

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

ПЕНЗЕНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

Факультет
физико-математических
и естественных наук

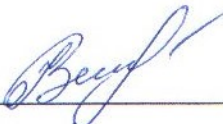
Кафедра
«Общая биология и биохимия»

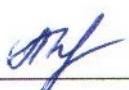
Направление подготовки 06.03.01 Биология
Профиль подготовки Биохимия
Форма обучения очная

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

на тему:

**«ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ КОМПОЗИЦИОННОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО
ПОКРЫТИЯ ДЛЯ ИМПЛАНТИРУЕМЫХ МЕДИЦИНСКИХ
ИЗДЕЛИЙ»**

Студент  Гуляева Вера Вячеславовна

Руководитель  Кручинина А.Д.

Нормоконтролер  Кручинина А.Д.

Работа допущена к защите (протокол заседания кафедры от 15.06.19 № 16)

Заведующий кафедрой  Карпова Г.А.

Работа защищена с отметкой отлично
(протокол заседания ГЭК от 15.06.19 № 5)

Секретарь ГЭК  Клыченков С.В.

Пенза, 2019

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	7
1.1 Биохимия костной ткани.....	7
1.1.1 Основные химические компоненты костной ткани.....	7
1.1.2 Моделирование и ремоделирование костной ткани.....	8
1.1.3 Биохимические маркеры метаболизма костной ткани.....	9
1.2 Реконструкция дефектов костной ткани.....	10
1.2.1 Виды дефектов.....	10
1.2.2 Материалы биомедицинского назначения, применяемые для реконструкции костной ткани.....	11
1.3 Послеоперационные инфекционные осложнения.....	13
1.4 Применение систем доставки лекарственных препаратов для снижения риска осложнений.....	16
1.4.1 Лекарственные препараты против инфекционных осложнений.....	17
1.4.2 Полимеры как подходящие материалы для системы контролируемой доставки лекарственных препаратов.....	21
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	23
2.1 Материалы исследований.....	23
2.2 Методы исследований.....	25
2.2.1 Оценка антибактериального действия лекарственного покрытия	25
2.2.2 Моделирование деградации лекарственного покрытия <i>in vitro</i>	26
2.2.3 Методы статистической обработки результатов.....	28

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	29
3.1 Результаты исследования антибактериального действия лекарственного покрытия костных блоков.....	29
3.2 Результаты исследования профилей выхода меропенема из лекарственного покрытия костных блоков	32
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	46
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	47
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	48

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. Реконструкция дефектов костной ткани с помощью новых технологий и материалов считается перспективным направлением в медицине. Обусловлено это высоким уровнем травм опорно-двигательного аппарата, обширностью стоматологических заболеваний, а также инфекционных осложнений после протезирования костей и суставов, таких как остеомиелит, гнойный артрит и др. Важной задачей при костной имплантации является предотвращение распространения инфекции на границе контакта поверхностей тканей и имплантата. Одним из способов, способствующих угнетению инфекционного процесса и повышающих эффективность лечения инфекции костей и суставов, является локальное применение лекарственных средств. В этом случае ситуация осложняется необходимостью доставки в нуждающуюся область антибактериального препарата (АБП) и поддержания его концентрации на заданном уровне длительное время.

Вопросы рационального применения АБП при лечении инфекции костей и суставов до настоящего времени не имеют однозначных ответов. Во многом это объясняется недостаточной эффективностью системной антибактериальной терапии, как правило, из-за низкой пенетрации АБП в костную ткань, антибиотикорезистентности многих возбудителей, роль которых в патогенезе имплантат-ассоциированных инфекций в ортопедии на сегодняшний момент неоспорима. Также открытым остается вопрос о длительности системной антибактериальной терапии послеоперационных инфекционных осложнений – продолжительность курсов колеблется от нескольких недель до нескольких месяцев.

Ортопедия и травматология являются обособленной областью медицины, в которой системная антибактериальная терапия проводится на протяжении длительного промежутка времени комбинацией препаратов в определенных дозах. Для этих целей разрабатывают композиционные

лекарственные покрытия, в которых на частицы нерастворимого в воде полимера наносится АБП. Первый обеспечивает адресную доставку лекарственного средства к очагу воспаления, второй – направлен на борьбу с возбудителями в зависимости от необходимого терапевтического эффекта. Полимеры, в зависимости от своих свойств и происхождения, обладают продолжительным периодом деградации в организме, что позволяет достигать замедленного и контролируемого высвобождения импрегнированного АБП.

Изготовленные подобным образом композиционные материалы представляют собой комбинацию, благодаря которой достигаются те или иные оптимальные свойства: регенерация костной ткани, регулируемая скорость деградации полимера, контролируемое высвобождение АБП. Кроме непосредственного лечения послеоперационных инфекционных осложнений АБП, материалы могут быть использованы в качестве покрытия для имплантируемых изделий с целью профилактики адгезии микроорганизмов и формирования биопленок.

В связи с этим создание композиционных лекарственных покрытий для имплантируемых медицинских изделий является довольно актуальным направлением для многих областей медицины и фармакологии.

Целью работы является исследование антибактериальных свойств и параметров высвобождения меропенема из композиционного лекарственного покрытия костных блоков.

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

- 1) Изучить особенности биохимии костной ткани, виды дефектов и способы их реконструкции, возможные послеоперационные инфекционные осложнения и способы снижения риска их возникновения;
- 2) Оценить антибактериальное действие образцов костных блоков с лекарственным покрытием;
- 3) Подготовить экспериментальные образцы костных блоков с лекарственным покрытием, провести моделирование деградации

лекарственных покрытий в условиях *in vitro* и оценить количественное высвобождение меропенема;

4) Оценить возможность использования органических растворителей и метода сверхкритической флюидной экстракции для изготовления лекарственного покрытия.

Выпускная квалификационная работа написана на 53 листах, содержит 8 рисунков, 15 таблиц и список литературы на русском и английском языках из 60 источников.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Биохимия костной ткани

Костная ткань – это особый вид соединительной ткани, который включает компоненты органической и неорганической природы, а также выполняет функцию депо кальция (99%) в организме. Костная ткань имеет свои особенности, не встречающиеся в других видах соединительной ткани. Главные её особенности – твердость, механическая прочность, упругость [10].

Как и все соединительные ткани, костная ткань состоит из внеклеточного матрикса и клеток. Внеклеточный матрикс состоит из органического и неорганических веществ: содержит воду, белки (коллагеновые и неколлагеновые), небольшое количество протеогликанов и растворенных низкомолекулярных органических соединений. Главная способность внеклеточного матрикса – умение минерализоваться (откладывать неорганические вещества в органический матрикс) и приобретать сложную кристаллическую структурную организацию [4].

1.1.1 Основные химические компоненты костной ткани

Костная ткань представляет собой уникальное единство минерального субстрата и белковой основы, взаимно проникающих друг в друга. Минеральная субстанция кости составляет 60 %, белковая основа – 30%, вода – 10 %. Минеральный компонент костной ткани составляет 1040- 1200 г кальция, 455-500 г фосфора, 5-9 г магния. В костной ткани также содержится 87 % фосфата кальция, 11 % карбоната кальция, 1,6 % фосфата магния, 0,4 % фторида кальция, 0,002 % различных микроэлементов (хлор, бор, алюминий, марганец, фтор, медь, серебро, стронций, барий, свинец, кадмий, кобальт, железо, титан, цинк, кремний и др.). Микроэлементы играют важную роль в вегетативных процессах, протекающих в костной ткани. Например, медь

активирует ферменты, вырабатываемые остеобластами (молодыми клетками костной ткани), марганец ускоряет работу щелочной фосфатазы, цинк способствует ускорению ферментов окисления [17]

Органический матрикс состоит на 90 % из коллагена – особого фибриллярного белка соединительной ткани. Наряду с ним, в ней содержатся белки неколлагеновой природы: гликопротеины, альбумины и сиалопротеины. Первые выполняют важные функции, принимая участие в процессах минерализации, водно-солевого обмена, развития и роста кости. Альбумины выполняют транспортную функцию, принимают участие в доставке и распределении гормонов, низкомолекулярных веществ из кровяного русла в кость. Сиалопротеины в костной ткани определяют способность связывать катионы, что важно для процессов минерализации костного органического матрикса. Другие неколлагеновые белки, такие как остеонектин, остеокальцин, остеонектин-кальцийсвязывающие белки, тоже принимают участие в процессах минерализации [10].

1.1.2 Моделирование и ремоделирование костной ткани

Кость при всей её твердости подвержена различным изменениям. Весь её плотный внеклеточный матрикс пронизан каналами и полостями, которые заполнены клетками, и составляют около 16 % веса компактной кости. Эти клетки участвуют в непрерывном процессе перестройки костной ткани. Процессы моделирования и ремоделирования обеспечивают постоянное обновление костей, а также модификацию их структуры и формы [8].

Моделированием называют образование новой кости, не связанное с предварительным разрушением старой костной ткани. Особенно моделирование имеет место в детском возрасте и приводит к изменению структуры скелета, тогда как у взрослых – к модификации этой структуры в ответ на какое-либо механическое воздействие. Данный процесс отвечает также за поэтапное увеличение размеров позвонков в зрелом возрасте [8,12].

Ремоделирование является главенствующим процессом в скелете взрослых и не сопровождается изменением структуры всего скелета, так как в этом случае происходит лишь замена определенного участка старой кости на новую. Такое обновление костной ткани способствует сохранению её механических свойств. Ремоделированию подвергается от 3 до 11 % скелета в год. Паратгормон, соматотропин, тироксин и кальцитриол повышают скорость ремоделирования, тогда как эстрогены, кальцитонин и глюкокортикоиды снижают её. К побуждающим факторам относятся возникновение микротрещин и механические воздействия в определённой мере [12].

1.1.3 Биохимические маркеры метаболизма костной ткани

Определение биохимических маркеров формирования костной ткани является важной частью диагностической программы исследования пациентов с метаболическими заболеваниями костей.

Метаболизм костной ткани характеризуется двумя обратными процессами: образованием остеобластами новой костной ткани и резорбцией (разрушением) старой остеокластами. Масса кости зависит от баланса между образованием кости и резорбцией в исследуемый период времени в зависимости от количества активированных участков ремоделирования (которому подвергается от 3 до 11% скелета в год). В норме количество новообразованной ткани равно разрушенной. При любых заболеваниях скелета происходят нарушения процессов ремоделирования кости, что сопровождается возникновением различных отклонений в уровне биохимических маркеров [41].

Имеются общие маркеры, характерные для формирования новой костной ткани, такие как остеокальцин и пептиды плазмы, костно-специфическая щелочная фосфатаза и проколлаген I. К биохимическим маркерам резорбции кости относятся кальций и гидроксипролин в моче, дезоксипиридинолин и пиридинолин мочи, кислая тартрат-резистентная

фосфатаза плазмы, коллагеновых телопептиды I типа в плазме и в моче и некоторые другие [10.41].

1.2 Реконструкция костной ткани

В последнее время процедура имплантации стала весьма востребованной. Однако, проведение такой операции невозможно, если костная ткань имеется в недостаточном количестве. Устранить эту проблему можно, если провести процедуру наращивания, то есть реконструкцию костной ткани. Она может проводиться следующим образом:

- регенерация ткани на основе синтетического сырья в порошкообразном виде;
- установка барьерных мембран с применением специальных костных блоков;
- ксенотрансплантация – в качестве строительного материала используется костная ткань животного происхождения;
- костные блоки – подсадка костных блоков в нижней или верхней челюсти при недостатке костного гребня [8];

В некоторых случаях используют сразу несколько методик одновременно, например, костную пластику комбинируют с установкой барьерных мембран. В целом, технология проведения процедуры применяется в индивидуальном порядке, принимая во внимание общую клиническую картину, результаты диагностики и личный анамнез [17, 45].

1.2.1 Виды дефектов

Под дефектом костной ткани понимают утрату костного вещества, возникшую либо вследствие прямого воздействия травмирующего агента (первичные дефекты), либо в результате оперативного патологического процесса или вмешательства (вторичные дефекты).

Объективным признаком дефекта костной ткани считается наличие диастаза между отломками величиной более 1-1,5 см. При определении истинных размеров дефекта костной ткани требуется измерить как величину межотломкового пространства, так и величину содержащегося анатомического укорочения поврежденного сегмента конечности [17].

Классифицируются дефекты костной ткани по размеру, локализации, виду (краевой, тотальный, циркулярный), форме концов отломков и состоянию окружающих кость тканей. Это помогает выбирать правильную тактику лечения, предупреждать развитие нежелательных последствий, прогнозировать длительность терапии и реабилитационного периода. Постановка точного диагноза, согласно современной классификации, совершенствует прогноз травмы и заметно снижает риск развития тяжелых осложнений [24,42].

В совокупность хирургических методов лечения дефектов костей входят различные виды несвободной и свободной ауто-, ксено- или аллогенной, костной пластики, пересадка костных трансплантатов или комплексов тканей с применением микрохирургической техники [10, 53].

1.2.2 Материалы биомедицинского назначения, применяемые для реконструкции костной ткани

Довольно широкой областью применения биоматериалов в настоящее время стала реконструкционная хирургия, которая позволяет проводить восстановление дефектов тканей и органов, улучшать качество жизни пациентов. Реконструкция дефектов и оптимизация процесса заживления костной ткани с помощью новых технологий и материалов является перспективным направлением в медицине [3].

Костнозамещающие материалы используются для восполнения объема и регенерации костной ткани, потерянной в результате какого-либо воспалительного процесса. Однако собственная кость пациента является

«золотым стандартом» для замещения костных дефектов из-за жизнеспособности клеток и факторов роста [6].

В соответствии с их происхождением (типом) все существующие в настоящий момент виды костных материалов и заменителей кости можно разделить на следующие группы:

- аутогенные трансплантаты – собственная костная ткань пациента, взятая из донорских зон внутри ротовой полости, либо подвздошной кости;
- аллогенные имплантаты (аллоимплантаты) – донорская, либо трупная костная ткань. Эта структура из натуральной костной ткани;
- ксеногенные имплантаты (ксеноимплантаты) – материалы животного происхождения, преимущественно из бычьей кости;
- аллопластические материалы – синтетические материалы, состоящие преимущественно из фосфата кальция [4,5].

Существуют четыре главные характеристики, которые должен проявлять любой костнозамещающий материал, чтобы считаться работоспособным.

1. Остеоинтеграция – способность к химическому соединению костной стенкой дефекта или с поверхностью имплантата без вмешательства соединительной ткани;
2. Остеокондуктивность – способность вызывать формирование и рост костной ткани на своей поверхности;
3. Остеоиндуктивность – способность осуществлять дифференцирование потенциальных мезенхимных клеток из окружающих тканей для образования молодых клеток костной ткани;
4. Остеогенез – способность формирования молодыми костными клетками новой костной матрицы в присутствии внедренного материала [52].

Сегодня благодаря прогрессирующему развитию костнозамещающих материалов доступна надежная и безопасная альтернатива использованию разных трансплантатов. У врачей существует возможность выбора разных костнозамещающих материалов и техник аугментации.

1.3 Послеоперационные инфекционные осложнения

Серьезной проблемой в реконструкционной ортопедии является снижение риска развития инфекции после проведения костной имплантации. Важной задачей при этом является предотвращение инфекции на границе контакта поверхностей тканей и имплантата. В этом случае ситуация осложняется необходимостью доставки в эту область противовоспалительных и АБП и поддержания их концентрации на заданном уровне определенное время [35].

Послеоперационные осложнения – это вновь начавшиеся патологические состояния, не являющиеся продолжением основного заболевания и нехарактерные для нормального течения послеоперационного периода. Частота послеоперационных осложнений соответствует объему хирургических вмешательств и варьирует в большом диапазоне от 6 до 20% [41].

Часто в случае послеоперационных осложнений в результате проведенной костной имплантации важным компонентом лечения является хирургическая санация, то есть специальные лечебно-профилактические меры с целью удаления очага некротизированных и лишенных кровоснабжения фрагментов кости, потому что в данной ситуации эти фрагменты представляют собой инородное тело и служат местом образования микробных биопленок [21]. Однако даже после качественной санации до возвращения кровоснабжения в костной ткани в самой области оперативного вмешательства остаются микроорганизмы, на борьбу с которыми направлено действие системной антибактериальной терапии [7].

Большинство осложнений – это гнойно-воспалительные заболевания, частота которых увеличивается и обусловлена широким распространением АБП, часто необоснованным их использованием, внутрибольничным инфицированием, а также организационными неполадками [22].

Выделяют такие распространенные послеоперационные осложнения как:

Остеомиелит (инфекция костной ткани) – заболевание воспалительного характера, которое образуется в результате гематогенного распространения инфекции или поражения кости из-за нездоровья суставов, а также после травмы и хирургического вмешательства. В около 90% случаев в роли возбудителя остеомиелита выступает *Staphylococcus aureus*, реже – *Streptococcus pyogenes* (4%), *Haemophilus influenzae* (около 4%), *Escherichia coli*, *Mycobacterium tuberculosis*, а также микроорганизмы родов *Salmonella* и *Klebsiella*. Основной метод лечения – дренирование и удаление участка омертвевшей ткани. Эмпирическую антибиотикотерапию нужно начинать как можно быстрее, так как в большинстве случаев заболевание вызывают стафилококки и стрептококки. При неправильном лечении, а также после хирургической операции или травмы болезнь перерождается в хроническую форму. У 50% больных возбудителем становятся *Staphylococcus aureus*, в остальных случаях чаще – грамотрицательные бактерии рода *Pseudomonas*, *Proteus* и *Escherichia coli*. Залогом эффективного лечения считается правильно подобранная антибактериальная терапия и успешное выполнение хирургического вмешательства [24,25,30].

Гнойный артрит – это воспаление всех структур сустава, вызываемое патогенной микрофлорой. Обычно в 95% случаев возбудителем являются *Staphylococcus aureus* и *Staphylococcus pyogenes*. Кроме того, в этиологии заболевания участвуют *Neisseria gonorrhoeae*, *Borrelia burgdorferi*, *Pasteurella* и другие [17]. Чаще происходит поражение крупных суставов, но нередко наблюдают инфекции плечевого, голеностопного, тазобедренного, локтевого и запястного суставов. Довольно часто это заболевание возникает при протезировании суставов, когда во время операции или в результате гематогенного распространения на протезе распространяются микроорганизмы, входящие в состав микрофлоры кожи (обычно *Staphylococcus aureus* или *Staphylococcus epidermidis*). Лечение

рекомендуется начинать с внутривенного введения АБП, эффективных в отношении конкретного или предполагаемого возбудителя. Затем продолжают курс антибактериальной терапии. В определенных ситуациях необходима пункция и промывание сустава [51,57].

Инфекции суставов после протезирования. Суставные протезы могут подвергнуться бактериальному воздействию во время операции и при гематогенном распространении инфекции. Возбудителями обычно становятся низковирулентные микроорганизмы (например, *Staphylococcus epidermidis*). Тяжёлые последствия наблюдают в результате инфекции, вызванной *Staphylococcus aureus* (особенно его метициллин-резистентными штаммами (MRSA)). По результатам исследования чувствительности микроорганизмов к АБП для лечения назначают их внутривенное введение [24,36].

Проблема лечения подобных заболеваний заключается в том, что минимальные концентрации АБП для уничтожения микроорганизмов часто превышают минимальные подавляющие концентрации (МПК) примерно в тысячу раз [16]. В результате этого системное введение АБП, к которым возбудитель демонстрирует чувствительность *in vitro* при рутинных исследованиях, не позволяет создать нужные эффективные концентрации в очаге инфекции. Массивная системная антибактериальная терапия непременно приводит к развитию токсического действия [24].

В настоящее время собрана и проанализирована информация об остеозамещающих материалах, которые используются для локальной антибиотикотерапии при заболеваниях костной ткани в условиях эксперимента и в клинической практике. Среди этих материалов можно выделить нерассасывающиеся (цементы на основе полиметилметакрилата) и материалы, подверженные биодеградации (материалы на основе биокерамики, костные трансплантаты, деминерализованный костный матрикс, природные и синтетические полимеры, комбинированные транспортные системы для антибактериальных препаратов). Довольно часто

для локального применения в составе костного цемента используют антибактериальные средства такие как: цефтриаксон, гентамицин, ванкомицин и другие, благодаря их физическим свойствам и активности в отношении большинства возбудителей послеоперационных вмешательств [1,43,44].

Для подавления распространения микроорганизмов, вызывающих инфекционные заболевания любой сложности, необходимо проведение исследований разнообразных лекарственных средств, чтобы выяснить, к каким АБП микроорганизмы проявляют большую чувствительность [40]. Различные эксперименты могут свидетельствовать о тенденции повышения устойчивости культуры, что в дальнейшем потребует изменения схемы терапии данным антибиотиком или использования для лечения и профилактики другого, более эффективного АБП [57].

1.4 Применение систем доставки лекарственных препаратов для снижения риска осложнений

Результативность противоопухолевых и противовоспалительных препаратов сильно ограничена их высокой токсичностью. Одним из решений данной проблемы является создание систем контролируемой доставки лекарственных средств [2].

Разработка систем контролируемой доставки лекарственных средств является актуальным направлением в медицине и фармакологии. Важным преимуществом этих систем считается возможность длительного и стационарного поддержания необходимого уровня лекарственного препарата в крови или в тканях пациента на определенный временной промежуток. Эта особенность позволяет избегать высоких первоначальных концентраций препарата и уменьшать число последующих процедур [9]. Важно это в моментах, когда в процессе лечения возникает необходимость использования значительно токсичных препаратов, эффективных в случае самого

заболевания, но при этом оказывающих негативное действие на другие системы организма. Часто это побуждает отказываться от использования подобных веществ и прибегать к применению менее эффективных препаратов [11].

Создать правильную концентрацию лекарственных веществ в пораженных болезнью местах, не затрагивая остальные, – задача сложная. Ведь лекарственные препараты, каким бы их не вводили способом, распределяются по всему организму более или менее равномерно. Для того, чтобы они попали конкретно в патологический очаг, необходим носитель, который бы доставил препарат к месту назначения [19].

Контролируемая доставка лекарственных препаратов востребована при длительных и системных заболеваниях. Она примечательна и для лечения инфицированных костных тканей [29]. На сегодняшний день уже показана перспективность биodeградируемых имплантатов, несущих антибиотики в лечении хронических и имплантат-ассоциированных остеомиелитов для подавления инфекций, вызванных стафилококком [3].

Многообразие возможных вариантов систем контролируемой доставки лекарственных средств открывает значительные перспективы в лечении многих заболеваний. Развитие этого направления в медицине и фармакологии позволит до минимума снизить стрессовое воздействие терапии на пациента и упростит процедуру лечения [55].

1.4.1 Лекарственные препараты против инфекционных осложнений

Учитывая природу воспалительных процессов, возникших в результате послеоперационных осложнений, осуществляют выбор лекарственного препарата и назначение курса лечения [48]. Если причиной воспаления стали аутоиммунные реакции, антибактериальные препараты не применяют. При поражении соединения вследствие инфекционного заражения организма рекомендуют антибактериальные препараты широкого спектра действия [28].

Все антибактериальные препараты по эффекту воздействия на микроорганизмы можно разделить на две группы:

- бактерицидные – вызывающие непосредственно гибель микроорганизмов;
- бактериостатические – препятствующие размножению микроорганизмов [16].

Бактерии, которые неспособны расти и размножаться, уничтожаются иммунной системой больного человека. Свои эффекты АБП реализуют множеством способов: некоторые из них тормозят синтез нуклеиновых кислот микроорганизмов, другие препятствуют синтезу их клеточной стенки, третьи тормозят синтез белков, а четвертые нарушают функции дыхательных ферментов [20,21].

АБП всех групп, так или иначе, влияют на организм человека, поэтому побочные эффекты неизбежны. Для лечения послеоперационных осложнений костной ткани лекарственный препарат подбирается исходя из типа патологии и инфекционного возбудителя. Вначале назначается тот, который оказывает воздействие на широкую группу кокков, стрептококков, стафилококков и анаэробных бактерий [57].

АБП для лечения инфекций костей и суставов, традиционно считаются антистафилококковые пенициллины, в частности, оксациллин – антибактериальное средство группы пенициллинов. В то же время необходимость частого введения оксациллина (обычно 4-5 раз в сутки) существенно затрудняет проведение длительной терапии и значительно увеличивает затраты на лечение [34,36].

К сожалению, до сегодняшнего момента крайне мало известно об эффективности альтернативных АБП при лечении инфекций костей и суставов, вызванных разными штаммами микроорганизмами, в том числе и *Staphylococcus aureus* (MSSA) [32].

Цефтриаксон – АБП цефалоспоринового ряда широкого спектра действия. Препарат ацетирует мембраносвязанные транспептидазы,

нарушая перекрестную сшивку пептидогликанов, которая необходима для обеспечения прочности и ригидности клеточной стенки, тем самым оказывая бактерицидное действие. Высокоактивен в отношении аэробных, анаэробных, грамположительных и грамотрицательных бактерий. Эффективен АБП в терапии патологий воспалительной и инфекционной природы, в частности гайморита, бронхита, ангины, пневмонии, а также инфекционных патологиях дермы, костей и суставов [36].

Ванкомицин – гликопептидный АБП, который более полувека является опорой при лечении инфекций, вызываемых грамположительными бактериями, которые резистентны к другим широко применяемым антибиотикам. К таким бактериям в основном относятся стафилококки, а также некоторые стрептококки, энтерококки и др. Ванкомицин практически лишен значимой активности в отношении грамотрицательных бактерий, что связано с его способностью из-за большой молекулярной массы проникать через пориновые каналы клеточной стенки этих бактерий [27,31,35,37].

Появление в последнее десятилетие новых препаратов, заставило по-новому взглянуть на практику применения ванкомицина и поэтому в ходе клинических исследований этот антибиотик неизменно используется как препарат сравнения. Также можно заметить, что новейшие препараты не уступают по эффективности ванкомицину при различных инфекционных осложнениях. Этот антибиотик остается актуальным и перспективным препаратом, предназначенным для лечения многих инфекций любой локализации [32,38,47].

Меропенем – синтетический АБП из группы карбапенемов. Бактерицидный эффект осуществляется в результате связывания препарата с пенициллин связывающими белками, что ведет к блокированию синтеза пептидогликана клеточной стенки бактерий. Меропенем обладает широким спектром действия в отношении грамположительной и грамотрицательной флоры, а также анаэробных бактерий [15]. Для меропенема более важна не величина разовой дозы, а кратность введения. Перспективным является

применение этого АБП при остеомиелите, учитывая его высокую эффективность. Меропенем активен при лечении инфекций различной локализации: пневмония, осложненные инфекции мочевыводящих путей, послеоперационная раневая инфекция, воспалительные заболевания малого таза, сепсис, послеоперационные осложнения и связанные с ними костные инфекции, легочные заболевания у больных с муковисцидозом, гнойный менингит и другие [46].

Офлоксацин – антибактериальное средство группы фторхинолонов, которое назначают для лечения бактериальных инфекций различных органов и функциональных систем. Бактерицидное действие этого препарата связано с блокадой фермента ДНК-гиразы в бактериальных клетках [19]. Высокоактивен в отношении большинства грамотрицательных бактерий, а также в отношении некоторых грамположительных микроорганизмов (в т.ч. *Staphylococcus spp.*, особенно бета-гемолитических стрептококков) [34]. Применяют для лечения острых, постоянных и повторных бактериальных инфекций, например, костно-суставной системы (послеоперационные осложнения, остеомиелит, ревматоидный артрит, гнойные осложнения после переломов), дыхательных путей (воспаление бронхов, пневмонии), органов дыхания, слуха и обоняния (воспаление глотки, гортани, придаточных пазух носа, средний отит), кожной поверхности и мягких тканей (деструктивные язвы, фурункулез) и др. [24].

Клиндамицин – полусинтетический АБП группы линкозамидов. Клиндамицин ингибирует синтез белков в бактериальной клетке за счет взаимодействия с 50S субъединицей рибосом, оказывает бактериостатическое действие, а в более высоких концентрациях в отношении некоторых микроорганизмов вызывает бактерицидное [34]. Применяется для лечения тяжёлых инфекций, вызванных чувствительными к нему анаэробными бактериями, в том числе: пептострептококками, клостридиями, анаэробными и микроаэрофильными стрептококками. Может применяться при полимикробных инвазиях, например, при

интраабдоминальных и тазовых инфекциях, остеомиелите, диабетических язвах стопы и стоматологических заболеваниях. Также отмечено его использование в терапии инфекций, вызванных метициллин-чувствительным золотистым стафилококком(MRSA) и респираторных инфекций, вызванных *Streptococcus pneumoniae* и *Streptococcus pyogenes* [28].

Альтернативой системному введению больших доз антибактериальных средств является комбинация системной и местной антибиотикотерапии. Существует мнение, что АБП, который высвобождается непосредственно в очаге инфекции в концентрации, превышающей МПК для конкретного микроорганизма, уничтожает планктонные формы бактерий, а также наносит повреждения микробным биопленкам, тем самым облегчая работу для антибиотиков, применяемых системно. Также следует отметить, что высокая локальная концентрация позволяет препаратам проникать в некротизированные участки ткани и в места с плохим кровоснабжением путем диффузии [34,38].

Таким образом, быстрая и адекватная эмпирическая антибактериальная терапия различных инфекций на сегодняшний день может быть обеспечена использованием препаратов широкого спектра действия. Для создания лекарственного покрытия теоретически можно использовать любой из вышеперечисленных препаратов [19, 50].

1.4.2 Полимеры как подходящие материалы для системы контролируемой доставки лекарственных препаратов

Большой прогресс в области остеопластических материалов связан с получением композитов полимерных материалов, которые имитируют взаимодействие минеральной части и коллагеновой матрицы костной ткани, синтезированных из природных полиэфиров (гликолевой, молочной и др. кислот), способных к биорезорбции и биodeградации [33].

К основным требованиям, которые предъявляются к биоматериалам, относится нетоксичность и высокая механическая прочность. Если раньше

биоматериалы разрабатывались методом проб и ошибок, то в настоящее время принят более осторожный подход, основанный на тщательных исследованиях [49,56].

Острая потребность в полимерах приводит к значительному расширению исследовательских работ в данной области. В качестве материалов в настоящее время часто используются полимеры на основе молочной и гликолевой кислот, так как они разрешены для использования в отраслях медицины и фармакологии [39,56].

Полимер полилактид (ПЛК, в англоязычной аббревиатуре – PLA). Он нерастворим в большинстве органических растворителей. Механическая прочность в сочетании с пластичностью делают PLA пригодным для изготовления различных конструкций – от нетканых и губчатых материалов до пластин и винтов, применяемых для фиксации различных костных отломков. Материал не обладает цитотоксичностью, обеспечивает адгезию и поддерживает размножение клеток. Также внимания заслуживает полигликозид (ПГК, в англоязычной аббревиатуре – PGA). По своим биологическим, физическим и химическим свойствам полигликозид близок к полилактиду [2,33,56].

Процесс разрушения имплантированного изделия, если таковые растворяются в воде и других жидких средах, начинается с обычного растворения. Этот процесс складывается из нескольких этапов: диффузии среды в массу материала (имплантата), электростатическому взаимодействию макромолекул материала молекулами растворителя, десорбции сольватированных макромолекул из массы материала в жидкую среду, окружающую изделие [14, 56, 58].

Биоразрушаемые полимерные материалы являются в настоящее время наиболее востребованными для многих областей биомедицинских применений, поэтому разработка новых типов полимеров, их комбинаций, изучение кинетики их деструкции и механизмов взаимодействия в системе с живым организмом весьма актуальны [13, 54].

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материалы исследования

В качестве объекта исследования были выбраны экспериментальные образцы костных блоков производства компании ООО «МедИнж-Био» с лекарственным покрытием. Для изготовления блоков использовали костную ткань крупного рогатого скота, возрастом до 6 месяцев, с соблюдением требований ГОСТ Р ИСО 22442-1-2011 [59]. Обработку проводили по запатентованной технологии (ТУ 9391-006-99509105-2014; РУ №РЗН 2015/3086): экспериментальные образцы изготавливались из губчатой кости, распиленной на блоки 20 x 15 x 5 мм, очищенной от сухожилий ручным способом с помощью ножа. Блоки предварительно промывали проточной водой 2-3 мин., обрабатывали в растворе 7% NaCl 12 часов, ультразвуковой ванне в растворе 0,1% перекиси водорода 48 часов, после каждой обработки блоки промывали проточной водой, затем подсушивали на фильтровальной бумаге в течение 3 часов, в пластиковой таре [60]. Подобная технология очистки сырья позволяет удалить из костного материала антигены, не затрагивая механические свойства нативной костной ткани.

ЛП представляло собой комбинацию АБП меропенема с полимером PLA. Данное покрытие наносилось на поверхность изделия с целью снижения риска развития инфекционных осложнений после имплантации. Задачей ЛП является доставка в инфекционную область АБП для поддержания его концентрации в зоне имплантации на заданном уровне длительное время. Полимерные системы позволяют дозированно вводить АБП и контролировать, с какой скоростью и в какое место доставляются лекарственные средства [18].

Для проведения экспериментальных исследований были изготовлены следующие группы образцов:

Группа 1 - ксеногенные костные блоки 20 x 15 x 5 мм с АБП без полимера. Для получения экспериментальных образцов группы 1 раствор меропенема (10 мг/мл) в 0,9% NaCl наносили с помощью дозатора на каждый блок.

Группа 2 – ксеногенные костные блоки 20 x 15 x 5 мм с АБП в PLA. Для получения экспериментальных образцов группы 2 раствор меропенема (10 мг/мл) в 1% PLA наносили с помощью дозатора на ксеногенные костные блоки.

Группа 3 – ксеногенные костные блоки 20 x 15 x 5 мм с АБП в PLA, изготовленные с помощью метода сверхкритической флюидной экстракции (СФЭ). Использование сверхкритических флюидов в процессе экстракции основано на высокой растворяющей способности различных газов, которую можно сравнить с растворяющей способностью жидких органических растворителей. В камеру подавали углекислый газ и доводили параметры среды до $P = 250$ атм., $t = 25^{\circ}\text{C}$. После костные блоки лиофилизировали (высушивали биологические объекты в замороженном состоянии под вакуумом) в VaCo-2 (ZIRBUS, Германия). Вышедшие блоки стерилизовали газом в среде оксида этилена с последующим вакуумированием и аэрацией в течение 2 суток. Общее количество меропенема на костных блоках 3 группы соответствовало первым двум группам.

Изучение свойств лекарственных покрытий костных блоков проводили в условиях *in vitro*: оценивали антибактериальное действие ЛП, моделировали деградацию лекарственного покрытия и исследовали профиль высвобождения АБП из него, время задержки АБП на поверхности изделия.

2.2 Методы исследования

2.2.1 Оценка антибактериального действия лекарственного покрытия

Определение антибактериальной активности костных блоков с лекарственным покрытием основано на способности угнетать рост бактерий. В качестве тестовой культуры бактерий использовали клинический штамм *Staphylococcus aureus*. Выбор был обусловлен частотой его обнаружения у пациентов с инфекционными осложнениями после оперативного лечения костно-суставной патологии. В России в отделениях с интенсивным использованием АБП частота выделения *Staphylococcus aureus* составляет 79% среди всех грамположительных возбудителей [28].

S. aureus культивировали на мясопептонном агаре при температуре 37°C в течение 18-24 часов. Перед использованием убеждались в чистоте культуры, а также отсутствии посторонней микрофлоры: выросшие колонии на чашке Петри подвергали визуальному контролю, оценивали однородность и морфологию, проводили микроскопию мазков, окрашенных по Граму.

Рабочую суспензию готовили из культуры выбранного тест-штамма, смывая биомассу стерильным 0,9% раствором NaCl (pH 7,2-7,4). Полученную бактериальную взвесь стандартизировали с помощью денситометра «Densimat» («bioMerieux», Франция), доводя конечную концентрацию до нужных значений. В опытах использовали бактериальные взвеси двух концентраций: 1×10^8 кл./мл и 1×10^5 кл./мл.

Для проведения исследования костные блоки помещали в контейнер с рабочей суспензией исследуемой культуры так, чтобы блок был полностью погружён в жидкость (5 мл) и оставляли на 20 мин (первая серия опытов) или на 1 час (вторая серия опытов) в термостате при температуре 37 °C. Затем удаляли избыток жидкости стерильной фильтровальной бумагой и переносили костные блоки на поверхность плотной питательной среды (кровяной агар (КА)) и изготавливали мазки-отпечатки с двух сторон

каждого блока. В это же время проводили высев на КА рабочей суспензии из контейнера, в котором находился блок.

Посевы инкубировали в термостате при температуре 37°C в течение 18-24 час. Результаты оценивали по отсутствию или наличию роста культуры на поверхности питательной среды в чашке Петри.

2.2.2 Моделирование деградации лекарственного покрытия *in vitro*

При определении начального содержания АБП в ЛП проводили растворение полимера в хлороформе с последующей экстракцией меропенема в водную фазу и спектрофотометрической оценкой количественного содержания на длине волны 295 нм.

Моделирование деградации ЛП проводили для оценки высвободившегося количества меропенема в раствор, а также для определения способности полимера задерживать АБП. При проведении эксперимента для каждого костного блока использовали отдельную ёмкость для испытаний, образцы были полностью погружены в раствор.

Экспериментальные образцы костных блоков выдерживали в 10 мл 0,1 М рН=7,4 фосфатного буфера (ГОСТ ISO 10993-13-2011) при температуре 37°C. Для анализа количественного высвобождения меропенема в первые сутки моделирования деградации покрытия замену буферного раствора проводили через 15, 30, 60 минут, 2 и 24 часа. Анализ содержания меропенема в модельном растворе проводили спектрофотометрическим методом на длине волны 295 нм, соответствующей максимуму поглощения лекарственного препарата, в кювете с длиной оптического пути 1 см.

Исследование продолжали до тех пор, пока в модельном растворе обнаруживался меропенем, следовательно, пока ЛП полностью не подверглось деградации и не утрачивало свою способность задерживать АБП [26,59].

Спектрофотометрический метод анализа основан на поглощении монохроматического излучения, т. е. излучения с длиной волны в видимой и УФ-областях спектра [26]. Большинству АБП свойственен УФ-спектр

поглощения, для меропенема максимум поглощения соответствует длине волны 295 нм.

Для построения калибровочной прямой готовили серию растворов меропенема в воде с концентрациями 5 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, которые представлены в таблице 1 и на рисунке 1.

Таблица 1– Приготовление стандартных растворов меропенема в воде

№	С (мкг/мл)	V препарата (мл)	V воды (мл)
1	5	0,1	0,9
2	10	0,2	0,8
3	15	0,3	0,7
4	20	0,4	0,6
5	25	0,5	0,5
6	30	0,6	0,4
7	35	0,7	0,3
8	40	0,8	0,2
9	45	0,9	0,1
10	50	1	0

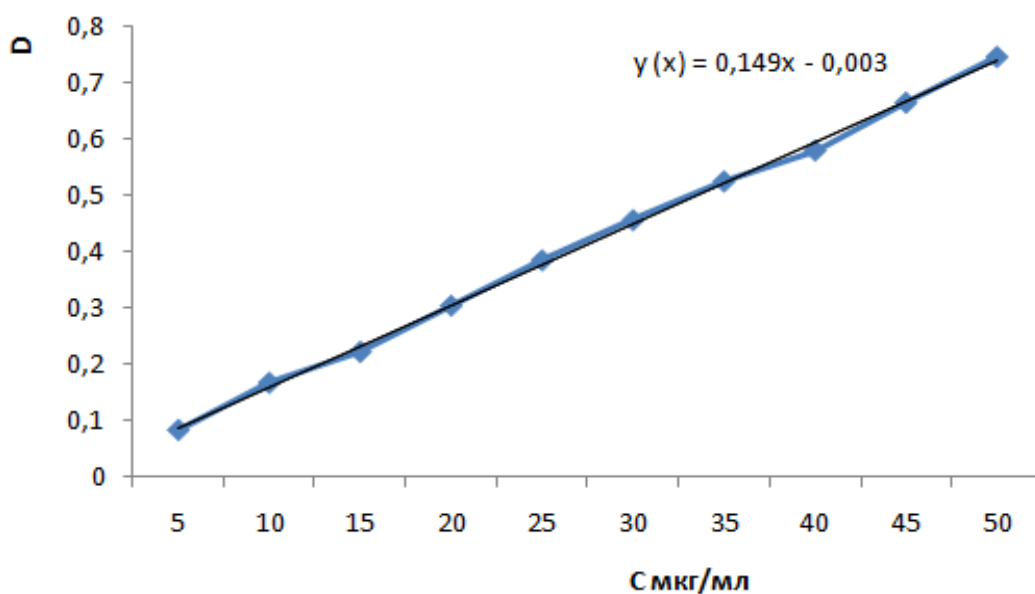


Рисунок 1. Калибровка по меропенему, $\lambda=295$ нм ($M \pm m$, $n=5$)

2.2.3 Методы статистической обработки результатов

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

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Результаты исследования антибактериального действия лекарственного покрытия костных блоков

В таблицах 2-4 представлены результаты исследований первой серии опытов экспериментальных образцов групп 1, 2 и 3, в которых блоки А, В, Д – содержат меропенем, а блоки Б, Г, Е – не содержат меропенем.

*Таблица 2 – Бактерицидная активность костного блока группы 1, импрегнированного меропенемом, при смешении с рабочей суспензией *S. aureus* 20 минут*

Концентрация <i>S. aureus</i>	Бактерицидное действие блоков группы 1			
	Блок А		Блок Б	
	Мазок-отпечаток на КА	Высев суспензии на КА	Мазок-отпечаток на КА	Высев суспензии на КА
1x10 ⁵ кл/мл	Роста нет	Роста нет	Рост есть	Рост есть

*Таблица 3 – Бактерицидная активность костного блока группы 2, импрегнированного меропенемом, при смешении с рабочей суспензией *S. aureus* 20 минут*

Концентрация <i>S. aureus</i>	Бактерицидное действие блоков группы 2			
	Блок В		Блок Г	
	Мазок-отпечаток на КА	Высев суспензии на КА	Мазок-отпечаток на КА	Высев суспензии на КА
1x10 ⁵ кл/мл	Роста нет	Роста нет	Рост есть	Рост есть

Таблица 4 – Бактерицидная активность костного блока группы 3, импрегнированного меропенемом, при смешении с рабочей суспензией *S. aureus* 20 минут

Концентрация <i>S. aureus</i>	Бактерицидное действие блоков группы 3			
	Блок Д		Блок Е	
	Мазок-отпечаток на КА	Высев суспензии на КА	Мазок-отпечаток на КА	Высев суспензии на КА
1x10 ⁵ кл/мл	Роста нет	Роста нет	Рост есть	Рост есть

В первой серии опытов с экспериментальными группами, в бактериологических посевах блоков, импрегнированных меропенемом, рост бактерий отсутствовал. В аналогичных посевах блоков без АБП наблюдали сплошной бактериальный рост, по результатам микроскопии мазков, окрашенных по Граму, – грамположительные кокки с характерной для стафилококков морфологией.

В таблице 5-7 представлены результаты исследований второй серии опытов групп 1, 2 и 3, в которых блоки А, В, Д – покрыты меропенемом, а блоки Б, Г, Е – не содержат меропенем.

Таблица 5 –Бактерицидная активность костного блока группы 1, импрегнированного меропенемом, при смешении с рабочей суспензией *S. aureus* 60 минут

Концентрация <i>S. aureus</i>	Бактерицидное действие блоков группы 1			
	Блок А		Блок Б	
	Мазок-отпечаток на КА	Высев суспензии на КА	Мазок-отпечаток на КА	Высев суспензии на КА
1x10 ⁵ кл/мл	Роста нет	Рост есть	Рост есть	Рост есть
1x10 ⁸ кл/мл	Рост есть	Рост есть	Рост есть	Рост есть

Таблица 6–Бактерицидная активность костного блока группы 3, импрегнированного меропенемом, при смешении с рабочей суспензией *S. aureus* 60 минут

Концентрация <i>S. aureus</i>	Бактерицидное действие блоков группы 2			
	Блок В		Блок Г	
	Мазок-отпечаток на КА	Высев суспензии на КА	Мазок-отпечаток на КА	Высев суспензии на КА
1x10 ⁵ кл/мл	Роста нет	Рост есть	Рост есть	Рост есть
1x10 ⁸ кл/мл	Рост есть	Рост есть	Рост есть	Рост есть

Таблица 7 –Бактерицидная активность костного блока группы 3, импрегнированного меропенемом, при смешении с рабочей суспензией *S. aureus* 60 минут

Концентрация <i>S. aureus</i>	Бактерицидное действие блоков группы 3			
	Блок Д		Блок Е	
	Мазок-отпечаток на КА	Высев суспензии на КА	Мазок-отпечаток на КА	Высев суспензии на КА
1x10 ⁵ кл/мл	Роста нет	Рост есть	Рост есть	Рост есть
1x10 ⁸ кл/мл	Рост есть	Рост есть	Рост есть	Рост есть

Во второй серии опыта во всех экспериментальных группах в случае помещения блоков в суспензию, содержащую 10⁵ микробных клеток в 1 мл, рост микроорганизмов на чашках Петри с мазками-отпечатками отсутствовал. На чашках с питательной средой, в которые был произведен высев из рабочей суспензии после обработки в ней костного блока, содержащего меропенем, наблюдался активный рост колоний. После помещения блоков с суспензию, содержащую 10⁸ микробных клеток в 1 мл, наблюдали рост микроорганизмов как на мазках-отпечатках, так и на чашках с высеvom из рабочей суспензии. Окраска по Граму выросших бактерий и последующая микроскопия показали, что во всех случаях это были

грамположительные кокки рода *Staphylococcus aureus*. На мазках-отпечатках блока без антибиотика и на чашках Петри с КА, на которые был произведен высеv из рабочих суспензий (10^5 и 10^8 кл/мл) наблюдали сплошной рост бактерий.

Полученные данные свидетельствуют о том, что антибактериальный эффект протестированных материалов присутствует во всех трех группах образцов костных блоков. Также показана возможность подавления роста *S.aureus* на модели *in vitro*, однако, его антибактериальная активность очевидно отсутствует при высокой контаминации изделия, т.е. бактерицидная активность изделия зависит от окружающей материал концентрации бактерий и от длительности контакта с бактериальной суспензией. Импрегнация ксеногенного костного материала АБП расширяет показания к его применению (например, для пациентов с остеомиелитом, парепротезными инъекциями и др.), а полимер, входящий в состав ЛП групп 2 и 3, не влияет на антибактериальный эффект.

3.2 Результаты исследования профилей выхода меропенема из лекарственного покрытия костных блоков

Задачей исследования является создание гибкой комбинации АБП с полимером, которая в экспериментах *in vivo* будет способна обеспечивать непрерывное высвобождение АБП в течение периода времени от нескольких дней до нескольких недель. Разработанное ЛП должно быть пригодным для нанесения и обладать прочным сцеплением с поверхностью костных блоков. Покрытие не должно вызывать негативных реакций со стороны организма реципиента, а просто устанавливать и распространять АБП к очагу воспаления, при этом давая стабильные предсказуемые концентрации препарата.

Результаты высвобождения меропенема из экспериментальных образцов группы 1, не содержащей полимер, представлены в таблицах 8-9 и

рисунках 2-3.

Таблица 8 –Высвобождение меропенема из костных блоков группы 1 в первые сутки эксперимента

Время	Оптическая плотность (295 нм)	Концентрация меропенема в растворе, мг/мл	Количество высвободившегося меропенема, мг
15 мин	0,1636	0,2156	2,1557
30 мин	0,1248	0,1635	1,6349
60 мин	0,0956	0,1243	1,2430
2 часа	0,1187	0,1553	1,5530
24 часа	0,1312	0,1721	1,7208

На протяжении всего времени исследования АБП выходил из экспериментальных образцов постепенно, фиксировался и задерживался на поверхности костного блока.

Профиль высвобождения меропенема из лекарственного покрытия ксеногенных костных блоков группы 1 в фосфатный буферный раствор (рН=7,4) в первые сутки эксперимента представлен на рисунке 2.

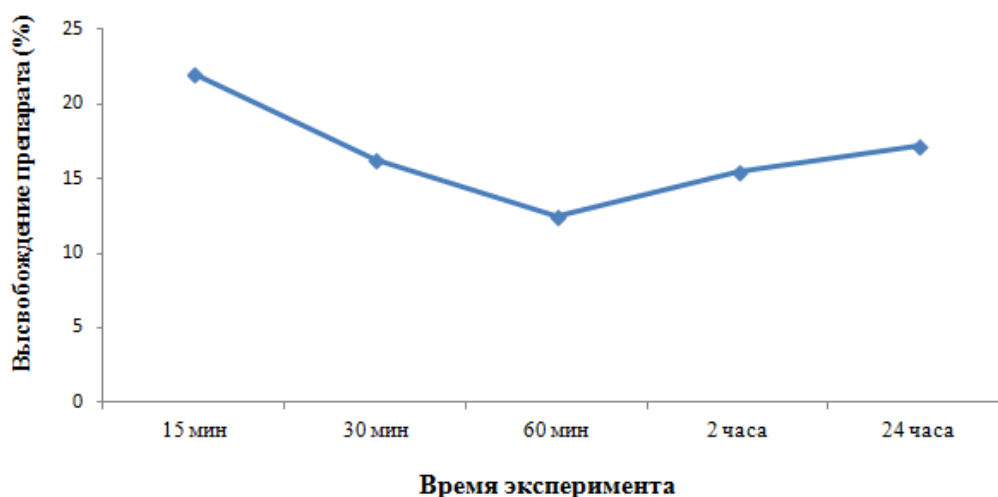


Рисунок 2. Профиль высвобождения меропенема в буферный раствор из ксеногенных костных блоков группы 1 в первые сутки эксперимента, % ($M \pm m$, $n=5$)

Повышенный выход АБП в течение первых минут и часов объясняется смыванием меропенема с доступного верхнего слоя костного блока. Через 15 мин. после погружения в модельный раствор выход меропенема составил 22%, через 30 мин. – 16,3%, через 1 час – 12,43%, через 2 часа – 15,53%, через 24 часа – 17,22%. Всего за первые сутки эксперимента из исследуемых образцов группы 1 высвобождается большая часть лекарственного препарата – больше 83 %.

Таблица 9 – Высвобождение меропенема из костных блоков группы 1 в течение 5 дней

Время (сутки)	Оптическая плотность (295 нм)	Концентрация меропенема в растворе мг/мл	Количество высвободившегося меропенема, мг
1	0,6339	0,8468	8,4685
2	0,1725	0,1138	1,1376
3	0,0984	0,0320	0,3201
4	0,0677	0,0043	0,0434
5	0,01	0,0005	0,0047

Профиль высвобождения меропенема из лекарственного покрытия ксеногенных костных блоков группы 1 в фосфатный буферный раствор (рН=7,4) в течение 5 дней эксперимента представлен на рисунке 3.

Подобная динамика высвобождения препарата обусловлена отсутствием компонента, который способен задерживать меропенем (полимера). Единственной преградой для выхода АБП является пористая поверхность ксеногенного костного блока, однако это не сильно задерживает лекарственное средство, и оно вымывается из образцов через 5 дней.

Таким образом, лекарственное покрытие экспериментальных образцов костных блоков группы 1 обеспечивает кратковременный выход лекарственного препарата. Повышение концентрации меропенема в составе лекарственного покрытия может привести к появлению цитотоксического

действия, что вызовет нежелательную реакцию со стороны иммунной системы. В связи с этим важным является контроль содержания препарата на поверхности костного блока.

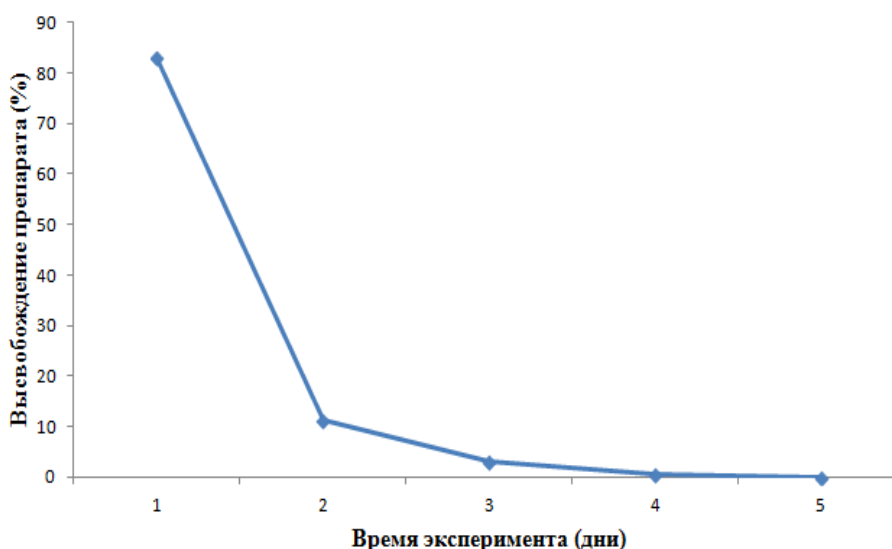


Рисунок 3. Профиль высвобождения меропенема в буферный раствор из ксеногенных костных блоков группы 1 в течение 5 дней эксперимента, % ($M \pm m$, $n=5$)

В хирургии частота неудовлетворительных результатов при лечении послеоперационных осложнений по-прежнему высока и составляет 13-25%, а рецидивы заболевания отмечаются в 18-42% случаев [28]. Применение одного только АБП без полимера для имплантата затруднено, а достижение больших концентраций в связи с неконтролируемым и быстрым высвобождением препарата из костного блока может приводить к развитию токсического действия на организм. Кроме того, послеоперационное или посттравматическое повреждение костных тканей создает условия неправильного кровоснабжения и препятствует формированию необходимых концентраций АБП в конкретном «слабом» месте. Неравномерное распространение препарата в костной ткани повышает риск инфекционных осложнений.

Результаты исследования показывают, что данным вариантом нанесения АБП на ксеногенные костные блоки можно создать высокие

концентрации препарата в тканях на очень короткое время, что является для лечения послеоперационных осложнений неэффективным.

Результаты высвобождения меропенема из экспериментальных образцов группы 2 представлены в таблицах 10-12 и рисунках 4-6.

Таблица 10 – Высвобождение меропенема из костных блоков группы 2 в первые сутки эксперимента

Время	Оптическая плотность (295 нм)	Концентрация меропенема в растворе, мг/мл	Количество высвободившегося меропенема, мг
15 мин	0,1298	0,1702	1,7020
30 мин	0,0975	0,1268	1,2685
60 мин	0,0785	0,0760	0,7601
2 часа	0,0881	0,0857	0,8567
24 часа	0,1045	0,1022	1,0218

Профиль высвобождения меропенема из лекарственного покрытия ксеногенных костных блоков группы 2 в фосфатный буферный раствор (рН=7,4) в первые сутки эксперимента представлен на рисунке 4.

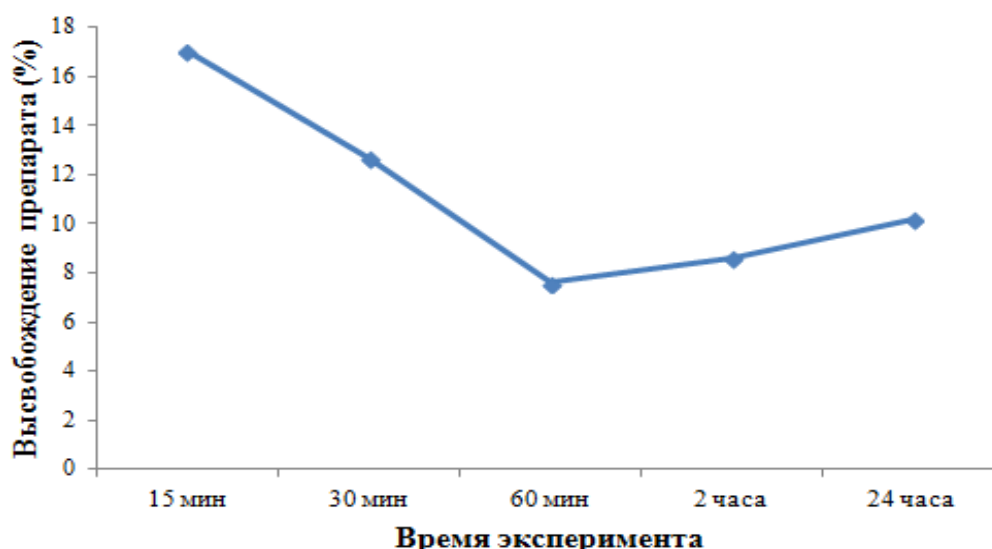


Рисунок 4. Профиль высвобождения меропенема в буферный раствор из ксеногенных костных блоков группы 2 в первые сутки эксперимента, % ($M \pm m$, $n=5$)

Согласно результатам эксперимента показано, что АБП задерживается полимером, но в первое время активно вымывается с поверхности исследуемых образцов. Через 15 мин. после погружения в модельный раствор выход меропенема составил 17,02%, через 30 мин. – 12,7%, через 1 час – 7,6%, через 2 часа – 6,6%, через 24 часа – 10,2%. Всего за первые сутки эксперимента из исследуемых образцов группы 2 высвобождается большая часть лекарственного препарата – 56%.

В течение первой недели эксперимента общий выход меропенема составил 72% от первоначального содержания.

Важный признак устройства контролируемой доставки – способность поддерживать постоянную концентрацию доставляемого препарата. Полимер PLA, используемый в исследовании, имеет достаточно длительный срок разложения (более месяца). Эта способность позволяет постепенно высвобождать препарат из покрытия и доставлять АБП в зону имплантации. Следует отметить, что способность контролируемого выпуска меропенема за счет гидролиза полимера позволяет обеспечить задержку АБП на длительный промежуток времени.

Таблица 11 – Высвобождение меропенема из костных блоков группы 2 в течение первой недели эксперимента

Время (дни)	Оптическая плотность (295 нм)	Концентрация меропенема в растворе, мг/мл	Количество высвободившегося меропенема, мг
1	0,4984	0,5652	5,6522
2	0,1300	0,1279	1,2785
3	0,0900	0,0876	0,8758
4	0,0861	0,0558	0,5577
5	0,0755	0,0487	0,4866
6	0,0732	0,0471	0,4711
7	0,0589	0,0375	0,3752

Профиль высвобождения меропенема из ксеногенных костных блоков группы 2 в фосфатный буферный раствор (pH=7,4) в течение первой недели эксперимента представлен на рисунке 5.

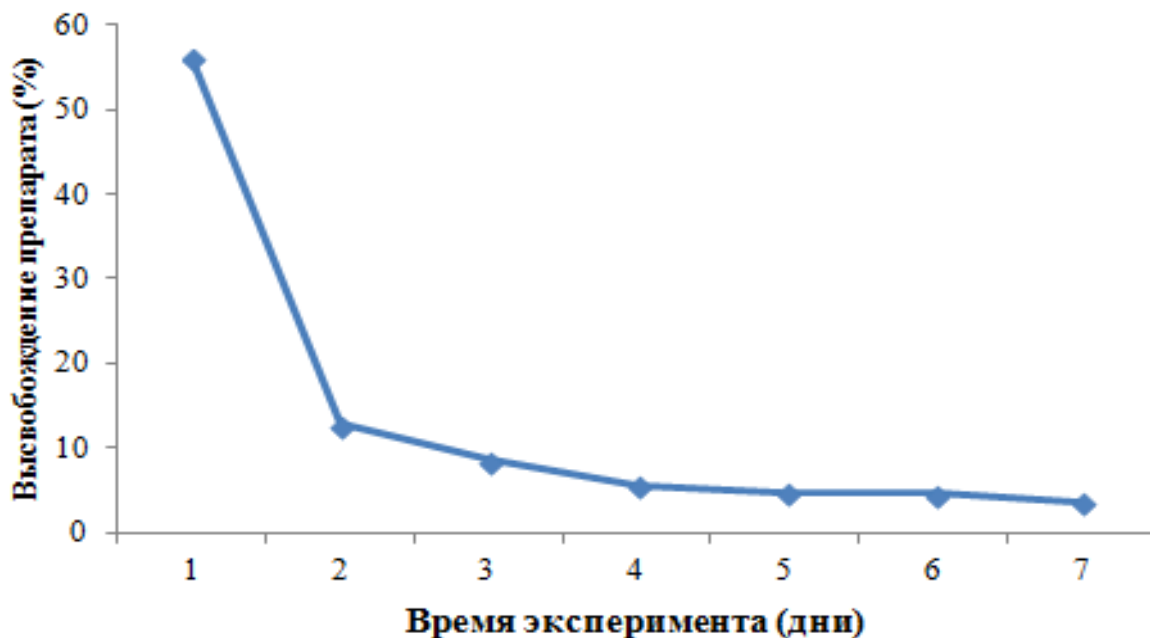


Рисунок 5. Профиль высвобождения меропенема в буферный раствор из ксеногенных костных блоков группы 2 в течение первой недели эксперимента, % ($M \pm m$, $n=5$)

По-видимому, под воздействием воды в полимере начинают протекать реакции гидролиза, происходит ослабление сил взаимодействия между структурными элементами и макромолекулами, в результате протекания дезориентационных процессов. Вода активно проникает в доступные аморфные области и там гидролизует эфирные связи, что инициирует снижение механических свойств исследуемых образцов. Последующая деградация аморфных областей полимера влияет на кристалличность, и скорость потери массы становится значительной, вместе с этим значительно увеличивается выход препарата в фосфатный буферный раствор [34].

Таблица 12– Высвобождение меропенема из костных блоков группы 2 в течение 1 месяца эксперимента

Время (дни)	Оптическая плотность (295 нм)	Концентрация меропенема в растворе, мг/мл	Количество высвободившегося меропенема, мг
1	0,4984	0,5652	5,6522
3	0,192	0,1903	1,9027
5	0,116	0,0758	0,7584
7	0,1021	0,0665	0,6651
12	0,1078	0,0352	0,3517
16	0,0976	0,0317	0,3174
20	0,0615	0,0196	0,1963
25	0,0234	0,0014	0,0137
31	0,0197	0,0011	0,0112

Профиль высвобождения меропенема из ксеногенных костных блоков группы 2 в фосфатный буферный раствор (pH=7,4) в течение 1 месяца эксперимента представлен на рисунке 6.

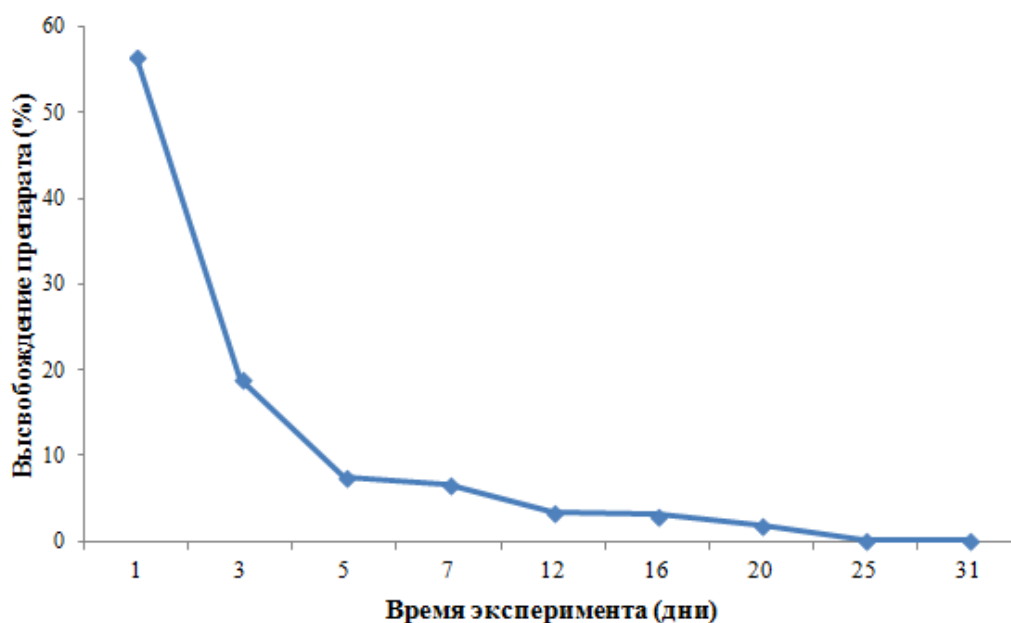


Рисунок 6. Профиль высвобождения меропенема в буферный раствор из ксеногенных костных блоков группы 2 в течение 1 месяца эксперимента, % ($M \pm m$, $n=5$)

По результатам исследования видно, что высвобождение препарата заканчивается через месяц с начала исследования. Однако, максимальный выход препарата наблюдается в течение первой недели, далее происходит значительное снижение выхода. По-видимому, концентрации высвобождающегося меропенема будут недостаточны для обеспечения антибактериального действия.

Для облегчения работы с полимерными связующими, а также для улучшения их свойств используют химические денатурирующие агенты – растворители – летучие жидкости, хорошо совмещающиеся с полимерами, создающие достаточно однородную смесь. Для изготовления лекарственного покрытия костных блоков группы 2 использовали ацетон. Он хорошо смешивается как с органическими растворителями, так и с водой. Его недостаток – гигроскопичность, так как в смеси с водой он хуже растворяет некоторые полимеры и отрицательно действует на физико-механические свойства полимерных материалов [43]. В любых случаях использования ацетона (как и любого выбранного растворителя) необходимо обоснованно рассчитывать его количество, помня, что его применение, в особенности в избытке, приводит к ухудшению свойств затвердевшего полимерного связующего, а также приводит к возникновению токсического эффекта при внедрении в организм.

Следовательно, нахождение ацетона в ЛП группы 2 в экспериментах *in vivo*, возможно будет сказываться на скорости замещения костной ткани, замедляя восстановительный процесс. После деградации полимера останется высокий риск нахождения ацетона в порах костных блоков, что непременно приведет к токсическому действию на организм в целом. В связи с этим важной задачей является последующий контроль остаточного содержания органического растворителя в покрытии после его изготовления.

Результаты высвобождения меропенема из экспериментальных образцов группы 3 представлены в таблицах 13-15 и рисунках 7-9.

Таблица 13 – Высвобождение меропенема из костных блоков группы 3 в течение первых суток эксперимента

Время	Оптическая плотность (295 нм)	Концентрация меропенема в растворе, мг/мл	Количество высвободившегося меропенема, мг
15 мин	0,3444	0,4583	4,5826
30 мин	0,2699	0,2687	2,6869
60 мин	0,2216	0,0147	0,1467
2 часа	0,1913	0,0253	0,2528
24 часа	0,2823	0,0187	0,1874

Профиль высвобождения меропенема из лекарственного покрытия ксеногенных костных блоков группы 3 в фосфатный буферный раствор (рН=7,4) в первые сутки эксперимента представлен на рисунке 7.

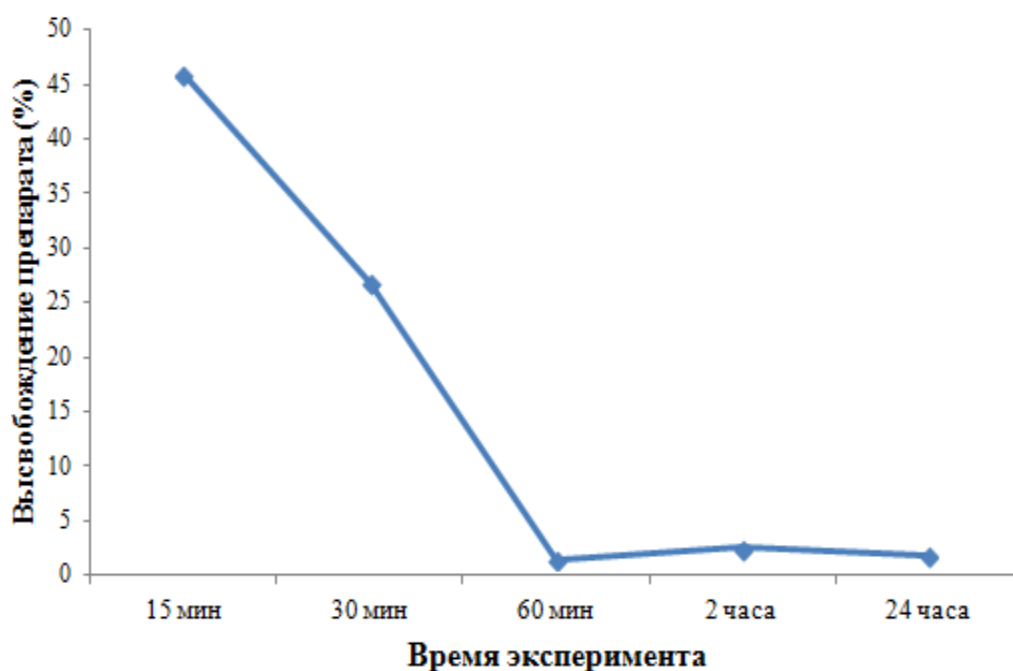


Рисунок 7. Профиль высвобождения меропенема в буферный раствор из ксеногенных костных блоков группы 3 в первые сутки эксперимента, % ($M \pm m$, $n=5$)

Повышенный выход АБП в течение первых минут и часов объясняется смыыванием меропенема с доступного верхнего слоя костного блока.

В ходе проведения эксперимента выяснилось, АБП также задерживается полимером, но в первое время активно вымывается с поверхности исследуемых образцов. Через 15 мин. после погружения в модельный раствор выход меропенема составил 45,826%, через 30 мин. – 26,9%, через 1 час – 1,5%, через 2 часа – 2,5%, через 24 часа – 1,9%. Всего за первые сутки эксперимента из исследуемых образцов группы 3 высвобождается большая часть лекарственного препарата – 79%.

В течение первой недели эксперимента общий выход меропенема составил 80% от первоначального содержания.

Таблица 14 – Высвобождение меропенема из костных блоков группы 3 в течение первой недели эксперимента

Время (дни)	Оптическая плотность (295 нм)	Концентрация меропенема в растворе, мг/мл	Количество высвободившегося меропенема, мг
1	1,3095	0,7856	7,8564
2	0,5256	0,0351	0,0104
3	0,4443	0,0296	0,2962
4	0,2249	0,0149	0,1489
5	0,2185	0,0145	0,1446
6	0,2101	0,0139	0,1390
7	0,2063	0,0136	0,1364

Профиль высвобождения меропенема из ксеногенных костных блоков группы 3 в фосфатный буферный раствор (рН=7,4) в течение первой недели эксперимента представлен на рисунке 8.

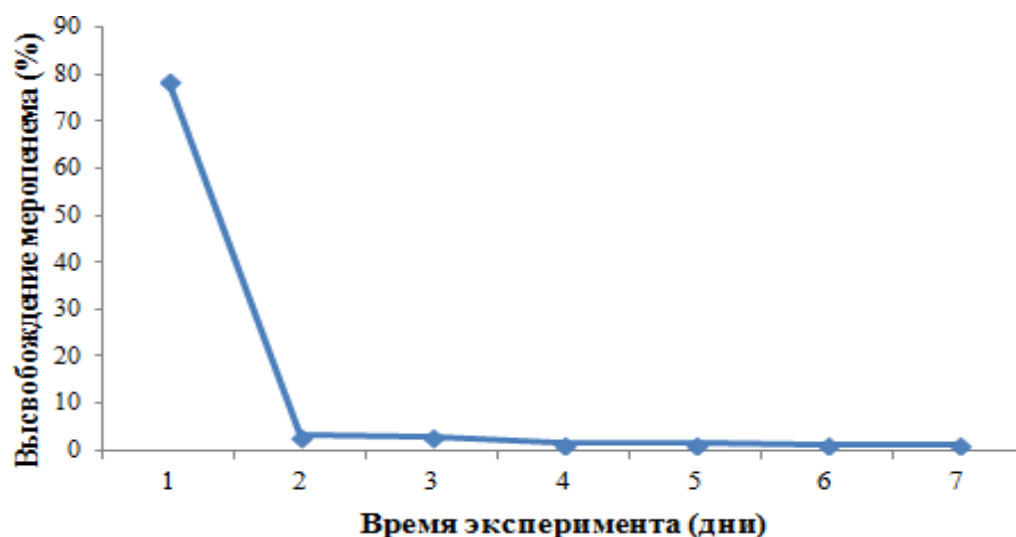


Рисунок 8. Профиль высвобождения меропенема в буферный раствор из ксеногенных костных блоков группы 3 в течение первой недели эксперимента, % ($M \pm m$, $n=5$)

Таблица 15 – Высвобождение меропенема из костных блоков группы 3 в течение 3 месяцев

Время (дни)	Оптическая плотность (295 нм)	Концентрация меропенема в растворе, мг/мл	Количество высвободившегося меропенема, мг
1	1,3095	0,7856	7,8564
3	0,9699	0,0392	0,3920
7	0,8598	0,0484	0,4835
12	0,7336	0,0360	0,3603
16	0,6788	0,0244	0,2436
20	0,5142	0,0191	0,1906
25	0,4883	0,0161	0,1607
30	0,3591	0,0101	0,1009
36	0,2299	0,0051	0,0508
42	0,1705	0,0046	0,0455
50	0,1591	0,0030	0,0301
57	0,1009	0,0024	0,0235
64	0,0778	0,0025	0,0254
70	0,0498	0,0021	0,0212
80	0,0101	0,0011	0,0110

Профиль высвобождения меропенема из ксеногенных костных блоков группы 3 в фосфатный буферный раствор (pH=7,4) в течение 3 месяцев эксперимента представлен на рисунке 9.

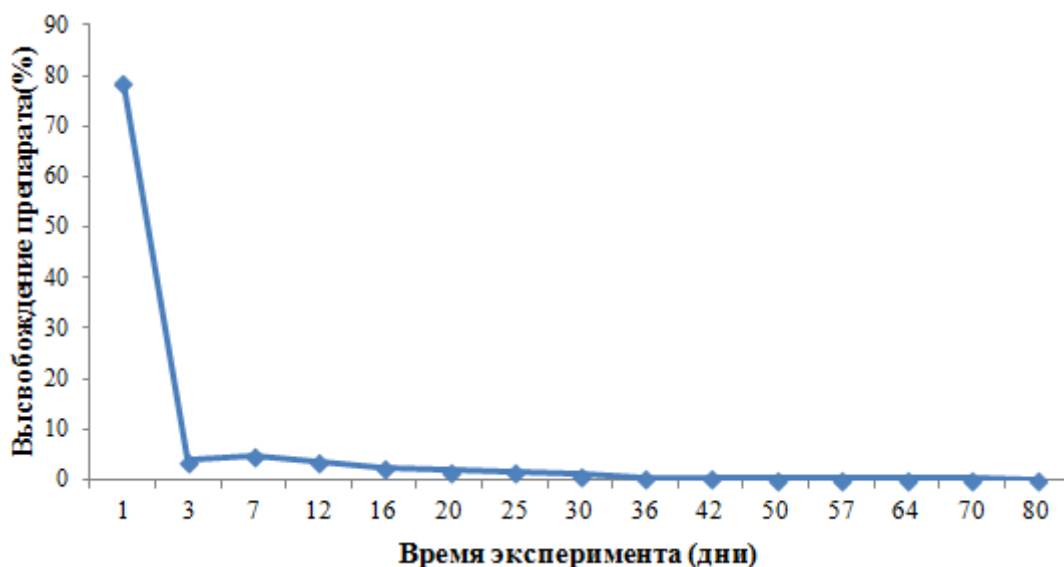


Рисунок 9. Профиль высвобождения меропенема в буферный раствор из ксеногенных костных блоков группы 3 в течение 3 месяцев эксперимента, % ($M \pm m$, $n=5$)

Результаты исследования показывают, что высвобождение препарата заканчивается через 80 дней с начала исследования. Однако, максимальный выход препарата наблюдается в течение первых трех дней, далее происходит значительное снижение выхода. Динамика высвобождения меропенема после первой недели эксперимента обусловлена механизмами деградации самого полимера. По-видимому, концентрации высвобождающегося меропенема будут недостаточны для обеспечения антибактериального действия.

Согласно полученным результатам, меропенем высвобождается дольше из образцов групп 2 и 3 по сравнению с группой 1. Применение полимера для изготовления лекарственного покрытия костных блоков способствует задержке препарата на поверхности изделия на один месяц для группы 2 и более двух месяцев для группы 3. Применение органического

растворителя для изготовления образцов группы 2 и вероятность неполного удаления повышает риск возникновения токсического действия образцов изделия на организм реципиента, в связи с этим важным является контроль остаточного содержания растворителя. Недостатком метода сверхкритической флюидной экстракции для изготовления покрытия является неравномерность нанесения меропенема на костные блоки, что будет в дальнейшем затруднять определение его точной дозировки и поступление необходимой концентрации препарата к очагу воспаления в экспериментах *in vivo*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе выполнения бакалаврской работы были исследованы свойства созданных композиционных лекарственных покрытий для имплантируемых медицинских изделий в условиях *in vitro*. Были изучены профили элюции и высвобождение меропенема в раствор из экспериментальных образцов костных блоков, отличающихся способом изготовления лекарственного покрытия. Исследовано антибактериальное действие костных блоков с лекарственным покрытием.

По результатам исследования можно сделать следующие **выводы**:

- 1) Нанесение лекарственного покрытия, содержащего меропенем, на поверхность костных блоков позволяет снизить риск возникновения постимплантационных инфекционных осложнений, вызванных *Staphylococcus aureus*;
- 2) Антибактериальным эффектом обладают все три группы образцов костных блоков с лекарственным покрытием. Применение органического растворителя и метода сверхкритической флюидной экстракции для изготовления лекарственного покрытия не снижают антибактериальный эффект;
- 3) Применение полимера для изготовления лекарственного покрытия позволяет увеличивать срок высвобождения лекарственного препарата;
- 4) Применение органического растворителя (ацетона) для изготовления лекарственного покрытия костных блоков и неполное его удаление повышает риск возникновения токсического действия образцов изделия на организм реципиента;
- 5) Неравномерность нанесения меропенема на костные блоки с помощью метода сверхкритической флюидной экстракции затрудняет определение его точной дозировки и поступление необходимой концентрации препарата к очагу воспаления в экспериментах *in vivo*.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АБП- антибактериальный препарат

ЛП- лекарственное покрытие

МИ- медицинское изделие

МПК- минимальная подавляющая концентрация

КА- кровяной агар

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ананьева Е.П., Караваева А.В., Соловский М.В. Антимикробная активность полимерных комплексов аминогликозидов // Проблема медицинской микологии. 2014. Т. 16. №4. С. 24-25.
2. Белов Д. А., Бычкова А.Н., Климовцова И.А. Биodeградируемые композиционные материалы медицинского назначения на основе полилактида // Материалы, технологии, инструменты. 2006. Т. 1. №1. С. 72-76.
3. Бессуднова Н.О. Материалы для биологических применений // Саратов: Саратовский государственный университет, факультет нано - и биомедицинских технологий. 2007. С.26-33.
4. Булатов А.А. Деминерализованные костные трансплантаты и индукционный остеогенез // СПб: Трансплантология и медицина России.2005. С. 52-66.
5. Булкина Н.В., Ведяева А.П., Иванов П.В.. Биологические реакции организма на биоимплантаты // Клиническая стоматология. 2016. Т.2 № 78. С. 47-48.
6. Булкина Н.В., Зюлькина Л.А. , Иванов П.В. Исследование изучаемых биоматериалов как биологических матриц для клеток in vitro // Клиническая стоматология. 2016. С. 2-4.
7. Буравцева Н.П., Аксёнова Л.Ю., Рязанова А.Г. Методические подходы для изучения чувствительности / Ставропольский научно-исследовательский противочумной институт Роспотребнадзора. 2009. 25 с.
8. Бушманов А.В., Воронцов А.В. Моделирование плотной костной ткани // Амурский государственный университет. 2009. С.1-4.
9. Волова Т.Г., Шишацкая Е.И., Миронов П.В. Материалы для медицины, клеточной и тканевой инженерии: электрон. учеб. пособие / Красноярск: ИПК СФУ, 2009. 262 с.

10. Волоотовский А.И., Макаревич Е.П., Чирак В.Э. Регенерация костной ткани в норме и при патологии: метод. рекомендации // Беларусский государственный медицинский университет. 2010. С.5-10.
11. Гомзяк В.И., Демина В.А., Разуваева Е.В. Биоразлагаемые полимерные материалы для медицины: от имплантата к органу // Тонкие химические технологии. 2017. Т. 12. №5. С. 6-10.
12. Дедух Н.В., Пошелок Д.М, Малышкина С.В. Моделирование и ремоделирование кости (обзор литературы) // Украинский морфологический альманах. 2014. Т.12. №1. С. 107-111.
13. Кедик С.А., Жаворонок Е.С., Седишев И.П. Полимеры для системы доставки пролонгированного действия // Фармацевтическая технология. 2013. С. 24-26.
14. Кильдеева Н.Р., Лозинский В.И. Высокопористые полимерные материалы для медицины и биотехнологии // Московский государственный университет им. Ломаносова. 2015. С. 200.
15. Козлов Н.С., Меропенем в современной хирургической практике // Хирургия, 2011. Т. 19. №16. С. 993.
16. Козлова Н.С., Баранцевич Е.Н., Иванова Л.В. Чувствительность энтеробактерий к антибиотикам различного происхождения // Проблема медицинской микологии. 2016. Т. 18. №3. С. 32.
17. Колин М.И., Илюнина О.О., Партурин Н.А. Применение остеопластического материала на основе ксеногенной костной ткани в челюстно-лицевой хирургии и его преимущества // Медицина. 2016. С. 22-24.
18. Кулапина Е.Г., Баранова О.В., Кулапина О.И. Современные методы определения антибиотиков в биологических и лекарственных средах (обзор) // Антибиотики и химиотерапия. 2009. С. 53-54.
19. Лазаренкова В.Б., Архипов В.В., Кукес В.Г. Фармакодинамика антибактериальных препаратов // Фармакология: эксперимент и клиника. 2006. С. 31-32.

20. Мельникова О.А., Самкова И.А., Маханькова Л.А. Методика измерений и алгоритмы определения лекарственных веществ в многокомпонентных смесях // Серия Медицина. 2015. №4. С.180.
21. Окулич В.К., Кабанова А.А., Сенькович С.А. Резистентность к антибиотикам, образующих биопленку // Витербск: Здоровоохранение, гигиена и эпидемиология. 2015. С. 13.
22. Осипенко М.А., Куюкина М.С., Ившина И.Б. Вероятностная модель антибиотикотипирования непатогенных микроорганизмов // Российский журнал биомеханики. 2004. Т. 8. №2. С.78-79.
23. Покровский О.А. Пробоподготовка в химическом анализе методом сверхкритической флюидной экстракцией: методология // ЗАО «ШАГ». 2013. С. 22-27.
24. Привольнев В.В., Родин А.В., Каракулина Е.В. Местное применение антибиотиков в лечении инфекций костной ткани // Смоленская государственная медицинская академия. 2012.Т.14. №2. С.118-122.
25. Сагинова Д.А. Локальное использование биodeградируемых материалов при заболевании остеомиелитом // Карагандинский государственный медицинский университет. 2014. С. 1-2.
26. Саушкина А.С., Булавина О.В. Изучение возможности выявления контрафактной продукции методом спектрофотометрии // Разработка исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции. 2010. № 65. С.390-392.
27. Сидоренко С.В., Гучев И.А., Мелехина Е.В. Ванкомицин - перспективы применения в XXI веке // Клиническая фармакология и терапия. 2018. С.17-19.
28. Тец В.В. Микроорганизмы и антибиотики // Клиническая микробиология. 2005. С. 89-90.
29. Bajpai A. K., Shukla S.K. Responsive polymers in controlled drug delivery // Progr. Polym. Sci. 2008. V. 33. P. 1098-1100.

30. Gitelis S. The treatment of chronic osteomyelitis with a biodegradable antibiotic-impregnated implant // *Journal Orthopaed Surg (Hong-Kong)*. 2002. P. 53-60.
31. Cooper G. Vancomycin: a comprehensive review of 30 years clinical experience // San Diego, CA, Park Row Publishers. 1986. P. 2-4.
32. Cui L., Ma X., Sato K. Cell wall thickening is a common feature resistance in *Staphylococcus aureus* // *Journal Clin.Microbiol.* 2003. P. 5-7.
33. Dong Q., Chow L.C., Frukhtbeyn S.A. A new bioactive polylactide-based composite with high mechanical // *Colloids Surfaces*. 2014. V. 457.№1. P. 257-261.
34. Dryden M.S. Novel antibiotic treatment for skin and soft tissue infection // *CurrOpin Infect Dis*. 2014. P.116-117.
35. Faron M., Ledeboer N., Buchan B. Resistance Mechanisms, Epidemiology, and Approaches to Screening for Vancomycin-Resistant *Enterococcus* in the Health Care Setting // *Clinical Microbiology*. 2016. V.54. №6. P. 2436-2438.
36. Hanssen A.D. Local antibiotic delivery vehicles in the treatment of musculoskeletal infection // *Clin. Orthopaed Relat. Res*. 2005.P.91-96.
37. Howden B., Ward P., Charles P. Treatment outcomes for serious infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with reduced vancomycin susceptibility // *Clin. Infect. Dis*. 2004.№ 38. P.521-524.
38. Hidayat L., Hsu D., Quist R. High-dose vancomycin therapy for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections, efficacy and toxicity // *Arch. Intern. Med*. 2006. P. 2139-2140.
39. Iordanskii A. L., Bonartseva G.A., Makhina T.A. Bacterial poly (3-hydroxybutyrate) as a biodegradable polymer for biomedicine. Part.1 // *Biomedicine*. 2016. P. 204-206.
40. Karmazanovskij G. G. Estimation of the Diagnostic Method Value (“Sensitivity”, “Specificity” and “General Accuracy”) // *Annaly hirurgicheskoygepatologii*. 2014. №2. P. 139-142.

41. Kolmas J., Szwaja M., Kolodziejcki W. Solid-state NMR and IR characterization of commercial xenogeneic biomaterials used as bone substitutes // Journal Pharm. Biomed. Anal. 2012. № 5. P. 136-141.
42. Modina T. N., Maklakova I.S. The use of synthetic hydroxyapatite during the closure of bone defects in outpatient surgery // Parodontologiya. 2012. T. 17. №1. P. 48-52.
43. Murray B. Vancomycin-resistant enterococcal infections // Journal Med. 2000. № 342. P.718-720.
44. Ovcharenko E. S., Melekov S.V. Opyt primeneniya osteoplasticheskogo materiala «KollapAn-L» v hirurgicheskom lechenii vospalitel'nyh zabolevanij parodonta // Parodontologiya. 2009. №1. P. 52-55.
45. Ostrovskij, A. Osteoplastic materials in modern parodontology and implantology / A. Ostrovskij //M., 1999. P. 39-52.
46. Pea F. Prospectively validated dosing nomograms for maximizing the pharmacodynamics of meropenem administered by continuous infusion in the critically ill patients, the Optivanco study //Antimicrob. Agents Chemother. 2009. P. 32-33.
47. Peetermans W. Antistaphylococcal activities of teicoplanin and vancomycin in vitro and in an experimental infection //Antimicrob. Agents Chemother. 1990. P.1869-1871.
48. Popadyuk O.Ya. Antimicrobial effect of wound healing nano-containing polymer materials // The Moldovan Medical Journal. 2017. P. 3-4.
49. Popadyuk O.Ya. Biodegradujuchapolimernaosnova "Biodep" // The Moldovan Medical Journal. 2016. №23. P. 2.
50. Piguet B., Chobaz C., Grounauer P. Toxic retinopathy caused by intravitreal injection of amikacin and vancomycin // Klin. Monbl. Augenheilk., 1996. P. 358-359.
51. Privolnev V.V., Karakulina E.V. The basic principles of the topical treatment of wounds and wound infection // Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy. 2011. V.3. №13. P. 214-218.

52. Ratner D. Biomaterials science: an introduction to materials in medicine // San Diego: Elsevier Academic Press. 2004. P. 851.
53. Sevastianov V.I. Research and development of bioartificial organs and tissues by using biopolymer materials // Journal Guangdong Non-Ferrous Metals. 2005. V. 15. № 2-3. P. 53-59.
54. Shishatskaya E.I., Volova T.G., Gordeev S.A. Degradation of P (3HB) and P (3HB-co-3HV) in biological media // BiomaterSciPolym Ed. 2005. P. 642-644.
55. Suchanek W., Yashimura M. Processing and properties of hydroxyapatite-based biomaterials for use as hard tissue replacement implants // Journal Mater.Res. 1998. P.94-111.
56. Shtilman I.M. Biodegradation of Polymers // Journal of Siberian Federal University. 2015. P.113-130.
57. Svensson E., Hanberger A., Nilsson P. Pharmacodynamic effects of antibiotics and antibiotic combinations on growing and nongrowing *Staphylococcus epidermidis* cells // Antimicrob. Agents Chemother. 1997, 41. P. 107-110.
58. Volova T. G., Shishatskaya E.I., Sinskey A.J. Degradable Polymers: Production, Properties and Applications // Nova Sci. Publ. Inc. 2013. P. 380.
59. ГОСТ ISO 10993-13-2011.ISO 10993-13:1998 ИУТ. Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 13. Идентификация и количественное определение продуктов деградации полимерных медицинских изделий. Введ. 2013-13-10993. М. 23 с.
60. Bio-Ost: Имплантаты для тканевой регенерации нового поколения [Электронный ресурс]: ксеногенные костные блоки. Пенза. Официальный сайт предприятия.