации покрытия для образцов группы 9

В первые 5 минут от начала эксперименты в физиологический раствор высвободилось 38% рифампицина. Через 15 минут выход препарата составил 68%, через 30 минут – 84%, через 50 минут – 91%, через 75 минут – 95%. В результате к концу эксперимента наблюдалось практически полное высвобождение рифампицина с покрытия в раствор – 99%. Более длительное высвобождение препарата в начале эксперимента, возможно связано с наличием желатина в составе лекарственного покрытия.

Профиль элюции линкомицина при моделировании гидролитической деградации покрытия в условиях *in vitro* для образцов группы 10 представлен на рисунке 18.

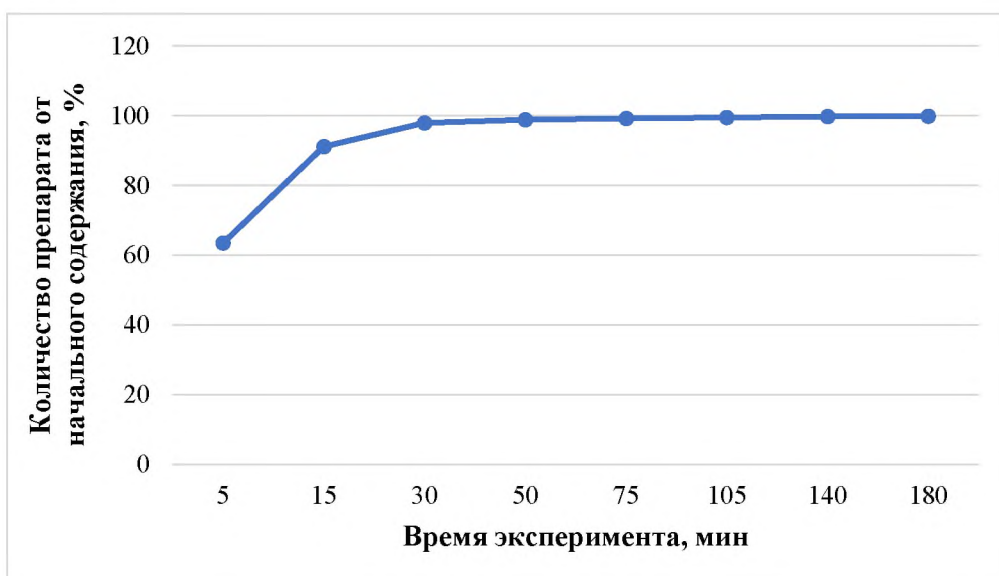


Рисунок 18. Профиль элюции линкомицина при моделировании гидролитической деградации покрытия для образцов группы 10

Профиль элюции линкомицина при моделировании гидролитической деградации покрытия в условиях *in vitro* для образцов группы 11 представлен на рисунке 19.

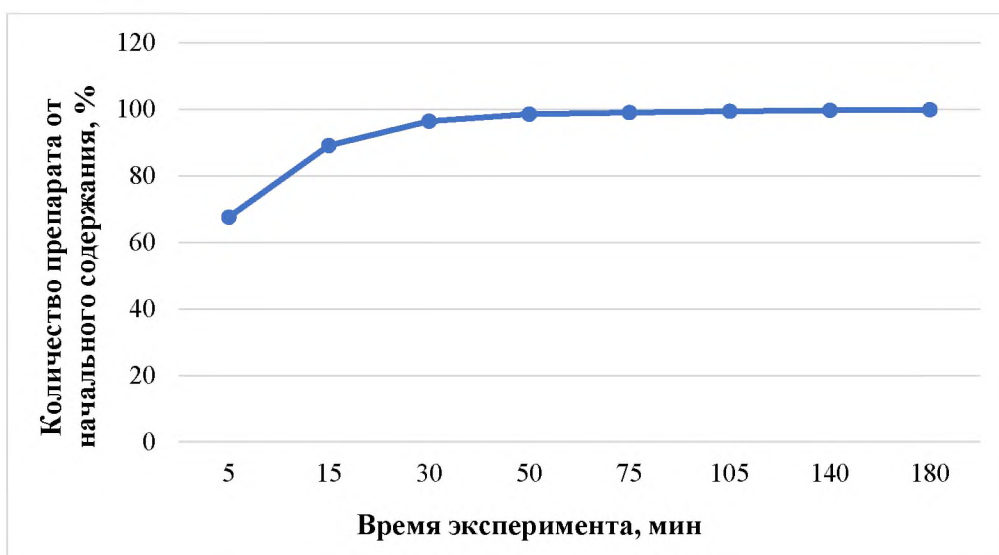


Рисунок 19. Профиль элюции линкомицина при моделировании гидролитической деградации покрытия для образцов группы 11

Профиль элюции линкомицина при моделировании гидролитической деградации покрытия в условиях *in vitro* для образцов группы 12 представлен на рисунке 20.

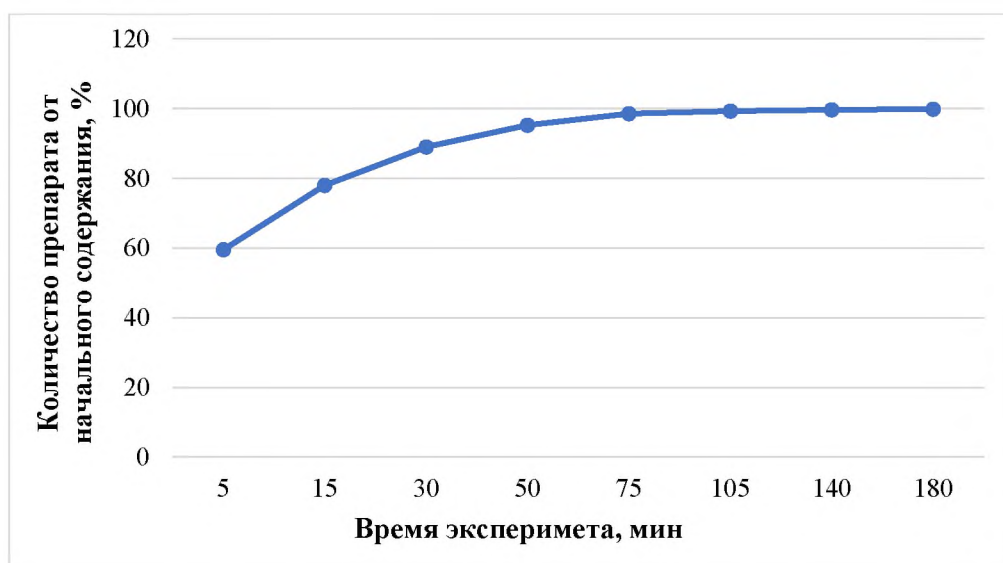


Рисунок 20. Профиль элюции линкомицина при моделировании гидролитической деградации покрытия для образцов группы 12

Анализируя профили элюции линкомицина в физиологический раствор, представленные на рисунках 18-20, обнаружили, что в первый промежуток времени от начала эксперимента в раствор высвободилось более 50% линкомицина от общего его содержания в покрытии. В ходе анализа полученных результатов наблюдали достаточно быстрое высвобождение линкомицина с покрытия и в конечном итоге спустя 3 часа от начала эксперимента получили практически 100% выход лекарственного препарата в раствор.

В результате проведенного исследования, направленного на изучение времени гидролитической деградации лекарственного покрытия в условиях *in vitro*, во всех образцах было выявлено практически полное высвобождение лекарственных препаратов в физиологический раствор. В ходе проведения эксперимента наблюдали достаточно быстрый выход препарата в раствор, который, вероятно, связан с содержанием лекарственных препаратов в верхнем слое покрытий образцов.

При анализе полученных результатов по моделированию деградации лекарственного покрытия в условиях *in vitro*, было обнаружено что добавление хлоргексидина в состав покрытия стент-графтов не влияет на время высвобождения антимикробного препарата. В то время как использование желатина в качестве матрицы для лекарственного вещества обеспечивает задержку высвобождения препаратов в первые промежутки времени от начала эксперимента. Более медленный выход препарата в начале эксперимента может обеспечить антибактериальный эффект, поскольку в среду выделяется достаточное количество антибиотика. В результате можно наблюдать угнетение роста микроорганизмов.

Таким образом, антимикробная активность обусловлена тем, что при деградации покрытий, лекарственный препарат с поверхности диффундирует в среду. Однако, анализируя полученные данные по скорости выхода препаратов в среду, пришли к выводу, что антибактериальный эффект обладает достаточно кратковременным действием, поскольку спустя 3 часа от начала эксперимента во всех группах образцов высвобождение препарата с поверхности покрытия составило более 95% от его общего содержания. Следовательно, чем медленнее в среду высвобождается препарат, тем более продолжительный антибактериальный эффект он обеспечивает.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе выполнения бакалаврской работы было оценено влияние лекарственного покрытия стент-графта на жизнеспособность микроорганизмов и время гидролитической деградации лекарственных покрытий.

Исходя из полученных результатов, можно сделать следующие выводы:

1. Установлено, что в качестве антимикробных агентов при разработке покрытий стент-графтов эффективны такие лекарственные препараты, как ванкомицин, цiproфлоксацин, рифампицин линкомицин и хлоргексидин.
2. Выявлено, что выбранные для исследования лекарственные вещества по-разному влияют на жизнеспособность таких микроорганизмов, как *Escherichia coli*, *Streptococcus viridans* и *Staphylococcus aureus*. Установлено, что наиболее удачными вариантами лекарственного покрытия по критерию антимикробной активности признаны: рифампицин как отдельный препарат, так и в комбинации с хлоргексидином; ванкомицин, цiproфлоксацин в комбинации с хлоргексидином и линкомицин как отдельный препарат.
3. Выявлены характеристические длины волн для различных лекарственных веществ в УФ-диапазоне: для ванкомицина – 280 нм, для рифампицина – 470 нм, для цiproфлоксацина – 274 нм.
4. Обнаружено, что использование желатина в качестве матрицы для лекарственного вещества обеспечивает задержку высвобождения лекарственных веществ.
5. Установлено, что время полной гидролитической деградации лекарственных покрытий стент-графтов составляет не более 180 минут, что свидетельствует о кратковременном антибактериальном эффекте.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Беляцкая А. В. и др. Нитрофураны для наружного применения (обзор) // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2019. Т.8. № 2. С. 38-47.
2. Бондаренко Н. А. и др. Цитотоксичность ксеногенного перикарда, консервированного эпоксидными соединениями в качестве сшивающих агентов // Современные технологии в медицине. 2021. Т.13. № 4. С. 27-35.
3. Бузмакова У.А., Кудряшова О.С. Химическая классификация и методы определения антибиотиков // Вестник Пермского университета. Серия «Химия». 2018. Т. 8, вып. 1. С. 6–28. DOI: 10.17072/2223-1838-2018-1-628.
4. Бут-Гусаим Г. В. и др. Эндоваскулярные методы контроля и лечения кровотечений // Хирургия. Восточная Европа. 2021. Т. 10. № 3. С. 359-370.
5. Егоров И.С. Основы учения об антибиотиках: Учебник. 6-е изд., перераб. и доп. / И.С. Егоров. Москва: Изд-во МГУ; Наука, 2004. 528 с. (Классический университетский учебник). ISBN 5-211-04669-2, ISBN 5-02-033595-9.
6. Журавлева И.Ю. и др. Какой желатин и антибиотик следует выбрать для герметизации тканого сосудистого трансплантата? // Международный журнал молекулярных наук. 2024. Т. 25. № 2. С. 965.
7. Казачек Я. В., Помешкина С. А., Барбараш О. Л. Профилактика инфекционных осложнений в кардиохирургии // Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. 2014. № 4. С. 62-69.
8. Карасев М. М., Редина М. А., Белоусова О. В. Новейшие достижения фармацевтической разработки, основанные на использовании коллагена// Фармация и фармакология. 2015. Т. 3. № 5. С. 12-17.

9. Кривкина Е. О., Матвеева В. Г., Антонова Л. В. Сосудистые протезы с противомикробным покрытием: экспериментальные разработки и внедрение в клиническую практику // Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. 2021. Т. 10. № 3. С. 90-102.
10. Нащекина Ю. А. и др. Биологические и реологические свойства коллагена, сшитого глутаровым альдегидом // Журнал технической физики. 2020. Т. 90. № 9. С. 1601-1606.
11. Панченко А. Н. Применение полимерных материалов в медицинских целях // Международный журнал гуманитарных и естественных наук. 2022. № 6-2. С. 6-9.
12. Патшина М. В., Ворошилин Р. А., Осинцев А. М. Анализ мирового рынка биоматериалов с целью определения потенциальных возможностей сырья животного происхождения // Техника и технология пищевых производств. 2021. Т. 51. № 2. С. 270-289.
13. Петрухина М. И., Ющенко Г. В., Политова Н. Г. Эпидемиологическое значение бактериальных плёнок // Журнал МедиАль. 2015. № 3 (17). С. 9-17.
14. Резвова М. А. и др. Перспективные полимерные соединения мембраны коронарных стент-графтов // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. 2020. Т. 19. № 3. С. 108-116.
15. Ришко О. Тетрациклины: взгляд из прошлого в будущее // Животноводство России. 2019. № 1. С. 36-37.
16. Шаданов А. А. и др. Оценка оригинального герметизирующего покрытия с антибактериальным эффектом для синтетических сосудистых протезов // Патология кровообращения и кардиохирургия. 2023. Т. 27. № 1. С. 38-46.
17. Щетинин Е. В. Полимиксины—новый взгляд на известные антибиотики// Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2000. Т.2. № 3. С. 68-73.

18. Aggarwal D., Kumar V., Sharma S. Drug-loaded biomaterials for orthopedic applications: A review // *Journal of Controlled Release*. 2022. Vol. 344. P. 113-133.
19. Benčina M. et al. The importance of antibacterial surfaces in biomedical applications // *Advances in biomembranes and lipid self-assembly*. Academic Press, 2018. Vol. 28. P. 115-165.
20. Binda E., Marinelli F., Marcone G. L. Old and new glycopeptide antibiotics: action and resistance // *Antibiotics*. 2014. Vol. 3. № 4. P. 572-594.
21. Cassano R. et al. Expanded polytetrafluoroethylene membranes for vascular stent coating: manufacturing, biomedical and surgical applications, innovations and case reports // *Membranes*. 2023. Vol. 13. № 2. P. 240.
22. Donlan R. M. Biofilms: microbial life on surfaces // *Emerging infectious diseases*. 2002. Vol. 8. № 9. P. 881.
23. Ershad-Langroudi A. et al. Polymers for implantable devices // *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. 2024. P. 1-6.
24. Etebu E., Ariekpar I. Antibiotics: Classification and mechanisms of action with emphasis on molecular perspectives // *Int. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. Res*. 2016. Vol. 4. № 2016. P. 90-101.
25. Fuoco D. Classification framework and chemical biology of tetracycline-structure-based drugs // *Antibiotics*. 2012. Vol. 1. № 1. P. 1-13.
26. Helmus M. N., Gibbons D. F., Cebon D. Biocompatibility: meeting a key functional requirement of next-generation medical devices // *Toxicologic pathology*. 2008. Vol. 36. № 1. P. 70-80.
27. Hu Y. Q. et al. Isoniazid derivatives and their anti-tubercular activity // *European journal of medicinal chemistry*. 2017. Vol. 133. P. 255-267.
28. Im S. H. et al. Current status and future direction of metallic and polymeric materials for advanced vascular stents // *Progress in Materials Science*. 2022. Vol. 126. P. 1-3.
29. Kang H. K., Park Y. Glycopeptide antibiotics: structure and mechanisms of action // *Journal of Bacteriology and Virology*. 2015. Vol. 45. № 2. P. 67-78.

30. Khan F., Tanaka M., Ahmad S. R. Fabrication of polymeric biomaterials: a strategy for tissue engineering and medical devices // *Journal of Materials Chemistry B*. 2015. Vol. 3. № 42. P. 8224-8249.
31. Le V. V. H., Rakonjac J. Nitrofurans: Revival of an “old” drug class in the fight against antibiotic resistance // *PLoS Pathogens*. 2021. Vol. 17. № 7. P. 1-7.
32. Mitchell R. S. et al. Endovascular stent–graft repair of thoracic aortic aneurysms // *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*. 1996. Vol. 111. № 5. P. 1054-1062.
33. Negut I., Bită B., Groza A. Polymeric Coatings and Antimicrobial Peptides as Efficient Systems for Treating Implantable Medical Devices Associated-Infections // *Polymers*. 2022. Vol. 14. № 8. P. 1611.
34. Oryan A. et al. Chemical crosslinking of biopolymeric scaffolds: Current knowledge and future directions of crosslinked engineered bone scaffolds // *International journal of biological macromolecules*. 2018. Vol. 107. P. 678-688.
35. Roina Y. et al. ePTFE functionalization for medical applications // *Materials Today Chemistry*. 2021. Vol. 20. P. 1-23.
36. Rolph R., Duffy J. M. N., Waltham M. Stent graft types for endovascular repair of thoracic aortic aneurysms // *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2015. № 9. P. 1-13.
37. Sapuła P., Bialik-Wąs K., Malarz K. Are natural compounds a promising alternative to synthetic cross-linking agents in the preparation of hydrogels? // *Pharmaceutics*. 2023. Vol. 15. № 1. P. 253.
38. Škrlová K. et al. Biocompatible polymer materials with antimicrobial properties for preparation of stents // *Nanomaterials*. 2019. Vol. 9. № 11. P. 1548.
39. Spížek J., Řezanka T. Lincosamides: Chemical structure, biosynthesis, mechanism of action, resistance, and applications // *Biochemical pharmacology*. 2017. Vol. 133. P. 20-28.

40. Strohbach A. et al. Polymers for cardiovascular stent coatings // International Journal of Polymer Science. 2015. – Vol. 2015. P. 1-12.
41. Teo A. J. T. et al. Polymeric biomaterials for medical implants and devices // ACS Biomaterials Science & Engineering. 2016. Vol. 2. № 4. P. 454-472.
42. Vaara M. Polymyxins and their potential next generation as therapeutic antibiotics // Frontiers in Microbiology. 2019. Vol. 10. P. 1-6.
43. VanEpps J. S., Younger J. G. Implantable device-related infection // Shock. 2016. Vol. 46. № 6. P. 597-608.
44. Von Eiff C. et al. Infections associated with medical devices: pathogenesis, management and prophylaxis // Drugs. 2005. Vol. 65. P. 179-214.
45. Wang W. et al. Improving Biocompatibility of Polyester Fabrics through Polyurethane /Gelatin Complex Coating for Potential Vascular Application // Polymers. 2022. Vol. 14. № 5. P. 989.
46. Woo J. et al. Functional ferrocene polymer multilayer coatings for implantable medical devices: Biocompatible, antifouling, and ROS-sensitive controlled release of therapeutic drugs // Acta Biomaterialia. 2021. Vol. 125. P. 242-252.