

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

"ПЕНЗЕНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ"

Факультет физико-математических и
естественных наук

Кафедра "Общая биология и
биохимия"

Направление подготовки 06.03.01 Биология

Профиль Биохимия

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

на тему:

**«ИЗУЧЕНИЕ ДЕГРАДАЦИИ ПОЛИМЕРНОГО ПОКРЫТИЯ
ЛЕКАРСТВЕННЫХ СТЕНТОВ IN VITRO»**

Студент  Чернова Анна Михайловна

Руководитель  Кручинина А.Д.

Нормоконтролёр  Кручинина А.Д.

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

Заведующий кафедрой  Карпова Г.А.

Работа защищена с отметкой отлично (протокол заседания ГЭК от 21.06.18 № 16)

Секретарь ГЭК  Кручинина А.Д.

Пенза, 2018

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	2
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	5
1.1 Методы эндоваскулярной хирургии	5
1.2 Стенты. Типы стентов	8
1.3 Предполагаемые механизмы развития рестеноза.....	10
1.4.1 Антипролиферативные препараты.....	11
1.4.2 Полимерные покрытия стентов	13
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	15
2.1 Подготовка образцов к исследованию.....	15
2.2 Моделирование деградации антипролиферативного покрытия в условиях in vitro.....	16
2.3 Исследование профиля элюции сиролимуса ВЭЖХ.....	16
2.4 Имплантация стентов животным.....	17
2.5 Гистологическое исследование	18
2.6 Методы статистической обработки результатов	20
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	21
3.1 Результаты нанесения покрытия на стенты	21
3.2 Результаты деградации антипролиферативного покрытия in vitro....	26
3.3 Результаты гистологических исследований	33
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	37
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	39
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	40

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. Во всём мире сердечно сосудистые заболевания являются основной причиной смерти и инвалидности граждан. В настоящее время уровень смертности от сердечно-сосудистой патологии составляет около 60 % от диагностированных заболеваний [16]. В связи с этим большое внимание уделяется вопросам профилактики, ранней диагностики и лечения данных патологии [10].

Коронарному стентированию отводится основное место в эндоваскулярном лечении больных сердечно-сосудистыми заболеваниями [2]. Этот высокотехнологичный метод характеризуется малой травматичностью и высокой эффективностью, а в ряде случаев служит прямой альтернативой традиционному хирургическому лечению [12].

Современные методы эндоваскулярной хирургии, в том числе стентирование коронарных поражений различной сложности дало возможность эффективно улучшать состояние пациентов. Однако осложнением данного метода является возникновение вторичного сужения сосудистого просвета. Имплантация коронарного стента приводит к травмированию сосудистой стенки, что является причиной возникновения ответа организма [22]. Применение в клинической практике лекарственных стентов из которых выделяется активное вещество, привело к снижению частоты рестенозов как следствие снижению необходимости повторного хирургического вмешательства [11].

Для достижения наилучшего клинического результата необходимо обеспечить контролируемые высвобождения лекарственного препарата, количество которого будет достаточным для подавления гиперплазии.

Лекарственное покрытие изготавливается из раствора полимера - ПЛГА и лекарственного препарата – сиролимуса. Согласно литературным данным ПЛГА с разным соотношением сополимеров обладают различной скоростью деградации. При замедлении деградации полимера скорость

высвобождения препарата будет снижаться и время его задержки на поверхности изделия будет увеличено [3].

При разработке медицинских изделий важным этапом является проведение доклинических исследований с целью оценки свойств изделия.

Целью данной работы является исследование скорости деградации полимерного лекарственного покрытия коронарных стентов и высвобождение лекарственного препарата *in vitro*.

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

1. Провести анализ литературы по теме исследования.
2. Подготовить экспериментальные образцы для проведения исследования.
3. Оценить начальное и остаточное после моделирования деградации покрытия количество препарата методом УФ-спектроскопии.
4. Изучить профиль элюции лекарственного препарата при моделировании деградации покрытия методом ВЭЖХ.
5. Проанализировать влияние типа полимера и количества препарата на интенсивность деградации лекарственного покрытия.
6. Оценить антипролиферативное действие лекарственного покрытия путем имплантации лекарственных стентов с последующим гистологическим исследованием.

Бакалаврская работа написана на 48 листах, содержит 14 рисунков, 1 таблицу и список литературы на русском и английском языках из 72 источников.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Методы эндоваскулярной хирургии

Одной из ключевых проблем здравоохранения развитых странах является высокий процент заболеваний органов кровообращения у населения трудоспособного возраста, которые являются основной причиной смерти и инвалидности [21].

В связи с этим восстановление нормальной проходимости коронарных артерий считается основным методом выбора, позволяющим повысить качество жизни пациента. Эндоваскулярные методы оперативного лечения широко распространены в современной кардиологической практике и занимают лидирующие позиции [2].

Эндоваскулярная хирургия – раздел оперативной хирургии, предполагающий транслюминальные (эндоваскулярные) хирургические вмешательства по восстановлению просвета атеросклеротически суженных или окклюзированных артерий, а также закрытию (эмболизации) гемангиом или сосудов опухолевых образований [1]. Эндоваскулярные операции проводят под рентгенологическим контролем. Доступ осуществляют, как правило, пункционной катетеризацией бедренной артерии, введением специальных катетеров и инструментов, позволяющих выполнять эмболизацию разных артерий, их стентирование, баллонную дилатацию, лечение некоторых врожденных пороков сердца.

Эндоваскулярная хирургия характеризуется малой инвазивностью методов, уменьшением риска послеоперационных осложнений, снижением смертности и продолжительности сроков госпитализации. В настоящее время эндоваскулярные вмешательства на коронарных артериях делают в 2 раза чаще, чем коронарное шунтирование [12].

Чрескожная транслюминальная ангиопластика представляет собой расширение суженного участка артерии при помощи баллонного катетера. Этот метод был воплощен А. Грюнтцигом в 1978 г. В настоящее время для чрескожной баллонной ангиопластики используют жесткий баллон, смонтированный на двухканальном катетере. Один канал необходим для введения рентгеноконтраста и перемещения катетера вдоль проводника, второй – для надувания баллона [1]. Перед установкой стента выполняют диагностическую ангиографию под рентгенологическим оборудованием. После этого в артерию вводят проводник и перемещают его к поврежденному участку. Далее по проводнику вводят баллонный катетер, устанавливают его в зоне сужения, раздувают баллон и достигают расширения сосуда [11].

Главным показанием для проведения транслюминальной баллонной ангиопластики считается наличие ограниченного стеноза со степенью сужения просвета сосуда 70-90 % без признаков атероматозного распада и кальцификации стенки. Осложнениям баллонной ангиопластики являются отслойка интимы, острый тромбоз и спазм артерии. Дилатация может также осложниться дистальной эмболией и разрывом сосуда [36].

Возможности эндоваскулярной хирургии расширились за счет использования лазерных источников энергии, оснащенных гибкими кварцевыми световодами. Восстановление просвета окклюзированных сосудов, независимо от стадии атеросклеротического процесса, стало возможным благодаря использованию высокоэнергетических лазеров на парах меди.

При наличии плотных атеросклеротических бляшек, полностью обтурирующих просвет артерии, для создания канала и восстановления просвета сосуда используют роторную реканализацию. При данном методе восстановления проходимости сосуда используют специальный катетер, имеющий на торцевой части вращающуюся головку из высоколегированного сплава [56].

Механизм создания просвета заключается в фрагментации атеросклеротических масс под действием вращающейся роторной головки. За счет сверхвысокой скорости вращения головки разрушение бляшек происходит до размеров форменных элементов крови. Показание к выбору роторной реканализации, по сравнению смеханической или лазерной, является протяженность окклюзии более 10 см. Лазерную и роторную реканализацию, как правило, дополняют баллонной дилатацией.

Стентирование. Коронарные стенты являются внутрисосудистыми опорными каркасами в виде сетки, изготовленной из металлических нитей с достаточной прочностью для предотвращения спадания сосуда за счёт периваскулярного склероза всегда развивающегося после дилатации [38]. Доставка осуществляется с помощью тонкого металлического проводника под наблюдением на мониторе, на проводнике находится баллон, размер его выбирается исходя из информации о суженном участке, стент расположен на баллоне, находится в сжатом состоянии. Для изготовления стентов используют биосовместимые материалы, обладающие необходимой гибкостью и упругостью, способные подстраиваются под сосуд.

При раздувании баллона происходит расширение стента и вдавливание его в стенку артерии, манипуляцию по раздуванию баллона проводят несколько раз, затем удаляют баллон из артерии вместе с катетером и проводником, стент остаётся в организме человека и выполняет функцию поддержки просвета сосуда.

Сквозь сосуд в устье суженной коронарной артерии вводится специальный катетер, через который проводится тонкий металлический проводник под наблюдениями на мониторе. Проводник снабжен специальным баллоном, размер которого подбирается в соответствии с особенностями суженного участка. На баллоне смонтирован в сжатом состоянии стент, который обязательно совместим с органами и тканями человека, гибкий и упругий, подстраивающийся под состояние сосуда.

Введенный баллон на проводнике раздувается, стент расширяется и вдавливается во внутреннюю стенку. Для полной уверенности в том, что стент расширился правильно, баллон раздувается несколько раз. Затем баллон сдувается и удаляется из артерии вместе с проводником и катетером. Стент остается и сохраняет просвет сосуда. [15].

Стентирование артерий очень быстро завоевало популярность во всем мире с момента своего возникновения. Показания к использованию стентов постоянно расширяются. Имплантацию данных устройств производят и коронарные, вертебробазиллярные, внутренние сонные, интракраниальные, почечные, подвздошные и другие артерии при самых различных поражениях артериального русла. Метод по эффективности значительно превосходит баллонную ангиопластику. Главными достоинствами служат постоянная оптимальная дилатация сосуда, ликвидация диссекций интимы, снижение риска эмболии дистального русла, особенно при наличии изъязвленных бляшек и тромботических масс, снижение риска тромбоза, рестеноза и увеличение времени проходимости артерии [13].

1.2 Стенты. Типы стентов

Стент—это специальная, изготовленная в форме цилиндрического каркаса упругая металлическая или пластиковая конструкция, которая помещается в просвет артерии и обеспечивает расширение участка.

Лекарственный стент состоит из металлического каркаса, полимера и лекарства, выделяющегося из полимерного покрытия. Металлическая основа для стентов изготавливается из платины, нитинола, тантала, золота, различных сплавов (кобальт-хромовый, платиновый сплавы). Лекарства необходимо для замедления роста ткани внутри стента, не должно оказывать токсическое действие, концентрация должна быть достаточной для осуществления эффекта[22].

Препараты, используемые при создании стентов с лекарственным покрытием, относятся к лимусному семейству (сиролимус, эверолимус, биолимус А9, зотаралимус, такролимус, пимекролимус). Исключение составляет лишь паклитаксел, являющийся лекарственной основой для стента «Таксус» [11].

По эволюционному развитию стентов, происходящему в связи с необходимостью уменьшения риска развития рестеноза и тромбоза стента, их можно разделить на несколько групп:

- непокрытые (голометаллические) стенты – это стенты, которые имеют металлический каркас без фиксации «лекарства» на нем. Такие стенты применяют при лечении инфаркта миокарда, стенозов крупных по диаметру коронарных артерий. Непокрытые стенты изготавливают из тантала, нитинола, сплава иридия и платины, а также сплавов кобальта. Такие сочетания металлов в структуре стента позволяют достигнуть наименьшую реакцию на установленный стент, как на инородное тело со стороны сосудистой стенки, то есть имеют наибольшую биосовместимость [56].

- стенты, выделяющие лекарственные препараты – это стенты, у которых наносимые на металлический каркас полимерные покрытия обеспечивают дозированное, локальное выделение лекарственного препарата в зону стентированной сосудистой стенки, уменьшая, тем самым, частоту рестенозирования [10].

- биоабсорбируемые (рассасывающиеся) стенты – это стенты, обеспечивающие временную поддержку и соответственно временную доставку лекарства к стенке сосуда, а также включают в себя потенциал восстановления нормальной сосудистой физиологии стентированного сосуда [61].

Несмотря на значительные успехи, достигнутые в последнее время в стентировании коронарных артерий, остаются нерешенными проблемы

тромбоза и рестеноза, что требует разработки новых медицинских изделий с улучшенными характеристиками.

1.3 Предполагаемые механизмы развития рестеноза

Рестеноз представляет собой повторное сужение просвета сосуда и может возникать в результате спадания просвета, образования тромба, гиперплазии неоинтимы, что приводит к необходимости проведения операции по ремоделированию сосудистой стенки [64]. Начальным моментом развития рестеноза считается механическое повреждение стенки сосуда, кроме того чувствительность к материалам, используемым для изготовления стента. Травматизация стенки артерии в ходе стентирования способствует возникновению локальной воспалительной реакции, а также адгезии, и агрегации тромбоцитов, что приводит к образованию тромба, миграции и делению клеток эндотелия [62]. Протекающие процессы в первую очередь направлены на восстановление анатомической целостности стенки сосуда, однако тромбоцитарный фактор активирует образование белков внеклеточного матрикса, что может вести к разрастанию неоинтимы и хроническому нарушению кровотока [45, 68].

Имплантация голометаллических стентов приводит к рестенозу в результате активной пролиферации, повышения экскреторной активности гладкомышечных клеток при повреждении, развития локального воспаления на внутрисосудистое нахождение инородного тела [24, 54].

Активную клеточную пролиферацию можно ингибировать за счет использования лекарственных веществ с антипролиферативной активностью и уменьшения степени травматизации сосуда за счет снижения металлонасыщенности эндопротеза [67]. Лекарственные стенты содержат полимер, необходимый для задержки активного вещества на поверхности и постепенного его высвобождения [34].

Интенсивность воспалительной реакции уменьшается под действием лекарственного препарата, однако развитие рестеноза в этом случае может быть связано аллергической реакцией на имплантат [55].

1.4.1 Антипролиферативные препараты

Лекарственный препарат с антипролиферативным эффектом должен иметь широкое терапевтическое действие, выборочным угнетением деления гладкомышечных клеток, отсутствием токсического эффекта на прилегающие к имплантату ткани.

В наши дни в качестве антипролиферативных препаратов активно применяются такролимус, эверолимус, биолимус А9, сиролимус, зотаролимус, миолимус [21].

Сиролимус (рапамицин) – вещество, являющееся продуктом жизнедеятельности актиномицет *Streptomyces hydroscopius*, по химическому строению принадлежит к группе макролидов. Препарат имеет антипролиферативные и иммуносупрессивные свойства. Он взаимодействует с белком FKBP506, который связывается с белком mTOR(мишень рапамицина у млекопитающих). Активированный mTOR блокирует клеточный цикл развития в основном гладкомышечных клеток на этапе перехода из фазы G, в фазу S, а также ингибирует миграцию гладкомышечных клеток в интиму. Это приводит к прекращению образования неоинтимы – ключевого механизма рестеноза. Вследствие особенностей строения полимера 75 % препарата выделяются в течение 10 дней, однако антирестенозные свойства препарата сохраняются значительно дольше [60].

К лимусному семейству относятся стенты на основе эверолимуса. Препарат эверолимус обладает антипролиферативными свойствами и действует на широкий диапазон клеток, включая сосудистые гладкомышечные клетки, что приводит к блокированию их клеточного цикла

пролиферации в фазе G1. Этот эффект опосредован связью с внутриклеточным белком FKBP12 и обусловлен замедлением активации киназы mTOR [31]. Эверолимус по химическому строению считается аналогом сиролимуса и также обладает иммуносупрессивным действием. Комбинация ингибирования гладкомышечных клеток и высокая липофильность позволяет предположить наилучшее предотвращение неоинтимальной гиперплазии.

Ещё одним представителем лимусного семейства является зотаралимус. Зотаралимус считается полусинтетическим аналогом сиролимуса, в котором позиция C40 модифицируется тетразольным кольцом, что приводит к уменьшению периода полураспада лекарства. Зотаралимус – первый цитостатический агент, созданный исключительно с целью лекарственного покрытия стентов [19].

Биолимус A9 является аналогом сиролимуса, обладает высокими липофильными свойствами. Механизм его действия также сходен и включает ингибирование пролиферации гладкомышечных клеток и Т-лимфоцитов.

Паклитаксел, используемый в стенте Taxus, – единственное из одобренных действующих веществ, не относящееся по структуре к лимусному семейству. Паклитаксел достаточно давно применяется в онкологии как один из компонентов химиотерапии рака молочной железы и яичников. Паклитаксель – алкалоид, получаемый из тихоокеанских тисов (*Taxus brevifolia*), известный противоопухолевый препарат, обладающий мощным антипролиферативным действием. Механизм действия паклитаксела связан с его способностью стимулировать “сборку” микротрубочек из димерных молекул тубулина, стабилизировать их структуру, что нарушает митотическую функцию клетки [28].

1.4.2 Полимерные покрытия стентов

Полимеры широко используются в коронарном стентировании с целью локальной доставки лекарств. При выборе полимера для стента необходимо учитывать следующие условия: во-первых, скорость деградации и коррозии, во-вторых, биосовместимость с сосудом и отсутствие токсичности, в-третьих, прочность полимера, чтобы избежать возможного немедленного спадения. От скорости деградации покрытия зависят изменение механических свойств и профиль элюции лекарств из стентов. Это влияет на выбор самого типа стента или сплава, из которого он изготовлен, а также на процесс производства стента и нанесение выделяемого агента [53].

В настоящее время в качестве полимеров, применяемых для стентов, используют полимолочную кислоту (PLLA), полигликолевую кислоту (PGA), полисополимер PLLA и PGA и поликапронолактон (PCL). Кроме того в качестве полимерных покрытий также применяются фосфорилхолин, поливинилацетат, полибутилметакрилат [38]. Полимерные покрытия, наносимые на металлический каркас, обеспечивают дозированное, локальное выделение лекарственного вещества в области стентированной сосудистой стенки, вследствие чего снижается частота рестеноза [33]. Тем не менее, гидрофобная природа, а также низкая биосовместимость полимеров приводит к воспалению сосудистой стенки в месте имплантации, как результат к длительному заживлению, что увеличивает риск возникновения тромбоза стента [26].

Перспективным направлением в совершенствовании стентов с лекарственным покрытием считается появление многокомпонентных полимеров. К примеру, BioLinx polymer, созданный фирмой Медтроник, состоит из 3-х компонентов: полимер СЮ – липофильный (гидрофобный), осуществляет контроль равномерного выделения препарата; полимер С19, гидрофильный, обладает высокой биосовместимостью, а поливинилпирролидон – (также гидрофильный полимер) способствует первичному выделению препарата [65]. Сочетание липогидрофильных

свойств полимера способствует высокой биосовместимости и длительному выделению препарата. Однако главным недостатком полимера Biolinx считается его ломкость при механических воздействиях, таких как прохождение через кальцинированный или же извитой участок сосуда. В результате нарушения выделения препарата повышается вероятность рестенозирования и тромбоза [10].

Несмотря на то, что нерастворимые полимерные покрытия стентов способны к постепенному и длительному высвобождению цитостатических веществ, сами по себе являются одним из факторов воспаления, а, следовательно, и фактором риска образования тромбов [43]. Для решения данной проблемы был разработан стент, который сочетает в себе полимерные биоабсорбируемые компоненты и металлическую основу для придания прочности и предупреждения раннего спадения [10].

Одним из первых подобных стентов является Biomatrix (фирма Biosensors). Их особенность заключается в аблюминальном покрытии биodeградирующим полимером с цитостатическим препаратом биолимуc A9, что и обеспечивает своевременную эндотелизацию стентированного участка артерии. Управляемое размывание полимера снижает пролиферативный ответ в острый период формирования рестеноза, в результате превращая стент в голометаллический [35].

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Подготовка образцов к исследованию

Объектом исследования являлись сиролимус-элюирующие стенты длиной 10 мм, small, и 28 мм, large (ООО «НаноМед») с покрытием изготовленном из:

- 0,75% раствора PLGA(65:35, Mr 60 кДа, характеристическая вязкость 0,62 дл/г, полидисперсность 1,69) (Lactel, США) в хлороформе («осч»), содержащего сиролимус (Sigma Aldrich, США) в концентрации 4 и 8 мкг/мм².
- 0,75% раствора PLGA(65:35, Mr 60 кДа, характеристическая вязкость 0,62 дл/г, полидисперсность 1,69) (Lactel, США) в хлороформе («осч»), содержащего сиролимус (Sigma Aldrich, США) в концентрации 8 мкг/мм².
- 0,75% раствора PLGA(50:50, Mr 27,2 кДа, характеристическая вязкость 0,39 дл/г, полидисперсность 1,81) (Lactel, США) в хлороформе («осч»), содержащего сиролимус (Sigma Aldrich, США) в концентрации 4 мкг/мм².

Полимерное покрытие наносилось с помощью установки покрытия стентов MediCoat™ DES3000 по программе для нанесения покрытия на стенты длиной 10 мм и стенты длиной 28 мм. Установка покрытия стентов MediCoat™ DES3000 интегрирована с устройством Sono-TekMicroMist для ультразвукового распыления капель и с устройством автоматической подачи раствора, программирование устройств осуществляется независимо друг от друга. Стент вручную загружается на устройство вращения стента, скорость которого может регулироваться пользователем. Стент движется горизонтально из стороны в сторону в области распыления композиции. Количество горизонтальных проходов, скорость потока и размер капель регулируется пользователем. Программы для нанесения покрытия на стенты,

дизайн и типоразмеры которых приняты к выпуску: скорость потока – 0,03 мл/мин, Ultrasonic – 4,5 w.

2.2 Моделирование деградации антипролиферативного покрытия в условиях *in vitro*

Общее количество образцов стентов в каждой группе длиной 28 мм – 12 штук. В 6 образцах определяли начальное содержание сиролимуса путем растворения покрытия в хлороформе и последующего анализа полученного раствора спектрофотометрическим методом на длине волны 280 нм.

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

2.3 Исследование профиля элюции сиролимуса ВЭЖХ

Исследование проводили на жидкостном хроматографе Shimadzu LC-20 Prominence (рис.1) с диодноматричным детектором с использованием колонки для хроматографии Luna C18, 150x4,6 мм. Для промывки автосамплера использовали 50% ацетонитрил в изопропиловом спирте.

Условия хроматографирования:

- подвижная фаза – смесь ацетонитрила с уксусной кислотой (pH 3,6) 70:30;
- скорость потока 1,5 мл/мин;
- температура 37°C.

Объем инъекции – 20 мкл. Среднее время анализа 1 образца – 13 минут.



Рисунок 1. Хроматограф Shimadzu LC-20 Prominence

2.4 Имплантация стентов животным

Исследование проводилось на 12 кроликах. Было выделено 2 группы, в каждой группе по 6 животных. 1 группа – контрольная (проводилась имплантация стента без покрытия), 2 группа – опытная (проводилась имплантация стента с лекарственным покрытием). Проводниковым катетером выполнена ангиография аортобедренного сегмента справа и проведена ангиопластика аортально-подвздошного сегмента с имплантацией МС 2.5х11 мм или стента с лекарственным покрытием МС 2.5х11 мм [3,4,6,7]. Через 4 и 7 недель после операции животных выводили из эксперимента, а

стентированный фрагмент артерии подвергали гистологическому исследованию.

2.5 Гистологическое исследование

Гистологическое исследование мягких соединительных тканей состояло из следующих этапов:

- 1) Подготовка образцов для гистологического исследования.
- 2) Проводка фрагментов по возрастающим концентрациям спиртов и пропитка парафином с последующим изготовлением парафиновых блоков.
- 3) Изготовление парафиновых срезов.
- 4) Окрашивание гистологических срезов гематоксилин-эозином и по методу Вейгерт-Ван-Гизона [16].
- 5) Заключение окрашенных срезов под покровное стекло.
- 6) Изучение срезов под микроскопом в проходящем свете.

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

Для изготовления парафиновых срезов парафиновый блок зажимали в держателе микротомы, устанавливали на микротом нож и выставляли толщину среза на 5-7 мкм. Полученный срез переносили при помощи колющих игл в чашку Петри с теплой водой (38 ± 2)°С, далее на предметное стекло, предварительно обработанное смесью белка куриного яйца с глицерином. Высушивали стекло в термостате при температуре (38 ± 2)°С.

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

Окраска гематоксилин-эозином. Окрашивали срезы гематоксилином 7-10 минут, после чего промывали в дистиллированной воде 5 минут. Выдерживали в 1% растворе соляной кислоты на 70° этаноле до побурения срезов. Далее промывали дистиллированной водой, а затем слабым (0,5 %) раствором аммиака до посинения срезов. После этого окрашивали водным раствором эозина в течение 1 минуты. Далее образцы трехкратно промывали в дистиллированной воде для удаления избытка эозина, однократно в 70 % растворе этанола, двукратно в 96% этаноле для удаления воды из срезов. Экспозиция в каждой порции спирта – 2 минуты. Для просветления дважды промывали срезы в смеси расплавленного фенола и ксилола в соотношении 1:4 в течение 1 минуты. Окончательное обезвоживание срезов проводили промыванием ксилолом в течение 2 минут.

Окраска включает использование основного красителя гематоксилина, окрашивающего базофильные клеточные структуры ярко-синим цветом, и спиртового кислого красителя эозина Y, окрашивающего эозинофильные структуры клетки красно-розовым цветом. Базофильные структуры, как правило, это те, которые содержат нуклеиновые кислоты (ДНК и РНК): клеточное ядро, рибосомы и РНК-богатые участки цитоплазмы.

Эозинофильные структуры содержат внутри- и внеклеточные белки, например, тельца Леви. Цитоплазма является эозинофильной средой.

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

2.6 Методы статистической обработки результатов

При оценке полученных экспериментальных данных были использованы методы статистического описания, методы проверки статистических гипотез, использующиеся в стандартных пакетах программы Statistica 6.0, в том числе 3S-критерий для обнаружения промахов, дисперсионный анализ для оценки принадлежности образцов к разным гомогенным группам и их сравнения [17].

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Результаты нанесения покрытия на стенты

Для создания лекарственного покрытия на сиролimus-элюирующие лекарственные стенты (ООО «Наномед») длиной 10 и 28 мм совместно с производителем была разработаны программы нанесения раствора полимера и лекарственного препарата.

Для стентов длиной 10 мм:

- 1
Comment: for 10 mm
- 2
Move To: 4.249 cm
Velocity: 0.419 cm/sec
Rotation Enabled CCW 2 rpm
Ultrasonic Power Off
Pump 1 Off
Pump 2 Off
Pump 3 Off
Focusing Gas Off
Drying Gas Off
- 3
Wait: 2 sec
Rotation Enabled CCW 2 rpm
Ultrasonic Power On
Pump 1 On
Pump 2 Off
Pump 3 Off
Focusing Gas On
Drying Gas Off
- 4
Loop Start Name: for_10_mm Count: 5
- 5
Move To: 4.839 cm
Velocity: 0.249 cm/sec
Rotation Enabled CCW 100 rpm
Ultrasonic Power On
Pump 1 On

Pump 2 Off
 Pump 3 Off
 Focusing Gas On
 Drying Gas Off
 6
 Move To: 4.249 cm
 Velocity: 0.249 cm/sec
 Rotation Enabled CCW 100 rpm
 Ultrasonic Power On
 Pump 1 On
 Pump 2 Off
 Pump 3 Off
 Focusing Gas On
 Drying Gas Off
 7
 Loop End Name: for_10_mm
 8
 Wait: 3 sec
 Rotation Enabled CCW 120 rpm
 Ultrasonic Power Off
 Pump 1 Off
 Pump 2 Off
 Pump 3 Off
 Focusing Gas Off
 Drying Gas On
 9
 Move To: 0.010 cm
 Velocity: 0.250 cm/sec
 Rotation Enabled CCW 120 rpm
 Ultrasonic Power Off
 Pump 1 Off
 Pump 2 Off
 Pump 3 Off
 Focusing Gas Off
 Drying Gas On

Для стентов длиной 28 мм:

1
 Comment: for 28 mm
 2
 Move To: 2.600 cm
 Velocity: 0.400 cm/sec
 Rotation Enabled CCW 2 rpm

Ultrasonic Power Off
 Pump 1 Off
 Pump 2 Off
 Pump 3 Off
 Focusing Gas Off
 Drying Gas Off
 3
 Wait: 2 sec
 Rotation Enabled CCW 2 rpm
 Ultrasonic Power On
 Pump 1 On
 Pump 2 Off
 Pump 3 Off
 Focusing Gas On
 Drying Gas Off
 4
 Loop Start Name: for_28_mm Count: 5
 5
 Move To: 4.100 cm
 Velocity: 0.250 cm/sec
 Rotation Enabled CCW 100 rpm
 Ultrasonic Power On
 Pump 1 On
 Pump 2 Off
 Pump 3 Off
 Focusing Gas On
 Drying Gas Off
 6
 Move To: 2.515 cm
 Velocity: 0.250 cm/sec
 Rotation Enabled CCW 100 rpm
 Ultrasonic Power On
 Pump 1 On
 Pump 2 Off
 Pump 3 Off
 Focusing Gas On
 Drying Gas Off
 7
 Loop End Name: for_28_mm
 8
 Wait: 3 sec
 Rotation Enabled CCW 120 rpm
 Ultrasonic Power Off
 Pump 1 Off

Pump 2 Off
Pump 3 Off
Focusing Gas Off
Drying Gas On

9

Move To: 0.010 cm
Velocity: 0.250 cm/sec
Rotation Enabled CCW 120 rpm
Ultrasonic Power Off
Pump 1 Off
Pump 2 Off
Pump 3 Off
Focusing Gas Off
Drying Gas On

Покрытие наносилось с использованием установки MediCoat™ DES3000 (рис.2), интегрированной с устройством Sono-Tek MicroMist (рис.3) для ультразвукового распыления капель и с устройством автоматической подачи раствора.

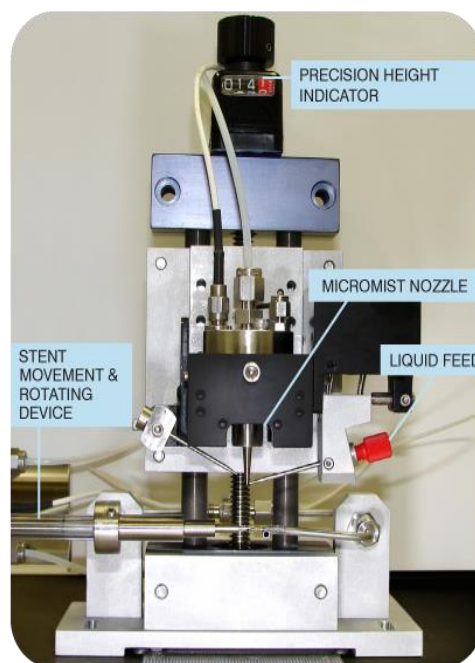


Рисунок 2. Установка для нанесения полимерного покрытия –
MediCoat™ DES3000

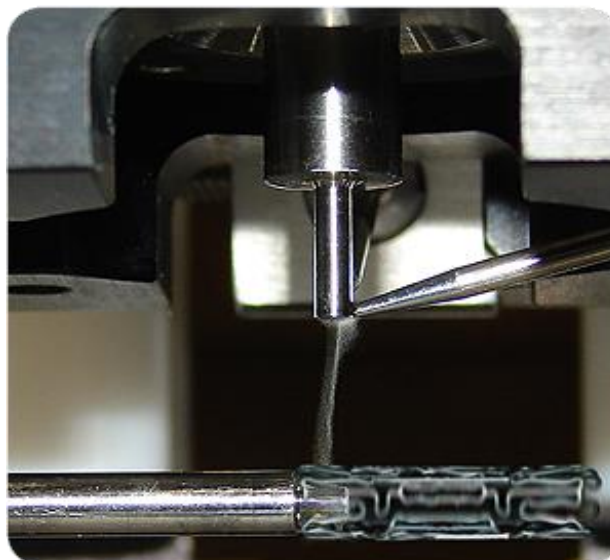


Рисунок 3. Устройство для ультразвукового распыления капель – Sono-Tek MicroMist

Лекарственное покрытие стентов, несмотря на способность к постепенному и длительному высвобождению препаратов, снижающих интенсивность ответной воспалительной реакции на имплантацию, может являться фактором развития аллергической реакции, а значит и фактором риска тромбообразования. Внутри стентовый тромбоз обнаруживается в 0,87-2,2% случаев и обычно возникает в течение первого года после постановки стента [37]. В связи с этим контроль количественного содержания полимера является важной задачей при производстве лекарственных стентов.

Оценку наличия полимера внутри стента проводили с помощью микроскопа (рис.4).



Рисунок 4. Фотография лекарственного стента под микроскопом

3.2 Результаты деградации антипролиферативного покрытия in vitro

Рестеноз развивается у 10-40% пациентов после стентирования [59]. Основными патогенетическими механизмами развития осложнения являются эластическое спадание просвета сосуда, пристеночное тромбообразование и гиперплазия неоинтимы, приводящие к патологическому ремоделированию стенки сосудов. В качестве пускового момента рассматривается механическое повреждение интимы и меди артерий, а также гиперчувствительность к материалам стента.

В настоящее время широкое применение находят стенты, покрытые полимером с лекарственными веществами, постепенное выделение которых с поверхности стента успешно противодействует развитию рестеноза. Поскольку основной риск повторного сужения сосуда приходится на первые полгода (до года) после стентирования, в течение которого и происходит полное выделение лекарства, при этом процент возникновения рестеноза резко уменьшился (до 2%) [66].

В связи с этим контроль скорости высвобождения антипролиферативного препарата является важной задачей при разработке лекарственных стентов.

В ходе данного исследования нами было определено начальное и остаточное содержание сиролимуса в лекарственных стентах, разработанных совместно с компанией ООО «НаноМед», и профиль элюции препарата при деградации лекарственного покрытия *invitro*.

Исследование проводили на жидкостном хроматографе Shimadzu LC-20 Prominence. В качестве калибровочных растворов применяли стандартные растворы сиролимуса в ацетонитриле с концентрациями 50 нг/мл, 250 нг/мл, 500 нг/мл, 1000 нг/мл и 2000 нг/мл (рис.5).

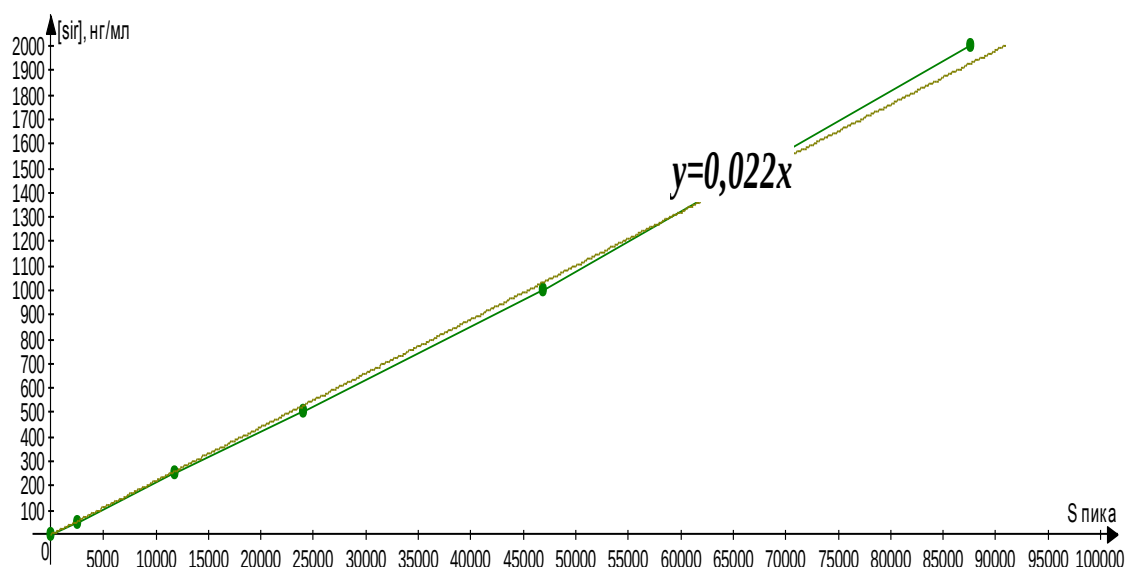


Рисунок 5. Калибровка по сиролимусу в ацетонитриле, ВЭЖХ, $\lambda=280$

нм

Начальное содержание сиролимуса определяли в 6 образцах путем растворения покрытия в ацетонитриле и последующего анализа полученного раствора методом ВЭЖХ при длине волны 280 нм. Начальное содержание сиролимуса составило – 110 мкг и 220 мкг. Согласно литературным данным, такое первоначальное содержание препарата является достаточным для предотвращения избыточной пролиферации гладкомышечных клеток – ключевого механизма развития рестеноза [59].

В ходе проведения эксперимента по моделированию деградации лекарственного покрытия *in vitro* было выявлено неравномерное высвобождение лекарственного препарата в фосфатный буферный раствор (рН=7,4) (рис.6, 7, 8).

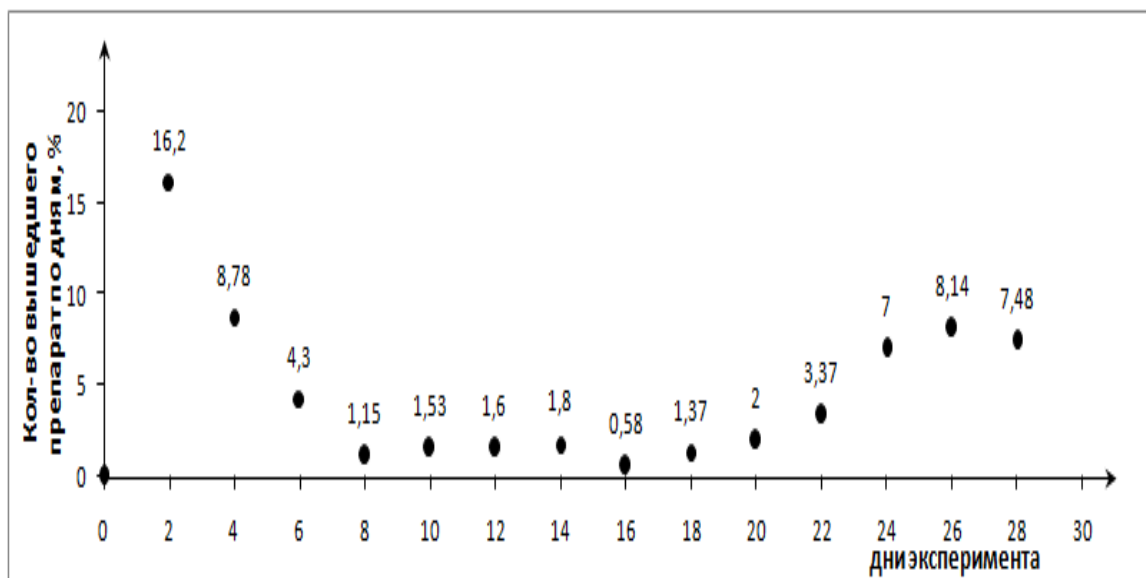


Рисунок 6. Профиль элюции сипролимуса в буферный раствор при деградации полимерного покрытия (PLGA 50:50, 4 мкг/мм² сипролимуса) лекарственных стентов в условиях in vitro, (% , n=6)

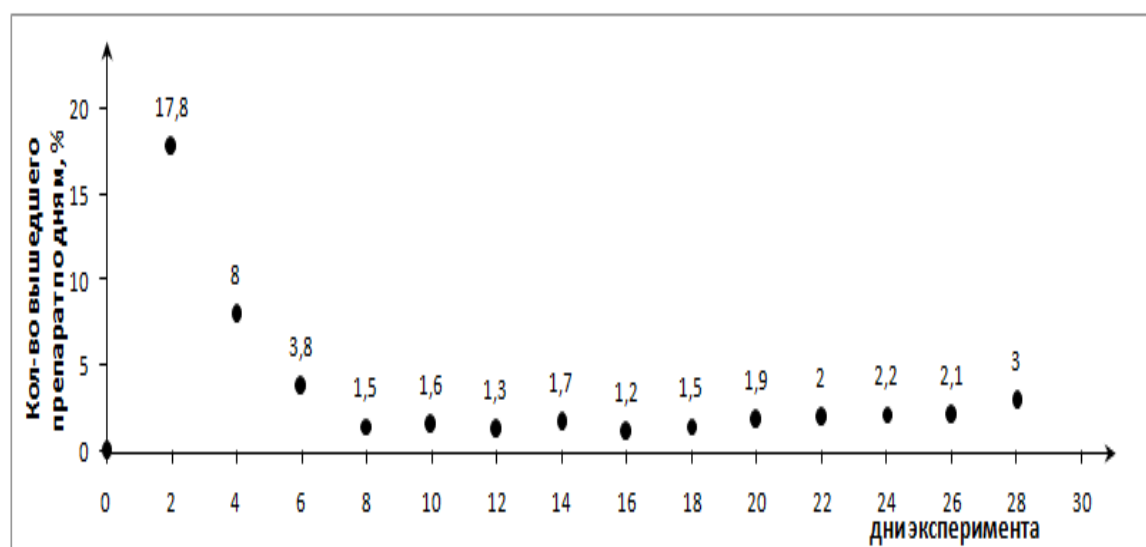


Рисунок 7. Профиль элюции сипролимуса в буферный раствор при деградации полимерного покрытия (PLGA 65:35, 4 мкг/мм² сипролимуса) лекарственных стентов в условиях in vitro (% , n=6)

63:35

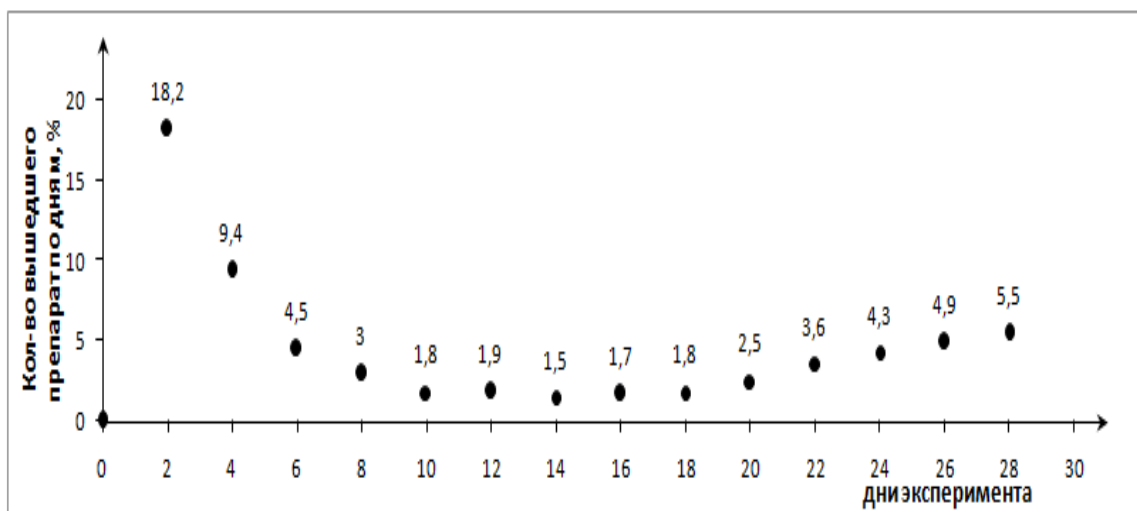


Рисунок 8. Профиль элюции сиролимуса в буферный раствор при деградации полимерного покрытия (PLGA65:35, 8 мкг/мм² сиролимуса) лекарственных стентов в условиях in vitro (% , n=6)

Повышенный выход препарата в течение первых нескольких дней не связан с деградацией полимера, а объясняется смыванием сиролимуса с доступного верхнего слоя покрытия. Дальнейшая динамика процесса обусловлена механизмами деградации самого полимера. Вода предпочтительно проникает в доступные аморфные области и там гидролизует эфирные связи, что инициирует снижение механических свойств образцов без изменения массы. Последующая деградация аморфных областей влияет на кристалличность, и скорость потери массы становится значительной, вместе с этим увеличивается выход препарата в буферный раствор. Начиная с 24 дня эксперимента, отмечено повышение выхода препарата в раствор для образцов PLGA 50:50, 4 мкг/мм² и PLGA65:35, 8 мкг/мм², что связано с интенсификацией процессов деградации полимерного покрытия. Таким образом, скорость разрушения покрытия зависит от типа полимера и концентрации препарата в нем. При увеличении доли молочной кислоты в полимере скорость деградации снижается. Увеличение количества препарата приводит к увеличению его выхода на поздних стадиях моделирования деградации лекарственного покрытия.

При оценке эффективности применения сиролимус-элюирующих лекарственных стентов с целью снижения риска рестеноза учитывается суммарный выход лекарственного препарата из антипролиферативного покрытия в модельную среду (рис.9, 10, 11).

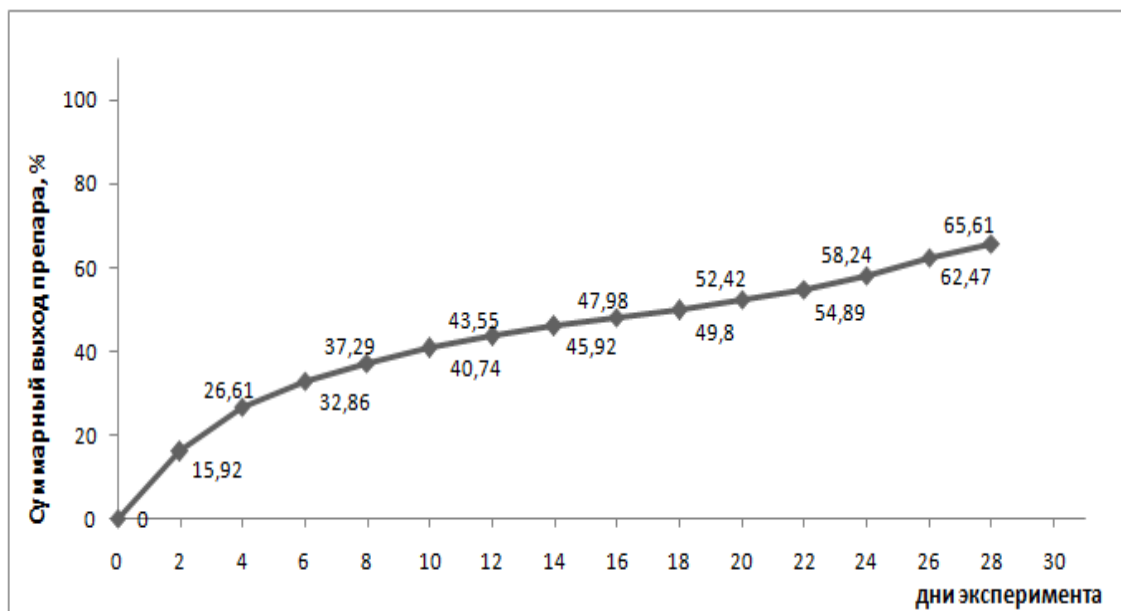


Рисунок 9. Суммарный выход сиролимуса при деградации полимерного покрытия (PLGA 50:50, 4 мкг/мм² сиролимуса) лекарственного стента в условиях *in vitro*, (%), $M \pm m$, $n=6$)

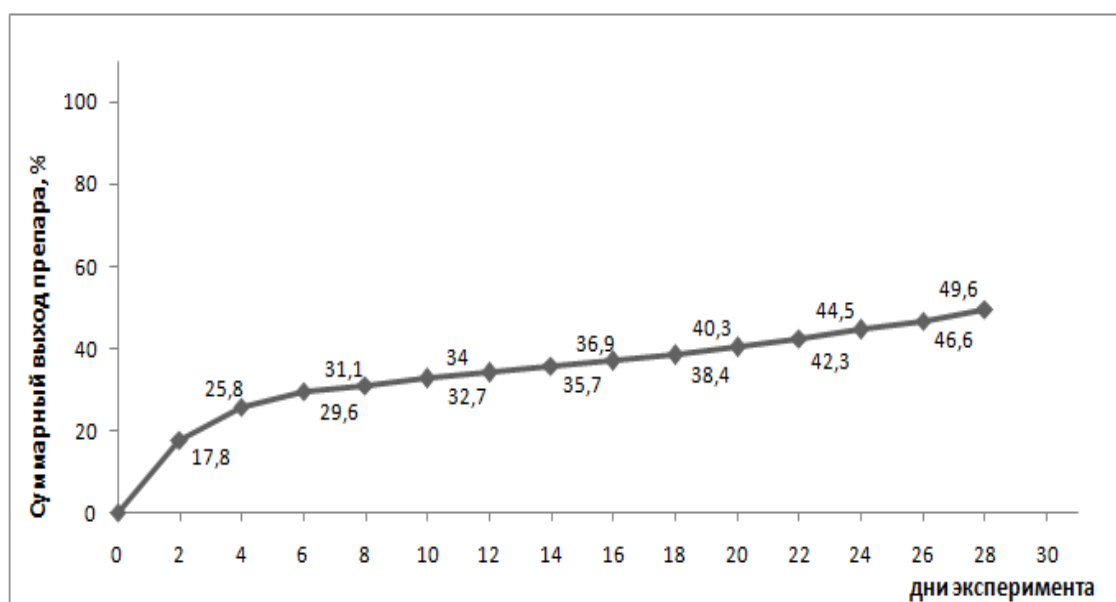


Рисунок 10. Суммарный выход сиролимуса при деградации полимерного покрытия (PLGA 65:35, 4 мкг/мм² сиролимуса) лекарственного стента в условиях *in vitro*, (%), $M \pm m$, $n=6$)

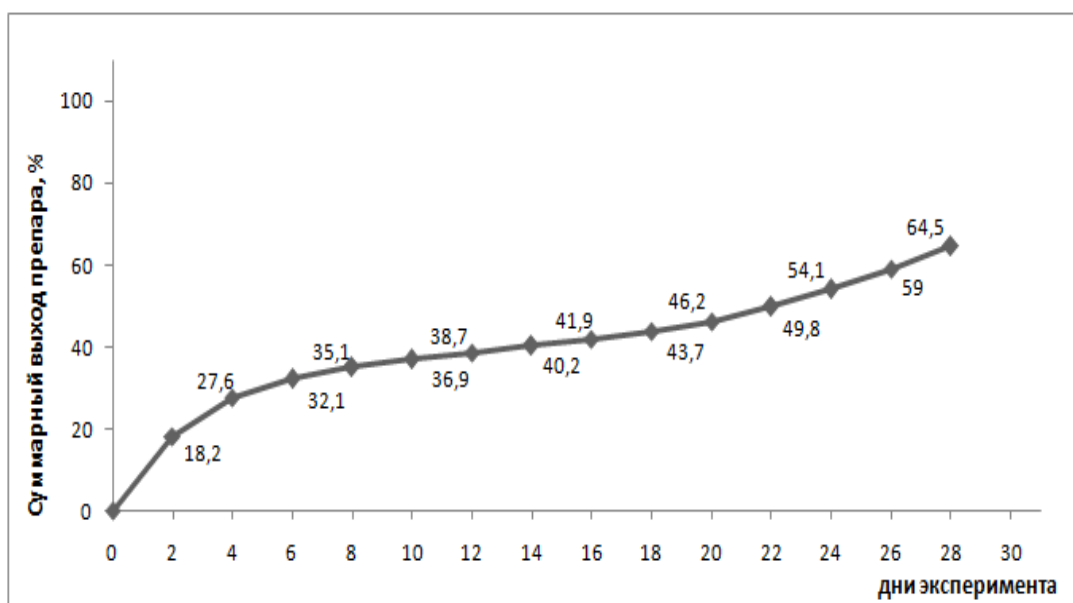


Рисунок 11. Суммарный выход сиролимуса при деградации полимерного покрытия (PLGA65:35, 8 мкг/мм²сиролимуса) лекарственного стента в условиях *in vitro*, (%), $M \pm m$, $n=6$)

Суммарный выход препарата за 28 дней из полимерного покрытия (PLGA 50:50, 4 мкг/мм²сиролимуса) составил 66% от первоначального содержания. Для лекарственного покрытия из PLGA65:35, содержащего 4 мкг/мм²сиролимуса и PLGA65:35, содержащего 8 мкг/мм²сиролимуса суммарный выход препарата составил 49,6% и 64,5% соответственно. Применение полимера PLGA65:35 увеличивает задержку лекарственного препарата в покрытии. На конечном этапе деградации покрытия скорость выхода препарата в раствор увеличивается, что связано с изменениями в структуре полимера.

Анализ литературных данных выявил, что количество высвободившегося препарата за первый месяц будет достаточным для предотвращения пролиферации клеток интимы сосуда. При этом остаточное содержание сиролимуса не должно оказывать негативного воздействия на дальнейшие процессы эндотелизации стента [46].

Остаточное содержание препарата определяли путем растворения покрытия в ацетонитрилеи последующего анализа полученного раствора методом ВЭЖХ при длине волны 280 нм. Оно составило 36 мг для лекарственных стентов (PLGA 50:50, 4 мкг/мм²сиролимуса), что примерно составляет 33% от первоначального содержания. 56 мг для лекарственных стентов (PLGA65:35, 4 мкг/мм²сиролимуса), что составляет 51% от первоначального содержания. 38,6 мг для лекарственных стентов (PLGA65:35, 8 мкг/мм²сиролимуса), что составляет 38,5% от первоначального содержания.

Изучая профили элюции лекарственных препаратов при деградации покрытий стентов таких зарубежных компаний как «Cordis Corporation», «Boston Scientific»[70], мы пришли к выводу, что результаты, полученные при деградации лекарственного покрытия стентов, разработанных компанией ООО «НаноМед» (рис.12), коррелируют с данными зарубежных исследователей для образцов лекарственных стентов (PLGA 50:50, 4 мкг/мм²сиролимуса) и (PLGA 65:35, 8 мкг/мм²сиролимуса). Однако абсолютное количество лекарственного препарата на поверхности лекарственных стентов компании ООО «НаноМед» соотносится с количеством лекарства на поверхности зарубежных аналогов только для группы образцов PLGA 65:35, 8 мкг/мм²сиролимуса.

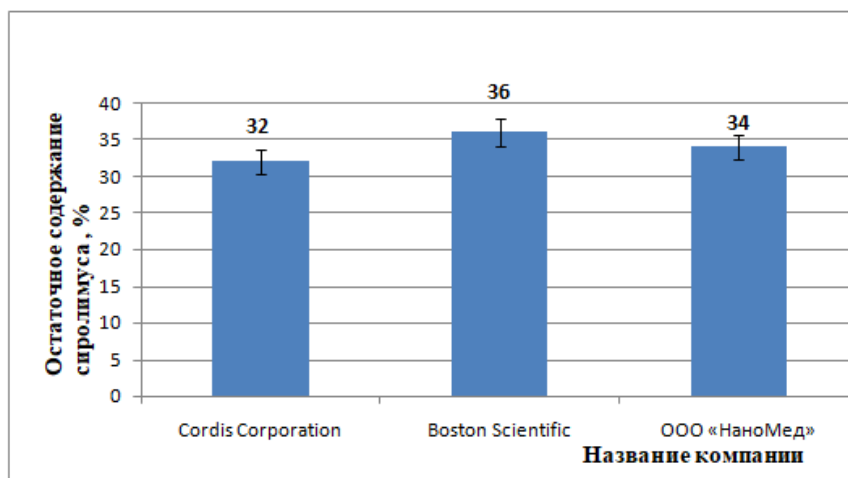
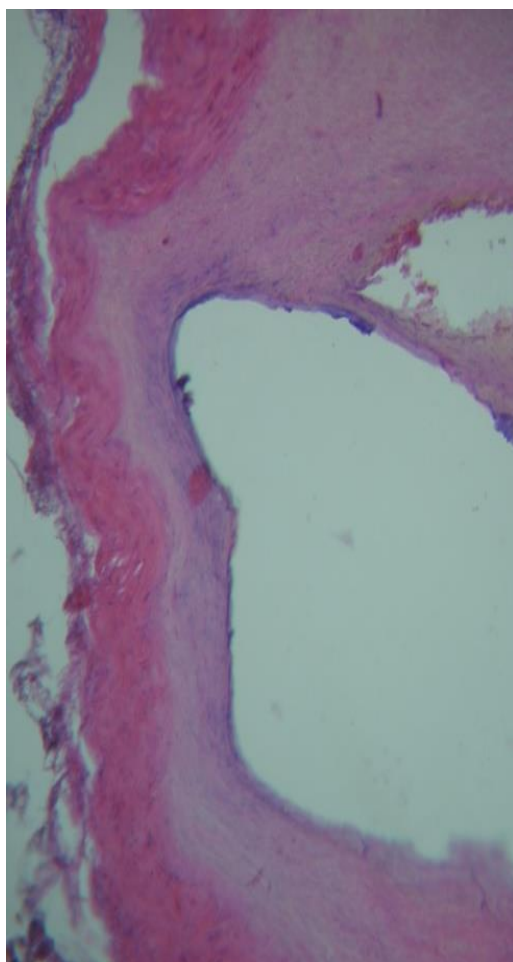


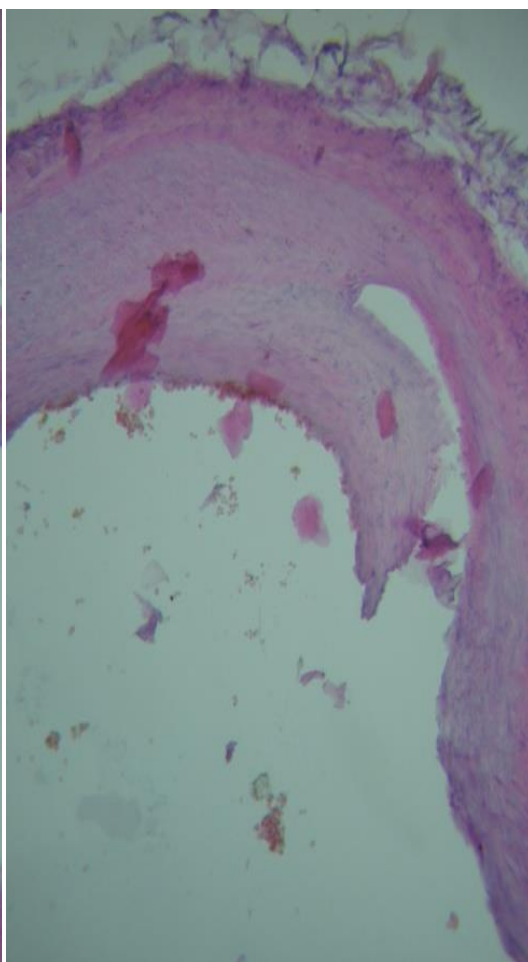
Рисунок 12. Остаточное содержание сиролимуса через 28 дней деградации лекарственного покрытия, %

3.3 Результаты гистологических исследований

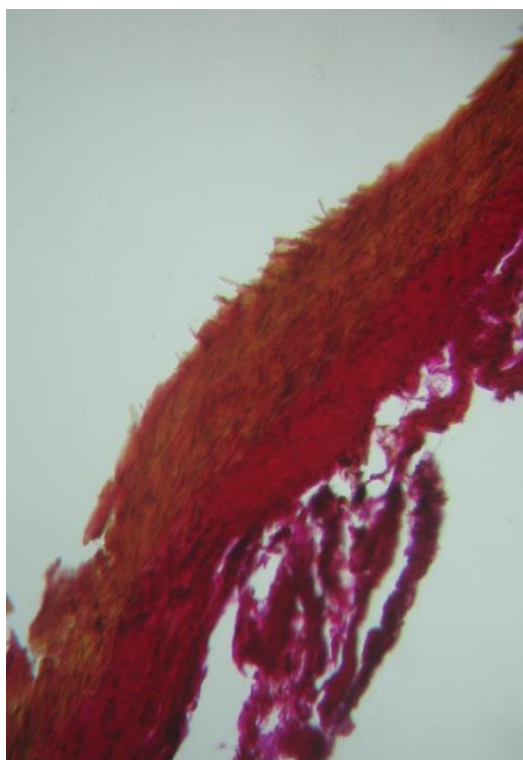
Для подтверждения влияния лекарственного покрытия стентов, разработанных совместно с компанией ООО «НаноМед», на интенсивность гиперплазии неоинтимы в месте имплантации были проведены операции на кроликах. Гистологическое исследование стентированных участков артерии проводили через 4, 7 недель после имплантации. Оценка состояния окружающих стент тканей проходила в двух положениях: центр и край. При этом образцы окрашивались двумя способами: гематоксилин-эозином и по методу Вейгерт-Ван-Гизона (рис. 13,14).



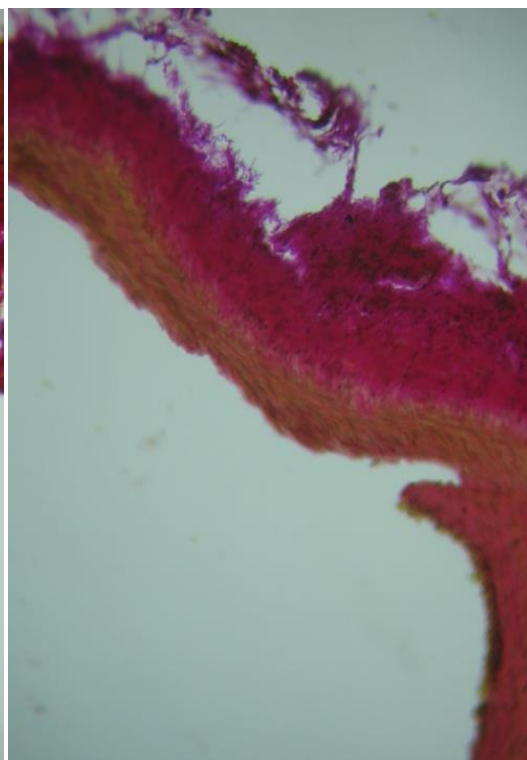
1a



1б

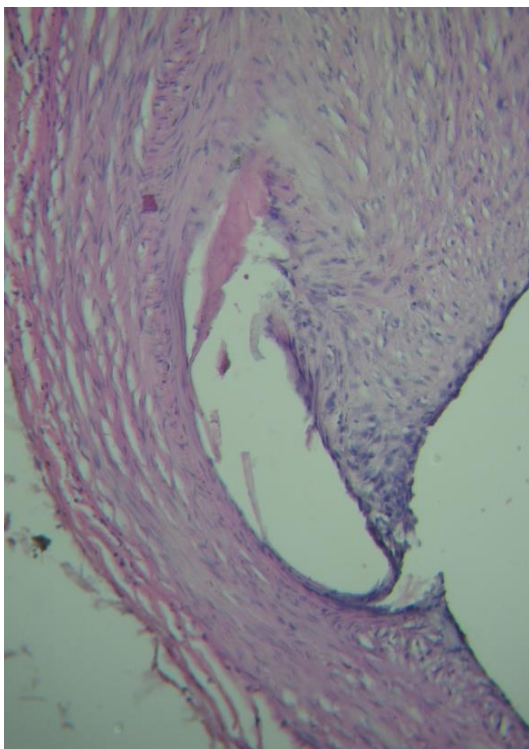


2а

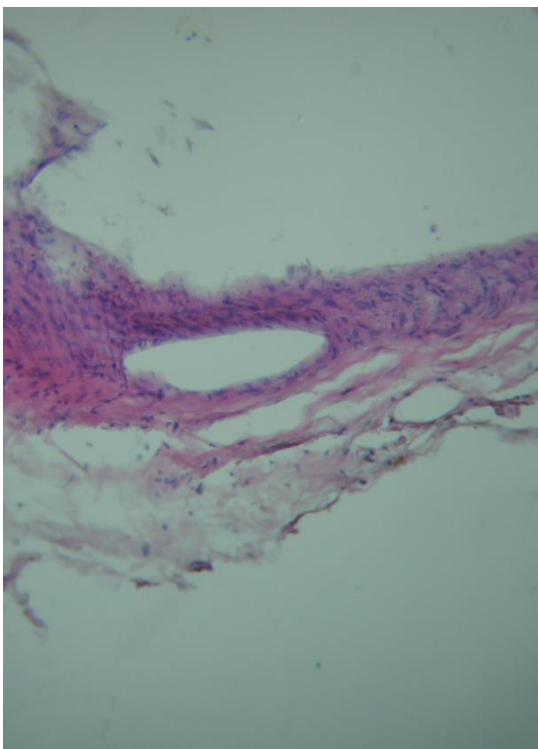


2б

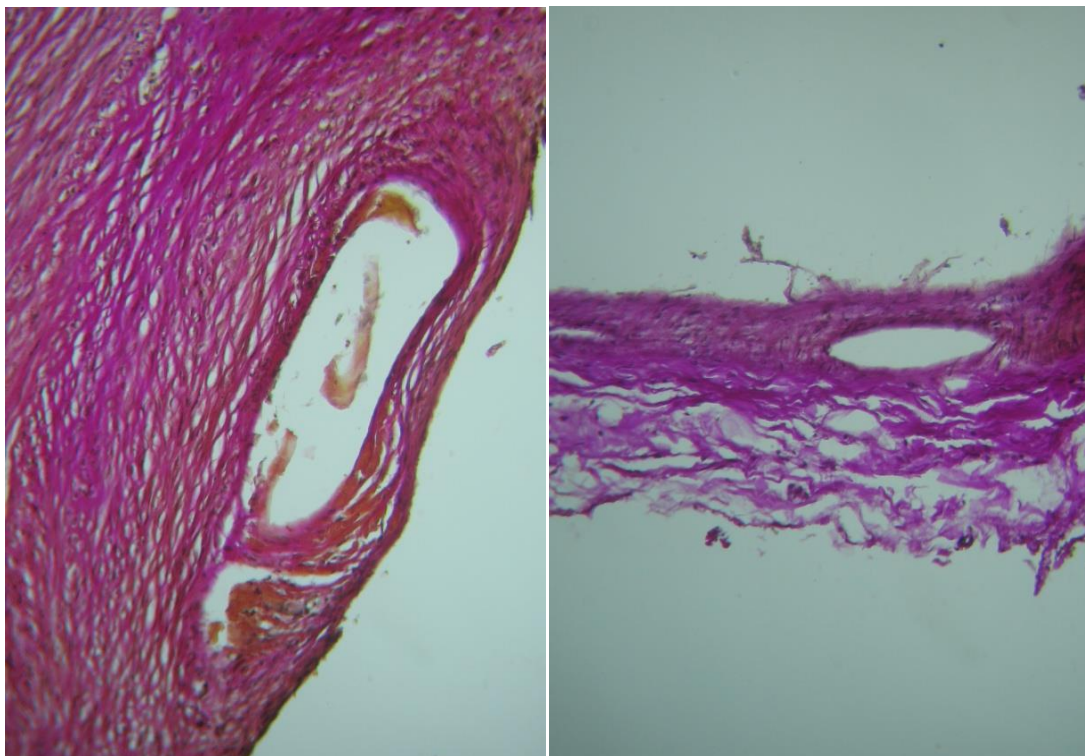
Рисунок 13. Образцы, окрашенные гематоксилин-эозином, х200: 1а – край, 1б – центр; и по методу Вейгер-Ван-Гизона, х200: 2а – край, 2б – центр. 4 недели после имплантации



1а



1б



2а

2б

Рисунок 14. Образцы, окрашенные гематоксилин-эозином, х200: 1а – край, 1б – центр; и по методу Вейгерт-Ван-Гизона, х200: 2а – край, 2б – центр. 7 недель после имплантации

Согласно результатам эксперимента на всех этапах исследования отмечено отсутствие воспалительного процесса. Со стороны полости сосуда выявлена эндотелиальная выстилка. В исследовании оценивалась толщина новообразовавшейся соединительной ткани (неоинтимы) в месте контакта металлического имплантата со стенкой кровеносного сосуда (табл.1).

Таблица 1. Толщина соединительной ткани над металлическим имплантатом на разных сроках после стентирования, мкм

Срок имплантации Название образца	4 недели	7 недель
Стент без покрытия	41,16 мкм	108,31 мкм
Стент с лекарственным покрытием	27,56 мкм	42,76 мкм

Таким образом, стент с лекарственным покрытием способствует снижению скорости пролиферации клеток неоинтимы, уменьшая толщину соединительной ткани в месте контакта со стенкой кровеносного сосуда на всех сроках имплантации по сравнению с голометаллическим стентом. К 4 неделям толщина меньше на 33%, к 7 неделям разница достигает 60,5%.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенного исследования были разработаны программы для нанесения лекарственного покрытия на стенты.

Анализ результатов исследования профиля элюции сиролимуса при моделировании деградации лекарственного покрытия *invitro* свидетельствует о том, что количество антипролиферативного препарата, выделяемого из полимерного покрытия, является достаточным для снижения риска развития рестеноза.

Согласно результатам гистологического исследования на всех этапах эксперимента отмечено отсутствие воспалительного процесса. Установлено, что стент с лекарственным покрытием способствует уменьшению толщины новообразующейся соединительной ткани в месте контакта со стенкой кровеносного сосуда на всех сроках имплантации по сравнению с голометаллическим стентом.

Согласно полученным результатам можно сделать следующие **выводы:**

1. Выявлено, что количество сиролимуса, выделяемого из лекарственного покрытия при его деградации является достаточным для подавления избыточной пролиферации гладкомышечных клеток, что снижает риск развития рестеноза.
2. Применение для создания лекарственного покрытия полимера PLGA 65:35 способствует замедлению скорости высвобождения лекарственного препарата по сравнению с полимером PLGA50:50.
3. Увеличение концентрации лекарственного препарата в полимерном покрытии приводит к увеличению выхода лекарственного препарата.
4. Установлено, что результаты исследования профилей элюции, начального и остаточного содержания сиролимуса для лекарственных стентов ООО «НаноМед» коррелируют с данными о лекарственных стентах

зарубежных производителей, демонстрирующих хороший клинический результат («Cordis Corporation», «Boston Scientific»)

5. Отмечено, при имплантации стентах лекарственным покрытием в месте контакта со стенкой кровеносного сосуда толщина неоинтимы меньше по сравнению с голометаллическим стентом.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

СЛТ – стент с лекарственным покрытием

L605 CoCr – кобальт-хромовый сплав

mTOR– мишень рапамицина у млекопитающих

PCL – поликапронолактон

PGA – полигликолевая кислота

PLLA – полимолочная кислота

PtCr – платино-хромовый сплав

316L – нержавеющая сталь

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Байтингер, В.Ф. Эндоваскулярная хирургия / В.Ф. Байтингер // Вопросы реконструктивной и пластической хирургии. – 2009. – №4. – С. 47-50.
2. Бокерия, Л.А. Применение стентов с лекарственным антипролиферативным покрытием в лечении больных ишемической болезнью сердца / Л.А. Бокерия, Б.Г. Алекян, Е.З. Голухова, Ю.И. Бузиашвили, Т.Г. Никитина // Креативная кардиология. – 2007. – № 1. – С. 193-198.
3. ГОСТ Р ИСО 10993-1-2011 Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 1. Оценка и исследования. М.: Стандартинформ, 2014. – 17 с.
4. ГОСТ Р ИСО 10993-2-2011 Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 2. Требования к обращению с животными. М.: Стандартинформ, 2014. – 12 с.
5. ГОСТ Р ИСО 10993-9-2011. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 9. Основные принципы идентификации и количественного определения потенциальных продуктов деградации. – М.: Стандартинформ, 2014. – 11 с.
6. ГОСТ Р ИСО 10993-11-2011 Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 11. Исследование общетоксического действия. М.: Стандартинформ, 2014. – 41 с.
7. ГОСТ Р ИСО 10993-12-2011 Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 12. Приготовление проб и стандартные образцы. М.: Стандартинформ, 2014. – 32 с.
8. ГОСТ Р ИСО 10993-13-2011. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 13. Идентификация и количественное определение продуктов деградации полимерных медицинских изделий. – М.: Стандартинформ, 2014. – 17 с.

9. ГОСТ Р ИСО 13781-2011. Смолы и отформованные элементы на основе поли(L-лактида) для хирургических имплантатов. Исследование деградации методом *invitro*. – М.: Стандартинформ, 2014. – 12 с.
10. Зейналов, Р. Стенты с биodeградирующим полимерным покрытием: общее состояние вопроса и перспективы / Р. Зейналов, И.А. Ковальчук, Д.Г. Громов // Международный журнал интервенционной кардиоангиологии. – 2011. – № 25. – С. 42-46.
11. Карпов, Ю. А. Коронарная ангиопластика и стентирование / Ю.А. Карпов, А.Н. Самко, В.В. Буза. – М.: Медицинское информационное агентство, 2010. – 312 с.
12. Кагана, И.И. Топографическая анатомия и оперативная хирургия / И.И. Кагана, И.Д. Кирпатовского. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2012. – Т. 1. – 512 с.
13. Кузнецов, Н.А. Общая хирургия / Н.А.Кузнецов. – М.: Мед.пресс-информ, 2009. – 896 с.
14. Кузнецова, И.Э. Перспективы применения биodeградируемых стентов в лечении атеросклеротических заболеваний сосудов / И.Э. Кузнецова, Н.В. Церетели, О.Е.Сухоруков, Д.А. Асадов // Международный журнал интервенционной кардиоангиологии. – 2013. – № 32. – С. 51-56.
15. Козлов, К.Л. Интервенционная пластика венечных артерий / К.Л. Козлов. – СПб.: ЭЛБИ, 2000. – 230 с.
16. Коржевский, Д.Э. Основы гистологической техники. Практическое руководство / Д.Э. Коржевский, А.В. Гиляров. – Спб.: СпецЛит, 2010. – 95 с.
17. Лакин, Г.Ф. Биометрия: учебное пособие для вузов / Г.Ф. Лакин. – М.: Высшая школа, 2000. – 312 с.
18. Левицкий, И.В. Характеристика рестенозов после имплантации различных типов стентов / И.В. Левицкий, Р.О. Широков, А.Н. Самко //

Международный журнал интервенционной кардиоангиологии. – 2011. – № 24. – С.79.

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

20. Малиованова, И.А. Кронарный атеросклероз и статины / И.А. Малиованова // Креативная кардиология. – 2009. – № 2. – С.118-130.

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

22. Самко, А.Н. Коронарное стентирование / А.Н. Самко, Н.А. Павлов. – М.: *Принт-Ателье*, 2001. – 283 с.

23. Самко, А.Н. Ближайшие и отдаленные результаты применения стентов с лекарственным покрытием эверолимусом Promus и сиролимусом Cypher у больных ИБС с коронарным атеросклерозом / А.Н. Самко, В.П. Лупанов, Г.Н. Бакашвили // Международный журнал интервенционной кардиоангиологии. – 2012. – № 29. – С. 9-18.

24. Самко, А.Н. Рестеноз: причины и механизмы развития при различных видах эндоваскулярного лечения / А.Н. Самко, Е.В. Меркулов, В.М. Власов, Д.Н. Филатов // Атеросклероз и дислипидемии. – 2014. – № 1. – С. 5-8.

25. Шигаев, М.В. Особенности конструкции и технологии изготовления систем доставки стентов / М.В. Шигаев // Труды Международного симпозиума «Надежность и качество». – 2010. – № 2. – С.197-199.

26. Aggarwal, A. Inflammatory response to drug eluting stent placement / A. Aggarwal // Am. J. Cardiol. – 2006. – № 98 (9). – P. 1210-1229.

27. Asakura, M. Remodeling of in-stent neointima, which became thinner and transparent over 3 years: serial angiographic and angioscopic follow-up / M. Asakura, Y. Ueda, S. Nanto // Circulation. – 2000. – № 97 (20). – P. 2003-2006.

28. Axel, D.I. Paclitaxel inhibits arterial smooth muscle cell proliferation and migration in vitro and in vivo using local drug delivery / D.I. Axel, W. Kunert, C. Goggelmann, M. Oberhoff, C. Herdeg, A. Kuttner, D.H. Wild, B.R. Brehm, R. Riessen, G. Koveker, K.R. Karsch // *Circulation*. – 2001. – № 96. – P. 636-645.
29. Cook, S. Incomplete stent apposition and very late stent thrombosis after drug-eluting stent implantation / S. Cook // *Circulation*. – 2009. – № 120. P. 391-399.
30. Costa, R.A. Angiographic results of the first human experience with everolimus-eluting stents for the treatment of coronary lesions (the Future I trial) / R.A. Costa, A.J. Lansky A, G.S. Mintz // *Am. J. Cardiol*. – 2005. – № 95 (1). – P. 113-116.
31. Eisen, H.J. Everolimus for the prevention of allograft rejection and vasculopathy in cardiac-transplant recipients / H.J. Eisen, E.M. Tuzcu, R. Dorent // *N. Engl. J. Med*. – 2003. – № 349. – P. 847-858.
32. Eury, K.R. Multi-layered biodegradable stent and method for its manufacture / K.R. Eury // *European Patent 604022 A1*. – 2004.
33. Garcia-Garcia, H.M. Drug eluting stents: Review / H.M. Garcia-Garcia, S. Vaina, K. Tsuchuda, P.W. Serruys // *Arch. Cardiol. Mex*. – 2006. – № 3. – P. 297-319.
34. Grewe, P. Acute and chronic tissue response to coronary stent implantation: pathologic findings in human specimen / P. Grewe, T. Deneke, A. Machraoui // *J Am CollCardiol*. – 2000. – № 35. – P. 157-163.
35. Grube, E. BioMatrixBiolimus A9-eluting coronary stent: a next-generation drug- eluting stent for coronary artery disease / E. Grube, L. Buellesfeld // *Expert Rev. Med. Devices*. – 2006. – № 3. –P. 731-741.
36. Haude, M. Quantitative analysis of elastic recoil after balloon angioplasty and after intracoronary implantation of ballon-expandable Palmaz-Schatz stents / M. Haude, R. Erbel, H. Issa, J. Meyer // *Am CollCardiol*. – 2003. – № 21. – P. 26-34.

37. Hoeven, B.L. Percutaneous coronary intervention with stent placement versus bypass operation in symptomatic multiple-vessel disease / B.L. Hoeven, M.J. Schalij // *Circulation*. – 2005. – № 119 (51). – P. 2837-2840.
38. Hofman, S.H. Recent developments in coated stents / S.H. Hofman, H.M. Beusekom, P.W. Serruys, W.J. Giessen // *Curr. Intervent. Cardiol. Rep.* – 2001. – № 3. – P. 28-36.
39. Hwang, C.W. Stent- based delivery is associated with marked spatial variations in drug distribution / C.W. Hwang, D. Wu, E.R. Edelman // *J. Am. Coll. Cardiol.* – 2001. – № 37. – P. 193-210.
40. Joner, M. Pathology of drug-eluting stents in humans: delayed healing and late thrombotic risk / M. Joner, A.V. Finn, A. Farb, E.K. Mont, F.D. Kolodgie, E. Ladich, R. Kutys, K. Skorija, H.K. Gold, R. Virmani // *J Am CollCardiol.* – 2006. – №48. – P. 193-202.
41. Kandzari, D.E. Comparison of long-term (seven year) outcomes among patients undergoing percutaneous coronary revascularization with versus without stenting / D. E. Kandzari, R.H. Tuttle, P. Zidar, J.G. Jollis // *Am J Cardiol.* – 2006. – № 97 (10). – P. 1467-1472.
42. Kastrati, A. Increased risk of restenosis after placement of gold-coated stents: results of a randomized trial comparing gold-coated with uncoated steel stents in patients with coronary artery disease / A. Kastrati, A. Schömig, J. Dirschinger, J. Mehilli, N. Welser, J. Pache, H. Schühlen, T. Schilling, C. Schmitt, F.J. Neumann // *Circulation*. – 2000. – № 101(21). – P. 2478-2483.
43. Kastrati, A. Sirolimus-eluting stents vs paclitaxel-eluting stents in patients with coronary artery disease: meta-analysis of randomized trials / A. Kastrati, A. Dibra, S. Eberle // *JAMA*. – 2005. – № 294 (7). – P. 819-825.
44. Kedhi, E. Second-generation everolimus-eluting and paclitaxel-eluting stents in real-life practice (Compare): a randomised trial / E. Kedhi, K.S. Joesoef, E. McFadden // *Lancet*. – 2010. – № 375. – P. 201–209.
45. Klomp, M. One year clinical outcome in an unselected patient population treated with the genous endothelial progenitor cell capturing stent / M.

Klomp, M.A. Beijk, J.G. Tijssen, R.J. Winter // Catheter CardiovascInterv. – 2011. – № 77 (6). – P. 809-17.

46. Kornowski, R. In-stent restenosis: contributions of inflammatory responses and arterial injury to neointimal hyperplasia / R. Kornowski, M. Hong, F. Tio // J Am CollCardiol. – 2000. – № 31. – P. 224-30.

47. Koster, R. Nickel and molybdenum contact allergies in patients with coronary in-stent restenosis / R. Koster, D. Vieluf, M. Kiehn, M. Sommerauer, J. Kahler, S. Baldus, T. Meinertz, C.W. Hamm // Lancet. – 2000. – № 356 (9245). – P. 1895-1897.

48. Maeng, M. A prospective randomized comparison of zotarolimus-eluting and sirolimus-eluting stents in patients with coronary artery disease / M. Maeng // American College of Cardiology Annual Scientific Session/i2 Summit. Atlanta, GA. – 2010.

49. Mayoux, G. Implantation of long coronary stents. Immediate and long-term results / G. Mayoux, P. Cantie, S. Murali // Arch Mal CouerVaiss. – 2000. – № 93 (1). – P. 11-18.

50. Mintz, G.S. Arterial remodeling after coronary angioplasty: a serial intravascular ultrasound study / G.S. Mintz, J.J. Popma, A.D. Pichard // Circulation. – 2003. – № 94. – P. 35-43.

51. Mortier, P. Stent design back in the picture: an engineering perspective on longitudinal stent compression / P. Mortier, M. De Beule // EuroIntervention. – 2011. – № 7. – P. 773-775.

52. Muni, N.I. Problems with drugeluting coronary stents - the FDA perspective / N.I. Muni, T.P. Gross // The New England Journal of Medicine. – 2004. – № 351. – P. 1593-1595.

53. Murphy, J.G. Polymeric stents: Modern alchemy or the future? / J.G. Murphy, R.S. Schwartz, K.C. Huber, D.R. Holmes // J. Invasive Cardiol. – 2001. – № 3. – P. 144-148.

54. Neumann, F.G. Neutrophil and platelet activation at balloon-injured coronary artery plaque in patients undergoing angioplasty / F. Neumann, M. Gawaz, G. Puchner // *J Am CollCardiol.* – 2006. – № 27. – P. 819-824.
55. Novack, V. Effect of coronary target lesion revascularization on late cardiac events after insertion of sirolimus-eluting or bare metal stents / V. Novack, M.C. Nguyen, M. Rooney // *Am J Cardiol.* – 2010. – № 106 (6). – P. 774-779.
56. Onuma, Y. Bioresorbable scaffold: the advent of a new era in percutaneous coronary and peripheral revascularization? / Y. Onuma, P.W. Serruys // *Circulation.* – 2011. – № 123. – P. 779-797.
57. Pellitero, S. Polymorphisms in platelet glycoproteins Ia and 111a are associated with arterial thrombosis and carotid atherosclerosis in type 2 diabetes / S. Pellitero, J.L. Reverter, D. Tassies // *Thromb. Haemost.* – 2010. – № 103 (3). – P. 630-637.
58. Popma, J. Final angiographic results of the Sirius Trial / J. Popma // *Transcatheter Cardiovascular Therapeutics Symposium.* Washington, DC. – 2002.
59. Roy, P. Comparison between sirolimus- and paclitaxel-eluting stents in complex patient and lesions subsets / P. Roy, R. Torguson, T. Okabe // *Catheter Cardiovasc. Interv.* – 2007. – № 70 (2). – P. 167-172.
60. Schuler, W. SDZ RAD, a new rapamycin derivative / W. Schuler, R. Sedrani, S. Cotton // *Transplantation.* – 2005. – № 64. – P. 36-42.
61. Serruys, P.W. From metallic cages to transient bioresorbable scaffolds: change in paradigm of coronary revascularization in the upcoming decade? / P.W. Serruys, H.M. Garcia-Garcia, Y. Onuma // *Eur Heart J.* – 2012. – № 33. – P.16-25.
62. Serruys, P.W. Heparin-coated Palmaz-Schatz stents in human coronary arteries: Early out-come of the BenestentH Pilot Study / P.W. Serruys, H. Emanuelsson, W. Giessen // *Circulation.* – 2013. – № 93. – P.412-422.
63. Stettler, C. Outcomes associated with drug-eluting and bare-metal stents: a collaborative network meta-analysis / C. Stettler, S. Wandel, S. Allemann // *Lancet.* – 2007. – № 370. – P. 937–948.

64. Tilli, F.V. Real life stenting: a comparison of target vessel revascularization in Benestent-stress lesions to non-Benestent-stress lesion (abstr) / F.V. Tilli, D. Aliabadi, J.W. Kinn // *Circulation*. – 2000. – № 94. – P. 330-332.
65. Udupi, K. Next generation Endeavor Resolute Stent: role of the BioLinx polymer system / K. Udupi // *Medtronic cardiovascular*. – 2011. – № 26. – P. 195-403.
66. Urban, P. Safety of coronary sirolimus-eluting stents in daily clinical practice: one-year follow-up of the e-Cypher registry / P. Urban, A.H. Gershlick, G. Guagliumi // *Circulation*. – 2006. – № 113 (11). – P. 1434-1441.
67. Vaknin-Assa, H. Characterization and clinical outcomes of drug-eluting in-stent restenosis / H. Vaknin-Assa, A. Assali, E. Lev // *Isr Med Assoc J*. – 2010. – № 12 (5). – P. 273-276.
68. Varani, E. Comparison of multiple drug-eluting stent percutaneous coronary intervention and surgical revascularization in patients with multivessel coronary artery disease: one-year clinical results and total treatment costs / E. Varani, M. Balducelli, G. Vecchi // *InvasCardiol*. – 2007. – № 19. – P.476-477.
69. Virmani, R. Drug-eluting stents: Caution and concerns for long-term outcome/ R.Virmani, A. Farb, G. Guagliumi, F.D. Kolodgie // *Coron. Artery Dis*. – 2004. – № 15. – P. 313-318.
70. Wang, X. Controlled release of sirolimus from a multilayered PLGA stent matrix / X. Wang // *Biomaterials*. – 2006. – № 27. – P. 5588-5595.
71. Waugh, J. The paclitaxel (Taxus)-eluting stent: a review of its use in the management of de novo coronary artery lesions / J. Waugh, A.J. Wagstaff // *Am J Cardiovasc Drugs*. – 2004. – №4 (4). – P. 257-268.
72. Yeung, A.C. Resolute us Investigators / A.C. Yeung // *J. Am. Coll. Cardiol*. – 2011. – № 17 (57). – P. 1778-1783.

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

ПЕНЗЕНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

Факультет
физико-математических
и естественных наук

Кафедра
«Общая биология и биохимия»

Направление подготовки
06.03.01 Биология
Профиль подготовки «Биохимия»

Утверждаю:
Зав. кафедрой
 Г.А. Карпова

« 01 » 11 2017 г.

Задание

По ВКР студента Черновой Анны Михайловны

Тема работы: «Изучение деградации полимерного покрытия лекарственных
стентов in vitro».

Утверждена приказом по Университету от « 01 » 10 2017 г. № 1096 а/с

Срок сдачи студентом законченной работы « 25 » мая 2018 г.

КАЛЕНДАРНЫЙ ПЛАН ВКР

№ п/п	Перечень подлежащих разработке вопросов:	Сроки выполнения этапов	Примечания
1.	Собеседование с научным руководителем, обсуждение темы и структуры ВКР, формулировка цели, задач	ноябрь 2017	выполнено
2.	Поиск научной, справочной литературы по теме ВКР, анализ современных научных достижений в области исследования по теме ВКР	ноябрь - декабрь 2017	выполнено
3.	Составление библиографического списка изученной литературы	ноябрь - декабрь 2017	выполнено
4.	Поиск и изучение методов исследования в рамках ВКР	ноябрь - декабрь 2017	выполнено
5.	Подготовка главы «Обзор литературы»	ноябрь - декабрь 2017	выполнено
6.	Подготовка главы «Материалы и методы исследования»	декабрь 2017	выполнено
7.	Составление плана проведения эксперимента, подготовка к выполнению эксперимента	декабрь - март 2017-2018	выполнено
8.	Подготовка экспериментальных образцов	декабрь - март 2017-2018	выполнено
9.	Оценить начальное и остаточное после моделирования деградации покрытия количество препарата методом УФ-спектроскопии	декабрь - март 2017-2018	выполнено
10.	Изучить профиль элюции лекарственного препарата при моделировании деградации покрытия методом ВЭЖХ	декабрь - март 2017-2018	выполнено
11.	Проанализировать влияние типа полимера и количество препарата на интенсивность деградации лекарственного покрытия	декабрь - март 2017-2018	выполнено
12.	Оценить антипролиферативное действие лекарственного покрытия путем имплантации лекарственных стентов с последующим гистологическим исследованием	декабрь - март 2017-2018	выполнено
13.	Оформление результатов исследования в виде графиков	декабрь - март 2018	выполнено
14.	Подготовка главы «Результаты исследования и их обсуждение»	декабрь - март 2017-2018	выполнено
15.	Итоговое оформление ВКР	апрель - май 2018	выполнено
16.	Подготовка презентации на защиту ВКР, подготовка к защите ВКР	май 2018	выполнено

Дата выдачи задания « 01 » 11 2017г.

Руководитель Ильин / В.В. Ильин

Задание принял к исполнению Ильин