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

ПЕНЗЕНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

Факультет
физико-математических
и естественных наук

Кафедра
«Общая биология и биохимия»

Направление подготовки 06.03.01 Биология
Профиль подготовки Биохимия
Форма обучения очная

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА
на тему:

«ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ СОВМЕСТИМОСТИ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО ПОКРЫТИЯ ИЗДЕЛИЙ ИЗ ТИТАНА»

Студент _____ Андреева Елена Сергеевна

Руководитель _____ Кручинина А.Д.

Нормоконтролер _____ Кручинина А.Д.

Работа допущена к защите (протокол заседания кафедры от 17.06.21 №15)

Заведующий кафедрой _____ Карпова Г.А.

Работа защищена с отметкой отлично

(протокол заседания ГЭК от 25 июня 2021 № 1)

Секретарь ГЭК _____ Клыченков С.В.

Пенза, 2021

СОДЕРЖАНИЕ

СОДЕРЖАНИЕ 2
ВВЕДЕНИЕ 3
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ 6
1.1 Биосовместимость имплантируемых материалов 6
1.2 Оценка биологической безопасности и токсичности медицинских изделий и лекарственных средств 9
1.3 Оценка биохимических и гематологических показателей крови 16
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ 23
2.1 Материалы исследования 23
2.2 Методы исследования 26
2.2.1 Исследования общей токсичности in vivo на крысах 26
2.2.2 Гематологические и биохимические анализы крови 27
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ 29
ЗАКЛЮЧЕНИЕ 45
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ 47

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. В настоящее время отмечается стремительно возрастающий интерес к протезированию и регенеративной медицине в целом. Разработка биологически нейтрального, нетоксичного покрытия для протеза, обладающего антибактериальным эффектом, позволит свести к минимуму вероятность инфекционных осложнений после операции по замене уставов или костной ткани.

Дегенеративные заболевания костной ткани и суставов являются одной из главных проблем современной ортопедии. Во многих случаях пациентам с такими заболеваниями необходимо эндопротезирование. С этим связан постоянный поиск и разработка наиболее подходящего для изготовления протеза материала. Однако с оперативным вмешательством при протезировании связана ещё одна серьёзная проблема – инфицирование области вмешательства. Для предотвращения развития инфекционных процессов необходимо не только строго соблюдать методы асептики, но и применять антибактериальную профилактику. Её суть заключается в достижении такой концентрации антибиотика в месте оперативного вмешательства, при которой рост и развитие микроорганизмов будут максимально подавляться. Однако добиться этого при приёме АБП внутрь довольно сложно.

Один из возможных вариантов решения этой проблемы – создание покрытия с антибактериальной активностью для самого эндопротеза. В качестве матрицы для лекарственных препаратов возможно использование различных полимерных носителей. Помимо адресной доставки препарата непосредственно к месту операционного вмешательства, такое покрытие делает возможной регуляцию сроков и скорости высвобождения антибиотика за счёт изменения состава полимера-носителя. Такое покрытие само по себе не должно вызывать негативных реакций в организме и не должно быть токсичным – то есть должно подходить под критерии биологической совместимости.

Объектом исследования работы выступает антибактериальное лекарственное покрытие, нанесённое на титановый блок.

Предмет исследования – биологическая совместимость указанного покрытия.

Целью данной работы является исследование биосовместимости антибактериальных покрытий с различными концентрациями антибактериального препарата и с разным составом полимерной матрицы.

В **задачи исследования** входит:

1. Изготовить образцы титановых блоков с нанесенными на поверхность антибактериальными биополимерными покрытиями разных типов.
2. Имплантировать образцы подкожно с проведением наблюдения за здоровьем животных и последующей макроскопической оценкой области имплантации.
3. Исследовать динамику изменений гематологических и биохимических показателей крови лабораторных животных на разных сроках после имплантации.
4. Проанализировать полученные результаты с точки зрения биологической совместимости покрытий с различными полимерами-носителями и разными концентрациями антибактериального препарата, выявить оптимальный состав.

Ожидаемым результатом работы является создание максимально биосовместимого покрытия для титановых протезов, обладающего антибактериальной активностью.

Для достижения поставленных целей были избраны следующие методы: анализ научной литературы по теме работы, проведение экспериментов in vitro и in vivo, статистическая обработка и обобщение полученных данных.

Практическая значимость данной выпускной квалификационной работы заключается в разработке применимого на практике биологически

совместимого антибактериального покрытия для изделий на основе титана и его сплавов. Результаты этого научно-экспериментального проекта можно применять в медицинской практике для изготовления медицинских изделий. Это позволит снизить риск развития постоперационных инфекционных осложнений, не нанося вреда организму реципиента.

Выпускная квалификационная работа написана на 51 листе, содержит 8 рисунков, 8 таблиц и список литературы на русском и английском языках из 42 источников.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Биосовместимость имплантируемых материалов

Строгого определения понятия «биосовместимость» до сих пор не существует. Однако под этим термином принято понимать способность какого-либо материала, устройства, изделия и т.п., имплантированного в организм, не вызывать отрицательных побочных эффектов, не индуцировать клеточный и тканевый ответ данного организма, при этом полностью сохраняя и выполняя свои функции.

Выделяют определённые критерии, по которым можно оценить биосовместимость необходимого объекта. Основные свойства, которыми должно обладать биосовместимое изделие:

- не вызывать иммунных, аллергических и воспалительных реакций в организме;
- не оказывать токсического влияния на организм;
- не провоцировать и/или подавлять развитие инфекции в месте имплантации;
- не оказывать канцерогенного влияния на организм;
- сохранять необходимые функциональные свойства и эксплуатационные параметры в течение всего предусмотренного срока эксплуатации изделия.

Кроме того, имплантат в идеале должен свободно интегрироваться в окружающие ткани, не препятствуя их росту.

Существует отдельный класс так называемых биорезорбируемых имплантатов, которые постепенно растворяются в организме, замещаясь собственными тканями организма-хозяина. Крайне важно в таком случае, чтобы продукты биодеградации имплантата не обладали токсичностью.

Выделяют два типа биосовместимости: цитоспецифическую и тканеспецифическую. Цитоспецифическая биосовместимость и её степень зависит от клеточных культур, используемых в имплантации.

Тканеспецифическая же биосовместимоть изменяется в зависимости от области организма, где была произведена имплантация [1].

Стоит отметить, что идеально биосовместимого материала не существует, так как все известные на данный момент материалы, используемые в протезировании и имплантации, являются в той или иной мере чужеродными организму [34].

Также можно выделить особую группу биоматериалов, предназначенных для непосредственного контакта с кровью. Эти материалы называют гемосовместимыми и часто выделяют в особую группу в связи с несколько иными требованиями к ним. Такие материалы, в частности, должны обладать следующими свойствами:

- не провоцировать образование тромбов и развитие тромбоэмболии;
- не активировать систему комплемента и не вызывать иных аутоиммунных реакций;
- не оказывать негативного влияния на белки и форменные элементы крови;
- не нарушать электролитический баланс крови.

Каждый материал, предполагаемый к использованию в имплантологии и протезировании, должен пройти ряд определённых исследований, в том числе тесты на биологическую совместимость. Всего принято выделять 4 группы таких тестов:

- методы in vitro и ex vivo;
- острые эксперименты in vivo;
- хронические эксперименты in vivo;
- клинические испытания.

Каждая из этих групп имеет свои преимущества и недостатки, свои ограничения и сложности в применении. Конкретный метод (или методы)

должны подбираться с учётом исследуемого объекта и предполагаемых сфер его применения.

Такое широкое разнообразие методов обусловлено целым рядом причин. Во-первых, это множество механизмов взаимодействия имплантата с живыми тканями организма-носителя, многие из которых до сих пор изучены недостаточно хорошо в силу крайней сложности проведения подобных исследований. Во-вторых, это встречающиеся различия в поведении имплантата при кратковременном и длительном сроке эксплуатации. В-третьих, контакт тканей организма с поверхностью имплантата вызывает различные взаимосвязанные иммунные, воспалительные, гемолитические и гемостатические реакции. Для того, чтобы охватить всю совокупность этих значимых факторов, приходится прибегать к множеству различных тестов.

Необходимо также отметить, что понимается под термином «биоматериал»: это любой синтетический или природный материал (металл, сплав, керамика, полимер, обработанная биологическая ткань и др.), используемый как медицинское изделие и/или его часть. Медицинское изделие – любой прибор, материал, препарат, используемый в медицинских целях для диагностики, предотвращения, лечения, облегчения симптомов заболевания, компенсации физического недостатка, включая стоматологические изделия; при этом не являющийся фармакологическим, иммунологическим либо метаболическим средством (однако вероятно применяющийся в комплексе с ними) [33].

1.2 Оценка биологической безопасности и токсичности медицинских изделий и лекарственных средств

Для объективной оценки биосовместимости того или иного материала первоначально необходимо провести токсикологические и санитарно-химические исследования. Санитарно-химический анализ включает в себя количественное определение входящих в исследуемый объект веществ и экстрагируемых химических компонентов. Необходимо также чётко идентифицировать материал, из которого состоит изделие, и определить степень его химической чистоты.

Вероятные нежелательные последствия применения исследуемого материала или продукта могут включать:

- Краткосрочные эффекты (например, острая токсичность, местные аллергические и воспалительные реакции, раздражение кожи и слизистых оболочек);
- Сенсибилизирующее действие, гемолиз, образование тромбов;
- Отдалённые специфические токсические эффекты (кальциноз, биодеструкция, генотоксичность, канцерогенность, тератогенность и др.)

Для каждого используемого материала и конечного продукта все эти риски должны быть учтены и отдельно подробно рассмотрены.

Согласно международному стандарту ИСО 10993 (ISO 10993), который принят в большинстве стран, общая схема тестирования медицинских и биомедицинских изделий включает в себя 4 последовательных стадии.

I стадия – характеристика и тестирование исходного сырья для изготовления изделий. В неё входит оценка биологических (цитолиз, гемолиз и др.), а также химических и физических свойств материалов, из которых изготовлено изделие, до и после различных технологических операций

(таких, как прессование, формование, стерилизация и др.). Проводится in vitro.

II стадия – исследование биосовместимости отдельных компонентов изделия. Оценивается биологическая безопасность каждого из компонентов изделия по отдельности.

III стадия – оценка качества и эффективности контроля на производстве. Даётся оценка соответствия технологических помещений, где ведётся работа с изделием, принятым стандартам и требованиям, предъявляемым к выпуску медицинских изделий, а также системе контроля качества исходного сырья и конечного продукта.

IV стадия – контроль качества конечного продукта во время его производства. На данной стадии проводится контроль качества непосредственно исходного сырья, а затем самого получаемого продукта. И сырьё, и продукт должны строго соответствовать паспортным данным и требуемым медицинско-техническим свойствам.

В данную программу испытаний, однако, не включены тесты на биодеградацию и кальцификацию изделий, а также испытания влияния материалов, входящих в состав изделия и/или продуктов их деструкции в организме на репродуктивную систему человека. Отсутствие данных об этих биологических свойствах имплантата может привести к ошибкам в оценке и прогнозе биосовместимости изделия, особенно в случае долгосрочного применения и функционирования данного изделия. Поэтому программа исследований выбирается индивидуально в каждом случае, исходя из соответствия изделия его указанному назначению и медико-технических свойств составляющих его материалов. Таким образом, для удобства выбора программы испытания медицинского изделия, их подразделяют на несколько категорий в соответствии с характером и продолжительностью их контакта с организмом человека. Стоит также отметить, что некоторые изделия могут входить в более чем одну категорию. В этом случае необходимость

исследования рассматривается с точки зрения требований каждой из категорий.

По характеру контакта с организмом выделяют три категории изделий:

1. Изделия, контактирующие с поверхностями покровных тканей организма человека:

- с неповреждённой кожей (электроды, внешние протезы);

- с неповреждёнными слизистыми оболочками (контактные линзы, катетеры, зубные протезы, бронхо- и гастроскопы и другие зонды и т.п.);

- с повреждёнными или подверженными опасности повреждения поверхностями кожи и слизистых оболочек (изъязвлённые, раневые, ожоговые).

2. Изделия, непосредственно не контактирующие с организмом человека, или внешние устройства:

- косвенно связанные с системой кровообращения, контактирующие с костью, тканью, дентином (системы переливания крови и её компонентов, системы дренирования, лапароскопы, артроскопы, пломбировочные материалы, стоматологический цемент и т.п.)

- изделия, контактирующие с циркулирующей кровью (внутрисосудистые катетеры, оксигенаторы, диализаторы, экстракорпоральные устройства вспомогательного кровообращения и т.п.);

3. Имплантируемые изделия:

- контактирующие с тканью/костью (ортопедические шпильки, маммопротезы, протезы гортани и т.п.);

- контактирующие с внутренней средой глаза (эндопротезы, экстраокулярные линзы, дренажи);

- контактирующие с кровью (протезы кровеносных сосудов, клапаны сердца, артерио-венозные фистулы).

Следующие три категории медицинских изделий выделяют в соответствии с продолжительностью их контакта с организмом:

1. Ограниченное воздействие: до 24 часов;

2. Длительное воздействие: более 24 часов, но не свыше 30 суток;

3. Постоянный контакт: свыше 30 суток.

В случае, если контакт медицинского изделия с организмом краткосрочный, но при этом многократный, необходимо учитывать возможный кумулятивный эффект. К испытаниям такого рода изделий предъявляются более жёсткие требования.

Стоит учесть, что промышленный выпуск медицинских изделий возможен только после успешного прохождения третьей стадии испытаний. Она включает в себя проверку эффективности работы системы контроля за производственным процессом и за качеством конечной продукции. Это включает в себя исследования:

- качества окружающей среды на производстве (анализ содержания в воздухе любых обнаруженных частиц вне зависимости от их природы, идентификация обнаруженных микроорганизмов и т.п.);

- эффективности очистки производственных помещений и используемого оборудования, качества сырья, процесса подготовки, стерилизации и упаковки изделий;

- качества готовой продукции.

Положительные результаты III стадии испытаний позволяют начать промышленный выпуск того или иного медицинского изделия. Он должен сопровождаться постоянным контролем качества (IV стадия) по заранее отдельно утверждённой программе. Помимо этого, необходима периодическая проверка качества сырья и конечного продукта независимыми аудиторскими компаниями [2].

Испытания проводятся в соответствии с утверждёнными документами: международный стандарт ИСО 10993 для оценки биологических свойств медицинских изделий и методическими рекомендациями Минздрава России. В соответствии с ними, помимо

биологической оценки материалов и изделий, необходимо учитывать следующие параметры:

- природу, степень, продолжительность, условия воздействия изделия на организм;

- химическую и физическую природу материалов и изготовленных из них изделий;

- потенциальную токсичность химических веществ, используемых при производстве конечного продукта;

- отношение размеров изделия к размеру тела/органа, куда производится имплантация;

- результаты доклинических исследований и дополнительную информацию, почерпнутую из соответствующей научной и медицинской литературы.

Все медицинские изделия, равно как и применяемые в комплексе с ними фармакологические препараты (в качестве покрытия имплантата, в качестве дополнительной терапии, иным образом) должны в обязательном порядке пройти доклиническое исследование общей и специфической токсичности (таблица 1, таблица 2). Так как покрытие имплантата содержит антибактериальный препарат, перед его применением необходимо определить его безопасность для организма реципиента. Данное исследование проводится в соответствии с «Методическими рекомендациями по изучению общетоксического действия лекарственных средств». Эта оценка включает в себя две стадии:

1. Исследование общей токсичности:

- острая токсичность;

- хроническая токсичность.

2. Исследования специфической токсичности:

- аллергизирующие свойства;

- иммунотоксическое действие;

- репродуктивная токсичность;

- мутагенность (генотоксичность)

Таблица 1 – Санитарно-химические исследования

Основные методы	Показатель	Допустимые значения
pH-метрия	Отклонение pH экстракта от контрольного раствора	±1,0
УФ-спектроскопия	Уровень поглощения экстракта в диапазоне длин волн от 220 до 360 нм	0,3
Хроматография	Концентрация свободного мономера	0,1 мг/л
Окисляемость	Концентрация O_2 в титруемом растворе с $KMnO_4$	2,0 (O_2/л)
Бромируемость	Концентрация бромирующихся веществ	1,0 (Br/л)

Примечание: в таблице приведены допустимые значения, применяемые наиболее часто к основным группам изделий. Допустимые значения могут меняться в зависимости от специфичности применения конкретного материала или изделия.

Таблица 2 – Токсикологические исследования

Основные методы	Показатель	Допустимые значения
Цитотоксичность на половых клетках крупного рогатого скота	Индекс токсичности (ИТ)	ИТ > 80%
Гистотоксичность на культуре тканей	Показатель гистотоксичности (ПГТ)	ПГТ > 0,72 (нетоксично) ПГТ < 0,27 (токсично)

Таблица 2 – продолжение

Острая токсичность на мышах	Степень токсичности вытяжки при однократном внутрибрюшинном введении	Отсутствие смертности. Внешнее состояние мышей и состояние внутренних органов не отличается от нормы.
Раздражающий эффект при инстилляции вытяжки в конъюнктивальную полость глаза кролика	Степень раздражения	0-I степень
Имплантационный тест	Общетоксическое действие по морфологической оценке органов животных	Отсутствие смертности. Внешнее состояние мышей и состояние внутренних органов не отличается от нормы.
Сенсибилизирующий эффект	Реакция дегрануляции тучных клеток	10% от контроля
Иммуннотоксичность	Фагоцитарная активность макрофагов	Не отличается от контроля
Мутагенность	Количество ретикулоцитов костного мозга	<5%

Повторные испытания материалов и изделий проводятся позже в процессе сертификации и производственного выпуска изделий, однако их программа заметно менее подробна и включает в себя меньше исследований,

которые ограничиваются отдельными ключевыми для конкретного изделия тестами.

Повторная полная биологическая оценка безопасности изделия должна проводиться в случае изменения любого из следующих параметров:

- источника либо свойств материалов, которые используются при производстве данного изделия;

- состава продукта, его обработки, упаковки и/или способа его стерилизации;

- конечного продукта при длительном хранении;

- при наличии любого подозрения на то, что изделие во время своего применения может вызвать какой-либо нежелательный эффект в организме человека.

Следует отметить, что санитарно-химические методы не относятся к биологической оценке изделия, однако являются обязательным этапом в оценке биосовместимости продукта. Помимо уточнения безопасности самого изделия, они позволяют повысить качество отбора изделий для биологической проверки на первоначальных стадиях разработки изделия [3].

1.3 Оценка биохимических и гематологических показателей крови

Помимо общих тестов на биологическую безопасность, большинство медицинских изделий должно пройти ряд испытаний на гемосовместимость. Гемосовместимость оценивается по результатам тестов in vitro, ex vivo и in vivo, которые описывают как процессы взаимодействия изделия (инородного тела) с кровью, так и сопутствующие изменения компонентов крови и свойств самого материала в результате контакта.

Для проведения анализа на биосовместимость того или иного изделия, а также для контроля приживаемости имплантата необходимо проводить биохимические и гематологические исследования крови реципиента. Безусловно, эксперименты должны проводиться на полностью здоровых животных. Для получения достоверных результатов анализ крови проводится

рано утром, строго натощак. Следует исключить серьёзные физические нагрузки, а также потребление жирной пищи примерно за сутки до анализа. Эти рекомендации применимы как к людям, так и к лабораторным животным [4].

Любые отклонения от нормы следует немедленно фиксировать. Если отклонения выявляются в процессе эксперимента на биосовместимость либо в постимплантационный период у реципиента, перенёсшего имплантацию сертифицированного изделия, следует как можно скорее выяснить причину отклонений. Стоит, однако, отметить, что в постоперационный период в любом случае будут выявляться отклонения от нормальных значений анализов в силу воспалительных процессов, неизбежно протекающих локально после операции – так называемый хирургический стресс [5]. Если же показатели со временем не приходят в норму и/или ухудшаются с течением времени, следует более тщательно исследовать имплантированное изделие во избежание негативного влияния на организм. При необходимости заменить имплантат, а на стадии исследований изменить состав изделия, его покрытия, методов стерилизации либо иного фактора, вызывающего негативные реакции организма.

Один из главных показателей, определяемый анализом крови – общий белок. Он показывает суммарную концентрацию всех белковых компонентов крови. Повышенное значение этого показателя указывает на тот или иной воспалительный процесс, протекающий в организме: инфекционное заболевание, артрит, ревматизм, развитие онкологического заболевания. Понижение общего белка крови указывает на патологии пищеварительной и выделительной систем. В некоторых случаях общий белок может также понижаться при росте злокачественных опухолей [6].

Альбумин – основной белок плазмы крови. Часто измеряется как отдельный показатель в анализах. Повышение уровня альбумина в крови (гиперальбуминемия) указывает, как правило, на сильное обезвоживание, например, при рвоте, поносе, обильном потении. Также гиперальбуминемия

встречается при обширных ожогах. Напротив, снижение альбуминов (гипоальбуминемия) встречается у беременных и кормящих грудью, а также может быть у курильщиков и при передозировке некоторыми лекарственными препаратами. Более общие причины гипоальбуминемии включают в себя острые инфекционные процессы и патологии печени, вплоть до цирроза [7].

Уровень глюкозы измеряется для определения концентрации углеводов в крови. Повышенный уровень (гипергликемия) говорит об угрозе развития либо об уже проявляющемся сахарном диабете. Понижение уровня глюкозы – гипогликемия – приводит к нарушению работы мозга, вплоть до комы [35].

Мочевина является основным продуктом распада белков в организме. Её уровень может кратковременно повышаться после длительных тяжёлых физических нагрузок. Повышенное содержание мочевины в крови в течение долгого времени говорит о хроническом процессе, затрагивающем мышцы; например, внутреннее кровотечение, рост злокачественной или доброкачественной опухоли, сердечная недостаточность [8].

Мочевая кислота – главный продукт распада пуриновых оснований, основных составляющих аминокислот. Выводится почками в неизменном виде, так как не участвует в дальнейших метаболических процессах. Повышение значения этого показателя говорит чаще всего о заболеваниях почек, также возникает при лейкозах и лимфомах, при длительном голодании. Помимо этого, содержание мочевой кислоты в крови увеличивается при передозировке лекарственными средствами, в частности салицилатами и диуретиками, и при злоупотреблении алкогольными напитками. Уровень мочевой кислоты снижается при приёме препаратов пиперазинового ряда, а также при анемиях и гепатите [9].

Креатинин – продукт аминокислотно-белкового обмена в организме. Его содержание в крови зависит от мышечной массы человека, так как креатинин образуется в мышцах при их активных сокращениях. В больших

концентрациях токсичен для организма, однако некоторое его количество в норме присутствует в крови, что указывает на нормальный метаболизм. Креатинин выводится из организма почками с мочой, поэтому повышение его концентрации в крови чаще всего указывает на серьёзные проблемы мочевыделительной системы. Помимо этого, уровень креатинина может повышаться при заболеваниях печени, гипертиреозе, сахарном диабете, тяжёлых инфекциях и артериальной гипертензии. Незначительное повышение уровня креатинина может возникать вследствие длительной напряжённой мышечной работы. В среднем у мужчин нормальная концентрация креатинина в крови выше, чем у женщин [10].

Билирубин – пигмент, который образуется в ходе распада гемоглобина. Повышенное значение этого показателя свидетельствует о проблемах с печенью, где и происходит распад: это может быть острое отравление, гепатит, цирроз, а также желчнокаменная болезнь. Значительное повышение уровня билирубина в крови как правило заметно невооруженным глазом: кожа и слизистые оболочки пациента приобретают характерный желтоватый оттенок («желтуха») [11].

Холестерин – важный продукт липидного обмена. Общий холестерин крови, обычно определяемый стандартным анализом, складывается из трёх компонентов: ЛПОНП (липопротеиды очень низкой плотности), ЛПНП (липопротеиды низкой плотности) и ЛПВП (липопротеиды высокой плотности). ЛПОНП и ЛПНП в высоких концентрациях способствуют развитию атеросклероза, откладываясь на стенках сосудов в виде холестериновых бляшек. ЛПВП, напротив, тормозят развитие атеросклероза, способствуя разрушению бляшек в сосудах. Повышенное значение общего холестерина в крови указывает на высокий риск развития атеросклероза и других заболеваний сердечно-сосудистой системы, повышенный риск инфарктов и инсульта, а также может свидетельствовать о заболеваниях печени [12].

Триглицериды, или нейтральные жиры – один из основных источников энергии для организма, в частности обеспечивающий мышечные сокращения. Триглицериды нерастворимы в воде, поэтому им необходим специальный переносчик – комплекс липидов с белком. Большинство триглицеридов в крови переносится ЛПОНП. Повышенное содержание триглицеридов в крови связывают с повышенным риском развития заболеваний сердечно-сосудистой системы, а также острого панкреатита; точные причины до конца не выяснены. Повышению уровня триглицеридов способствуют злоупотребление алкоголем, снижение функции щитовидной железы (гипотиреоз), сахарный диабет, заболевания печени и почек, подагра, панкреатит. Также повышенные уровни триглицеридов могут сохраняться до нескольких месяцев у пациентов, перенёсших инфаркт миокарда. Снижение уровня триглицеридов может наблюдаться при гипертиреозе, ХОБЛ, нарушениях всасывания кишечника и некоторых других состояниях [13].

С-реактивный белок (СРБ) – белок острой фазы воспаления. Продуцируется печенью. Его уровень резко возрастает при инфекционных заболеваниях (примерно через 6 часов после начала защитной реакции организма на возбудитель заболевания) и приходит в норму через 6-10 дней после выздоровления. Повышение его уровня также может свидетельствовать об атеросклерозе и воспалении сосудистых стенок, поэтому СРБ может служить маркером патологий сердечно-сосудистой системы [14].

Биохимический анализ крови включает также определение некоторых ферментов. Наиболее важными и часто определяемыми показателями являются концентрации гамма-глутамилтрансферазы (гамма-ГТ), аланинаминотрансферазы (АЛТ) и аспартатаминотрансферазы (АСТ). Гамма-ГТ – фермент печени и поджелудочной железы. В норме его содержание в крови должно быть низким, так как это внутриклеточный фермент, попадающий в кровеносное русло только при разрушении клеток (в том числе при их естественном обновлении). Следовательно, повышение

концентрации гамма-ГТ говорит о массовой гибели клеток в организме. Чаще всего к повышению концентрации этого фермента в крови приводят заболевания печени и желчевыводящих путей, панкреатит, инфаркт миокарда, сахарный диабет, ожирение, онкологические заболевания, а также алкоголизм. Снижение уровня гамма-ГТ характерно для гипотериоза [15].

АЛТ и АСТ – ферменты печени, два наиболее важных показателя, свидетельствующих о возможном повреждении этого органа. АЛТ более специфичен; иногда определяются не только концентрации этих ферментов в крови, но и их соотношение (АСТ/АЛТ). У здоровых людей активность этих ферментов в крови невысокая. Наиболее часто их активность увеличивается из-за заболеваний печени (гепатиты, цирроз), а также при повреждениях мышц (например, длительных внутримышечных инъекциях). Злоупотребление алкоголем и жирной жареной пищей также может приводить к незначительному повышению активности обоих ферментов [16].

Железо – один из важнейших микроэлементов в организме. Входит в состав гемоглобина эритроцитов. Всасывается с пищей, затем переносится при помощи особого белка трансферрина. Снижение его концентрации приводит к нарушению переноса кислорода кровью и развитию железодефицитной анемии. Также входит в состав миоглобина мышц. К снижению уровня железа приводят различные нарушения всасывания, хроническая кровопотеря, недостаточное употребление железосодержащих продуктов, хронические заболевания (болезнь Крона, туберкулёз, системная красная волчанка), гемолитические анемии и др. Повышение концентрации железа в крови вызывают талассемия, частые переливания крови, острый гепатит, воспаления почек, гемохроматоз. Стоит отметить, что анализ определяет концентрацию железа, переносимого кровью в связке с трансферрином (около 0,1% от общего количества железа). Количество железа в сыворотке может значительно изменяться в разные дни и даже в течение одних суток; максимальная концентрация обычно достигается в утренние часы [17].

Электролиты крови (K^+, Na^+, Cl^-) обеспечивают поддержание водного и кислотно-щелочного баланса организма. Натрий в основном локализован в межклеточной жидкости, калий – внутри клеток, однако небольшое его содержание также обнаруживается в плазме. Хлориды обычно мигрируют сквозь мембрану клетки, поддерживая её электронейтральность; их уровень чаще всего совпадает с уровнем натрия или близок к нему. Совместное измерение уровней натрия, калия и хлоридов позволяет определить анионовое «окно» – разницу в содержании анионов и катионов в крови. Баланс этих химических элементов является важным показателем здоровья человека, в частности того, как функционируют почки и сердце. Среди всех электролитов наиболее важными показателями для человека являются уровни калия и натрия. При нарушении функционирования почек организм иногда может удерживать избыточное количество жидкости для разбавления натрия и хлоридов таким образом, что их концентрация падает ниже нормы. При сильной потере жидкости концентрация калия, натрия и хлоридов может резко возрастать. Некоторые формы сердечных заболеваний, проблемы с мышцами, нервной системой и сахарный диабет также приводят к отклонениям от нормы уровня одного или нескольких электролитов [18].

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материалы исследования

Объектом исследования выступают образцы имплантатов в виде титановых блоков диаметром 6 мм и высотой 1 мм. Антибактериальное покрытие наносилось на блоки методом ультразвукового напыления с последующей сушкой при комнатной температуре в течение 48 часов.

Для сравнения эффективности антимикробного действия, а также биологической стойкости и совместимости покрытий в качестве матрицы для антибактериального препарата были использованы два полимера: полилактид-ко-гликозид (PLGA) с содержанием сополимеров 50:50 и полилактид (PLA). Вторым компонентом покрытия является антимикробный препарат, в данном случае использовался ванкомицин в 2 концентрациях.

Опытная группа 1 – PLGA 50:50 с итоговым содержанием ванкомицина 30±5 мкг/мм^2.

Опытная группа 2 – PLGA 50:50 с итоговым содержанием ванкомицина 60±10 мкг/мм^2.

Опытная группа 3 – PLA с итоговым содержанием ванкомицина 30±5 мкг/мм^2.

Опытная группа 4 – PLA с итоговым содержанием ванкомицина 60±10 мкг/мм^2.

В качестве контрольной группы выступали титановые блоки того же размера, но не имеющие покрытия.

Полилактид (PLA) является полиэфиром молочной кислоты. Его широкое применение в медицине и биотехнологии обеспечено такими свойствами полимера, как термопластичность, биосовместимость и способность к естественной деградации внутри организма [36]. Для полилактида характерны сравнительно высокие скорости разрушения при нахождении в биологических средах, причём как в аэробных, так и в анаэробных условиях. Немаловажным является и высокая доступность сырья для получения PLA: сырьём для производства этого биополимера

могут служить, например, возобновляемые растительные ресурсы или бытовые отходы. Само производство полилактида также является экологичным, так как сопровождается значительно меньшими выбросами CO_2 в атмосферу по сравнению с производством других полимеров. Молочную кислоту, которая является мономером полилактида, получают микробиологическим методом, используя предварительно полученные гидролизом сахара. Сырьём для гидролиза могут служить, например, крахмал или меласса. Очень часто вместо молочной кислоты для полимеризации используют её соли, лактиды – вследствие повышенной гигроскопичности самой кислоты [19].

Лактид – циклический димер молочной кислоты (лактата). Лактид может существовать в виде активных L- и D-форм, а также в виде рацемата (оптически неактивен). Наиболее распространённой и употребляемой является L-форма, на долю которой при микробиологическом синтезе приходится до 99,5% [20].

Полигликолид (PGA) – термопластичный полимер, продукт полимеризации лактида гликолевой кислоты. Волокна полигликолида обладают очень высокой прочностью и жёсткостью, кроме того, они биосовместимы, нетоксичны и биоразлагаемы. Это обуславливает широкое применение PGA в медицинской практике, в особенности в сочетании с лактидами. [37]

Полиэфиры полилактидгликолида (PLGA) являются одними из наиболее распространённых биоразлагаемых полимерных материалов, используемых в биотехнологии и медицине. Физико-химические свойства PLGA могут варьировать в зависимости от соотношения сополимеров в молекуле и от последовательного их расположения. Благодаря этому возможно получение сополимеров с различными молекулярными массами и отличающимися структурами макромолекул. Таким образом, существует большое семейство сополиэфиров, свойства которых варьируются в пределах определённого диапазона [21].

Ванкомицин, используемый в форме ванкомицина гидрохлорида – антибиотик трициклической группы, гликопептид. Используется преимущественно для лечения стафилококковых инфекций. [38] Ванкомицин получают методом микробиологического синтеза из *Amycolatopsis orientalis*. Повышает проницаемость и ингибирует образование бактериальной клеточной стенки, нарушает синтез РНК. Активен в отношении грамположительных аэробных и анаэробных микроорганизмов, включая резистентные к пенициллину и другим антибиотикам. Не проявляет активности в отношении грамотрицательных микроорганизмов, грибов, простейших, вирусов из-за высокой молекулярной массы. Наиболее активно действует на микроорганизмы в стадии размножения. Обладает низкой биологической доступностью, практически не метаболизируется. При длительном многократном применении возможна кумуляция ванкомицина в тканях. Выводится почками (печенью при приёме внутрь) в неизменном виде [22].

Местное применение повышает концентрацию антибактериального препарата в зоне с наибольшим предполагаемым риском инфекционного осложнения, а также снижает риск развития резистентности у микроорганизмов. Однако ванкомицин даже при местном использовании потенциально оказывает негативное влияние на печень, почки и кровь. Поэтому при имплантации необходим контроль гематологических показателей, почеченых и печёночных проб [23].

2.2 Методы исследования

Для достижения поставленных целей работы были использованы следующие методы:

- Подкожная имплантация титановых блоков с нанесённым на них полимерным антибактериальным покрытием подопытным животным (белым беспородным крысам).
- Гематологические и биохимические анализы крови подопытных животных.
- Вскрытие подопытных животных для оценки местной тканевой реакции.

Статистическая обработка данных проводилась в программе Statistica.10. Для оценки статистических выбросов применялся метод Тьюки, для определения вида распределения - критерий Шапиро–Уилка, U-критерий Манна Уитни для апостериорного сравнения и критерий Краскела-Уоллиса для сравнения различных групп. Уровень статистической значимости $p < 0,05$.

2.2.1 Исследования общей токсичности in vivo на крысах

В эксперименте использовались белые беспородные крысы. Исследование проводилось на 50 особях обоих полов, массой 250-300 г и возрастом 12 недель. Перед оперативным вмешательством все животные были помещены в карантин и прошли акклиматизацию в условиях вивария в течение 14 дней. Условия содержания животных и проведения экспериментов in vivo соответствовали ГОСТ Р ИСО 10993-2 «Требования к обращению с животными» [24].

Были сформированы несколько экспериментальных групп животных: 4 опытных группы и контрольная группа. В каждую группу входило по 10 особей: 5 самцов, 5 самок. Операции проводились в условиях стерильности по стандартной методике в соответствии с ГОСТ Р ИСО 10993-6-2011 [25].

Во время проведения операции для наркоза применялись следующие препараты: раствор тилетамина гидрохлорида, золазепама гидрохлорида (6

мг/кг, золетил 100 Virbac Sante Animale, Франция) и ксилазина гидрохлорида (10 мг/кг, рометар, Bioveta, Чешская Республика). Для имплантации титанового блока формировались подкожные карманы. В сформированные вдоль средней линии спины карманы крысам из опытных групп имплантировали титановые блоки с соответствующим полимером и соответствующей концентрацией ванкомицина в покрытии; крысам из контрольной группы – титановые блоки без покрытия.

Через 3 месяца после оперативного вмешательства проводилось вскрытие подопытных крыс с целью определение наличия или отсутствия местных негативных тканевых реакций на имплантацию (например, некроза прилежащих тканей), а также для оценки функционального состояния внутренних органов после операции.

Предварительно было произведено гуманное умерщвление животных (эвтаназия) путём помещения крыс в газовую камеру и вдыхания ими углекислого газа (CO_2). После достоверного установления факта смерти животного проводилась аутопсия с извлечением органов и их осмотром, а также осмотром прилежащих к области имплантации тканей.

Вскрытие проводилось в соответствии с принятыми процедурами согласно государственным стандартам (ГОСТ Р 57547-2017) [26].

2.2.2 Гематологические и биохимические анализы крови

Контроль гематологических и биохимических показателей крови после операции осуществлялся трижды: через 1 неделю, через 4 недели и через 3 месяца после оперативного вмешательства. Забор крови для исследований осуществлялся путём пункции хвостовой вены. Кровь отбиралась в пробирки, содержащие антикоагулянт ЭДТА. [27]

Забор крови с последующим анализом проводился и до оперативного вмешательства с целью последующего сравнения показателей и контроля состояния здоровья подопытных животных.

Гематологическое исследование проводили на анализаторе BC-2800 Vet Auto Hematology Analyzer (Mindray, Китай). Плазму крови для

исследований получали методом центрифугирования крови в течение 15 мин при 3000 об./мин в медицинской лабораторной центрифуге ОПН-8 («Аналит-Нева», Россия).

Оценка функционального состояния печени и почек проводилась с учётом следующих показателей: альбумин; билирубин; активность аминотрансфераз (АСТ и АЛТ); щелочной фосфатазы (ЩФ); креатинин, мочевина (рекомендованные к анализу ГОСТ Р ИСО 10993-11) с помощью клинических наборов («Ольвекс Диагностикум», Россия) [28].

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе исследования были изучены гематологические и биохимические показатели крови белых беспородных крыс до и после подкожной имплантации титановых блоков с антибактериальным покрытием. Статистически значимые отличия между значениями гематологических показателей крови самцов и самок выявлены не были.

Результаты гематологических и биохимических анализов крови подопытных животных сравнивались как с показателями до имплантации, так и с референсными значениями, представленными в справочной литературе [29]. Параметры крови крыс до имплантации соответствовали нормальным значениям, представленным в следующих таблицах (таблица 3, таблица 4).

Таблица 3 – Референсные значения гематологических показателей крови крыс

Показатель	Норма	Единицы измерения
Гемоглобин	118±4	г/л
Гематокрит	40±2	%
Протромбиновое время	22±1	сек
АЧТВ	19±1	сек
Тромбоциты	562±18	$*10^9$/л
Эритроциты	8,3±0,4	$*10^{12}$/л
Лейкоциты	7,1±0,1	$*10^9$/л
Лимфоциты	65±0,5	%
Моноциты	6,5±0,3	%
Базофилы	0,7±0,1	%
Эозинофилы	2,0±0,1	%
Нейтрофилы	25,8±0,4	%

Стоит отметить, что гематологические параметры крови всех животных до оперативного вмешательства находились в пределах нормы с учётом статистической погрешности, что говорит о здоровье крыс и их подготовленности к проведению эксперимента.

Таблица 4 – Референсные значения биохимических показателей крови крыс

Показатель	Норма	Единицы измерения
Альбумин	31±2,3	г/л
Билирубин	1,2±0,04	мкмоль/л
АСТ	98±6,1	Ед/л
АЛТ	47,4±5,3	Ед/л
Щелочная фосфатаза	111,7±11,1	Ед/л
Креатинин	46±3,4	мкмоль/л
Мочевина	5,3±0,7	ммоль/л

То же касается и биохимических показателей: до имплантации титановых блоков значения всех параметров соответствовали нормальным. Таким образом, можно заключить, что все животные, принимавшие участие в эксперименте, были полностью здоровы; а полученные данные можно считать достоверными.

В ходе исследования сравнивали гематологические показатели крови крыс опытных групп и контрольной группы. Результаты сравнения представлены в следующих таблицах (таблица 5 для опытных групп 1 и 2, таблица 6 для опытных групп 3 и 4).

Таблица 5 – Гематологические показатели крыс до и после имплантации титановых блоков с антибактериальным покрытием на основе PLGA (опытные группы 1 и 2)

Гемоглобин, г/л	116±5	118±3,2	119±2,2	123±3,8	117±5,1	118±4,8	120±3,8	118±3,1	119±3,3	118±4
Гематокрит, %	43±2	41±3	40±4	42±2	40±3	40±2	41±2	40±3	40±2	40±2
Протромбиновое время, сек	20±2	20±1	21±1	22±1	21±2	21±2	21±1	22±1	22±1	23±1
АЧТВ, сек	20±1	19±1	21±1	21±1	18±1	19±1	20±1	19±1	19±1	19±1
Тромбоциты, $*10^9$/л	567±15	527±21	539±24	519±18	537±13	538±19	543±16	559±17	565±18	560±19
Эритроциты, $*10^{12}$/л	8,8±0,6	8,2±0,5	8,3±0,6	8,1±0,5	8,1±0,6	8,2±0,5	8,0±0,7	8,3±0,3	8,2±0,3	8,3±0,3
Лейкоциты, $*10^9$/л	7,3±0,2	13,3±0,7	13,8±0,5	12,7±0,7	7,7±0,4	7,9±0,6	7,8±0,5	7,1±0,2	7,1±0,1	7,2±0,1
Лимфоциты, %	66,0±0,8	51,7±1,7	52,9±1,8	51,2±2,1	62,3±0,5	63,1±0,8	63,0±0,7	63,9±0,5	65,1±0,5	64,0±0,4
Моноциты, %	6,1±0,2	4,1±0,4	4,0±0,5	3,9±0,5	4,7±0,4	5,1±0,3	4,9±0,4	6,5±0,3	6,2±0,4	6,4±0,3
Базофилы, %	0,7±0,2	0,9±0,1	0,8±0,1	0,8±0,1	0,8±0,1	0,7±0,1	0,7±0,1	0,7±0,1	0,7±0,1	0,6±0,1
Эозинофилы, %	2,3±0,2	2,1±0,2	2,2±0,1	2,2±0,2	2,1±0,2	2,1±0,1	2,2±0,1	2,0±0,1	2,1±0,1	2,0±0,1
Нейтрофилы, %	25,0±0,6	39,9±0,7	39,1±0,6	40,2±0,7	28,2±0,5	27,8±0,5	27,0±0,7	26,0±0,5	25,4±0,7	25,3±0,6

Таблица 6 – Гематологические показатели крыс до и после имплантации титановых блоков с антибактериальным покрытием на основе PLA (опытные группы 3 и 4)

Показатель, единицы измерения	До имплантации	После имплантации								
		1 неделя			4 недели			3 месяца		
		Опытная группа 1	Опытная группа 2	Контрольная группа	Опытная группа 1	Опытная группа 2	Контрольная группа	Опытная группа 1	Опытная группа 2	Контрольная группа
Гемоглобин, г/л	116±5	119±3,4	118±2,8	123±3,8	117±4,3	118±3,9	120±3,8	118±3,8	118±3	118±4

Гематокрит, %	43±2	41±4	41±3	42±2	41±2	40±2	41±2	40±1	40±2	40±2
Протромбиновое время, сек	20±2	21±2	20±1	22±1	21±1	20±2	21±1	22±1	23±1	23±1
АЧТВ, сек	20±1	18±1	19±1	21±1	19±1	18±1	20±1	20±1	19±1	19±1
Тромбоциты, $*10^9$/л	567±15	531±23	527±25	519±18	541±14	545±17	543±16	564±13	561±17	560±19
Эритроциты, $*10^{12}$/л	8,8±0,6	8,2±0,4	8,1±0,6	8,1±0,5	8,2±0,5	8,3±0,5	8,0±0,7	8,4±0,3	8,3±0,4	8,3±0,3
Лейкоциты, $*10^9$/л	7,3±0,2	12,9±0,6	13,6±0,3	12,7±0,7	7,9±0,3	7,6±0,7	7,8±0,5	7,2±0,1	7,1±0,2	7,2±0,1
Лимфоциты, %	66,0±0,8	52,3±1,5	50,8±2,2	51,2±2,1	61,9±0,8	63,3±0,9	63,0±0,7	66,0±0,8	64,5±0,6	64,0±0,4
Моноциты, %	6,1±0,2	4,0±0,3	4,1±0,5	3,9±0,5	4,9±0,5	5,2±0,4	4,9±0,4	6,6±0,3	6,3±0,2	6,4±0,3
Базофилы, %	0,7±0,2	0,7±0,3	0,8±0,2	0,8±0,1	0,7±0,1	0,8±0,1	0,7±0,1	0,7±0,2	0,7±0,1	0,6±0,1
Эозинофилы, %	2,3±0,2	2,1±0,1	2,0±0,2	2,2±0,2	2,0±0,2	2,1±0,2	2,2±0,1	2,0±0,2	2,1±0,1	2,0±0,1
Нейтрофилы, %	25,0±0,6	40,3±0,5	39,3±0,7	40,2±0,7	29,1±0,3	28,7±0,5	27,0±0,7	25,9±0,5	25,8±0,7	25,3±0,6

В ходе исследования были выявлены отклонения значений некоторых гематологических показателей на разных сроках после операции. Наибольшие отклонения выявлены в содержании лейкоцитов (рис. 1 - 6). Лейкоцитоз, возникший за счёт увеличения количества нейтрофилов, свидетельствует об иммунной реакции фагоцитоза и развитии воспалительного ответа на оперативное вмешательство и вживление образцов. Возвращение уровня лейкоцитов к значениям, близким к нормальным, через 4 недели после операции, говорит об успешном протекании регенеративных процессов. Полное завершение регенерации

наблюдается через 3 месяца, когда уровень лейкоцитов полностью вернулся к норме.

У животных первой опытной группы через 1 неделю после операции выявлено повышение общего уровня лейкоцитов в среднем на 87%, через 4 недели и 3 месяца значения гематологических показателей приблизились к нормальным в пределах статистической погрешности. Во второй опытной группе общий уровень лейкоцитов повысился на 94% в течение первой недели, затем также снизившись до показателей, близких к норме.

В третьей опытной группе зарегистрировано повышение уровня лейкоцитов на 92% по прошествии 1 недели после операции. Через 1 месяц уровень лейкоцитов вернулся к норме с учётом погрешности. Аналогичная картина наблюдается в 4 опытной группе (зарегистрировано повышение уровня лейкоцитов на 79% в первую неделю после операции).

У животных из контрольной группы обнаружено повышение данного параметра на 79% после 1 недели.

Значения гематологических показателей во всех группах животных находились в норме по прошествии 3 месяцев после оперативного вмешательства.

Лейкоцитоз – повышение количества лейкоцитов в крови – часто наблюдается после оперативных вмешательств вследствие нарушения целостности тканей и, как следствие этого, протекании асептической воспалительной реакции.

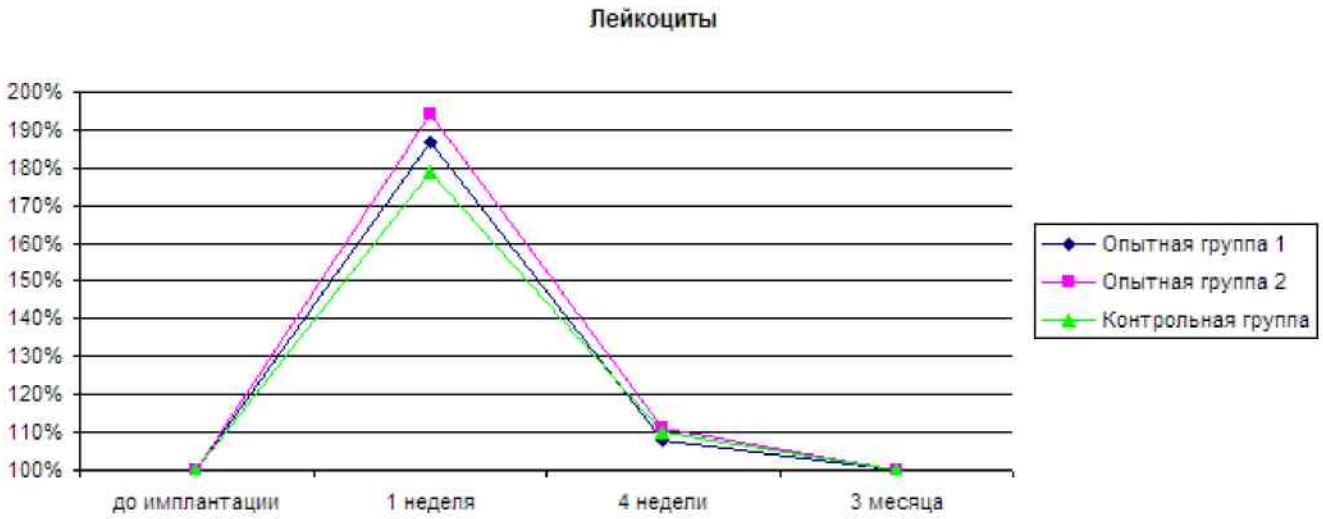

Рисунок 1. Динамика колебаний общего уровня лейкоцитов в крови крыс после подкожной имплантации титановых блоков с антибактериальным покрытием на основе PLGA (опытные группы 1 и 2)

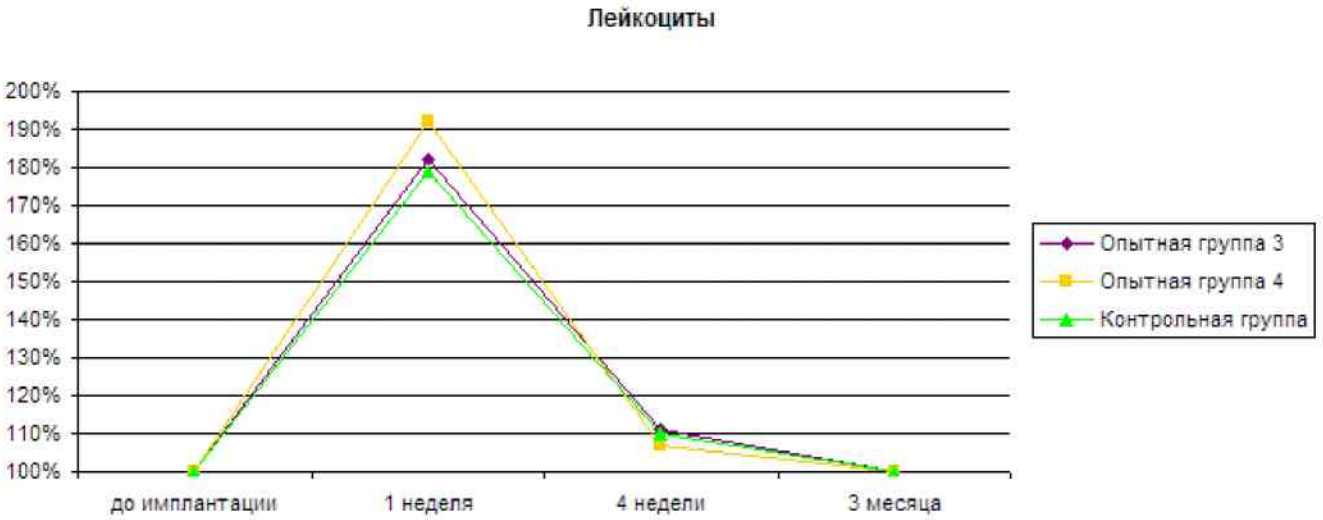

Рисунок 2. Динамика колебаний общего уровня лейкоцитов в крови крыс после подкожной имплантации титановых блоков с антибактериальным покрытием на основе PLA (опытные группы 3 и 4)

Повышение общего уровня лейкоцитов в основном за счёт увеличения числа нейтрофилов в крови говорит об остром воспалительном процессе. Нейтрофилы являются наиболее многочисленными из всех лейкоцитов, выполняя фагоцитарную функцию. Их подвижность позволяет им проникать

в ткани, недоступные для других лейкоцитов, что обуславливает увеличения их количества в крови при повреждении мышечных тканей [30].

Среди животных первой опытной группы было обнаружено повышение уровня нейтрофилов в среднем на 55% от нормы через 1 неделю после операции. Сходная картина наблюдалась и в других опытных группах: уровень нейтрофилов в крови животных 2 и 4 групп через неделю после операции увеличился на 52% по сравнению с нормой, 3 группы – на 56%. Через 1 месяц после вмешательства уровень нейтрофилов снизился до близкого к норме. У животных из контрольной группы картина не претерпела значительных изменений: уровень нейтрофилов увеличился на 56% через 1 неделю после имплантации.

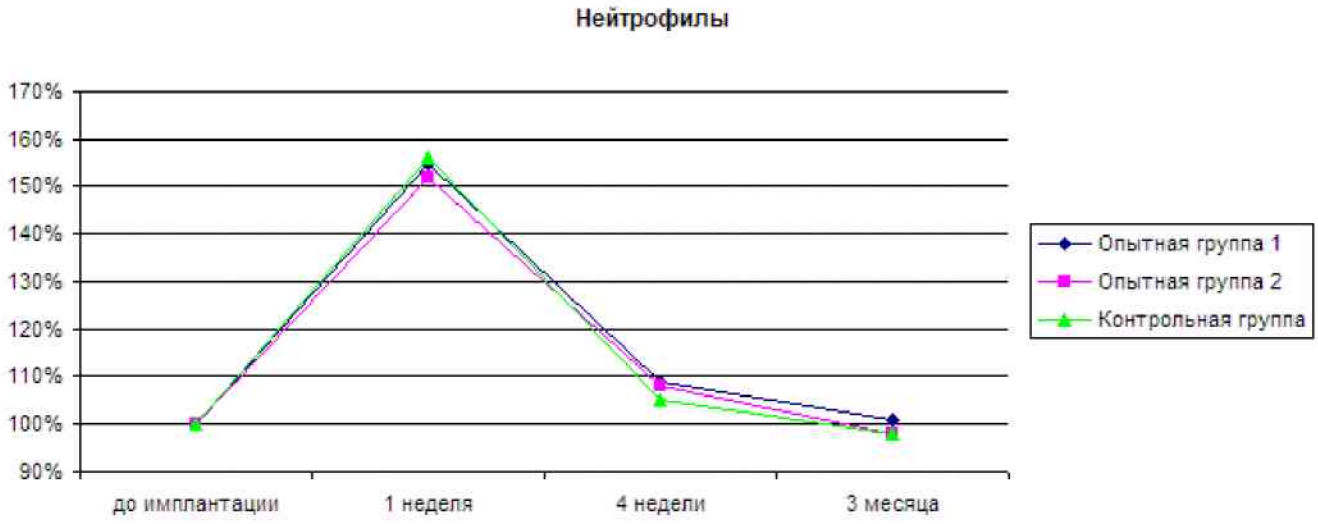

Рисунок 3. Динамика колебаний уровня нейтрофилов в крови крыс после подкожной имплантации титановых блоков с антибактериальным покрытием на основе PLGA (опытные группы 1 и 2)

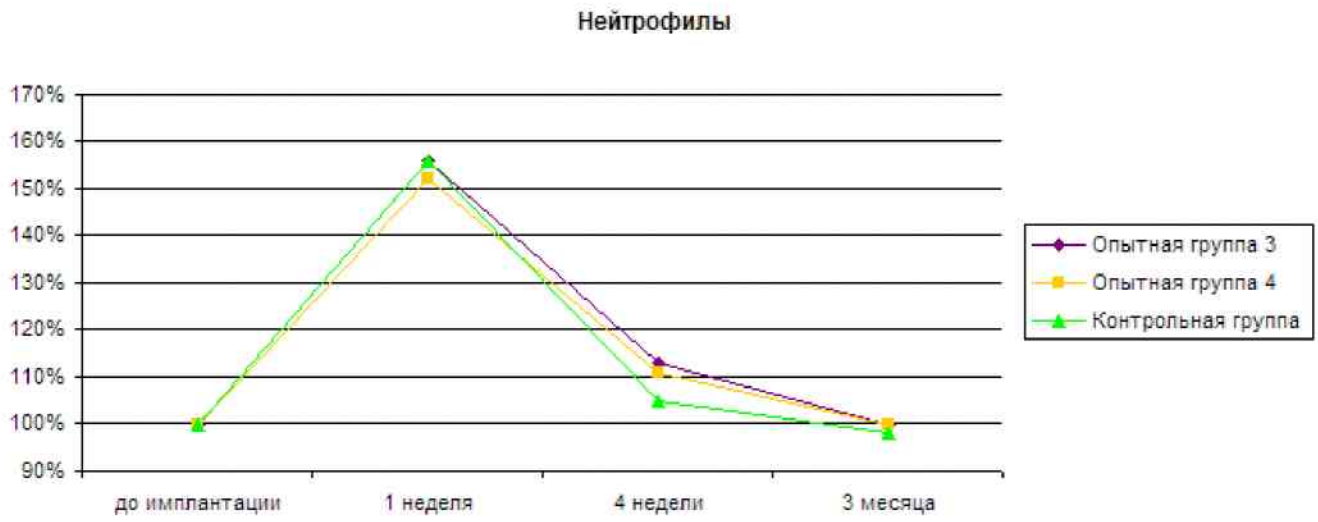

Рисунок 4. Динамика колебаний уровня нейтрофилов в крови крыс после подкожной имплантации титановых блоков с антибактериальным покрытием на основе PLA (опытные группы 3 и 4)

Примечательно также изменение уровня лимфоцитов в крови в сторону его уменьшения. Лимфоциты – специфические клетки иммунной системы, уничтожающие инфекционные агенты и изменённые клетки самого организма. Лимфоцитопения может возникать вследствие целого ряда патологических состояний, самыми распространёнными из которых являются недостаточное питание, инфекционные заболевания и развитие онкологических процессов. Условия содержания крыс и прочие результаты анализов, однако, позволяют исключить данные причины в этом исследовании, поскольку они соответствовали ГОСТу, а все животные получали достаточное сбалансированное питание. Наиболее вероятно лимфоцитопения была вызвана оперативным вмешательством, которое могло повлечь за собой повреждение лимфатических протоков и лимфорею с потерей лейкоцитов [31].

Определить конкретный тип лимфоцитов при проведении стандартного гематологического исследования крови не представляется возможным, поэтому при проведении анализа учитывается только общее число лимфоцитов в крови.

У животных первой опытной группы количество лимфоцитов в крови снизилось на 20% от нормы (1 неделя после операции), вернувшись к значениям, близким к нормальным, через 4 недели и 3 месяца после вмешательства. В других опытных группах и в контрольной группе ситуация сходна: во второй опытной группе уровень лейкоцитов в первую неделю снизился на 19%, в третьей на 20%, в четвёртой – на 22%. Через 3 месяца после имплантации у животных из всех опытных групп количество лимфоцитов в крови повысилось до близких к норме значений с учётом погрешности.

В контрольной группе анализ показал снижение уровня лимфоцитов до 79% от нормы в первую неделю после вживления блока; уровень лейкоцитов восстановился до 97% через 4 недели и до 98% через 3 месяца после вмешательства.

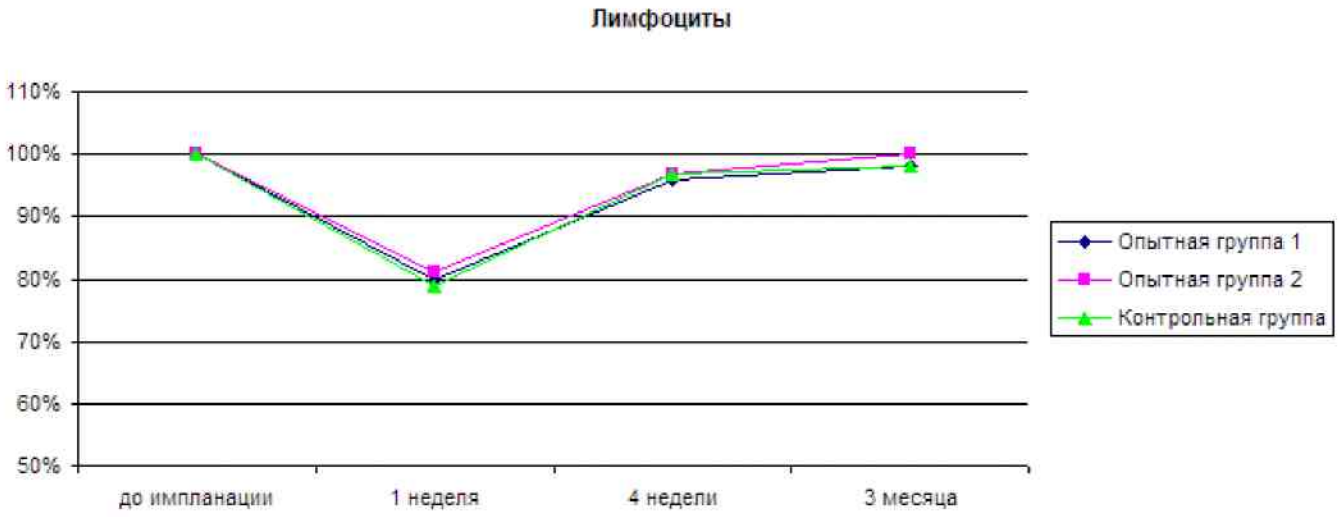

Рисунок 5. Динамика колебаний уровня лимфоцитов в крови крыс после подкожной имплантации титановых блоков с антибактериальным покрытием на основе PLGA (опытные группы 1 и 2).

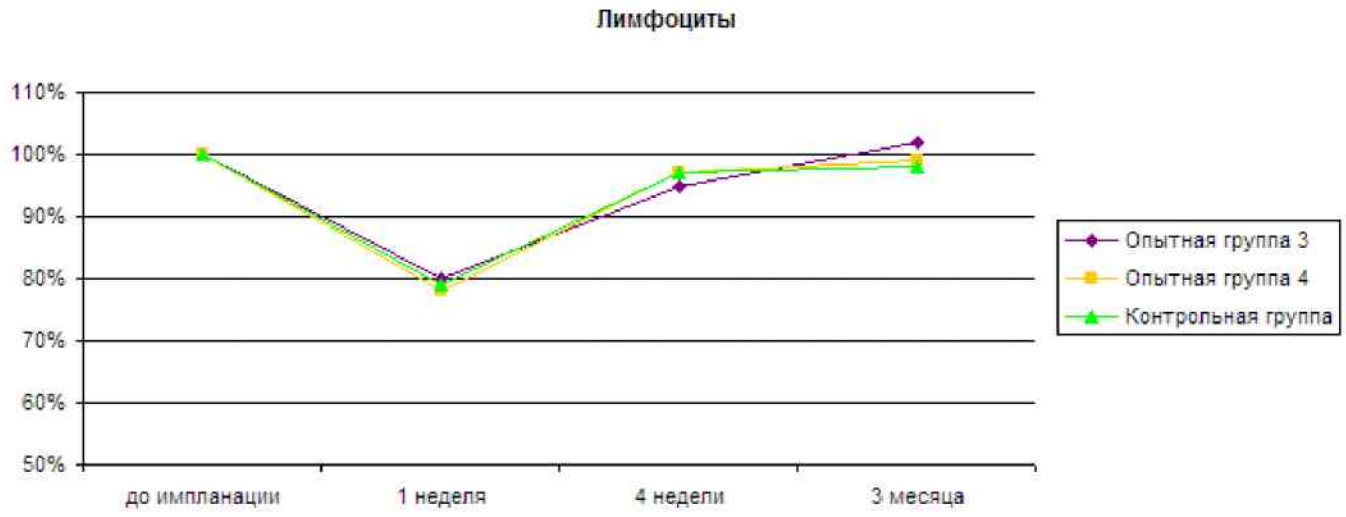

Рисунок.6. Динамика колебаний уровня лимфоцитов в крови крыс после подкожной имплантации титановых блоков с антибактериальным покрытием на основе PLA (опытные группы 3 и 4)

Таким образом, гематологические показатели крови до имплантации, а также через 4 недели и 3 месяца после имплантации находятся в пределах физиологической нормы; через 1 неделю после имплантации выявлены незначительные отклонения от нормальных значений, обусловленные воспалительными процессами, неизбежными после оперативного вмешательства.

В ходе исследования биохимических показателей крови статистически значимые различия между параметрами самцов и самок выявлены также не были. Так же, как и в случае с гематологическими параметрами, проводилось сравнение показателей крови животных из опытных групп и из контрольной группы. Полученные в результате этого данные представлены в следующих таблицах (таблица 7 для опытных групп 1 и 2 и таблица 8 для опытных групп 3 и 4).

Таблица 7 – Биохимические показатели крыс до и после имплантации титановых блоков с антибактериальным покрытием на основе PLGA (опытные группы 1 и 2)

Показатель, единицы измерения	До имплантации	После имплантации								
		1 неделя			4 недели			3 месяца		
		Опытная группа 1	Опытная группа 2	Контрольная группа	Опытная группа 1	Опытная группа 2	Контрольная группа	Опытная группа 1	Опытная группа 2	Контрольная группа
Альбумин, г/л	30±3,1	32±3,3	31±2,8	33±2,7	32±1,7	33±2,1	31±1,5	31±2,1	32±2,0	31±1,9
Билирубин, мкмоль/л	1,2±0,04	1,23±0,03	1,26±0,04	1,28±0,03	1,22±0,05	1,21±0,03	1,23±0,04	1,2±0,05	1,21±0,04	1,21±0,03
АСТ, ед/л	101±5,2	105±5,9	103±6,8	102±6,2	99±6,9	100±6,3	101±6,5	99±5,8	97±6,5	97±6,3
АЛТ, ед/л	44±5,3	81,2±5,6	78,0±6,4	79,0±7,2	50,2±5,1	48,9±4,9	49,1±4,8	45,5±4,2	46,1±5,0	46,8±4,9
Щелочная фосфатаза, ед/л	108,2±12,3	119±11,2	125±10,8	123±11,2	116±11,3	117±10,9	115±10,8	109,3±11,2	113,1±10,6	112,8±11,0
Креатинин, мкмоль/л	48±2,8	50±3,9	51±4,3	51±4,7	49±3,9	48±3,6	48±4,9	45±2,8	44±3,3	45±3,2
Мочевина, ммоль/л	4,9±0,8	5,2±0,8	5,3±0,5	5,1±0,7	5,3±0,4	5,2±0,7	5,3±0,5	5,3±0,6	5,1±0,8	5,2±0,7

Таблица 8 – Биохимические показатели крыс до и после имплантации титановых блоков с антибактериальным покрытием на основе PLA (опытные группы 3 и 4)

Показатель, единицы измерения	До имплантации	После имплантации								
		1 неделя			4 недели			3 месяца		
		Опытная группа 1	Опытная группа 2	Контрольная группа	Опытная группа 1	Опытная группа 2	Контрольная группа	Опытная группа 1	Опытная группа 2	Контрольная группа
Альбумин, г/л	30±3,1	33±1,9	32±2,8	33±2,7	32±2,2	31±2,9	31±1,5	30±3,1	33±2,1	31±1,9
Билирубин, мкмоль/л	1,2±0,04	1,26±0,04	1,24±0,06	1,28±0,03	1,22±0,05	1,20±0,05	1,23±0,04	1,23±0,04	1,22±0,04	1,21±0,03
АСТ, ед/л	101±5,2	103±6,2	104±5,8	102±6,2	100±5,7	102±6,0	101±6,5	95±6,3	99±6,1	97±6,3
АЛТ, ед/л	44±5,3	79,5±6,4	81,8±6,3	79,0±7,2	52,4±5,1	50,9±5,3	49,1±4,8	47,7±5,5	48,1±5,8	46,8±4,9
Щелочная фосфатаза, ед/л	108,2±12,3	124±11,5	120±11,2	123±11,2	116±10,9	118±11,2	115±10,8	110,8±11,2	109,5±11,3	112,8±11,0
Креатинин, мкмоль/л	48±2,8	51±4,2	49±5,1	51±4,7	48±4,6	47±3,9	48±4,9	44±3,5	43±4,2	45±3,2
Мочевина, ммоль/л	4,9±0,8	5,2±0,8	5,3±0,1	5,1±0,7	5,3±0,6	5,1±0,9	5,3±0,5	5,3±0,8	5,3±0,5	5,2±0,7

В ходе исследования были обнаружены значительные отклонения в активности АЛТ в крови на разных сроках после оперативного вмешательства (рис. 7, 8). Так, через неделю после операции было обнаружено повышение активности аланинаминтрансферазы в первой опытной группе на 71%, во второй на 65%, в третьей на 68%, в четвёртой –

на 73%. Как через 1 месяц, так и через 3 месяца после операции значения активности АЛТ в крови крыс вернулись в норму [32]. Подобная динамика характерна и для контрольной группы: активность АЛТ повысилась на 67% в первую неделю после вмешательства, далее снизившись до нормальных значений.

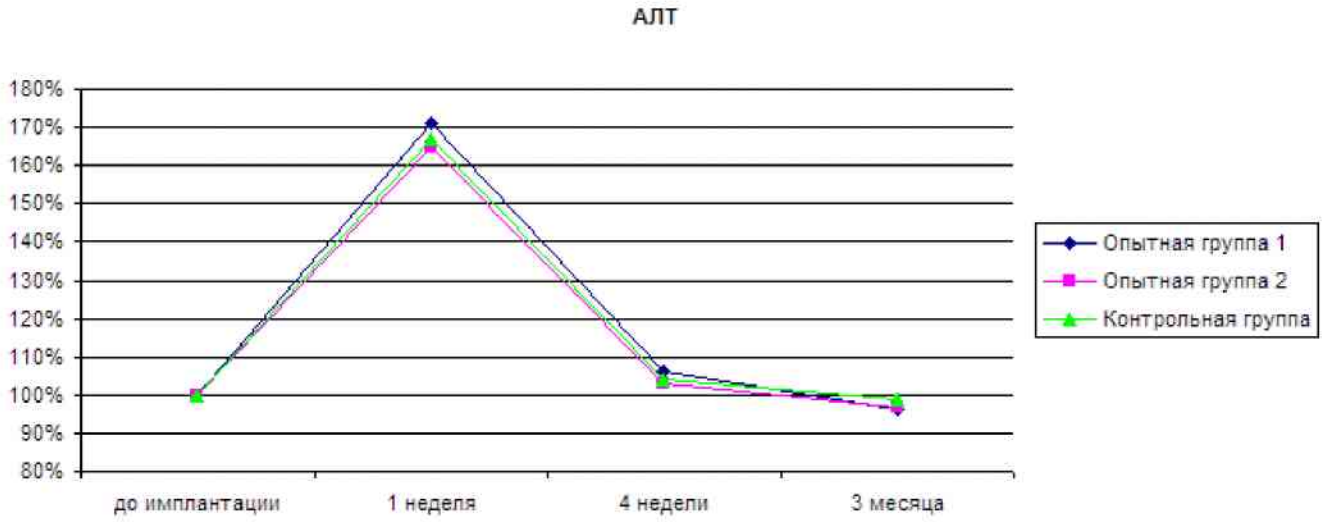

Рисунок 7. Динамика колебаний активности АЛТ в крови крыс после подкожной имплантации титановых блоков с антибактериальным покрытием на основе PLGA (опытные группы 1 и 2)

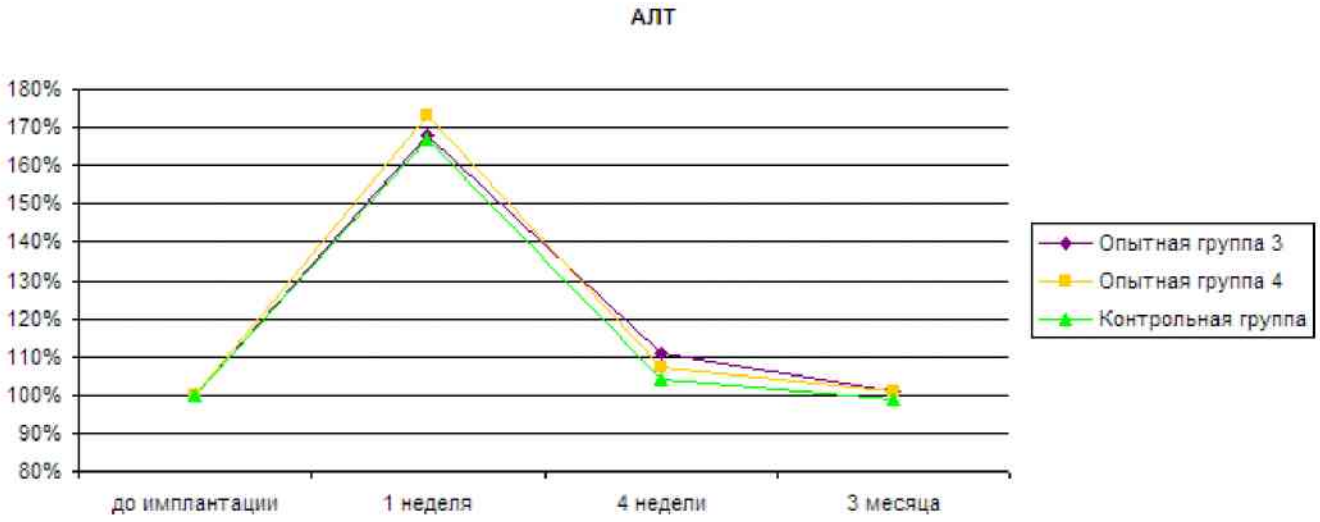

Рисунок.8. Динамика колебаний активности АЛТ в крови крыс после подкожной имплантации титановых блоков с антибактериальным покрытием на основе PLA (опытные группы 3 и 4)

Достоверные отличия в концентрациях альбумина, билирубина, креатинина, мочевины и активностях АСТ и щелочной фосфатазы выявлены не были. Биохимические параметры крови до операции, через 4 недели и 3 месяца находятся в пределах нормы; через 1 неделю после операции выявлены колебания аланинаминотрансферазы (АЛТ).

Фермент аланинаминтрансфераза является внутриклеточным ферментом и содержится главным образом в клетках печени, а также в клетках скелетной мускулатуры. В норме активность АЛТ в крови сравнительно невысока. Увеличение активности этого фермента в крови свидетельствует о нарушении целостности клеток, содержащих АЛТ и, как следствие, его выходе в кровяное русло. В данном случае повышение активности АЛТ в крови вызвано оперативным вмешательством, неизбежно сопровождающимся повреждением скелетной мускулатуры; а постепенное её возвращение к нормальным значениям говорит об успешном протекании процессов регенерации.

Таким образом, можно сделать вывод, что изменения гематологических и биохимических показателей крови в постоперационный период носят адаптационный характер и являются результатом ответной реакции организма на оперативное вмешательство и вживление инородного тела.

В ходе проведения вскрытия подопытных животных видимые патологические изменения прилежащих тканей обнаружены не были. Не выявлено очагов некротического поражения тканей, что свидетельствует об отсутствии тканевой токсичности покрытия и хорошей приживаемости покрытого им изделия. Морфологически прилежащие мышечные ткани светло-розового цвета, без повреждений, без признаков воспалительных или иных патологических процессов.

Исследование внутренних органов крыс, принимавших участие в эксперименте, также не показало наличия каких-либо патологических изменений. Особое внимание при проведении аутопсии было уделено печени

и почкам, так как именно эти органы участвуют в выведении продуктов биологической деградации антибактериального лекарственного покрытия из организма.

Морфологическая оценка состояния тканей печени не показала наличия очагов некротического изменения тканей, у всех подвергнутых аутопсии животных размеры органа соответствуют среднестатистическим нормальным значениям: 8-9 см в поперечном диаметре, 4,5-5,5 см в дорсовентральном измерении и 3-3,5 см в краниокаудальном измерении. При взвешивании печени не было выявлено значительных отклонений от референсных значений (15-16 г). Объём печени всех подвергнутых вскрытию животных также соответствует норме и составляет в среднем 21 – 23 мл [39].

При визуальном осмотре почек также не было выявлено никаких отклонений: размеры органов соответствуют нормальным (2-4 см в длину и 1,5-2 см в ширину), патологических образований и некротических изменений тканей не наблюдается. У большинства животных вне зависимости от пола размеры левой почки незначительно больше правой, что является физиологической нормой [40].

Вес почек также находился в пределах нормы, составляя в среднем около 2-2,5 см (для пары органов) [41].

При проведении аутопсии все животные были взвешены. В среднем вес животных находился в пределах от 200 до 250 г, что соответствует нормальным значениям. Сравнение с весом животных до проведения операции показывает отсутствие значительных изменений данного параметра [42].

Полученные данные позволяют сделать заключение об отсутствии токсического влияния покрытия на органы и ткани, а также о достаточно высокой биологической совместимости данного покрытия. Исходя из результатов исследования, можно заключить, что биосовместимость покрытий на основе PLGA и PLA примерно одинакова и не имеет существенной зависимости от используемой концентрации

антибактериального препарата. Таким образом, при необходимости использования покрытий подобного типа конечный выбор полимера-носителя должен основываться не на степени его биологической совместимости, а на иных параметрах, например, на скорости биодеградации покрытия в организме и скорости высвобождения антибактериального лекарственного препарата из него.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на значительный прогресс в области медицины, не все заболевания опорно-двигательного аппарата поддаются консервативному лечению. Существует целый ряд дегенеративных заболеваний костной ткани, например, различные виды артрозов и артритов, при которых протезирование является наиболее эффективным, а порой единственным методом лечения. Помимо этого, протезирование может значительно улучшить качество жизни пациента после ампутаций и тяжёлых травм, как например перелом шейки бедра. В связи с этим большой интерес представляет проблема предотвращения инфицирования области протезирования после операции. Наиболее перспективным её решением представляется нанесение биоразлагаемых антибактериальных полимерных покрытий на сам эндопротез, однако такое покрытие должно быть биологически совместимым и не вызывать реакции отторжения.

В данной работе было проведено исследование биологической совместимости нескольких вариантов полимерного покрытия, содержащего антибиотик. В качестве матрицы для препарата – ванкомицина – использовались два различных полимера – PLA и PLGA. Ванкомицин был использован в двух разных концентрациях для изучения его влияния на биосовместимость покрытия. Таким образом, были созданы 4 опытные группы для изучения биосовместимости 4 типов полимерного покрытия.

Исследование биологической совместимости включало в себя целый ряд процедур, в числе которых имплантация белым беспородным крысам образцов протезов в виде титановых блоков с нанесённым на них покрытием, гематологические и биохимические анализы крови подопытных животных и последующее вскрытие животных. Поставленные задачи были выполнены в полном объёме:

1. Нанесение лекарственных покрытий на поверхность титановых блоков осуществлялось ультразвуковым напылением растворов, содержащих PLGA или PLA в качестве матрицы для

антибактериального препарата ванкомицина. Данный способ обеспечивает равномерное распределение действующего вещества по поверхности, наличие полимера позволяет добиться адресной доставки и контролируемого высвобождения препарата.

2. Наблюдение за здоровьем животных после имплантации и последующая макроскопическая оценка области имплантации показали отсутствие патологических изменений. Не выявлено очагов некротического поражения тканей, что свидетельствует об отсутствии тканевой токсичности покрытия и хорошей приживаемости покрытого им изделия. Патоморфологическое исследование печени и почек установило отсутствие патологических изменений органов.
3. Статистически значимых различий между животными из опытных групп и контрольной группы не обнаружено ни на одном из сроков. Все изменения анализов крови животных свидетельствуют о неинфекционном воспалительном процессе, вызванным хирургическим вмешательством. Возвращение показателей крови через 4 недели после операции к первоначальным значениям говорит об успешном протекании регенеративных процессов.
4. Исследование показало отсутствие токсических эффектов со стороны антибактериальных покрытий на организм лабораторных животных после имплантации, что говорит о достаточной биологической совместимости и возможности использования подобных покрытий в практике изготовления медицинских изделий на основе титана и его сплавов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Биосовместимость. / под ред. В. И. Севастьянова. Москва: ГУП «Информационный центр ВНИИгеосистем», 1999. 368 с.

2. ГОСТ Р ИСО 10993-1–2009. Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 1. Оценка и исследования. Введ. 2009-08-06. Москва: Стандартинформ, 2009. 14 с.

3. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. / Под ред. А. Н. Миронова. Москва: Гриф и К, 2013. 944 с.

4. Меньшиков В. В. Обеспечение качества лабораторных исследований. Преаналитический этап: справочное пособие / под ред. Меньшикова В. В. Москва: «ЮНИМЕД-пресс», 2003. 312 с.

5. Овечкин А. М. Хирургический стресс-ответ, его патофизиологическая значимость и способы модуляции // Регионарная анестезия и лечение острой боли. 2008. Т. 2 № 2. С. 49-62.

6. Рожнова О. М., Шарапов В. И., Маянская Н. Н. Биохимия крови (учебное пособие) // Успехи современного естествознания. 2010. № 2. С. 47-48;

7. Лабораторные методы исследования в клинике: справочник / под ред. В. В. Меньшикова. Москва: Медицина, 1987. 368 с.

8. Давыдова А. В. Биохимический анализ крови в дифференциальной диагностике заболеваний печени: учебное пособие для врачей. Иркутск: ИГМУ, 2013. 64 с.

9. Барскова В. Г. Влияние гипергликемии и гиперинсулинемии на уровень мочевой кислоты и течение артрита у больных подагрой с сахарным диабетом 2 типа / В. Г. Барскова, М. С. Елисеев, А. В. Зилов, Е. Л. Насонов // Ожирение и метаболизм. 2007. Т. 4. №1. С. 19-23.

10. Лабораторная диагностика в урологии : методические рекомендации № 57 / Д.Ю. Пушкарь [и др.]. Москва: Издательский дом «АБВ-пресс», 2019. 109 с.

11. Гончарик Т. А. Дифференциальная диагностика желтух: учебно-методическое пособие. Минск: БГМУ, 2009. 24с.

12. Латфуллин И. А. Атеросклероз (краткие сведения истории развития, причины, патогенез заболевания, факторы риска, принципы прфилактики). Казань: Издательство Казанского университета, 2015. 145 с.

13. Сергиенко И. В., Аншелес А. А., Кухарчук В. В. Дислипидемии, атеросклероз и ишемическая болезнь сердца: генетика, патогенез, фенотипы, диагностика, терапия, коморбидность. 4-е изд., перераб. и доп. Москва: ООО «ПатиСС», 2020. 298 с.

14. Гребенев А.Л. Пропедевтика внутренних болезней : Учебник. 5-е изд., перераб. и доп. Москва: Медицина, 2001. 592 с.

15. Ипатова М. Г., Мухина Ю. Г., Шумилов П. В. Интерпретация биохимического анализа крови при патологии печени: Пособие для врачей. Москва: Прима-Принт, 2017. 136 с.

16. Гавриленко Д. И., Гавриленко Т. Е. Особенности интерпретации некоторых печеночных тестов : Практическое пособие для врачей. Гомель: ГУ «РНПЦ РМиЭЧ», 2017. 27 с.

17. Общий анализ крови: метод. указ. к практ. занятиям по пропедевтике внутр. медицины для студентов мед. фактов высш. мед. учеб. заведений III–IV уровня аккредитации /сост.: Т.В. Ащеулова, Н.И. Питецкая. Харьков: ХНМУ, 2016. 20с.

18. Данилова Л. А. Анализы крови, мочи и других биологических жидкостей человека в разные возрастные периоды. 2-е издание. Санкт-Петербург: СпецЛит, 2016. 111с.

19. Левченко Е. В., Чернышева Н. Л. Производство биоразлагаемого полимера полилактида // Вестник молодёжной науки. 2016. №4 (6). С. 22-27.

20. Способ получения лактида медицинской чистоты / О. В. Бабкина, В. Т. Новиков, А. С. Князев, К. В. Алексеенко // Вестник Томского государственного университета. 2013. № 367. С. 195-199.

21. Тимченко Т. В., Щербакова Л. И., Компанцев В. А. Поли-D,L-лактид-ко-гликолид: методы получения, свойства и использование для разработки лекарственных препаратов со средствами микро- и нанодоставки // Современные проблемы науки и образования. 2015. №4. С. 559-570.

22. Белоусов Д. Ю., Белоусов Ю. Б., Селютин О. А., Филиппова О. В. Сравнительная характеристика препаратов ванкомицина, зарегистрированных в РФ. Качественная Клиническая Практика. 2009. №4. С. 3-12.

23. Шихвердиев Н. Н., Хубулава Г. Г., Марченко С. П., Суворов В. В. Влияние местного применения ванкомицина на функцию органов после операций на сердце // Патология кровообращения и кардиохирургия. 2015. Т. 19, № 4. С. 34-37.

24. ГОСТ Р ИСО 10993-2-2011 Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 2 Требования к обращению с животными. Введ. 2013-01-01. Москва: Стандартинформ. 2011. 11 с.

25. ГОСТ Р ИСО 10993-6-2011 Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 6 Исследование местного действия после имплантации. Введ. 2013-01-01. Москва: Стандартинформ. 2011. 24 с.

26. ГОСТ Р ИСО 57547-2017 Патологоанатомическое исследование трупов непродуктивных животных. Общие требования. Введ. 2017-09-01. Москва: Стандартинформ. 2017. 15 с.

27. Грачева О. А., Пахомов Г. А., Елдашев А. В. Методы взятия крови у разных видов животных, птиц и рыб : учебно-методическое пособие. Казань: Центр информационных технологий КГАВМ, 2008. 33 с.

28. ГОСТ Р ИСО 10993-11-2009 Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 11 Исследования общетоксического действия. Введ. 2009-08-06. Москва: Стандартинформ. 2009. 21 с. .

29. Справочник. Физиологические, биохимические и биометрические показатели нормы экспериментальных животных. / под ред. Макарова В.Г., Макаровой М.Н. Санкт-Петербург: ООО «Издательство ЛЕМА», 2013. 116 с.

30. Андрюков Б. Г., Богданова В. Д., Ляпун И. Н. Фенотипическая гетерогенность нейтрофилов: новые антимикробные характеристики и диагностические технологии // Гематология и трансфузиология. 2019. №64(2). С. 211-221

31. Ватутин Н. Т., Ещенко Е. В. Лимфопения: основные причины развития // Архивъ внутренней медицины. 2016. № 2 (28). С. 22-27.

32. Войтенко Н. Г., Макарова М. Н., Зуева А. А. Вариабельность биохимических показателей крови и установление референсных интервалов в доклинических исследованиях. Сообщение 1: крысы // Лабораторные животные для научных исследований. 2020. № 1. С. 47-53.

33. Хенч, Л., Джонс, Д. Биоматериалы, искусственные органы и инжиниринг тканей. Москва : Техносфера, 2005. 305 с.

34. Zor, F. Biocompatibility in regenerative medicine / F. Zor, F. N. Selek, G. Orlando, D. F. Williams // Nanomedicine (London). 2019. 13 p.

35. Koutny, T. Blood glucose level reconstruction as a function of transcapillary glucose transport // Computers in Biology and Medicine. 2014. Pp 171-178.

36. Casalini, T. A Perspective on Polylactic Acid-Based Polymers Use for Nanoparticles Synthesis and Applications/ T. Casalini, F.Rossi, A. Castrovinci, G. Perale// Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. 2019. 15 p.

37. Xiaoyan, T., Xiaojun, Yu. Polymeric Biomaterials in Tissue Engineering and Regenerative Medicine in Natural and Synthetic Biomedical Polymers // Natural and Synthetic Biomedical Polymers. 2014. Pp 351-357.

38. Hermans, P. E., Wilhelm, M. P. Vancomycin // Mayo Clinic Proceedings. 1987. № 62(10). Pp 901-905.

39. Vdoviaková, K. Importance Rat Liver Morphology and Vasculature in Surgical Research/ K. Vdoviaková, E.Petrovová, L. Krešáková, M. Maloveská, J. Teleky, J. Jenčová, J. Živčák, A. Jenča Jr.// Medical Science Monitor. 2016. Pp 4716-4728.

40. Dorotea, S.B. Kidney Measures in the Domestic Rat: a Radiographic Study and a Comparison to Ultrasonographic Reference Values/ S.B. Dorotea, T. Banzato, L. Bellini, B. Contiero, A. Zotti//Journal of Exotic Pet Medicine. 2016. № 25. Pp 157-162.

41. Kanerva, R.L. Comparison of Fresh and Fixed Organ Weights of Rats/ R.L. Kanerva, F.R. Lefever, C.L. Alden// Toxicologic Pathology. 1983. Vol. 11. №2. Pp 129-131.

42. Yoldas, A., Dayan M. O. Morphological Characteristics of Renal Artery and Kidney in Rats // The Scientific World Journal. 2014. Pp 1-7.

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РФ

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования

ПЕНЗЕНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

Факультет
физико-математических
и естественных наук

Кафедра
«Общая биология и биохимия»

Направление подготовки
06.03.01 Биология
Профиль подготовки «Биохимия»

Утверждаю:
Зав. кафедрой
_____ Г.А. Карпова
«06» ноября 2020г.

Задание

По ВКР студента Андреевой Елены Сергеевны

Тема работы «Изучение биологической совместимости антибактериального лекарственного покрытия изделий из титана»

Утверждена приказом по Университету от «25» ноября 2020 г. № 883/о
Срок сдачи студентом законченной работы «31» мая 2021г.

КАЛЕНДАРНЫЙ ПЛАН ВКР

№ п/п	Перечень подлежащих разработке вопросов:	Сроки выполнения этапов	Примечания
1	Подбор и изучение литературы, составление библиографии по теме научного исследования	Ноябрь 2020	выполнено
2	Составление содержания выпускной квалификационной работы, подготовка обзора литературы	Декабрь 2020-апрель 2021	выполнено
3	Оформление теоретической части выпускной квалификационной работы (1 главы), исправление замечаний	Апрель 2021-май 2021	выполнено
4	Выбор материалов, и базы исследования методов: подкожная имплантация титановых блоков с нанесённым на них покрытием, общий и биохимический анализы крови лабораторных животных, вскрытие лабораторных животных.	Ноябрь 2020	выполнено
5	Выполнение экспериментальной части выпускной квалификационной работы Подготовка экспериментальных образцов титановых блоков с антибактериальным покрытием, исследование биосовместимости лекарственного покрытия, влияния имплантации экспериментальных образцов на гематологические и биохимические параметры крови мелких лабораторных животных.	Декабрь 2020-апрель 2021	выполнено
6	Обработка полученных результатов, оформление таблиц, графиков, их описание.	Апрель 2021-май 2021	выполнено
7	Подготовка материалов исследования для апробации на научно-практических конференциях	Май 2021-июнь 2021	выполнено
8	Оформление текста выпускной квалификационной работы. Подготовка доклада и презентации	Май 2021-июнь 2021	выполнено
9	Проверка работы на наличие заимствования в системе «Антиплагиат»	До 9 июня 2021	выполнено

Дата выдачи задания «06» ноября 2020 г.

Руководитель _____ Кручинина А.Д.

Задание принял к исполнению _____