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 СПОСОБА ОБРАБОТКИ ПОЛИЭФИРНОЙ ТКАНИ ДЛЯ ИЗГОТОВЛЕНИЯ МАНЖЕТЫ СЕРДЕЧНОГО КЛАПАНА»

Студент _____ Луконина Светлана Александровна

Научный руководитель _____ Кручинина А.Д.

Нормоконтролёр _____ Кручинина А.Д.

Работа допущена к защите (протокол заседания кафедры от 13.06.17 №14)

Заведующий кафедрой _____ Карпова Г.А.

Работа защищена с отметкой отлично (протокол заседания ГЭК от 20.06.17 № 12)

Секретарь ГЭК _____ Кручинина А.Д.

Пенза, 2017

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ……3

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ ……....5

1.1 Сердечно-сосудистая система…….5

1.1.1 Сердечные клапаны……5

1.1.2 Биологические искусственные клапаны……..7

1.1.3 Механические искусственные клапаны……...8

1.1.4 Полимерные искусственные клапаны……..…….....10

1.2 Синтетические материалы в хирургии……..11

1.2.1 Полиэфирное волокно……..……13

1.3 Антипролиферативные препараты……14

1.3.1 Сиролимус……...……..15

1.4 Типы транспортных систем на основе полимерных носителей…….16

1.5 Полимеры для доставки лекарственных препаратов.....18

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ …….……22

2.1 Подготовка образцов к исследованию……..22

2.2 Моделирование деградации антипролиферативного покрытия в условиях in vitro……..23

2.3 Исследование профиля элюции сиролимуса……24

2.4 Подкожная имплантация образцов животным……24

2.5 Гистологическое исследование……..26

2.6 Методы статистической обработки результатов……..28

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ…...29

3.1 Результаты деградации антипролиферативного покрытия in vitro…29

3.2 Результаты гистологических исследований……37

ЗАКЛЮЧЕНИЕ…….……..46

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ……..….47

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ……....48

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. Сердечно-сосудистая система обеспечивает все жизненно важные функции организма. Главные компоненты сердечно-сосудистой системы: кровь, кровеносные сосуды и сердце; их согласованное функционирование обеспечивает доставку к тканям кислорода и необходимых питательных веществ, удаление продуктов обмена, контроль всех многочисленных функций через эндокринную систему и терморегуляцию. Заболевание или отказ любой из составляющих частей сердечно-сосудистой системы может иметь катастрофические последствия, включая необратимые изменения в органах и тканях, нарушение функций мозга, остановку сердца и смерть. Заболевания сердечно-сосудистой системы уже долгое время занимают первое место, и на них приходится свыше 40 % всех случаев смерти [6].

Одной из существенных причин смерти кардиохирургических больных являются нарушения функций клапанов сердца. Ежегодно выполняются десятки тысяч операций по протезированию клапанов сердца с врожденными и приобретенными пороками. Существует два основных типа протезов клапана – механические и биологические искусственные клапаны сердца (ИКС). На успешную имплантацию и регенерацию оказывает существенное влияние подбор адекватного материала для изготовления биоискусственных конструкций [19].

Уже первые клинические наблюдения и изучение результатов после имплантации искусственных клапанов показали, что они далеко не безразличны для больного и 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.

Искусственные клапаны сердца компании ЗАО НПП «МедИнж» успешно зарекомендовали себя на рынке медицинских изделий. Однако исследования последних лет выявили в некоторых случаях активное обрастание манжеты клапана соединительной тканью, что может ухудшать работу медицинского изделия, снижая срок его эксплуатации. В настоящее время ведется активная работа по улучшению характеристик существующих медицинских изделий и разработке новых. В связи с этим актуальным является разработка антипролиферативного покрытия полиэфирной ткани манжеты с целью подавления избыточной пролиферации клеток тканей, прилежащих к протезу, и снижения рисков осложнений после имплантации клапана.

В современной медицине в качестве препаратов, подавляющих деление клеток, широкое применение находят иммунодепрессанты (сиролимус, эверолимус, зотаролимус) и цитостатики (паклитаксел). С целью дозированного локального высвобождения лекарственного препарата используют биодеградируемые полимеры (PLA, PGA и PLGA).

Целью данной работы является разработка антипролиферативного покрытия полиэфирной ткани для манжеты сердечного клапана.

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

1)Провести анализ литературных источников по теме исследования;

2)Подготовить модельные образцы полиэфирной ткани с различным антипролиферативным покрытием;

3)Изучить профили элюции сиролимуса при моделировании деградации антипролиферативного покрытия in vitro;

4)Исследовать остаточное содержание сиролимуса в образцах;

5)Оценить тканевую реакцию на имплантаты с помощью различных гистологических техник.

Бакалаврская работа написана на 53 листах, содержит 26 рисунков и список литературы на русском и английском языках из 49 источников.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Сердечно-сосудистая система

Центральным органом сердечно-сосудистой системы является сердце, которое сокращаясь, перекачивает кровь по организму. Оно состоит из четырех камер, работающих, как две независимые системы насосов: левое предсердие и левый желудочек, и правое предсердие и правый желудочек. Левый желудочек прокачивает кровь через аорту (артерию) и обеспечивает циркуляцию крови по артериям. Клетки извлекают из крови питательные вещества и O_2 и выделяют в нее отходы и CO_2. Обедненная кислородом кровь возвращается в правое предсердие (через венозную систему) и переходит в правый желудочек. Правый желудочек перекачивает кровь через легочную артерию к легким, где кровь насыщается кислородом, а CO_2 высвобождается. Эта насыщенная кислородом кровь перетекает в левое предсердие, а оттуда в левый желудочек, и цикл повторяется. Предсердия сокращаются одновременно, то же делают и желудочки, но с небольшой задержкой. Таким образом, предсердия перекачивают кровь в желудочки, после чего желудочки перекачивают кровь по артериям. Фаза наполнения кровью левого желудочка носит название диастолы, тогда как фазу сокращения желудочка (т.е. момент, когда желудочки качают кровь) называют систолой. Правая сторона сердца качает кровь к легким при среднем систолическом давлении около 15-20 мм рт.ст., левая сторона сердца работает при более высоком среднем систолическом давлении – около 120 мм рт.ст.

1.1.1 Сердечные клапаны

Благодаря работе клапанов кровь течет по сердцу в нужном направлении, что обеспечивает снабжение организма насыщенной

кислородом кровью, и попадание крови с высоким содержанием CO_2 к легким.

Полулунные клапаны расположены между выходным протоками желудочков, и крупными артериями, несущими кровь к телу. Это аортальный клапан и клапан легочного ствола, расположенные в выводных трактах аорты и легочной артерии, соответственно (т.е. на левой и правой сторонах сердца, соответственно). Полулунные клапаны состоят из трех створок, которые слипаются, закрывая клапан, или отходят к стенкам сосудов, открывая клапан (пропуская прямой поток). Эти клапаны перекрывают обратный ток крови из артерий в желудочки во время диастолы и пропускают прямой ток крови в артерии во время систолы. У человека клапан имеет три створки, открывающихся в сторону аорты: правую коронарную, левую коронарную и заднюю (некоронарную). Полулунные створки, смыкаясь, перекрывают отверстие, соединяющее аорту и левый желудочек. К створкам прикреплены сухожильные нити, другим концом они крепятся к верхушкам сосочковых мышц. Сами створки крепятся к фиброзному кольцу, которое образует отверстие между аортой и левым желудочком.

Атриовентрикулярные клапаны, а именно митральный и трехстворчатый, находятся с левой и правой стороны сердца, соответственно, между предсердиями и желудочками. Митральный клапан состоит из двух створок, а трехстворчатый – из трех. Атриовентрикулярные клапаны имеют струновидные сухожильные нити, соединяющиеся со стенкой желудочков посредством сосочковых мышц. Эти клапаны препятствуют току крови обратно в предсердия во время диастолы.

Сердечные клапаны состоят из соединительной ткани (коллаген, эластин и глюкозаминогликаны). Существует целый ряд осложнений, приводящих к повреждению сердечных клапанов. С функциональной точки зрения, их можно поделить на два вида: стеноз и регургитацию.

Стеноз имеет место, когда открытый клапан не пропускает кровь в прямом направлении, регургитация – когда обратный ток крови не блокируется закрытым клапаном.

1.1.2 Биологические искусственные клапаны

Сердечные клапаны, изготовленные из натуральных материалов, называют биологическими искусственными клапанами (биопротезами). Они используются в течение последних 25-30 лет. Это могут быть аутогенные трансплантаты (когда легочные клапаны пациента используют для замены ему же клапана аорты), а могут быть ксеногенные, изготавливаемые из тканей домашних животных (свиньи и крупного рогатого скота). Искусственные биологические клапаны, безусловно, имеют более близкую человеку анатомию по сравнению с механическими, благодаря чему не вызывают тромбообразования, наблюдающегося при использовании механических, а, следовательно, не требуется пожизненного применения антикоагулянтных препаратов, и обладают лучшей гемодинамикой. Однако ксенотрансплантатная ткань более подвержена кальцификации и механическим повреждениям, поэтому срок их службы существенно короче, нежели механических протезов [21]. 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 глютаровым альдегидом. Однако фиксация глютаровым альдегидом ускоряет обызвествление, приводящее к отказу клапана. Поэтому сейчас разрабатывают альтернативные методы сохранения ткани путем образования сшивок, в том числе с использованием полиэпокси соединений (например, полиглицидиловый эфир) и фотоокисления в присутствии красителей. Для создания биологических искусственных клапанов используют ткань перикарда быка. Её прикрепляют к металлической или пластиковой рамке и

покрывают синтетическим материалом, например, р-ПТФЭ или дакроном. Их делают трехстворчатыми (чтобы имитировать структуру аортального клапана). Аортальные клапаны свиньи, фиксированные глютаровым альдегидом, также используют для протезирования сердечных клапанов. Основная разница между аортальным клапаном свиньи и клапаном из перикарда быка заключается в том, что створки свиных клапанов имеют естественное соединение с остальным клапаном [18].

1.1.3 Механические искусственные клапаны.

Механические искусственные клапаны стали применять в клинической практике с середины 1950-х гг. С тех пор их конструкции непрерывно совершенствуются; в настоящее время их насчитывается свыше 100. Жесткие элементы клапанов изготавливают из нержавеющей стали, сплавов молибдена; для корпусов и створок используют пиролитический углерод и полиэфируретаны. Первую успешную установку механических клапанов осуществили в 60-х годах 20 века - это были шариковые механические искусственные клапаны. В закрытом положении это была сфера, которую изготавливали из металла или синтетического пластика; во время открытия клапана сфера фиксировалась на металлическом кольце посредством металлической клетки. Тефлоновую пластину прикрепляли к клапану с помощью кольца из нержавеющей стали и стальной проволоки, затем тефлон приклеивали к сердцу. Среди первоначальных улучшений был силиконовый кожух для предотвращения образования тромбов и закупоривания отверстия и использование стальной клетки для уменьшения необходимых размеров. Были разработаны различные варианты такого клапана, например, с раздвинутыми прутьями (т.е. не с закрытой клеткой) и покрытием из ткани дакрон (полиэтилетерефталат). Принцип, лежащий в основе работы этих клапанов, был по существу одним и тем же: шарик открывал и закрывал отверстие в ответ на перепад давления, а клетка удерживала его на месте.

В середине 1980-х гг. стали использовать двустворчатые искусственные клапаны сердца, оборудованные плоскими полудисками, вращающимися на шарнирах. В этом типе ИКС кровь подвержена наименьшему травмированию.

Диски делали из пиролитического углерода, а клетки из сплавов кобальта с хромом или титаном. В дисковом искусственном клапане вместо шарика, удерживаемого на месте, используется диск. В зависимости от разности давлений диск блокирует отверстие или отодвигается от него. Другая конструкция состоит из диска, наклоненного под углом, что делает поток асимметричным; в митральном положении, например, его можно использовать для того, чтобы направлять поток к задней стенке желудочка. У дисковых клапанов есть маленькие ограничители наподобие клеток, контролирующие их движение. Для закрепления клапанов в сердце на механических клапанах устанавливают опорные кольца из дакрона, или р-ПТФЭ (растянутый политетрафторэтилен: одиночное волокно ПТФЭ, растянутое и содержащее около 50% свободного объема).

К механическим поломкам, случающимся с шариковыми механическими искусственными клапанами, относятся залипание шарика между прутьями (из-за набухания шарика) и поломки самих прутьев; у дисковых механических искусственных клапанов возникают похожие проблемы: залипание диска, его неравномерное движение в клетке и износ, приводящий к подтеканию крови.

В современных моделях запирательный элемент (диск) выполнен из силиконового каучука, усиленного титановым кольцом, а также из полиформальдегида полиэтилена сверхвысокой молекулярной массы.

Основные проблемы, связанные с современными механическими искусственными клапанами – это необходимость длительного приема антикоагулянтов (включая риск кровотечения), гемолиз (красных кровяных телец), эндокардит и износ механических клапанов. Считается,

что гемолиз вызывается быстрым закрытием створок клапана, повреждающих красные кровяные тельца; гемолиз может проходить легко, но может и приводить к серьезной анемии. Более тяжелые формы гемолиза, скорее всего, вызываются подтеканием крови либо в результате плохого прикрепления клапана к сердцу, либо в результате износа протеза. Эндокардит – это инфекция ткани сердечного клапана, возникающая при установке искусственного клапана, встречающаяся с частотой менее 0.3% в год в митральном или аортальном положениях. Несмотря на применение антикоагулянтов, у пациентов с искусственными клапанами частота тромбоэмболии (т.е. осложнений, связанных с образованием тромбов и эмболией) является главным аспектом, требующим улучшения. Для снижения таких осложнений необходимо совершенствование используемых при их изготовлении материалов.

Обнадеживающие результаты получены при испытании ИКС с гибкими лепестковыми запирательными элементами, изготовленными из сегментированных полиуретанов. Эндопротезы этого типа выдерживают до 800 млн. циклов открывания – закрывания и характеризуются низкой склонностью к кальцификации. Для снижения риска развития инфекции в конце 1990-х гг. поверхности ИКС покрывали серебром, однако впоследствии было выявлено, что это может приводить к неполному замыванию клапана.

1.1.4 Полимерные искусственные клапаны.

Искусственные аортальные клапаны с гибкими створками были разработаны в 60-х годах 20 века. Они состояли из трех створок из силиконовой резины. Предполагали, что при нанесении на поверхность покрытия, предотвращающего свертывание крови, можно получить искусственные клапаны, которые можно будет с успехом применить в клинической практике. Были разработаны и другие синтетические гибкие клапаны, например, из тефлона. Однако разработанные ранее полимерные

искусственные клапаны страдали недостаточной износостойкостью и вызывали образование тромбов. Недавно возник интерес к разработке полимерных протезов клапанов из полиуретанов. Полиуретаны отличаются хорошей совместимостью с кровью, им можно придавать физиологическую форму, изготавливая гибкие клапаны. Недавно были разработаны искусственные клапаны из синтетического поликарбонатуретана для установки как в аортальное, так и в митрально положения, а также полиэфируретановые искусственные клапаны и клапаны, изготовленные из полиэфируретановых рамок, покрытых полиуретанмочевинным каучуком на основе простых эфиров. Тестирование in vivo, в некоторых случаях проводившееся при отсутствии антикоагулянтов, дает многообещающие результаты, а при тестировании на телятах и овцах такие искусственные клапаны демонстрируют большую износостойкость по сравнению с биологическими [22].

Было высказано предположение, что на обызвествление и износ таких искусственных клапанов может влиять состав полиуретана. Поэтому развитие технологии синтеза полиуретана может в будущем привести к дальнейшим успехам в создании искусственных клапанов. Хочется верить, что такие клапаны смогут объединить в себе преимущества механических и биологических искусственных клапанов и улучшенную износостойкость полимерных, обеспечивающих гидродинамику, близкую к физиологической, и снижение риска образования тромбов [17].

1.2 Синтетические материалы в хирургии

Выбор материала для регенеративной медицины, а также технология изготовления биоконструкций из него зависит от области применения: костная ткань, кровеносные сосуды, кожные покровы, мышечная ткань, нервные волокна. Для успешного использования биоматериал должен обладать определенными химическими, биологическими и механическими

свойствами [36, 39]. К требуемым химическим свойствам можно отнести такие характеристики, как отсутствие вредных химических реакций с тканями организма, а также межтканевыми жидкостями, резорбция с контролируемой скоростью в организме [44]. В качестве материалов для протезирования сердечных клапанов обычно используют натуральные ткани. Альтернативной заменой сердечных клапанов могут служить механические клапаны из пиролитического углерода, а металлические стенты можно применять для поддержания артерий в раскрытом состоянии. Эти материалы - заменители помогают восстановить уровень кровообращения, необходимый для нормальной работы организма.

Один из самых перспективных высокотехнологичных полимеров, обладающий уникальным комплексом свойств – это политетрафторэтилен $(– CF2\ CF2–)_n$. Эти свойства делают его незаменимым в XXI веке, причём не только в космических аппаратах, авиации и военной технике, но и в атомной, энергетической, пищевой, медицинской и других отраслях промышленности.

Синтетические материалы, в основе которых лежит структура политетрафторэтилена (ПТФЭ), находят широкое применение в различных областях хирургии уже более четверти века. Причиной тому являются их хорошие эксплуатационные качества, биологическая совместимость с внутренними средами организма, высокая тромборезистентность.

Молекула ПТФЭ представляет собой полимер, в основе которого лежит фторуглеродная цепь. В качестве боковых радикалов молекулы находятся атомы фтора, что обеспечивает веществу стабильность и высокую устойчивость к различного рода воздействиям.

В 1972 г. Ben Eiseman впервые использовал протез из модифицированного ПТФЭ для пластики кровеносного сосуда. В 2011 году тефлон впервые применён для пластики поврежденной носовой перегородки и стенок околоносовых пазух вместо титановых сеток. Через

12-15 месяцев имплантат полностью растворяется и замещается собственной тканью пациента.

При производстве материалов из ПТФЭ за счет его физической модификации формируется особая структура, в которой островки компактного ПТФЭ толщиной 5-6 нм соединены между собой тонкими волокнами длиной до 10 нм. При этом материал характеризуется эластичностью и достаточно высокой пористостью (объем пустот доходит до 90%), которая сочетается с отсутствием хирургической порозности.

В настоящее время ПТФЭ применяется для изготовления имплантатов для сердечнососудистой и общей хирургии, стоматологии, офтальмологии. Тефлон считается наиболее пригодным материалом для производства искусственных кровеносных сосудов и сердечных стимуляторов [49].

1.2.1 Полиэфирное волокно

Полиэфирное волокно считается самым популярным из искусственных волокон. Такой материал получается благодаря плавлению полиэтилентерефталата (ПЭТ) или же его отдельных составляющих. Полиэфирные волокна получают также на основе химически модифицированного ПЭТ (со-полиэфирные волокна) и в значительно меньших количествах – из поликарбонатов, полиэтиленоксибензоата, поликсилилен-гликольтерефталата, жидкокристаллических полиэфиров. У этого волокна есть несколько весьма полезных свойств: прочность, повышенная степень упругости, низкая теплопроводность, стойкость к воздействию высоких температур. В медицинской сфере полиэфирное волокно применяется в хирургии в качестве шовного материала. Полиэфирное волокно растворимо в крезоле и других фенолах; частично растворяется в конц. H_2SO_4 (выше 83%-ной) и HNO_3, полностью разрушается при кипячении в конц. растворах щелочей, обработке водяным паром при 220°С в течение 1 часа. Устойчиво в ацетоне,

дихлорэтане, к действию окислителей и восстановителей, микроорганизмов.

1.3 Антипролиферативные препараты

Для подавления пролиферации клеток при трансплантации используются такие фармакологические средства как иммунодепрессанты. Число препаратов для иммуносупрессии и их эффективность постепенно увеличиваются. Вместо иммунодепрессантов, которые угнетают целиком активность иммунокомпетентных клеток и ослабляют защитные свойства организма от инфекций и возможного появления злокачественных опухолей, появляются препараты, которые избирательно действуют на отдельные звенья иммунологической реакции отторжения, не угнетая функцию иммунокомпетентных клеток целиком. Усовершенствованная методика иммунодепрессантной терапии позволила более уверенно подавлять реакцию отторжения [12]. Антипролиферативные лекарственные вещества должны обладать широким терапевтическим действием, селективной супрессией пролиферации гладкомышечных клеток без токсического воздействия на клетки медии и адвентиции, низкой провоспалительной активностью, а также способствовать реэндотелизации.

К группе антипролиферативных препаратов также относят препараты группы лимусов – сиролимус, эверолимус, зотаролимус, биолимус А9, миолимус, такролимус [16.].

Препарат эверолимус обладает антипролиферативными свойствами и действует на широкий диапазон клеток, включая сосудистые гладкомышечные клетки, что приводит к блокированию их клеточного цикла пролиферации в фазе G1. Этот эффект опосредован связью с внутриклеточным белком FKBP12 и обусловлен замедлением активации

киназы mTOR [32]. Эверолимус по химическому строению считается аналогом сиролимуса и также обладает иммуносупрессивным действием.

Комбинация ингибирования гладкомышечных клеток и высокая липофильность позволяет предположить наилучшее предотвращение неоинтимальной гиперплазии.

Зотаролимус считается полусинтетическим аналогом сиролимуса, в котором позиция С40 модифицируется тетразольным кольцом, что приводит к уменьшению периода полураспада лекарства. Зотаролимус – первый цитостатический агент, созданный исключительно с целью лекарственного покрытия стентов [14]

Биолимус А9 является аналогом сиролимуса, обладает высокими липофильными свойствами. Механизм его действия также сходен и включает ингибирование пролиферации гладкомышечных клеток и Т-лимфоцитов.

Единственный одобренный антипролиферативный препарат, не относящийся по структуре к лимусном семейству – это паклитаксел. Он достаточно давно применяется в онкологии как один из компонентов химиотерапии рака молочной железы и яичников. Паклитаксель – алкалоид, получаемый из тихоокеанских тисов (Taxus brevifolia), известный противоопухолевый препарат, обладающий мощным антипролиферативным действием. Механизм действия паклитаксела связан с его способностью стимулировать “сборку” микротрубочек из димерных молекул тубулина, стабилизировать их структуру, что нарушает митотическую функцию клетки [25].

1.3.1 Сиролимус

В 1975 году в одном из октябрьских номеров японского журнала J. Antibiot были опубликованы первые две статьи о существовании антибиотика рапамицина (Rapamycin). Работа была посвящена веществу, встречающемуся в природе как продукт жизнедеятельности актиномицет

Streptomyces hydroscopius. Руководитель работы доктор S.N. Sehgal назвал новый антибиотик рапамицином, так как грибок, из которого был выделен названный макролид, был обнаружен в почве на о. Пасха (туземное название – Rapa Nui) [43]. Рапамицин принадлежит к группе макролидных антибиотиков, его молекула имеет довольно сложное строение $C_{51}H_{79}NO_{13}$ [42]. Позднее выяснилось, что препарат обладает антипролиферативными свойствами и подавляет рост раковых опухолей у подопытных животных [33], а благодаря своей иммуносупрессивной активности рапамицин способен ингибировать реакцию отторжения трансплантанта [34]. Сиролимус оказывает мощный антипролиферативный эффект в отношении гладкомышечных клеток и эндотелиоцитов, оказывает цитотостатическое действие и вызывает апоптоз данных клеток [40, 48]. Он взаимодействует с белком FKBP506, который связывается с белком mTOR (мишень рапамицина у млекопитающих). Активированный mTOR блокирует клеточный цикл развития в основном гладкомышечных клеток на этапе перехода из фазы G, в фазу S, а также ингибирует миграцию гладкомышечных клеток в интиму. В настоящее время рапамицин производится американской компанией Wyeth-Ayerst Research и он больше известен под названием «сиролимус» (Sirolimus). Рапамицин не нашел широкого применения в терапии грибковых и онкологических заболеваний, где его первоначально предполагали использовать [43] но, благодаря экспериментальной работе R. Gallo и соавт., получил свое применение в интервенционной кардиологии.

1.4 Типы транспортных систем на основе полимерных носителей

На основе полимерных носителей существует несколько типов транспортных систем: липосомы, полимерные мицеллы, наночастицы, микрокапсулы. [5]

Липосомы представляют собой фосфолипидные капсулы шаровидной формы, размером около 100–150 нм. Основным преимуществом липосом является включение в них гидрофильных и гидрофобных лекарственных веществ [37]. Главный недостаток липосом как лекарственной формы – это нестабильность при хранении и трудность стерилизации. Решением этого недостатка стало появление полимерных липосом.

Полимерные мицеллы представляют собой ассоциаты молекул ПАВ и относятся к группе лиофильных коллоидных систем. Важными преимуществами полимерных мицелл являются их низкая токсичность и высокий выход продукции с четкой степенью разделения. Основным недостатком можно назвать неконтролируемое высвобождение лекарственного вещества [5].

Наночастицы являются наиболее перспективной подгруппой. Они представляют собой универсальную систему для доставки лекарственных веществ, способную преодолевать различные физиологические барьеры и доставлять их к органам [3]. Лекарственные вещества из наночастиц высвобождаются медленно, со скоростью, которую можно контролировать. Выделение лекарственных веществ из наночастиц может происходить как с поверхности наночастицы, так и со всей массы в результате ее распада [46]. Для получения наночастиц выделяют несколько групп полимеров – носителей: 1) модифицированные полисахариды (диальдегидкрахмал), 2) модифицированный альбумин, 3) нанокристаллы. Для повышения защиты от агрегации наночастиц используют биостабилизаторы. Помимо основной функции, их используют для контролирования распределения наночастиц в организме, время нахождения в желудочно-кишечном тракте, а также прилипания к стенкам кишечника (биоадгезия).

Микрокапсулы представляют собой частицы лекарственного вещества, покрытые полимерной оболочкой или полимерным матричным

каркасом, в котором находятся распределенные лекарственные вещества [1]. Появление многокомпонентных полимеров явилось перспективным направлением в совершенствовании препаратов с лекарственным покрытием [10]. Например, BioLinx polymer, разработанный фирмой Медтроник, состоит из 3-х компонентов: полимер СЮ - липофильный (гидрофобный) – контролирует равномерное выделение препарата; полимер С19, гидрофильный, обладает высокой биосовместимостью, а поливинилпиролидон, также гидрофильный полимер, способствует первичному выделению препарата. Сочетание липогидрофильных качеств покрытия способствует высокой биосовместимости и длительному выделению препарата. Однако, основным недостатком полимера Biolinx является его ломкость при механических воздействиях [45]. Развитие технологий, синтез новых типов лекарственных веществ и полимерных покрытий значительно улучшили результаты проводимых эндоваскулярных процедур [4].

1.5 Полимеры для доставки лекарственных препаратов

Полимеры, в зависимости от происхождения, делятся на природные (альбумин, желатин и др.) и синтетические (полистирол, поливиниловый спирт и др.), а по степени биодеградации – на биодеградируемые (полиакрилаты, полимолочная и полигликолевая кислоты и др.) и небиодеградируемые (поливинилы) [20].

Обобщение литературных данных о полимерах показывает, что в настоящее время для создания систем доставки лекарственных веществ, наиболее популярны и исследованы продукты (со)полимеризации молочной и гликолевой кислот (PLA, PGA и PLGA). Они низкотоксичны, обладают хорошей биологической совместимостью с тканями живых организмов, а свойства и скорость деструкции их можно регулировать

содержанием кристаллической фазы и соотношением звеньев мономеров в PLGA [5].

Полимолочная (полиоксипропионовая) кислота (polylactic acid, PLA) представляет собой термопластичный сложный полиэфир, имеет степень кристалличности 37%, при температуре плавления 175–178^0 С. Она может существовать в L и D формах. L форма полимолочной кислоты встречается в природе, а D форму получают синтетическим путем. Время биодеградации в организме у L формы полимолочной кислоты составляет около 2 лет, а у D формы – 12–16 месяцев [20]. Низкая токсичность, превосходная биологическая совместимость и отсутствие воспалений при контакте с живыми организмами, а также хорошие механические свойства делают полимолочную кислоту привлекательной для фармацевтической промышленности [2, 29].

Полигликолевая кислота (polyglycolic acid, PGA), как и полимолочная кислота, представляет собой жесткий термопластичный полимер с высокой степенью кристалличности (46-50%). Она обладает высокой температурой плавления (около 225^{0}С), поэтому ее растворимость в органических растворителях ограничена [15]. По некоторым данным, в отличие от молочной кислоты, гликолевая в организме превращается не в углекислый газ и воду, а с помощью гликолятоксидазы – в глиоксиловую кислоту. После реакции с глицинтрансамилазой последняя превращается в глицин. В зависимости от объема и формы получаемого продукта полный распад в организме наблюдается в течение 4–6 недель, благодаря чему не требует удаления после операции, т.е. отсутствуют дополнительные травмы для прооперированной области, и нити не оказывают негативного влияния на окружающие ткани организма [46]. Хотя гликолевая кислота и усваивается организмом, но при больших концентрациях она способна повреждать ткани, что вызывает местные воспалительные реакции[35].

Высокомолекулярные формы нерастворимы в большинстве органических растворителей, таких как этилацетат, ацетон, хлороформ.

Однако, формы с низким молекулярным весом обладают другими физическими свойствами, что сказывается на их растворении. Тем не менее, полигликолид растворяется в таких фторированных растворителях, как гексафторизопропанол и сесквигидрат гексафторацетона. Они используются в том случае, если надо приготовить раствор полимера с высоким молекулярным весом для электроспиннинга или изготовления пленки [24]. В настоящее время PGA широко применяется для создания рассасывающегося хирургического шовного материала [28, 41].

Хирургическая нить образуется путем скручивания волокон из PGA. Одним из преимуществ этого материала является способность присоединения к нему дополнительных химических цепочек, приводящих к появлению новых свойств, что увеличивает диапазон применения. Благодаря своей кристаллической структуре, PGA не растворима в воде, её пластичность возрастает с повышением влажности, что позволяет легко формировать биоконструкции [33].

Для создания систем пролонгированного действия наиболее широко применяются сополимеры молочной и гликолевой кислот (PLGA, PLG, PLGC или CPLG]) [31]. Свойства и области применения PLGA могут изменяться в широких пределах не только благодаря варьированию молекулярной массы полимера, но и за счет изменения соотношения мономерных звеньев в полимере. Как и гомополимеры (PLA и PGA), сополимеры молочной и гликолевой кислот обладают низкой токсичностью, превосходной биологической совместимостью и характеризуются практическим отсутствием воспалений при контакте с живыми организмами [27].

В ряде случаев используют другие сополимеры молочной кислоты. Обычно второй сомономер вводят для изменения гидрофильно-гидрофобных свойств полимера, а, следовательно, и профиля скорости высвобождения активного вещества из микрочастиц на его основе. Так, если высвобождение гидрофобного лекарственного вещества из

микрочастиц на основе PLGA происходит недостаточно быстро, существует возможно заменить его на двойные и тройные блок-сополимеры PLA и полиэтиленгликоля (PEG). Такие сополимеры (PLA-PEG и PLA-PEG-PLA) получают по механизму открытия кольца из D,L-лактида и полиэтиленгликоля при катализе, например, 2-этил- гексаноатом олова или из лактида с этиленоксидом с получением мультиблочного сополимера

Применение полимеров для доставки лекарственных веществ стало возможным благодаря: 1) способности образовывать стабильные микро- и наночастицы; 2) эффективной степени включения в полимерную матрицу лекарственных веществ различной физико-химической природы и фармакологических свойств; 3) отсутствию полной биодеградируемости в организме и токсичности [38].

Применение лекарственных форм пролонгированного действия на основе полимерных носителей дает возможность значительно повысить биодоступность лекарственных препаратов и минимизировать их побочные эффекты.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Подготовка образцов к исследованию

Объектом исследования являлись образцы полиэфирной ткани с различными типами антипролиферативного покрытия размером 10х10 мм.

Для получения антипролиферативного покрытия 200 мкл раствора сиролимуса в хлороформе («осч») с PLGA или без наносились с помощью дозатора на фрагменты полиэфирной ткани, которые затем сушили при комнатной температуре в течение суток. После этого проводилась стерилизация образцов оксидом этилена.

Выбрано несколько групп образцов:

Группа 1 - полиэфирная ткань без антипролиферативного покрытия

Группа 2 - полиэфирная ткань с антипролиферативным покрытием, изготовленным без PLGA, содержащим сиролимус (Sigma Aldrich, США) в концентрации 5 мг/мл.

Группа 3 - полиэфирная ткань с антипролиферативным покрытием, изготовленным без PLGA, содержащим сиролимус (Sigma Aldrich, США) в концентрации 8 мг/мл.

Группа 4 - полиэфирная ткань с антипролиферативным покрытием, изготовленным без PLGA, содержащим сиролимус (Sigma Aldrich, США) в концентрации 10 мг/мл.

Группа 5 - полиэфирная ткань с антипролиферативным покрытием, изготовленным из 0,75% раствора PLGA (50:50, Mr 27,2 кДа, характеристическая вязкость 0,39 дл/г, полидисперсность 1,81) (Lactel, США) в хлороформе («осч»), содержащего сиролимус (Sigma Aldrich, США) в концентрации 5 мг/мл.

Группа 6 - полиэфирная ткань с антипролиферативным покрытием, изготовленным из 0,75% раствор PLGA (50:50, Mr 27,2 кДа, характеристическая вязкость 0,39 дл/г, полидисперсность 1,81) (Lactel,

США) в хлороформе («осч»), содержащего сиролимус (Sigma Aldrich, США) в концентрации 8 мг/мл.

Группа 7 - полиэфирная ткань с антипролиферативным покрытием, изготовленным из 0,75% раствора PLGA (50:50, Mr 27,2 кДа, характеристическая вязкость 0,39 дл/г, полидисперсность 1,81) (Lactel, США) в хлороформе («осч»), содержащего сиролимус (Sigma Aldrich, США) в концентрации 10 мг/мл.

2.2 Моделирование деградации антипролиферативного покрытия в условиях in vitro

Общее количество образцов каждой обработки размером 10х10 мм – 12 штук. В 6 образцах определяли начальное содержание сиролимуса путем растворения покрытия в ацетонитриле и последующего анализа полученного раствора методом ВЭЖХ при длине волны 280 нм. Для изучения процессов деградации лекарственного покрытия in vitro использовали фосфатный буфер с добавлением азида натрия pH 7,4 [7, 8, 9]. Каждый образец (общее количество 6 штук) выдерживался в 10 мл раствора при 37^{o}C в течение 28 дней. Учитывая период полужизни сиролимуса в растворе (57-63 ч), замену буфера производили каждые 48 часов. При смене буфера отбирали 2,5 мл раствора, который лиофилизировали до образования сухого остатка с использованием лиофильной сушки VaCo 2. В ходе процесса образцы замораживались при -80^{o}C в течение 24 часов, сушка происходила в вакуумной камере при комнатной температуре в течение 12 часов. Полученный сухой остаток растворяли в 0,9 мл ацетонитрила, центрифугировали при 3000 об/мин в течение 15 мин. Содержание сиролимуса в надосадочной жидкости определяли методом ВЭЖХ.

2.3 Исследование профиля элюции сиролимуса

Исследование проводили на жидкостном хроматографе Shimadzu LC-20 Prominence (рис.1) с диодноматричным детектором с использованием колонки для хроматографии Luna C18, 150x4,6 мм. Для промывки автосамплера использовали 50% ацетонитрил в изопропиловом спирте. Условия хроматографирования: подвижная фаза – смесь ацетонитрила с уксусной кислотой (pH 3,6) 70:30; скорость потока 1,5 мл/мин; температура 37°C. Объем инжекции – 20 мкл. Среднее время анализа 1 образца – 13 минут.

Рис. 1. Хроматограф Shimadzu LC-20 Prominence.

2.4 Подкожная имплантация образцов животным

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 (рис. 2). Хирургическую операционную рану закрывали с помощью шовного материала, участок линии разреза обрабатывали антисептическим раствором.

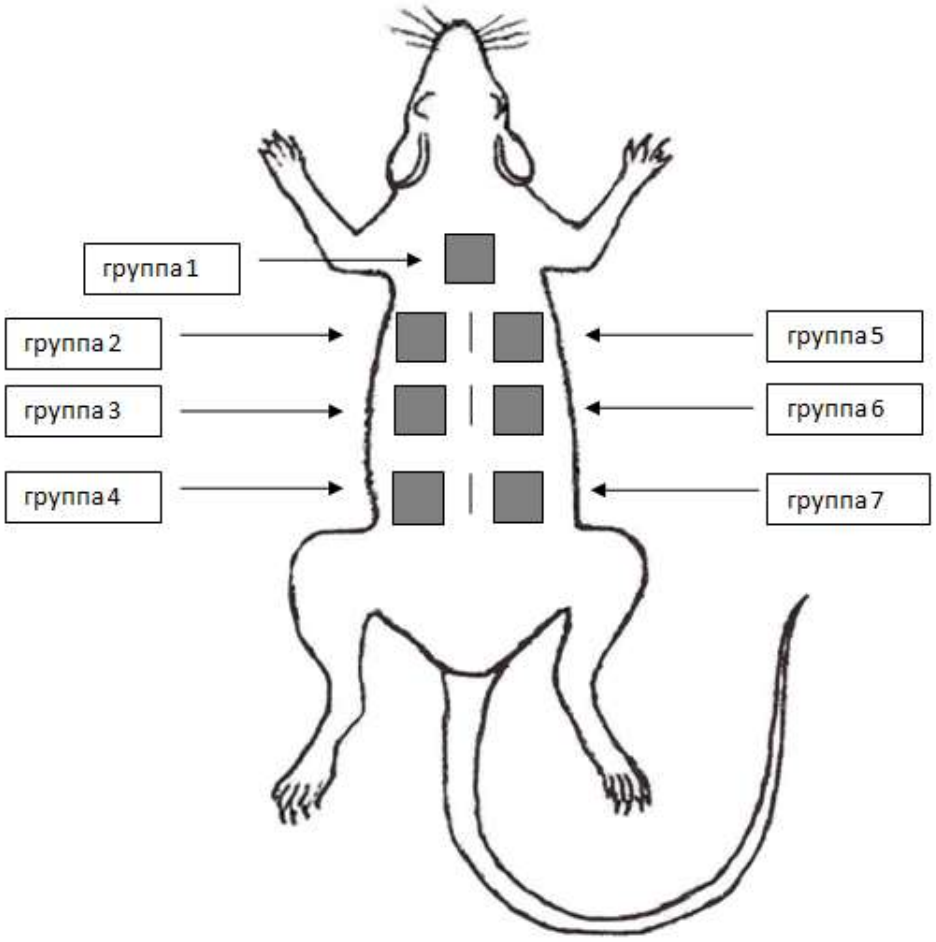


Рис. 2. Схема имплантации образцов.

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 по методу Вейгерт-Ван-Гизона [11]

5)Заключение окрашенных срезов под покровное стекло.

6)Изучение срезов под микроскопом в проходящем свете.

Образцы помещали в 4% раствор нейтрального формалина не менее чем на 24 ч, после чего – в емкость с подведенной к ней холодной водопроводной водой, не менее чем на 6 ч. После этого приступали к изготовлению парафиновых блоков. При этом извлеченные из воды фрагменты погружали в емкость с 50% раствором этилового спирта на 4-6 ч, далее в емкость с 60% раствором этилового спирта на 4-6 ч, далее в емкость с 70% раствором этилового спирта на 8-12 ч, далее в емкость с 80% раствором этилового спирта на 8-12 ч, далее в емкость с 90% раствором этилового спирта на 8-12 ч, далее в емкость с 96% раствором этилового спирта на 12-24 ч. Затем помещали образцы в хлороформ на 1,5 часа. После извлечения фрагментов из хлороформа помещали их в смесь хлороформа с парафином в термостат при температуре 37°С на 3-6 ч (соотношение 1:1). Далее пропитывали фрагменты на водяной бане парафином при температуре 57°С на протяжении 1,5 ч. Залитые фрагменты приклеивали к деревянным колодкам.

Для изготовления парафиновых срезов парафиновый блок зажимали в держателе микротома, устанавливали на микротом нож и выставляли

толщину среза на 5-7 мкм. Полученный срез переносили при помощи колющих игл в чашку Петри с теплой водой (38±2)°С, далее на предметное стекло, предварительно обработанное смесью белка куриного яйца с глицерином. Высушивали стекло в термостате при температуре (38±2)°С.

Перед проведением окрашивания проводили депарафинизацию срезов в орто-ксилоле, после чего выдерживали в спиртах с нисходящими концентрациями и доводили до воды (две порции ксилола – 3-5 минут, 96° этанол – 3 минуты, 80° этанол – 3 минуты, 70° этанол – 3 минуты, дистиллированная вода – 5 минут).

Окраска гематоксилин-эозином. Окрашивали срезы гематоксилином 7-10 минут, после чего промывали в дистиллированной воде 5 минут.

Выдерживали в 1% растворе соляной кислоты на 70° этаноле до побурения срезов. Далее промывали дистиллированной водой, а затем слабым (0,5 %) раствором аммиака до посинения срезов. После этого окрашивали водным раствором эозина в течение 1 минуты. Далее образцы трехкратно промывали в дистиллированной воде для удаления избытка эозина, однократно в 70 % растворе этанола, двукратно в 96% этаноле для удаления воды из срезов. Экспозиция в каждой порции спирта – 2 минуты. Для просветления дважды промывали срезы в смеси расплавленного фенола и ксилола в соотношении 1:4 в течение 1 минуты. Окончательное обезвоживание срезов проводили промыванием ксилолом в течение 2 минут. Окраска включает использование основного красителя гематоксилина, окрашивающего базофильные клеточные структуры ярко-синим цветом, и спиртового кислого красителя эозина Y, окрашивающего эозинофильные структуры клетки красно-розовым цветом. Базофильные структуры, как правило, это те, которые содержат нуклеиновые кислоты (ДНК и РНК): клеточное ядро, рибосомы и РНК-богатые участки цитоплазмы. Эозинофильные структуры содержат внутри- и внеклеточные белки, например, тельца Леви. Цитоплазма является эозинофильной средой.

Окраска по методу Вейгерт-Ван-Гизона. Наносили на срез 10 капель раствора йодной кислоты на 5 мин. Промывали срезы в дистиллированной воде, после чего помещали срезы в раствор Вейгерта и инкубировали 12 часов. После промывания в дистиллированной воде наносили на срез 10 капель дифференцирующего кислотного буфера на 10 минут, промывали дистиллированной водой, наносили 10 капель железного гематоксилина Вейгерта 1 и добавляли 5 капель железного гематоксилина Вейгерта 2, оставляли на 10 минут. В течение 10 минут промывали образцы в проточной воде, далее наносили на срезы 10 капель пикрофуксина по Ван-Гизону, оставляли на 7 минут. Промывали срезы в дистиллированной воде. После погружали препараты в 70% раствор этилового спирта на 10 секунд, далее в 96% раствор этилового спирта на 2 мин. Далее препараты погружали в ксилол. После их извлечения помещали на предметное стекло, наносили на окрашенный срез 2 капли пихтового бальзама с последующим укрыванием его покровным стеклом.

2.6 Методы статистической обработки результатов

При оценке полученных экспериментальных данных были использованы методы статистического описания, методы проверки статистических гипотез, использующиеся в стандартных пакетах программы Statistica 6.0, в том числе 3S-критерий для обнаружения промахов, дисперсионный анализ для оценки принадлежности образцов к разным гомогенным группам и их сравнения [13].

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Результаты деградации антипролиферативного покрытия in vitro

В ходе проведенного исследования нами были определены суммарный выход сиролимуса в буферный раствор, остаточное содержание сиролимуса в образцах и профиль элюции препарата при деградации лекарственного покрытия in vitro. Исследование проводили на жидкостном хроматографе Shimadzu LC-20 Prominence. В качестве калибровочных растворов применяли стандартные растворы сиролимуса в ацетонитриле с концентрациями 50 нг/мл, 250 нг/мл, 500 нг/мл, 1000 нг/мл и 2000 нг/мл (рис.3).

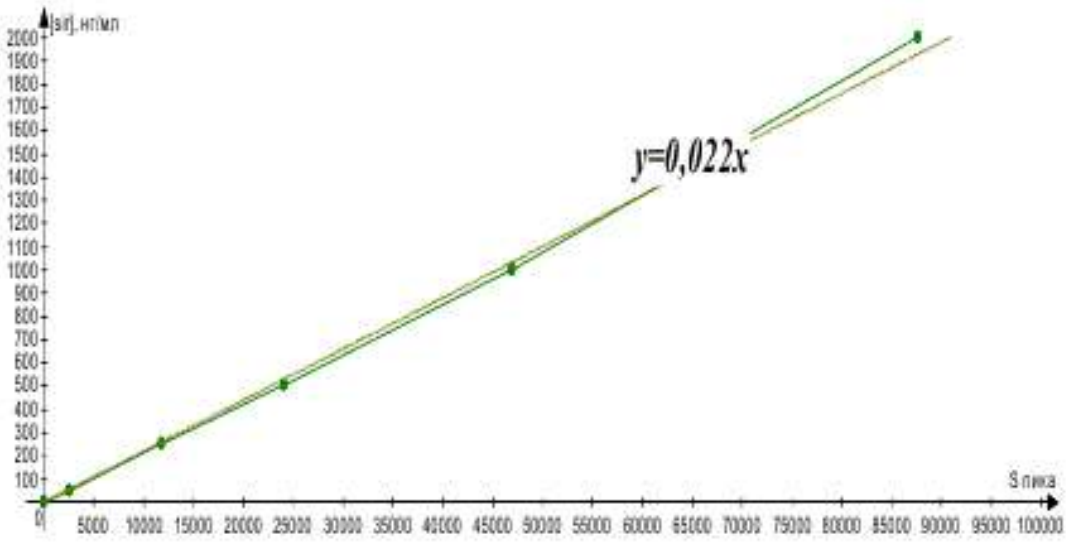


Рис. 3. Калибровка по сиролимусу в ацетонитриле, ВЭЖХ, λ=280 нм.

Начальное содержание сиролимуса определяли в 6 образцах путем растворения покрытия в ацетонитриле и последующего анализа полученного раствора методом ВЭЖХ при длине волны 280 нм.

Профиль элюции сиролимуса в фосфатный буферный раствор pH=7,4 при моделировании деградации антипролиферативного покрытия in vitro, изготовленного из 0,75% PLGA, содержащего 5 мг/мл сиролимуса представлен на рисунке 4.

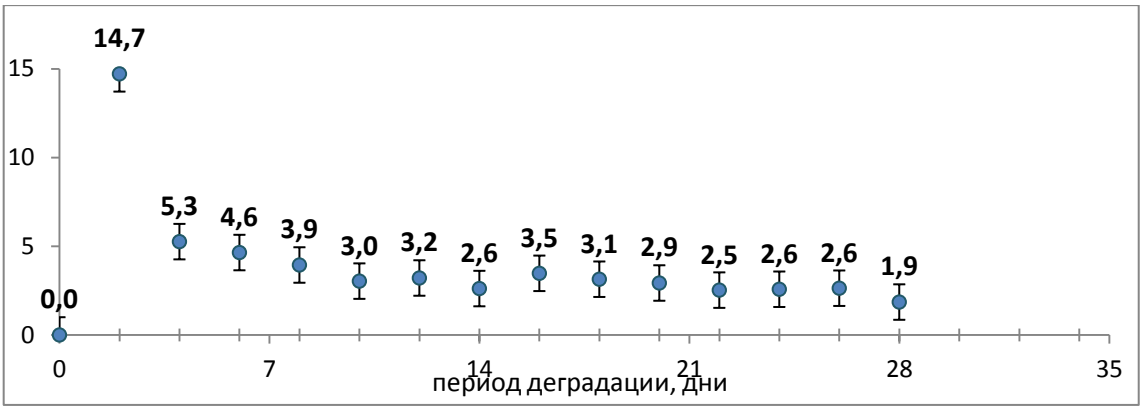


Рис. 4. Профиль элюции сиролимуса в буферный раствор pH=7,4 при моделировании деградации антипролиферативного покрытия in vitro (0,75% PLGA, сиролимус 5 мг/мл), %.

Результаты исследования показали, что выход сиролимуса в буферный раствор за первую неделю составил 24,6%, за вторую – 12,7%, за третью и четвертую недели – 9,6%. На рисунке видно, что максимальный выход препарата наблюдался в течение первых нескольких дней, а на конечном этапе деградации покрытия скорость выхода препарата в раствор заметно снизилась.

Профиль элюции сиролимуса в фосфатный буферный раствор pH=7,4 при моделировании деградации антипролиферативного покрытия in vitro, изготовленного из 0,75% PLGA, содержащего сиролимус в концентрации 8 мг/мл представлен на рисунке 5.

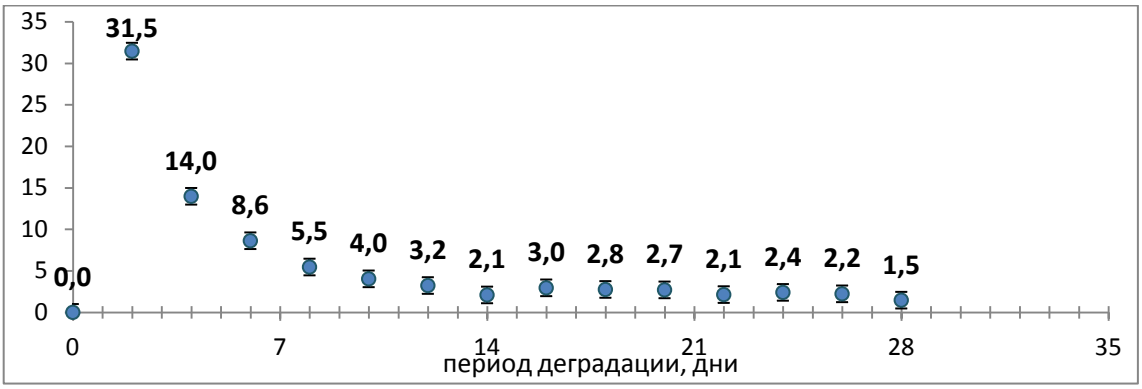


Рис. 5. Профиль элюции сиролимуса в буферный раствор pH=7,4 при моделировании деградации антипролиферативного покрытия in vitro (0,75% PLGA, сиролимус 8 мг/мл), %.

Результаты исследования показали, что выход сиролимуса в буферный раствор за первую неделю составил 24,6%, за вторую – 14,8%, за третью и четвертую недели – 8,5% и 8,2% соответственно. На рисунке видно, что максимальный выход препарата наблюдался в течение первых нескольких дней, а на конечном этапе деградации покрытия скорость выхода препарата в раствор заметно снизилась.

Профиль элюции сиролимуса в фосфатный буферный раствор pH=7,4 при моделировании деградации антипролиферативного покрытия in vitro, изготовленного из 0,75% PLGA, содержащего сиролимус в концентрации 10 мг/мл представлен на рисунке 6.

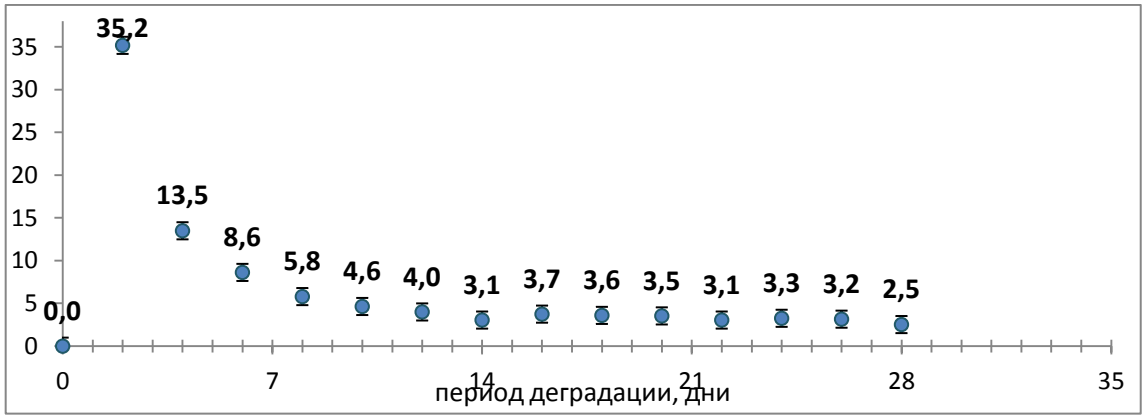


Рис. 6. Профиль элюции сиролимуса в буферный раствор pH=7,4 при моделировании деградации антипролиферативного покрытия in vitro (0,75% PLGA, сиролимус 10 мг/мл), %.

Результаты исследования показали, что выход сиролимуса в буферный раствор за первую неделю составил 22,1%, за вторую – 14,4%, за третью и четвертую недели – 13,9% и 12,1% соответственно. На рисунке видно, что максимальный выход препарата наблюдался в течение первых нескольких дней, а на конечном этапе деградации покрытия скорость выхода препарата в раствор заметно снизилась.

В ходе проведения эксперимента по моделированию деградации лекарственного покрытия in vitro было выявлено неравномерное высвобождение лекарственного препарата в фосфатный буферный раствор (pH=7,4) во всех образцах. Повышенный выход препарата в течение первых нескольких дней не связан с деградацией полимера, а объясняется смыванием сиролимуса 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 сиролимуса в фосфатный буферный раствор pH=7,4 при моделировании деградации антипролиферативных покрытий in vitro, изготовленных без полимера и содержащих разные концентрации сиролимуса (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 pH=7,4. При этом наблюдается схожая динамика выхода лекарственного препарата по сравнению с образцами антипролиферативных покрытий с PLGA: максимальный выход в первые 2 суток с последующим снижением интенсивности высвобождения.

При оценке эффективности применения сиролимуса в качестве антипролиферативного покрытия учитывается суммарный выход

лекарственного препарата из антипролиферативного покрытия в модельную среду.

График суммарного выхода сиролимуса в буферный раствор при деградации покрытия изготовленного из 0,75% раствора PLGA, содержащего сиролимус в концентрации 5 мг/мл представлен на рисунке 7.

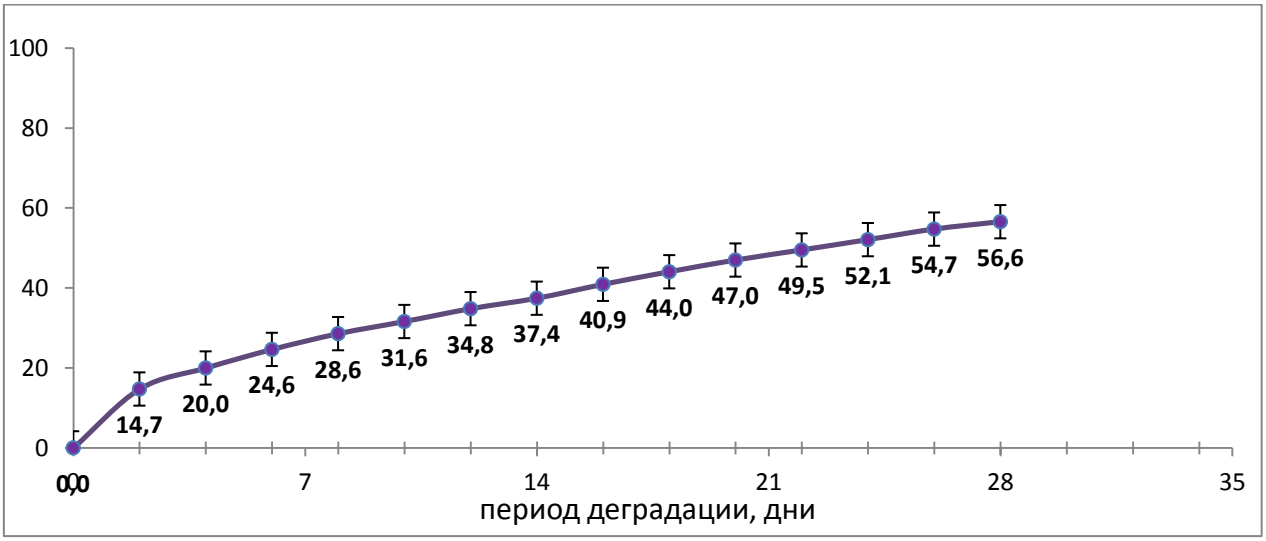


Рис. 7. Суммарный выход сиролимуса в буферный раствор при деградации покрытия изготовленного из 0,75% раствора PLGA в хлороформе, содержащего сиролимус в концентрации 5 мг/мл, %.

Согласно результатам исследования, суммарный выход сиролимуса из антипролиферативного покрытия за четыре недели составил 56,6%.

График суммарного выхода сиролимуса в буферный раствор при деградации покрытия изготовленного из 0,75% раствора PLGA, содержащего сиролимус в концентрации 8 мг/мл представлен на рисунке 8.

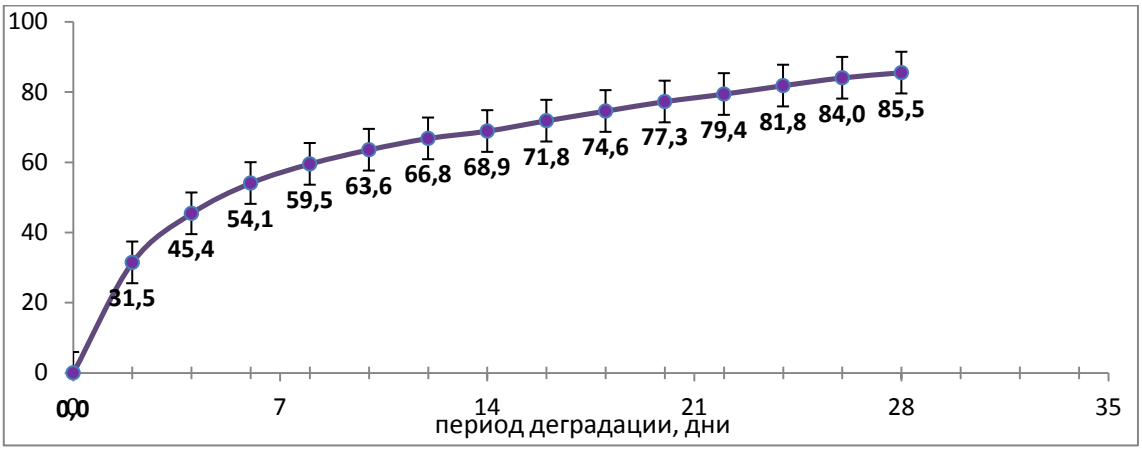


Рис. 8. Суммарный выход сиролимуса в буферный раствор при деградации покрытия изготовленного из 0,75% раствора PLGA в хлороформе, содержащего сиролимус в концентрации 8 мг/мл, %.

Согласно результатам исследования, суммарный выход сиролимуса из антипролиферативного покрытия за четыре недели составил 85,5%.

График суммарного выхода сиролимуса в буферный раствор при деградации покрытия изготовленного из 0,75% раствора PLGA, содержащего сиролимус в концентрации 10 мг/мл представлен на рисунке 9.

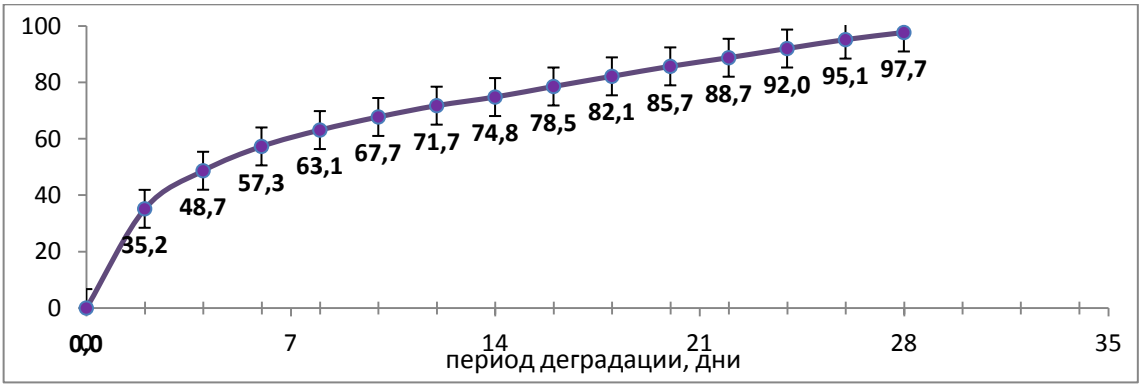


Рис. 9. Суммарный выход сиролимуса в буферный раствор при деградации покрытия изготовленного из 0,75% раствора PLGA в хлороформе, содержащего сиролимус в концентрации 10 мг/мл, %.

Согласно результатам исследования, суммарный выход сиролимуса из антипролиферативного покрытия за четыре недели составил 97,7%.

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

Остаточное содержание препарата определяли путем растворения покрытия в ацетонитриле и последующего анализа полученного раствора методом ВЭЖХ при длине волны 280 нм.

Результаты исследования по оценке остаточного содержания сиролимуса в антипролиферативном покрытии, изготовленном из 0,75% раствора PLGA, содержащего сиролимус в концентрации 5 мг/мл, на разных сроках инкубации в фосфатном буфере pH=7,4 при температуре 37°С представлены на рисунке 10.

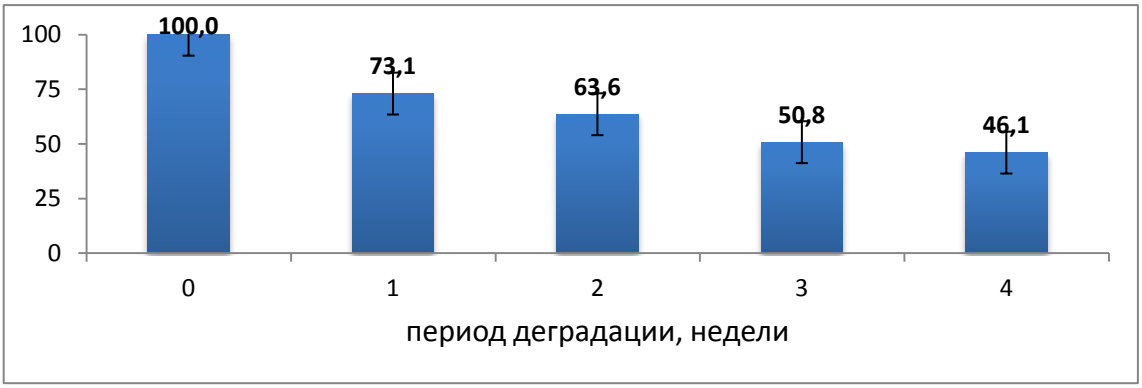


Рис. 10. Остаточное содержание сиролимуса при деградации покрытия, изготовленного из 0,75% раствора PLGA в хлороформе, содержащего сиролимус в концентрации 5 мг/мл, %.

Согласно полученным данным остаточное содержание сиролимуса в антипролиферативном покрытии через 4 недели моделирования его деградации составило 46,1%.

Результаты исследования по оценке остаточного содержания сиролимуса в антипролиферативном покрытии, изготовленном из 0,75% раствора PLGA, содержащего сиролимус в концентрации 8 мг/мл, на разных сроках инкубации в фосфатном буфере pH=7,4 при температуре 37°С представлены на рисунке 11.

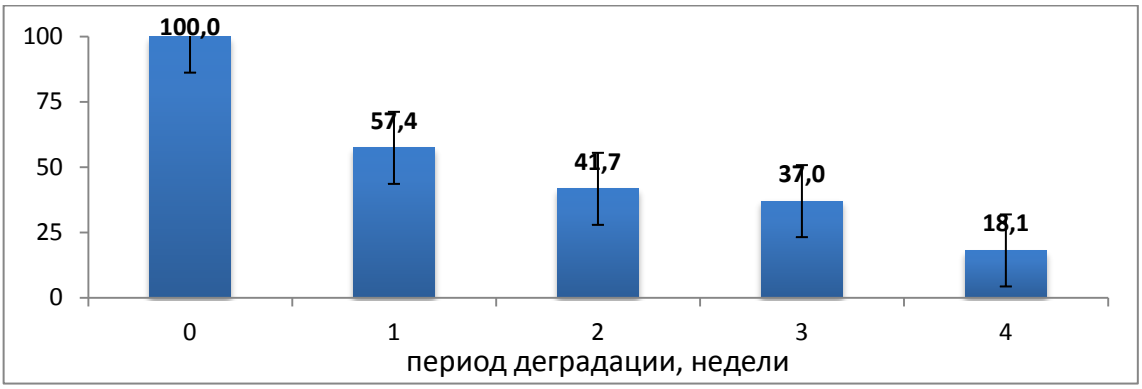


Рис. 11. Остаточное содержание сиролимуса при деградации покрытия, изготовленного из 0,75% раствора PLGA в хлороформе, содержащего сиролимус в концентрации 8 мг/мл, %.

Согласно полученным данным остаточное содержание сиролимуса в антипролиферативном покрытии через 4 недели моделирования его деградации составило 18,1%.

Результаты исследования по оценке остаточного содержания сиролимуса в антипролиферативном покрытии, изготовленном из 0,75% раствора PLGA, содержащего сиролимус в концентрации 10 мг/мл, на разных сроках инкубации в фосфатном буфере pH=7,4 при температуре 37°С представлены на рисунке 12.

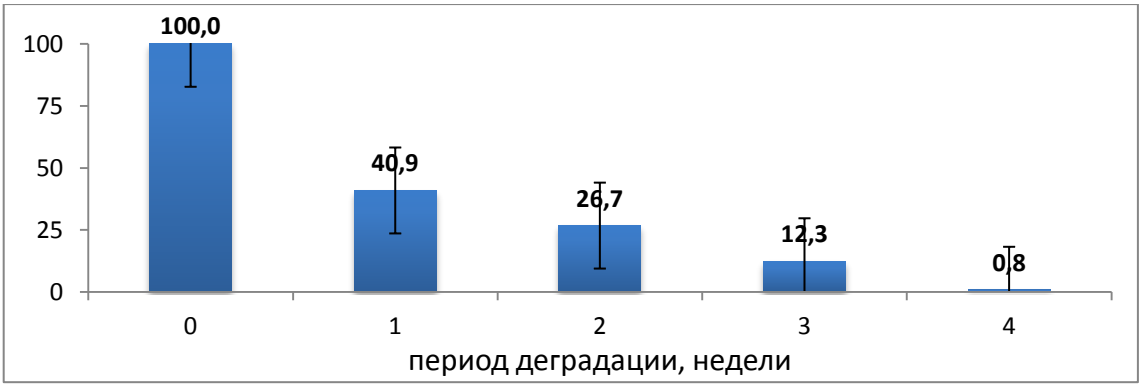


Рис. 12. Остаточное содержание сиролимуса при деградации покрытия, изготовленного из 0,75% раствора PLGA в хлороформе, содержащего сиролимус в концентрации 10 мг/мл, %

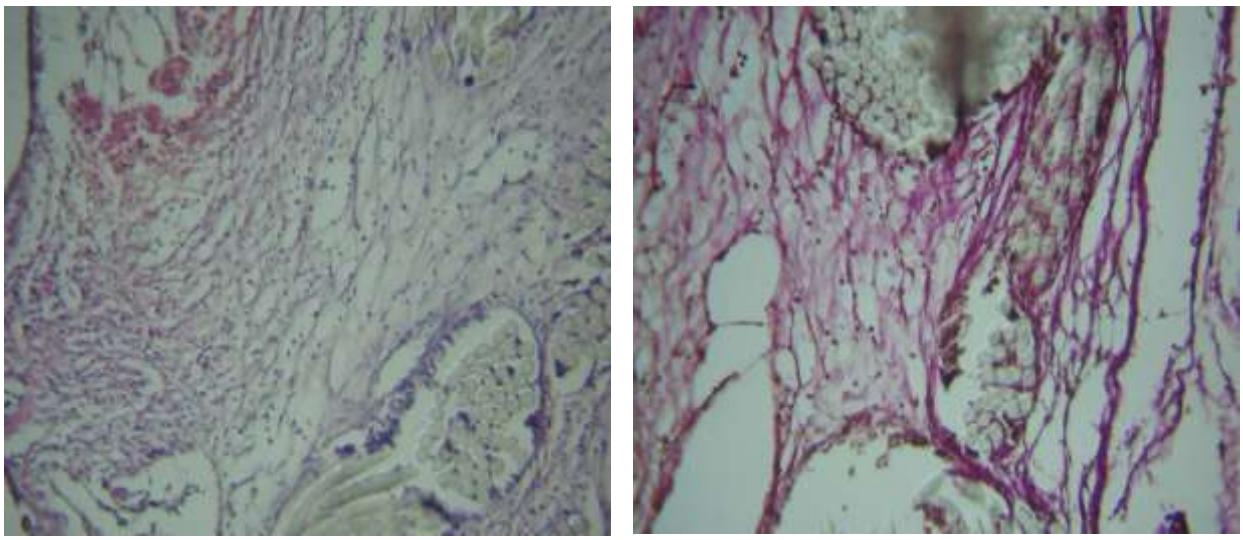
Согласно полученным данным остаточное содержание сиролимуса в

антипролиферативном покрытии через 4 недели моделирования его деградации составило 0,8%.

3.2 Результаты гистологических исследований

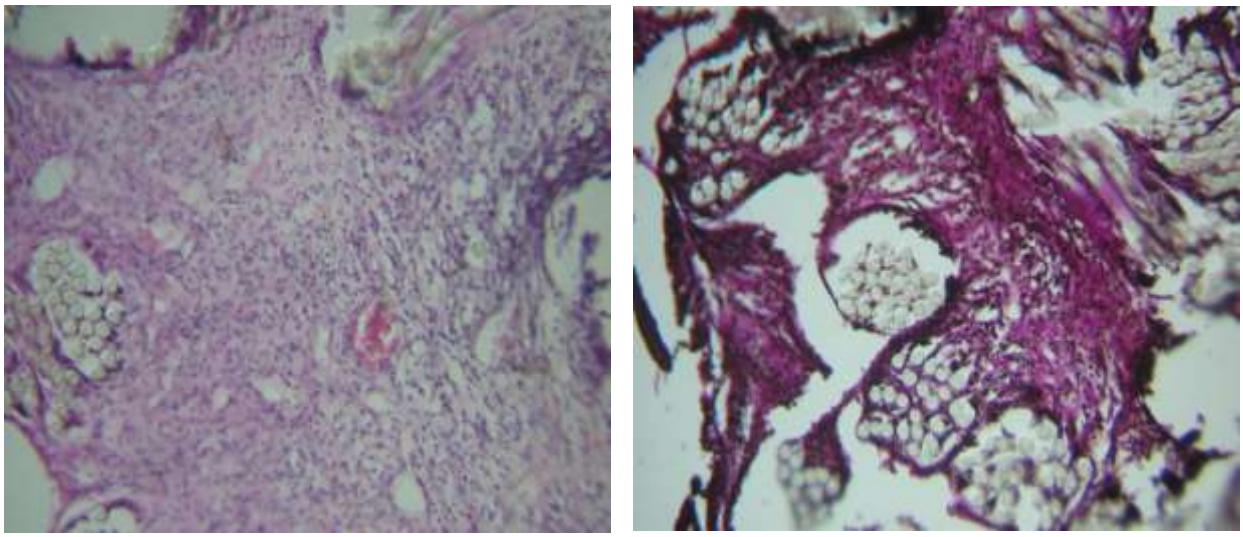
Для подтверждения эффективности антипролиферативного лекарственного покрытия на соответствующих сроках имплантации (1 и 4 недели) выводили животных из эксперимента и проводили забор полиэфирной ткани с прилежащими к имплантату тканями реципиента и их оценка с помощью различных гистологических техник. 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 13-19:



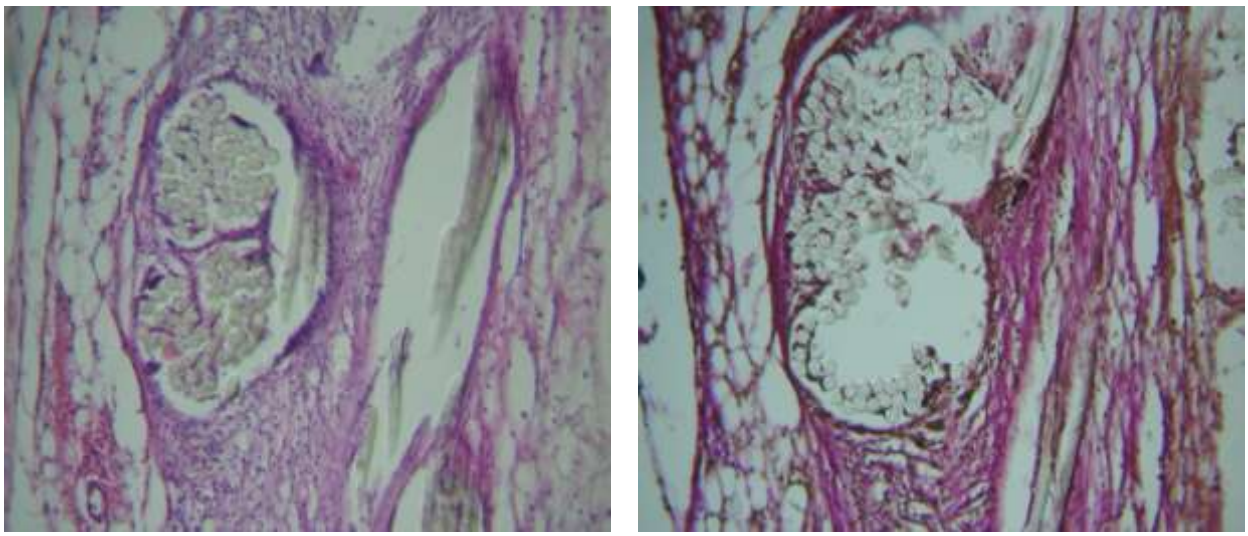
А) Б)

Рис.13 Результаты гистологического исследования образцов 1 группы через 1 неделю после имплантации А) окрашивание гематоксилин-эозином, х200; Б) окрашенные по методу Вейгерт-Ван-Гизона, х200.



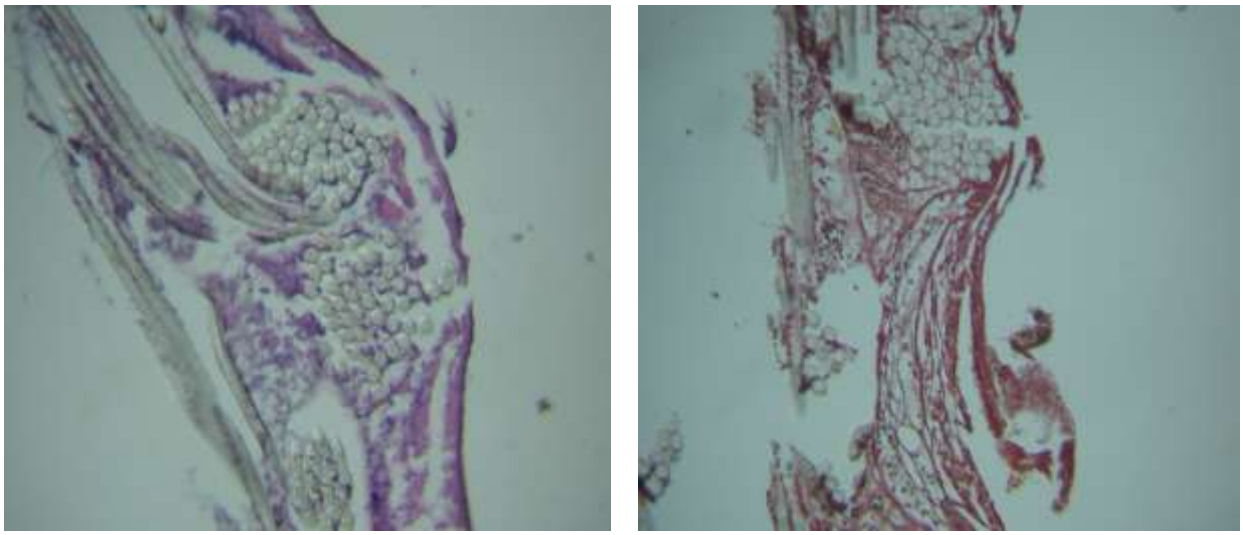
А) Б)

Рис.14 Результаты гистологического исследования образцов 2 группы через 1 неделю после имплантации А) окрашивание гематоксилин-эозином, х200; Б) окрашенные по методу Вейгерт-Ван-Гизона, х200.



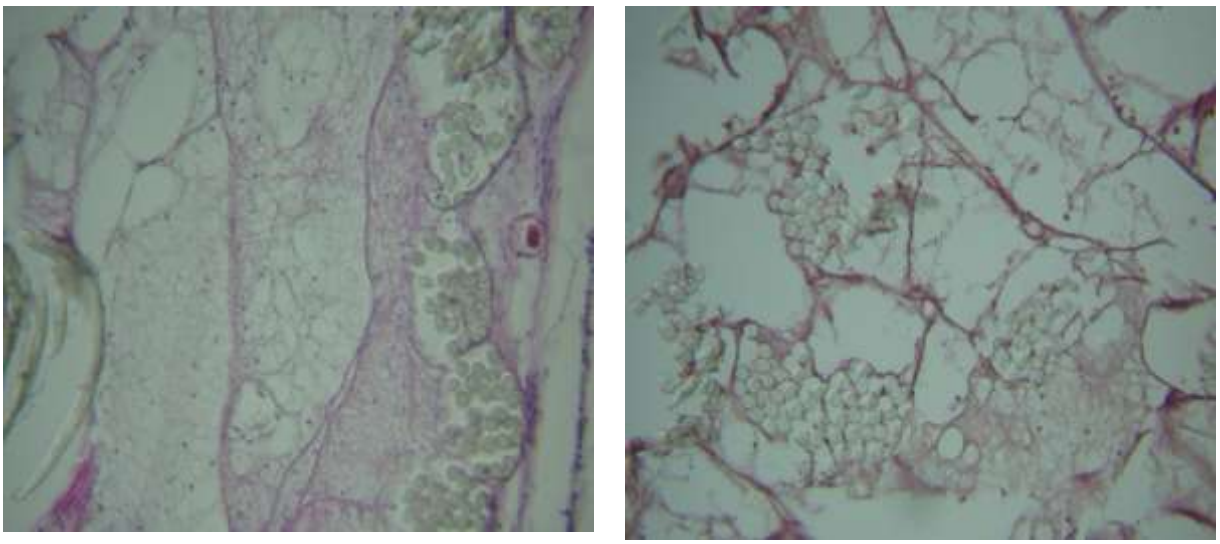
А) Б)

Рис.15 Результаты гистологического исследования образцов 3 группы через 1 неделю после имплантации А) окрашивание гематоксилин-эозином, х200; Б) окрашенные по методу Вейгерт-Ван-Гизона, х200.



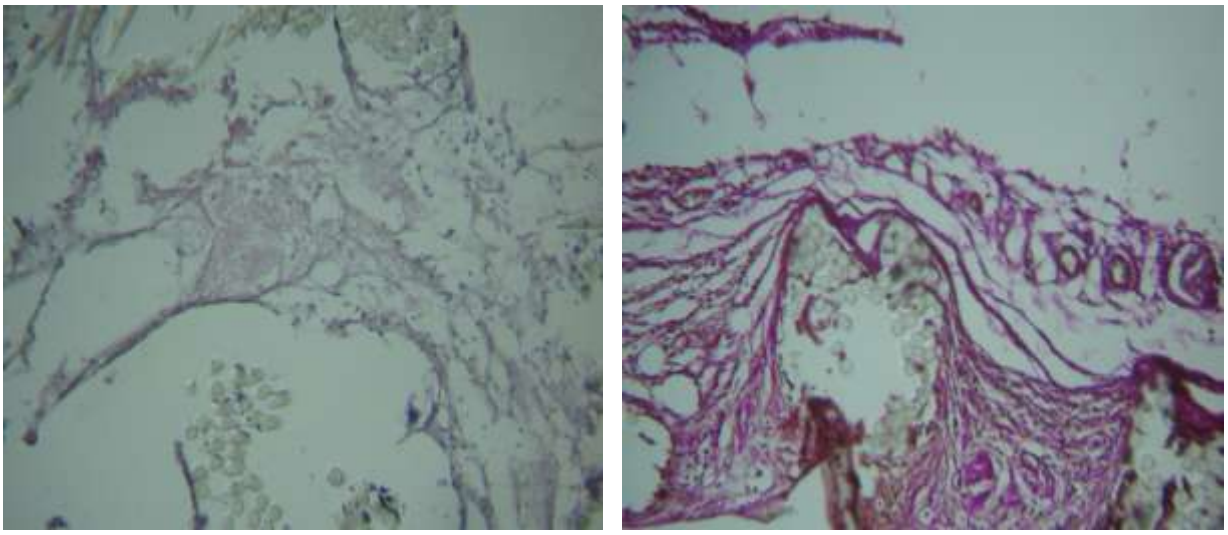
А) Б)

Рис.16 Результаты гистологического исследования образцов 4 группы через 1 неделю после имплантации А) окрашивание гематоксилин-эозином, х200; Б) окрашенные по методу Вейгерт-Ван-Гизона, х200.



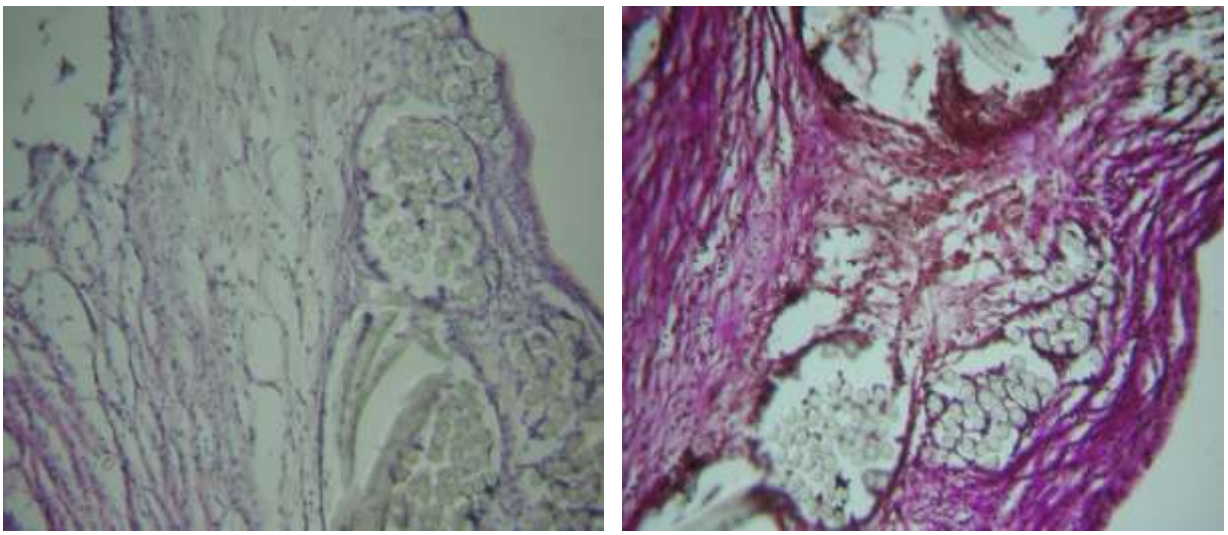
А) Б)

Рис.17 Результаты гистологического исследования образцов 5 группы через 1 неделю после имплантации А) окрашивание гематоксилин-эозином, х200; Б) окрашенные по методу Вейгерт-Ван-Гизона, х200.



А) Б)

Рис.18 Результаты гистологического исследования образцов 6 группы через 1 неделю после имплантации А) окрашивание гематоксилин-эозином, х200; Б) окрашенные по методу Вейгерт-Ван-Гизона, х200.



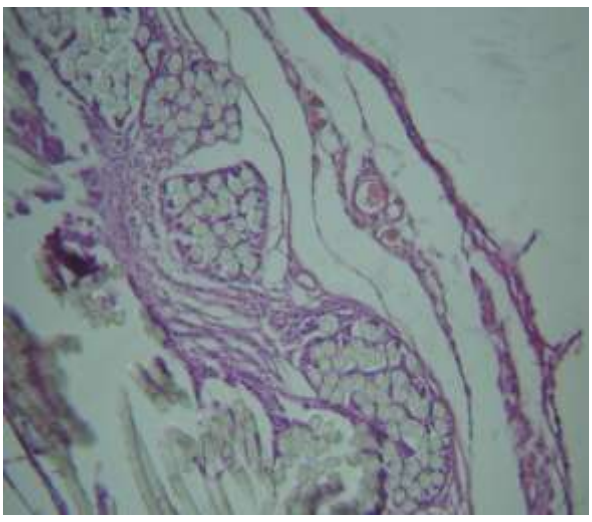
А) Б)

Рис.19 Результаты гистологического исследования образцов 7 группы через 1 неделю после имплантации А) окрашивание гематоксилин-эозином, х200; Б) окрашенные по методу Вейгерт-Ван-Гизона, х200.

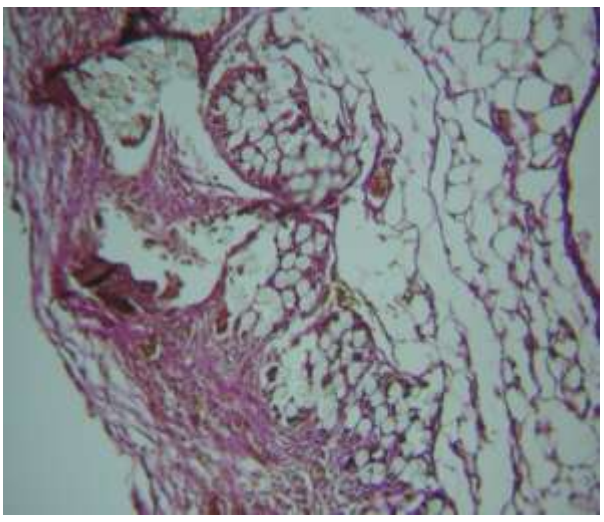
Изучение тканевой реакции на имплантацию образцов 1, 5, 6 групп показало, что через 1 неделю после оперативного вмешательства отмечена средне выраженная воспалительная реакция (лимфогистоцитарная инфильтрация). Наблюдается прорастание соединительной ткани как между пучками волокон, так и между отдельными 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 2, 3, 4, 7 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 20-26:

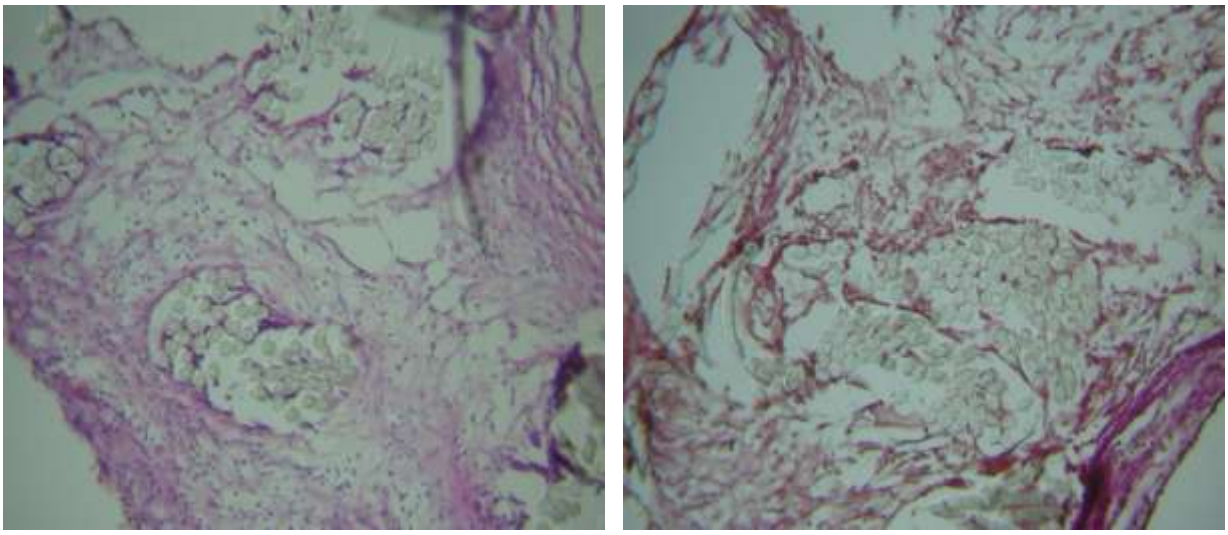


А)



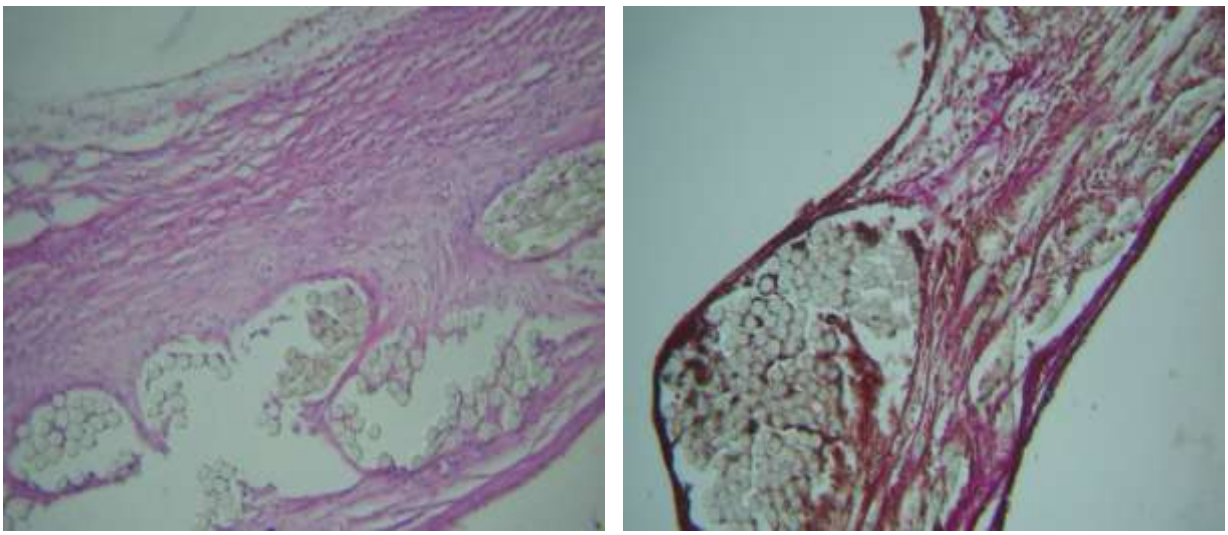
Б)

Рис.20 Результаты гистологического исследования образцов 1 группы через 4 недели после имплантации А) окрашивание гематоксилин-эозином, х200; Б) окрашенные по методу Вейгерт-Ван-Гизона, х200.



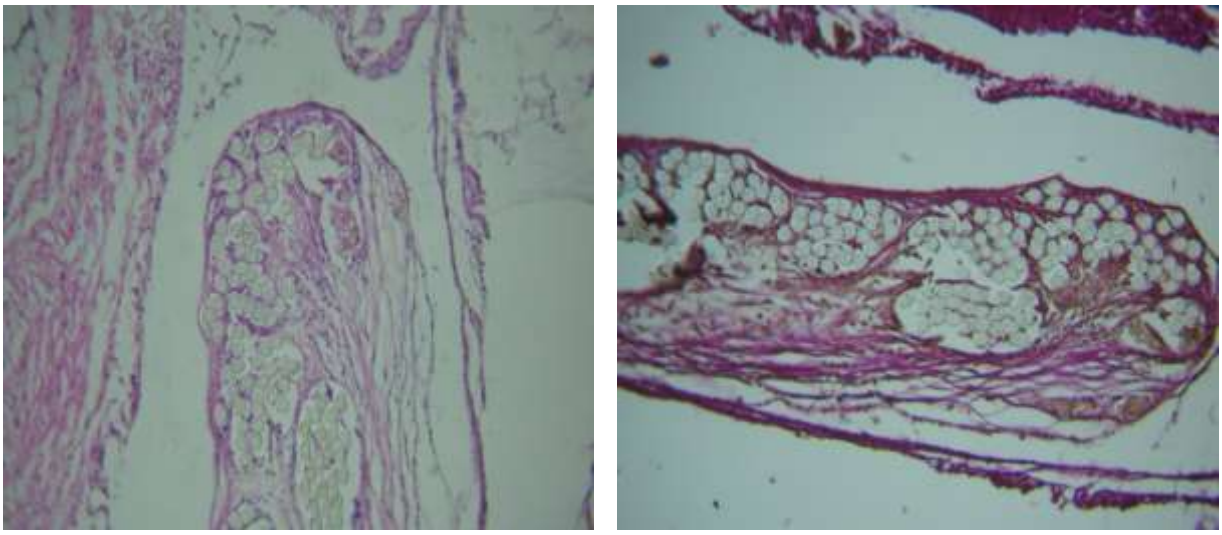
А) Б)

Рис.21 Результаты гистологического исследования образцов 2 группы через 4 недели после имплантации А) окрашивание гематоксилин-эозином, х200; Б) окрашенные по методу Вейгерт-Ван-Гизона, х200.



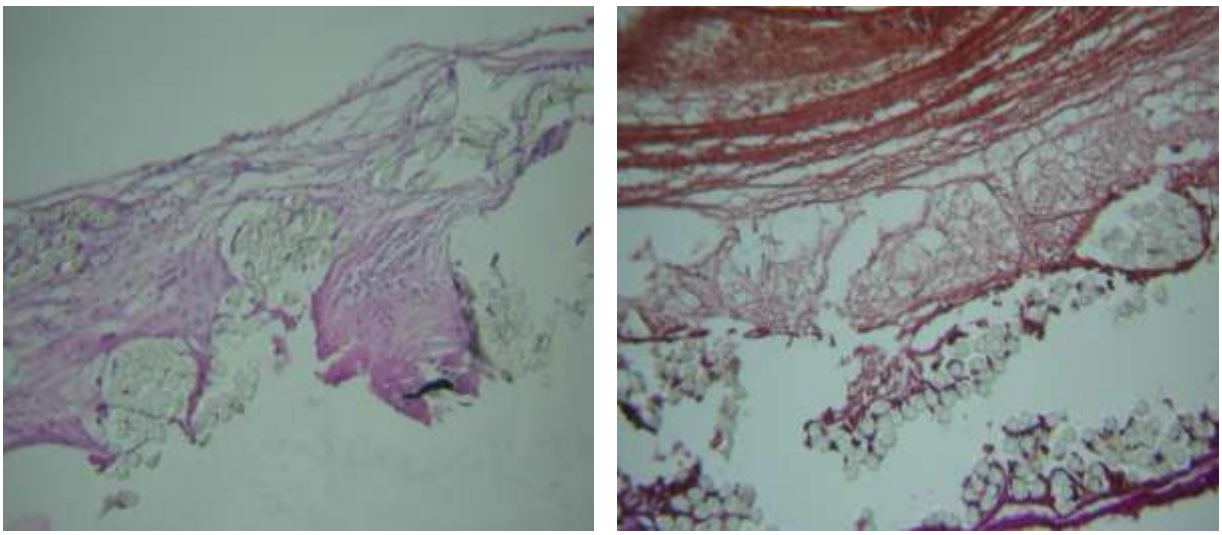
А) Б)

Рис. 22 Результаты гистологического исследования образцов 3 группы через 4 недели после имплантации А) окрашивание гематоксилин-эозином, х200; Б) окрашенные по методу Вейгерт-Ван-Гизона, х200.



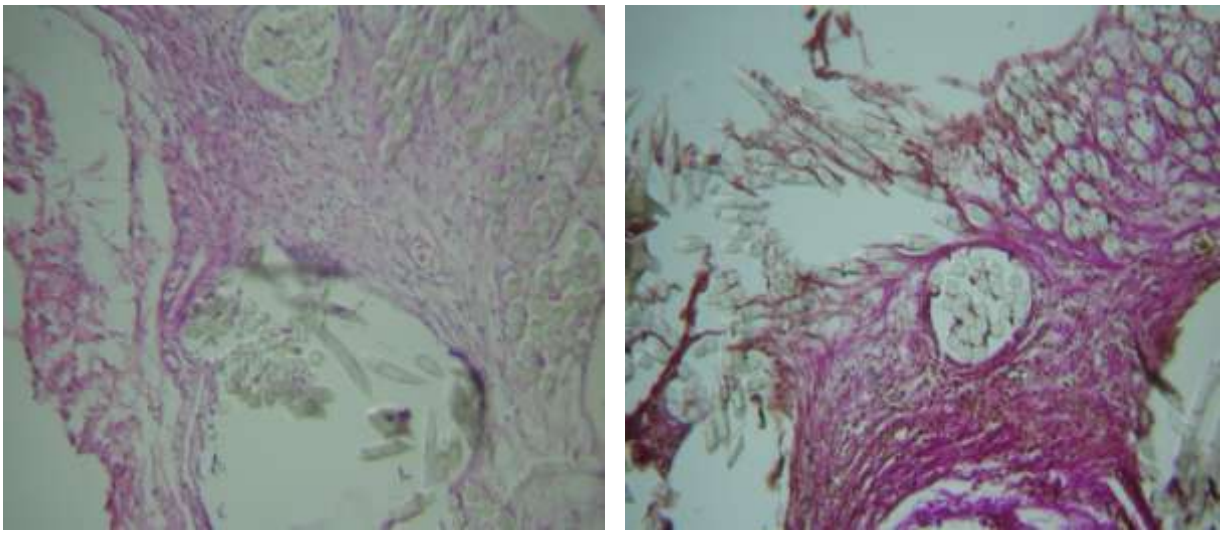
А) Б)

Рис.23 Результаты гистологического исследования образцов 4 группы через 4 недели после имплантации А) окрашивание гематоксилин-эозином, х200; Б) окрашенные по методу Вейгерт-Ван-Гизона, х200.



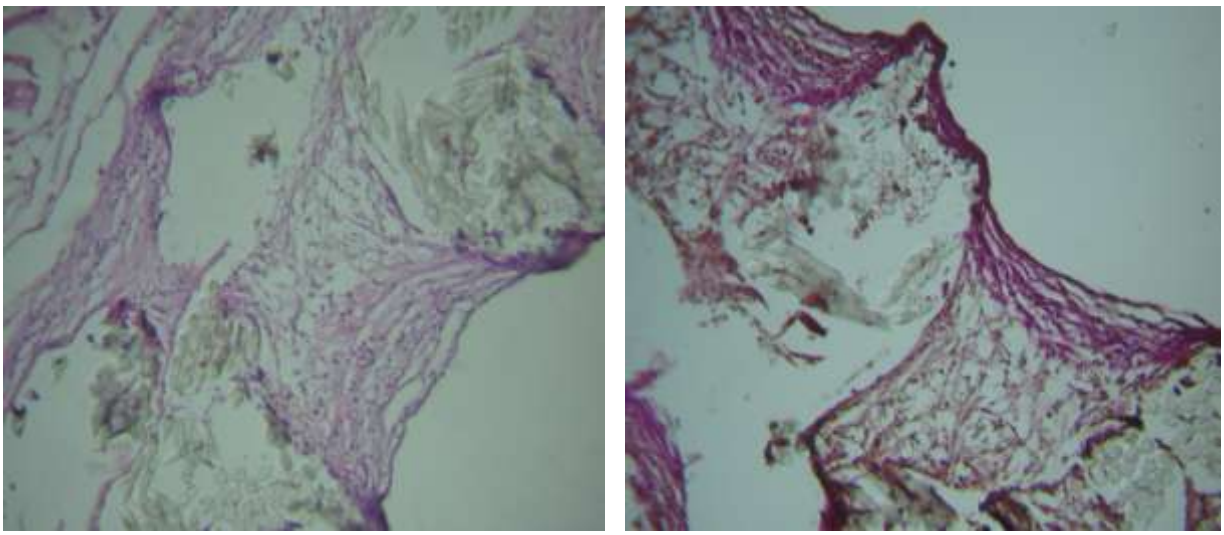
А) Б)

Рис. 24 Результаты гистологического исследования образцов 5 группы через 4 недели после имплантации А) окрашивание гематоксилин-эозином, х200; Б) окрашенные по методу Вейгерт-Ван-Гизона, х200.



А) Б)

Рис.25 Результаты гистологического исследования образцов 6 группы через 4 недели после имплантации А) окрашивание гематоксилин-эозином, х200; Б) окрашенные по методу Вейгерт-Ван-Гизона, х200.



А) Б)

Рис. 26 Результаты гистологического исследования образцов 7 группы через 4 недели после имплантации А) окрашивание гематоксилин-эозином, х200; Б) окрашенные по методу Вейгерт-Ван-Гизона, х200.

Через 4 недели после оперативного вмешательства отмечено отсутствие воспалительной реакции вокруг образцов всех экспериментальных групп. Для 1, 5, 6, 7 групп отмечено прорастание соединительной ткани как между пучками волокон, так и между отдельными волокнами полиэфирной ткани. Прирост соединительной ткани вокруг имплантата значительный. Прирост соединительной ткани вокруг 2, 3, 4 групп незначительный.

Поскольку основной задачей антипролиферативного покрытия полиэфирной ткани являлось подавление избыточного разрастания соединительной ткани вокруг имплантата, по итогам эксперимента наиболее удачной признана 2 группа образцов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе выполнения бакалаврской работы были разработаны модельные образцы полиэфирной ткани с сиролимуссодержащим антипролиферативным покрытием для изготовления манжеты сердечного клапана. Были изучены профили элюции и суммарный выход сиролимуса в раствор при моделировании деградации антипролиферативного покрытия in vitro, оценено остаточное содержание лекарственного препарата по окончании срока инкубации. Исследован тканевый ответ организма реципиента на имплантацию образцов.

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

1) Выявлен неравномерный выход сиролимуса в раствор при деградации антипролиферативного покрытия: максимальный в первые двое суток с последующим снижением интенсивности высвобождения.
2) Установлено, что остаточное содержание сиролимуса уменьшается при увеличении его концентрации в антипролиферативном покрытии.
3) Показано, что антипролиферативное покрытие не вызывает воспалительной реакции или отторжения имплантата.
4) Разработано антипролиферативное покрытие полиэфирной ткани, подавляющее избыточное разрастание соединительной ткани и не влияющее на процессы регенерации.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ИКС – искусственные клапаны сердца

КРС – крупный рогатый скот

ПАВ – поверхностно-активные вещества

ПТФЭ – политетрафторэтилен

ПЭТ – полиэтилентерефталат

р-ПТФЭ – растянутый политетрафторэтилен

FKBP12 – внутриклеточный белок

FKBP506 – внутриклеточный белок

mTOR – мишень рапамицина у млекопитающих

PEG – полиэтиленгликоль

PGA – полигликолевая кислота

PLA – полимолочная кислота

PLGA - поли(L-лактид-со-)гликолид

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алексеев, К.В. Сравнительное изучение вспомогательных веществ, применяемых при капсулировании / К.В Алексеев. // Стратегия развития российской фармации: материалы науч. конф. – 2008. – С. 130-132.

2. Алексеев, К.В. Полимеры для фармацевтической технологии / К.В. Алексеев, И.А. Грицкова, С.А. Кедик. – М.: ЗАО ИФТ, 2011. – 508-511 с.

3. Аляутдин, Р.Н. Транспорт лекарственных веществ через гематоэнцефалический барьер / Р.Н Аляутин. // Вестн. НИИ молекул. Медицины. – 2003. – № 3. – С. 11-29.

4. Бабунашвили, А.М. Применение коронарного стентирования в зависимости от клинической картины ИБС и типа атеросклеротического поражения коронарного русла / А.М. Бабунашвили, В.А Иванов. – М, 2000. – 74-77 с.

5. Блынская, Е.В. Перспективы развития фармацевтической нанотехнологии / Е.В. Блынская, К.В Алексеев, Р.Н Аляутдин. // Российский хим. журнал. – 2010. – № 6. – С. 38-44.

6. Волова, Т.Г. Материалы для медицины, клеточной и тканевой инженерии / Т. Г. Волова, Е. И. Шишацкая, П. В. Миронов. - Сибирский федеральный университет, 2009. – 48-49с

7. ГОСТ Р ИСО 10993-13-2011. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 13. Идентификация и количественное определение продуктов деградации полимерных медицинских изделий. – М.: Стандартинформ, 2014. – 14-17 с.

8. ГОСТ Р ИСО 10993-9-2011. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 9. Основные принципы идентификации и количественного определения потенциальных продуктов деградации. – М:Стандартинформ, 2014. – 8-11 с.

9. ГОСТ Р ИСО 13781-2011. Смолы и отформованные элементы на основе поли(L-лактида) для хирургических имплантатов. Исследование деградации методом in vitro. – М.: Стандартинформ, 2014. – 9-12 с.

10. Зейналов, Р.В. Стенты с биодеградирующим полимерным покрытием: общее состояние вопроса и перспективы / Р. Зейналов, И.А. Ковальчук, Д.Г. Громов // Международный журнал интервенционной кардиоангиологии. – 2011. – № 25. – С. 42-46.

11. Коржевский, Д.Э. Основы гистологической техники. Практическое руководство / Д.Э. Коржевский, А.В. Гиляров. – Спб.: СпецЛит, 2010. – 87-95 с.

12. Кузин, М.И. Хирургические болезни / М. И. Кузин, О. С. Шкроб, Н.М. Кузин. – М.: Медицина, 2002. – 735-749 с.

13. Лакин, Г.Ф. Биометрия: учебное пособие для вузов / Г.Ф. Лакин. – М.: Высшая школа, 2000. – 309-312 с.

14. Левицкий, И.В. Второе поколение стентов с лекарственным покрытием. Коронарный стент с покрытием зотаролимус / И.В. Левицкий, А.Н. Самко, Е.В.Меркулов // Новости кардиологии. – 2012. – № 3. – С.17-21.

15. Медвецкий, А.И. Полимерные соединения: методы получения и характеристики основных типов транспортных систем на их основе / А.И. Медвецкий, В.А. Компанцев, Л.И. Щербакова, О.М. Марков. – М.: Высшая школа, 2005. – 1-2 с.

16. Савченко, А.П. Интервенционная кардиология. Коронарная ангиография и стентирование / А.П. Савченко, О.В. Черкавская, Б.А. Руденко, П.А. Болотов. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 432-448 с.

17. Сакураи, Я.И. Взаимодействие полимеров медицинского назначения с живым организмом. Введение в биоматериаловедение / Я. Сакураи, Т. Акаикэ // Полимеры медицинского назначения. – 1981. – С. 194–243.

18. Севастьянов, В.И. Биоматериалы для искусственных органов / В.И. Севастьянов, В.И. Шумаков. – М.: Медицина, 1990. – 214-220 с.

19. Севастьянов, В. И. Методология отбора гемосовместимых материалов в условиях in vitro для искусственных органов / В. И Севастьянов // Медицинская техника. – 1990. – № 4. – С. 26–29.

20. Штильман, М.И. Полимеры медико-биологического назначения / М.И. Штильман. – М.: Академкнига, 2006. – 379-400 с.

21. Штильман, М.И. Имплантаты в сердечно-сосудистой хирургии / М.И. Штильман. – М.: Академкнига, 2006. – 83-85 с.

22. Штильман, М.И. Проспект НИИ конструкционных материалов на основе графита / М. И. Штильман // Полимеры медико-биологического назначения. – 2006. – С. 140-143.

23. Левер, М. Д. Системы сердечно-сосудистой стимуляции / М. Д. Левер, Л.Хенч. - М.: Медицина, 1985. – 75–80 с.

24. Amoore, L. Governance, risk and dataveillance in the war on terror/ L. Amoore, M.De Goede. - Crime Law Soc Change. – 2005 - P. 149-173.

25. Axel, D. Paclitaxel inhibits arterial smooth muscle cell proliferation and migration in vitro and in vivo using local drug delivery / D.I. Axel, W. Kunert, C. Goggelmann, M. Oberhoff, C. Herdeg, A. Kuttner, D.H. Wild, B.R. Brehm. Riessen R, G. Koveker, K.R. Karsch / Circulation. – 2001. – № 96. – P. 636-645.

26. Axel, D. Paclitaxel inhibits arterial smooth muscle cell proliferation and migration in vitro and in vivo using local drug delivery / D.I. Axel, W. Kunert, C. Goggelmann, M. Oberhoff, C. Herdeg, A. Kuttner, D.H. Wild, B.R. Brehm. Riessen R, G. Koveker, K.R. Karsch / Circulation. – 2001. – № 96. – P. 678-680.

27. Bogner, A. A history of scanning electron microscopy developments: towards "wet-STEM" imaging / A. Bogner, P.H Jouneau, G.Thollet, D.Basset, C. Gauthier. - Micron (Oxford, England : 1993). – 2007. – P. 390-401.

28. Cartmill, B.T. How do absorbable sutures absorb? A prospective double-blind randomized clinical study of tissue reaction to polyglactin sutures in human skin / B.T Cartmill, D.M. Parham, P.W Strike, L.Griffiths,B. Parkin. – Orbit. – 2014 - № 33. – P. 437-443.

29. Conti, B. Use of polylactic acid for the preparation of microparticulate drug delivery systems/ B Conti, F. Pavanetto, I. Genta. // J. of Microencapsulation. – 1992. – №. 9. – P. 153-166.

30. Costa, M.P. Combined polyglycolic acid tube and autografting versus autografting or polyglycolic acid tube alone. A comparative study of peripheral nerve regeneration in rats/ M.P Costa, N.H Teixeira, M.V Longo, R Gemperli //Sociedade Brasileira para Desenvolvimento Pesquisa em Cirurgia. – 2015. – № 30. – P. 46-53.

31. Eberle, A.L. High-resolution, high-throughput imaging with a multibeam scanning electron microscope / A.L Eberle, S.Mikula, R.Schalek, J Lichtman, M.L. Tate, D.Zeidler // Journal of microscopy. – 2015. – № 2. – P. 114-120.

32. Eisen, H.J. Everolimus for the prevention of allograft rejection and asculopathy in cardiac-transplant recipients / H.J. Eisen, E.M. Tuzcu, R. Dorent // N. Engl. J. Med. – 2003. – № 349. – P. 847-858.

33. Eng, C.P. Activity of rapamycin (AY-22,989) against transplanted tumors / C.P. Eng, S.N. Sehgal, C.Vezina. – 1984. – P. 1231-1237.

34. Granger, D.K. Prolongation of renal allograft survival in a large animal model by oralrapamycin monotherapy. Transplantation. / D.K Granger, J.W Cromwell, S.C Chen. – 1995. – P. 183-186.

35. Gunatillake, P.A. Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering / R.Adhikari, P.A Gunatillake // European Cells and Materials. – 2003. – № 5. – P. 1-16.

36. Jeffries, E.M. Highly elastic and suturable electrospun poly(glycerol sebacate) fibrous scaffolds / E.M Jeffries, R.A Allen, J.Gao, M.Pesce, Y.Wang. // Acta biomaterialia. – 2015. – № 18. – P. 30-39.

37. Karsa, D.R. Chemical aspects of drug delivery systems / D.R. Karsa, R.A. Tephenon // The Royal Society of Chemistry. Cambridge. – 1996. – P.154-161.

38. Landfester, K. Miniemulsions for nanoparticle synthesis / K. Landfester //Top Curr Chem. – 2003. – № 227. – P. 75-124.

39. Lace, R. Biomaterials for ocular reconstruction / R. Lace, C.Murray-Dunning, R. Williams // Journal of Materials Science. – 2014. – № 4. – P. 1523-1534.

40. Moreno, R. Risk of stent thrombosis after sirolimus or paclitaxel eluting coronary stent implantation / R. Moreno, C Fernandez , A. Sanchez-Recalde. – 2007. – P. 110-112.

41. Pihlajamaki, H. The impact of polyglycolide membrane on a tendon after surgical rejoining. A histological and histomorphometric analysis in rabbits / H. Pihlajamaki, O. Tynninen, P. Karjalainen, P. Rokkanen, P. // Journal of biomedical materials research. Part A. – 2007. – №4. – P. 987-993.

42. Ruygrok, P.N. Rapamycin in cardiovascular medicine / P.N. Ruygrok, D.W. Muller, P.W. Serruys // Int. Med. J. – 2003; – №3 – P. 103-109.

43. Sehgal, S.N. Sirolimus: its discovery, biological properties, and mechanism of action. Transplant Proc. /Sehgal S.N., Baker H., Vezina C. // Rapamycin (AY-22,989) a new antifungal antibiotic. II. Fermentation, isolation and characterization. J. Antibiot. – 1975; – №10. – P. 727-732.

44. Song, Z.-m. Prevention of postoperative tendon adhesion by biodegradable electrospun membrane of poly (lactide-co-glycolide) / . Song, Z.-m, Shi, B., Ding, J.-x., Zhuang, X.-l., Zhang, X.-n., Fu, C.-f., and Chen, X.-s. // Chinese Journal of Polymer Science. – 2015. – № 33. – P. 57-58.

45. Udupi, K. Next generation Endeavor Resolute Stent: role of the BioLinx polymer system / K Udupi // Medtronic cardiovascular, Santa Rosa, CA, USA. – P. 95-403.

46. Uhrich, K.E. Polymeric system for controlled drug release / K. E. Uhrich // Chem. Rev. – 1999. – Vol. 99. – P. 3181-3198.

47. Vezina, C. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. / C Vezina, A Kudelski, S. Sehgal.// Antibiot. – 1975. – № 28(10). – P. 721-726.

48. Wessely, R. Comparative characterization of cellular and molecular anti-restenotic profiles of paclitaxel and sirolimus. Implications for local drug delivery. / R Wessely, B. Blaich, R.S. Belaiba. – 2007. – P.1003-1012.

49. Компания «Экофлон» [Офиц. сайт]. URL: http://www.ecoflone.net.

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
06.03.01Биология
Профиль подготовки «Биохимия»

Утверждаю:
Зав. кафедрой
_____ Г.А. Карпова
«2» 11 2016 г.

Задание

По ВКР студента Лукониной Светланы Александровны
Тема работы «Разработка способа обработки полиэфирной ткани для изготовления манжеты сердечного клапана».

Утверждена приказом по Университету от «6» декабря 2016 г. №1191 о/с

Срок сдачи студентом законченной работы «26» мая 2017 г.

КАЛЕНДАРНЫЙ ПЛАН ВКР

№ п/п	Перечень подлежащих разработке вопросов:	Сроки выполнения этапов	Примечания
1	Анализ литературы по теме исследования, написание введения, глав обзора литературы («Сердечно-сосудистая система», «Сердечные клапаны», «Биологические искусственные клапаны сердца», «Механические искусственные клапаны», «Полимерные искусственные клапаны», «Синтетические материалы в хирургии», «Полиэфирное волокно», «Антипролиферативные препараты», «Сиролимус», «Типы транспортных систем на основе полимерных носителей», «Полимеры для доставки лекарственных препаратов»)	ноябрь 2016-апрель 2017	Выполнено
2	Подготовка образцов к исследованию. Моделирование деградации антипролиферативного покрытия в условиях in vitro	ноябрь - декабрь 2016	Выполнено
3	Исследование профиля элюции сиролимуса	декабрь 2016-январь 2017	Выполнено
4	Подкожная имплантация образцов животным животным и забор биоматериала	декабрь 2016-март 2017	Выполнено
5	Проведение гистологического исследования	март-апрель 2017	Выполнено
6	Статистическая обработка результатов исследования, анализ полученных данных	март-апрель 2017	Выполнено
7	Написание глав «Материалы методы исследования», «Результаты исследования и их обсуждение», «Заключение»	февраль-май 2017	Выполнено

Дата выдачи задания «2» 11 2016 г.

Руководитель _____ Кучинина А.Д.

Задание принял к исполнению _____

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
06.03.01Биология
Профиль подготовки «Биохимия»

Утверждаю:
Зав. кафедрой
_____ Г.А. Карпова
«_2_» _11_ 201_6_г.

Задание

По ВКР студента Лукониной Светланы Александровны
Тема работы «Разработка способа обработки полиэфирной ткани для изготовления манжеты сердечного клапана».

Утверждена приказом по Университету от «_6_» декабря 201_6_ г. №_1191 а/о

Срок сдачи студентом законченной работы «_26_» мая 201_7_ г.

КАЛЕНДАРНЫЙ ПЛАН ВКР

№ п/п	Перечень подлежащих разработке вопросов:	Сроки выполнения этапов	Примечания
1	Анализ литературы по теме исследования, написание введения, глав обзора литературы («Сердечно-сосудистая система», «Сердечные клапаны», «Биологические искусственные клапаны сердца», «Механические искусственные клапаны», «Полимерные искусственные клапаны», «Синтетические материалы в хирургии», «Полиэфирное волокно», «Антипролиферативные препараты», «Сиролимус», «Типы транспортных систем на основе полимерных носителей», «Полимеры для доставки лекарственных препаратов»)	ноябрь 2016-апрель 2017	Выполнено
2	Подготовка образцов к исследованию. Моделирование деградации антипролиферативного покрытия в условиях in vitro	ноябрь - декабрь 2016	Выполнено
3	Исследование профиля элюции сиролимуса	декабрь 2016-январь 2017	Выполнено
4	Подкожная имплантация образцов животным животным и забор биоматериала	декабрь 2016-март 2017	Выполнено
5	Проведение гистологического исследования	март-апрель 2017	Выполнено
6	Статистическая обработка результатов исследования, анализ полученных данных	март-апрель 2017	Выполнено
7	Написание глав «Материалы методы исследования», «Результаты исследования и их обсуждение», «Заключение»	февраль-май 2017	Выполнено

Дата выдачи задания «2» 11 2016 г.

Руководитель _____ Кучинина А.Д.

Задание принял к исполнению _____