

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

ПЕНЗЕНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

Факультет
физико-математических
и естественных наук

Кафедра
«Общая биология и биохимия»

Направление подготовки 06.03.01. Биология
Профиль Биохимия
Форма обучения очная

ВЫПУСНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

на тему:

**«ИЗУЧЕНИЕ КИНЕТИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ ВЫСВОБОЖДЕНИЯ
ПРЕПАРАТОВ ИЗ КОМПОЗИЦИОННОГО
ЛЕКАРСТВЕННОГО ПОКРЫТИЯ»**

Студент Шшиш — Шишкина Мария Игоревна

Руководитель Акру Кручинина А.Д.

Нормоконтролёр Акру Кручинина А.Д.

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

Заведующий кафедрой Кар Карпова Г.А.

Работа защищена с отметкой отлично
(протокол заседания ГЭК от 15.06.19 № 9)

Секретарь ГЭК СК Клыченков С.В.

Пенза, 2019

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	6
1.1 Послеоперационные инфекционные осложнения в кардиохирургии	6
1.2 Инфекционный эндокардит	7
1.2.1 Возбудители инфекционного эндокардита	9
1.2.2 Биохимический механизм развития воспаления и тромбообразования	11
1.3 Полимерные системы доставки лекарственных препаратов	14
1.4 Характеристика и действие антимикробных препаратов	18
1.4.1 Антибактериальная терапия	18
1.4.2 Фармакокинетика лекарственных средств	19
1.4.3 Антибиотики, применяемые при лечении инфекционных осложнений	20
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	26
2.1 Материалы исследования	26
2.2 Методы исследования	28
2.2.1 Моделирование деградации лекарственного покрытия in vitro	28
2.2.2 Спектрофотометрический метод определения ванкомицина в растворе	28
2.2.3 Методика определения ванкомицина в растворе методом ВЭЖХ ..	30
2.2.4 Дisko-диффузионный метод	31
2.2.5 Методы статистической обработки результатов	33
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	34
3.1 Оценка антибактериального действия лекарственного покрытия дisko-диффузионным методом	34
3.2 Результаты моделирования деградации лекарственного покрытия in vitro	36

3.2.1 Определение профилей высвобождения ванкомицина при деградации лекарственного покрытия	36
3.2.2 Определение суммарного выхода ванкомицина при деградации лекарственного покрытия	41
3.2.3 Определение остаточного содержания ванкомицина при деградации лекарственного покрытия.....	46
3.2.4 Сравнительная оценка зависимости остаточного содержания ванкомицина от концентрации полимера PLGA 85:15	48
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	50
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	51
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	52

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. Заболевания сердечно-сосудистой системы являются самыми распространёнными в мире. Согласно статистике, ими страдают около 3,5% населения всего земного шара. Они служат причинами более трети летальных исходов, а также приводят к потере трудоспособности многих больных. Особенно высокой является частота инфекционных осложнений после кардиохирургических вмешательств [1].

Реконструктивные клапаносберегающие операции занимают лидирующие позиции [17].

Любой протез – это инородное тело, в связи с этим остаётся высокий риск тромбообразования, инфицирования и механического износа протезов. Типичным осложнением имплантации протеза клапана сердца является инфекционный эндокардит. Заболевание не зависит от модели клапана. Средняя выживаемость к 10-летнему сроку после операций протезирования клапанов составляет 39% - 75% [8].

Традиционным подходом при лечении бактериальных поражений клапанов сердца является классическая лекарственная терапия. Как правило, это антибиотики широкого спектра действия: группы аминогликозидов, гликопептидов, фторхинолов, цефалоспоринов и пенициллинов [12].

Для уничтожения инфекций локализованных на поверхности клапана приходится заполнять антибиотиком весь организм, при этом создать местную повышенную концентрацию путем локальной инъекции не удастся, так как он непрерывно смывается кровью. Поэтому основным принципом, использованным в настоящей работе при создании лекарственного покрытия манжеты клапана сердца, является контролируемое и длительное выделение антибиотика с поверхности биопротеза [29]. Контроль и доставку лекарственного препарата осуществляют биоразлагаемые полимерные системы, применение которых особенно актуально в последнее десятилетие.

Целью данной работы является исследование кинетических параметров высвобождения антибиотика ванкомицина из композиционного лекарственного покрытия.

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

- 1) Подготовить образцы лекарственных покрытий, на основе полимеров PLGA с разным соотношением сополимеров (65:35; 75:25; 85:15) и провести моделирование деградации лекарственных покрытий в условиях *in vitro*;
- 2) Оценить начальное и остаточное содержание ванкомицина при моделировании деградации лекарственных покрытий;
- 3) Оценить количественное высвобождение ванкомицина по неделям при моделировании деградации лекарственного покрытия *in vitro*;
- 4) Оценить возможность использования спектрофотометрического метода и метода ВЭЖХ для оценки количественного высвобождения лекарственного препарата из покрытия и определения остаточного содержания в нём;
- 5) Провести оценку антибактериального эффекта лекарственного покрытия до и после моделирования деградации *in vitro*.

Выпускная квалификационная работа написана на 57 листах, содержит 17 рисунков, 4 таблицы и список литературы на русском и английском языках из 60 источников.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Послеоперационные инфекционные осложнения в кардиохирургии

Частота развития инфекционных осложнений после кардиохирургических операций по литературным данным составляет от 4,9 до 30,8%, что обусловлено разным исходным статусом больных, особенностями операции и послеоперационного периода.

Можно выделить 2 механизма инфицирования при нозокомиальных инфекциях: экзо- и эндогенный путь. Экзогенное инфицирование происходит во время проведения инвазивных процедур. В условиях современного стационара этот путь инфицирования хорошо поддается контролю посредством соблюдения правил асептики и антисептики. Но несмотря на это даже в ведущих клиниках мира частота инфекционных осложнений после операций на открытом сердце остается достаточно высокой. Это связано с эндогенным путём инфицирования, который сопровождается выраженным изменением гомеостаза и микроциркуляции, а также ослаблением барьерных свойств слизистых оболочек с транслокацией бактерий в системный кровоток.

Госпитальные инфекции в большинстве случаев обусловлены полирезистентной микрофлорой, что приводит к серьезным проблемам при назначении адекватной терапии.

Для инфекционных очагов различной локализации характерны свои возбудители. Так, при ИВЛ-ассоциированной пневмонии и мочевых инфекциях выделяются грамотрицательные бактерии, в области хирургического вмешательства, катетерных инфекций кровотока и протезного эндокардита характерна ведущая роль стафилококков. В структуре патогенов доля грамотрицательных микроорганизмов составила 62 %, грамположительных – 47 %, в 19 % случаев были выделены грибы [27].

У пациентов, которые длительно находятся в отделении интенсивной терапии, чаще развиваются инфекции, вызванные стафилококками, а также полирезистентными штаммами *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* и грибами. Знание этих особенностей необходимо для назначения адекватных режимов антибиотикотерапии [3].

Эволюция микроорганизмов привела к формированию и глобальному распространению резистентных штаммов, зачастую нечувствительных к большинству доступных антимикробных препаратов. В кардиохирургическом стационаре в настоящее время наибольшую проблему оказывают метициллинрезистентные штаммы золотистого и коагулазонегативных стафилококков, а также штаммы *Enterococcus faecium* со сниженной чувствительностью к ванкомицину. После окончания операции в ближайшие несколько суток показано продолжение системного введения антибиотика, который использовали для антибиотикопрофилактики. Антибиотики назначают, не дожидаясь микробиологических данных, с учетом локализации процесса и предполагаемого возбудителя. Необходимо оптимально использовать имеющиеся антибиотики, не допуская их избыточного применения, что повлечет за собой лишь рост резистентности среди нозокомиальных патогенов [27].

1.2 Инфекционный эндокардит

Одной из наиболее актуальных проблем современной клинической медицины является инфекционный эндокардит. В последнее время отмечается увеличение частоты заболевания как в нашей стране, так и за рубежом [11].

Заболеваемость, по данным разных авторов, составляет от 1,7 до 11,6 случая на 100 тыс. населения в год. У мужчин ИЭ встречается в 1,5–3 раза чаще, чем у женщин, а в возрастной популяции старше 60 лет — это соотношение достигает 8:1. Средний возраст заболевших составляет 43–50 лет. Клиника инфекционного эндокардита разнообразна, поэтому необходимо грамотно назначить лечение [3].

Инфекция возникает чаще на патологически изменённом клапане или эндокардите. Поэтому в группе риска находятся пациенты с ревматическими, атеросклеротическими повреждениями клапанов сердца, а также больные с искусственными клапанами сердца [13].

На клапанах сердца формируются вегетации, включающие в себя колонии микроорганизмов, воспалительные клетки, эритроциты и фибрин. Это приводит к развитию деструктивного процесса, в результате которого нарушается функция клапанов сердца, образуются тромбы, формируется сердечная недостаточность.

Чаще всего инфекционный эндокардит поражает аортальный клапан – 62 - 66%, митральный – 14 - 49%. В процесс могут быть вовлечены несколько клапанов – в 13% случаев.

Протезный инфекционный эндокардит протекает тяжелее, чем поражение нативных клапанов. При этом заболевании отмечается высокая летальность форм – до 75% [14].

Инфекционный эндокардит (ИЭ) в течение последних 30 лет становится все более значимой проблемой кардиологии по следующим причинам:

- несмотря на обилие новых бактерицидных средств и широко используемого хирургического лечения, летальность остается высокой – от 18 до 36% [47];

- проблематична ранняя диагностика [1];

Основными принципами антибактериального лечения ИЭ являются:

1. Этиотропность антибактериальной терапии. При ИЭ, как и при любом другом инфекционном заболевании, требуется установление этиологии заболевания.

2. Выбор препаратов с преимущественно бактерицидным действием должен проводиться в соответствии с результатами антибиотикограммы, отражающей степень чувствительности/резистентности возбудителя.

3. Обязательное комбинирование нескольких антибактериальных препаратов должно обеспечивать усиление их бактерицидного действия. Парентеральный, преимущественно внутривенный, путь введения препаратов обеспечивает точное дозирование и, следовательно, поддержание адекватной бактерицидной концентрации в крови.

4. Длительность лечения должна обеспечивать уничтожение возбудителя ИЭ и обеспечение диффузии антибиотиков в вегетации в целях их стерилизации. При достижении эффекта терапия ИЭ должна быть продолжительной: при стрептококковом ИЭ не менее 4 нед, при стафилококковом — не менее 6 нед. [15].

1.2.1 Возбудители инфекционного эндокардита

Инфекционный эндокардит представляет собой полиэтиологичное заболевание, которое обусловлено чрезвычайно широким спектром возбудителей.

Чаще всего причиной ИЭ становится стрептококк *Str. viridans*, на долю которого приходится около 45% всех возбудителей заболевания. Он обитает в полости рта и может попадать в кровоток при стоматологических манипуляциях.

Другой представитель зеленеющих стрептококков *S. bovis* является причиной более чем 10% случаев заболевания, особенно на фоне воспалительных и онкологических процессов в толстом кишечнике.

Клапанные протезы сердца поражают коагулазопозитивные (*S. aureus*) и коагулазонегативные (*S. epidermidis* и др.) стафилококки.

Смертность от инфекции, вызванной *Staph.aureus*, составляет 86–90 %, *Staph.epidermidis*, — 52–60 % [9].

К началу XXI века существенную роль стали играть грамотрицательные бактерии. Спектр грамотрицательных бактерий довольно широк: *Hemophilus species*, *E.coli*, *Klebsiella species*, *Proteuss pecies*, *Pseudomonas species*, *Serratia*, *Alcaligenes feacalis*, *Eikenella corrodens*.

Эти возбудители выявляются большей степени при поражении клапанных протезов, а также при повторных ИЭ, первоначально вызванных другим агентом [13].

Также представляет интерес группа медленно растущих, грамотрицательных палочек, объединяемых аббревиатурой НАСЕК.

Среди прочих возбудителей можно отметить грамположительные палочки рода *Corynebacterium* (дифтероиды), которые входят в состав нормальной микрофлоры кожи и полости рта. Они являются причиной как раннего, так и позднего ИЭ клапанных протезов (8,9 и 3,2% соответственно).

Реже всего причиной инфекционного эндокардита являются риккетсии (*Coxiella burnetii*), бруцеллы, хламидии и легионеллы. Эти микроорганизмы требуют особых условий культивирования, поэтому данная инфекция может быть диагностирована с помощью специальных тестов. На развитие инфекционного эндокардита влияет способность микроорганизмов к адгезии. В большей степени это присуще грамположительным коккам (особенно *Str. viridans*) и гораздо в меньшей степени – грамотрицательным бактериям [32].

Развитие инфекционного эндокардита обусловлено несколькими факторами:

Первое – повреждение эндотелия сердечных клапанов и пристеночного эндокарда, являющиеся результатом:

- а) воспалительных и дегенеративных процессов;
- б) нарушения внутрисердечной гемодинамики на фоне врожденных или приобретенных пороков сердца;
- в) травмирование концом подключичного катетера или во время струйных внутривенных введений любых лекарственных препаратов, которые приводят к попаданию в эндокардит мельчайших пузырьков воздуха.

В очагах травмированного эндотелия формируются асептические вегетации, состоящие из тромбоцитов и фибрина, являющиеся своеобразным «ложом» для ИЭ.

Второе – транзиторная бактериемия, которая развивается при повреждении кожи и слизистых оболочек под влиянием травмирующих агентов, например, при медицинских манипуляциях. Интенсивность микробной инвазии в кровотоки зависит от объема травмы, времени экспозиции и плотности микроорганизмов в зоне повреждения.

Происходит адгезия микроорганизмов с образованием покрывающего слоя из тромбоцитов и фибрина на поверхности тромботических наложений. Формируется зона локального агранулоцитоза, недоступная для фагоцитов. Это обеспечивает выживание и дальнейшее развитие микроорганизмов. Бактериальные колонии разрастаются, вызывая деструкцию сердечных клапанов [3].

После замены клапана сердца наблюдаются различные осложнения. Протезы, взаимодействуя с компонентами крови, в организме человека испытывают непрерывные силовые воздействия. Поэтому существуют требования по био- и гемосовместимости, прочности, долговечности, износостойкости и неизменности формы компонентов протеза [32].

1.2.2 Биохимический механизм воспаления и тромбообразования

После операций есть высокий риск развития воспалительной реакции, т.к. механическое воздействие на стенки артерии вызывает деэндотелизацию стенки сосуда, сопровождается повреждениями клеток интимы, формированием пристеночного тромба. Этот каскад событий приводит к инфильтрации зон повреждения клетками гематогенного происхождения и развитию воспалительного процесса [44].

В ряде случаев стенты с лекарственным покрытием могут вызывать системное воспаление и даже приводить к поздним тромбозам [59].

Воспаление – это сложный патологический процесс, с его помощью организм реагирует на повреждение тканей.

Вследствие повреждения клеток высвобождаются соединения, ранее находящиеся в клетках, в основном вещество соединительной ткани, в котором содержатся фибриллярные компоненты и практически все белки крови.

Затем происходит усиление микроциркуляции из-за действия биогенных аминов и продуктов распада некоторых тканевых элементов. Одним из первых процессов является высвобождение гистамина и гепарина из гранул тучных клеток. Их действие проявляется уже через несколько секунд после нанесения повреждения, что подтверждает их предварительный синтез и депонирование. Гистамин приводит к релаксации гладкой мускулатуры и повышению проницаемости сосудистой стенки. Гепарин связывает основные белки, вышедшие из разрушенных клеток.

Также высвобождается серотонин, оказывающий влияние на сосуды. Из поврежденных или погибших клеток выходят гидролазы, расщепляющие белки. Из α 2-глобулинов крови образуются кинины, которые пролонгируют повышенную проницаемость сосудов. Гистамин и серотонин быстро инактивируются и поэтому время их действия ограничено.

В очаг воспаления начинают выходить другие компоненты крови, прежде всего фибриноген и тромбоциты, а затем иммуноглобулины и части системы комплемента. Фибриноген участвует в образовании фибрина, что приводит к ограничению очага воспаления и способствует агрегации тромбоцитов, полимеризации фибрина и возникновению тромбов [40, 49, 50].

Следствием тромбоза являются нарушения микроциркуляции с последующей гипоксией. При этом аэробный метаболизм изменяется на анаэробный, происходит повышенная выработка лактата и снижение значения pH. Происходит активация тромбоцитов, которые взаимодействуя с молекулами коллагена, выделяют новые порции серотонина.

При гидролизе фосфолипидов цитоплазматических мембран образуются арахидоновая кислота, из которой синтезируются простагландины. Они повышают проницаемость стенок сосудов и чувствительность болевых рецепторов. При длительном течении воспалительного процесса макрофаги продуцируют простагландины, которые способны целенаправленно ингибировать синтез некоторых медиаторов [32].

Вместе с высокомолекулярными компонентами плазмы крови в очаг воспаления поступают вода, ионы, глюкоза и другие низкомолекулярные соединения. Вода обычно находится в динамическом равновесии с элементами соединительной ткани. Вода, накапливаясь в очаге воспаления, уменьшает концентрацию соединений, обладающих повреждающим действием, и тем самым снижает интенсивность этого действия.

Кроме ингибиторов протеаз, из плазмы в очаг воспаления выходят и молекулы иммуноглобулинов, которые участвуют в иммунных реакциях. Затем в очаг воспаления активно проникают нейтрофильные лейкоциты и макрофаги. Порядок действия этих клеток определяется величиной pH очага воспаления. Макрофаги синтезируют ферменты, разрушающие структуры, находящиеся в зоне воспаления. Фагоцитоз и разрушение фагоцитированных структур является главными функциями макрофагов. Они освобождают область воспаления от продуктов распада клеток. [47].

Самым распространённым осложнением при замене клапана сердца является тромбообразование.

Определённую роль в возможном образовании тромбов играет электрический потенциал его поверхности. Форменные элементы крови и эндотелий, выстилающий стенки сердечно-сосудистой системы, заряжены отрицательно. При повреждении эндотелия возникает положительный электрический потенциал, способствующий осаждению на этом участке тромбоцитов и лейкоцитов. Механизм тромбообразования на биологических поверхностях очень сложен, что объясняется каскадным характером свертывания крови [52].

Первый акт взаимодействия крови с любым инородным имплантатом заключается в адсорбции на его поверхности белков плазмы крови и контактных факторов свёртывания крови.

Если происходит адсорбция фибриногена, то инородное тело становится активным по отношению к тромбоцитам. Их количество на инородной поверхности возрастает. Адгезия тромбоцитов – слипание их с поверхностью – вторая стадия процесса. Вслед за адгезией происходит разрушение тромбоцитов, их слипание между собой и с поверхностью. Одновременно адсорбируются и контактные факторы свёртывания крови. Они инициирует каскад ферментативных реакций, который заканчивается выделением в кровь тромбина. Образование тромбов происходит на инородной поверхности в течение одной минуты [29].

1.3 Полимерные системы доставки лекарственных препаратов

Развитие современных медицинских технологий было бы невозможно без применения различных материалов со специальными свойствами. Синтетические биоразлагаемые полимеры широко используются для создания систем контролируемой доставки лекарственных препаратов, шовных хирургических материалов, для изготовления ортопедических изделий (винты, штифты, стержни), а также нетканых материалов и матриксов для тканевой инженерии.

Лекарственные препараты длительного высвобождения не могут поддерживать концентрацию на нужном уровне. Поэтому перспективным направлением считается создание комбинированного покрытия, состоящего из препарата и полимерной системы адресной доставки [25]. Технология контролируемого высвобождения позволяет обеспечить:

- постоянную концентрацию терапевтически активного соединения в крови;

- предсказуемую скорость высвобождения на протяжении длительного периода времени;
- защиту биоактивных соединений, имеющих очень короткий период полураспада;
- устранение побочных эффектов лекарств и частое дозирование;
- решение проблем, связанных со стабильностью лекарств [37].

Регулирование молекулярной и надмолекулярной структуры биоразлагаемых полимеров позволяет управлять физико-химическими и физико-механическими характеристиками материалов, а также кинетикой их биodeградации.

Для создания полимерных наночастиц используются полимолочная и полигликолевая кислоты, а также их различные сополимеры, которые широко применяются в медицине и биотехнологии [39, 51].

Эти полимеры деградируют в организме человека до естественных метаболитов молочной и гликолевой кислот. Данные сополимеры позволяют контролировать скорость биodeградации материалов, что позволяет их использовать при создании комбинированного лекарственного покрытия [54].

Ангидриды гидролизуются при физиологических условиях, что приводит к разложению полимера [57].

Однако благодаря наличию гидрофобных областей разрушение происходит только на поверхности, так как вода не может проникнуть в объем полимера. Это приводит к тому, что процесс эрозии хорошо контролируется, и следовательно высвобождение препарата часто продолжается дольше [59; 60].

Полигликолид (polyglycolide – PGA) является простейшим полиэфиром, в котором сильно выражены межмолекулярные взаимодействия, его отличает высокая степень кристалличности, а также чрезвычайная гидролитическая нестабильность [18].

В отличие от полилактида, полигликолид не растворяется в большинстве органических растворителей, растворяющих полилактоны, таких как ацетон, хлороформ, метиленхлорид.

Однако из-за жесткости и сложностей в переработке чистый полигликолид практически не применяется, для уменьшения жесткости в полимерную цепь полигликолида вводят 10% звеньев лактида [20].

Полилактид (polylactide – PLA) является полиэфиром молочной кислоты, представляет собой бесцветные кристаллы. Относится к разрушаемым полимерам, для него характерны высокие скорости разрушения в биологических средах.

Биоразлагаемые полиэфиры полилактидгликолида (PLGA) являются одними из наиболее часто используемых полимеров для доставки лекарств и биомолекул. Полилактидгликолиды могут быть получены синтетическим путем из молочной и гликолевой кислот, образующих между собой сложноэфирную связь [53].

На физико-химические свойства PLGA влияют молярное соотношение расположение молочной и гликолевых кислот.

Полимер растворим в большинстве растворителей, в том числе хлорсодержащих растворителях, тетрагидрофуране, ацетоне, этилацетате. В воде PLGA разлагается в результате гидролиза эфирных связей [18,43,53]. Широко изучено влияние этих свойств полимера на скорость высвобождения лекарственного вещества из полимерной матрицы.

Применение пролонгированных лекарственных форм на основе PLGA дает определенные преимущества:

- увеличение биодоступности лекарственного препарата, сокращение общего количества лекарственного вещества необходимого для терапевтической дозы и уменьшение кратности его приема;
- поддержание постоянной терапевтической концентрации в крови [15,22].

Биодеградирование всех полимерных соединений можно разделить на 2 типа.

1) Поверхностная эрозия, отличается медленным проникновением воды в частицу с образованием гетерогенной дисперсии по всей матрице. Уменьшению диаметра частиц происходит с постоянной скоростью.

2) Массовая эрозия, которая характеризуется равномерным распределением воды в матрице и сохранением своего первоначального размера [36, 46].

На высвобождение лекарственного препарата из полимерной матрицы влияют процессы: диффузии, биodeградации, или сочетание этих двух механизмов.

Можно выделить три основных механизма, по которым происходит высвобождение лекарств:

1. Активный агент связан ковалентными связями с полимером (системы концевой цепи). Расщепление цепи сопровождается высвобождением АФИ с контролируемой скоростью.
2. АФИ содержится в сердцевинном слое, окруженном биоразлагаемой оболочкой. Скорость разрушения окружающей оболочки определяет скорость высвобождения препарата, как только оболочка будет полностью разрушена, хирургического удаления устройства не потребуется.
3. Равномерная дисперсия препарата в полимере, а высвобождение лекарства контролируется процессами диффузии и эрозии [54].

Кроме того, необходимо учитывать молекулярную массу полимера, т.к. переплетения между цепями могут мешать всасыванию воды в объём, и растворение препарата замедлится.

Полимер разлагается до тех пор, пока его молекулярная масса не снизится до критического значения, при этом олигомеры смогут диффундировать из объёма. Это приводит к существенному разрушению и образованию пор. Через поры всасывается вода, что способствует высвобождению препарата.

При использовании полимера с малой молекулярной массой (примерно 4000 г/моль) препарата сразу будет высвобождаться [37].

1.4 Характеристика и действие антимикробных препаратов

1.4.1 Антибактериальная терапия

Для повышения эффективности лечения бактериальных инфекций необходимы: точный диагноз, определение предполагаемого возбудителя, выбор оптимального препарата в соответствии с инфекционно-воспалительным процессом, выбор оптимальной дозы, учёт особенностей фармакокинетики препаратов.

При проведении антибактериальной терапии выбор препарата и режима дозирования базируется на клинической фармакологии ЛС и определяется:

1. Фармакодинамикой АБП: антибактериальной активностью, эффектом действия;
2. Фармакокинетикой препарата;
3. Прогнозируемыми нежелательными лекарственными реакциям;
4. Стоимостью лечения.

Важной характеристикой антибиотика является спектр и степень его активности в отношении микроорганизмов. Количественным выражением активности АМП является его минимальная подавляющая концентрация (МПК). Чем меньше, тем более активен препарат.

Разнообразие внутрибольничных инфекций определяет необходимость проведения постоянного микробиологического мониторинга в стационаре [6].

Из грамположительных кокков самыми проблематичными в плане антибиотикотерапии являются энтерококки и стафилококки. В отношении энтерококков, как правило, бактерицидными оказываются комбинации пенициллинов и гликопептидов с аминогликозидами.

Синергизм бактерицидного действия комбинаций антибиотиков является основным принципом оптимальной терапии энтерококкового ИЭ, который может быть залогом успешного лечения при ИЭ, вызванном другими микроорганизмами.

Данные о резистентности стрептококков или стафилококков, вызывающих ИЭ, не всегда коррелируют со снижением эффективности выбранного медикаментозного лечения или замедлением клинического ответа на применение пенициллинов, цефалоспоринов или гликопептидов.

В случае нозокомиального стафилококкового ИЭ необходимо определить чувствительность возбудителя к оксациллину. Оксациллинорезистентные штаммы стафилококков можно рассматривать как резистентные ко всем β -лактамным антибиотикам, особенно при высокой резистентности. В случае резистентности стафилококков к оксациллину следует определить чувствительность к тейкопланину. Последний, а также ванкомицин одинаково активны в отношении золотистого стафилококка,

При обнаружении синегнойной палочки необходимо определить ее чувствительность к β -лактамным антибиотикам, аминогликозидам и фторхинолонам. Для лечения ИЭ предпочтительнее использовать комбинации антибиотиков, что позволяет:

1. Достичь высоких бактерицидных концентраций антимикробных препаратов.

1. Предупредить развитие резистентности.

Наиболее выраженным бактерицидным эффектом обладает комбинация β -лактамного антибиотика или гликопептида с аминогликозидами [16].

1.4.2 Фармакокинетика лекарственных средств

Целью противомикробной терапии является создание и поддержание в месте бактериальной инфекции концентрации активного АМП препарата, обеспечивающей бактерицидный эффект в отношении возбудителей заболевания. Период полувыведения определяет кратность введения или приёма АМП. Также больше значение имеет распределение препарата и его способность проникать через тканевые барьеры.

На это влияет лиофильность – вещества с высокой лиофильностью легче проникают в ткани. Распределение в организме противомикробные препараты связываются с белками плазмы крови. Высокое сродство с белками плазмы препятствуют образованию высоких концентратов препарат во внесосудистом русле. Распределены в организме, большинство АБП связываются с альбуминами. Степень ионизации антибиотика также имеет большое значение. Для накопления соединений с высокой степенью ионизации (аминогликозидов и β -лактамы антибиотиков) требуется кислая среда.

К хорошо всасываемым препаратам (более 70% от дозы) относятся: ампициллин, амоксициллин, рифампицин, фторхинолы и др.

Лекарственные препараты выводятся из организма преимущественно почками. Некоторые антибиотик выводятся с желчью – рифампицин, фторхинолы, эритромицин.

Под взаимодействием ЛС понимается изменение эффективности и безопасно одного ЛС при одновременном его применении с другим ЛС [4,19].

Комбинированные назначенные антибиотиков используется для: повышения силы антибактериального действия, увеличения терапевтической эффективности; замедление развития резистентности при хронической инфекции. Синергизм — это однонаправленное действие ЛС обеспечивающее более сильный клинический эффект, чем действие ЛС в отдельности [2].

1.4.3 Антибиотики, применимые при лечении инфекционных осложнений

Аминогликозиды оказывают бактерицидное действие благодаря нарушению синтеза белка на рибосомах. Аминогликозиды редко вызывают аллергические реакции. Главное значение – они активны по отношению к аэробным грамотрицательным бактериям. Можно выделить три поколения аминогликозидов:

1 поколение – стрептомицин, неомицин, канамицин

2 поколение – гентамицин, торбрамицин, сизомицин

3 поколение – амикацин, нетилмицин.

Наиболее чувствительными к данным антибиотикам являются стафилококки, а также грамотрицательные энтеробактерии. Стрептококки и энтерококки умеренно чувствительны.

Амикацин быстро всасывается при внутримышечном введении, является гидрофильным соединением, поэтому распределяется в сосудистом русле и внеклеточной жидкости. Препарат не метаболизируется в печени, выводится почками.

Для профилактики побочных эффектов следует соблюдать дозировку амикацина. Она рассчитывается исходя из массы тела, а также индивидуальных особенностей: функции почек, локализации инфекции.

Резистентность к амикацину развивается медленно. К недостаткам этого антибиотика, относится проявление токсичности, в частности, ото- и нефротоксичность. Известно, что комплекс аминогликозидов с биосовместимыми полимерами приводит к снижению острой токсичности данных антибиотиков [12].

Гентамицины образуются культурой *Mycromonospora purpurea*. Антибиотик обладает широким спектром биологического действия; подавляет развитие грамположительных и грамотрицательных бактерий, не оказывает действия на грибы. Устойчивость к гентамицинам проявляется относительно медленно и скачкообразно. Наиболее часто используется в медицинской практике при лечении тяжелых гнойных инфекций [31].

Фторхинолоны (ФХ) являются сегодня одним из важнейших классов антимикробных препаратов (АМП). Их «классический» представитель (ципрофлоксацин) широко применяются в клинической практике при различной инфекционной патологии человека, включая хирургические инфекции кожи и мягких тканей (ИКМТ) [34].

Фторхинолы действуют на большое количество грамотрицательных микроорганизмов и стафилококков, грамотрицательных энтеробактерий, в том числе на многие нозокомиальные штаммы, устойчивые к цефалоспори-нам и аминогликозидам.

Ципрофлоксацин хорошо проникает в ткани и органы, реже вызывает побочные эффекты со стороны ЖКТ и ЦНС, выпускается в виде растворов для внутривенных инфузий [40]. Ципрофлоксацин, как и другие фторхинолы, может рассматриваться в качестве важной альтернативы наиболее эффектив-ным антибиотикам широкого спектра действия при лечении большого круга инфекций [24].

В связи с широким распространением полирезистентных патогенных микроорганизмов в мировой медицинской практике высока потребность в антибиотиках, относящихся к химической группе пептидов (в частности, гликопептидов), благодаря их значительной противобактериальной активно-сти в отношении возбудителей с множественной лекарственной устойчи-востью. На данный момент в эту группу антибиотиков в номенклатуре проти-вобактериальных медицинских препаратов входят даптомицин, рамопланин, тейкопланин и ванкомицин. Эти антибиотики обладают активностью в отно-шении грамположительных бактерий.

Бактерицидный тип действия и высокая активность в отношении мик-роорганизмов – вот главное преимущество гликопептидных антибиотиков [28].

Более полувека антибиотик ванкомицин является основой этиотропной терапии тяжелых инфекций, вызываемых грамположительными бактериями, которые устойчивы к другим широко применяемым антибиотикам. К таким бактериям, в первую очередь, относятся стафилококки, устойчивые к β -лактамным антибиотикам, а также некоторые стрептококки, энтерококки. Ванкомицин не оказывает влияния на грамотрицательные микроорганизмы. Препарат не всасывается при приеме внутрь, хорошо распределяется в орга-низме, не метаболизируется, выводится почками. Часто ванкомицин назна-чают для антибиотикопрофилактики в пред- и послеоперационные периоды [19].

Профилактическое применение ванкомицина, возможно, оправдано у пациентов с инфекционным эндокардитом, в частности искусственного клапана, которым планируется выполнение инвазивных процедур, способных вызвать транзиторную бактериемию. [30]

Цефалоспорины по химическому строению принадлежат к группе β -лактамных соединений, близких к пенициллинам. Цефалоспорины подавляют развитие грамположительных и грамотрицательных бактерий, но активность их гораздо ниже, чем у пенициллина.

В зависимости от свойств и времени получения цефалоспорины подразделяют на четыре поколения.

Цефалоспорины 1 поколения (цефалоридин, цефалотин, цефазолин, цефалексин и др.) высоко активны в отношении стафилококков, стрептококков, пневмококков, многих видов энтеробактерий, в том числе *E. coli*, *Proteus mirabilis*.

Цефалоспорины 2 поколения (цефамандол, цефокситин, цефуроксим и др.) характеризуются высокой активностью в отношении грамотрицательных бактерий, устойчивы к действию β -лактамаз. Они не оказывают заметного действия на энтерококки, *Pseudomonas aeruginosa*.

Цефалоспорины 3 поколения (цефотаксим, цефаклор, цефтазидим, цефтриаксон, цефтизоксим, цефоперазон, цефпирамид) высоко активны в отношении энтеробактерий, в том числе устойчивых к другим антибиотикам [21].

Пенициллин оказывает антимикробное действие в отношении грамположительных бактерий (стафилококки, стрептококки и некоторые другие) и практически неактивен в отношении грамотрицательных бактерий и дрожжей. По характеру действия на микроорганизмы пенициллин – бактериостатический, а в определенных концентрациях – бактериоцидный антибиотик.

Микроорганизмы чувствительные к пенициллину относительно легко и быстро приобретают устойчивость к антибиотику. У бактерий устойчивость к пенициллинам связана с их способностью образовывать фермент β -лактамазу.

Пенициллин нашел широкое применение в медицине благодаря высоким лечебным свойствам и чрезвычайно низкой токсичности. Одним из первых заболеваний, при котором стали применять этот антибиотик, был сепсис (общая гнойная инфекция). Пенициллин широко применяется в хирургии, успешно используется при лечении остеомиелитов (особенно острых остеомиелитов), карбункулов, инфицированных ран и других заболеваний. [33]

Оксациллин - бактерицидный антибиотик из группы полусинтетических пенициллинов, который устойчив к действию пенициллиназы. Активен в отношении грамположительных микроорганизмов: *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., в том числе *Streptococcus pneumoniae*, анаэробных спорообразующих палочек; грамотрицательных кокков. Не проявляет активность в отношении большинства грамотрицательных бактерий, риккетсий, вирусов, простейших, грибов. Устойчивость развивается медленно. Антибиотик способен блокировать синтез клеточной стенки бактерий за счет нарушения поздних этапов синтеза пептидогликана.

Применяется при инфекционных заболеваниях, вызванных грамположительными микроорганизмами: сепсис, абсцесс, холецистит, пиелонефрит, остеомиелит, послеоперационные и раневые инфекции, инфицированные ожоги, инфекционный эндокардит, менингит, синусит [6].

Ампициллин - полусинтетический антибиотик, который не разрушается в кислой среде желудка, хорошо всасывается при приеме внутрь.

Проявляет активность в отношении грамположительных микроорганизмов, на которые действует бензилпенициллин.

Также действует на ряд грамотрицательных микроорганизмов *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* и поэтому рассматривается как антибиотик широкого спектра действия. Особенно часто его назначают при заболеваниях, вызванных смешанной инфекцией. Не активен в отношении грамотрицательных бактерий, риккетсий, вирусов, простейших, грибов. Устойчивость развивается медленно.

Применяют ампициллин для лечения больных у которых выявлены следующие заболевания: абсцессы легких, перитонит, холецистит, сепсис, кишечные инфекции, а также при послеоперационных инфекциях мягких тканей [6].

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1 Материалы исследования

Поскольку материалом для изготовления манжеты клапана сердца служит полиэфирная ткань, объектом исследования являлось лекарственное покрытие, нанесенное в виде полимерной пленки, содержащей антибактериальный препарат, на поверхность синтетического материала.

Композиционное лекарственное покрытие пролонгированного действия состоит из антибактериального вещества, в роли которого выступает ванкомицин, а также из полимера PLGA с разным соотношением сополимеров: 65:35; 75:25; 85:15. Полимер не влияет на структуру лекарственного вещества, продукты его метаболизма не оказывают негативного действия на организм. Антибиотик сохраняет свой терапевтический эффект и высвобождается при гидролизе полимерной матрицы в неизменном виде.

Для исследования кинетических параметров высвобождения ванкомицина и оценки антибактериального эффекта лекарственного покрытия были изготовлены следующие группы экспериментальных образцов:

Группа 1 – лекарственное покрытие, изготовленное на основе полимера PLGA (65:35 Mr 60 кДа, характеристическая вязкость 0,62 дл/г, полидисперсность 1,69) (Lactel, США).

Группа 2 – лекарственное покрытие, изготовленное на основе полимера PLGA (75:25 Mr 60 кДа, характеристическая вязкость 0,62 дл/г, полидисперсность 1,69) (Lactel, США).

Группа 3 – лекарственное покрытие, изготовленное на основе полимера PLGA (85:15 Mr 60 кДа, характеристическая вязкость 0,62 дл/г, полидисперсность 1,69) (Lactel, США).

Лекарственное покрытие получено путём смешения раствора ванкомицина с раствором полимера в соотношении (5:1). Полученный раствор наносили на круги из полиэфирной ткани с помощью дозатора. Образцы высушивались в термощкафу при 37°C, затем были упакованы в фольгированные и газопроницаемые пакеты для стерилизации оксидом этилена.

Для оценки зависимости выхода ванкомицина от концентрации полимера PLGA (85:15) были изготовлены следующие группы экспериментальных образцов:

Группа 1 – лекарственное покрытие, изготовленное на основе полимера 1% PLGA (85:15 Mr 60 кДа, характеристическая вязкость 0,62 дл/г, полидисперсность 1,69) (Lactel, США).

Группа 2 – лекарственное покрытие, изготовленное на основе полимера 3% PLGA (85:15 Mr 60 кДа, характеристическая вязкость 0,62 дл/г, полидисперсность 1,69) (Lactel, США).

Группа 3 – лекарственное покрытие, изготовленное на основе полимера 5% PLGA (85:15 Mr 60 кДа, характеристическая вязкость 0,62 дл/г, полидисперсность 1,69) (Lactel, США).

Группа 4 – лекарственное покрытие, изготовленное на основе полимера 7% PLGA (85:15 Mr 60 кДа, характеристическая вязкость 0,62 дл/г, полидисперсность 1,69) (Lactel, США).

Группа 5 – лекарственное покрытие, изготовленное на основе полимера 10% PLGA (85:15 Mr 60 кДа, характеристическая вязкость 0,62 дл/г, полидисперсность 1,69) (Lactel, США).

2.2. Методы исследования

2.2.1 Моделирование деградации лекарственного покрытия *in vitro*

Для проведения эксперимента по моделированию деградации *in vitro* для каждой экспериментальной группы было получено 50 образцов лекарственного покрытия. В 5 образцах определяли начальное содержание ванкомицина путем растворения покрытия в смеси вода:хлороформ в течение 30 минут и последующего анализа водной фазы спектрофотометрическим методом на длине волны 280 нм в кювете с длиной оптического пути 1 см, методом ВЭЖХ.

Для изучения процессов деградации лекарственного покрытия *in vitro* использовали 0,1М фосфатный буфер pH=7,4 [8]. Каждый образец выдерживался в растворе при 37°C в течение 9 недель, замену буфера проводили каждую неделю.

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 [14], методом ВЭЖХ, а также при помощи ВЭЖХ.

В 5 образцах после инкубации в фосфатном буфере определяли остаточное содержание ванкомицина путем растворения покрытия в смеси вода:хлороформ в течение 30 минут и последующего анализа полученного раствора спектрофотометрическим методом на длине волны 280 нм в кювете с длиной оптического пути 1 см, а также при помощи ВЭЖХ.

2.2.2 Спектрофотометрический метод определения ванкомицина

Спектрофотометрический метод базируется на способности поглощения молекулами и атомами излучения, имеющего электромагнитную природу.

Основная зависимость, изучаемая в спектрофотометрии, - зависимость интенсивности поглощения падающего света от длины волны.

По данным литературы, ванкомицин можно обнаружить с помощью УФ-спектроскопии на длине волны 280 нм [14].

В ходе исследования для определения высвобождения антибиотика в раствор каждую неделю отбирались по 5 кругов, высушивались в термошкафу при 37°C и хранились в холодильнике. Затем образцы растворялись в смеси вода : хлороформ, время экстракции 30 минут. Содержание ванкомицина определяли методом УФ-спектроскопии на длине волны 280 нм в кювете с длиной оптического пути 1 см.

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 мл воды	V мл препарата		C мкг/мл
1	0,96	0,04		4
2	0,92	0,08		8
3	0,88	0,12		12
4	0,84	0,16		16
5	0,8	0,2		20
6	0,76	0,24		24
7	0,72	0,28		28
8	0,68	0,32		32
9	0,64	0,36		36
10	0,6	0,4		40
11	0,5	0,5		50
12	0,4	0,6		60
13	0,3	0,7		70
14	0,2	0,8		80
15	0,1	0,9		90
16	0	1		100
17	1	0		0

Калибровка по ванкомицину



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

2.2.3 Методика определения ванкомицина ВЭЖХ

Возможности метода ВЭЖХ гораздо шире по сравнению с ГХ и ГЖХ. Основными параметрами хроматограммы являются время удерживания компонентов и площадь пиков, по которым проводят идентификацию и количественный анализ. В ОФ ВЭЖХ варианте используют неполярные модифицированные сорбенты (октадецилсилан) и полярные подвижные фазы (ацетонитрил, метанол). Метод используется в анализе любых негазообразных веществ.

Измерение высвобождения ванкомицина проводились на жидкостном хроматографе «SHIMADZU LC-20 Prominence» с колонкой PerfectSil 100 ODS-3, 5 мкм, 250 x 4.6 мм, MZ. Хроматограмму ванкомицина можно увидеть на рисунке 2.

Режим работы - изократический, подвижная фаза: ацетонитрил-вода-кислота фосфорная (5:5:0,01). Скорость подачи элюента: 0,07 мл в мин. Давление = 5,2 МПа; $t=40$ °C, время хроматографирования составляет 8 минут.
[7]

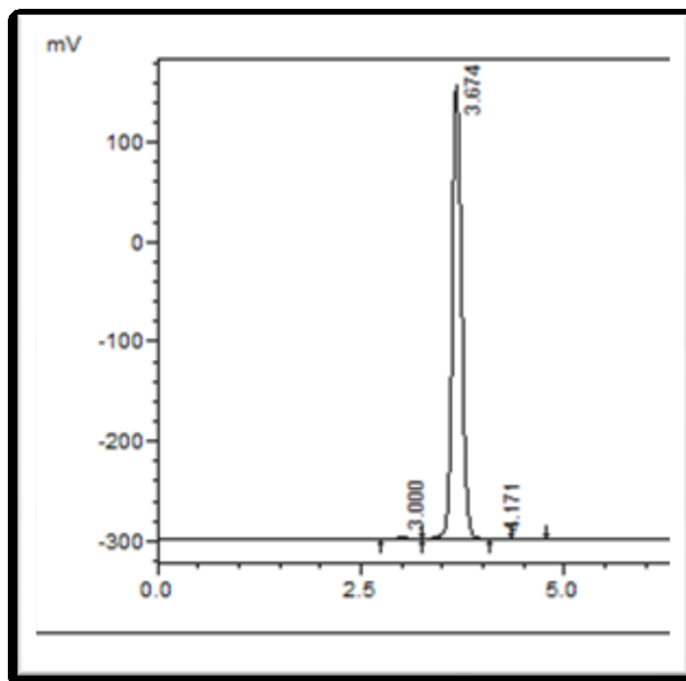


Рисунок 2. Хроматограмма ванкомицина , $\lambda=280$ нм
($M \pm m$, $n=5$)

2.2.4 Диско-диффузионный метод

В ходе исследования проводилась оценка антибактериального действия лекарственного покрытия из ванкомицина с полимером PLGA до и после моделирования деградации.

Суть метода заключается в угнетении роста микроорганизмов антибиотиком на плотной питательной среде. В качестве носителя антибактериального препарата используют диск из ПЭТ с лекарственным покрытием. Образование зоны подавления роста происходит в результате диффузии АБП из носителя в питательную среду. После посева тестовых культур на поверхность питательной среды сразу же помещается диск с лекарственным покрытием. Затем происходит рост микроорганизмов на поверхности среды и диффузия антибиотика из диска

Перед заполнением расплавленной средой чашки Петри устанавливают на строго горизонтальную поверхность.

Соблюдение указанных предосторожностей необходимо в связи с тем, что размер и форма зоны задержки роста зависят от глубины и равномерности агарового слоя.

После заполнения чашки оставляют при комнатной температуре для застывания. Хранить чашки можно запаянными в полиэтиленовые пакеты при 4-8 °С в течение 7-10 сут.

Стандартный инокулюм наносится пипеткой на поверхность чашки Петри с питательной средой в объеме 1-2 мл, равномерно распределяют по поверхности покачиванием, после чего удаляют избыток инокулюма пипеткой. Приоткрытые чашки подсушивают при комнатной температуре в течение 10-15 мин.

Не позднее чем через 15 мин после инокуляции на поверхность питательной среды наносят диски с лекарственным покрытием. Аппликацию дисков проводят с помощью стерильного пинцета или автоматического диспенсера. Расстояние от диска до края чашки и между дисками должно быть 15-20 мм.

Диски должны равномерно контактировать с поверхностью агара, для чего их следует аккуратно прижать пинцетом.

Непосредственно после аппликации дисков чашки Петри помещают в термостат вверх дном и инкубируют при температуре 35 °С в течение 18-24 ч (в зависимости от вида тестируемого микроорганизма).

После окончания инкубации чашки помещают вверх дном на темную матовую поверхность так, чтобы свет падал на них под углом в 45° (учёт в отраженном свете).

Диаметр зон задержки роста измеряют с точностью до 1 мм, предпочтительнее пользоваться штангенциркулем или кронциркулем. При измерении зон задержки роста следует учитывать зону полного подавления видимого роста [23]. В таблице 2 приведены пограничные значения диаметра зон подавления роста (мм).

Таблица 2 – Пограничные значения диаметров зон подавления роста (мм)

Микроорганизм	<i>R</i>	<i>I</i>	<i>S</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	—	—	≥15
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	—	—	≥15
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	—	—	≥17
<i>Streptococcus bovis</i>	—	—	≥17
<i>Enterococcus faecalis</i>	≤14	15-16	≥17

- R — бактерия резистентна к данному антибиотику;
- I — бактерия промежуточно резистентна к данному антибиотику;
- S — бактерия чувствительная к данному антибиотику.

2.2.5 Методы статистической обработки результатов

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

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Оценка антибактериального действия лекарственного покрытия диско-диффузионным методом

В ходе исследования была произведена оценка антибактериального действия лекарственного покрытия до и после моделирования деградации по отношению к тестовым культурам бактерий: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus bovis*, *Enterococcus faecalis* (таблица 3).

Ванкомицин относится к группе гликопептидов и проявляет несколько механизмов антимикробного действия: нарушает синтез клеточной стенки бактерий, блокируя образования пептидогликана; структуру и функцию цитоплазматической мембраны; синтез РНК на уровне рибосом.

На большинство микроорганизмов действует бактерицидно. Активен в отношении аэробных грамположительных микроорганизмов, включая метициллин-устойчивые штаммы и штаммы, устойчивые к пенициллину.

*Таблица 3 – Наличие антибактериального эффекта
лекарственного покрытия*

№ группы образцов	Наличие антибактериального эффекта	
	До моделирования деградации лекарственного покрытия	Через месяц после моделирования деградации лекарственного покрытия
Группа 1		
- <i>Staphylococcus aureus</i>	+	+
- <i>Staphylococcus epidermidis</i>	+	+

- Streptococcus pneumoniae	+	+
- Streptococcus bovis	+	+
- Enterococcus faecalis	+	+
Группа 2		
- Staphylococcus aureus	+	+
- Staphylococcus epidermidis	+	+
- Streptococcus pneumoniae	+	+
- Streptococcus bovis	+	+
- Enterococcus faecalis	+	+
Группа 3		
- Staphylococcus aureus	+	+
- Staphylococcus epidermidis	+	+
- Streptococcus bovis	+	+
- Enterococcus faecalis	+	+

Согласно полученным результатам, лекарственное покрытие обладает антибактериальным действием по отношению к тестовым культурам Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Streptococcus pneumoniae, Streptococcus bovis, Enterococcus faecalis.

Технология изготовления лекарственного покрытия не влияет на антибактериальную активность лекарственного препарата. Полученное лекарственное покрытие сохраняет действие на протяжении одного месяца. Как правило, именно через месяц возникают различные осложнения в виде инфекций после проведения операций по замене клапана сердца.

Инфекционный эндокардит – полиэтиологическое заболевание, которое обусловлено чрезвычайно широким спектром возбудителей, поэтому перспективным считается назначение сразу нескольких препаратов, направ-

ленных как на грамположительных, так и на грамотрицательных возбудителей заболевания. Сочетание антибиотиков между собой позволяет расширить спектр действия и увеличить эффективность проводимой терапии. Так, в таблице 5 приведено фармакодинамическое взаимодействие ванкомицина с другими группами антибиотиков, которые в перспективе могут применяться при лечении острых инфекций, вызванными разными микроорганизмами.

Таблица 4 – Фармакодинамическое взаимодействие антибиотиков

Анти-биоик	Рифампицин	Аминогликозиды	Линезолид	Гентамицин	Эритромицин	Левифлоксацин	Азитромицин	Меропенем
Ванкомицин	++	++	+	++	++	++	+	++

++ - наиболее предпочтительные комбинации с хорошей эффективностью;

+ - комбинация рациональна при ряде показаний

3.2 Результаты моделирования деградации лекарственного покрытия in vitro

3.2.1 Определение профилей высвобождения ванкомицина при деградации лекарственного покрытия

В ходе проведения эксперимента были определены профили высвобождения ванкомицина при деградации лекарственного покрытия in vitro. Количественное содержание ванкомицина в растворе определяли спектрофотометрическим методом и методом ВЭЖХ.

Профили выхода ванкомицина в фосфатный буферный раствор pH=7,4 при моделировании деградации лекарственного покрытия in vitro, изготовленного из 5% PLGA 65:35, представлены на рисунке 3,4.

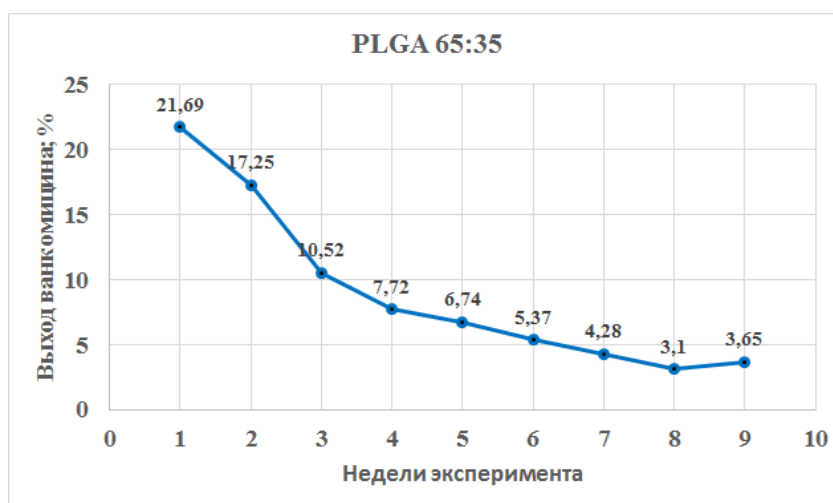


Рисунок 3. Профиль выхода ванкомицина из лекарственного покрытия на основе 5% PLGA 65:35 (% , $M \pm m$, $n=5$). Спектрофотометрический метод.

В первую неделю эксперимента обнаружено максимальное количество антибиотика в растворе – 21,69 % от общего содержания ванкомицина в покрытии. В течении первых двух недель наблюдается смывание антибиотика с поверхности покрытия. Дальнейшее высвобождение лекарственного препарата обусловлено постепенным гидролизом полимера.

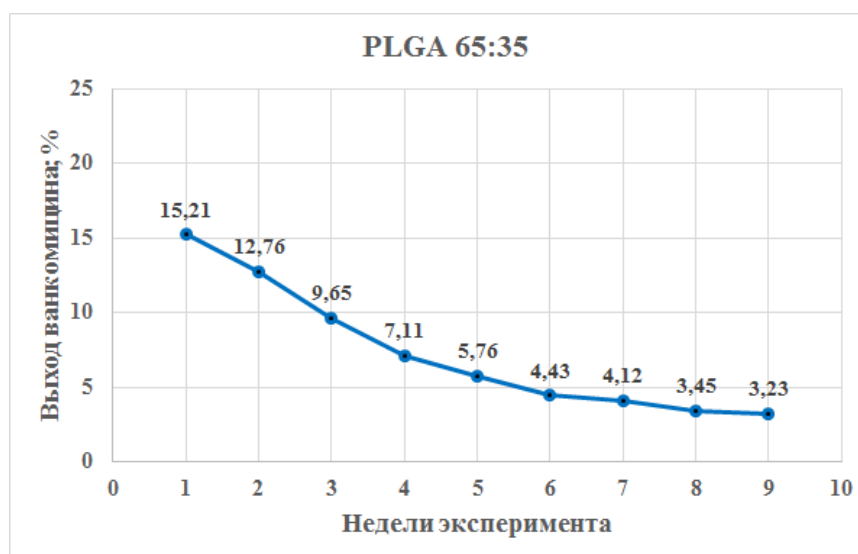


Рисунок 4. Профиль выхода ванкомицина из лекарственного покрытия на основе 5% PLGA 65:35 (% , $M \pm m$, $n=5$). Метод ВЭЖХ.

В первую неделю эксперимента обнаружено максимальное количества препарат в растворе – 15,21 % от общего содержания ванкомицина в покрытии. В течении первых двух недель наблюдается смывание антибиотика с по-

верхности покрытия. Дальнейшее высвобождение лекарственного препарата обусловлено постепенным гидролизом полимера.

Профили выхода ванкомицина в фосфатный буферный раствор pH=7,4 при моделировании деградации лекарственного покрытия *in vitro*, изготовленного из 5% PLGA 75:25, представлены на рисунке 5,6.



Рисунок 5. Профиль выхода ванкомицина из лекарственного покрытия на основе 5% PLGA 75:25 (%), $M \pm m$, $n=5$. Спектрофотометрический метод.

В первую неделю эксперимента обнаружено максимальное количества препарат в растворе – 18,67 % от общего содержания ванкомицина в покрытии. В течении первых двух недель наблюдается смывание антибиотика с поверхности покрытия. Дальнейшее высвобождение лекарственного препарата обусловлено постепенным гидролизом полимера.

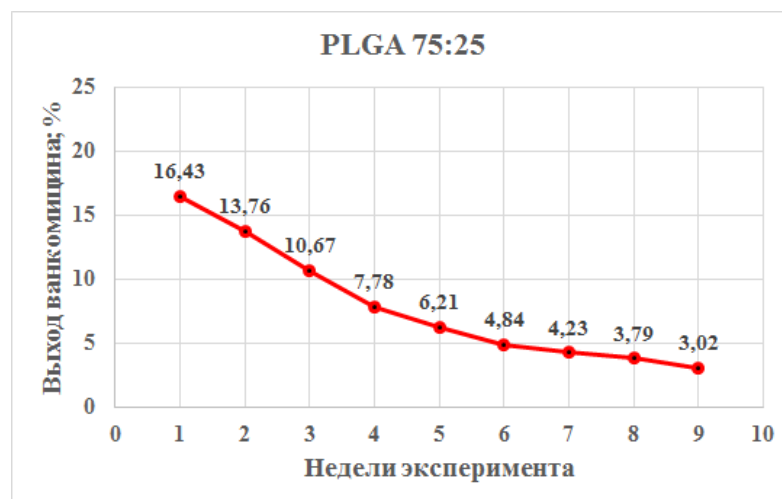


Рисунок 6. Профиль выхода ванкомицина из лекарственного покрытия на основе 5% PLGA 75:25 (% , $M \pm m$, $n=5$. Метод ВЭЖХ.

В первую неделю эксперимента обнаружено максимальное количества препарат в растворе – 16,43 % от общего содержания ванкомицина в покрытии. В течении первых двух недель наблюдается смывание антибиотика с поверхности покрытия. Дальнейшее высвобождение лекарственного препарата обусловлено постепенным гидролизом полимера.

Профили выхода ванкомицина в фосфатный буферный раствор pH=7,4 при моделировании деградации лекарственного покрытия *in vitro*, изготовленного из 5% PLGA 85:15, представлен на рисунке 7,8.

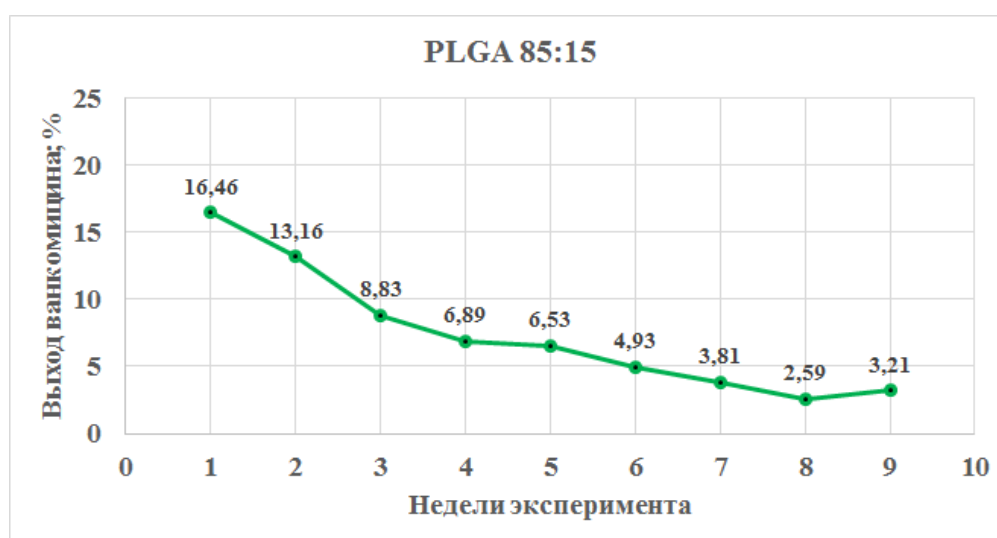


Рисунок 7. Профиль выхода ванкомицина из лекарственного покрытия на основе 5% PLGA 85:15 (% , $M \pm m$, $n=5$). Спектрофотометрический метод.

В первую неделю эксперимента обнаружено максимальное количества препарат в растворе – 16,43 % от общего содержания ванкомицина в покрытии. В течении первых двух недель наблюдается смывание антибиотика с поверхности покрытия. Дальнейшее высвобождение лекарственного препарата обусловлено постепенным гидролизом полимера.

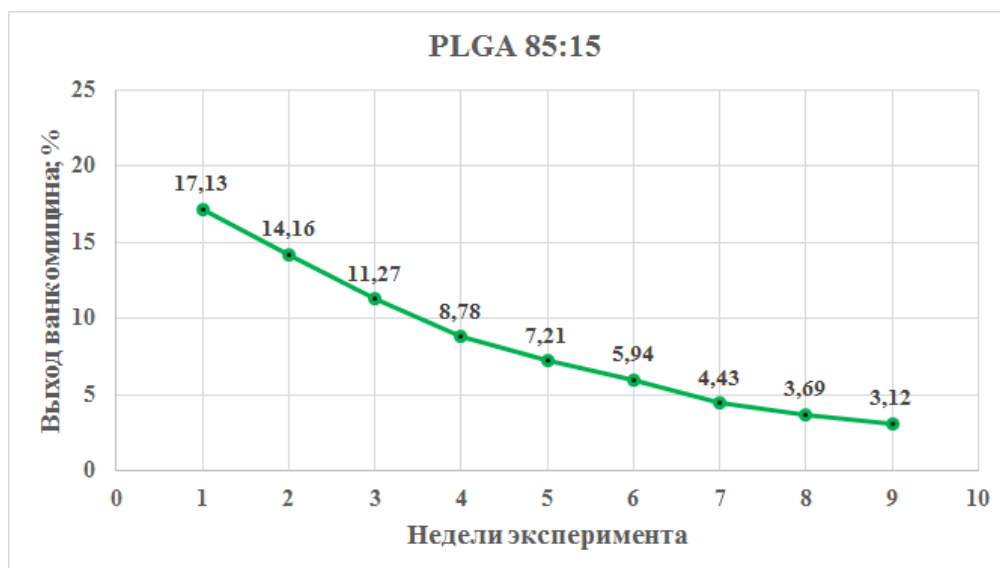


Рисунок 8. Профиль выхода ванкомицина из лекарственного покрытия на основе 5% PLGA 85:15 (% , $M \pm m$, $n=5$). Метод ВЭЖХ.

В первую неделю эксперимента обнаружено максимальное количества препарат в растворе – 17,13 % от общего содержания ванкомицина в покрытии. В течении первых двух недель наблюдается смывание антибиотика с поверхности покрытия. Дальнейшее высвобождение лекарственного препарата обусловлено постепенным гидролизом полимера.

В ходе проведения эксперимента по исследованию влияния типа полимера на скорость высвобождения лекарственного препарата *in vitro* во всех образцах был выявлен неравномерный выход лекарственного препарата в фосфатный буферный раствор ($pH=7,4$). Повышенный выход препарата в течение первых двух недель можно объяснить смыванием ванкомицина с доступного верхнего слоя покрытия.

На дальнейший выход препарата влияет механизм деградации самого полимера. Полимер разлагается до тех пор, пока его молекулярная масса не снизится до критического значения. Это приводит к существенному разрушению и образованию пор. Через поры всасывается вода, что способствует разрыву эфирных связей и высвобождению препарата.

При изготовлении лекарственного покрытия были использованы полимеры PLGA с разным соотношением сополимеров (65:35; 75:25; 85:15), однако видна общая тенденция выхода антибиотика в фосфатный буфер: в первые две недели наблюдается повышенный выход ванкомицина, затем количество антибиотика снижается.

3.2.2 Определение суммарного выхода ванкомицина при деградации лекарственного покрытия

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

Графики суммарного выхода ванкомицина в фосфатный буферный раствор pH=7,4 при моделировании деградации лекарственного покрытия *in vitro*, изготовленного из 5% раствора PLGA 65:35, представлены на рисунке 9,10.

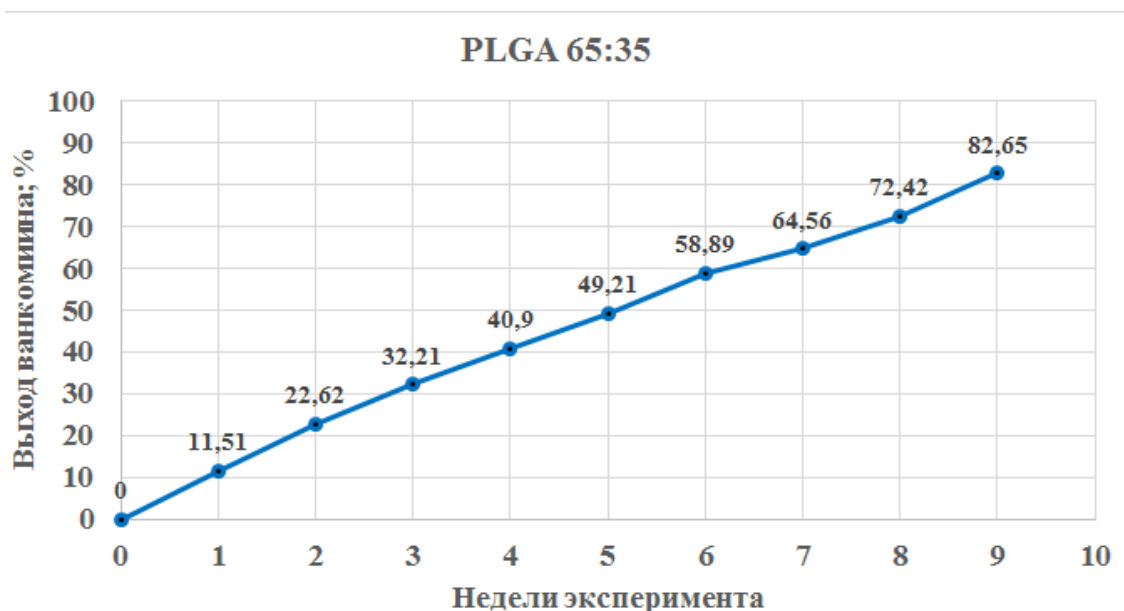


Рисунок 9. Суммарный выход ванкомицина из лекарственного покрытия на основе 5% PLGA 65:35 (% , $M \pm m$, $n=5$). Спектрофотометрический метод.

Суммарный выход препарата за 9 недель проведения эксперимента по моделированию деградации полимерного покрытия составил 82,65% от первоначального содержания. Остаточное содержание препарата, определяемое путем растворения покрытия в смеси вода : хлороформ, составило 16,63 %.

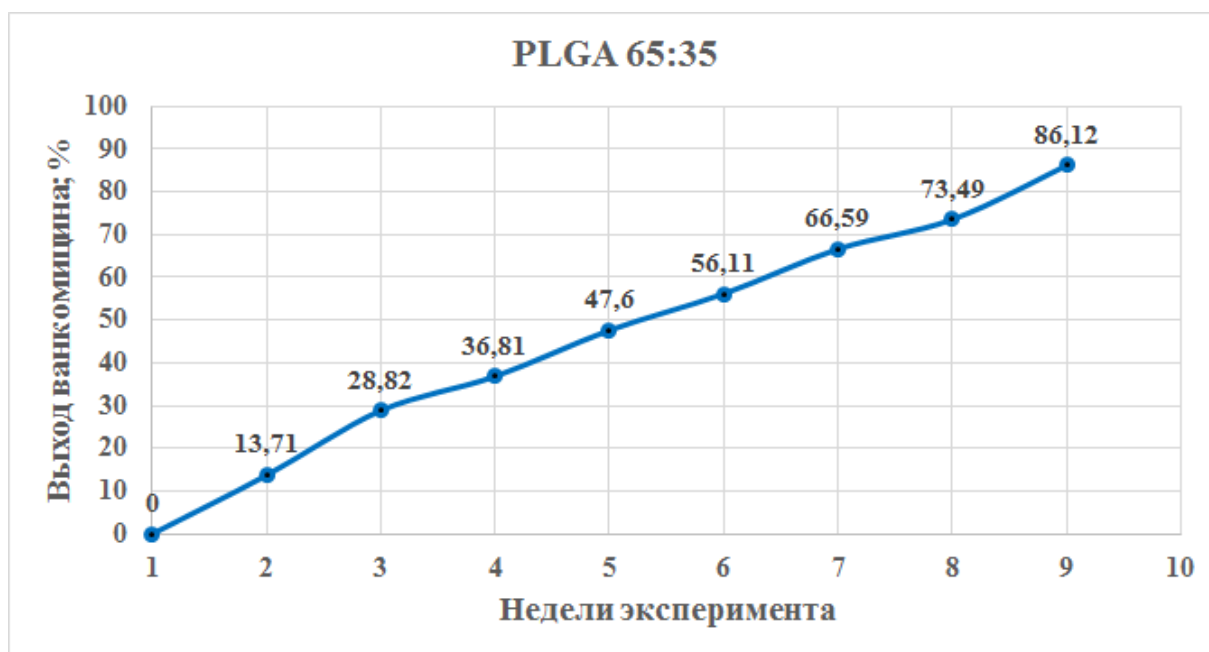


Рисунок 10. Суммарный выход ванкомицина из лекарственного покрытия на основе 5% PLGA 65:35 (% , $M \pm m$, $n=5$).

Метод ВЭЖХ.

Суммарный выход препарата за 9 недель проведение эксперимента по моделированию деградации полимерного покрытия составил 86,12% от первоначального содержания. Остаточное содержание препарата, определяемое путем растворения покрытия в смеси вода : хлороформ, составило 18,23 %.

Графики суммарного выхода ванкомицина в фосфатный буферный раствор pH=7,4 при моделировании деградации лекарственного покрытия *in vitro*, изготовленного из 5% раствора PLGA 75:25, представлены на рисунке 11,12.

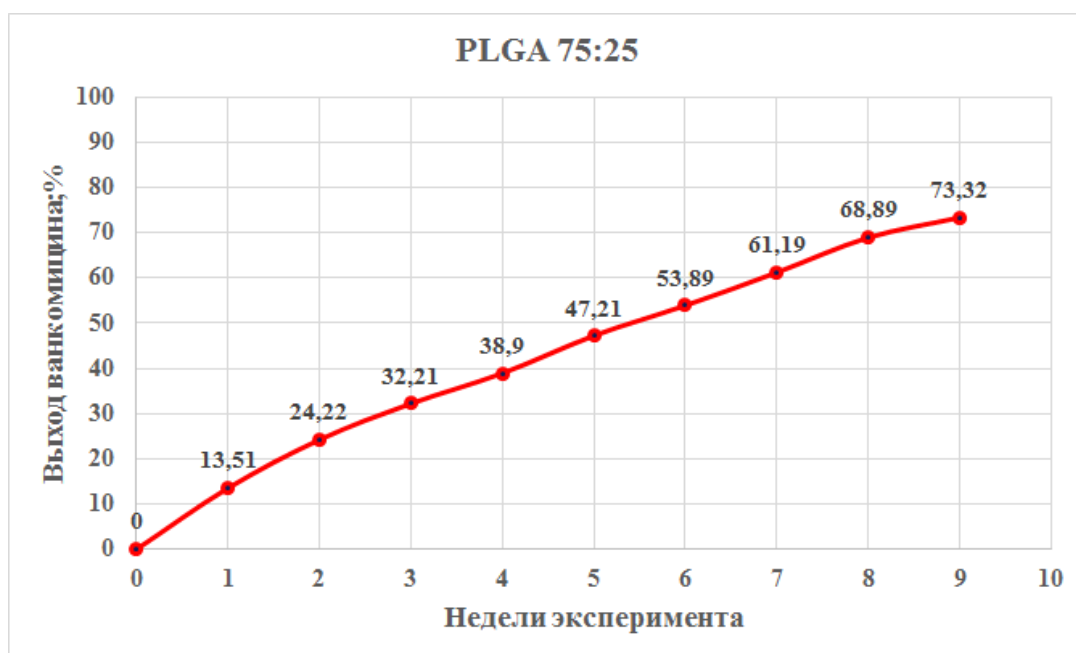


Рисунок 11. Суммарный выход ванкомицина из лекарственного покрытия на основе 5% PLGA 75:25 (% , $M \pm m$, $n=5$).

Спектрофотометрический метод.

Суммарный выход препарата за 9 недель проведение эксперимента по моделированию деградации полимерного покрытия составил 73,32% от первоначального содержания. Остаточное содержание препарата, определяемое путем растворения покрытия в смеси вода : хлороформ, составило 25,45 %.

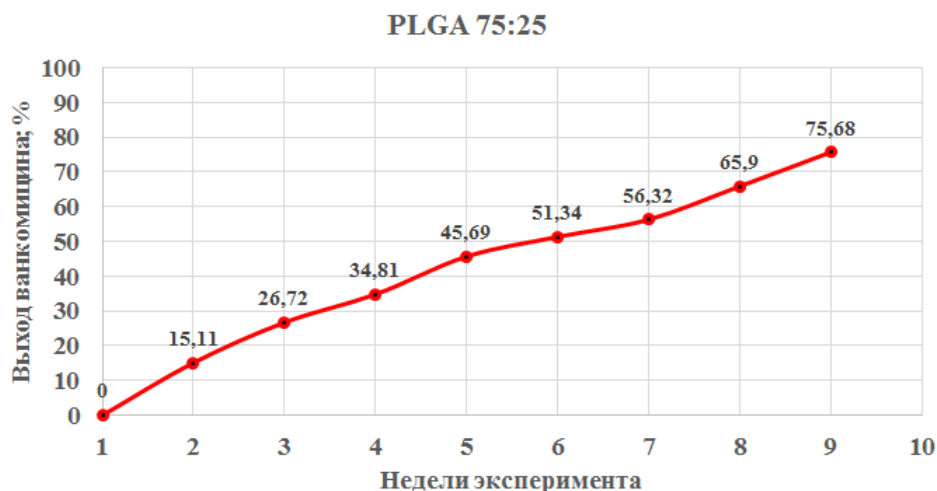


Рисунок 12. Суммарный выход ванкомицина из лекарственного покрытия на основе 5% PLGA 75:25 (% , $M \pm m$, $n=5$).

Метод ВЭЖХ.

Суммарный выход препарата за 9 недель проведения эксперимента по моделированию деградации полимерного покрытия составил 75,68% от первоначального содержания. Остаточное содержание препарата, определяемое путем растворения покрытия в смеси вода : хлороформ, составило 28,75 %.

Графики суммарного выхода ванкомицина в фосфатный буферный раствор $pH=7,4$ при моделировании деградации лекарственного покрытия *in vitro*, изготовленного из 5% раствора PLGA 85:15, представлены на рисунке 13,14.

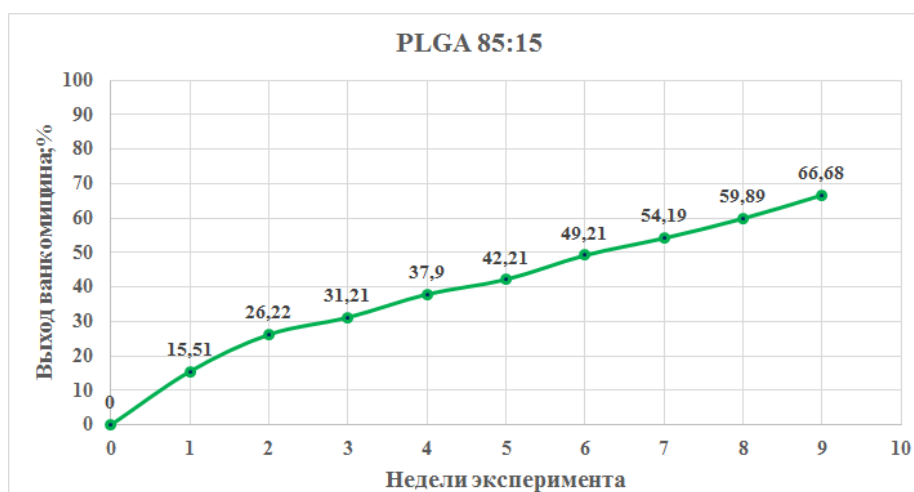


Рисунок 13. Суммарный выход ванкомицина из лекарственного покрытия на основе 5% PLGA 85:15 (% , $M \pm m$, $n=5$).

Спектрофотометрический метод.

Суммарный выход препарата за 9 недель проведения эксперимента по моделированию деградации полимерного покрытия составил 66,68% от первоначального содержания. Остаточное содержание препарата, определяемое путем растворения покрытия в смеси вода : хлороформ, составило 32,16 %.

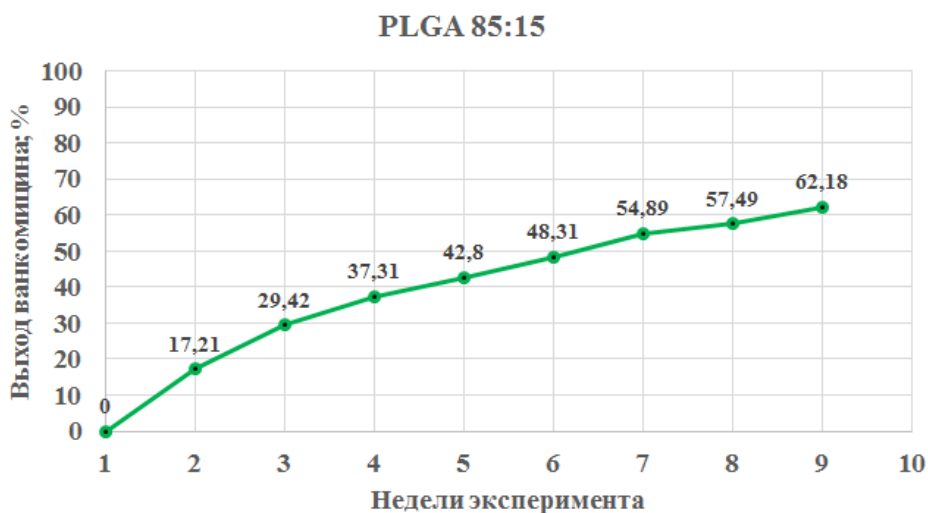


Рисунок 14. Суммарный выход ванкомицина из лекарственного покрытия на основе 5% PLGA 85:15 (% , $M \pm m$, $n=5$).

Метод ВЭЖХ.

Суммарный выход препарата за 9 недель проведение эксперимента по моделированию деградации полимерного покрытия составил 62,18% от первоначального содержания. Остаточное содержание препарата, определяемое путем растворения покрытия в смеси вода : хлороформ, составило 35,76 %.

Таким образом, суммарный выход лекарственного препарата зависит от типа полимера, используемого для изготовления антибактериального покрытия.

3.2.3 Определение остаточного содержания ванкомицина при деградации лекарственного покрытия

Оценка остаточного содержания ванкомицина проводилась по окончании моделирования деградации *in vitro*. Остаточное содержание ванкомицина

определяли путем растворения покрытия в смеси вода : хлороформ и последующего анализа полученного раствора методом УФ-спектроскопии на длине волны 280 нм.

Остаточное содержание ванкомицина в фосфатный буферный раствор pH=7,4 в зависимости от типа полимера PLGA при моделировании деградации антибактериального покрытия *in vitro*, представлены на рисунке 15,16.

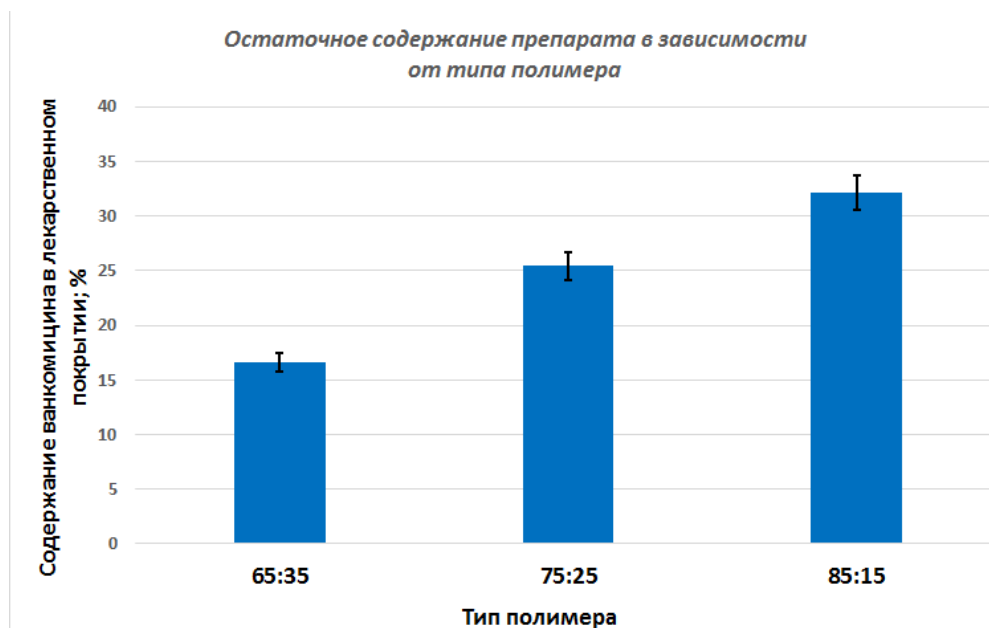


Рисунок 15. Остаточное содержание ванкомицина в зависимости от типа полимера (% , $M \pm m$, $n=5$). Спектрофотометрический метод.

Согласно полученным данным наибольшую задержку препарата осуществляет полимер PLGA 85:15. Остаточное содержание ванкомицина при использовании полимера PLGA 65:35 составил = 16,63 %, при PLGA 75:25 = 25,45 %, при PLGA 85:15 = 32,16 %. Это можно объяснить тем, что скорость гидролиза зависит от водопоглощения полимера.

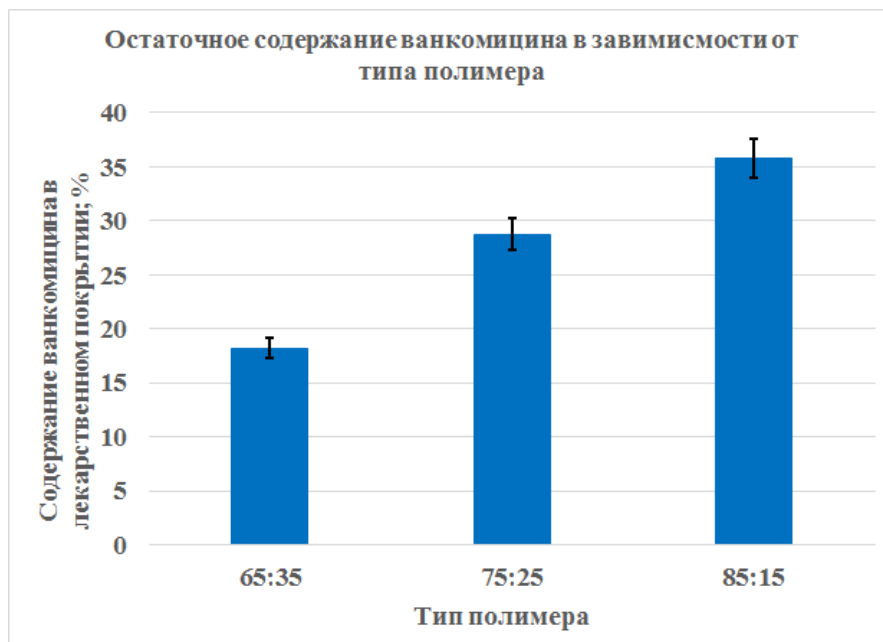


Рисунок 16. Остаточное содержание ванкомицина в зависимости от типа полимера (% , $M \pm m$, $n=5$). Метод ВЭЖХ.

Остаточное содержание ванкомицина при использовании полимера PLGA 65:35 составил = 18,23 %, при PLGA 75:25 = 28,75 %, при PLGA 85:15 = 35,76 %.

Отмечается более высокая склонность гликолида к полимеризации по сравнению с лактидом. С увеличением содержания лактидных звеньев в макромолекуле сополимера повышается его гидрофобность, но уменьшается кристалличность, изменяются сроки биодеструкции в биологической среде.

В тоже время, сам полимер не влияет на структуру лекарственного препарата, а в организме полимерные фрагменты отделяются и гидролизуются.

Поскольку инфекционный эндокардит возникает после отмены антибактериальной терапии на сроке 1 и более месяца после операции, то для изготовления лекарственного покрытия предполагается использовать полимер PLGA с соотношением сополимеров 85:15.

Таким образом, можно сделать вывод, что при оценке выхода ванкомицина можно использовать две методики: спектрофотометрическую, при которой происходит измерение оптической плотности раствора, ВЭЖХ, где че-

рез площадь пика можно проследить разделение нескольких препаратов в растворе.

При оценке выхода одного антибиотика в раствор удобно использовать спектрофотометрическую методику, но при комбинации нескольких антибиотиков, существует возможность использования ВЭЖХ.

ВЭЖХ является одним из перспективных методов определения смеси антибиотиков. Достоинствами метода ВЭЖХ являются: универсальность; высокая разделяющая способность; высокая чувствительность метода; высокая степень автоматизации разделения и обработки полученной информации.

3.2.4 Сравнительная оценка зависимости остаточного содержания ванкомицина от концентрации полимера PLGA 85:15

Изучено влияние разных концентраций полимера PLGA 85:15 на остаточное содержание ванкомицина, что представлено на рисунке 17.

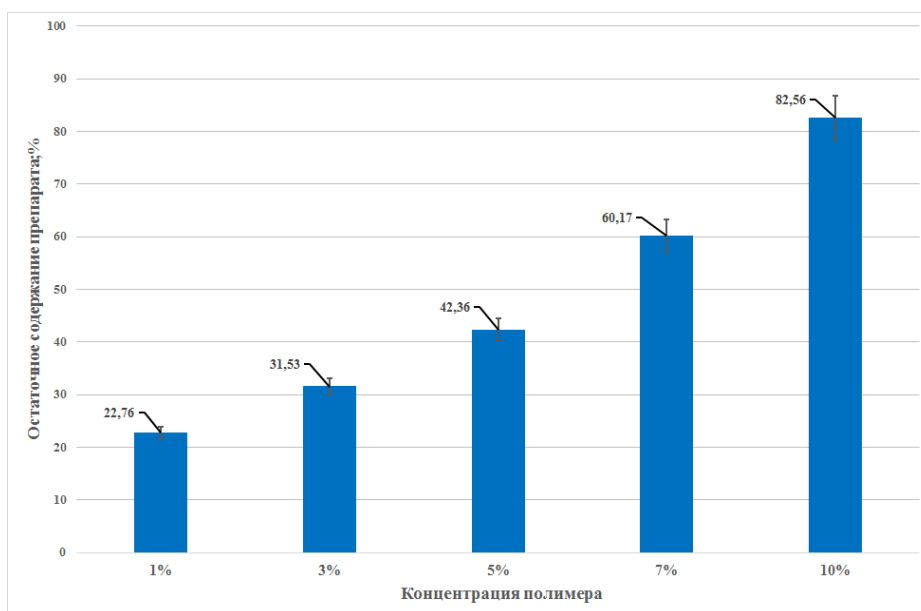


Рисунок 17. Сравнительная оценка зависимости остаточного содержания ванкомицина от концентрации полимера PLGA 85:15
(%, $M \pm m$, $n=5$)

В ходе эксперимента установлено, что 1% PLGA 85:15 удерживает препарат на поверхности антибактериального покрытия манжеты клапана сердца, к концу эксперимента остаточное содержание препарата составило 22,76 % относительно первоначально.

Полимер 10% PLGA 85:15 удерживает препарат, не обеспечивая выхода антибиотика в раствор на протяжении долгого периода времени, а значит, его неэффективно использовать в процессе дальнейшего эксперимента. К концу эксперимента остаточное содержание препарата составило 82,56 % от первоначального.

Оптимальным можно считать 5 % PLGA 85:15, т.к. именно при ней можно увидеть достаточный выход антибиотика в раствор, т.е. 42,36 % от первоначального. По остаточному содержанию ванкомицина можно судить о том сколько препарата задерживается на поверхности изделия. При повышении концентрации полимера повышается остаточное содержание ванкомицина в растворе.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе выполнения бакалаврской работы было исследовано влияние типа полимера на скорость деградации лекарственного покрытия, произведена оценка зависимости концентрации полимера PLGA 85:15 на остаточное содержание ванкомицина. Получены результаты по суммарному выходу ванкомицина в раствор при моделировании деградации антибактериального покрытия *in vitro*, а также произведена оценка остаточного содержания лекарственного препарата по окончании сроков инкубации в модельном растворе.

По результатам исследования можно сделать следующие выводы:

- 1) В ходе исследования установлено что технология изготовления лекарственного покрытия не оказывает негативного влияния на антибактериальный эффект;
- 2) Исследование показало, что тип полимера PLGA влияет на время деградации лекарственного покрытия, наибольшее время деградации обнаружено у полимера PLGA с соотношением сополимеров 85:15;
- 3) Установлено неравномерное высвобождение ванкомицина из лекарственного покрытия по неделям: максимально в первые 2 недели с последующем снижением выхода препарата в модельный раствор;
- 4) Доказана возможность использования спектрофотометрического метода и метода ВЭЖХ для оценки высвобождения ванкомицина из лекарственного покрытия;
- 5) Полученное лекарственное покрытие обладает антибактериальным эффектом по отношению к тестовым культурам: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus bovis*, *Enterococcus faecalis*. Полимер PLGA не оказывает негативного влияния на действие ванкомицина.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АМП – антимикробный препарат

АФИ – активный фармацевтический ингредиент

ИЭ – инфекционный эндокардит

ОФ ВЭЖХ – обращённо-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография

ЛВ – лекарственное вещество

PGA – полигликолевая кислота

PLA – полимолочная кислота

PLGA – поли –D,L-лактид-ко-гликолид

ИЭПК – инфекционный эндокардит протезированного клапана

ИКТМ – инфекция кожи и мягких тканей

ЖКТ – желудочно-кишечный тракт

ЦНС – центральная нервная система

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Амосова Е.Н. Клиническая кардиология. Киев: Здоровье, 1998. 700 с.
2. Балткайс Я.Я., Фатеев В.А. Взаимодействие лекарственных веществ. М.: Медицина, 1991. 301 с.
3. Белов Б.С., Тарасова Г.М. Инфекционный эндокардит: этиология, патогенез, клиническая картина (часть 1) // Современная ревматология. 2008. №2. С. 32-38
4. Белоусов Ю.Б., Леонова М.В. Введение в клиническую фармакологию. М.: МИА, 2002. 128 с.
5. Виноградова, Т.Л. Инфекционный эндокардит: современное течение // Клиницист ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н.И. Пирогова. 2011. №3. С. 4-10
6. Воробьев П.А. Справочник лекарственных средств Формулярного комитета. М.: Ньюдиамед, 2009. 479 с.
7. Гаврилин М.В. Оптимизация методики определения ципрофлоксацина гидрохлорида методом ВЭЖХ в растворе для инфузий // Химико-фармацевтический журнал. 2004. Т.28, № 12. С. 42-44.
8. ГОСТ Р ИСО 10993.13-2016 «Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 13. Идентификация и количественное определение продуктов деструкции полимерных медицинских изделий». Введ. 2017-10-01. М.: Стандартиформ, 2019. 20 с.
9. Гуревич М.А. Некоторые особенности современного инфекционного эндокардита // Российский кардиологический журнал. 2009. №6. С. 87-92.
10. Дмитриева Н.В., Григорьевская З.В., Дьякова С.А. Разработка стратегических подходов терапии инфекций, вызванных мультирезистентными *Acinetobacter baumannii* // Сибирский онкологический журнал. 2012. № 4. С. 11-19.

11. Дорوفеев Е.В., Тюрин В.П. Диагностика и дифференциальный диагноз инфекционного эндокардита // Вестник Национального медико-хирургического Центра им. Н.И. Пирогова. 2012. Т.7, №2. С. 122-126.
12. Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках. М.: Изд-во МГУ; Наука, 2004. 528 с.
13. Ефремова О.А. Инфекционный эндокардит // Научные ведомости. 2010. № 4. С. 81-94.
14. Казайкин, В. Н., Пономарев В.О., Вохминцев А.С., Вайнштейн И.А. Определение концентрации ванкомицина в витреальной полости для оптимизации лечения острых бактериальных послеоперационных эндофтальмитов // Практическая медицина. 2016. № 2. С. 85-89.
15. Климова О. В., Рябцева М.С., Воронцова Е.А. Разработка новой наносомальной лекарственной формы ломефлоксацина на основе биodeградируемых полимеров // Молекулярная медицина. 2012. № 1. С. 27-30.
16. Кнышов В.Н., Коваленко В.Н., Руденко А.В. Инфекционный эндокардит. К.: МОРИОН, 2004. 256 с.
17. Константинов Б.А., Прелатов В.А., Иванов В.А., Малиновская Т.Н. Клапаносберегающие реконструктивные операции в хирургии пороков сердца. М.: Медицина, 1989. 140 с.
18. Кузнецова И.Г., Северин С.Е. Использование сополимера молочной и гликолевой кислот для получения наноразмерных лекарственных форм // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2013. №5. С. 30-38.
19. Кукес В.Г. Клиническая фармакология. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2006. 944 с.
20. Малафеев К.В., Москалюк О.А., Юдин В.Е. Получение и свойства волокон из сополимера молочной и гликолевой кислот // Высокомолекулярные соединения. 2017. Т.59, №1. С. 1-6.
21. Машковский М.Д. Лекарственные средства. М.: ООО «Издательство Новая Волна», 1998. 320 с.

22. Минько Н.И, Нарцев В.М. Методы получения и свойства нано-объектов. Белгород: БГТУ, 2007. 104 с.
23. МУК 4.2.1890-04 Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. Введ. 04.03.2004. М.: Федеральный центр госсанэпиднадзор Минздрав России. 2004. 91 с.
24. Падейская Е.Н., Яковлев В.П. Антимикробные препараты фторхинолов. М.: Логата, 1998. 352 с.
25. Платэ Н. А., Васильев В.Е. Физиологически активные полимеры. М.: Химия, 1986. 294 с.
26. Покровский А.В. Клиническая ангиология. М.: «ОАО Издательство Медицина», 2004. 888 с.
27. Попов Д.А. Послеоперационные инфекционные осложнения в кардиохирургии. М.: НЦССХ им. А.Н. Бакулёва РАМН, 2007. 582 с.
28. Рогожин Е.А. Пептидные антибиотики – структурные особенности закономерности биологической активности // Актуальные вопросы биологической физики и химии. 2018. Т.3, №3. С. 619-621.
29. Серёгина Т.С., Иванова В.Р., Харитонов В.Г. Синтез полимерных модификаторов биологической ткани, содержащих аминогликозидные антибиотики // Успехи в химии и химической технологии. 2018. Т. 32, №7. С.24-26
30. Сидоренко С.В., Гучев И.А., Миеехина Е.В. Ванкомицин – перспективы применения в 21 веке // Клиническая фармакология и терапия. 2009. Т.18, № 2. С. 16-22.
31. Соловский М.В. Исследование антимикробной активности и острой токсичности полимерных солей гентамицина // Антибиотики и химиотерапия. 2000. Т. 45, №6. С. 10-12.
32. Фадеев А.А. Конструктивные формы и функциональные свойства протезов клапанов сердца. М.: НЦССХ им. А.Н. Бакулёва РАМН, 1999. 342 с.

33. Хабриев Р.У., Герасимов В.Б. М.: ОАО «Издательство Медицина», 2004. 944 с.
34. Чазова Е.И., Беленко Ю.Н. Рациональная фармакотерапия сердечно-сосудистых заболеваний. М.: Литтерра, 2005. 972 с.
35. Шейкин В.В. Технология иммобилизации ципрофлоксацина на модифицированной поверхности титановых имплантатов // Современная медицина: актуальные вопросы. 2013. № 10. С. 32-38.
36. Avgoustakis K. Pegylated poly(lactide) and poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles: preparation, properties and possible application in drug delivery // Curr. Drug Deliv. 2004. Vol. 1. P. 321-330.
37. Bajpai A.K., Shukla S.K., Bhanu S., Kankane S. Responsive polymers in controlled drug delivery // Progress in Polymer Science. 2008. V. 33. P. 1088-1118.
38. Braunecker J., Baba M., Milroy G.E., Cameron R.E. The effects of molecular weight and porosity on the degradation and drug release from polyglycolide // AAPS Pharm SciTech. 2004. V.15. P. 530-535.
39. Hakkarainen M. Aliphatic polyesters: abiotic and biotic degradation and degradation products // Advances in polymer science. 2002. V.157. P. 113-115.
40. Higgins D. M., Basaraba R.J., Hohnbaum A.C. Localized immunosuppressive environment in the foreign body response to implanted biomaterials // Cell Fusions. 2009. Vol. 1. P. 161-170.
41. Hooper D. C., Lozo E., Riecke K. Quinolone antimicrobial agents // Cell Fusions. 2009. Vol. 33. P. 194-200.
42. Horvath C., Schenderlein S. Targeting CCR2 or CD18 inhibits experimental in-stent restenosis in primates: inhibitory potential depends on type of injury and leukocytes targeted // Essentials of Restenosis. 2002. Vol. 10. P. 175-178.
43. Husmann M., Schenderlein S., Luck M. Polymer erosion in PLGA microparticles produced by phase separation method // International Journal of Pharmaceutics. 2002. Vol. 2. P. 277-280.

44. Inoue T., Croke T., Morooka T. Vascular inflammation and repair: implications for reendothelialization, restenosis, and stent thrombosis // JACC Cardiovasc Interv. 2011. Vol. 4. P. 1057-1066.
45. Jain R. A. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly (lactide-co-glycolide) (PLGA) devices // J. Biomaterials. 2000. Vol. 21. P. 2475–2480.
46. Jalil R., Nixon J.R. Biodegradable poly (lactic acid) and poly (lactide-co-glycolide) microcapsules: problems associated with preparative techniques and release properties // Microencapsulation. J. 1990. Vol. 7. P. 297-305.
47. Kawamoto R., Yamashita A., Nisgihira K. Different inflammatory response and oxidative stress in neointimal hyperplasia after balloon angioplasty and stent implantation in cholesterol-fed rabbits // Pathology - Research and Practice. 2006. Vol. 202. P. 447-456.
48. Kawano H., Koide Y., Baba T. Granulation tissue with eosinophil infiltration in the restenotic lesion after coronary stent implantation // Circulation Journal. 2004. Vol. 68. P. 722-723.
49. Luttikhuisen D. T., Harmsen M.C. Cellular and molecular dynamics in the foreign body reaction // Tissue Engineering and Regenerative Medicine. 2006. Vol. 12. P.55-60.
50. Luttikhuisen D. T., Luttikhuisen D.T., Harmsen A.H. The correlation between difference in foreign body reaction between implant locations and cytokine and MMP expression // Biomaterials. 2006. Vol. 27. P. 63-70.
51. Makadia H. K., Siegel S.J. Poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier // Polymers. 2011. Vol. 90. P. 488-494.
52. Nebeker J.R., Virmani R. Hypersensitivity cases associated with drug-eluting coronary stents: a review of available cases from the Research on Adverse Drug Events and Reports (RADAR) project // J. Am. Coll. Cardiol. 2006. Vol. 47. P. 175-181.

53. Odds F.C., Orid F.C. Activities of an intravenous formulation of itraconazole in experimental disseminated *Aspergillus*, *Candida*, and *Cryptococcus* infections // *Antimicrob Agents Chemother*. 2000. Vol. 44(11). P. 3180-3183.
54. Park J. H. Biodegradable polymers for microencapsulation of drugs // *J. Molecules*. 2005. Vol.10. P. 146-151.
55. Peletrie L., Petersdort R. Infective endocarditis. In: *Heart Disease* / Ed. E. Braunwald. 2000. P.160-165.
56. Robinson J.R. *Controlled Drug Delivery. Fundamentals and Applications*. 1987. P. 45-52.
57. Shen E., Kipper M.J., Determan A. Design of an injectable system based on bioerodible polyanhydride microspheres for sustained drug delivery // *J. Biomaterials*. 2002. Vol. 23. P. 4405-4412.
58. Shen E., Kipper M.J., Dziadul B. Mechanistic relationships between polymer microstructure and drug release kinetics in bioerodible polyanhydrides // *J. Controlled Release*. 2002. Vol. 82. P. 115-125.
59. Virmani R., Guagliumi G. Localized hypersensitivity and late coronary thrombosis secondary to a sirolimus-eluting stent: should we be cautious // *J. Circulation*. 2004. Vol. 109. P. 701-705.
60. Winzenburg G., Schmidt S., Kissel T. Biodegradable polymers and their potential use in parenteral veterinary drug delivery systems // *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2004. № 56. P. 1453-1466.