

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

Інститут хімії високомолекулярних сполук НАН України,
Київ, Україна





Надійшла: 12.04.2021

Прийнята: 27.05.2021

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2021.2.16-24>

УДК 678.664, 57.084.1, 57.085.1

ВПЛИВ ПРОЛОНГОВАНОЇ ФОРМИ ЛІЗОЦИМУ У СКЛАДІ ПОЛІУРЕТА- НОВОГО ІМПЛАНТАТУ НА КЛІТИНИ ТА ТКАНИНИ *IN VITRO* ТА *IN VIVO*

Galatenko N.A. , Kuliesh D.V.  ✉, Gritsenko V.P. , Narazhayko L.F.  Influence of the prolonged form of lysocyme in the composition of polyurethane implant on cells and tissues *in vitro* and *in vivo*. Institute of Chemistry of Macromolecular Compounds of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine.


ABSTRACT. Background. The development of biocompatible polymeric implant materials and providing them with biological activity is an urgent task that can significantly increase the effectiveness of such materials when used in medical practice. **Objective.** Investigation of the interaction of connective tissue culture matrix cells with a prolonged form of the proteolytic enzyme lysozyme as part of a polyurethane implant *in vitro* and study of the effect of this form on cells and tissues during implantation in experimental animals *in vivo*. **Methods.** In order to study the possible cytotoxicity of the components of polymer composite materials and the effect of lysozyme on the growth and development of the culture of fibroblastic elements, studies were performed by tissue culture *in vitro*. Polymeric composite materials based on polyurethaneurea without and with lysozyme were implanted into the body of white laboratory rats of the Wistar line. Cellular responses of the body after implantation were studied by light microscopy by analysis of histological micropreparations. **Results.** Biological studies have assessed the effect of prolonged lysozyme on cells and tissues *in vitro* and *in vivo*. **Conclusion.** The fibroblast tissue culture method showed the effectiveness of biologically active polyurethaneureas with prolonged release of lysozyme, which was expressed in the prolongation of the dynamics of growth and development of cellular elements *in vitro*. It has been shown that lysozyme in the composition of polymer composite materials had a biological effect and helped to reduce the cellular response to the implantation of polymer samples, accelerating the formation of connective tissue capsules around the implants.


Key words: implantation, polyurethaneurea, lysozyme, biocompatibility, histological examination, tissue culture method.


Citation:


Galatenko NA, Kuliesh DV, Gritsenko VP, Narazhayko LF. [Influence of the prolonged form of lysocyme in the composition of polyurethane implant on cells and tissues *in vitro* and *in vivo*]. Morphologia. 2021;15(2):16-24. Ukrainian.

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2021.2.16-24>

 Galatenko N.A. 0000-0002-5961-5750

 Kuliesh D.V. 0000-0002-0484-7853

 Gritsenko V.P. 0000-0002-6001-5365

 Narazhayko L.F. 0000-0001-7031-9998

✉ d_kulesh@ukr.net

© Dnipro State Medical University, «Morphologia»

Вступ

На теперішній час широкого застосування в медичній практиці знаходять імплантаційні матеріали на основі різних класів полімерів [1-3], до яких висувається ряд вимог. Серед основних

вимог до таких матеріалів можна виділити – біосумісність, нетоксичність, визначені фізико-механічні та хімічні властивості, здатність/стійкість до біодеградації тощо.

При цьому проблема безпечної взаємодії

полімерних імплантативних матеріалів з тканинами живого організму в залежності від області їх застосування є недостатньо вирішеною та нерідко призводить до небажаних клітинних реакцій, до розвитку гострих запальних процесів та відторгнення таких матеріалів. Тому, останнім часом, актуальним напрямком досліджень є розробка біосумісних полімерних імплантативних матеріалів та надання їм біологічної активності за рахунок фізичної або хімічної іммобілізації біологічно активних речовин на полімерних матрицях, що дозволяє збільшити стійкість до інфікування патогенними мікроорганізмами, зменшити реактивні запальні процеси на початкових етапах після імплантації, досягти місцевої пролонгованої дії іммобілізованих сполук та, в кінцевому підсумку, привести до підвищення ефективності таких матеріалів [2, 4].

Поліуретансечовини (ПУС) за даними багатьох авторів використовуються при створенні медичних виробів [5-7] та є біосумісними матеріалами, що володіють високими фізико-механічними властивостями, проявляють стабільність до біодеградації [8, 9].

В роботі [8] було синтезовано та досліджено біодеградацію ПУС, які містять у своїй структурі фрагменти кополімеру ПВБ за різного співвідношення подовжувача ланцюга та кополімеру з лізоцимом в кількості 1 мас. %. В умовах *in vitro* показано, що біодеградація досліджуваних матеріалів при їх експозиції в модельному біологічному середовищі 199 (БС 199) супроводжувалася структуруванням полімерної матриці за рахунок руйнування та перерозподілу міжмолекулярних водневих зв'язків з утворенням більш досконалої сітки фізичних взаємодій. Авторами було встановлено, що розроблені композиційні матеріали здатні до пролонгованого вивільнення антибактеріального препарату лізоциму шляхом варіювання співвідношень вихідних складових при синтезі полімерної основи, що підтверджує перспективність застосування розроблених композиційних матеріалів в медичній практиці, а саме в хірургії – для лікування ран та опіків. Пролонговане вивільнення лізоциму зі структури полімерної матриці має приводити до місцевої біологічної дії, що сприятиме розчиненню гнійно-некротичних мас гострого запального процесу.

Так як літературних даних по вивченню біосумісності пролонгованої форми лізоциму не існує, то метою даної роботи було дослідження взаємодії клітин матриксу тканинної культури сполучної тканини з пролонгованою формою протеолітичного ферменту лізоциму у складі поліуретанового імплантату в умовах *in vitro* та вивчення впливу такої форми на клітини та тканини при імплантації в організм експериментальних тварин в умовах *in vivo*.

Матеріали та методи

Об'єктами досліджень були: 1) зразки ПУС з фрагментами кополімеру полі(вінілбутирало, вінілацетату з вініловим спиртом) (ПВБ) та 2) зразки ПУС+ПВБ з 1 мас. % лізоцимом.

Дослідження композиційних матеріалів методом культури тканин.

З метою дослідження можливої цитотоксичності компонентів композиційних матеріалів та впливу лізоциму на ріст та розвиток культури фібробластичних елементів були проведені дослідження методом культури тканин в умовах *in vitro*.

Тканинна культура підшкірно-жирової клітковини білих щурів має великі переваги при вивченні взаємодії полімерних біологічно активних імплантатів, так як при будь-якому виді імплантації (внутрішньочеревна, внутрішньом'язова) організм реагує через систему сполучної тканини, яка володіє схожістю метаболічних процесів з тканинною культурою фібробластів. 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* [10]. 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 [11]. Як модельне середовище використовували БС 199 для культури тканин. Після експлантації зразків клітковини на 3 добу культивування у флаконах Карреля проводили заміну рідкої фази (живильного середовища) екстрактами з випробних матеріалів: ПУС+ПВБ та ПУС+ПВБ з лізоцимом, які 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.

На 5, 7, 10, 14 та 21 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.

Імплантативний тест та гістологічні дослідження.

З метою вивчення клітинних реакцій на ім-

плантацію біологічно активних композиційних матеріалів та оцінки біосумісності полімерних матеріалів на основі ПУС+ПВБ та ПУС+ПВБ з лізоцимом була проведена їх імплантація в організм 24 експериментальних тварин – лабораторних щурів, вагою 200-250 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 [13] та у відповідності до закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» №3447-IV від 21.02.2006 р.

Модельні операції виконувалися в асептичних умовах. 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, та 30 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 [14, 15]. 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, мікрофото зйомка проводилася за допомогою фотоапарату Canon PowerShot A640 з адаптером Soligor Adapter Tube for Canon A610/A620 52 mm Tele.

Результати та їх обговорення

*Вивчення проліферативної активності культури фібробластів при внесенні екстракту з композиційних матеріалів на основі ПУС+ПВБ та ПУС+ПВБ з лізоцимом в умовах *in vitro**

На 5 добу культивування при дослідженні екстрактів зі зразка ПУС+ПВБ форма клітин варіювала від веретеноподібної до полігональної. Більшість клітин мали полігональну форму з численними відростками (рис. 1). Спостерігалися багаточисельні клітини, що розташовувалися поодинокі.

На 7 добу культивування у флаконах Карреля з екстрактом зі зразка ПУС+ПВБ навколо експлантатів формувалися 3 зони росту: компактна, що складалася з клітин веретеноподібної і полігональної форми, за якою формувалися пучки і тяжі, що розташовуються сіткоподібно та зона одиничних мігруючих елементів. Зустрічалися окремі клітини округлої форми та багато клітин неправильної полігональної форми у вигляді тяжів (рис. 2).

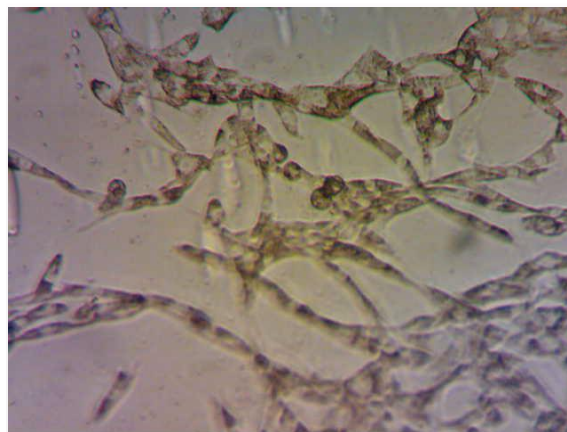


Рис. 1. Сіткоподібна зона росту клітинних елементів на 5 добу культивування при дослідженні екстракту зі зразка ПУС+ПВБ. $\times 160$.

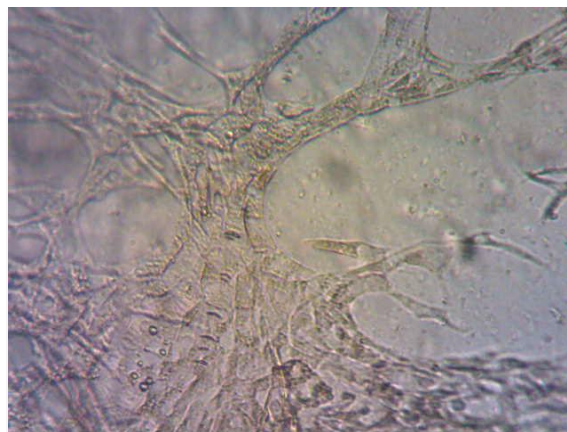


Рис. 2. Компактна та сіткоподібна зони росту клітинних елементів на 7 добу культивування при дослідженні екстракту зі зразка ПУС+ПВБ. $\times 160$.

Слід зазначити, що у флаконах Карреля після внесення екстракту зі зразка ПУС+ПВБ на 10 добу культивування відбувалася дегенерація клітинних елементів в компактній та сіткоподібній зонах, де спостерігалася роз'єднання клітин, втрата ними міжклітинних містків, вакуолізація та зернисте переродження цитоплазми. Зустрічалися поодинокі клітини полігональної форми (рис. 3). При цьому площі зон росту клітинних елементів були незначними.

На 14 добу дослідження після внесення в середовище культивування екстракту зі зразка

ПУС+ПВБ клітинна популяція вступала у фазу вираженої дегенерації, що виявлялося в значній вакуолізації цитоплазми та зернистому переродженні її в клітинах (рис. 4).

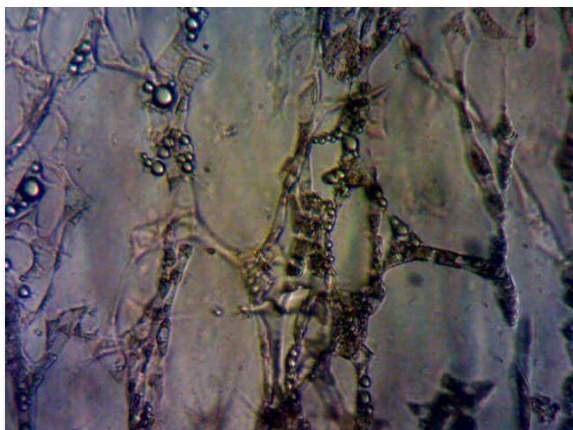


Рис. 3. Дегенеративні зміни фібробластів в сіткоподібній зоні росту на 10 добу культивування при дослідженні екстракту зі зразка ПУС+ПВБ.. ×160.

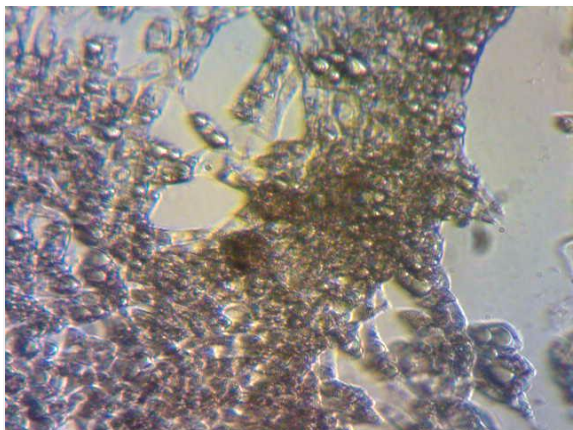


Рис. 4. Дегенеративні зміни в культурі фібробластів на 14 добу культивування при дослідженні екстракту зі зразка ПУС+ПВБ. ×160.

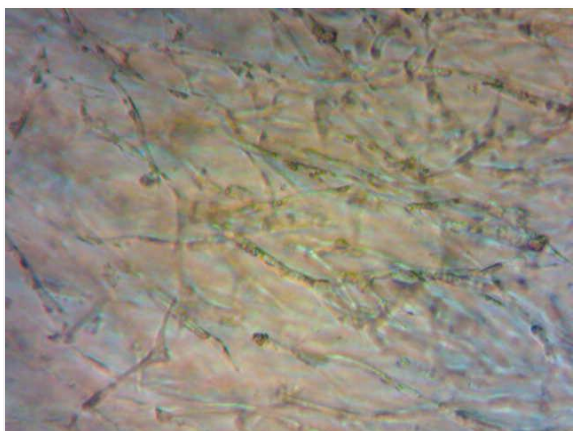


Рис. 5. Сіткоподібна зона росту клітинних елементів на 5 добу культивування при дослідженні екстракту зі зразка ПУС+ПВБ з лізоцимом. ×160.

Динаміка росту та розвитку клітинних елементів при внесенні екстракту з дослідного зразка ПУС+ПВБ з лізоцимом у флакони Карреля значно відрізнялася від динаміки у флаконах з екстрактом зі зразка ПУС+ПВБ.

На 5 добу спостерігалось формування великої за площами сіткоподібної зони та зони мігруючих елементів. Фібробласти були переважно витягнутої форми (рис. 5), але зустрічалися також клітини округлої та полігональної форми.

При внесенні екстракту зі зразка ПУС+ПВБ з лізоцимом на 7 добу дослідження у флаконах Карреля спостерігалось формування компактної та сіткоподібної зон росту. Характерним для даного терміну дослідження був так званий тканинноподібний ріст (рис. 6). Третя зона одиничних мігруючих клітин була більша, ніж у флаконах з екстрактом зі зразка ПУС+ПВБ, та відрізнялася різноманітністю клітинних форм.

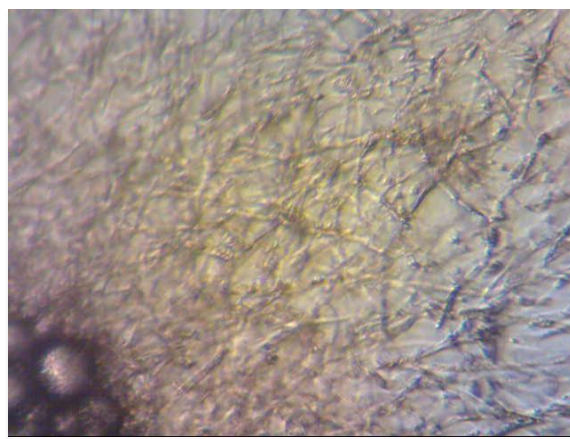


Рис. 6. Тканинноподібний ріст фібробластичних елементів на 7 добу культивування при дослідженні екстракту зі зразка ПУС+ПВБ з лізоцимом. ×160.

На 14 добу після експлантації у флаконах Карреля з екстрактом зі зразка ПУС+ПВБ з лізоцимом збільшувалися площі зон росту клітин. Вони були значно ширше в порівнянні з площиною росту при внесенні в культуральне середовище екстракту зі зразка ПУС+ПВБ. Також навколо експлантатів спостерігався тканинноподібний ріст. Щільність фібробластичних елементів залишалася більш вираженою в зоні компактного розташування клітин та на периферії у вигляді невеликих скупчень. В компактній зоні з'являлися ознаки дегенеративних змін клітинних елементів (рис. 7).

У флаконах з екстрактом зі зразка ПУС+ПВБ з лізоцимом на 14 добу культивування кількість клітин, що дегенерують, також продовжувала збільшуватися. Але незважаючи на дегенерацію культури, у зоні мігруючих фібробластів були присутні нові веретеноподібні та полігональні клітини (рис. 8).

Після 21 доби культивування у флаконах з екстрактом зі зразка ПУС+ПВБ з лізоцимом спостерігалися нові веретеноподібні та полігональні клітини (рис. 9). Збільшувалася їх кількість, що свідчило про подовження фази міграції клітин.

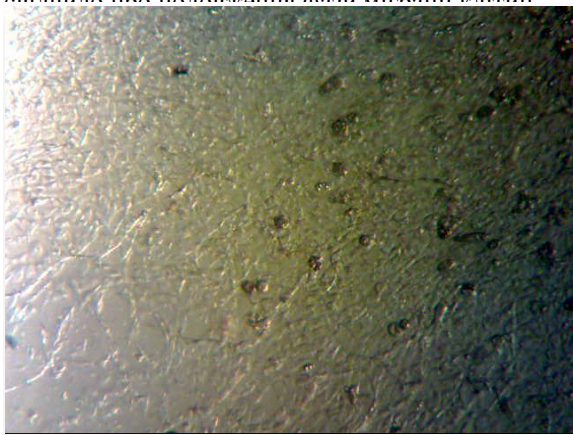


Рис. 7. Дегенеративні зміни в компактній зоні росту культури фібробластів на 10 добу культивування при дослідженні екстракту зі зразка ПУС+ПВБ з лізоцимом. $\times 160$.

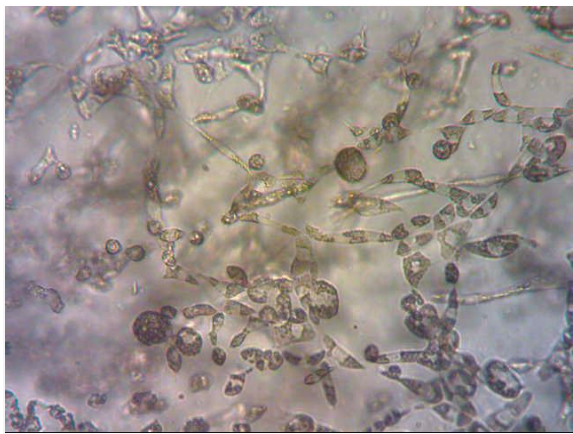


Рис. 8. Дегенеративні зміни в культурі фібробластів на 14 добу культивування при дослідженні екстракту зі зразка ПУС+ПВБ з лізоцимом. $\times 160$.

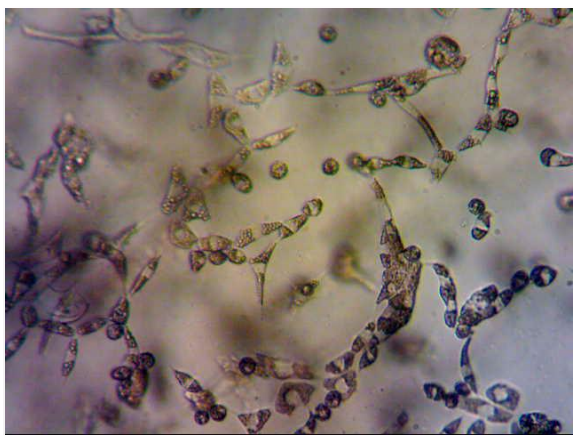


Рис. 9. Дегенеративні зміни в культурі фібробластів на 21 добу культивування при дослідженні екстракту зі зразка ПУС+ПВБ з лізоцимом. $\times 160$.

Таким чином, проведені дослідження показали, що при внесенні в культуральне середовище екстракту зі зразка ПУС+ПВБ з лізоцимом спостерігався більш активний ріст фібробластичних елементів, ніж при внесенні екстракту зі зразків ПУС+ПВБ. На 14 добу дослідження у флаконах з екстрактом зі зразка ПУС+ПВБ з лізоцимом сповільнювався процес дегенерації фібробластичних елементів, а на 21 добу спостерігалася міграція нових веретеноподібних і полігональних клітин.

Методом тканинної культури показана ефективність пролонгованої форми лізоциму, яка виражалася в подовженні часу життєздатності фібробластичних елементів до 21 доби. Це може бути свідченням впливу гідролітичного ферменту лізоциму на міжклітинний матрикс в культурі тканин з ефектом знешкодження продуктів життєдіяльності тканинної культури на всіх етапах дослідження.

Дослідження біосумісності композиційних матеріалів на основі ПУС+ПВБ та ПУС+ПВБ з лізоцимом в умовах in vivo.

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

Макроскопічно навколо імплантованих зразків на всіх термінах дослідження виявлялася сполучна тканина, яка була щільно з'єднана з поверхнею імплантованих зразків, за кольором і структурою не відрізнялася від тканин подалі від місця імплантації.

Основна увага при аналізі гістологічних мікропрепаратів зверталася на ознаки розвитку запальних явищ в зоні імплантації полімерних зразків на межі "імплантат – тканина".

На 7 добу після імплантації навколо полімерних зразків ПУС+ПВБ спостерігалася сформована, достатньо зріла сполучнотканинна капсула, клітинний склад якої відрізнявся по всій своїй протяжності. Так на одних ділянках капсула характеризувалася наявністю круглоклітинної інфільтрації, що складалася з нейтрофілів, лімфоцитів та макрофагів (рис. 10, а). Останні були представлені в незначній кількості, але іноді спостерігалися локальні скупчення макрофагів, де їх кількість помітно зростала. На інших ділянках спостерігалися більш зріла капсула, що містила веретеноподібні фібробласти, які знаходилися в товщі пучків зрілих колагенових волокон

(рис. 10, б). Кровоносні судини середнього калібру були представлені в незначній кількості, а

мікроциркуляторні процеси в них були без порушень.

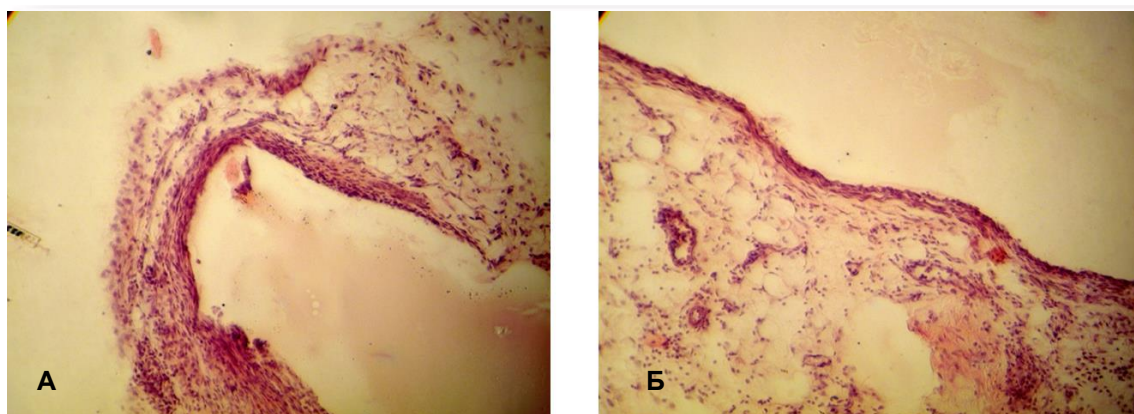


Рис. 10. Сполучнотканинна капсула навколо імпантованого зразка ПУС+ПВБ на 7 добу експерименту. Забарвлення гематоксиліном і еозином. $\times 200$.

На 7 добу після імпантації навколо полімерних зразків ПУС+ПВБ з лізоцимом спостерігалось відмежування імпантованого полімерного зразка від оточуючих тканин сполучнотканинною капсулою, як і навколо полімерних зразків без лізоциму. Клітинний склад капсули був представлений, в основному, веретеноподібними фібробластами, які знаходилися в товщі пучків колагенових волокон. На окремих ділянках спостерігалися скупчення круглоклітинних елементів, макрофагів, що, ймовірно, могло бути свідченням активації фагоцитарних процесів (рис. 11). Кровоносні судини були представлені в незначній кількості, без ознак порушень мікроциркуляції в них.

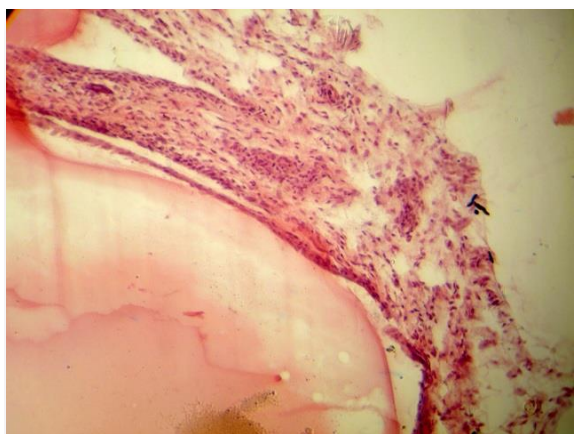


Рис. 11. Сполучнотканинна капсула навколо імпантованого зразка ПУС+ПВБ з лізоцимом на 7 добу експерименту. Забарвлення гематоксиліном і еозином. $\times 200$.

На 14 добу після операції навколо полімерних зразків ПУС+ПВБ спостерігалась сформована, місцями не зріла сполучнотканинна капсула. Основними клітинними елементами капсули за-

лишалися нейтрофіли та лімфоцити, подекуди спостерігалися залишки клітинного детриту (рис. 12, а). Кількість макрофагів збільшувалась в порівнянні з попереднім терміном дослідження, що було свідченням активних фагоцитарних процесів. На окремих ділянках капсули, як і на попередньому терміні дослідження, спостерігалися зрілі фібробласти веретеноподібної форми, що розташовувалися в товщі пучків зрілих колагенових волокон. На даному терміні дослідження спостерігалися поодинокі кровоносні судини з нормальною мікроциркуляцією. На 14 добу після операції навколо полімерних зразків ПУС+ПВБ з лізоцимом спостерігалися схожі клітинні реакції, як і навколо імпантованих полімерних зразків без лізоциму. Характерною особливістю клітинних реакцій на даному терміні дослідження було збільшення товщини сполучнотканинної капсули, що відмежовувала полімерний зразок від оточуючих тканин, в порівнянні з попереднім терміном дослідження. При цьому з'являлася яскраво виражена інфільтрація круглоклітинними елементами. Основними клітинними елементами капсули були нейтрофіли та макрофаги (рис. 12, б). На окремих ділянках капсули спостерігалися молоді форми фібробластичних елементів та веретеноподібні фібробласти, що розташовувалися між рядами пучків зрілих колагенових волокон. Кровоносні судини були представлені в незначній кількості без порушень мікроциркуляторних процесів в них.

Через 30 днів після операції навколо зразка ПУС+ПВБ спостерігалось збільшення щільності та подекуди товщини сполучнотканинної капсули за рахунок активного синтезу фібробластами колагенових волокон та інших компонентів екстрацелюлярного матриксу (рис. 13, а). Клітинний склад капсули був представлений, в основному, фібробластами веретеноподібної форми, що знаходилися в товщі пучків зрілих колагенових

волокон. Внутрішній шар капсули, що контактував з імпантованим зразком був представлений невеликою кількістю лейкоцитів, лімфоцитів. Крім того, спостерігалася незначна інфільтрація капсули та оточуючої сполучної тканини макрофагами. Кількість кровоносних судин була незначною, мікроциркуляторні процеси в судинах були непорушені. Через 30 днів після операції навколо зразка ПУС+ПВБ з лізоцимом спостерігалася тонка сполучнотканинна капсула, ступінь зрілості якої також був різний по всій її довжині. Так на одних ділянках капсули основ-

ними клітинними елементами були веретеноподібні фібробласти, що розташовувалися в товщі пучків зрілих колагенових волокон, орієнтованих вздовж імпантованих матеріалів. На інших ділянках капсули спостерігалися залишкові явища лейкоцитарної інфільтрації, малодиференційовані клітинні елементи та молоді форми фібробластів (рис. 13, б). Макрофаги були представлені у невеликій кількості, але мали високу фагоцитарну активність. Кількість кровоносних судин була невеликою, всі вони були без порушень мікроциркуляторних процесів в них.

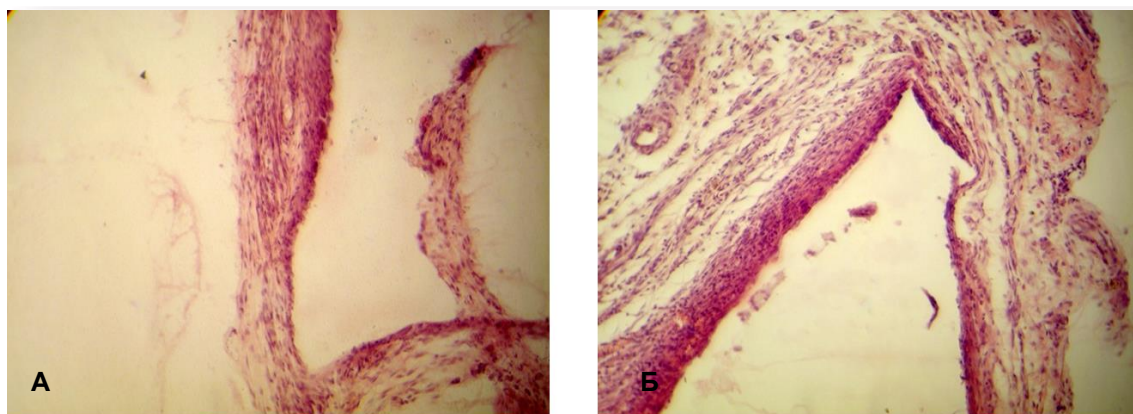


Рис. 12. Сполучнотканинні капсули навколо імпантованих зразків на 14 добу експерименту: а) ПУС+ПВБ. Забарвлення гематоксиліном і еозином. $\times 200$; б) ПУС+ПВБ з лізоцимом. Забарвлення гематоксиліном і еозином. $\times 200$.

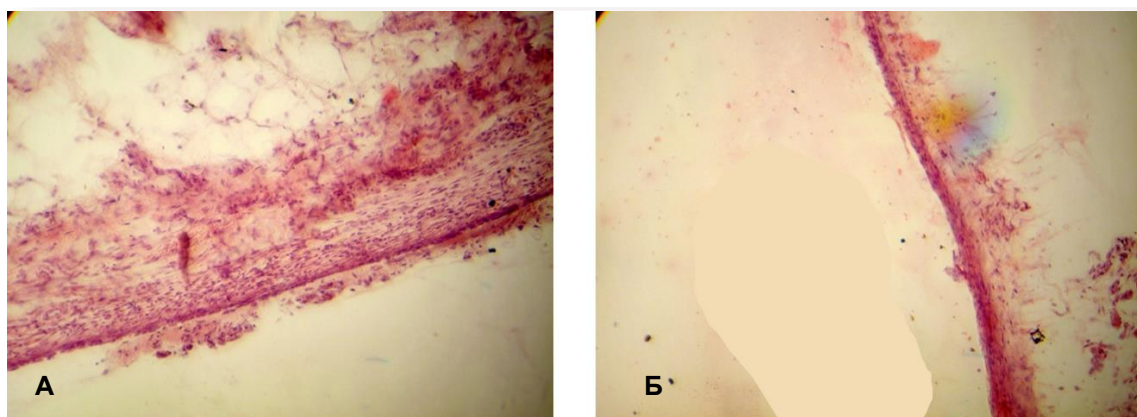


Рис. 13. Сполучнотканинні капсули навколо імпантованих зразків на 30 добу експерименту: а) ПУС+ПВБ. Забарвлення гематоксиліном і еозином. $\times 200$; б) ПУС+ПВБ з лізоцимом. Забарвлення гематоксиліном і еозином. $\times 200$.

Таким чином, проведені гістологічні дослідження показали, що вже на ранніх термінах експерименту відбувався закономірний процес перебування чужорідного тіла в живому організмі – його відмежування від оточуючих тканин за рахунок формування сполучнотканинних капсул. Ступінь зрілості сполучнотканинних капсул навколо зразків ПУС+ПВБ без та з лізоцимом був досить високим вже на 7 добу експерименту. Хоча треба відмітити, що сполучнотканинні капсули подекуди характеризувалися різним ступенем зрілості по всій довжині капсул. Так, на од-

них ділянках капсули основними клітинними елементами були молоді форми фібробластів та фібробласти з морфологічними ознаками функціонально активних форм. На інших ділянках капсули подекуди спостерігалися залишкові явища круглоклітинної інфільтрації. Характерними клітинними елементами були макрофаги, які брали активну участь у процесі фагоцитозу продуктів метаболізму клітин, а їх активність була направлена на реалізацію захисно-компенсаторних механізмів організму. На більш пізніх термінах дослідження навколо всіх імпантова-

них зразків спостерігався класичний перебіг клітинних реакцій, де характерними були проліферативні процеси за участю основних клітин сполучнотканинних капсул – фібробластів, які розташовувалися в товщі пучків зрілих колагенових волокон та активно синтезували колаген.

Висновки

1. Методом культури тканин встановлено, що при внесенні в культуральне середовище екстрактів з полімерних зразків ПУС+ПВБ з лізоцимом спостерігався більш активний ріст фібробластичних елементів, ніж при внесенні в культуру тканин екстрактів зі зразків ПУС+ПВБ. На 14 добу дослідження у флаконах з екстрактами зі зразків ПУС+ПВБ з лізоцимом спостерігалось сповільнення процесу дегенерації фібробластичних елементів, а на 21 добу спостерігалась міграція нових веретеноподібних та полігональних клітин, що свідчило про відсутність гістотоксичного впливу екстрактів зі зразків композиційних матеріалів з лізоцимом на клітини, що культивувались.

2. Метод тканинної культури фібробластів показав ефективність біологічно активних поліуретансечовин з пролонгованим вивільненням

лізоциму, що виражалось в подовженні динаміки росту та розвитку клітинних елементів *in vitro*.

3. Встановлено, що імплантація всіх дослідних зразків на основі ПУС+ПВБ в організм експериментальних тварин приводило до розвитку клітинних реакцій типових для асептичного запалення. Імпантовані полімерні зразки мали високий ступінь біосумісності та поступово біоінтегрувалися в підшкірну сполучну тканину у вигляді ареактивної інкапсуляції сполучною тканиною. Показано, що лізоцим у складі полімерних зразків ПУС+ПВБ проявляв біологічну дію та сприяв зменшенню клітинних реакцій на імплантацію полімерних зразків, прискорюючи утворення сполучнотканинних капсул навколо імплантатів.

Перспективи подальших розробок

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

Інформація про конфлікт інтересів

Потенційних або явних конфліктів інтересів, що пов'язані з цим рукописом, на момент публікації не існує та не передбачається.

Літературні джерела References

1. Treushnikov VM., Viktorova EA. Principles of Manufacturing Biocompatible and Biostable Polymer Implants (Review). *Sovremennye tehnologii v medicine*. 2015; 7(3): 149–171.

2. Galatenko NA, Malanchuk VO, Rozhnova RA, Astapenko OO, Rudenchik TV. [Biologichno aktivni poliuretanovi kompoziciji dlya endoprotezuvannya kistkovoyi tkanini]. Kyiv: Naukova dumka; 2020. 232 s. Ukrainian.

3. Shtil'man MI. [Polimery mediko-biologicheskogo naznacheniya]. Moskva: IKC, Akademkniga; 2006. 400 s. Russian.

4. Galatenko NA, Rozhnova RA. [Biologicheski aktivnye polimernye materialy dlya medicyny]. Kyiv: Naukova dumka; 2013. 208 s. Russian.

5. Raygorodskiy IM, Kolganova IV, Kirilin AD, Kopylov VM, Matyushin GA. [Gazodiffuzionnyye membrannyye materialy dlya oksigenatsii krovi i «iskusstvennoy kozhi». Kriticheskiye tekhnologii. Membrany]. 2002;14:18-28. Russian.

6. Zdrachala R, Strand M. Fluorinated polyurethanes and medical devices therefrom. 325476; appl. 20.03.89; publ. 19.06.1990. Pat. 4935480 USA.

7. Takakura T, Kato M, Yamabe M. Synthesis and characterization of fluorinecontaining segmented poly(urethane-urea)s. *Macromolecular Chemistry*. 1990;3(191):625-32.

8. Stashenko KV, Visloguzova TV, Galatenko NA, Rozhnova RA. [Rozrobka kompozicijnih materialiv na osnovi poliuretansechovin z fragmentami kopolimeru poli(vinilbutiralyu, vinilacetatu ta vinilovogo spirtu) ta lizocimu]. *Polimernij zhurnal*. 2020; 2:126-136. Ukrainian.

9. Stashenko KV, Rudenchik TV, Galatenko NA, Rozhnova RA. [Sintez i vlastivosti kompozicijnih materialiv na osnovi poliuretansechovin z fragmentami kopolimeru polivinilbutiralyu (vinilacetatu z vinilovim spirtom) ta lizocimom]. *Voprosy himii i himicheskoy tekhnologii*. 2020; 1: 71-79. Ukrainian.

10. Serov VV, Shekhter AB. [Soedinitelnaya tkan (funkcionalnaya morfologiya i obshhaya patologiya)]. Moskva: Meditsina; 1981. 312 p. Russian.

11. Lebedev CV, Konstantinov YUB, Galatenko NA. [Toksikologo-gigienichni ta doklinichni doslidzhennya polimernih materialiv i virobiv na ih osnovi medichnogo priznachennya: metod. vkazivki]. Kyiv: Naukova dumka; 2009. 99 s. Ukrainian.

12. Yaczenko VP, Galatenko NA, Pkhakadze GA. [Metod kil'kisnogo doslidzhennya rostu fibroblastichnikh klitin u kulturі tkanini]. *Czitologiya i genetika*. 1984; 4: 280–284. Ukrainian.

13. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. Council of Europe, Strasbourg;

1986. 53 p.

14. Sarkisov DS, Petrova YuL. [Mikroskopicheskaya tekhnika]. Moskva: Meditsina; 1996. 542 p. Russian.

15. Bagrij MM, Dibrova VA, Popadinecz OG,

Grishhuk MI, authors; Bagriya MM, Dibrovi VA, editor. [Metodiki morfologichnikh doslidzhen: monografiya]. Vinnicya: Nova Kniga; 2016. 328 p. Ukrainian.

Галатенко Н.А., Кулеш Д.В., Гриценко В.П., Наражайко Л.Ф. Вплив пролонгованої форми лізоциму у складі поліуретанового імплантату на клітини та тканини *in vitro* та *in vivo*.

РЕФЕРАТ. Актуальність. Розробка біосумісних полімерних імплантаційних матеріалів та надання їм біологічної активності є актуальною задачею, що здатна значно підвищити ефективність таких матеріалів при застосуванні у медичній практиці. **Мета.** Дослідження взаємодії клітин матриксу тканинної культури сполучної тканини з пролонгованою формою протеолітичного ферменту лізоциму у складі поліуретанового імплантату в умовах *in vitro* та вивчення впливу такої форми на клітини та тканини при імплантації в організм експериментальних тварин в умовах *in vivo*. **Методи.** З метою дослідження можливої цитотоксичності компонентів полімерних композиційних матеріалів та впливу лізоциму на ріст та розвиток культури фібробластичних елементів були проведені дослідження методом культури тканин *in vitro*. Полімерні композиційні матеріали на основі поліуретансечовини без та з лізоцимом імплантували в організм білих лабораторних щурів лінії Wistar. Клітинні реакції організму після імплантації вивчали методом світлової мікроскопії шляхом аналізу гістологічних мікропрепаратів. **Результати.** Проведені біологічні дослідження дозволили оцінити вплив пролонгованої форми лізоциму на клітини та тканини *in vitro* та *in vivo*. **Підсумок.** Метод тканинної культури фібробластів показав ефективність біологічно активних поліуретансечовин з пролонгованим вивільненням лізоциму, що виражалося в подовженні динаміки росту та розвитку клітинних елементів *in vitro*. Показано, що лізоцим у складі полімерних композиційних матеріалів проявляв біологічну дію та сприяв зменшенню клітинних реакцій на імплантацію полімерних зразків, прискорюючи утворення сполучнотканинних капсул навколо імплантатів.

Ключові слова: імплантація, поліуретансечовина, лізоцим, біосумісність, гістологічне дослідження, метод культури тканин.

Галатенко Н.А., Кулеш Д.В., Гриценко В.П., Наражайко Л.Ф. Влияние пролонгированная форма лизоцима в составе полиуретановых имплантатов на клетки и ткани *in vitro* и *in vivo*.

РЕФЕРАТ. Актуальность. Разработка биосовместимых полимерных имплантационных материалов и придание им биологической активности является актуальной задачей, которая способна значительно повысить эффективность таких материалов при применении в медицинской практике. **Цель.** Исследование взаимодействия клеток матрикса тканевой культуры соединительной ткани с пролонгированной формой протеолитического фермента лизоцима в составе полиуретанового имплантата в условиях *in vitro* и изучения влияния такой формы на клетки и ткани при имплантации в организм экспериментальных животных в условиях *in vivo*. **Методы.** С целью исследования возможной цитотоксичности компонентов полимерных композиционных материалов и влияния лизоцима на рост и развитие культуры фибробластических элементов были проведены исследования методом культуры тканей *in vitro*. Полимерные композиционные материалы на основе полиуретанмочевины без и с лизоцимом имплантировали в организм белых лабораторных крыс линии Wistar. Клеточные реакции организма после имплантации изучали методом световой микроскопии путем анализа гистологических микропрепаратів. **Результаты.** Проведенные биологические исследования позволили оценить влияние пролонгированной формы лизоцима на клетки и ткани *in vitro* и *in vivo*. **Заключение.** Метод тканевой культуры фибробластов показал эффективность биологически активных полиуретанмочевин с пролонгированным высвобождением лизоцима, что выражалось в удлинении динамики роста и развития клеточных элементов *in vitro*. Показано, что лизоцим в составе полимерных композиционных материалов проявлял биологическое действие и способствовал уменьшению клеточных реакции на имплантацию полимерных образцов, ускоряя образование соединительнотканых капсул вокруг имплантатов.

Ключевые слова: имплантация, полиуретанмочевина, лизоцим, биосовместимость, гистологическое исследование, метод культуры тканей.