

Н.А. Галатенко
Д.В. Кулеш
Р.А. Рожнова
В.П. Гриценко
Л.Ф. Наражайко

Інститут хімії високомолекулярних сполук НАН України,
Київ, Україна

Надійшла: 30.02.2021
Прийнята: 15.03.2021

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2021.1.39-47>

УДК 57.089.67, 616-089.843, 678.664

ОЦІНКА БІОСУМІСНОСТІ ІЗОЦІАНУРАТВМІСНИХ ПОЛІУРЕТАНІВ З ІФОСФАМІДОМ МЕТОДАМИ *IN VIVO* ТА *IN VITRO*

Galatenko N.A. , Kuliesh D.V.  ✉, Rozhnova R.A. , Gritsenko V.P. , Narazhayko L.F.  Assessment of biocompatibility of isocyanurate-containing polyurethanes with ifosfamide by in vivo and in vitro methods. Institute of Macromolecular Chemistry of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine.

ABSTRACT. Background. The creation of polymeric composite materials with pronounced biological activity, which are able to act as implants with local prolonged action of the immobilized substance can be widely used in medical practice. **Objective.** Study of cellular reactions of surrounding tissues of experimental animals to implantation of polymeric composite materials based on isocyanurate-containing polyurethanes with ifosfamide, study of histotoxicity of the obtained materials by tissue culture method. **Methods.** Polymeric composite materials based on isocyanurate-containing polyurethanes without and with ifosfamide were implanted into the body of white laboratory Wistar rats. Cellular responses of the organism and possible changes in the structure of test specimens after implantation were studied by light microscopy by analysis of histological micropreparations. In order to study the peculiarities of the dynamics of growth and development of fibroblastic elements, the method of tissue culture was used. **Results.** Conducted biological studies by in vivo and in vitro methods allowed to evaluate the effect of immobilized ifosfamide in the structure of isocyanurate-containing polyurethanes on cellular reactions of surrounding tissues during implantation in experimental animals, as well as the effect of extracts from developed polymer samples on cultured cell growth. **Conclusion.** It was found that the implantation of isocyanurate-containing polyurethanes with ifosfamide led to the development of intense cellular reactions in the area of implant placement, primarily the reaction of round cell elements. The presence of ifosfamide in the structure of the polymeric implantation material probably affected the proliferation of cellular elements, inhibited regenerative processes in the early stages of the study and delayed the formation of a mature connective tissue capsule around the implanted samples. The tissue culture method showed that when making an extract of isocyanurate-containing polyurethanes with ifosfamide in the culture medium, there was a large variability of cell forms, which led to the appearance of macrophage-like elements.

Key words: implantation, polyurethane, ifosfamide, biocompatibility, histological examination, tissue culture method.

Citation:

Galatenko NA, Kuliesh DV, Rozhnova RA, Gritsenko VP, Narazhayko LF. [Assessment of biocompatibility of isocyanurate-containing polyurethanes with ifosfamide by in vivo and in vitro methods]. Morphologia. 2021;15(1):39-47. Ukrainian.

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2021.1.39-47>

 Galatenko N.A. 0000-0002-5961-5750,  Kuliesh D.V. 0000-0002-0484-7853
 Rozhnova R.A. 0000-0003-3284-3435,  Gritsenko V.P. 0000-0002-6001-5365
 Narazhayko L.F. 0000-0001-7031-9998
✉ d_kulesh@ukr.net
© Dnipro State Medical University, «Morphologia»

Вступ

Імплантаційні матеріали на основі синтетичних полімерних матеріалів є доволі затребуваними матеріалами в різних областях медицини і з успіхом використовуються при проведенні реконструктивних, відновлювальних та пластичних операцій [1-3]. Актуальною задачею сього-

дня є створення полімерних композиційних матеріалів з вираженою біологічною активністю, що здатні виступати як імпланти з місцевою пролонгованою дією іммобілізованої речовини, та можуть сприяти повноцінній та швидкій реабілітації [1]. Одним з класів полімерів, що застосовуються для таких цілей є поліуретани

(ПУ), що володіють високою біосумісністю та здатні виконувати різноманітні функції в залежності від області застосування [4, 5]. Крім того, ПУ є універсальною матрицею для створення композиційних матеріалів на їх основі з іммобілізованими біологічно активними сполуками та лікарськими речовинами, а їх хімічна структура сприяє пролонгованому вивільненню іммобілізованих речовин та підвищує їх біосумісність.

В роботі [6] було синтезовано ізоціануратвмісний поліуретан та проведено іммобілізацію Іфосфаміду (ІФО) на його основі в розрахунку 1 мг ІФО на 1 см² полімерної плівки. ІФО ((RS)-N-Біс(2-хлоретил)-1,3,2-оксазафосфінан-2-амін-2-оксид), діюча речовина препарату з торговою назвою Холосан®, застосовується при лікуванні неоперабельних злоякісних пухлин, таких як рак легень, яєчників, молочної залози, рак шийки матки, саркоми м'яких тканин. ІФО – це цитостатична речовина з групи оксазафосфоринів, синтетичний аналог циклофосфаміду. Цитостатичний ефект ІФО є наслідком взаємодії між його алкілюючими метаболітами і ДНК. Відомо, що пухлини, які можуть бути резистентними до циклофосфаміду чи рецидивувати після лікування циклофосфамідом, часто відповідають на лікування ІФО [7]. Синтезовані полімерні композиційні матеріали було досліджено фізико-хімічними методами (ІЧ-спектроскопії, ДСК, ТГА), за результатами яких було встановлено, що характеристики отриманих зразків відповідають вимогам, що пред'являються до полімерів медичного призначення. Також була вивчена біодеградація отриманих композиційних матеріалів в модельних середовищах протягом 1, 3, 6 місяців. За результатами проведених випробувань було показано, що отримані зразки не зазнають значних змін структури та властивостей після їх інкубування в модельних середовищах та є стабільними.

Для подальшої роботи з отриманими полімерними композиціями медичного призначення потрібно провести комплекс біологічних випробувань направлених на вивчення їх біосумісності з тканинами організму. Ці випробування проводяться на експериментальних тваринах з урахуванням передбачуваної області застосування. Так як отриманий матеріал передбачає використання як імплантат з протипухлинною дією за рахунок пролонгованого вивільнення цитостатика ІФО, то метою даної роботи було вивчення біосумісності, клітинних реакцій оточуючих тканин експериментальних тварин на імплантацію полімерних композиційних матеріалів на основі ізоціануратвмісних ПУ з ІФО, дослідження гістотоксичності отриманих матеріалів методом культури тканин.

Матеріали та методи

Було синтезовано ПУ з ізоціануратними

компонентами (ПУ+ІЦК), на які проводили іммобілізацію ІФО безпосередньо під час синтезу шляхом введення його розчину у диметилацетаміді в кількості 1 мг ІФО на 1 см² плівки. Синтезований полімерний матеріал представляв собою прозору плівку жовтого кольору

З метою вивчення клітинних реакцій на імплантацію біологічно активних композиційних матеріалів та оцінки біосумісності полімерних матеріалів на основі ПУ+ІЦК та ПУ+ІЦК+ІФО була проведена їх імплантація в організм 24 експериментальних тварин – лабораторних щурів, вагою 180-230 г. Всі маніпуляції з експериментальними тваринами проводилися з дотриманням принципів, викладених в Європейській конвенції по захисту хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та інших цілей [8] та у відповідності до закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» №3447-IV від 21.02.2006 р. Використовували здорових, молодих статевозрілих тварин. Модельні операції виконували під загальним наркозом лабораторних тварин в асептичних умовах. Шерстяний покрив в області операції видаляли стрижкою. Після обробки операційного поля полімерні зразки у вигляді монолітних плівок товщиною 2 мм та розміром 10x10 мм поміщалися субкутально в область міжлопаточного простору в підшкірно-жирову клітковину експериментальних тварин без додаткової фіксації, для виключення впливу шовного матеріалу на рановий процес. Така область характеризується добрим кровозабезпеченням, високою щільністю клітин різних диферонів, а також малою рухливістю цієї зони і недоступністю для самої тварини, що зводить до мінімуму ризик її втручання в експериментальний процес. Після хірургічної процедури рану ушивали стерильним шовним матеріалом. Тварин виводили з експерименту через 7, 14, 30 та 90 діб шляхом гуманної евтаназії. Дослідний матеріал (полімерний зразок з оточуючою сполучною тканиною) фіксували в 10% розчині формаліну та заливали в парафін після проведеної гістологічної обробки за стандартною методикою [9, 10]. Зрізи товщиною 10-15 мкм забарвлювали гематоксиліном і еозином. Аналіз клітинних реакцій та оцінку біосумісності композиційних матеріалів проводили шляхом дослідження гістологічних препаратів за допомогою світлової мікроскопії – мікроскоп Carl Zeiss Primo Star, мікрофотозйомка проводилася за допомогою фотоапарату Canon PowerShot A640 з адаптером Soligor Adapter Tube for Canon A610/A620 52 mm Tele. Оцінювалася локальна запальна реакція навколо імплантованих композиційних матеріалів, що дало змогу оцінити їх біосумісність.

Для вивчення особливостей динаміки росту та розвитку фібробластичних елементів був застосований метод клітинної культури. Цей метод дає змогу швидко та точно оцінити гістотоксич-

ну дію хімічних сполук на клітини – фібробласти, що мають важливе значення у взаємодії полімерний імплантат – сполучна тканина. Відомо, що фібробласти є складовою частиною строми паренхіматозних органів та беруть активну участь в морфогенезі, диференціюванні спеціалізованих клітин і, відповідно, дозволяють екстраполювати дані отримані в культурі фібробластів на дослідження *in vivo* [11]. Як джерело клітин використовували підшкірну клітковину білих лабораторних щурів, що в умовах культивування викликає ріст фібробластичних і фібробластоподібних елементів.

Культури були досліджені методом експлантації в згустку плазми у флаконах Карреля. Досліджувались дві експериментальні групи: дослідна і контрольна. Як модельне середовище використовували біологічне середовище 199 (БС 199) для культури тканин. У контрольній групі проводили культивування тканини на плазмі з послідуною зміною БС 199 протягом 3, 7, 10, 14 днів культивування. У дослідній групі – впродовж 3, 7, 10, 14 днів культивування БС 199 замінювали екстрактом з полімерного зразка ПУ+ІЦК+ІФО. Екстракт готували в співвідношенні ваги полімерного зразка до об'єму модельного середовища як 100 мг / 1 мл. Час екстракції становив 1 добу за температури +37 °С. Для визначення впливу отриманих полімерних зразків на ріст культури тканини екстракт з них вносили в середовище культивування на 3 добу інкубації.

На 5, 7, 10 та 14 добу проводили спостереження за зонами росту клітин, класифікуючи їх на компактну, сіткоподібну зони та зону мігруючих фібробластичних елементів згідно з [12]. Критерієм для виділення цих зон був характер розташування зростаючих фібробластичних елементів. До компактної зони відносили ділянки щільного розташування клітин, що росли. До сіткоподібної відносили ділянки розташування

клітинних тяжів, що анастомозувалися і розгалужувалися. По вершинах ізольованих клітинних тяжів, що вросли в тверду фазу живильного середовища до місця розташування ізольовано лежачих клітин визначали зону мігруючих елементів.

Результати та їх обговорення

Дослідження біосумісності композиційних матеріалів на основі ізоціануратвмісних ПУ з ІФО методом імплантаційного тесту.

Під час експерименту вивчалися поведінкова реакція тварин, їх зовнішній стан, післяопераційне поле. Щоденна візуальна оцінка реакції епітелію на операційному місці показала, що рана загоювалася через 3-5 днів після операції без ознак запальної реакції. За морфологічними ознаками практично не було виявлено дегенеративних змін, пухлин, некрозу тканин ні у короткочасному, ні у віддаленому післяопераційному періоді. Протягом всього часу експерименту імплантовані матеріали пальпувалися через шкіру тварин. Імплантація досліджуваних зразків не викликала агресії та змін в поведінці експериментальних тварин.

Основна увага в гістологічних дослідженнях зверталася на ознаки розвитку запальних явищ в зоні імплантації полімерних зразків на межі "імплантат – тканина". Макроскопічно навколо імплантованих зразків на всіх термінах дослідження виявлялася сполучна тканина, що відмежовувала імплантовані зразки від оточуючих тканин, за кольором і структурою не відрізнялася від тканин подалі від місця імплантації.

Через 7 днів після операції навколо полімерних зразків ПУ+ІЦК спостерігалася формування досить тонкої сполучнотканинної капсули, що відокремлювала імплантовані зразки від оточуючої сполучної тканини (рис. 1, а).

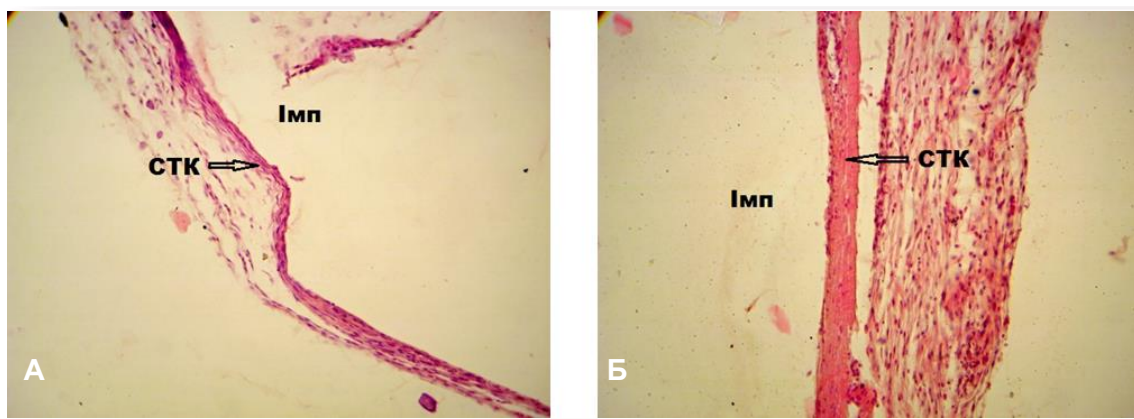


Рис. 1. Сполучнотканинні капсули (СТК) навколо імплантованих полімерних зразків (Імп) на 7 добу експерименту: а) формування досить тонкої та зрілої сполучнотканинної капсули навколо імплантованого зразка ПУ+ІЦК; б) СТК зі щільним розташуванням колагенових волокон навколо імплантованого зразка ПУ+ІЦК+ІФО. Забарвлення гематоксиліном і еозином. $\times 200$.

Капсула, в основному, мала високий ступінь зрілості на даному терміні дослідження та складалася з синтетично активних фібробластів, що знаходилися в товщі пучків зрілих колагенових волокон. На окремих ділянках спостерігалася капсула, яка характеризувалася меншим ступенем зрілості та складалася з молодих форм фібробластичних елементів без чітких ознак їх зрілості, лейкоцитів (поліморфноядерних нейтрофілів), а також моноцитарно-макрофагальних клітин з вираженою фагоцитарною активністю, незначної кількості малодиференційованих клітин. Спостерігалися поодинокі кровоносні судини, мікроциркуляторні процеси в яких були без порушень. Через 7 днів після операції навколо полімерних зразків ПУ+ІЦК+ІФО також спостерігалася досить тонка сполучнотканинна капсула, внутрішній шар якої був представлений щільною оформленою сполучною тканиною, основними клітинними елементами якої були фібробласти веретеноподібної форми, що знаходилися між рядами пучків зрілих колагенових волокон (рис. 1, б). Поряд з внутрішнім шаром капсули, подалі від імплантату, спостерігалася слабка за інтенсивністю лейкоцитарна та макрофагальна інфільтрація. На окремих ділянках була наявна більша за інтенсивністю реакція круглоклітинних елементів – поліморфноядерних лейкоцитів та мононуклеарних клітин (макрофагів). Крім того, на таких ділянках спостерігалася значна кількість малодиференційованих клітин. Крово-

носні судини були представлені у великій кількості, деякі з них були повнокровні, спостерігалася крайове стояння лейкоцитів (маргінація).

Через 14 днів після операції навколо полімерних зразків ПУ+ІЦК спостерігалася збільшення товщини сполучнотканинної капсули, в порівнянні з попереднім терміном дослідження за рахунок початку активних проліферативних процесів та утворенням міжклітинної речовини у вогнищі запалення. Капсула мала різний ступінь зрілості по всій своїй протяжності. Так, на одних ділянках, спостерігалася сформована та зріла капсула, що була представлена фібробластами, що розташовувалися в товщі пучків колагенових волокон. На інших ділянках, капсула мала невисокий ступінь зрілості і була представлена круглоклітинними елементами – поліморфноядерними лейкоцитами, а також інтенсивною моноцитарно-макрофагальною реакцією, що свідчило про активний процес фагоцитозу. На даному терміні дослідження характерною була локальна геморагічна ексудація оточуючих капсулу тканин та велика кількість кровоносних судин (рис. 2, а), яка істотно зростала, в порівнянні з попереднім терміном дослідження. Виявлялися судини, що характеризувалися наявністю крайового стояння лейкоцитів, деякі кровоносні судини були з елементами стазу та тромбозу. Поряд з судинами розміщувалися тканинні базофіли.

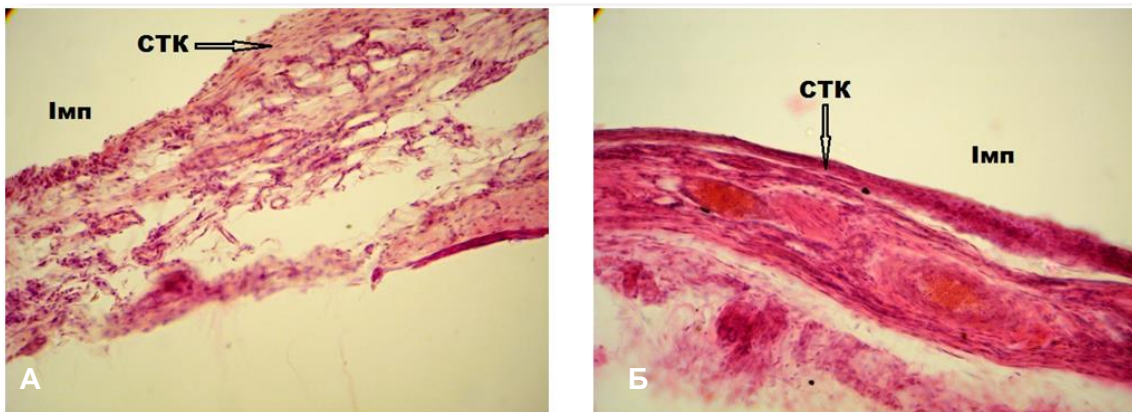


Рис. 2. Сполучнотканинні капсули (СТК) навколо імпантованих полімерних зразків (Імп) на 14 добу експерименту: а) СТК з великою кількістю кровоносних судин навколо імпантованого зразка ПУ+ІЦК; б) СТК з осередками інфільтратів круглоклітинних елементів навколо імпантованого зразка ПУ+ІЦК+ІФО. Забарвлення гематоксиліном і еозином. $\times 200$.

Через 14 днів після операції навколо полімерних зразків ПУ+ІЦК+ІФО спостерігалася значне збільшення товщини капсули, при цьому її основними клітинними елементами були фібробласти, що розташовувалися в товщі колагенових волокон. Характерним для даного терміну дослідження була поява осередкових інфільтратів, що склалися переважно з макрофагів, лімфоцитів, плазматичних клітин (рис. 2, б). Така інтенсивність клітинних реакцій через 14 днів після опера-

ції могла свідчити, з одного боку, про активний процес фагоцитозу пошкоджених та зруйнованих клітин в зоні розвитку запалення, з іншого – про активацію захисно-компенсаторних механізмів клітинних реакцій, направлену на біологічну активність ІФО, що, ймовірно, пролонговано вивільнювався з полімерного носія. Кровоносні судини були представлені в значній кількості, при цьому багато судин мали розширений провіт, окремі судини були повнокровні та розширені,

деякі з судин були з елементами стазу та тромбозу. Подекуди спостерігалася ексудація (вихід

Через 30 діб після операції навколо зразка ПУ+ІЦК спостерігалася тонка та достатньо зріла сполучнотканинна капсула, що складалася, в основному з пучків колагенових волокон та фіброblastів веретеноподібної форми між ними, що активно синтезували колаген та утворювали міжклітинну речовину. На окремих ділянках капсули були наявні незначні скупчення круглоклітинних елементів – поліморфноядерних лейкоцитів та макрофагів (рис. 3, а). Подекуди спостерігалися гігантські клітини чужорідних тіл. На даному терміні дослідження відбувалася нормалізація мікроциркуляторних процесів в кровоносних судинах, в порівнянні з попереднім терміном дослідження. При цьому кількість кро-

відкої частини крові) в волокнисту сполучну тканину поряд з вогнищем запалення.

воносних судин істотно зменшувалася за рахунок їх редукції. Через 30 діб після операції навколо імплантованого зразка ПУ+ІЦК+ІФО спостерігалася досить товста та незріла сполучнотканинна капсула. На даному терміні дослідження спостерігалася висока інтенсивність моноцитарно-макрофагальної реакції та лейкоцитарної інфільтрації в оточуючій імплантат сполучній тканині (рис. 3, б). На окремих ділянках капсули спостерігалися пучки зрілих колагенових волокон, направлених вздовж полімерного імплантату, та веретеноподібні фіброblastи між ними. Кількість кровоносних судин, як і через 14 діб після операції, була високою, але мікроциркуляторні процеси в них були без ускладнень.

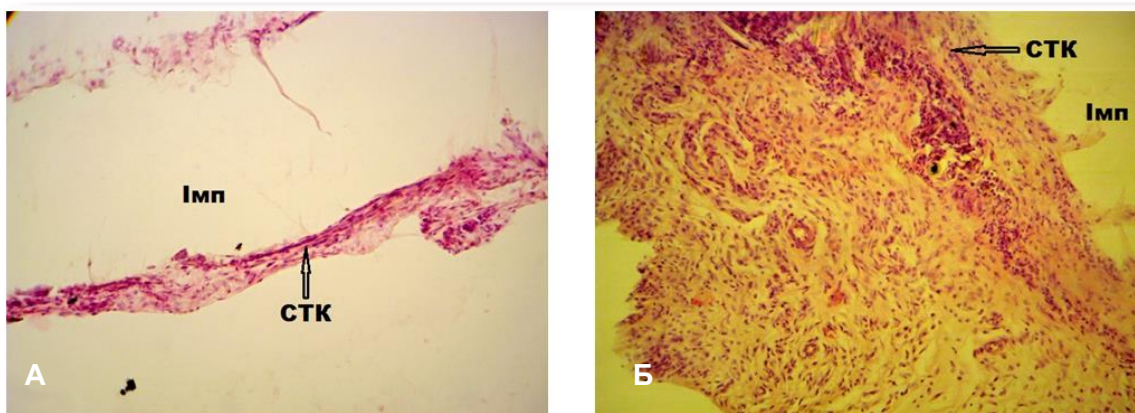


Рис. 3. Сполучнотканинні капсули (СТК) навколо імплантованих полімерних зразків (Імп) на 30 добу експерименту: а) СТК навколо імплантованого зразка ПУ+ІЦК; б) круглоклітинна інфільтрація в оточуючій імплантований зразок ПУ+ІЦК+ІФО сполучній тканині. Забарвлення гематоксилином і еозином. $\times 400$.

Через 90 діб після операції навколо зразка ПУ+ІЦК спостерігалася сполучнотканинна капсула, що мала високий ступінь зрілості по всій своїй довжині (рис. 4, а). Основними клітинними елементами капсули були веретеноподібні фіброblastи, що знаходилися між пучками хвилястих колагенових волокон, орієнтованих вздовж імплантованого зразка. На окремих ділянках капсули спостерігалася незначна макрофагальна та лейкоцитарна реакції. Кількість кровоносних судин була незначною, а мікроциркуляторні процеси в них були без порушень. Через 90 діб після операції навколо зразка ПУ+ІЦК+ІФО спостерігалася нормалізація клітинних реакцій, в порівнянні з попередніми термінами дослідження та формування щільної та зрілої сполучнотканинної капсули, основними клітинними елементами якої були синтетично активні фіброblastи, що лежали між пучків хвилястих колагенових волокон (рис. 4, б). Кількість кровоносних судин на даному терміні дослідження була незначною, порушень мікроциркуляторних процесів в них не

спостерігалася.

Таким чином, за результатами гістологічних досліджень було встановлено, що імплантація полімерних зразків на основі поліуретану з ізоціануратними компонентами (ПУ+ІЦК, ПУ+ІЦК+ІФО) в організм експериментальних тварин приводила до відмежування всіх імплантованих зразків від оточуючих тканин СТК вже на ранніх термінах дослідження. Ступінь зрілості, товщина СТК, а також інтенсивність клітинних реакцій живого організму експериментальних тварин на імплантацію полімерних зразків різного складу дещо відрізнялися одні від одних, але, в цілому, були типовими для класичного розвитку асептичного запалення навколо імплантованих поліуретанових матеріалів. Динаміка запального процесу, закономірний характер його розвитку, в більшій мірі, був обумовлений комплексом біологічних процесів у вогнищі запалення, що приводили до формування зрілих та сформованих сполучнотканинних капсул.

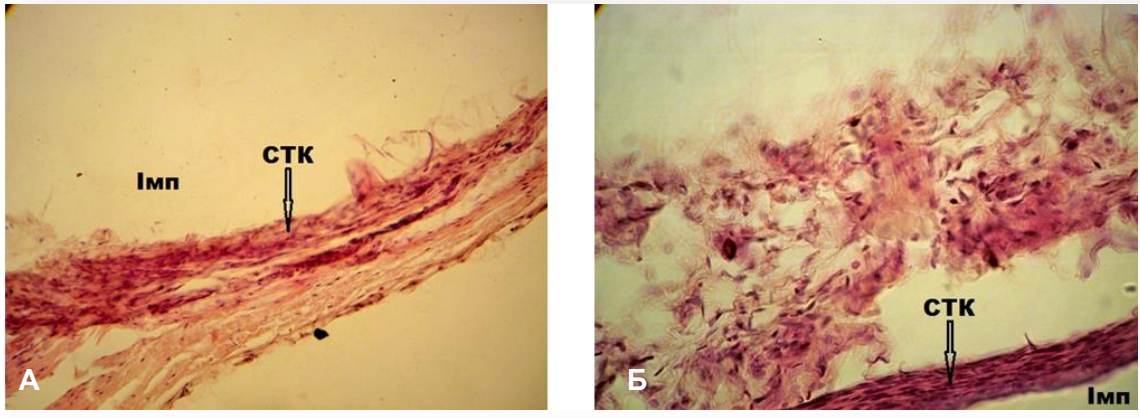


Рис. 4. Сполучнотканинні капсули (СТК) навколо імпантованих полімерних зразків (Імп) на 90 добу експерименту: а) СТК навколо імпантованого зразка ПУ+ІЦК; б) СТК навколо імпантованого зразка ПУ+ІЦК+ІФО. Забарвлення гематоксилином і еозиним. А - $\times 200$. Б - $\times 400$.

Аналіз гістологічних препаратів показав, що нормалізація клітинних реакцій навколо імпантованих зразків ПУ+ІЦК відбувалася лише через 30 діб після операції, а у випадку імпантації ПУ+ІЦК+ІФО спостерігалися яскраво виражені клітинні реакції і через 30 діб після імпантації, що, скоріше за все, було пов'язано не тільки з реакцією організму на присутність чужорідного матеріалу, а й з біологічною активністю самого ІФО – цитостатичною дією. Повноцінне формування та дозрівання СТК навколо імпантованого зразка ПУ+ІЦК+ІФО спостерігалось лише через 90 діб після операції. При цьому майже на всіх термінах дослідження капсули навколо зразка ПУ+ІЦК+ІФО спостерігалася інтенсивна реакція лейкоцитів (поліморфноядерних нейтрофілів) та моноцитарно-макрофагальних клітин з вираженою фагоцитарною активністю, пов'язана з процесом фагоцитозу з метою реалізації захисно-компенсаторних механізмів організму.

Дослідження біосумісності композиційних

матеріалів на основі ізоціануратвмісних поліуретанів з ІФО методом культури тканин.

На 3 добу після експлантації в контролі відмічалася міграція поодиноких фібробластичних елементів, що мали, в основному, веретеноподібну форму та на деяких ділянках зон росту формували тяжі, що склалися з 3-4 клітин. На даному терміні дослідження спостерігалася доволі активна міграція в поживне середовище поодиноких макрофагальних елементів, представлених більш крупними, ніж фіброласти клітинами неправильної, часто полігональної форми (рис. 5, а). Надалі активність росту фібробластичних елементів збільшувалася. На 5 добу спостерігалось розмежування зон росту на компакту та сіткоподібну зони росту. Компактна зона росту складалася з клітин веретеноподібної форми та незначної кількості клітин полігональної форми. За компактною зоною формувалися тяжі та пучки клітин, розташованих сіткоподібно (рис. 5, б).

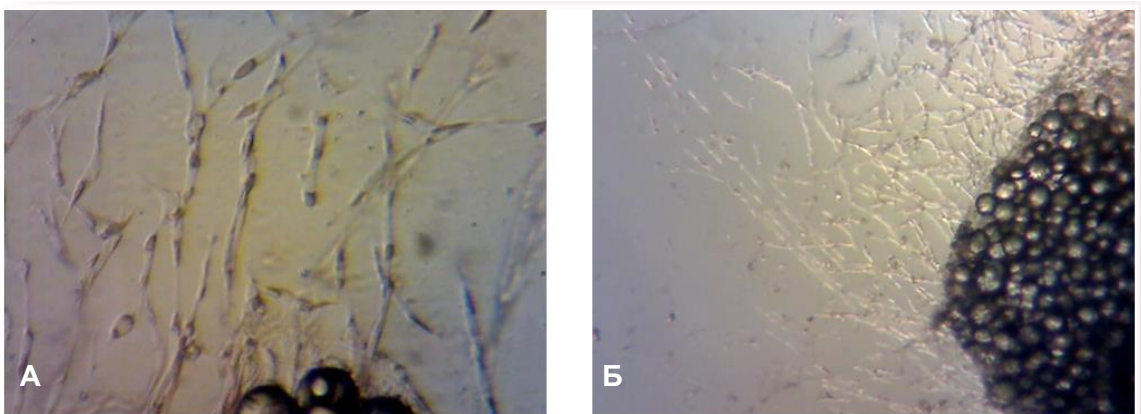


Рис. 5. Ріст культури тканин фібробластів: а) на 3 добу культивування. Контроль; б) на 5 добу культивування. Контроль. $\times 160$.

На 7 добу в контролі спостерігалось формування зони росту поодиноких мігруючих елементів. Будава перших двох зон на цьому

терміну дослідження суттєво не змінювалось. На 10 добу дослідження в контролі спостерігалися перші ознаки дегенеративних змін, що проявля-

лися у вигляді посиленої вакуолізації цитоплазми клітин, а дегенеративні зміни були найбільш виражені в компактній зоні. На 14 добу дослідження клітинна популяція клітин в контролі вступала у фазу вираженої дегенерації, основними ознаками якої була різка вакуолізація цитоплазми та її зернисте переродження (рис. 6).

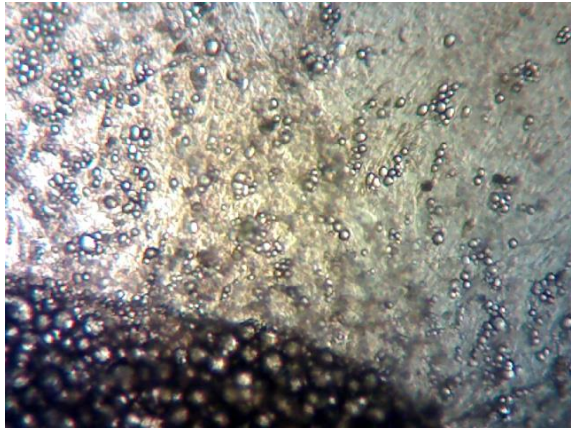


Рис. 6. Зернисте переродження цитоплазми на 14 добу культивування. Контроль. $\times 160$.

Представлені дані про характер росту та розвитку клітинних елементів підшкірної сполучної тканини білих щурів, в основному, схожі з результатами, отриманими іншими авторами при використанні різних варіантів живильних сере-

довищ, умов культивування тощо.

Маючи уявлення про характер росту та розвитку клітинних елементів сполучної тканини *in vitro* нами були вивчені особливості впливу екстракту зі зразка полімеру з іммобілізованим ІФО на клітини тканинної культури. Слід відмітити, що міграція клітин з підшкірно-жирової клітковини білих щурів активно відбувалася на 5 добу культивування. Клітини, в порівнянні з контролем, мали, в основному, полігональну форму, яка характерна для макрофагоподібних клітинних елементів. Відмічалось безліч поодиноких клітин полігональної форми (рис. 7, а). На 7 добу культивування спостерігалось формування трьох зон росту – компактної, сіткоподібної зони та зони мігруючих фібробластичних елементів та поодиноких мігруючих клітин (рис. 7, б). Характерною особливістю на даному терміні дослідження була форма зростаючих клітинних елементів – тяжкі клітини були представлені, в основному, клітинами полігональної форми. В зоні поодиноких мігруючих клітин також відмічалася значна варіабельність клітинних форм від округлої до полігональної.

На 10-14 добу дослідження клітинна популяція вступала у фазу дегенеративних змін, що супроводжувалося округленням тіл клітин зі зникненням відростків, спостерігалася вакуолізація та зернисте переродження цитоплазми клітин (рис. 8).

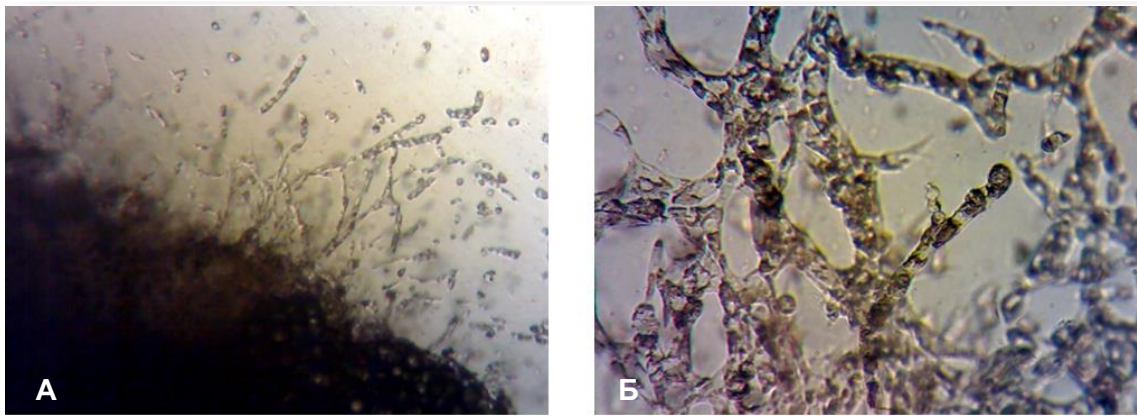


Рис. 7. Ріст культури тканин фібробластів після внесення в середовище культивування екстракту з ПУ+ІЦК+ІФО: а) міграція фібробластичних елементів на 5-у добу культивування; б) сіткоподібна зона фібробластичних елементів на 7-у добу культивування. $\times 160$.

Таким чином, можна відмітити, що при внесенні екстракту з полімерного зразка з ІФО, терміни проходження фаз росту і розвитку клітинних елементів були схожі з контролем. Однак спостерігалася велика варіабельність клітинних форм, що могло свідчити про вплив ІФО на клітинні елементи сполучної тканини, що призводило до появи макрофагоподібних елементів. Отримані дані дослідження в культурі тканин підтверджуються випробуваннями *in vivo*, де на

термінах 7-14 діб активно відбувається виселення клітин імунного ряду в сполучнотканинну капсулу, що оточує імплантат.

Висновки

1. Встановлено, що імплантація ізоціануратвісних ПУ в організм експериментальних тварин приводило до розвитку клітинних реакцій типових для асептичного запалення, без ознак гострих запальних та інших реактивних процесів. Проведені гістологічні дослідження показав-

ли, що досліджені зразки є нетоксичними та біосумісними.

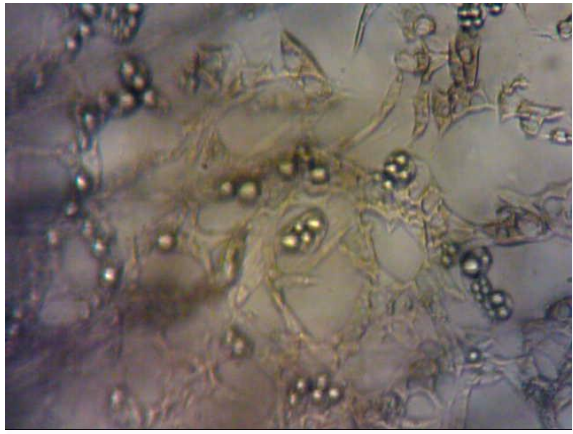


Рис. 8. Компактна та сіткоподібна зони фібробластичних елементів на 10 добу після внесення в середовище культивування екстракту з ПУ+ІЦК+ІФО. $\times 160$.

2. Показано, що імплантація ізоціануратвмісних ПУ з ІФО призводила до розвитку інтенсивних клітинних реакцій в зоні розміщення імплантатів, насамперед реакції круглоклітинних елементів – поліморфноядерних лейкоцитів та мононуклеарних клітин (макрофагів). Наявність ІФО в структурі полімерного імплантаційного матеріалу, ймовірно, впливала на проліферацію клітинних елементів

та заважала нормальному протіканню процесу запалення в зоні розміщення імплантату, в результаті чого відбувалося інгібування регенераторних процесів на ранніх термінах дослідження та затримка формування зрілої СТК навколо імплантованих зразків ПУ+ІЦК+ІФО.

3. Методом культури тканин показано, що при внесенні екстракту зі зразка ПУ+ІЦК+ІФО в середовище культивування, спостерігалася велика варіабельність клітинних форм. Це могло свідчити про вплив ІФО на клітинні елементи сполучної тканини, що призводило до появи макрофагоподібних елементів.

4. Проведені біологічні дослідження методами *in vivo* та *in vitro* дозволили оцінити дію впливу іммобілізованого на ізоціануратвмісних ПУ ІФО на клітинні реакції оточуючих тканин при імплантації в організм експериментальних тварин, а також на ріст культивованих клітин фібробластів щурів.

Перспективи подальших розробок

Проведення подальших медико-біологічних досліджень, направлених на визначення можливості застосування розроблених полімерних композиційних матеріалів з ІФО в медичній практиці.

Інформація про конфлікт інтересів

Потенційних чи явних конфліктів інтересів на момент публікації не існує та не передбачається.

Літературні джерела References

1. Galatenko NA, Malanchuk VO, Rozhnova RA, Astapenko OO, Rudenchik TV. [Biologichno aktivni poliuretanovi kompoziciji dlya endoprotezuвання kistkovoyi tkanini]. Kyiv: Naukova dumka; 2020. 232 p. Ukrainian.
2. Volova TG, Shishaczkaya EI. [Razrushayemy'e biopolimery: poluchenie, svojstva, primeneniye]. Krasnoyarsk: Krasnoyarskiy pisatel'; 2011. 390 s. Russian.
3. Shtil'man MI. [Polimery medikobiologicheskogo naznacheniya]. Moskva: Akademkniga; 2006. 400 s. Russian.
4. Wenshou W, Chun W. Polyurethane for biomedical applications: A review of recent developments. Woodhead Publishing Reviews: Mechanical Engineering Series; 2012. 115-151. <https://doi.org/10.1533/9781908818188.115>
5. Stuart L. Cooper Jianjun Guan. Advances in Polyurethane Biomaterials. 1st Edition; 2016. 718 p.
6. Gladir II, Kozlova GA, Narazhajko LF, Galatenko NA. [Rozrobka ta doslidzhennya polimernikh kompozicijnikh materialiv medichnogo priznachennya z ifosfamidom na osnovi poliuretaniv z izocianuratnimi fragmentami]. Polimernij zhurnal. 2020. 42 (2): 125-135. Ukrainian.
7. Bezuglyj PA, Bolotov VV, Griczenko IS, authors; VP Chernykh, editor. [Ot substanczii k lekarstvu: Uchebnoe posobie]. Kharkov: Zolotyestranicy; 2005. 1244 p. Russian.
8. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. Council of Europe, Strasbourg; 1986. 53 p.
9. Sarkisov DS, Petrova YuL. [Mikroskopicheskaya tekhnika]. Moskva: Meditsina. 1996. 542 p. Russian.
10. Bagrij MM, Dibrova VA, Popadinecz OG, Grishhuk MI, authors; Bagriya MM, Dibrovi VA, editor. [Metodiki morfologichnikh doslidzhen: monografiya]. Vinniczya: Nova Kniga; 2016. 328 p. Ukrainian.
11. Serov VV, Shekhter AB. [Soeditelnaya tkan (funkcionalnaya morfologiya i obshhaya patologiya)]. Moskva: Meditsina; 1981. 312 p. Russian.
12. Yaczenko VP, Galatenko NA, Pkhakadze GA. [Metod kil'kisnogo doslidzhennya rostu fibroblastichnikh klitin u kulturi' tkanini]. Czitologiya i genetika. 1984; 4: 280-284. Ukrainian.

Галатенко Н.А., Кулеш Д.В., Рожнова Р.А., Гриценко В.П., Наражайко Л.Ф. Оцінка біосумісності ізоціануратвмісних поліуретанів з іфосфамідом методами *in vivo* та *in vitro*.

РЕФЕРАТ. Актуальність. Створення полімерних композиційних матеріалів з вираженою біологічною активністю, що здатні виступати як імплантати з місцевою пролонгованою дією іммобілізованої речовини можуть знайти широке застосування у медичній практиці. **Мета.** Вивчення клітинних реакцій оточуючих тканин експериментальних тварин на імплантацію полімерних композиційних матеріалів на основі ізоціануратвмісних поліуретанів з іфосфамідом, дослідження гістотоксичності отриманих матеріалів методом культури тканин. **Методи.** Матеріали імплантували в організм білих лабораторних щурів лінії Wistar. Клітинні реакції організму і можливі зміни структури випробних зразків після імплантації вивчали методом світлової мікроскопії шляхом аналізу гістологічних мікропрепаратів. З метою вивчення особливостей динаміки росту та розвитку фібробластичних елементів був застосований метод культури тканин. **Результати.** Проведені біологічні дослідження методами *in vivo* та *in vitro* дозволили оцінити дію впливу іммобілізованого іфосфаміду в структурі ізоціануратвмісних поліуретанів на клітинні реакції оточуючих тканин при імплантації в організм експериментальних тварин, а також вплив екстрактів з розроблених полімерних зразків на ріст культивованих клітин фібробластів щурів. **Висновки.** Встановлено, що імплантація ізоціануратвмісних поліуретанів з іфосфамідом призводила до розвитку інтенсивних клітинних реакцій в зоні розміщення імплантатів, насамперед реакції круглоклітинних елементів. Наявність іфосфаміду, ймовірно, впливала на проліферацію клітинних елементів, відбувалося інгібування регенераторних процесів на ранніх термінах дослідження та затримка формування зрілої сполучнотканинної капсули навколо імплантованих зразків. Методом культури тканин показано, що при внесенні екстракту з ізоціануратвмісних поліуретанів з іфосфамідом в середовище культивування, спостерігалася велика варіабельність клітинних форм, що призводило до появи макрофагоподібних елементів.

Ключові слова: імплантація, поліуретан, іфосфамід, біосумісність, гістологічне дослідження, метод культури тканин.

Галатенко Н.А., Кулеш Д.В., Рожнова Р.А., Гриценко В.П., Наражайко Л.Ф. Оценка биосовместимости изоциануратсодержащих полиуретанов с ифосфамидом методами *in vivo* и *in vitro*.

РЕФЕРАТ. Актуальность. Создание полимерных композиционных материалов с выраженной биологической активностью, способных выступать в качестве имплантатов с местными пролонгированным действием иммобилизованного вещества, и которые могут найти широкое применение в медицинской практике. **Цель.** Изучение клеточных реакций окружающих тканей экспериментальных животных на имплантацию полимерных композиционных материалов на основе изоциануратсодержащих полиуретанов с ифосфамидом, исследование гистотоксичности полученных материалов методом культуры тканей. **Методы.** Материалы имплантировали в организм белых лабораторных крыс линии Wistar. Клеточные реакции организма и возможные изменения структуры испытательных образцов после имплантации изучали методом световой микроскопии путем анализа гистологических микропрепаратив. С целью изучения особенностей динамики роста и развития фибробластических элементов был применен метод культуры тканей. **Результаты.** Проведенные биологические исследования методами *in vivo* и *in vitro* позволили оценить действие влияния иммобилизованного ифосфамида в структуре изоциануратсодержащих полиуретанов на клеточные реакции окружающих тканей при имплантации в организм экспериментальных животных, а также влияние экстрактов из разработанных полимерных образцов на рост культивируемых клеток фибробластов крыс. **Выводы.** Установлено, что имплантация изоциануратсодержащих полиуретанов с ифосфамидом приводила к развитию интенсивных клеточных реакций в зоне размещения имплантатов, прежде всего реакции круглоклеточных элементов. Наличие ифосфамида, вероятно, влияло на пролиферацию клеточных элементов, происходило ингибирование регенераторных процессов на ранних сроках исследования и задержка формирования зрелой соединительнотканной капсулы вокруг имплантированных образцов. Методом культуры тканей показано, что при внесении экстракта изоциануратсодержащих полиуретанов с ифосфамидом в среду культивирования, наблюдалась большая вариабельность клеточных форм, что приводило к появлению макрофагоподобных элементов.

Ключевые слова: имплантация, полиуретан, ифосфамид, биосовместимость, гистологическое исследование, метод культуры тканей.