

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

Інститут хімії високомолекулярних сполук НАН України  
Київ, Україна







Надійшла: 14.04.2024

Прийнята: 25.05.2024

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2024.2.44-54>

УДК 57.089.67, 616-089.843, 678.664

## ВИВЧЕННЯ ЦИТОТОКСИЧНОСТІ ТА БІОСУМІСНОСТІ ІЗОЦІАНУРАТВМІСНИХ ПІНОПОЛІУРЕТАНСЕЧОВИН НАПОВНЕНИХ ДАКАРБАЗИНОМ ДЛЯ ЗАСТОСУВАННЯ В МЕДИЦИНІ

Kuliesh D.V.  ✉, Rozhnova R.A. , Denisenko V.D. , Hrytsenko V.P. , Narazhaiko L.F. , Galatenko N.A.  Study of cytotoxicity and biocompatibility of isocyanurat-containing polyurethane foam filled with dacarbazine for application in medicine.

Institute of macromolecular chemistry of NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine.

**ABSTRACT. Background.** The development of new and modification of existing polymer materials in order to obtain implants with improved functional capabilities that can perform the function of carriers of biologically active substances and drugs is an urgent task. **Objective.** Study of the biocompatibility of isocyanurate-containing polyurethane foam filled with dacarbazine by medical and biological methods. **Methods.** The study of cytotoxicity and biocompatibility of isocyanurate-containing polyurethane foams filled with dacarbazine was carried out using the rat fibroblast culture method *in vitro* and using the implantation test *in vivo*. **Results.** According to the results of research conducted using the rat fibroblast culture method, it was established that the culture of fibroblasts, both in the control and in the study of composite materials with different percentages of dacarbazine, was in the stage of stable growth, which indicated the absence of a cytotoxic effect of the experimental samples on the cultured cells. Using the implantation test, biocompatibility and the development of cellular reactions to the implantation of composite materials based on isocyanurate-containing polyurethane foam with dacarbazine in the body of experimental animals were studied. It was shown that the cellular reactions of the tissues of experimental animals to the implantation of test samples of isocyanurate-containing polyurethane foams of various compositions were typical for the reaction of a living organism to the presence of a foreign body during subcutaneous implantation and did not lead to pathological processes in the surrounding tissues, and the porous structure promoted the migration of cellular elements into the deeply implanted samples. **Conclusion.** According to the results of medical and biological studies, it is shown that isocyanurate-containing polyurethane foams with dacarbazine do not have a pronounced cytotoxic effect, are biocompatible and promising materials for use in medicine and are recommended for further tests, including clinical ones.

**Key words:** isocyanurate-containing polyurethane foam, dacarbazine, culture of rat fibroblasts, implantation, biocompatibility.

### Citation:

Kuliesh DV, Rozhnova RA, Denisenko VD, Hrytsenko VP, Narazhaiko LF, Galatenko NA. [Study of cytotoxicity and biocompatibility of isocyanurat-containing polyurethane foam filled with dacarbazine for application in medicine]. Morphologia. 2024;18(2):44-54. Ukrainian.

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2024.2.44-54>

 Kuliesh D.V. 0000-0002-0484-7853;  Rozhnova R.A. 0000-0003-3284-3435;

 Denisenko V.D. 0000-0003-3675-769X;  Hrytsenko V.P. 0000-0002-6001-5365;

 Narazhaiko L.F. 0000-0001-7031-9998;  Galatenko N.A. 0000-0002-5961-5750

✉ [d\\_kulesh@ukr.net](mailto:d_kulesh@ukr.net)

© Dnipro State Medical University, «Morphologia»

### Вступ

На сьогоднішній день в Україні проводиться велика кількість офтальмологічних операцій на

окулоорбітальній ділянці через збільшення кількості травм внаслідок бойових уражень, техноген-

них катастроф, кримінальних травм, внутрішньочного раку та інших захворювань [1, 2, 3]. У разі серйозних окулоорбітальних травм та при важких онкологічних захворюваннях ока хірурги проводять видалення пошкодженого ока пацієнта, встановлюючи орбітальний імплантат в анофтальмологічній ямці з метою створення об'ємної та високо рухливої опорно-рухової кукси (ОРК) для подальшого очного протезування [4]. За останні декілька десятиліть дизайн орбітальних імплантатів і критерії вибору матеріалів, з яких вони виготовлені, прогресували від базових непористих полімерних сфер до пристроїв зі складнішими формами та функціями для забезпечення покращених довгострокових клінічних результатів [5]. Основними недоліками більшості орбітальних імплантатів є небезпека їх міграції, розвиток інфекції після хірургічного втручання та погана рухливість, перенесена на косметичний очний протез. Ефективними імплантаційними матеріалами зарекомендували себе керамічні та полімерні пористі імплантати [6], що застосовуються як пасивний каркас для фіброваскулярного вrostання. Такі імплантати мають комплекс визначених фізико-механічних показників, характеризуються високим ступенем біосумісності, що, в кінцевому результаті, приводить до якісного косметичного результату та рухливості ока.

Актуальною задачею є розробка нових та модифікація існуючих полімерних матеріалів з метою одержання імплантатів з покращеними функціональними можливостями, що можуть виконувати функцію носіїв біологічно активних речовин та лікарських препаратів [7], що дозволить досягти максимально можливої та таргетованої біологічної дії (антибактеріальної, протизапальної, цитостатичної тощо) в місці застосування імплантату.

Перспективними матеріалами в цій області досліджень можуть бути поліуретани [8] та пінополіуретансечовини (ППУС) [9-13], які завдяки своїй біосумісності та експлуатаційним характеристикам є придатними для іммобілізації протипухлинних лікарських препаратів, зокрема дакарбазину (ДАК), який відноситься до алкілюючих цитостатичних засобів триазенової структури, механізм дії яких зумовлений здатністю основного метаболіту – діазометану утворювати ковалентні алкільні зв'язки з молекулами, що містять електронні центри, як наприклад, SH-групи. Оскільки препарат є структурним аналогом пуринових основ, він діє як антиметаболіт, пригнічуючи синтез ДНК у клітинах пухлин.

Важливим та завершальним етапом розробки біологічно активних полімерних матеріалів як імплантатів є дослідження їх біосумісності з використанням медико-біологічних методів випробування, одними з яких є метод культури фібробластів щурів, що дозволяє визначити

рівень цитотоксичності композицій та метод імплантаційного тесту, що дозволяє оцінити місцеві патологічні ефекти на структуру та функції тканин експериментальних тварин, викликані матеріалом при його імплантації. За результатами медико-біологічного оцінювання можуть бути надані рекомендації щодо перспективності застосування отриманих композицій в клінічних випробуваннях та їх подальшого впровадження в медичну практику.

**Метою** даної роботи було дослідження біосумісності ізоціануратвмісних пінополіуретансечовин наповнених дакарбазинном медико-біологічними методами – методом культури фібробластів щурів в умовах *in vitro* та за допомогою імплантаційного тесту в умовах *in vivo*.

#### **Матеріали та методи**

Об'єктами дослідження були ізоціануратвмісні пінополіуретансечовинні композиції з ДАК, синтезовані на основі поліоксипропіленгліколю та 2,4,6-триізоціанат-(трисгексаметилен)ізоціанурату (Tolonate HDT-LV, ТЦУ) як описано в роботі [14]. Іммобілізацію ДАК здійснювали шляхом його розчинення в дистильованій воді з наступним веденням отриманого розчину у форполімер та інтенсивним перемішуванням. Спінювання і тужавіння отриманих композицій відбувалося в термошафі за температури 25°C. Одержані таким чином композиції являли собою еластичні дрібнопористі губки білого кольору та характеризувалися пролонгованим вивільнення лікарської речовини – ДАК з можливістю регулювання часу та кількості вивільненої лікарської речовини [14]. Вміст лікарської речовини ДАК в композиції складав 0,5 та 1 мас. %. Було проведено дослідження композиційних матеріалів такого складу: №1 – ППУС на ТЦУ; №2 – ППУС на ТЦУ + ДАК 0,5 мас. %; №3 – ППУС на ТЦУ + ДАК 1 мас. %.

**Метод культури фібробластів.** При дослідженні цитотоксичності зразків полімерних композицій з ДАК був використаний метод культури фібробластів щурів, що дає змогу оцінити цитотоксичність полімерних матеріалів медичного призначення *in vitro* [15, 16]. Метод заснований на культивуванні в стандартних умовах підшкірної клітковини білих щурів лінії Wistar, що дає в умовах культивування ріст фібробластичних елементів.

Культуру клітин фібробластів щурів одержували шляхом експлантації шматочків підшкірно-жирової клітковини, які поміщали у флакони Карреля з живильною сумішшю, що складалася з твердої та рідкої фаз. Тверда фаза: плазма крові півня, екстракт курячого ембріону (отримували в умовах лабораторного експерименту). Рідка фаза: середовище 199 (ТОВ «БІОТЕСТЛАБ», Україна), сироватка крові великої рогатої худоби (ТОВ «НДП «Ветеринарна ме-

дицина», Україна). Джерело росту фібробластичних елементів – культивована тканина (підшкірна клітковина білих щурів).

*Підготовка культур клітин для експлантації.* Вид тварин: білі щури породи Wistar будь-якої статі вагою 130-150 г. Групи експерименту: контрольна (культивовані тканини) і дослідна (на 3-ю добу культивування вносили зразки композицій з розрахунку 100 мг виробу на 1 мл рідкої фази). В кожній групі було по 3 експлантації.

*Умови експлантації.* Тварин виводили з експерименту ефірним наркозом. В стерильних умовах з задньої половини спинної частини тулуба виділяли фрагменти підшкірної клітковини розміром 1 x 1 см. Шматочки клітковини поміщали в фізіологічний розчин з доданням стрептоміцину (фарм.) з розрахунку на 10 см<sup>3</sup> розчину 25 мл препарату. Після цього промивали потрійною порцією фізіологічного розчину без антибіотику. Вихідні шматочки клітковини розділяли на окремі експлантати шириною не більше 1,0-1,5 мм. Експлантат переносили в однакові за розмірами флакони Карреля з живильною сумішшю, що складалася з плазми півня і середовища 199. На дно кожного флакона рівномірно поміщали по 4-5 експлантатів. Додавали ембріональний екстракт, приготовлений з 10 добових курячих ембріонів. Після формування твердої фази в флакони вносили суміш сироватки великої рогатої худоби і середовища 199. Співвідношення інгредієнтів в живильному середовищі складало: середовище 199 – 50%, екстракт курячих ембріонів – 10%, плазма крові півня – 20%, сироватки великої рогатої худоби – 20% (для флаконів висотою 1 см, діаметр 3,5 см). Культуру інкубували за температури 37°C, рідку фазу замінювали кожні 3 доби. На 3-тю добу спостерігали за міграцією клітинних елементів. За умов міграції клітинних елементів в дослідні проби вносили випробний зразок з розрахунку 100 мг на 1 мл рідкого середовища. На 3, 7, 10 та 14 добу проводили спостереження за ростом компактної, сіткоподібної зони і зони мігруючих фібробластичних елементів, використовуючи мікроскоп Carl Zeiss Primo Star при збільшенні  $\times 160$ . Мікрофотозйомка проводилася за допомогою фотоапарату Canon PowerShot A640 з адаптером Soligor Adapter Tube for Canon A610/A620 52 mm Tele. Критерієм для виділення цих зон був характер розташування зростаючих фібробластичних елементів.

Проводили якісний аналіз зон росту з описом характеру росту клітинних елементів. До компактної зони відносили ділянки щільного розташування клітин, що ростуть, до сіткоподібної зони – ділянки розташування клітинних тяжів, що анастомозуються і галузяться. По вершинах ізольованих клітинних тяжів, що врастають в тверду фазу живильного середовища до місця розташування ізольовано лежачих клітин визначали зону мігруючих елементів.

*Гістологічні методи дослідження.* Вивчення клітинних реакцій м'яких тканин на імплантацію розроблених композиційних матеріалів та оцінку їх біосумісності проводили за допомогою імплантаційного тесту в організмі лабораторних щурів лінії Wistar. Всі маніпуляції з експериментальними тваринами проводилися під наркозом, а також з дотриманням принципів принципів Хельсінкської декларації, прийнятої Генеральною асамблеєю Всесвітньої медичної асоціації (2000), згідно з положеннями «Європейської конвенції по захисту хребетних тварин, що використовуються в експериментах та інших навчальних цілях» [17].

Модельні операції на лабораторних тваринах виконувалися в асептичних умовах. Після обробки операційного поля полімерні зразки складу ППУС на ТЦУ без ДАК, ППУС на ТЦУ з 0,5 мас. % ДАК та ППУС на ТЦУ з 1 мас. % ДАК розміром 10x5x5 мм поміщалися субкутально в область міжлопаточного простору без додаткової фіксації, для виключення впливу шовного матеріалу на рановий процес. Така область характеризується малою рухливістю і недоступністю для самої тварини, що зводить до мінімуму ризик її втручання в експериментальний процес. Тварин виводили з експерименту на 7, 14, 30 та 90 добу після операції шляхом передозування хлороформом. Дослідний матеріал (полімерний зразок з оточуючою сполучною тканиною) фіксували в 10% розчині формаліну та заливали в парафін після проведеної гістологічної обробки за стандартною методикою [18, 19]. Парафінові зрізи, виготовлені за допомогою мікротому, товщиною 10-15 мкм, забарвлювали гематоксином і еозинном. Оцінка біосумісності імплантованих композиційних матеріалів проводилася шляхом аналізу гістологічних препаратів за допомогою світлової мікроскопії (мікроскоп Carl Zeiss Primo Star) при збільшенні  $\times 200$ ,  $\times 400$ . Мікрофотозйомка проводилася за допомогою фотоапарату Canon PowerShot A640 з адаптером Soligor Adapter Tube for Canon A610/A620 52 mm Tele. Під час експерименту вивчалися поведінкова реакція тварин, їх зовнішній стан, післяопераційне поле.

#### **Результати та їх обговорення**

*Дослідження біосумісності ізоціануратвмісних ППУС наповнених ДАК методом культури фібробластів щурів.* Для вивчення особливостей динаміки росту та розвитку фібробластичних елементів був застосований метод клітинної культури, що дає змогу швидко та точно оцінити цитотоксичну дію хімічних сполук на клітини – фібробласти щурів, що мають важливе значення у взаємодії полімерний імплантат – сполучна тканина. Відомо, що фібробласти є складовою частиною строми паренхіматозних органів і беруть активну участь у морфогенезі, диференціюванні спеціалізованих клітин і, відповідно, дозволять екстраполювати дані, отримані в культурі фібробластів на дослідження *in*

*vivo* [15, 16]. На 3 добу після експлантації в контролі, що досліджували без внесення полімерних зразків у середовище культивування, спостерігалися перші ознаки росту, які проявлялися міграцією одиничних клітин витягнутої форми, а також поодинокими мігруючими фібробластичними елементами, що мали веретеноподібну форму (рис. 1, а). На 7 добу зони росту культури розділялися на три: компактну, що складалася з клітин веретеноподібної та полігональної форми, сіткоподібну та зону одиничних мігруючих елементів.

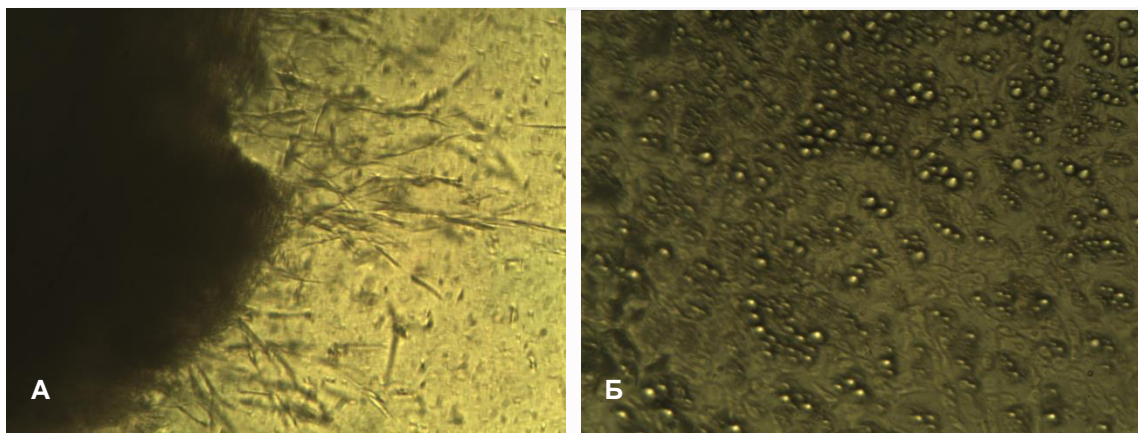


Рис. 1. Ріст культури фібробластів щурів в контролі. а) перші ознаки росту клітин на 3 добу культивування.  $\times 160$ ; б) дегенеративні процеси в клітинах на 14 добу культивування.  $\times 160$ .

На 3 добу культивування в культурі клітин фібробластів щурів, в яку вносили екстракти з полімерних зразків ППУС на ТЦУ без ДАК, спостерігалася міграція фібробластичних елементів неправильної, полігональної форми (рис. 2).

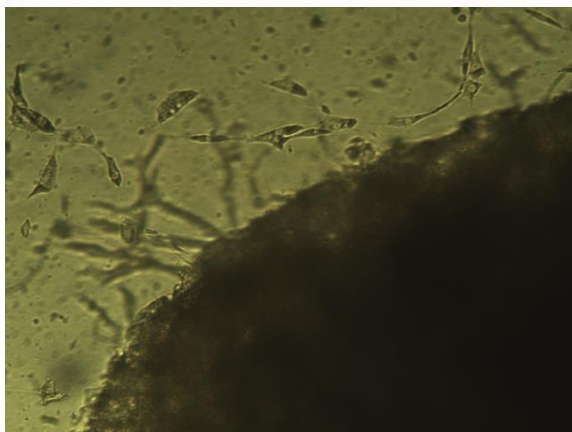


Рис. 2. Початок росту в культурі підшкірно-жирової клітковини щурів при внесенні в середовище зразка ППУС на ТЦУ без ДАК на 3 добу культивування.  $\times 160$ .

Подальше спостереження за ростом у цих флаконах не показало значних змін у швидкості росту та в структурі клітин в порівнянні з контролем.

Для полімерних зразків ППУС на ТЦУ з 0,5

Найбільша кількість клітин, що ділилися, спостерігалася в зоні одиничних мігруючих елементів. На 10 добу після експлантації відбувалося збільшення зон росту, спостерігався тканиноподібний ріст, а в компактній зоні виявлялися перші ознаки дегенеративних змін фібробластичних елементів. На 14 добу дослідження клітинна популяція клітин вступала в стадію вираженої дегенерації (рис. 1, б).

мас. % ДАК на 3 добу культивування зони росту були представлені фібробластоподібними клітинами більших розмірів неправильної форми в порівнянні з контролем (рис. 3, а). Слід відмітити наявність великої кількості ізольовано лежачих клітин полігональної форми на відстані від експланта. На 7 добу культивування в дослідних флаконах спостерігалася формування трьох зон росту: компактної, що складалася з клітин веретеноподібної та полігональної форми, сіткоподібної та зони одиничних мігруючих елементів, що мали веретеноподібну та полігональну форму. Зони росту за площею не поступалися контрольним зразкам (рис. 3, б). При цьому характерною була міграція клітинних елементів у пористу структуру полімерного зразка, де спостерігалися клітини веретеноподібної та полігональної форм.

Спостереження за культурами клітин фібробластів щурів зі зразком ППУС на ТЦУ з 1 мас. % ДАК були схожі з розвитком культури фібробластів щурів, які містили зразки ППУС на ТЦУ з 0,5 мас. % ДАК. Слід зазначити, що характерними були клітинні форми від веретеноподібних до полігональних і спостерігалася велика кількість ізольовано лежачих клітин полігональної форми на відстані від експланта, особливо в зоні одиничних мігруючих елементів (рис. 4, а). В подальшому відмічалася ущільнення клітин в зоні компактного розташування фібробластичних елементів, а зони росту відрізнялися від контролю більшим різноманіттям клітинних форм, більшість з

яких мали полігональну форму з численними відростками. Ріст полігональних клітин також був добре виражений поблизу полімеру (рис. 4, б). На 14 добу культивування клітинна популяція вступала у фазу дегенеративних змін з округленням

тіла клітин, повною втратою міжклітинних контактів, як в дослідних зразках з полімерами, так і в контрольних, що було характерно для даного терміну культивування культури.

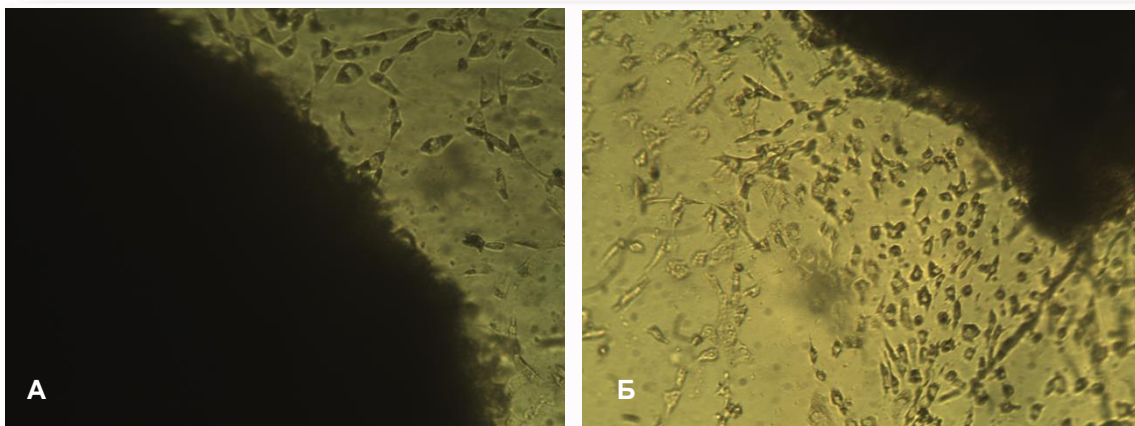


Рис. 3. Ріст культури тканин фібробластів при дослідженні полімерного зразка ППУС на ТЦУ з 0,5 мас. % ДАК. а) фібробластоподібні клітини неправильних форм на 3 добу культивування.  $\times 160$ ; б) формування зон росту клітин на 7 добу культивування.  $\times 160$ .

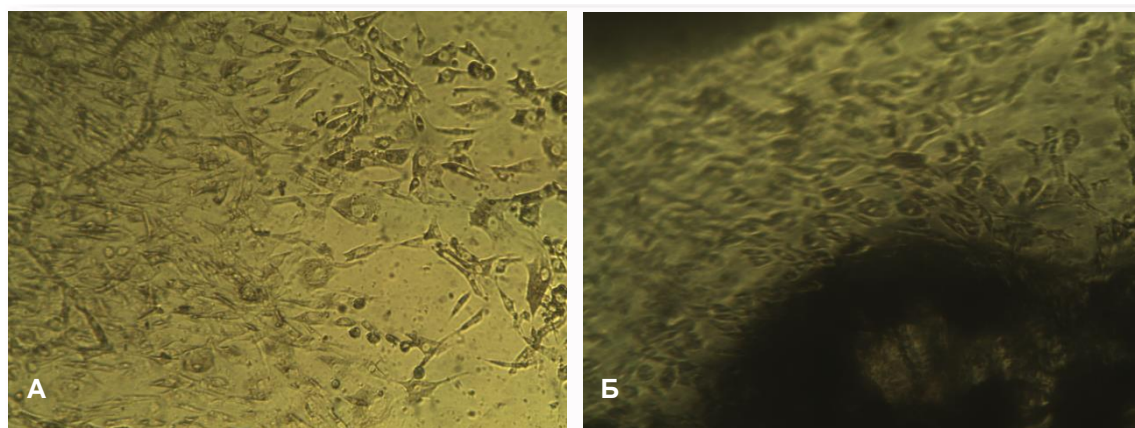


Рис. 4. Ріст культури тканин фібробластів при дослідженні полімерного зразка ППУС на ТЦУ з 1 мас. % ДАК. а) різноманітність клітинних форм на 7 добу культивування.  $\times 160$ ; б) ріст клітин полігональної форми на 10 добу культивування.  $\times 160$ .

Таким чином, проведені дослідження свідчать про те, що культура фібробластів щурів, як в контролі, так і при культивуванні полімерних зразків ППУС на ТЦУ різного складу перебувала в стадії стабільного росту, що свідчить про відсутність цитотоксичного впливу компонентів дослідних зразків на клітини, що культивувались. Однак, в зонах росту при інкубації полімерних зразків ППУС на ТЦУ з різною концентрацією ДАК спостерігалось збільшення кількості клітин полігональної неправильної форми, ніж в контрольних флаконах.

*Дослідження біосумісності ізоціануратвмісних ППУС наповнених ДАК методом імплантаційного тесту*

Щоденна візуальна оцінка реакції епітелію на операційному місці показала, що рана загоюва-

лася протягом 3 діб після операції без ознак запальної реакції. За морфологічними ознаками не було виявлено дегенеративних змін, пухлин, ні у короткочасному, ні у віддаленому післяопераційному періоді. Протягом всього часу експерименту всі імплантовані матеріали пальпувалися через шкіру тварин. Імплантація досліджуваних зразків не викликала агресії та змін у поведінці експериментальних тварин. Макроскопічно при заборі матеріалу для досліджень навколо всіх зразків спостерігалось формування сполучнотканинних капсул (СТК) без ознак вираженої запальної реакції. СТК оточували пористі імплантати, надійно фіксуючи їх в місці імплантації та унеможлилювали їх зміщення або міграцію в підшкірному просторі протягом всього терміну експерименту. В місці імплантації дослідних зразків були відсутні морфологічно видимі зміни оточуючих тканин,

некроз, ексудация, нагноєння тощо. Навколо всіх імплантованих зразків виявлялася густа сітка кровоносних судин та спостерігалось збільшення товщини та щільності окремих СТК на більш пізніх термінах дослідження.

Мікроскопічно через 7 днів після операції навколо імплантованих зразків ППУС на ТЩУ без ДАК спостерігалось формування СТК, клітинний склад якої був представлений поліморфноядерними нейтрофілами, моноцитарно-макрофагальними елементами, молодими формами фібробластів (рис. 5, а). Локально на невеликих ділянках капсули були присутні фібробласти витягнутої веретеноподібної форми, що знаходилися в товщі пучків зрілих колагенових волокон. Кількість кровоносних судин була невеликою, а мікроциркуляторні процеси в них були без ускладнень. На даному терміні дослідження за рахунок наявності пор в структурі імплантованих зразків ППУС на ТЩУ без ДАК починалася міграція та адгезія клітинних елементів на внутрішніх поверхнях пор. Це слугувало своєрідним каркасом для формування та проростання тяжів сполучної тканини

вглиб імплантованих зразків. Через 14 днів після операції навколо зразків ППУС на ТЩУ без ДАК спостерігалось збільшення товщини СТК, яка характеризувалася більшим ступенем зрілості, ніж на попередньому терміні дослідження. Основними клітинними елементами капсули були витягнуті веретеноподібні фібробласти, що розташовувалися в товщі пучків зрілих колагенових волокон, та макрофаги, кількість яких істотно збільшувалася в порівнянні з попереднім терміном дослідження. Це могло свідчити про активацію проліферації паралельно з підсиленням фагоцитарного процесу. Крім того, спостерігалось локально виражена круглоклітинна реакція (поліморфноядерних нейтрофілів та лімфоцитів) та молоді форми фібробластичних елементів. На даному терміні характерним було більш глибоке проростання тяжів сполучної тканини вглиб імплантованих зразків (рис. 5, б). Кількість кровоносних судин була невисокою, мікроциркуляторні процеси в них були без порушень.

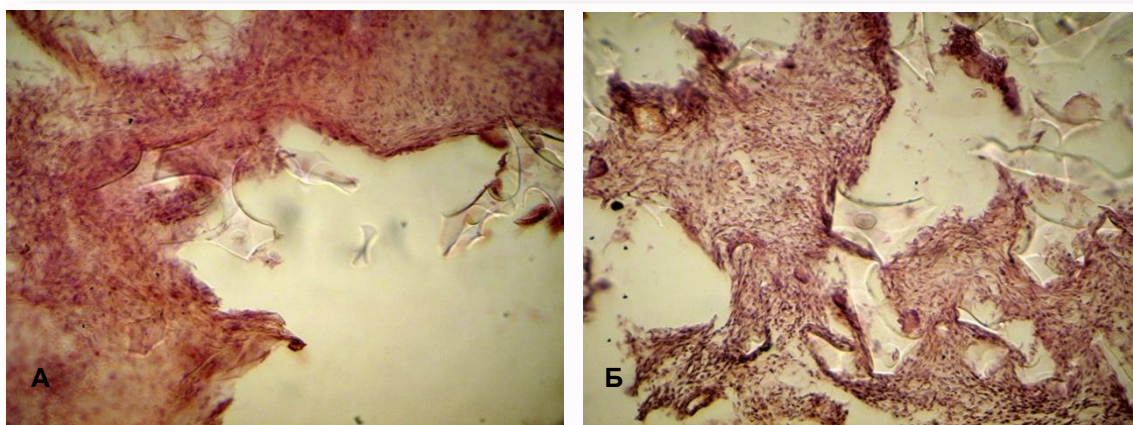


Рис. 5. СТК навколо імплантованих полімерних зразків ППУС на ТЩУ без ДАК. а) круглоклітинна реакція на 7 добу експерименту. Забарвлення гематоксилином і еозином.  $\times 200$ ; б) проростання тяжів сполучної тканини вглиб структури полімеру на 14 добу експерименту. Забарвлення гематоксилином і еозином.  $\times 200$ .

Через 30 днів після операції навколо зразка ППУС на ТЩУ без ДАК спостерігалось дозрівання СТК за рахунок активного синтезу фібробластами колагенових волокон та компонентів екстрацелюлярного матриксу. Клітинний склад капсули характеризувався наявністю молодих форм фібробластичних елементів та фібробластами веретеноподібної форми, що знаходилися в товщі пучків зрілих колагенових волокон. подекуди спостерігалась локальна інфільтрація поліморфноядерними нейтрофілами, лімфоцитами, а також макрофагами з високою фагоцитарною активністю. Кількість кровоносних судин була невеликою, всі вони були без видимих порушень трофіки. Через 90 днів після операції навколо імплантованих зразків ППУС на ТЩУ без ДАК спостерігалось більш повне проростання тяжів сполуч-

ної тканини вглиб імплантованих пористих зразків з утворенням локальних СТК, що мали високий ступінь зрілості та організації по всій своїй протяжності. При цьому не спостерігалось інтенсивних запальних реакцій, що свідчило про високий ступінь біоінтеграції імплантованих зразків з оточуючими тканинами. Капсули складалася з пучків хвилястих колагенових волокон з веретеноподібними фібробластами між ними, при цьому спостерігалось збільшення щільності капсул за рахунок синтетичної активності фібробластів. На окремих ділянках капсул характерними були незначні осередки макрофагів з високою фагоцитарною активністю. На даному терміні дослідження спостерігалась невелика кількість кровоносних судин, окремі з них характеризувалися порушенням мікроциркуляторних процесів в них. Зокрема, в поодиноких судинах було характерним крайове

стояння еритроцитів, а також стаз і тромбоз.

Через 7 дів після операції навколо імплантованих зразків ППУС на ТЦУ з 0,5 мас. % ДАК спостерігалася відмежування імплантованого матеріалу від оточуючих тканин широким лейкоцитарним валом та більш товстою СТК, ніж навколо імплантованих зразків ППУС на ТЦУ без ДАК. У складі капсули спостерігалися клітини круглоклітинного ряду, в основному, нейтрофіли та лімфоцити, а також була яскраво виражена моноцитарно-макрофагальна інфільтрація. Поряд були присутні молоді форми фібробластичних елементів, малодиференційовані клітини. На невеликих ділянках капсули характерними були веретеноподібні фібробласти, що лежали в товщі пучків зрілих колагенових волокон. Кровоносні судини були представлені у великій кількості, деякі з них були повнокровні та розширені, окремі судини були з елементами стазу та тромбозу. Через 14 дів після операції навколо імплантованих зразків ППУС на ТЦУ з 0,5 мас. % ДАК спостерігалася більш тонка та сформована СТК, в порівнянні з капсулою, утвореною навколо цих імплантованих зразків на попередньому терміні дослідження. Внутрішній шар капсули характеризувався наявністю яскраво вираженої круглоклітинної реакції, в основному нейтрофілів та макрофагів, а подекуди і незначної лімфоцитарної інфільтрації. Зовнішній шар капсули складався з пучків зрілих хвилястих колагенових волокон та видовжених веретеноподібних фібробластів між ними (рис. 6, а). Кількість кровоносних судин була помірною, мікроциркуляторні процеси в них були без порушень. При імплантації зразків ППУС на ТЦУ з 0,5 мас. % ДАК на даному терміні дослідження спостерігалася інтенсивне проростання тяжів сполучної тканини вглиб пористої структури матеріалів. Через 30 дів після операції навколо зраз-

ків ППУС на ТЦУ з 0,5 мас. % ДАК спостерігалася збільшення інтенсивності запальних клітинних реакцій в пористій структурі імплантованих зразків. Відбувалося різке збільшення кількості нейтрофілів, лімфоцитів та макрофагів. Кількість кровоносних судин суттєво не зростала в порівнянні з попереднім терміном дослідження, а самі судини характеризувалися мікроциркуляторними процесами без патологічних відхилень. Спостерігалися поодинокі судини, просвіт яких був розширений, відмічався стаз та тромбоз таких судин. На даному терміні дослідження спостерігалася активна міграція клітинних елементів в пористу структуру імплантованих зразків та проростання тяжів сполучної тканини вглиб матеріалу з формуванням сполучної тканини різного ступеню зрілості. В цілому, на таких ділянках відкритої пористості спостерігалися клітини круглоклітинного ряду та молоді форми фібробластичних елементів з високою синтетичною активністю. Через 90 дів після операції навколо імплантованих зразків ППУС на ТЦУ з 0,5 мас. % ДАК характерним було формування СТК досить високого ступеню зрілості. Клітини запального ряду були представлені в незначній кількості, а основними клітинними елементами були фібробласти веретеноподібної форми, що лежали в товщі пучків зрілих колагенових волокон. На окремих ділянках капсули характерними були незначні осередки макрофагів з високою фагоцитарною активністю (рис. 6, б), що може бути пояснено реакцією оточуючих тканин на наявність чужорідного для організму тіла, а також може бути свідченням активної процесу біодеструкції імплантованих зразків. Тяжі сполучної тканини ставали більш розгалуженими та проростали вглиб полімерних зразків. Кількість кровоносних судин була помірною, мікроциркуляторні процеси в них були в нормі.

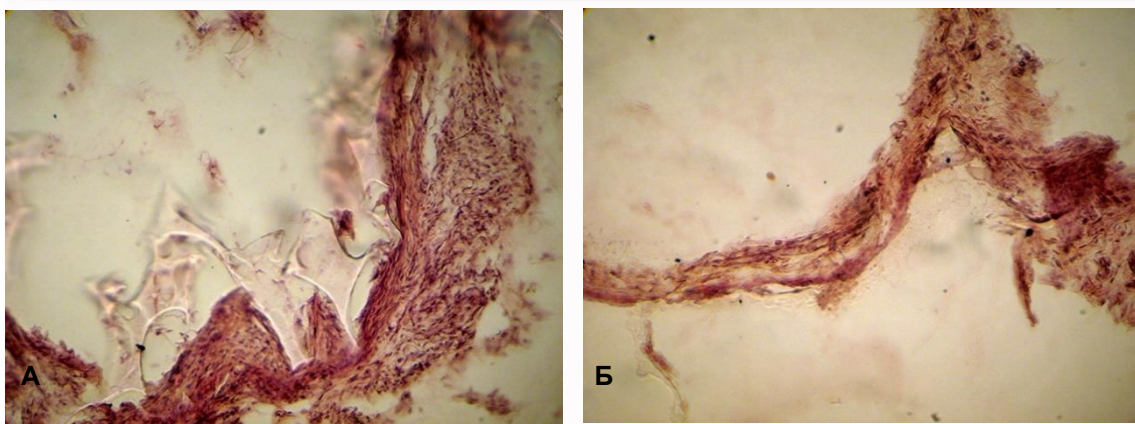


Рис. 6. СТК навколо імплантованих полімерних зразків ППУС на ТЦУ з 0,5 мас. % ДАК. а) формування колагенових волокон на 14 добу експерименту. Забарвлення гематоксиліном і еозином.  $\times 200$ ; б) осередки макрофагів з високою фагоцитарною активністю на 90 добу експерименту. Забарвлення гематоксиліном і еозином.  $\times 200$ .

Через 7 дів після імплантації навколо зразків ППУС на ТЦУ з 1 мас. % ДАК спостерігалася формування досить сформованої СТК, клітинний

склад якої був представлений фібробластами витягнутої веретеноподібної форми, що знаходилися в товщі пучків зрілих колагенових волокон,

що свідчило про активацію проліферативних процесів. На окремих ділянках капсула характеризувалася меншим ступенем зрілості, основними клітинними елементами якої були нейтрофіли, макрофаги, а також молоді форми фібробластичних елементів. Кількість кровоносних судин була незначною, всі вони характеризувалися нормальними мікроциркуляторними процесами. Характерним для даного терміну дослідження було протяжне і велике скупчення жирових клітин навколо імплантованого зразку (рис. 7, а). Через 14 днів після операції навколо імплантованих зразків ППУС на ТІЦУ з 1 мас. % ДАК спостерігалось

формування СТК різного ступеню зрілості. Так на одних ділянках капсула складалася з пучків хвилястих колагенових волокон та видовжених веретеноподібних фіброblastів між ними, на інших була наявна інтенсивна нейтрофільна інфільтрація з одночасним посиленням реакції моноцитарно-макрофагальних елементів за рахунок міграції клітинних елементів та проростання тяжів сполучної тканини в пористу структуру імплантованого зразка (рис. 7, б). Кількість кровоносних судин була невеликою, мікроциркуляторні процеси в них були без порушень трофіки.

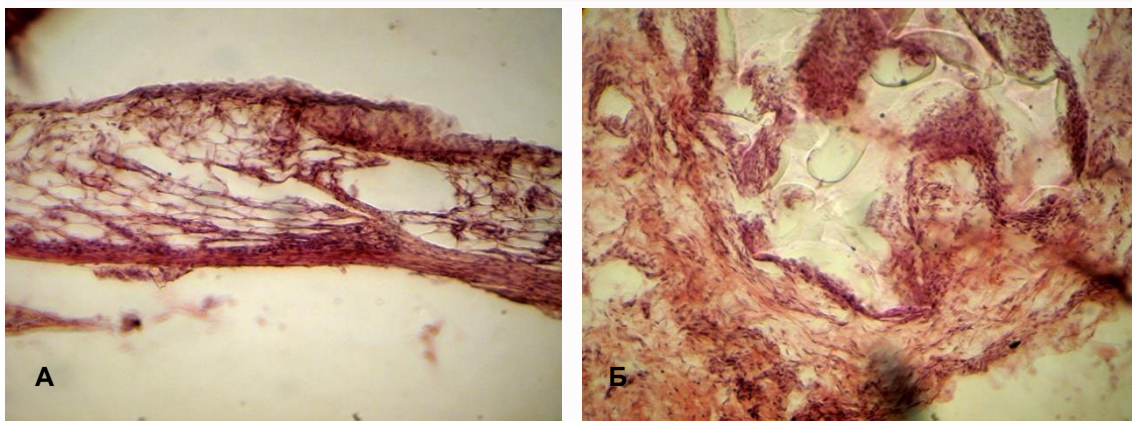


Рис. 7. СТК навколо імплантованих полімерних зразків ППУС на ТІЦУ з 1 мас. % ДАК. а) жирові клітини поряд з СТК на 7 добу експерименту. Забарвлення гематоксилином і еозином.  $\times 200$ ; б) нейтрофільна інфільтрація з яскраво вираженою реакцією моноцитарно-макрофагальних елементів на 14 добу експерименту. Забарвлення гематоксилином і еозином.  $\times 200$ .

Через 30 днів після операції навколо імплантованих зразків ППУС на ТІЦУ з 1 мас. % ДАК спостерігалось, як і на попередньому терміні дослідження, інтенсивне проростання тяжів сполучної тканини вглиб пористої структури матеріалу з одночасним формуванням досить великою кількістю відокремлених СТК. Клітинний склад сполучної тканини, що проростала в пори імплантованих зразків був представлений фіброblastичними елементами з посиленою синтетичною активністю, що активно продукували колаген та компоненти екстрацелюлярного матриксу. Кількість макрофагів залишалася досить високою на даному терміні дослідження (рис. 8). Кількість кровоносних судин була невеликою, мікроциркуляторні процеси в них були в нормі. Через 90 днів після операції навколо імплантованих зразків ППУС на ТІЦУ з 1 мас. % ДАК спостерігалась клітинні реакції, подібні до реакцій навколо зразків ППУС з 0,5 мас. % ДАК на аналогічному терміні дослідження. Так, навколо імплантованих зразків характерною була зріла та сформована СТК по всій своїй протяжності. Клітини запального ряду були представлені в незначній кількості, а основними клітинними елементами були фіброblastи веретеноподібної форми, що лежали в товщі пучків зрілих колагенових волокон.

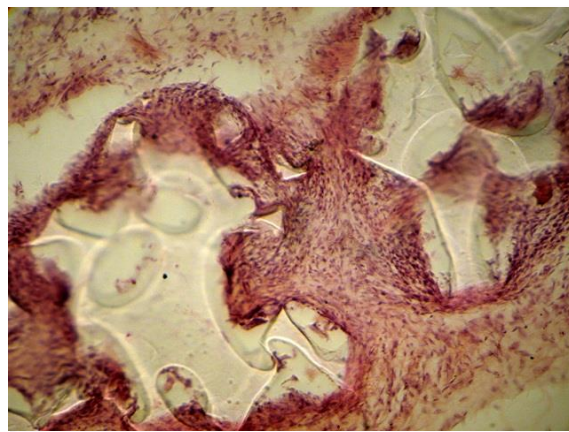


Рис. 8. Інтенсивна макрофагальна реакція в СТК навколо імплантованих зразків ППУС на ТІЦУ з 1 мас. % ДАК на 30 добу експерименту. Забарвлення гематоксилином і еозином.  $\times 200$ .

На окремих ділянках капсули спостерігалися локальні осередки макрофагів з високою фагоцитарною активністю. Тяжі сполучної тканини ставали ще більш розгалуженими та проростали вглиб пористої структури імплантованих зразків. Спостерігалися поодинокі кровоносні судини, кількість яких була незначною, мікроциркуляторні процеси в них були порушені.



Таким чином, було проведено дослідження біосумісності розроблених композиційних матеріалів на основі ППУС на ТЩУ, що містили різну кількість ДАК (0,5 мас. % та 1 мас. %). За допомогою імплантаційного тесту вивчено вплив отриманих композиційних матеріалів на розвиток клітинних реакцій та формування СТК в експерименті. В цілому, клітинні реакції тканин експериментальних тварин на імплантацію зразків ППУС на ТЩУ різного складу не приводили до патологічних процесів в оточуючих тканинах. Гістологічними методами показано, що вже через 7 діб після операції відбувалося відокремлення імплантованих зразків від оточуючих тканин шляхом формування захисного широкого лейкоцитарного валу з одночасним утворенням СТК, що відмежовувала чужорідний для організму імплантаційний матеріал. Формування СТК навколо імплантованих зразків ППУС на ТЩУ різного складу було цілком закономірним, біологічно детермінованим і прогнозованим процесом. Клітинні реакції на ранніх термінах дослідження навколо зразків з ДАК мали більшу реактивність та інтенсивність, ніж навколо зразків ППУС на ТЩУ без ДАК. Характерними були яскраво виражені нейтрофільна та лімфоцитарна інфільтрації, спостерігалася інтенсивна моноцитарно-макрофагальна реакція. При цьому навколо всіх зразків відбувався активний процес ангиогенезу, що сприяв виведенню продуктів метаболізму з вогнища запалення. Можна припустити, що іммобілізований на ППУС на ТЩУ ДАК, пролонговано вивільнявся в оточуючі імплантований зразок тканини, проявляючи біологічну активність та збільшуючи тривалість запального процесу в зоні розміщення імплантату за рахунок підвищеної реактивності клітинних реакцій. Поступово, на більш пізніх термінах дослідження, спостерігалася нормалізація клітинних реакцій навколо всіх імплантованих зразків з формуванням зрілої СТК з фібробластами, що активно синтезували колагенові волокна та інші компоненти екстрацелюлярного матриксу. Пориста структура зразків ППУС на ТЩУ сприяла клітинам оточуючих тканин проникати вглиб імплантованих зразків, викликаючи розвиток різної за інтенсивністю нейтрофільної та лімфоцитарної інфільтрації в їх структурі, а також протікання вираженої макрофагальної реакції на всіх термінах дослідження. Макрофаги, брали активну участь у

процесі реалізації захисно-компенсаторних механізмів, реагуючи на наявність чужорідних тіл в організмі експериментальних тварин.

#### **Висновки**

1. Методом культури клітин встановлено, що культура фібробластів щурів, як в контролі, так і при дослідженні композиційних матеріалів на основі ізоціануратвмісних ППУС з ДАК перебувала в стадії стабільного росту, що свідчило про відсутність цитотоксичності дослідних зразків на клітини, що культивувались. При інкубації дослідних зразків з різною концентрацією ДАК спостерігалася збільшення кількості клітин полігональної неправильної форми.

2. За допомогою імплантаційного тесту вивчено біосумісність та розвиток клітинних реакцій на імплантацію композиційних матеріалів на основі ізоціануратвмісних ППУС з ДАК експериментальним тваринам. Показано, що клітинні реакції на імплантацію дослідних зразків ізоціануратвмісних ППУС різного складу не призводили до патологічних процесів в оточуючих імплантат тканинах.

3. На ранніх термінах дослідження навколо ізоціануратвмісних ППУС з ДАК були характерними яскраво виражені круглоклітинні реакції, зокрема нейтрофільна та лімфоцитарна інфільтрації, спостерігалася інтенсивна моноцитарно-макрофагальна реакція, що може бути пояснено вивільненням ДАК з ППУС композицій на ранніх термінах спостереження та його впливом на оточуючі імплантат тканини, а пориста структура сприяла міграції клітинних елементів вглиб імплантованих зразків.

4. За результатами проведених медико-біологічних досліджень встановлено, що ізоціануратвмісні ППУС з ДАК не мають вираженої цитотоксичної дії, є біосумісними та перспективними матеріалами для застосування в медицині.

#### **Перспективи подальших розробок**

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

#### **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. Bhattacharjee K, Barman MJ, Ghosh S, authors; Chaugule, S, Honavar, S, Finger P, editor: Orbital Implants. Surgical Ophthalmic Oncology. 2019. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-18757-6\\_13](https://doi.org/10.1007/978-3-030-18757-6_13).
2. Bigun NM. The use of a polymer-carbohydrate implant during reconstructive operations on the

orbit in the peri-orbital area. Archives of Ophthalmology of Ukraine. 2016;4,2(6):86-90.

3. Lin C, Liao S. Long-term complications of different porous orbital implants. A 21-year review. British Journal of Ophthalmology. 2017;101:681-685.

4. Moshfeghi DM, Moshfeghi AA, Finger PT. Enucleation. *Surv Ophthalmol.* 2000;44(4):277-301. doi: 10.1016/s0039-6257(99)00112-5.
5. Chen XY, Yang X, Fan XL. The Evolution of Orbital Implants and Current Breakthroughs in Material Design, Selection, Characterization, and Clinical Use. *Front Bioeng Biotechnol.* 2022;9:800998. doi: 10.3389/fbioe.2021.800998.
6. Baino F. Bioceramics and Composites for Orbital Implants: Current Trends and Clinical Performance. In: Antoniac, I. (eds) *Handbook of Bioceramics and Biocomposites.* Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-09230-0\\_60-1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-09230-0_60-1).
7. Ferrari G, Thives Mello A, Melo G, de Mello Roesler CR, Salmoria GV, de Souza Pinto LP, de Mello Gindri I. Polymeric implants with drug-releasing capabilities: a mapping review of laboratory research. *Drug Dev Ind Pharm.* 2021;47(10):1535-1545. doi: 10.1080/03639045.2022.2043354.
8. Galimova VU, Kulbaev ND, Ryzhova VA. The influence of the cosmetic effect of eye prosthetics on the quality of life of patients with anophthalmos, atrophy and subatrophy of the eyeball. *Refractive surgery and ophthalmology.* 2004;1:27-29.
9. Vislohubova T, Rozhnova R, Galatenko N. Development and research of polyurethane foam composite materials with albugin. *American Journal of Polymer Science and Technology.* 2021;3:38-43.
10. Galatenko NA, Rozhnova RA. [Biologically active polymer materials for medicine]. Kyiv: Naukova Dumka; 2013. 211 p. Ukrainian.
11. Galatenko NA, Rozhnova RA, Kuliesh DV, Visloguzova TV, Maletskyy AP, Bigun NM. [Response of soft tissues and abdominal organs of rabbits and rats to implanting albugin-containing cross-linked polyurethane composite]. *Journal of ophthalmology.* 2020;6:30-37. Ukrainian. doi.org/10.31288/oftalmolzh202063037.
12. Galatenko NA, Kuliesh DV, Narazhaiko LF, Grytsenko VP, Zakashun TIu, Maletskyy AP, Bigun NM. [Assessing in vitro cytotoxicity and pH of extracts of synthetic polymers made of cross-linked polyurethane composite with immobilized albugin]. *Journal of ophthalmology.* 2020;4:56-61. Ukrainian. <http://doi.org/10.31288/oftalmolzh202045661>.
13. Galatenko NA, Rozhnova RA, Kuliesh DV, Denisenko VD, Maletskyy AP, Bigun NM. [Rat tissue responses to dacarbazine-containing implants made of cross-linked polyurethane of different densities]. *J. ophthalmol.* 2022;4:40-8. Ukrainian. <http://doi.org/10.31288/oftalmolzh202244048>.
14. Denisenko VD, Galatenko NA, Rozhnova RA, Nechaeva LYu. [Isocyanurate-containing polyurethane foams, filled with dacarbazine, for medicine]. In: [II International Scientific Conference "Theoretical and Experimental Aspects of Modern Chemistry and Materials TASH-2023", 2023, May 20; Dnipro, Ukraine]. 48-51. Ukrainian.
15. Burenko HV, Galatenko NA, Kabak KS, authors; Pkhakadze HA, editor: *Morfologicheskiye y byokhymicheskiye aspekty byodestruktsyy polymerov* [Morphological and biochemical aspects of polymer biodegradation]. Kyiv: Nauk. dumka; 1986. 152 p. Russian.
16. Lebedev EV, Konstantinov YuB, Galatenko NA, Yatsenko VP, Rozhnova RA, Maksymenko VB. [Toxicological, hygienic and preclinical studies of polymeric materials and products based on them for medical purposes]. Kyiv: Naukova dumka, 2009. Russian.
17. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. Council of Europe, Strasbourg. 1986. 53 p.
18. Sarkisov DS, Petrova YuL. *Microscopic technique.* M.: Medicine, 1996. 542 p. Russian.
19. Bagriy MM, Dibrova VA, Popadynets OG, Hryschuk MI. [Methods of morphological research]. Vinnytsia: Nova Knyga, 2016. 328 p. Ukrainian.

**Кулеш Д.В., Рожнова Р.А., Денисенко В.Д., Гриценко В.П., Наражайко Л.Ф., Галатенко Н.А. Вивчення цитотоксичності та біосумісності ізоціануратвмісних пінополіуретансечовин наповнених дакарбазином для застосування в медицині.**

**РЕФЕРАТ. Актуальність.** Розробка нових та модифікація існуючих полімерних матеріалів з метою одержання імплантатів з покращеними функціональними можливостями, що можуть виконувати функцію носіїв біологічно активних речовин та лікарських препаратів є актуальною задачею. **Мета.** Дослідження біосумісності ізоціануратвмісних пінополіуретансечовин наповнених дакарбазином медико-біологічними методами. **Методи.** Вивчення цитотоксичності та біосумісності ізоціануратвмісних пінополіуретансечовин наповнених дакарбазином проводилися за допомогою методу культури фібробластів щурів в умовах *in vitro* та за допомогою імплантаційного тесту в умовах *in vivo*. **Результати.** За результатами проведених досліджень методом культури фібробластів щурів встановлено, що культура фібробластів, як в контролі, так і при дослідженні композиційних матеріалів з різним відсотком дакарбазину перебувала в стадії стабільного росту, що свідчило про відсутність цитотоксичного впливу дослідних зразків на клітини, що культивувались. За допомогою імплантаційного тесту вивчено біосумісність та розвиток клітинних реакцій на імплантацію композиційних матеріалів на основі ізоціануратвмісних пінополіуретансечовин з дакарбазином в організм експериментальних тварин. Показано, що клітинні реакції тканин експериментальних тварин на імплантацію дослідних зразків ізоціануратвмісних пінополіуретансечовин різного складу були типовими для реакції живого організму на присутність чужорідного тіла при підшкірній імплантації та не

призводили до патологічних процесів в оточуючих тканинах, а пориста структура сприяла міграції клітинних елементів вглиб імплантованих зразків. **Висновки.** За результатами проведених медико-біологічних досліджень показано, що ізоціануратвмісні пінополіуретансечовини з дакарбазином не мають вираженої цитотоксичної дії, є біосумісними та перспективними матеріалами для застосування в медицині та рекомендовані для проведення подальших випробувань, в тому числі клінічних.

**Ключові слова:** ізоціануратвмісні пінополіуретансечовини, дакарбазин, культура фібробластів щурів, імплантація, біосумісність.