

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

"ПЕНЗЕНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ"

Факультет физико-математических и
естественных наук

Кафедра "Общая биология и
биохимия"

Направление подготовки 06.03.01 Биология

Профиль Биохимия

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

на тему:

**«РАЗРАБОТКА ЛЕКАРСТВЕННОГО ПОКРЫТИЯ МАНЖЕТЫ
СЕРДЕЧНОГО КЛАПАНА»**

Студент Рожкова Рожкова Анастасия Дмитриевна

Руководитель Кручинина Кручинина А.Д.

Нормоконтролёр Кручинина Кручинина А.Д.

Работа допущена к защите (протокол заседания кафедры от 09.06.18 № 14)

Заведующий кафедрой Карпова Карпова Г.А.

Работа защищена с отметкой отлично (протокол заседания ГЭК от 21.01.18 № 11)

Секретарь ГЭК Кручинина Кручинина А.Д.

Пенза, 2018

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	3
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	5
1.1 Клапаны сердца.....	5
1.1.1 Эндопротезирование клапанов сердца	6
1.1.2 Механические искусственные клапаны сердца	6
1.1.3 Биологические заменители клапанов сердца	8
1.2 Осложнения после имплантации сердечных клапанов.....	9
1.2.1 Инфекционный эндокардит	11
1.3 Обзор лекарственных препаратов	14
1.3.1 Антикоагуляционные препараты	14
1.3.2 Антипролиферационные препараты	16
1.3.3 Антибиотики и противогрибковые препараты	18
1.4. Материалы для депонирования и контролируемой доставки лекарственных препаратов.....	21
ГЛАВА 2. ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	24
2.1 Подготовка образцов к исследованию	24
2.2 Моделирование деградации лекарственного покрытия в условиях in vitro	26
2.3 Оценка антибактериального действия дисковым методом	28
2.4 Подкожная имплантация образцов	29
2.5 Гистологическое исследование	29
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	32
3.1 Результаты деградации антибактериального покрытия in vitro.....	32
3.2 Оценка антибактериального действия лекарственного препарата	41
3.3 Результаты гистологических исследований.....	42
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	48
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	49

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. Основная задача, которая стоит перед здравоохранением, четко определена сложившейся в стране высокой смертностью от болезней сердца и сосудов, составляющей 56% в общем числе умерших.

Одной из причин высокой смертности является недостаточное внедрение в практику высокотехнических эффективных методов лечения. Такими методами являются коронарная ангиопластика и стентирование, а также протезирование клапанов сердца.

Первые клинические наблюдения и изучение результатов после имплантации показали, что искусственные клапаны и стенты могут вызывать ряд тяжёлых осложнений. Если в начале внедрения протезирования клапанов сердца летальность достигала 53-79%, то за последние годы благодаря применению усовершенствованных искусственных клапанов и улучшению техники имплантации наметилась тенденция на значительное снижение этого показателя.

При имплантации искусственных клапанов сердца очень часто возникает осложнение, называемое инфекционным эндокардитом. Развитие заболевания может быть обусловлено возбудителями, составляющими чрезвычайно обширный перечень, пополняемый практически ежегодно.

Несмотря на достигнутый прогресс в ранней диагностике и лечении инфекционного эндокардита, в современных условиях заболевание по-прежнему характеризуется серьезными осложнениями и высоким уровнем смертности, так как серьезными преградами, стоящими на пути эффективной антимикробной терапии, являются как нарастающая резистентность возбудителей инфекционного эндокардита к антибиотикам, так и увеличивающаяся этиологическая роль инфекционных агентов, ранее встречающихся очень редко.

Стратегия предотвращения данного осложнения основывается на локальном применении препаратов, обладающих антибактериальным действием. В связи с этим актуальным является разработка антибактериального лекарственного покрытия манжеты сердечного клапана с целью снижения рисков осложнений после его имплантации.

В современной медицине в качестве препаратов для лечения и профилактики инфекционного эндокардита широкое применение находят антибиотики (ванкомицин, гентамицин и амикацин), а также противогрибковые препараты (флуконазол). С целью дозированного локального высвобождения лекарственного препарата используют биodeградируемые полимеры (PLA, PGA и PLGA).

Целью данной работы является разработка лекарственного покрытия манжеты сердечного клапана.

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

- 1) Провести анализ литературных источников по теме исследования;
- 2) Подготовить экспериментальные образцы лекарственных покрытий манжет клапанов;
- 3) Провести моделирование деградации лекарственных покрытий;
- 4) Оценить содержание лекарственных препаратов в образцах до и после моделирования деградации лекарственных покрытий методом УФ-спектроскопии;
- 5) Оценить количественное высвобождение лекарственных препаратов по дням при моделировании деградации лекарственного покрытия *in vitro*.
- 6) Оценить антибактериальный эффект лекарственного покрытия.

Бакалаврская работа написана на 53 листах, содержит 18 рисунков , 2 таблицы и список литературы на русском и английском языках из 44 источников.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Клапаны сердца

Сердце является биологическим насосом, в котором клапанные структуры обеспечивают одностороннее движение крови.

Продольной перегородкой сердце разделено на две половины: правую, содержащую венозную кровь, и левую, заполненную артериальной кровью. Каждая половина сердца состоит из двух камер: верхней – предсердия и нижней – желудочка.

Сердце человека четырехкамерное и содержит два близких по строению входных клапана (митральный и трикуспидальный), расположенных между предсердиями и желудочками. На выходе из желудочков находятся два схожих (аортальный и пульмональный), так называемых полулунных клапана.

Митральный клапан состоит из двух створок, а трикуспидальный – из трех. Такие клапаны препятствуют току крови обратно в предсердия во время диастолы.

Полулунные клапаны состоят из трех створок, которые слипаются, закрывая клапан, или отходят к стенкам сосудов, открывая клапан. Эти клапаны перекрывают обратный ток крови из артерий в желудочки во время диастолы и пропускают прямой ток крови в артерии во время систолы.

Сердечные клапаны состоят из соединительной ткани (коллаген, эластин и глюкозаминогликаны) [7].

Восстановление замыкательной и пропускной функции патологически измененного клапана сердца человека возможно путем его замещения протезом или трансплантатом.

Для выполнения таких операций, оценки клапанной патологии с помощью инструментальных методов исследования необходимы знания

современных данных по хирургической и функциональной анатомии, морфологии и биомеханике клапанного аппарата сердца [11].

1.1.1 Эндопротезирование клапанов сердца

Замещение клапанов сердца различными конструкциями используется при ряде врожденных и приобретенных пороках сердца в результате заболеваний, в частности сердечных недостаточностях (снижении замыкательной функции клапана).

Эндопротезирование клапанов сердца, введенное в клиническую практику а начале 60-х годов, широко применяется в хирургической практике. Ежегодно во всем мире выполняются десятки тысяч операций с достаточно хорошими ближайшими и отдаленными последствиями.

Задача эндопротезов сердечных клапанов заключается в обеспечении естественного однонаправленного тока крови по элементам сердечно-сосудистой системы и недопущении тока крови в обратном направлении.

В наибольшей мере в настоящее время отработаны операции по замещению митрального и аортального клапанов.

Используемые в настоящее время замещающие клапаны сердца делятся на две группы: механические клапаны и клапаны на основе клапанов и тканей животных (биопротезы).

1.1.2 Механические искусственные клапаны сердца

Механические клапаны изготавливают из искусственных материалов. Они содержат в своей конструкции специальный запирающий элемент, представляющий собой движущуюся деталь, открывающую зазор клапана для пропускания тока крови после сердечной пульсации и перекрывающую этот зазор в период между пульсациями.

Существуют дисковые механические эндопротезы – одностворчатые и двустворчатые, а также шаровые механические протезы. В случае шаровых протезов ток крови периодически перекрывается опускающимся на седло шариком, движущимся в ограничителях. В дисковом одностворчатом механическом эндопротезе просвет клапана открывается и закрывается движущимся в ограничителях плоским диском, а в конструкции двустворчатого протеза просвет клапана открывается и закрывается плоскими полудисками, вращающимися на шарнирах [18].

В настоящее время наиболее часто используются двустворчатые механические эндопротезы клапанов сердца.

К настоящему времени разработано и исследовалось более 100 конструкций механических клапанов. Наиболее типичная конструкция предусматривает наличие четырех элементов:

- 1) запирающего элемента, представляющего собой подвижную деталь, периодически открывающую и закрывающую отверстие для тока крови;
- 2) ограничителя для запирающего элемента, изготовленного обычно из толстой и прочной металлической проволоки и удерживающего этот элемент в конструкции;
- 3) опорного кольца, которое, с одной стороны, используется для крепления всей конструкции в окружающих тканях, и на котором, с другой стороны, закрепляется седло запирающего элемента;
- 4) седла, имеющего форму, соответствующую запирающему элементу, которое крепится на опорном кольце или составляет его часть и обеспечивает достаточно плотный контакт с запирающим элементом в момент закрытия зазора, исключая обратный ток крови.

В зависимости от конструкции клапана ток крови может или обтекать запирающий элемент (например, в случае его шаровой или дисковой формы), или протекать в середине зазора клапана (в случае двухстворчатой

формы). В последнем случае кровь травмируется в меньшей степени, чем в других конструкциях, что определяет меньшее количество тромбозов.

Типичными преимуществами механических клапанов является их высокая прочность и долговечность – в среднем более 30 лет.

К недостаткам механических клапанов относятся высокая возможность тромбообразования. Поэтому пациенты с механическими клапанами должны принимать лекарства, обладающие антикоагулянтным действием. Кроме того запирающий элемент механических клапанов может оказывать травмирующее действие на форменные элементы крови, а также повышает гидродинамическое сопротивление, что приводит к дополнительной нагрузке на сердце. Повышен риск возникновения эндокардитов [38, 43].

1.1.3 Биологические заменители клапанов сердца

Среди биологических заменителей клапанов сердца можно выделить каркасные биопротезы и бескаркасные клапаны.

Основу биопротезов (ксеноклапанов, ксенографов) составляет запирающий элемент из природных тканевых элементов – лепестков сердечных клапанов свиньи или ткани перикарда (околосердечной сумки) коров. Этот запирающий элемент обычно закреплен в основании, изготавливаемом из искусственных материалов. Таким образом, полимерные материалы используются и в биопротезах клапанов сердца.

Ксеноклапаны клапаны обладают высокими гидродинамическими характеристиками, однако они в большей мере подвержены кальцификации. Для таких эндопротезов имеется опасность биодеградации.

Существуют также биопротезы на основе тканей человека. Они бывают двух типов – гомографы, клапаны, взятые от другого человека, и аутографы, клапаны перемещенные в другую позицию этого же пациента. Примером использования аутографа является замещение аортального клапана, поражаемого чаще других клапанов, легочным клапаном пациента. В таком

случае последний может быть замещен биопротезом или механическим клапаном. Пересаженные клапаны человека отличаются более высоким уровнем биосовместимости [22].

Большая часть биопротезов клапанов сердца изготавливается из специально обработанных (например, глутаровым альдегидом) сердечных клапанов животных.

При их использовании можно избежать некоторых осложнений, связанных с механическими искусственными клапанами. Биологические искусственные клапаны не вызывают тромбообразования, наблюдающегося при использовании механических, а следовательно, не требуется пожизненного применения антикоагулянтных препаратов. Их применяют только в течение двух-трех месяцев после операции, пока не произойдет эндотелизация пришивного кольца.

Однако главная проблема при использовании биологических искусственных клапанов связана с их плохой износостойкостью по сравнению с механическими протезами. Было подсчитано, что через 15 лет продолжают функционировать лишь от 30 до 40% протезов. У молодых пациентов разрушение происходит быстрее, чем у пожилых. Для замедления разрушения биологические искусственные клапаны фиксируют глутаровым альдегидом. Однако фиксация глутаровым альдегидом ускоряет обызвествление, приводящее к отказу клапана. Поэтому сейчас разрабатывают альтернативные методы сохранения ткани путем образования сшивков, в том числе с использованием полиэпоксисоединений (например, полиглицидиловый эфир) и фотоокисления в присутствии красителей [15, 29].

1.2 Осложнения после имплантации сердечных клапанов

В клиническую практику протезирование клапанов сердца вошло в 60-х годах прошлого столетия. Однако замена сердечного клапана довольно

часто вызывает разнообразные осложнения. К основным таким осложнениям относятся стеноз протеза, обструкция протеза, регургитация, тромбоэмболии артерий большого круга и инфекционный эндокардит.

Протезы способны вызывать относительный стеноз, который сопровождается деформацией створок и сужением клапанного отверстия. Самая частая причина стеноза у взрослых – кальцификация створок клапана, из-за которой уменьшается подвижность его створок. Стеноз протеза в свою очередь может спровоцировать такие осложнения, как инфекционный эндокардит, эмболии (чаще всего - коронарных, почечных и церебральных артерий). Медикаментозное лечение мало влияет на течение заболевания. Независимо от тяжести относительного стеноза необходима профилактика инфекционного эндокардита. Наиболее часто стеноз вызывают механические протезы, хотя даже нормально функционирующий протез вызывает небольшой или умеренный стеноз, особенно при больших объемах кровотока, наблюдаемых при различных инфекциях, анемии, физической нагрузке, клапанной и околоклапанной регургитации.

Нарушение функции эндопротеза может быть вызвано также патологической обструкцией, которая вызвана чаще всего образованием тромба, разрастанием соединительной ткани, вегетации. Наиболее опасным осложнением является образование тромба, которое почти всегда обусловлено недостаточной антикоагулянтной терапией.

Некоторые инфекционные заболевания либо отрыв клапана, несвязанный с инфекцией могут спровоцировать регургитацию. Регургитация возникает как при клапанных, так и при околоклапанных патологических процессах и представляет собой обратный ток крови из одной камеры сердца в другую.

При трансплантации механических протезов есть высокий риск тромбоэмболий артерий большого круга. Основная причина их образования заключается в медленном бессимптомном росте тромба на клапане. Риск

тромбоэмболий зависит от того, как проводится антикоагулянтная терапия [14].

1.2.1 Инфекционный эндокардит

Рост числа больных – носителей протезов клапанов сердца – неизменно приводит к увеличению заболеваемости инфекционным эндокардитом в общей популяции населения [35]. Актуальность проблемы инфекционного эндокардита определяется высокой летальностью и сложностью ранней диагностики [31, 36, 39]. Даже в условиях адекватной терапии летальность составляет 10-30%, а при отсутствии своевременного распознавания и правильного лечения достигает 100% [9].

Согласно рекомендациям Европейского кардиологического общества (2004 г.) выделяют активный, излеченный и рецидивирующий инфекционный эндокардит. Вторичный эндокардит развивается на фоне врожденных или приобретенных пороков сердца. Первичный инфекционный эндокардит возникает у больных, не имевших такой фоновой кардиальной патологии.

При поражении протезированных клапанов выделяют ранний (в течение года после операции) и поздний инфекционный эндокардит [2].

В зависимости от возбудителя инфекционный эндокардит может быть стрептококковым, стафилококковым, хламидийным, грибковым и т.д.

Для инфекционного эндокардита протезированного клапана характерны микробные ассоциации (бактериальные и бактериально-грибковые). В структуре возбудителей инфекционного эндокардита среди всех выделенных штаммов преобладают грамположительные кокки, отмечается высокая частота грибковой флоры (дрожжевые грибы *Candida*, *Cephalosporum*), а также встречаются грамотрицательные (*Enterobacter*, *Pantonea aglomerans*) и анаэробные бактерии (*Peptostreptococcus*).

Среди грамположительных кокков лидирует золотистый стафилококк (*Staphylococcus aureus*), эпидермальный стафилококк (*Staphylococcus epidermidis*) и энтерококки (*Enterococcus gallinarum*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*). Стафилококки обладают метициллинрезистентностью, сохраняя высокую чувствительность к ванкомицину. Штаммы грибов чувствительны к флуконазолу [27].

Основой патогенеза инфекционного эндокардита являются нарушения внутрисердечной гемодинамики, травматизация участков клапанного или пристеночного эндокарда, бактериемия, снижение резистентности организма, исходно сопутствующая патология внутрисердечных структур врожденного или приобретенного генеза.

Локальные нарушения гемодинамики ведут к повреждению (сращиванию) эндотелия, который становится потенциальным активатором тромбогенеза, а участки поврежденного эндокарда становятся исходными очагами инфицирования при транзиторной бактериемии.

Как правило, условия для образования колоний микроорганизмов возникают при переходе инфицированного потока крови из полости высокого давления в полость малого давления.

Фиксация возбудителя к эндотелию происходит при наличии двух групп факторов — локальных и общих. К первой группе относятся врожденные и приобретенные морфологические изменения клапанного аппарата и других структур сердца (традиционно считается, что эндокардит «ложится в ложе» ревматического порока) и связанные с ними изменения сердечной гемодинамики. Деструктивные изменения эндокарда могут также возникать вследствие механической травматизации эндокарда во время внутрисердечных манипуляций (однократная катетеризация сердца в течение нескольких минут делает эндокард чувствительным к микробной инвазии на протяжении нескольких дней), оперативных вмешательств на сердце, при ранении сердца и др.

Повреждение эндотелиальной поверхности клапана обнажает тромбогенный субэндотелиальный коллаген, что ведет к отложению фибрина с последующим формированием небактериальных тромботических эндокардиальных повреждений.

Микроорганизмы размножаются в фибрин-тромбоцитарном окружении вегетации, при которых существует высокий риск отрыва и эмболии жизненно важных органов. Микроорганизмы, находящиеся глубоко внутри вегетации, обладают пониженным метаболизмом и не высвобождаются в ток крови.

Инвазия микроорганизмов в фиброзную оболочку клапанов приводит к формированию микроабсцессов, содержащих микроорганизмы, находящиеся в состоянии значительно сниженного метаболизма.

В около 30% случаев развитию инфекционного эндокардита не предшествовала патология сердца, включая небактериальные тромботические эндокардиальные повреждения.

Некоторые микроорганизмы, такие как золотистый стафилококк, ряд штаммов стрептококков, сальмонеллы, риккетсии, бореллии и кандиды способны инфицировать интактные эндотелиоциты либо путем взаимодействия специфических гликопротеидов (золотистый стафилококк, стрептококки), либо эндотелиального фагоцитоза. Фактически эндотелиоциты могут также захватывать метаболически латентные микроорганизмы. Микроорганизмы, повреждая эндотелий, обнажают субэндотелиальный коллаген, что способствует агрегации тромбоцитов и полимеризации фибрина с последующим формированием вегетации на поверхности клапана [6].

При инфекции механического протеза происходит поражение биологического материала (фибрина, тромбов, соединительной ткани), который покрывает пришивное кольцо, а сам клапан поражается редко. При инфекциях биологических протезов поражаются и створки, и клапанное

кольцо. Инфекция биологических протезов поддается лечению несколько легче, чем механических.

1.3 Обзор лекарственных препаратов

1.3.1 Антикоагуляционные препараты

Большую группу пациентов, которым требуется назначение антикоагуляционных препаратов, составляют больные, перенесшие операцию протезирования клапанов сердца. Основную опасность для жизни таких больных составляют тромбоэмболические осложнения, источником которых являются тромбы, образующиеся на поверхность протеза клапана.

Антикоагуляционные препараты представляют собой лекарственные средства, которые угнетают активность свертывающей системы крови, препятствуя образованию тромбов.

Различают антикоагулянты прямого и непрямого действия. Антикоагулянты прямого действия понижают активность тромбина в крови, а антикоагулянты непрямого действия нарушают процесс образования протромбина в печени.

Из антикоагулянтов прямого действия следует выделить гепарин. Соединение было выделено в 1916 г. из печени. В дальнейшем его обнаружили в легких, слизистой оболочке кишечника, мышцах и других органов. Для применения в качестве лекарственного средства гепарин получают из слизистой оболочки кишечника свиней, а также из легких крупного рогатого скота.

Основное свойство – антикоагуляционное (антитромботическое) действие, которое объясняется способностью его высокомолекулярных цепей ингибировать ключевой фермент свертывания крови – тромбин. Используется для профилактики и терапии тромбоэмболий и их осложнений, для предотвращения тромбообразования при различных оперативных

вмешательствах, в том числе на операциях на сердце и кровеносные сосуды [10].

Гепарин используется в создании лекарственного покрытия протезов. Так как сосудистые протезы малого диаметра с ковалентной связью претерпевают быструю биodeградацию и возрастает риск послеоперационных тромбозов. Иммобилизация гепарина остается одним из наиболее распространенных способов повышения гемосовместимости поверхности изделий медицинского назначения [40]. Обработка синтетических протезов покрытием, обладающим аффинностью к гепарину, замедляет процесс их интеграции в ткани (вживление), уменьшает реакцию неоинтимальной гиперплазии, что в конечном итоге приводит к улучшению функциональных свойств сосудистых протезов малого диаметра [17].

Варфарин – антикоагулянт непрямого действия. Впервые был синтезирован в 1948 г. в результате поиска более мощных антикоагулянтов, и зарегистрирован своим создателем – Карлом Линком – в качестве крысиного яда. Лишь в 1951 г. начались первые опыты по использованию варфарина с медицинскими целями, а с 1954 г. препарат получил разрешение для использования в клинической практике. Механизм действия варфарина – нарушение метаболизма витамина К в результате угнетения фермента эпоксидредуктазы – был полностью расшифрован лишь 30 лет спустя после открытия препарата. В течение нескольких десятилетий варфарин оставался основным и, по сути, единственным антикоагулянтом, используемым для профилактики и лечения тромбозов в зарубежной клинической практике. По сравнению с другими представителями класса не прямых антикоагулянтов или антагонистов витамина К варфарин обладает наименьшей токсичностью, достаточно хорошей управляемостью и прекрасной доказательной базой. Однако в России препарат был зарегистрирован лишь в 2001 г., и то в виде дженерика (до этого времени в СССР и России применялся фенилин) [23].

Назначение варфарина позволяет снизить риск тромбозов у пациентов с искусственными клапанами сердца на 75% [19], поэтому

длительная (пожизненная) терапия антикоагулянтами обязательна практически всем больным после операции протезирования клапанов. Исключение составляют пациенты без факторов риска тромбоэмболических осложнений, которым был установлен биопротез: в этом случае длительность терапии может быть ограничена тремя месяцами [21].

1.3.2 Антипролиферационные препараты

Антипролиферативное действие направлено на подавление избыточной пролиферации различных клеток.

Главной причиной возникновения рестеноза после эндоваскулярного лечения коронарных артерий является местная неоинтимальная пролиферация в ответ на контролируемое повреждение катетерами интимы и меди артерии.

Множественные исследования показали, что сиролимус- и паклитаксел-покрытые стенты снижают риск рестеноза сосудов. Стент, выделяющий лекарство, обычно состоит из: металлической основы; полимерного слоя, на который абсорбировано лекарство или с которым лекарство смешано; иногда – из защитного полимерного слоя, который предотвращает раннее вымывание лекарства; собственно лекарства.

Полимерный слой, содержащий активную субстанцию, должен быть абсолютно биосовместимым, выполнять механические функции, а также обеспечивать нужную необходимую концентрацию препарата [37, 44].

Лекарственный препарат должен обладать способностью ингибировать наибольшее количество различных компонентов комплексного процесса рестенозирования. Безудержный рост неоинтимы по некоторым основным характеристикам схож с ростом опухоли, что навело на мысль использования цитостатических препаратов Рапамицин (Сиролимус) и Паклитаксел (Таксол) [26].

Паклитаксель является средством, стабилизирующим микроканалы и обладающим антипролиферативной активностью. Она обеспечивается за счет воздействия на митотическое веретено в М-фазе, тем самым предотвращая переход в анафазу и последующее деление клетки. Более того, паклитаксель может замедлить миграцию гладкомышечных клеток. Покрытые паклитакселем сосудистые стенты показали доза-зависимую антирестенозную эффективность у животных [32, 34].

Однако при высокой дозировке осаждение фибрина на стенте усиливалось, и процесс заживления поврежденной поверхности сосуда нарушался [33].

Сиролимус (рапамицин) – вещество, встречающееся в природе как продукт жизнедеятельности актиномицет *Streptomyces hydropneumoniae*, относится по химической структуре к макролидам. Сиролимус обладает мощным антипролиферативным и иммуносупрессивным свойствами. Он взаимодействует с белком FKBP506, который, в свою очередь, связывается с белком mTOR (мишень рапамицина у млекопитающих). Активированный mTOR блокирует клеточный цикл развития в основном гладкомышечных клеток на этапе перехода из фазы G_1 в фазу S, а также ингибирует миграцию гладкомышечных клеток в интиму. Это приводит к прекращению образования неинтимы, которая представляет собой фиброзную оболочку, образующуюся на внутренней поверхности сосудистого протеза в результате перерождения прорастающего в него эндотелия [5].

Первое клиническое применение стента с сиролимусовым покрытием было осуществлено в Сан-Пауло и Роттердаме. Сорок пять пациентов были отобраны для имплантации стента с сиролимусовым покрытием Bx Velocity для изолированных поражений коронарных артерий длиной до 18 мм и диаметром сосуда 3,0-3,5 мм. Всем пациентам были имплантированы стенты длиной 18 мм с сиролимусовым покрытием. Обследование через 24 месяца обнаружило 0% рестеноза внутри стента и минимальную гиперплазию

интимы. Не наблюдалось случаев подострого или позднего тромбоза стента [41, 42].

Таким образом, ранние клинические результаты исследований стентов с лекарственным покрытием весьма многообещающи и перспективны, поскольку они убедительно демонстрируют подавление пролиферации неоинтимы почти у всех пациентов после имплантации коронарного эндопротеза [28].

1.3.3 Антибиотики и противогрибковые препараты

Для лечения инфекционного эндокардита, вызываемого разнообразными микроорганизмами и грибами, применяются бактерицидные антибиотики и противогрибковые препараты.

Ежегодно публикуются сообщения о выделении в качестве возбудителя инфекционного эндокардита новых экзотических микроорганизмов. Несмотря на это стрептококки и стафилококки продолжают оставаться основными возбудителями инфекционного эндокардита.

Основой терапии инфекционного эндокардита остается применение бактерицидных антибиотиков, таких как ванкомицин, гентамицин, цефазолин, амикацин. Также назначаются и противогрибковые препараты, например, флуконазол [25].

В 1952 г. был выделен из образца почвы штамм *Streptomyces orientalis* (в настоящее время *Ammycolatopsis orientalis*). Последний привлек внимание исследователей по причине синтеза ранее неизвестной субстанции “05865”, подавляющей рост грамположительных бактерий, в том числе устойчивого к пенициллину *Staphylococcus aureus*. Вскоре было получено активное вещество – ванкомицин. В ходе первого клинического испытания на добровольцах препарат оказался эффективным в 8 из 9 случаев тяжелой инфекции, вызванной *S. aureus*. В 1958 г., на фоне растущей потребности в антистафилококковых антибиотиках, ванкомицин прошел регистрацию по

ускоренной процедуре и, одновременно с метициллином, стал доступен для клинического использования. Однако выраженные ото- и нефротоксичность недостаточно очищенного препарата не позволяли рассматривать ванкомицин как средство выбора для лечения стафилококковых инфекций.

Возвращение интереса к ванкомицину было связано с внедрением в практику хроматографических методов очистки антибиотика и формированием у стафилококков нового механизма устойчивости к бета-лактамам. Хроматографически очищенные лекарственные формы ванкомицина с содержанием не менее 93% активного вещества характеризуются низкой токсичностью и в целом рассматриваются как достаточно безопасные. Из присутствующих на рынке Российской Федерации лекарственных форм ванкомицина указанным критериям соответствуют Ванкоцин (Elly Lilly), Эдицин (Lek) и Веро-Ванкомицин (Верофарм).

Ванкомицин, как и другие гликопептиды, относится к антибиотикам, блокирующим биосинтез одного из основных компонентов клеточной стенки бактерий – пептидогликана. Гликопептиды связываются с концевым дипептидом D-Ala-D-Ala, входящим в состав дисахарид-пентапептида – предшественника пептидогликана. В результате такого связывания происходит блокада последних стадий синтеза пептидогликана – включения предшественника в растущие цепи полимера (реакция трансгликозилирования) и образования поперечных сшивок между параллельными цепями (транспептидазная реакция). Ванкомицин практически лишен значимой активности в отношении грамотрицательных бактерий, что связано с его неспособностью из-за большой молекулярной массы проникать через пориновые каналы клеточной стенки микроорганизмов.

Ванкомицин остается актуальным и эффективным препаратом, предназначенным для лечения высоко вероятной и подтвержденной инфекции любой локализации. При борьбе с любой тяжелой системной

инфекцией показано применение данного препарата. Особенно это касается тяжелых бактериемических инфекций, инфекций ЦНС и эндокардита [24].

Амикацин – полусинтетический антибиотик из группы аминогликозидов, обладающий широким спектром антимикробного действия. Активен в отношении грамотрицательных бактерий (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Shigella* spp., *Salmonella* spp. и др.) и некоторых грамположительных микроорганизмов (в том числе *Staphylococcus* sp., устойчивый к пенициллину, метициллину). Резистентность к амикацину развивается медленно. К недостаткам этого антибиотика, как и всех аминогликозидов, следует отнести проявление токсичности, в частности, ототоксичности и нефротоксичности.

Известно, что комплексообразование аминогликозидов с биосовместимыми полимерами приводит к снижению острой токсичности данных антибиотиков.

На основе сополимеров N-винилпирролидона с кротоновой кислотой и полисахарида лютелана могут быть получены полимерные комплексы амикацина с содержанием антибиотика 20 и 25%. Комплексы амикацина с синтетическими сополимерами ВП-КК в опытах *in vitro* проявляют выраженное антимикробное действие, сопоставимое с антибиотиком амикацином (в отношении грамотрицательных бактерий), а в отношении штаммов *S. aureus* превышают активность амикацина в 2 раза. Применение лютелана в качестве носителя для антибиотика приводит к снижению антимикробной активности комплекса, что, связано с высокой молекулярной массой полисахарида [16].

Флуконазол является противогрибковым препаратом новой химической группы – производных триазола. Оказывает выраженное противогрибковое действие. Активен в отношении ряда дрожжевых грибов, дерматофитов и возбудителей оппортунистических и эндемических микозов. Назначается при систематическом лечении инфекционного эндокардита [9].

1.4. Материалы для депонирования и контролируемой доставки лекарственных препаратов

В настоящее время очень перспективным и быстро развивающимся направлением в фармакологии является разработка систем контролируемой доставки лекарственных средств. С помощью этих систем можно добиться длительного поддержания требуемого уровня лекарственного препарата в крови или тканях пациента на определенный период времени. Это позволяет избегать высоких стартовых концентраций препарата и уменьшить число процедур.

При создании имплантатов для сердечно-сосудистой системы, используют материалы, обладающие высоким уровнем гемосовместимости.

Среди полимеров, обладающих повышенной гемосовместимостью, практическое применение нашли «сегментированные» полиуретаны (блоксополиуретаны, содержащие гибкие блоки, например простых и сложных полиэфиров, поликарбонатов, полисилоксанов, и блоки, обеспечивающие хорошее межмолекулярное взаимодействие), а также полиэтилентерефталат, фторсодержащие карбоцепные полимеры (вспененный политетрафторэтилен, фторлоны), полисилоксаны, углеродсодержащие композиты [30].

Эти материалы не должны стимулировать разрушение и денатурацию молекулярных и клеточных компонентов крови, не должны влиять на водно-солевой баланс и pH крови, а также не должны вызывать образование тромба (тромборезистентность) [1].

Система контролируемой доставки лекарственных средств должна быть инертной, биосовместимой, механически прочной, с высоким содержанием лекарства, должны исключать возможность неконтролируемого высвобождения препарата, быть легко имплантируемой и извлекаемой, при этом не должна вызывать дискомфорт у пациента, просто изготавливаться и стерилизоваться.

На основе биodeградируемых носителей создаются лекарственные формы для снятия болей, антидепрессанты, антибактериальные, антипролиферативные и противовоспалительные препараты.

Биodeградируемые носители лекарственных препаратов постепенно разрушаются в организме, при этом на скорость биodeградации полимерного матрикса и, соответственно, выход лекарственного вещества влияют многие факторы, обусловленные химической структурой препарата, стерилизацией, условия хранения, формой и местом имплантации, физико-химическими и физическими факторами.

На основе полимерных носителей существует несколько типов транспортных систем: пленки, спрессованные компакты в виде стержней и таблетированных форм, а также микрокапсулы, микросферы, наночастицы, липосомы, мицеллы.

В большинстве случаев препарат в системе доставки находится в связанном виде – конъюгирован с макромолекулами полимера посредством химической связи, которая влияет на скорость высвобождения лекарства. В связи с этим чаще всего при депонировании препаратов используются химические последовательности небольшой длины, так называемые «спейсеры».

Таблетированные формы могут быть покрыты дополнительными оболочками из полимера с целью регуляции скорости выхода препарата.

Наиболее перспективными считаются системы контролируемой доставки лекарственных средств на основе биodeградируемых микросфер и микрокапсул, которые обычно имеют размер от 10 до 1000 нм. Микрокапсулы отличаются от микросфер тем, что лекарство в них не диспергировано в матриксе, а находится как бы в резервуаре. Микрочастицы можно применять для создания лекарственных форм огромного спектра препаратов, с их помощью относительно просто контролировать профиль выхода лекарства, они легко могут быть введены инъекцией в кровоток, подкожно или внутримышечно, адаптированы для орального применения

или ингаляций. Препарат в микросферах либо связывается с полимерным матриксом, либо находится в свободном состоянии в порах конструкции. Выход препарата происходит за счет растворения матрикса в водной среде и в результате деградации биоразрушаемого полимерного матрикса. К микрочастицам также можно отнести и микролипосомы, представляющие собой высокоорганизованные липидные молекулы, которые образуют сферическую слоистую структуру, включающую в себя раствор, в котором они ресуспендированы [4, 8, 12, 13].

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1 Подготовка образцов к исследованию

Объектом исследования являлись образцы антибактериальных лекарственных покрытий манжеты сердечного клапана.

Лекарственное покрытие представляло собой комбинацию антибактериального препарата ванкомицина с полимеров PLGA. Конечная цель лекарственных форм длительного действия заключается в улучшении лечебного эффекта за счет поддержания постоянного уровня концентрации препарата в зоне имплантации. Полимерные системы используются для контроля над тем, с какой скоростью и в какое место доставляются лекарства. Полимер должен обеспечивать контролируемое высвобождение лекарственного препарата, не усиливать воспалительную реакцию в месте имплантации и не быть тромбогенным, а также обладать достаточной прочностью, чтобы выдерживать стерилизацию и имплантацию.

Для исследования профиля высвобождения лекарственного препарата из покрытия были подготовлены следующие группы образцов:

Группа 1 – манжета клапана 23,4 x 24,9 мм без лекарственного покрытия

Группа 2 - манжета клапана 23,4 x 24,9 мм с лекарственным покрытием, изготовленным из 1% раствора PLGA (65:35, Mr 60 кДа, характеристическая вязкость 0,62 дл/г, полидисперсность 1,69) (Lactel, США) в ацетоне («осч»), содержащего ванкомицин в концентрации 5 мг/мл.

Группа 3 – манжета клапана 23,4 x 24,9 мм с лекарственным покрытием, изготовленным из 1% раствора PLGA (65:35, Mr 60 кДа, характеристическая вязкость 0,62 дл/г, полидисперсность 1,69) (Lactel, США) в ацетоне («осч»), содержащего ванкомицин в концентрации 8 мг/мл.

Группа 4 - манжета клапана 23,4 x 24,9 мм с лекарственным покрытием, изготовленным из 1% раствора PLGA (65:35, Mr 60 кДа,

характеристическая вязкость 0,62 дл/г, полидисперсность 1,69) (Lactel, США) в ацетоне («осч»), содержащего ванкомицин в концентрации 10 мг/мл.

Для получения лекарственного покрытия 200 мкл раствора ванкомицина в смеси вода : ацетон (1:4) с PLGA или без наносились с помощью дозатора на полиэфирную ткань манжет клапанов, которые затем сушили при комнатной температуре в течение суток. После этого проводилась двойная упаковка образцов в фольгированные и газопроницаемые пакеты, стерилизация оксидом этилена.

Для исследования тканевой реакции на имплантацию материала были изготовлены следующие группы образцов.

Группа 1 - полиэфирная ткань без лекарственного покрытия

Группа 2 - полиэфирная ткань с лекарственным покрытием, изготовленным из 1% раствора PLGA (65:35, Мг 60 кДа, характеристическая вязкость 0,62 дл/г, полидисперсность 1,69) (Lactel, США) в ацетоне («осч»), содержащего ванкомицин в концентрации 5 мг/мл.

Группа 3 - полиэфирная ткань с лекарственным покрытием, изготовленным из 1% раствора PLGA (65:35, Мг 60 кДа, характеристическая вязкость 0,62 дл/г, полидисперсность 1,69) (Lactel, США) в ацетоне («осч»), содержащего ванкомицин в концентрации 8 мг/мл.

Группа 4 - полиэфирная ткань с лекарственным покрытием, изготовленным из 1% раствора PLGA (65:35, Мг 60 кДа, характеристическая вязкость 0,62 дл/г, полидисперсность 1,69) (Lactel, США) в ацетоне («осч»), содержащего ванкомицин в концентрации 10 мг/мл.

Лекарственное покрытие получили путем нанесения с помощью дозатора раствора ванкомицина в смеси вода : ацетон (1:4) с PLGA или без на фрагменты полиэфирной ткани размером 10x10 мм. Образцы высушивались при комнатной температуре в течение суток. После этого проводилась двойная упаковка образцов в фольгированные и газопроницаемые пакеты, стерилизация оксидом этилена.

Для оценки антибактериального действия лекарственного покрытия комбинацию ванкомицина с PLGA наносили на круги из полиэфирной ткани диаметром 6 мм.

Концентрация ванкомицина на площадь поверхности одинакова для образцов манжет клапанов и образцов полиэфирной ткани. Дальнейшие исследования свойств лекарственного покрытия проводилось с использованием химических реактивов классов «ХЧ», «ОСЧ».

2.2 Моделирование деградации лекарственного покрытия в условиях *in vitro*

Общее количество образцов манжет клапанов с каждым видом лекарственного покрытия – 15 штук. В 5 образцах определяли начальное содержание ванкомицина путем растворения покрытия в смеси вода:ацетон и последующего анализа полученного раствора спектрофотометрическим методом на длине волны 280 нм в кювете с длиной оптического пути 1 см [20]. Для изучения процессов деградации лекарственного покрытия *in vitro* использовали 0,1М фосфатный буфер pH=7,4. Каждый образец (10 штук) выдерживался в 10 мл раствора при 37°C в течение 30 дней, замену буфера производили каждые 24 часа. При смене буфера отбирали 1 мл раствора для анализа содержания препарата. Содержание ванкомицина определяли методом УФ-спектроскопии на длине волны 280 нм в кювете с длиной оптического пути 1 см. В 5 образцах после инкубации в фосфатном буфере определяли остаточное содержание ванкомицина путем растворения покрытия в смеси вода:ацетон и последующего анализа полученного раствора спектрофотометрическим методом на длине волны 280 нм в кювете с длиной оптического пути 1 см.

Для построения калибровки в качестве калибровочных растворов применяли стандартные растворы ванкомицина в воде с концентрациями 4 мкг/мл, 8 мкг/мл, 12 мкг/мл, 16 мкг/мл, 20 мкг/мл, 24 мкг/мл, 28 мкг/мл, 32

мкг/мл, 36 мкг/мл, 40 мкг/мл, 50 мкг/мл, 60 мкг/мл, 70 мкг/мл, 80 мкг/мл, 90 мкг/мл, 100 мкг/мл (таблица 1, рисунок 1).

Таблица 1 – Приготовление стандартных растворов ванкомицина в воде ($M \pm m$, $n=5$)

№	$V_{\text{воды, мл}}$	$V_{\text{препарата, мл}}$	$C, \text{ Мкг/мл}$	ΔD
1	0,36	0,04	4	0,02
2	0,32	0,08	8	0,03
3	0,28	0,12	12	0,04
4	0,24	0,16	16	0,06
5	0,2	0,2	20	0,08
6	0,16	0,24	24	0,09
7	0,12	0,28	28	0,11
8	0,08	0,32	32	0,12
9	0,04	0,36	36	0,13
10	0,6	0,4	40	0,14
11	0,5	0,5	50	0,18
12	0,4	0,6	60	0,21
13	0,3	0,7	70	0,25
14	0,2	0,8	80	0,3
15	0,1	0,9	90	0,34
16	0	1	100	0,37
17	1	0	0	0

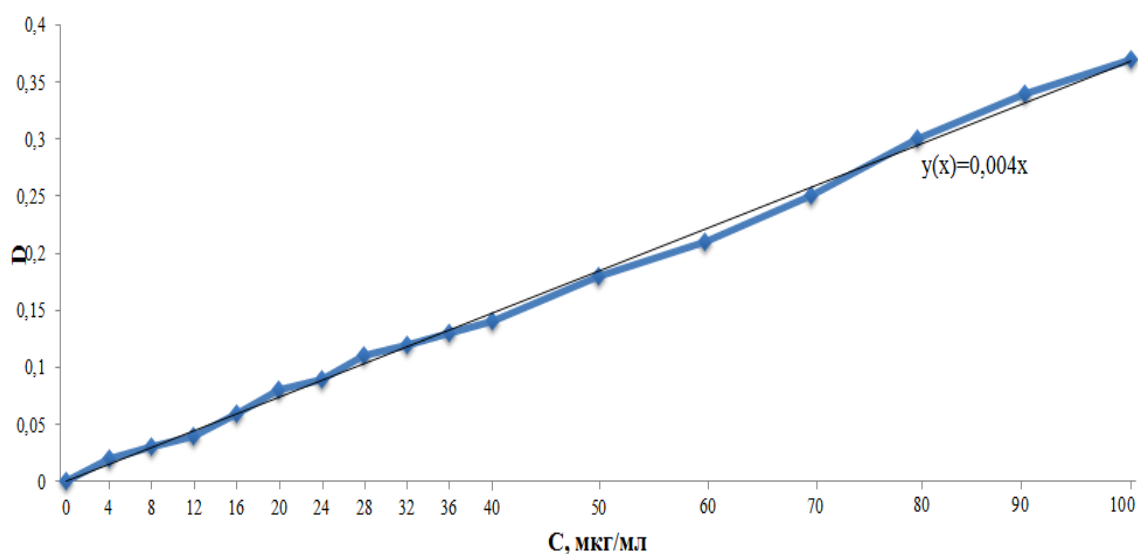


Рисунок 1. Калибровка по ванкомицину, $\lambda=280$ нм ($M \pm m$, $n=5$)

2.3 Оценка антибактериального действия дисковым методом

В основе диско-диффузионного метода лежит подавление антибиотиком поверхностного, видимого роста микроорганизмов на плотных питательных средах. Стандартной питательной средой является агаровая питательная среда. После посева культуры микроорганизмов, диск с предварительно нанесенным антибиотиком помещается на поверхность питательной среды. Далее на питательной среде начинается рост микроорганизмов и диффузия антибиотика из диска.

Инокулят представлен либо 18 – 20-ти часовой агаровой, либо 5 – 6-ти часовой бульонной культурой исследуемого микроорганизма. Приготовленный инокулят наносят в количестве 1 – 2 мл на поверхность чашки Петри с питательной средой, равномерно распределяют по поверхности покачиванием и удаляют избыток жидкости пипеткой. Приоткрытые чашки подсушивают при комнатной температуре в течение 10 – 15 мин.

Диски с антибиотиками помещают на поверхность агара, плотно прижимая каждый диск, обеспечивая постоянную диффузию антибиотика.

После окончания инкубации чашки помещают кверху дном на темную матовую поверхность так, чтобы свет настольной лампы падал на них под углом в 45° (учет в отраженном свете). Диаметр зон задержки роста с учетом диаметра самого диска измеряют с точностью до 1 мм. При измерении зон задержки роста следует ориентироваться на полную ингибицию видимого роста. Оценка антибиотической активности производится согласно МУК 4.2.1890-04.

2.4 Подкожная имплантация образцов

Исследование проводилось на 12 самцах белых беспородных крысах в возрасте 3 месяцев. Животных содержали в стандартных условиях вивария при постоянном доступе к воде и пище, 12-часовой смене светового режима.

Операцию проводили под ингаляционным наркозом (диэтиловый эфир). Образцы полиэфирной ткани помещались в карманы, сформированные вдоль средней линии спины. Хирургическую операционную рану закрывали с помощью шовного материала, участок линии разреза обрабатывали антисептическим раствором.

Через 1 и 4 недели после операции животных выводили из эксперимента, а образцы материала с прилежащими тканями реципиента подвергали гистологическому исследованию. Оценивали воспаление и степень фиброза, степень дегенерации в морфологии ткани, некроз (по стенкам капилляров и/или осколкам ядер), количество и силу врастания ткани в пористый материал, состояние тканевого ложа и поверхности имплантата.

2.5 Гистологическое исследование

Гистологическое исследование мягких соединительных тканей состояло из следующих этапов:

- 1) Подготовка образцов для гистологического исследования.
- 2) Проводка фрагментов по возрастающим концентрациям спиртов и пропитка парафином с последующим изготовлением парафиновых блоков.
- 3) Изготовление парафиновых срезов.
- 4) Окрашивание гистологических срезов гематоксилин-эозином и гематоксилин-пикрофуксином (метод Вейгерта-Ван-Гизона).
- 5) Заключение окрашенных срезов под покровное стекло.
- 6) Изучение срезов под микроскопом в проходящем свете.

Метод окраски гематоксилин-эозином является самым распространенным в гистологической практике, так как благодаря удачному сочетанию красителей, позволяет получить общее представление о состоянии исследуемых органов и тканей. Гематоксилин представляет собой природный краситель растительного происхождения, растворимый в воде, спирте и глицерине. Гематоксилин обладает основными свойствами. Это позволяет выявлять структурные компоненты ядра, содержащие нуклеиновые кислоты. Эозин – искусственный краситель, растворим в воде и спиртах, обладает кислотными свойствами, окрашивает цитоплазму клеток в розовый цвет.

Методика окрашивания подразумевает приготовление стекол со срезами, удаление излишка влаги с препарата и накапывание пипеткой раствор красителя до полного покрытия препарата. Через 2 минуты сливают красящий раствор со стекол и помещают в дистиллированную воду для отмывания излишков красителя. После этого, вытерев тыльную сторону стекла, препарат рассматривают под микроскоп, предварительно накрыв препарат покровным стеклом. Окрашивание соединительной и мышечной ткани по методу ван Гизона имеет ряд преимуществ по сравнению с окраской гематоксилин-эозином, так как по-разному окрашиваются различные компоненты ткани. При окраске данным методом употребляются два раствора: железный гематоксилин Вейгерта и кислую смесь пикрофуксина. Коллагеновые волокна соединительной ткани после окраски пикрофуксином имеют ярко-красный цвет, а мышечные и эластические волокна – буровато-красный или желто-зеленый. Железный гематоксилин Вейгерта окрашивает ядра в темно-коричневый или буровато-черный цвет.

При окрашивании, в первую очередь срезы помещают в гематоксилин Вейгерта на 2-5 минут. Далее ополаскивают срезы в дистиллированной воде и переносят в водопроводную воду на 10 минут. На следующем этапе помещают срезы на 1-3 минуты в пикрофуксин. Быстро споласкивают срезы в дистиллированной воде, проводят их очень быстро через 96% спирт, просветляют в карбол-толуоле, толуоле и заключают в канадский бальзам. В

результате получают коллагеновые волокна ярко-красного цвета, а мышечные и эластические – буровато-желтого или желто-зеленого. Ядра бурокоричневого или буро-черного цвета [3].

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Результаты деградации антибактериального покрытия *in vitro*

В ходе проведенного исследования были определены профили элюции ванкомицина по дням, неделям и его суммарное высвобождение из полимерного покрытия в буферный раствор при деградации лекарственного покрытия *in vitro*. Исследование проводили на спектрофотометре СФ-2000.

Начальное содержание ванкомицина определяли в 5 образцах путем растворения в смеси вода:ацетон и последующего спектрометрического анализа полученного раствора на длине волны 280 нм в кювете с длиной оптического пути 1 см.

Профиль элюции ванкомицина в фосфатный буферный раствор pH=7,4 при моделировании деградации лекарственного покрытия *in vitro*, изготовленного из 1% PLGA (65:35), содержащего 5 мг/мл ванкомицина представлен на рисунке 2.

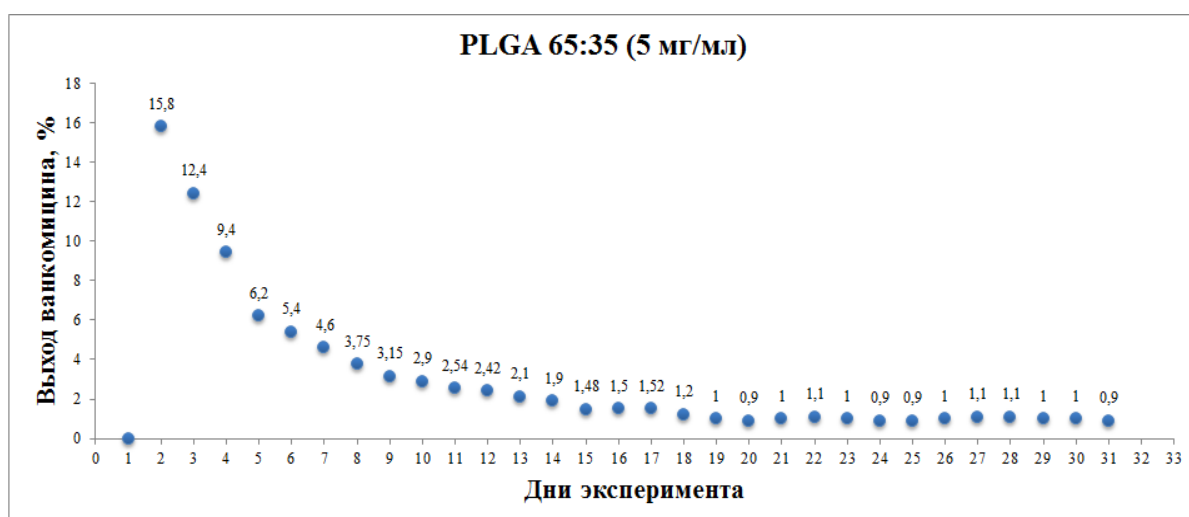


Рисунок 2. Профиль элюции ванкомицина в буферный раствор pH=7,4 при моделировании деградации лекарственного покрытия *in vitro* по дням (1% PLGA, ванкомицин 5 мг/мл), % ($M \pm m$, n=5)

Максимальное количество препарата в растворе обнаружено на 1 сутки эксперимента - 15,8% от общего содержания ванкомицина в покрытии. На 2 сутки количество препарата в растворе уменьшилось, но незначительно – 12,4%. В первые несколько дней наблюдается смывание лекарственного препарата с поверхности покрытия, а именно в течение первых двух недель. Ежедневный средний выход препарата на 3 и 4 неделях эксперимента составил 1%. Увеличение выхода препарата с 26 дня эксперимента может быть обусловлено постепенным разрушением полимера.

Профиль элюции ванкомицина в фосфатный буферный раствор pH=7,4 при моделировании деградации лекарственного покрытия *in vitro*, изготовленного из 1% PLGA (65:35), содержащего ванкомицин в концентрации 8 мг/мл представлен на рисунке 3.

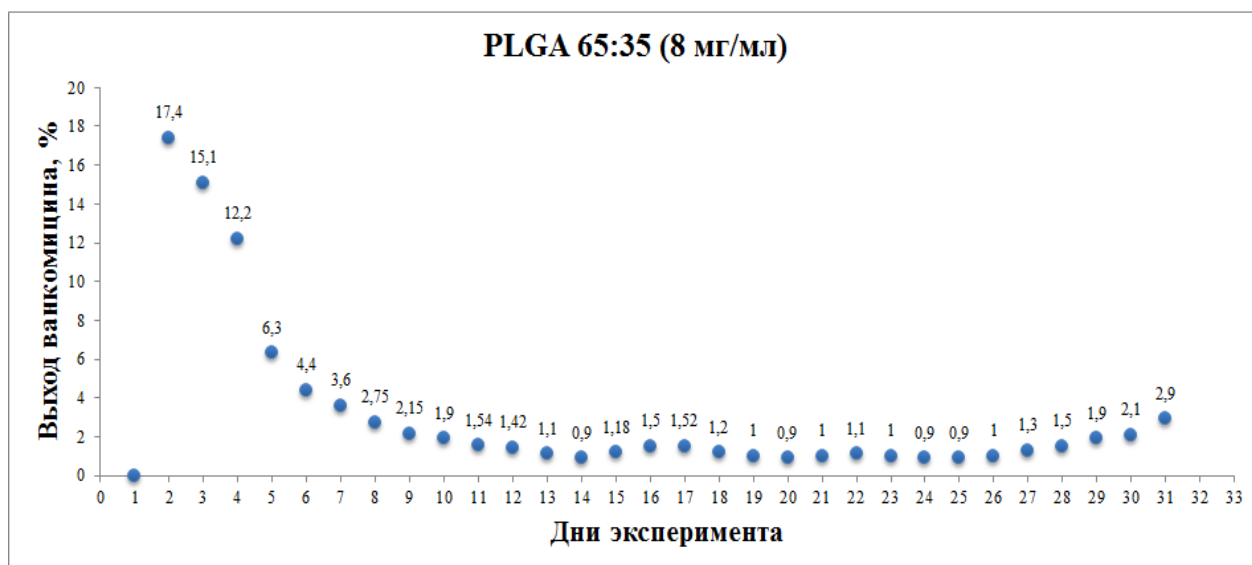


Рисунок 3. Профиль элюции ванкомицина в буферный раствор pH=7,4 при моделировании деградации лекарственного покрытия in vitro по дням (1% PLGA, ванкомицин 8 мг/мл), % ($M \pm m$, n=5)

Максимальное количество препарата в растворе обнаружено на 1 сутки эксперимента - 17,4% от общего содержания ванкомицина в покрытии. На 2 сутки количество препарата в растворе уменьшилось, но незначительно – 15,1%. В первые несколько дней наблюдается смывание лекарственного

препарата с поверхности покрытия, а именно в течение первых двух недель. Ежедневный средний выход препарата на 3 и 4 неделях составил 1%. Увеличение выхода препарата с 26 дня эксперимента может быть обусловлено постепенным разрушением полимера.

Профиль элюции ванкомицина в фосфатный буферный раствор pH=7,4 при моделировании деградации лекарственного покрытия *in vitro*, изготовленного из 1% PLGA (65:35), содержащего ванкомицин в концентрации 10 мг/мл представлен на рисунке 4.

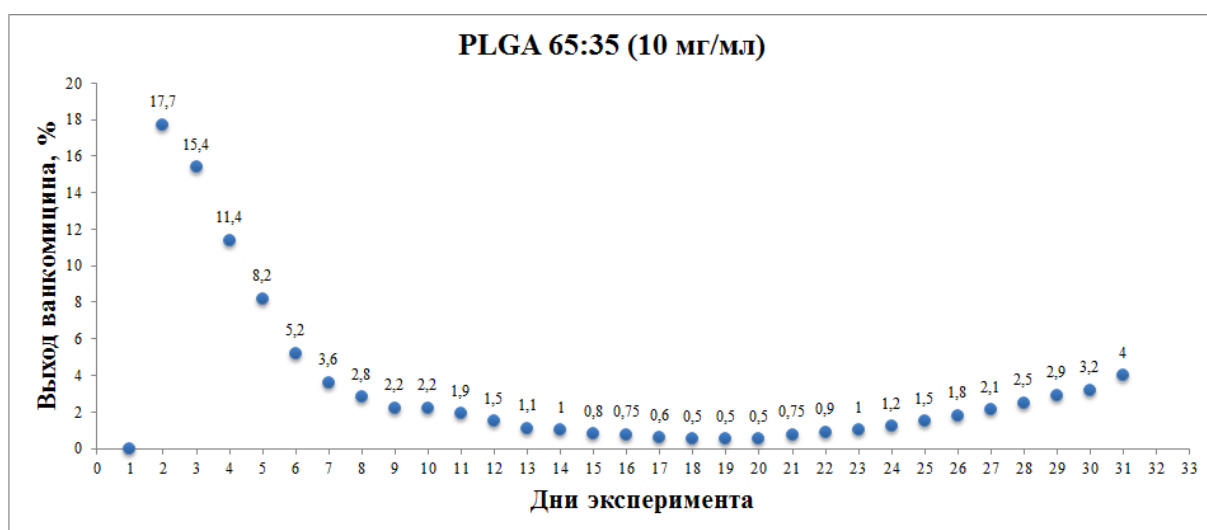


Рисунок 4. Профиль элюции ванкомицина в буферный раствор pH=7,4 при моделировании деградации лекарственного покрытия *in vitro* по дням (1% PLGA, ванкомицин 10 мг/мл), % ($M \pm m$, $n=5$)

Максимальное количество препарата в растворе обнаружено на 1 сутки эксперимента - 17,7% от общего содержания ванкомицина в покрытии. На 2 сутки количество препарата в растворе уменьшилось, но незначительно — 15,4%. В первые несколько дней наблюдается смывание лекарственного препарата с поверхности покрытия, а именно в течение первых двух недель. Ежедневный средний выход препарата на 3 и 4 неделях составил 1%. Увеличение выхода препарата с 21 дня эксперимента может быть обусловлено постепенным разрушением полимера.

В ходе проведения эксперимента по моделированию деградации лекарственного покрытия *in vitro* было выявлено неравномерное высвобождение лекарственного препарата в фосфатный буферный раствор ($\text{pH}=7,4$) во всех образцах. Повышенный выход препарата в течение первых нескольких дней не связан с деградацией полимера, а объясняется смыванием ванкомицина с доступного верхнего слоя покрытия. Дальнейшая динамика процесса обусловлена механизмами деградации самого полимера. Вода предпочтительно проникает в доступные аморфные области и там гидролизует эфирные связи, что инициирует снижение механических свойств образцов без изменения массы. На конечном этапе деградации покрытия скорость выхода препарата в раствор снижается, что связано с изменениями в структуре полимера.

Анализ профилей элюции ванкомицина в фосфатный буферный раствор $\text{pH}=7,4$ при моделировании деградации антибактериальных покрытий *in vitro*, изготовленных без полимера и содержащих разные концентрации ванкомицина (5 мг/мл, 8 мг/мл, 10 мг/мл) показал, что лекарственный препарат полностью смывается с полиэфирной ткани за первую неделю инкубации в растворе фосфатного буфера $\text{pH}=7,4$. При этом наблюдается схожая динамика выхода лекарственного препарата по сравнению с образцами антибактериальных покрытий с PLGA: максимальный выход в первые 2 суток с последующим снижением интенсивности высвобождения.

Высвобождение ванкомицина в фосфатный буферный раствор $\text{pH}=7,4$ при моделировании деградации лекарственного покрытия *in vitro*, изготовленного из 1% PLGA (65:35), содержащего 5 мг/мл ванкомицина представлен на рисунке 5.

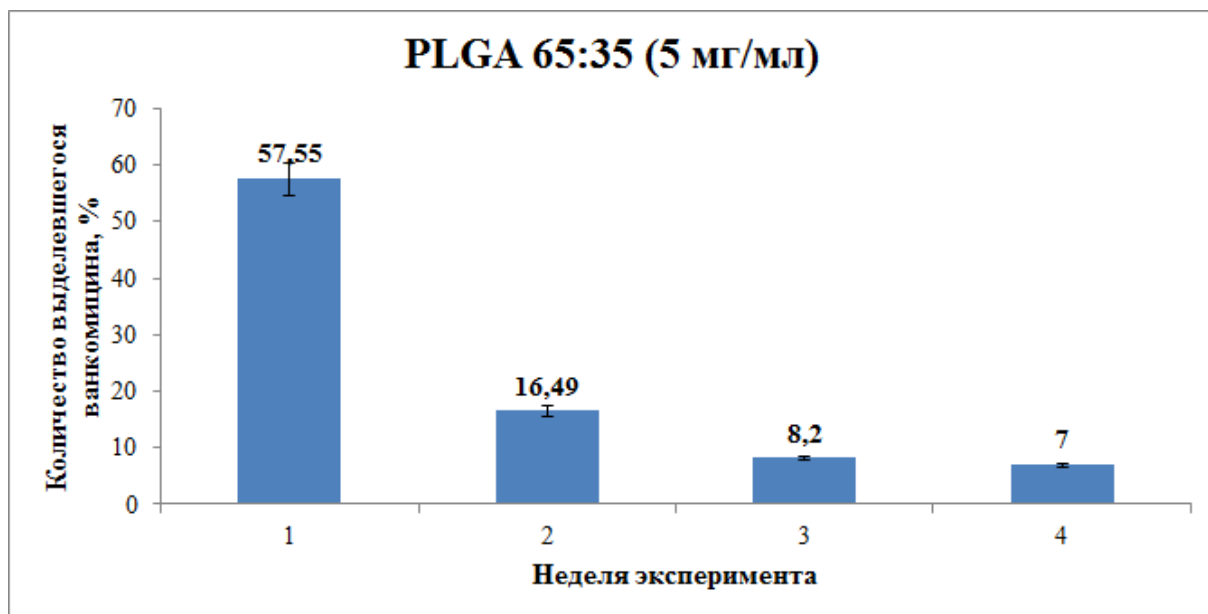


Рисунок 5. Высвобождение ванкомицина в буферный раствор pH=7,4 при моделировании деградации лекарственного покрытия *in vitro* по неделям (1% PLGA, ванкомицин 5 мг/мл), % ($M \pm m$, n=5)

Результаты исследования показали, что выход ванкомицина в буферный раствор за первую неделю составил 57,55%, за вторую – 16,49%, за третью и четвертую недели – 8,2% и 7%. На рисунке видно, что максимальный выход препарата наблюдался в первую неделю, а на 3 и 4 неделях количество вышедшего препарата в раствор заметно снизилось.

Высвобождение ванкомицина в фосфатный буферный раствор pH=7,4 при моделировании деградации лекарственного покрытия *in vitro*, изготовленного из 1% PLGA (65:35), содержащего ванкомицин в концентрации 8 мг/мл представлен на рисунке 6.

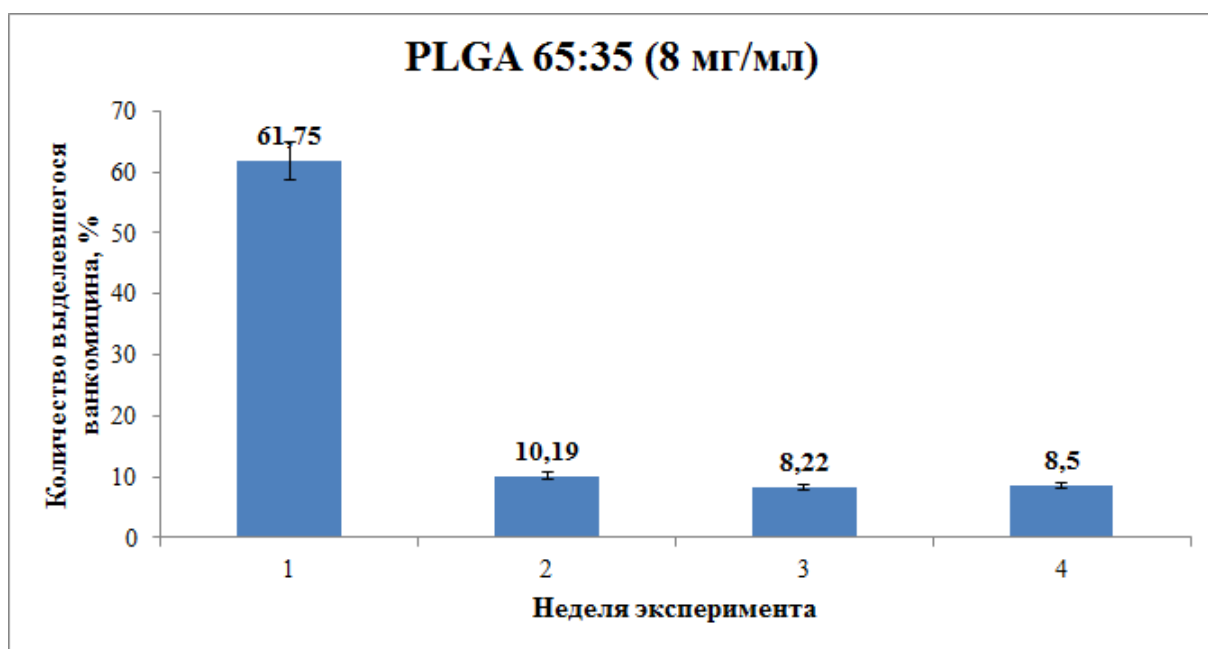


Рисунок 6. Высвобождение ванкомицина в буферный раствор pH=7,4 при моделировании деградации лекарственного покрытия in vitro по неделям (1% PLGA, ванкомицин 8 мг/мл), % ($M \pm m$, n=5)

Результаты исследования показали, что выход ванкомицина в буферный раствор за первую неделю составил 61,75%, за вторую – 10,19%, за третью и четвертую недели – 8,22% и 8,5% соответственно. На рисунке видно, что максимальный выход препарата наблюдался в первую неделю, а на 3 и 4 неделях количество вышедшего препарата в раствор заметно снизилось.

Высвобождение ванкомицина в фосфатный буферный раствор pH=7,4 при моделировании деградации лекарственного покрытия in vitro, изготовленного из 1% PLGA (65:35), содержащего ванкомицин в концентрации 10 мг/мл представлен на рисунке 7.

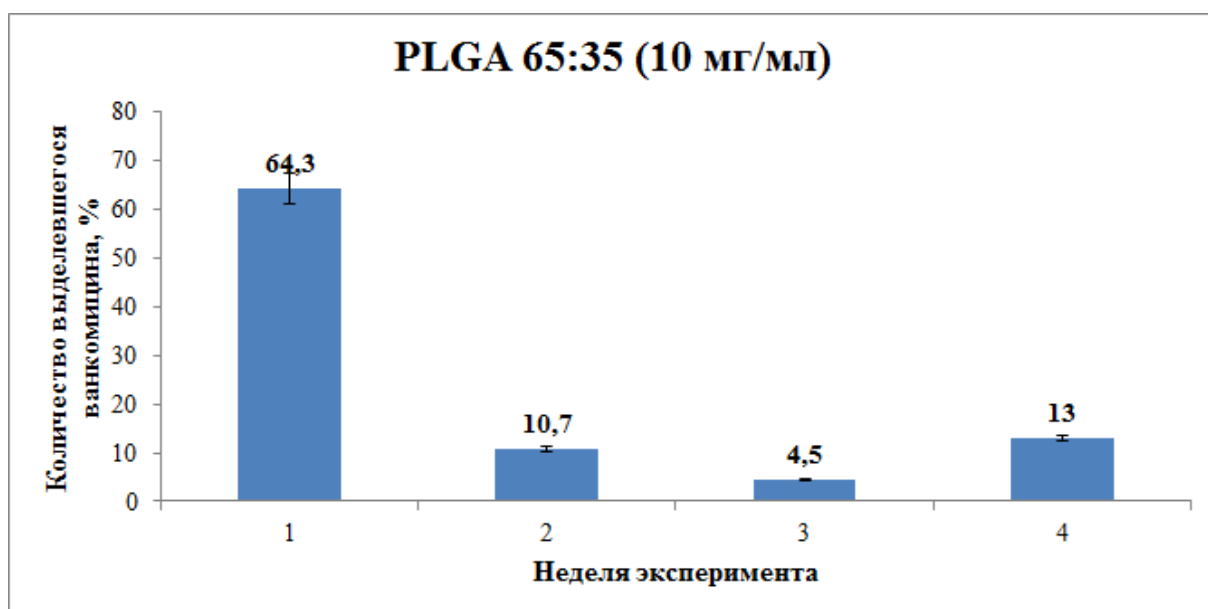


Рисунок 7. Высвобождение ванкомицина в буферный раствор $pH=7,4$ при моделировании деградации лекарственного покрытия *in vitro* по неделям (1% PLGA, ванкомицин 10 мг/мл), % ($M \pm m$, $n=5$)

Результаты исследования показали, что выход ванкомицина в буферный раствор за первую неделю составил 64,3%, за вторую – 10,7%, за третью и четвертую недели – 4,5% и 13% соответственно. На рисунке видно, что максимальный выход препарата наблюдался в первую неделю, а на 3 и 4 неделях количество вышедшего препарата в раствор заметно снизилось.

При оценке эффективности применения ванкомицина в качестве антибактериального покрытия учитывается суммарный выход лекарственного препарата из антибактериального покрытия в модельную среду.

График суммарного выхода ванкомицина в буферный раствор при деградации покрытия изготовленного из 1% раствора PLGA (65:35), содержащего ванкомицин в концентрации 5 мг/мл представлен на рисунке 8.

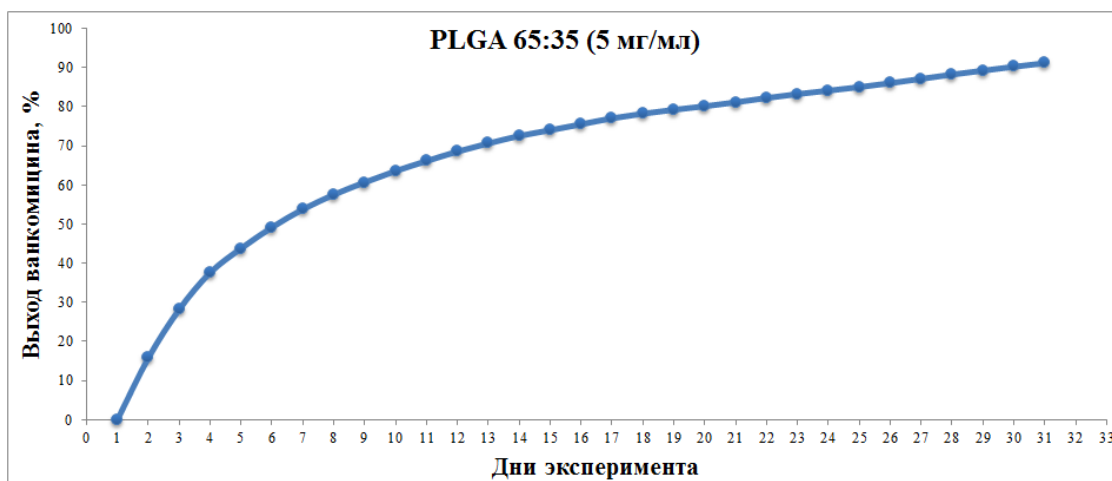


Рисунок 8. Суммарный выход ванкомицина в буферный раствор при деградации покрытия изготовленного из 1% раствора PLGA в хлороформе, содержащего ванкомицин в концентрации 5 мг/мл, % ($M \pm m$, $n=5$)

Согласно результатам исследования, суммарный выход ванкомицина из лекарственного покрытия за 30 дней составил 91,16% от первоначального содержания.

График суммарного выхода ванкомицина в буферный раствор при деградации покрытия изготовленного из 1% раствора PLGA (65:35), содержащего ванкомицин в концентрации 8 мг/мл представлен на рисунке 9.

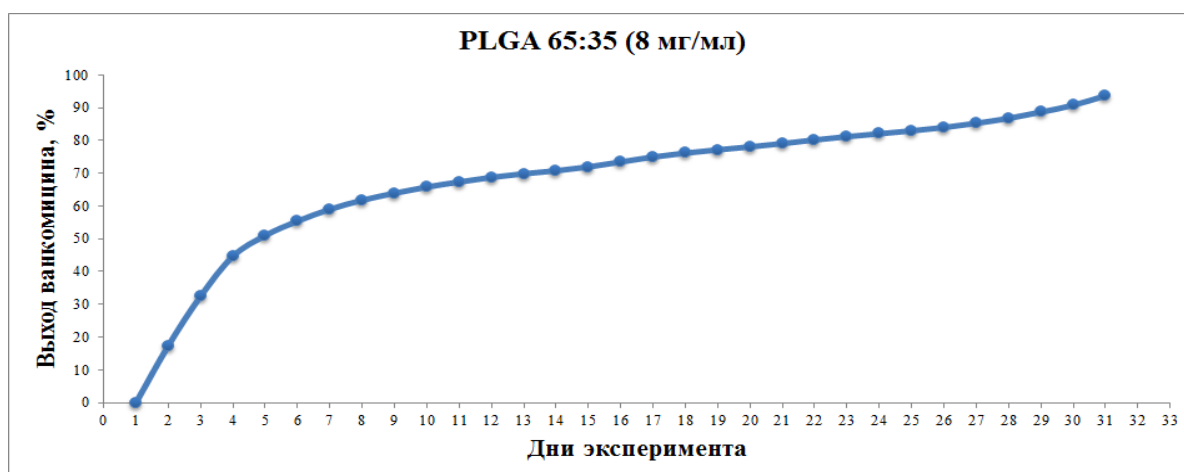


Рисунок 9. Суммарный выход ванкомицина в буферный раствор при деградации покрытия изготовленного из 1% раствора PLGA в хлороформе, содержащего ванкомицин в концентрации 8 мг/мл, % ($M \pm m$, $n=5$)

Согласно результатам исследования, суммарный выход ванкомицина из лекарственного покрытия за 30 дней составил 93,66% от первоначального содержания.

График суммарного выхода ванкомицина в буферный раствор при деградации покрытия изготовленного из 1% раствора PLGA, содержащего ванкомицин в концентрации 10 мг/мл представлен на рисунке 10.

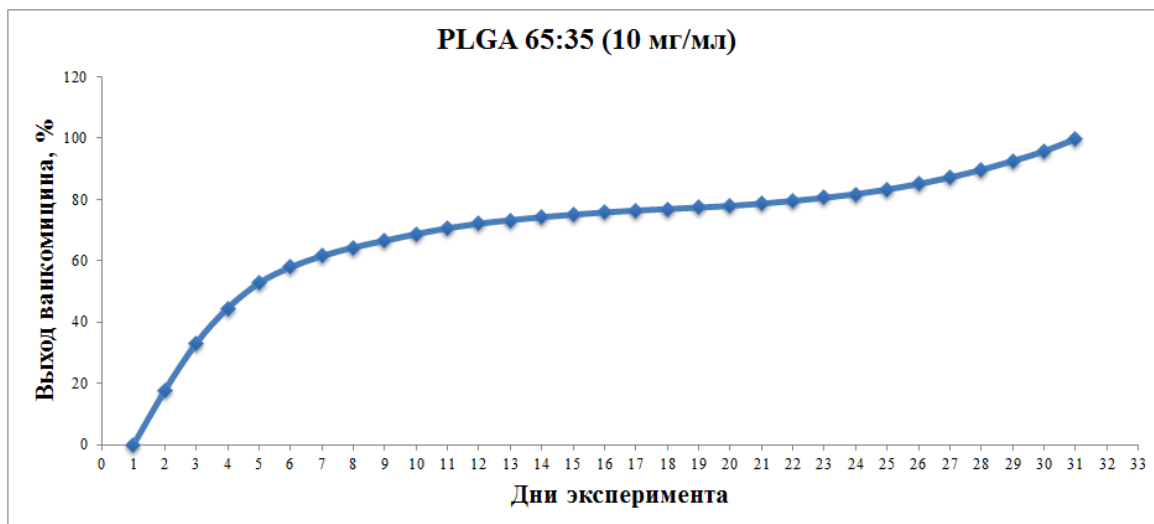


Рисунок 10. Суммарный выход ванкомицина в буферный раствор при деградации покрытия изготовленного из 1% раствора PLGA в хлороформе, содержащего ванкомицин в концентрации 10 мг/мл, % ($M \pm m$, $n=5$)

Согласно результатам исследования, суммарный выход ванкомицина из лекарственного покрытия за 30 дней составил 99,7% от первоначального содержания.

Таким образом, суммарный выход лекарственного препарата зависит от концентрации ванкомицина в антибактериальном покрытии и повышается при увеличении концентрации лекарственного препарата.

3.2 Оценка антибактериального действия лекарственного препарата

Для подтверждения эффективности лекарственного покрытия проводили анализ антибактериального действия препарата диско-диффузионным методом.

Изготовление покрытия манжеты «Протезов клапанов сердца с двумя поворотными створками из пироуглерода с супрааннулярными и интрааннулярными формами манжет с антитромбогенными и антибактериальными покрытиями «МЕДИНЖ» проводили согласно технологической инструкции МИ.25000.00416, согласно требованиям ТУ-9444-006-27771122-2003 в лаборатории ЗАО НПП «МедИнж».

Спектр антибиотического действия проверяли с использованием различных микроорганизмов, выращенных на средах обогащения и обычных средах:

- Бактерии *Pseudomonas aeruginosa*
- Бактерии *Staphylococcus aureus*
- Бактерии *Enterococcus faecalis*
- Бактерии *Staphylococcus epidermidis*
- Бактерии *Streptococcus pneumoniae*
- Бактерии *Escherichia coli*

Аппликация образцов манжет проводилась на поверхность агара Мюллера-Хинтон, инокулированного тестовыми культурами в концентрации 10^6 КОЕ/мл. На агаризованную среду с культурами пинцетом помещали испытуемые образцы полиэфирной ткани манжет с антитромбогенным и антибактериальным покрытием в форме кругов диаметром 6 мм². Исследования проводили при 37°C. Через 18 часов оценивали результаты исследования и выражали антибиотическую активность как диаметр зоны задержки роста вокруг образца в миллиметрах.

Результаты испытаний антибиотической активности представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Антибиотическая активность ($M \pm m$, $n=5$)

Вид бактериальной культуры	Зона задержки роста, мм		
	PLGA 65:35 (5 мг/мл)	PLGA 65:35 (8 мг/мл)	PLGA 65:35 (10 мг/мл)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	22	21	21
<i>Staphylococcus aureus</i>	21	21	22
<i>Enterococcus faecalis</i>	15	16	13
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	22	22	22
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	16	15	15
<i>Escherichia coli</i>	20	19	20

Согласно результатам исследования, наибольшего подавления роста колоний не наблюдается, лекарственные покрытия с разными концентрациями обладают антибактериальной активностью.

3.3 Результаты гистологических исследований

Для подтверждения эффективности лекарственного покрытия на соответствующих сроках имплантации (1 и 4 недели) выводили животных из эксперимента и проводили забор полиэфирной ткани с прилежащими к имплантату тканями реципиента и их оценка с помощью различных гистологических техник. Оценка состояния окружающих тканей проходила в двух положениях: центр и край. При этом образцы окрашивались двумя способами: гематоксилин-эозином и по методу Вейгерт-Ван-Гизона.

Результаты гистологического исследования после 1 недели имплантации материалов представлены на рисунках 11-14:

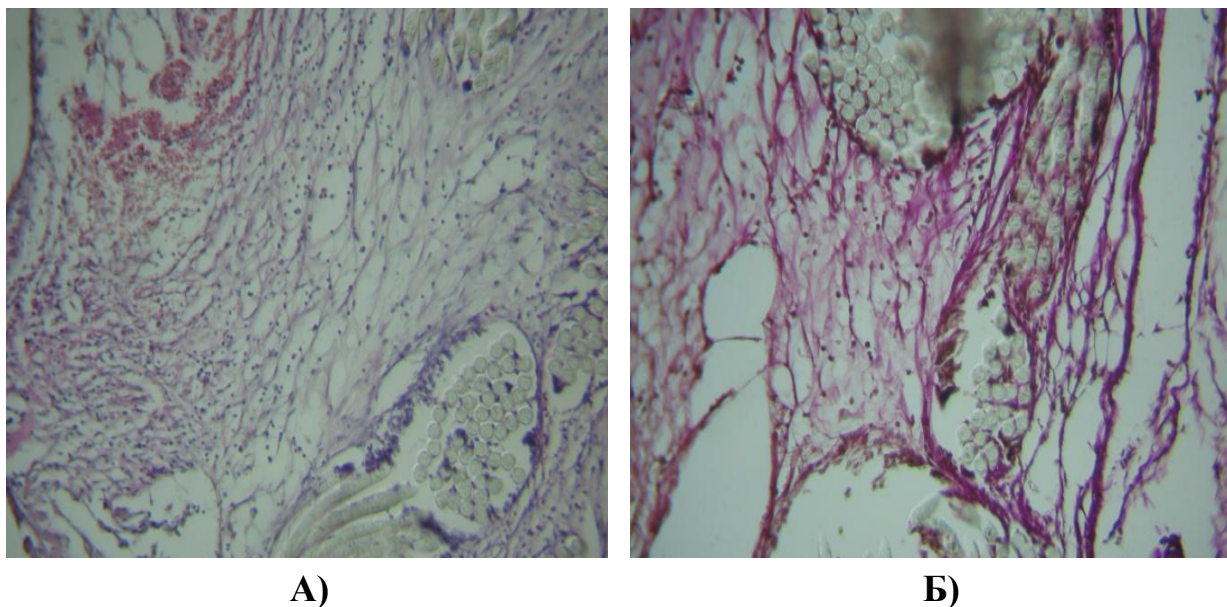


Рисунок 11. Результаты гистологического исследования образцов 1 группы через 1 неделю после имплантации А) окрашивание гематоксилин-эозином, х200; Б) окрашенные по методу Вейгерт-Ван-Гизона, х200

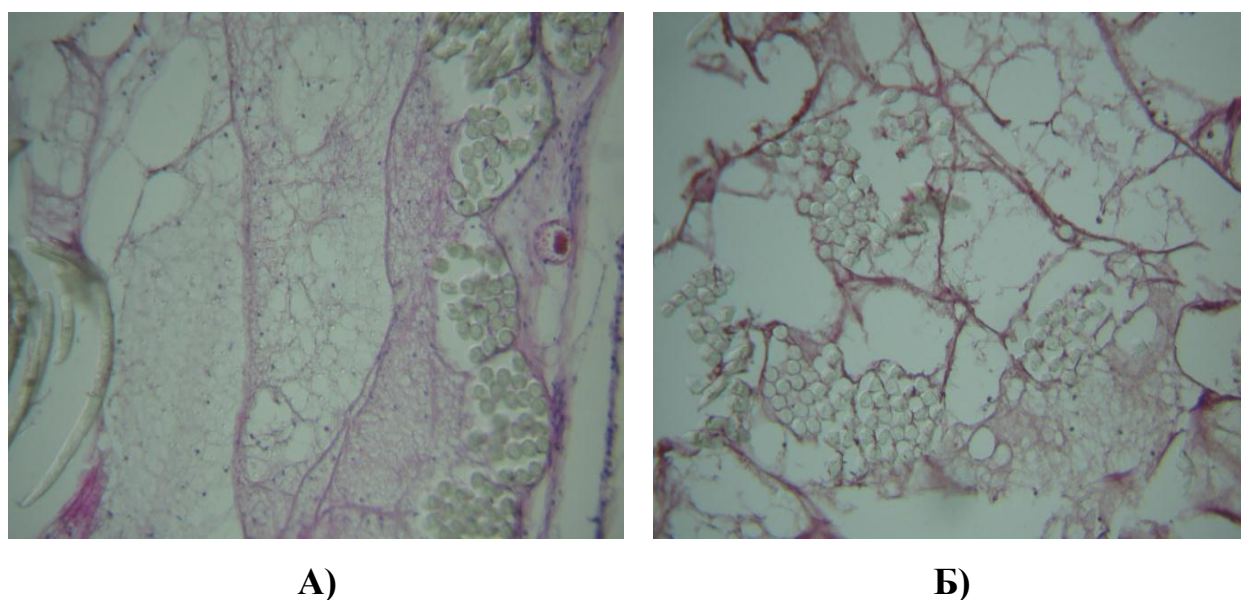
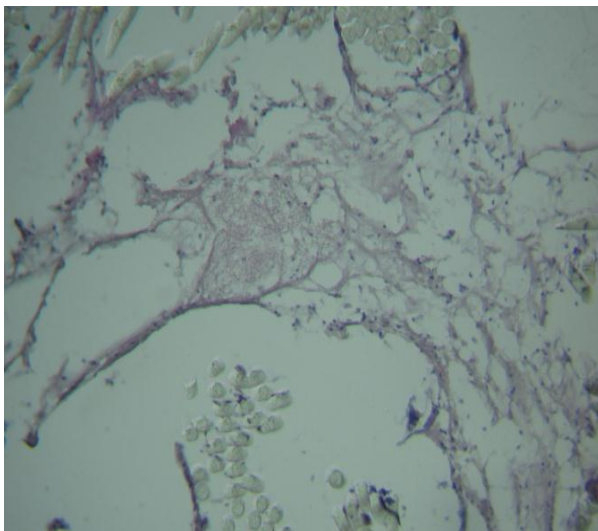
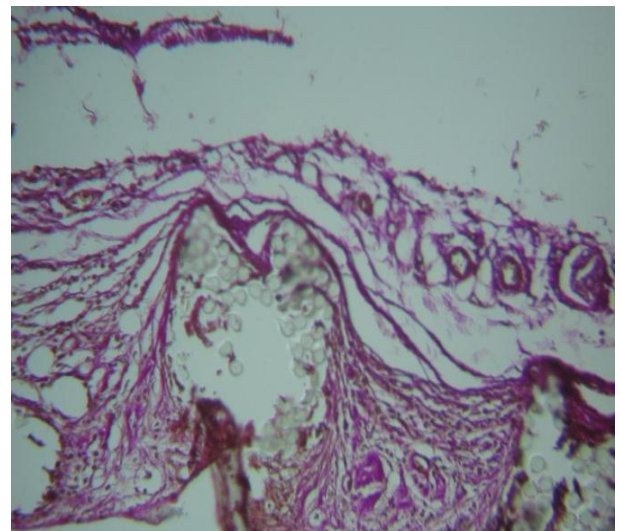


Рисунок 12. Результаты гистологического исследования образцов 2 группы через 1 неделю после имплантации А) окрашивание гематоксилин-эозином, х200; Б) окрашенные по методу Вейгерт-Ван-Гизона, х200

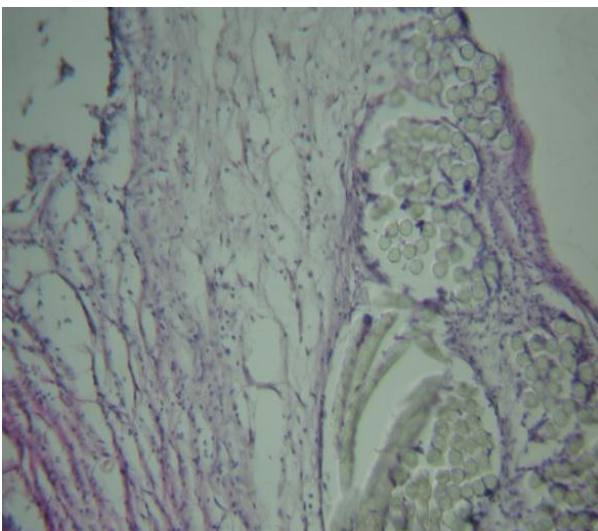


А)

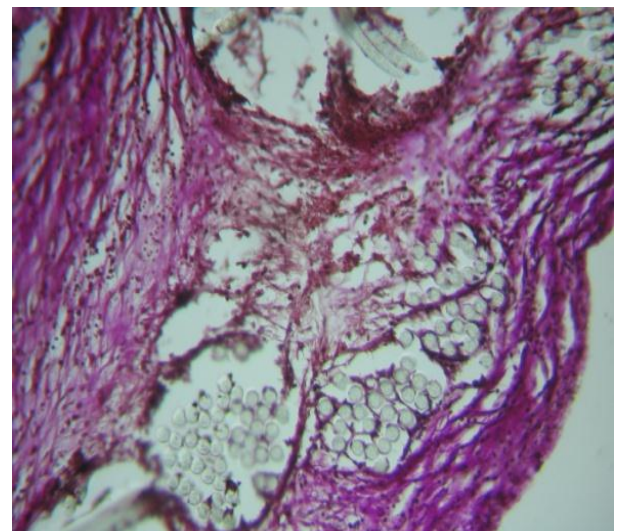


Б)

Рисунок 13. Результаты гистологического исследования образцов 3 группы через 1 неделю после имплантации А) окрашивание гематоксилин-эозином, x200; Б) окрашенные по методу Вейгерт-Ван-Гизона, x200



А)



Б)

Рисунок 14. Результаты гистологического исследования образцов 4 группы через 1 неделю после имплантации А) окрашивание гематоксилин-эозином, x200; Б) окрашенные по методу Вейгерт-Ван-Гизона, x200

Изучение тканевой реакции на имплантацию образцов 1, 2, 3 групп показало, что через 1 неделю после оперативного вмешательства отмечена средне выраженная воспалительная реакция (лимфогистоцитарная

инфильтрация). Наблюдается прорастание соединительной ткани как между пучками волокон, так и между отдельными волокнами полиэфирной ткани. Прирост соединительной ткани вокруг имплантата значительный. Отмечено большое количество новообразованных сосудов, что свидетельствует об успешной регенерации.

Изучение тканевой реакции на имплантацию образцов 4 групп показало, что через 1 неделю после оперативного вмешательства отмечена слабо выраженная воспалительная реакция (лимфогистоцитарная инфильтрация). Наблюдается формирование коллагеновых и эластиновых волокон вокруг имплантата. Прирост соединительной ткани минимальный. Отмечено образование сосудов, что свидетельствует об успешной регенерации.

Результаты гистологического исследования после 4 недель имплантации материалов представлены на рисунках 15-18:

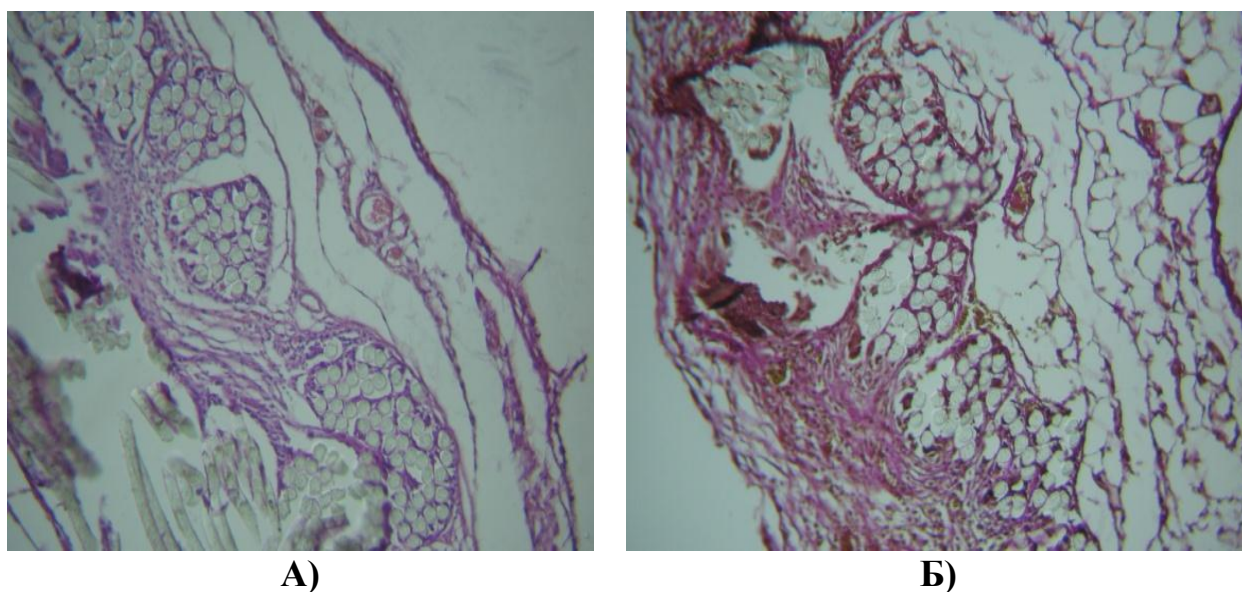
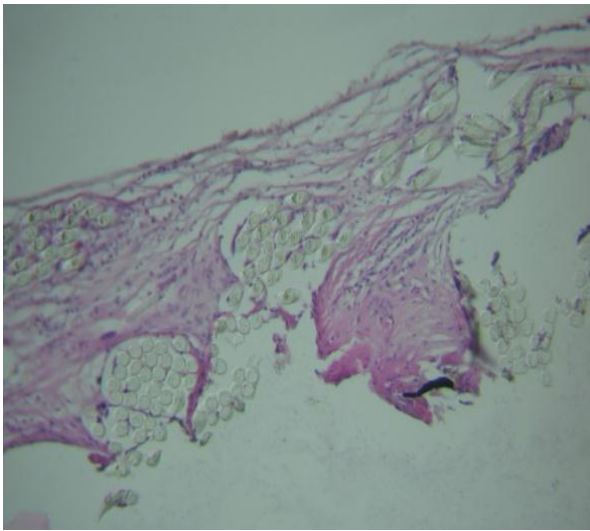
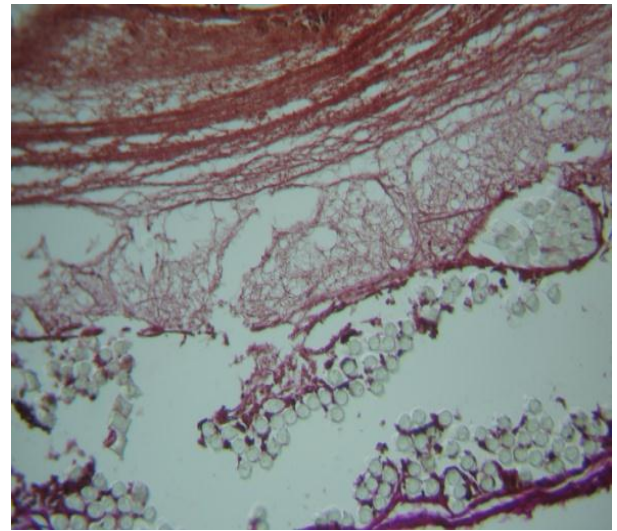


Рисунок 15. Результаты гистологического исследования образцов 1 группы через 4 недели после имплантации А) окрашивание гематоксилин-эозином, x200; Б) окрашенные по методу Вейгерт-Ван-Гизона, x200

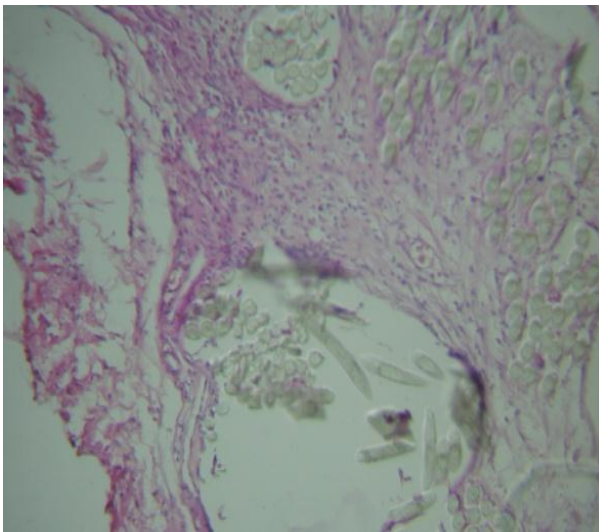


А)

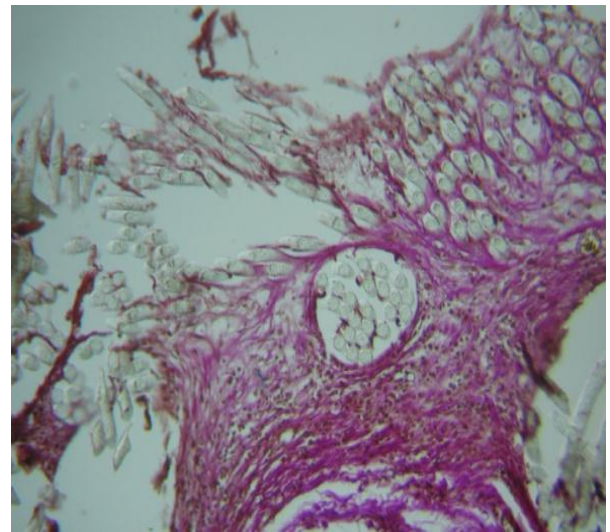


Б)

Рисунок 16. Результаты гистологического исследования образцов 2 группы через 4 недели после имплантации А) окрашивание гематоксилин-эозином, x200; Б) окрашенные по методу Вейгерт-Ван-Гизона, x200

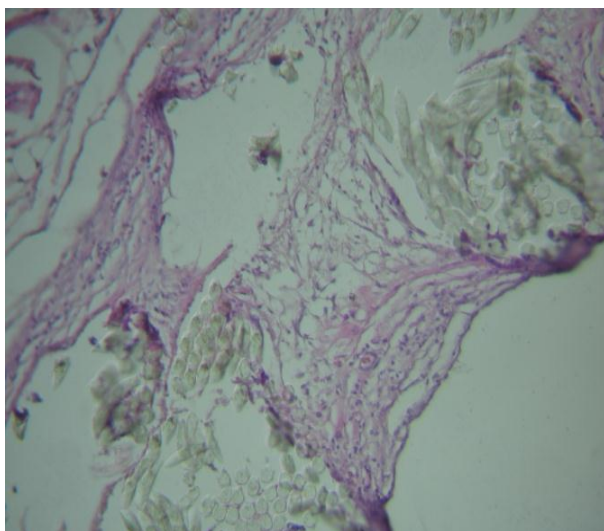


А)

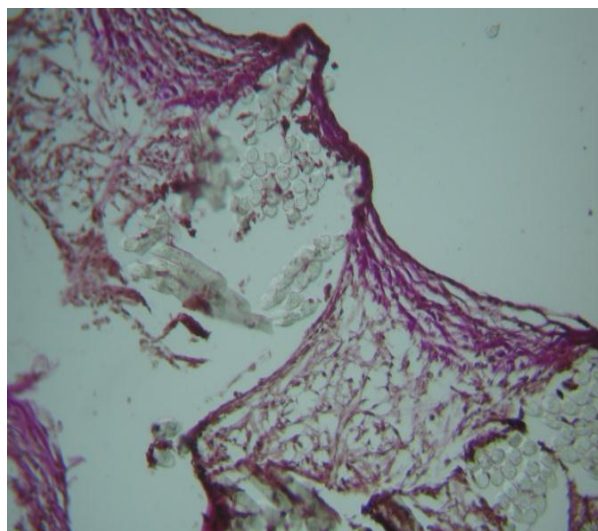


Б)

Рисунок 17. Результаты гистологического исследования образцов 3 группы через 4 недели после имплантации А) окрашивание гематоксилин-эозином, x200; Б) окрашенные по методу Вейгерт-Ван-Гизона, x200



А)



Б)

Рисунок 18. Результаты гистологического исследования образцов 4 группы через 4 недели после имплантации А) окрашивание гематоксилин-эозином, x200; Б) окрашенные по методу Вейгер-Ван-Гизона, x200

Через 4 недели после оперативного вмешательства отмечено отсутствие воспалительной реакции вокруг образцов всех экспериментальных групп. Для 1, 2, 3, 4 групп отмечено прорастание соединительной ткани как между пучками волокон, так и между отдельными волокнами полиэфирной ткани. Прирост соединительной ткани вокруг имплантата незначительный.

Нормальный процесс репарации свидетельствует об отсутствии токсического действия лекарственного покрытия из организма реципиента.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе выполнения бакалаврской работы были разработаны модельные образцы полиэфирной ткани и манжет сердечного клапана с ванкомицинсодержащим лекарственным покрытием. Были изучены профили элюции и суммарный выход ванкомицина в раствор при моделировании деградации лекарственного покрытия *in vitro*. Исследован тканевый ответ организма реципиента на имплантацию образцов, а также изучена антибактериальная активность покрытия.

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

- 1) Разработано лекарственное покрытие манжеты сердечного клапана, обладающее антибактериальным действием.
- 2) Выявлен неравномерный выход ванкомицина в раствор при деградации лекарственного покрытия: максимальный в первые двое суток с последующим снижением интенсивности высвобождения.
- 3) Выявлена зависимость выхода лекарственного препарата от его изначальной концентрации в лекарственном покрытии: при росте изначальной концентрации ванкомицина увеличивается его выход.
- 4) Установлено, что остаточное содержание ванкомицина уменьшается при увеличении его концентрации в лекарственном покрытии.
- 5) Показано, что лекарственное покрытие не вызывает сильно выраженную воспалительную реакцию или отторжение имплантата.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бокерия, Л. А. Механические протезы клапанов сердца. Справочное пособие / Л. А. Бокерия, А. А. Фадеев, О. А. Махачев, А. П. Мельников, И. Э. Бондаренко. – М.: Изд-во НЦССХ им. А. Н. Бакулева РАМН, 2012. – 141 с.
2. Ватутин, Н. Т. Кардиология / Н. Т. Ватутин. – Д.: Каштан., 2008. – 446 с.
3. Волкова, О. В. Основы гистологии с гистологической техникой / О. В. Волкова, Ю. К. Елецкий. – М.: Медицина, 1982. – 304 с.
4. Волова, Т. Г. Материалы для медицины, клеточной и тканевой инженерии / Т. Г. Волова, Е. И. Шишацкая, П. В. Миронов. – К.: ИПК СФУ, 2009. – 262 с.
5. Карпов, Ю. А. Коронарная ангиопластика и стентирование / Ю. А. Карпов, А. Н. Самко, В. В. Буза. – М.: ООО «Медицинское информационное агенство», 2010. – 307 с.
6. Кнышов, В. Н. Инфекционный эндокардит / В. Н. Кнышов, В. Н. Коваленко, А. В. Руденко, А.А. Крикунов, Л. Б. Шолохова, Б. М. Бешляга. – К.: МОРИОН, 2004. – 256 с.
7. Козлов, В. И. Анатомия сердечно-сосудистой системы: учебное пособие для студентов медицинских вузов / В. И. Козлов. – М.: Практическая медицина, 2013. – 192 с.
8. Коршак, В. В. Полимеры в процессах иммобилизации и модификации природных соединений / В. В. Коршак, М. И. Штильман. – М.: Наука, 1984. – 261 с.
9. Лилли, Л. Патофизиология заболеваний сердечно-сосудистой системы / Л. Лилли. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2003. – 598 с.
10. Машковский, М. Д. Лекарственные средства / М. Д. Машковский. – М.: ООО «Издательство Новая Волна», 2005. – 1200 с.

11. Орловский, П. И. Искусственные клапаны сердца / П. И. Орловский, В. В. Гриценко, А. Д. Юхнев, С. В. Евдокимов, В. И. Гавриленков. – М.: «ОЛМА Медиа Групп», 2007. – 464 с.
12. Панарин, Е. Ф. Полимеры — носители биологически активных веществ / Е. Ф. Панарин, Н. А. Лавров, М. В. Соловский, Л. И. Шальнова. – СПб.: Изд-во «Профессия», 2014. – 304 с.
13. Платэ, Н. А. Физиологически активные полимеры / Н. А. Платэ, А. Е. Васильева. – М.: Химия, 1986. – 296 с.
14. Фрид, М. Кардиология в таблицах и схемах / М. Фрид, С. Грайнс. – М.: «Практика», 1996. – 687 с.
15. Штильман, М. И. Имплантаты в сердечно-сосудистой хирургии / М. И. Штильман. – М.: ИКЦ «Академкнига», 2006. – 400с.
16. Ананьева, Е. П. Антимикробная активность полимерных комплексов антибиотика амикацина / Е. П. Ананьева, А. В. Караваева, М. В. Соловский // Проблемы медицинской микологии. – 2014. – № 4. – С. 22-25.
17. Бобков, В. В. Медико-биологические испытания протезов малого диаметра из ePTFE с гемосовместимым самогепаринизируемым покрытием, аффинным к гепарину / В. В. Бобков, Е. А. Немец, Э. К. Гасанов, В. Т. Василенко, Е. В. Сагалова, В. А. Муха, Д. В. Шумаков // Московский хирургический журнал. – 2010. – № 2. – С. 8-10.
18. Бураковский, В. И. Трансплантация сердца / В. И. Бураковский, Л. А. Бокерия // Сердечно-сосудистая хирургия. – 1989. – С.589-598.
19. Дземешкевич, С. Л. Антикоагулянтная терапия у пациентов с клапанными пороками сердца. / С. Л. Дземешкевич, Е. П. Панченко // РМЖ. – 2001. – № 9. – С. 27-30.
20. Казайкин, В. Н. Определение концентрации ванкомицина в витреальной полости для оптимизации лечения острых бактериальных послеоперационных эндофтальмитов / В. Н. Казайкин, В. О. Пономарев, А. С. Вохминцев, И. А. Вайнштейн // Практическая медицина. – 2016. – № 2. – С. 85-89.

21. Кропачева, Е. С. Непрямые антикоагулянты в практике кардиолога и терапевта / Е. С. Кропачева, Е. П. Панченко // Клиницист. – 2006. – № 1. – С. 45-49.

22. Кузьмишин, Л. Е. Применение эндопротезов клапанов сердца и эндопротезов сосудов в качестве технических средств реабилитации и услуг, предоставляемых инвалиду / Л. Е. Кузьмишин, М. П. Баньковская // Медико-социальные проблемы инвалидности. – 2012. – № 2. – С. 15-21.

23. Марцевич, С. Ю. Варфарин и его значение в эру новых оральных антикоагулянтов. Вопросы контроля эффективности и безопасности лечения / С. Ю. Варфарин, Ю. В. Лукина // Рациональная фармакотерапия в кардиологии. – 2017. – № 5. – С. 699-705.

24. Сидоренко, С. В. Ванкомицин – перспективы применения в XXI веке / С. В. Сидоренко, И. А. Гучев, Е. В. Мелехина // Клиническая фармакология и терапия. – 2009. – № 2. – С. 16-23.

25. Тюрин, В. П. Антибактериальная терапия инфекционного эндокардита / В. П. Тюрин, Ю. Г. Тихонов // Клинич. микробиол. и антимикроб. химиотерапия. – 2000. – № 2. – С. 31-39.

26. Фоякин, А. В. Клиническая кардиология: диагностика и лечение / А. В. Фоякин, Л. А. Бокерия, Е. З. Голухова – М.: НЦССХ им. А.Н. Бакулева РАМН, 2011. – 1711 с.

27. Цеханович, В. Н. Инфекционный эндокардит протезированного клапана: клинико-лабораторные и морфологические особенности, значение комплексной эхокардиографии в диагностике / В. Н. Цеханович, М. В. Мильченко, Е. И. Ярославская, В. А. Федоров, М. Н. Тюканов, А. В. Тимошенко, С. Ф. Иванова, Л. В. Шохина // Патология кровообращения и кардиохирургия. – 2008. – № 1. – С. 69-74.

28. Чи, Х. Л. Стенты с лекарственным покрытием / Х. Л. Чи, У. П. Серруйз // Международный журнал интервенционной кардиоангиологии. – 2003. – № 1. – С. 9-18.

29. Штильман, М. И. Полимеры медико-биологического назначения / М. И. Штильман // Высокомолекулярные соединения. Серия А. – 2010. – № 9. – С. 1551-1569.
30. Штильман, М. И. Биоматериалы – важное направление биомедицинских технологий / М. И. Штильман // Вестник РГМУ. – 2016. – № 5. – С. 4-15.
31. Chastre, J. Early infective endocarditis on prosthetic valves / J. Chastre, J. L. Trouillet // Eur. Heart J.. – 1995. – Vol. 16. – P. 32-38.
32. Drachman, D. E. Neointimal thickening after stent delivery of paclitaxel: change in composition and arrest of growth over six months / D. E. Drachman, E. R. Edelman, P. Seifert // J Am Coll Cardiol. – 2000. – Vol. 36. – P. 2325-32.
33. Farb, A. Pathological analysis of local delivery of paclitaxel via a polymer-coated stent / A. Farb, P. F. Heller, S. Shroff, et al. // Circulation. – 2001. – Vol. 104. – P. 473-9.
34. Heldman, A. W. Paclitaxel stent coating inhibits neointimal hyperplasia at 4 weeks in a porcine model of coronary restenosis / A. W. Heldman, L. Cheng, G. M. Jenkins, et al. // Circulation. – 2001. – Vol. 103. – P. 2289-95.
35. Hogevis, H. Epidemiologic aspects of infective endocarditis in an urban population. A 5-year prospective study. / H. Hogevis, L. Olaison, R. Andersson. et al. // Medicine (Baltimore). – 1995. – Vol. 74 (6). – P. 324-339.
36. Horstkotte, D. Transcatheter umbrella closure of valvular and paravalvular leaks. / D. Horstkotte, C. Piper, R. Niehues. et al. // Eur. Heart J. – 1995. – Vol. 16. – P. 39-47.
37. Hwang, C.W. Physiological transport forces govern drug distribution for stent-based delivery / C.W. Hwang, D. Wu, S. Abdel-Ghany, E.R. Edelman // Circulation. – 2001. – Vol. 104. – P. 600-5.
38. Kulik, A. Early postoperative anticoagulation after mechanical valve replacement: a Canadian survey / A. Kulik, F. D. Rubens, D. Baird // Journal of Heart Valve Disease. – 2006. – Vol. 15(4). – P. 581– 587.

39. Mahesh, B. Prosthetic valve endocarditis / B. Mahesh, G. Angelini, M. Caputo. et al. // Ann. Torac. Surg. – 2005. – Vol. 80 (3). – P. 1151.

40. Nojiri, C. Anastomic intimal hyperplasia: mechanical injury or fl ow induced / C. Nojiri, S. White, S. Gladov et al. // J Vasc.Surg. – 1992. – Vol. 4. – P. 806–815.

41. Sousa, J. E. Lack of Neointimal Proliferation After Implantation of Sirolimus-Coated Stents in Human Coronary Arteries: A Quantitative Coronary Angiography and Three-Dimensional Intravascular Ultrasound Study / J. E. Sousa, M. A. Costa, A. Abizaid, et al. // Circulation. – 2001. – Vol. 103. – P. 192-195.

42. Sousa, J. E. Sustained Suppression of Neointimal Proliferation by Sirolimus-Eluting Stents: OneYear Angiographic and Intravascular Ultrasound Follow-Up / J. E. Sousa, M. A. Costa, A. Abizaid, et al. // Circulation. – 2001. – Vol. 104. – P. 2007-11.

43. Unger, F. Standards and Concepts in Valve Surgery. / F. Unger, W. Rainer, D. Horstkotte // AsianCardiovascThoracAnn. – 2000. – Vol. 8. – P. 294-301.

44. Whelan, D. M. Mechanisms of drug loading and release kinetics / D. M. Whelan, H. M. van Beusekom, W. J. Giessen // Semin Interv Cardio. – 1998. – Vol. 3. – P. 127-31.

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

ПЕНЗЕНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

Факультет
физико-математических
и естественных наук

Кафедра
«Общая биология и биохимия»

Направление подготовки
06.03.01 Биология
Профиль подготовки «Биохимия»

Утверждаю:
Зав. кафедрой
Карпова Г.А. Карпова
« 01 » 11 2017 г.

Задание

По ВКР студента Рожковой Анастасии Дмитриевны

Тема работы: «Разработка лекарственного покрытия манжеты сердечного
клапана».

Утверждена приказом по Университету от « 31 » 10 201 7 г. № 1096 а/о

Срок сдачи студентом законченной работы « 25 » март 201 8 г.

КАЛЕНДАРНЫЙ ПЛАН ВКР

№ п/п	Перечень подлежащих разработке вопросов:	Сроки выполнения этапов	Примечания
1.	Собеседование с научным руководителем, обсуждение темы и структуры ВКР, формулировка цели, задач	ноябрь 2017	Выполнено
2.	Поиск научной, справочной литературы по теме ВКР, анализ современных научных достижений в области исследования по теме ВКР	ноябрь - декабрь 2017	Выполнено
3.	Составление библиографического списка изученной литературы	ноябрь - декабрь 2017	Выполнено
4.	Поиск и изучение методов исследования в рамках ВКР	ноябрь - декабрь 2017	Выполнено
5.	Подготовка главы «Обзор литературы»	ноябрь - декабрь 2017	Выполнено
6.	Подготовка главы «Материалы и методы исследования»	декабрь 2017	Выполнено
7.	Составление плана проведения эксперимента, подготовка к выполнению эксперимента	декабрь - март 2017-2018	Выполнено
8.	Подготовка экспериментальных образцов	декабрь - март 2017-2018	Выполнено
9.	Моделирование деградации лекарственного покрытия	декабрь - март 2017-2018	Выполнено
10.	Определение начального и остаточного количественного содержания лекарственного препарата	декабрь - март 2017-2018	Выполнено
11.	Определение содержания лекарственного препарата в инкубационной среде	декабрь - март 2017-2018	Выполнено
12.	Определить антибактериальный эффект лекарственного покрытия	декабрь - март 2017-2018	Выполнено
13.	Обработка и анализ полученных результатов эксперимента. Собеседование с научным руководителем	декабрь - март 2017-2018	Выполнено
14.	Оформление результатов исследования в виде графиков	декабрь - март 2018	Выполнено
15.	Подготовка главы «Результаты исследования и их обсуждение»	декабрь - март 2017-2018	Выполнено
16.	Итоговое оформление ВКР	апрель - май 2018	Выполнено
17.	Подготовка презентации на защиту ВКР, подготовка к защите ВКР	май 2018	Выполнено

Дата выдачи задания « 01 » 11 2017 г.

Руководитель _____

Задание принял к исполнению _____