

Дослідження цитотоксичності та кислотності екстрактів з синтетичного полімерного матеріалу на основі сітчастого поліуретану з іммобілізованим альбуцидом в умовах *in vitro*

Н. А. Галатенко¹, д-р біол. наук; Д. В. Кулеш¹, канд. біол. наук; Л. Ф. Наражайко¹, пров. інженер; В. П. Гриценко¹, пров. інженер; Т. Ю. Закашун¹, пров. інженер; А. П. Малецький², д-р мед. наук; Н. М. Бігун³, канд. мед. наук

¹ Інститут хімії високомолекулярних сполук НАН України; Київ (Україна)

² ДУ «Інститут очних хвороб і тканинної терапії ім. В.П. Філатова НАМН України»; Одеса (Україна)

³ КНП ЛОР «Львівська обласна клінічна лікарня»; Львів (Україна)

E-mail: maletskiy@filatov.com.ua

Ключові слова:

сітчастий поліуретан, альбуцид, імплантат, реконструктивні операції на органі зору, цитотоксичність, величина pH

Актуальність. Відсоток очного травматизму в Україні є стабільно високим, у зв'язку з чим проведення відновлюючих операцій на орбіті та окулоорбітальній ділянці має важливе значення, а їх успішне впровадження залежить від якості імплантаційних матеріалів. Одним з таких матеріалів є розроблений нами полімерний матеріал на основі сітчастого поліуретану (ПУ) з біологічно активною речовиною – альбуцидом.

Мета: дослідити в умовах *in vitro* цитотоксичність та кислотність екстрактів з синтетичних полімерних матеріалів на основі сітчастого ПУ та ПУ з іммобілізованим альбуцидом.

Матеріал і методи. Випробування цитотоксичності. Для вивчення цитотоксичності композиційних матеріалів на основі сітчастого ПУ та ПУ з альбуцидом, був застосований метод клітинної культури. В якості джерела клітин використовували підшкірну клітковину білих лабораторних щурів лінії Wistar, що в умовах культивування викликає ріст фібробластних і фібробластоподібних елементів.

Визначення міри кислотності водних розчинів (pH) проводилось шляхом дослідження екстрактів зі зразків ПУ та ПУ з альбуцидом. Величина pH характеризує кислотність або лужність екстракту. Величину pH вимірювали на універсальному іономірі ЕВ-74 зі скляними електродами.

Результати. Встановлено, що культура фібробластів, як у контролі, так і при дослідженні дослідних зразків ПУ та ПУ з альбуцидом, перебувала в стадії стабільного росту, що свідчить про відсутність токсичної дії екстрактів на культивовані клітини. Показано, що пінополіуретанові композиційні матеріали з альбуцидом мають нейтральне pH, яке не перевищує гігієнічних нормативів.

Актуальність. В останні десятиліття в Україні відмічається виражена тенденція росту очного травматизму, основними причинами якого є техногенні та кримінальні травми ока та орбіти, внутрішньоочні злоякісні пухлини, бойові ураження очей, що характеризуються значними ушкодженнями тканин ока та очної ямки, часто у поєднанні з травмами обличчя та інших частин тіла [6,9]. Враховуючи явну тенденцію росту очного травматизму, проведення відновлювальних та реконструктивних операцій на орбіті та окулоорбітальній ділянці має важливе значення, а їх успішне здійснення сприяє медико-соціальній та професійній реабілітації пацієнтів.

При проведенні відновлюючих та реконструктивних операцій офтальмохірургу в своїй практиці доводиться використовувати імплантаційні матеріали для заміни м'яких і кісткових структур. На теперішній час існує безліч біологічних [4,5] і штучних (синтетичних) матеріалів [1,7,10], причому перевагою володіють біо-

інтегровані імплантати, що дозволяють тканинам реципієнта вросати в них, здійснюючи надійну фіксацію в місці імплантації.

Одним з таких матеріалів є розроблений нами полімерний матеріал на основі сітчастого поліуретану (ПУ) [2, 8], у склад полімерного ланцюга якого входить уретанова група $-\text{NHCOO}-$, близька за будовою до пептидної групи білків $-\text{CONH}-$, що є важливим моментом в успіхах застосування цього класу синтетичних матеріалів. З метою надання полімерному матеріалу біологічної активності нами була проведена іммобілізація біологічно активної речовини – сульфацилу натрію (альбуциду), що може мати вирішальне значення в біоінтеграції полімерного імплантату в патологічно змінених тканинах. Попередньо проведені нами екс-

периментальні дослідження [3] показали, що поліуретанові імплантатні матеріали з іммобілізованим альбуміном є біосумісними, клітинні реакції при їх імплантації з боку організму експериментальних тварин були характерними для асептичного запалення. Крім того, було відмічено, що навколо імплантатів цих матеріалів з альбуміном формувалася сполучнотканинна капсула, а також спостерігалася міграція клітин вглиб пористих імплантатів. Проведені попередні експериментальні дослідження пінополіуретанових композиційних матеріалів з альбуміном виявили позитивні сторони, які пред'являються до імплантатів. У зв'язку з цим, для проведення клінічних досліджень необхідно провести санітарно-хімічне вивчення та доклінічні випробування матеріалу на основі сітчастого поліуретану, що містить альбумід.

Мета дослідження: дослідити в умовах *in vitro* цитотоксичність та кислотність екстрактів з синтетичних полімерних матеріалів на основі ПУ та ПУ з іммобілізованим альбуміном.

Матеріал і методи

Згідно договору про спільну науково-дослідну роботу між Інститутом хімії високомолекулярних сполук НАН України та ДУ «Інститутом очних хвороб та тканинної терапії ім. В.П.Філатова НАМН України» у випробувальній лабораторії «Відділ полімерів медичного призначення ІХВС НАН України», атестованої Національним Агентством з акредитації України (Свідоцтво про акредитацію №20725 від «25» червня 2019 р.) були проведені санітарно-хімічні дослідження та доклінічні випробування матеріалу на основі сітчастого поліуретану, що містить альбумід.

З огляду на область і спосіб застосування розробленого полімерного матеріалу при дослідженні були задіяні методики згідно з ДСТУ EN ISO 10993-1:2015 (EN ISO 10993-1:2009, IDT; ISO 10993-1:2009, IDT) і (EN ISO 10993-5:2009, IDT; ISO 10993-5:2009, IDT) Біологічне оцінювання медичних виробів. Частина 1 і 5.

На даному етапі роботи нами досліджувалася цитотоксичність *in vitro* та кислотність екстрактів з синтетичного полімерного матеріалу на основі ПУ та ПУ з іммобілізованим альбуміном.

Для вивчення цитотоксичності композиційних матеріалів на основі ПУ з альбуміном, був застосований метод клітинної культури згідно зі стандартом ДСТУ EN ISO 10993-5:2015 (EN ISO 10993-5:2009, IDT; ISO 10993-5:2009, IDT) Біологічне оцінювання медичних виробів. Частина 5. Випробування на цитотоксичність *in vitro*. Клітинні культури є модельною тест-системою, використання якої можна розглядати як прискорений метод в токсикологічному експерименті, якому притаманні: висока чутливість і відтворюваність, більш швидке отримання результатів, надійність контролю над якістю проведення експерименту.

Як джерело клітин використовували підшкірну клітковину білих лабораторних щурів, що в умовах

культивування викликає ріст фібробластних і фібробластоподібних елементів.

Культури були досліджені методом експлантації в згустку плазми у флаконах Карреля. Досліджувались три групи: контрольна та дослідні (екстракти зі зразків ПУ та ПУ з альбуміном). У контрольній групі проводили культивування тканини на плазмі з послідовною зміною біологічного середовища 199 протягом 3, 7, 10, та 14 діб культивування. У дослідних групах протягом 3, 7, 10 та 14 діб культивування біологічне середовище 199 змінювалося екстрактами зі зразків ПУ та ПУ з альбуміном. В якості модельного середовища використовували середовище 199 для культури тканин. Екстракти готували в співвідношенні ваги випробних зразків до об'єму модельного середовища (100:1) мг/мл. Час контакту зразків з модельним середовищем становив 1 добу. Температурний режим екстракції був 37 °С.

На 3, 7, 10 та 14 добу проводили спостереження за ростом компактної, сіткоподібної зони та зони мігруючих фібробластних елементів, використовуючи мікроскоп AMPLIVAL. Критерієм для виділення цих зон був характер розташування зростаючих фібробластичних елементів. До компактної зони відносили ділянки щільного розташування клітин, що зростали. До сіткоподібної зони відносили ділянки розташування клітинних тяжів, що анастомозувалися та розгалужувалися. По вершинах ізольованих клітинних тяжів, що вросли у тверду фазу живильного середовища до місця розташування ізольовано лежачих клітин, визначали зону мігруючих елементів.

З метою встановлення величини рН проводили дослідження екстрактів зі зразків ПУ та ПУ з альбуміном. Величина рН характеризувала кислотність або лужність екстракту. Величину рН вимірювали на іонометрі універсальному ЕВ-74 зі скляними електродами.

Результати вимірювань обчислювали за формулою:

$$\Delta pH = pH_0 - pH_K,$$

де ΔpH – зміна величини рН, pH_0 – величина рН витяжки, pH_K – величина рН контрольного розчину.

Показники рН розраховували як середнє арифметичне трьох результатів паралельних визначень (довіра ймовірність 0,95).

Результати

1. Випробування на цитотоксичність *in vitro*.

На третю добу культивування в контролі спостерігалися перші ознаки росту, які проявлялися міграцією поодиноких клітин витягнутої форми, а також поодинокі мігруючі фібробластні елементи, що мали веретеноподібну форму (рис. 1).

Надалі активність росту фібробластних елементів збільшувалася. На 5 добу у флаконах Карреля площі росту були представлені, в основному, двома зонами: сіткоподібною, яка складалася з пучків і тяжів клітин, що розташовувалися сіткоподібно, та зони мігруючих елементів, що мали веретеноподібну та полігональну форму.

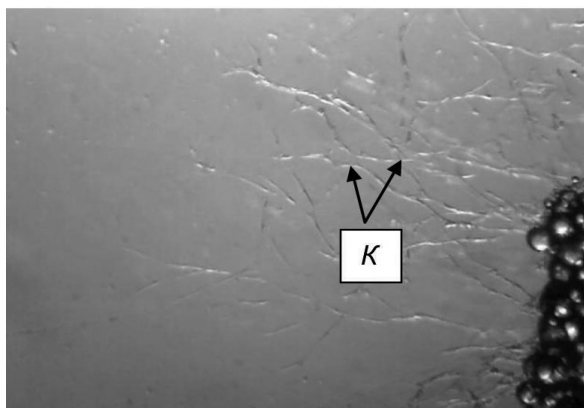


Рис. 1. Початок росту клітин (K) в культурі підшкірно-жирової клітковини щурів на 3 добу культивування в контролі. $\times 150$

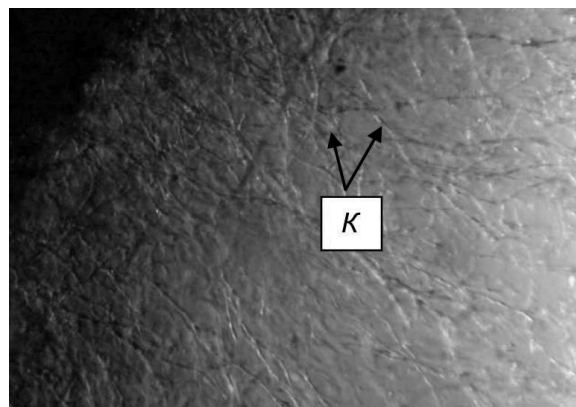


Рис. 2. Ріст культури тканин фібробластів на 7 добу культивування в контролі (стрілками позначені клітини (K)). $\times 150$

На 7 добу культивування в контролі зони росту розділялися на компакту, що складалася з клітин веретеноподібної та полігональної форми, сіткоподібну зону та зону одиничних мігруючих елементів. Найбільша кількість клітин, що діляться, спостерігалася в третій зоні (рис. 2).

На 10 добу культивування в контролі відбувалося збільшення зон росту, але у компактній та сіткоподібній зонах виявлялися ознаки дегенеративних змін фібробластних елементів. На 14 добу культивування клітинна популяція в контрольній групі вступала в стадію вираженої дегенерації.

На відміну від контролю при внесенні екстрактів зі зразків ПУ у флакони Карреля на початкових етапах дослідження відзначалася незначна затримка міграції фібробластних елементів. На 5 добу відбувалося вирівнювання темпів росту клітин (рис. 3).

При внесенні екстрактів з ПУ з альбумидом у флакони Карреля зони росту були представлені фібробластоподібними клітинами більших розмірів неправильної форми, в порівнянні з контролем. Слід зазначити велику кількість ізольовано лежачих клітин полігональної форми на відстані від експлантату (рис. 4).

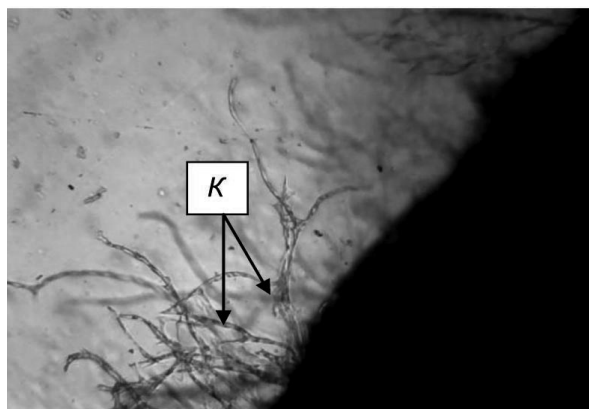


Рис. 3. Міграція фібробластних елементів на 5 добу культивування у дослідній групі (екстракт зі зразка ПУ) (стрілками позначені клітини (K)). $\times 150$

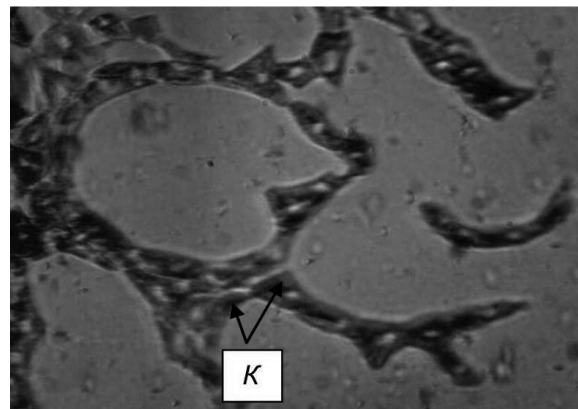


Рис. 4. Ріст культури тканин фібробластів на 5 добу культивування (екстракт зі зразка ПУ з альбумидом) (стрілками позначені клітини (K)). $\times 200$

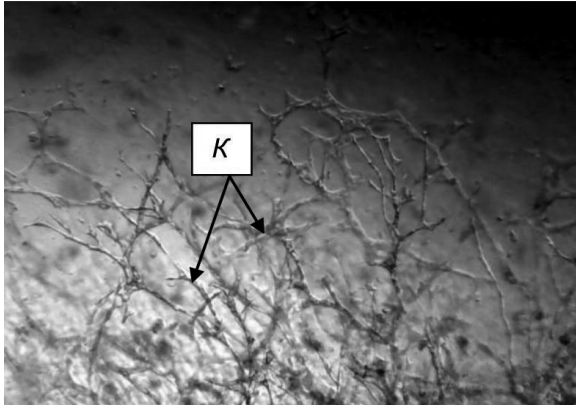


Рис. 5. Ріст культури тканин фібробластів на 7 добу культивування (екстракт зі зразка ПУ з альбуцидом) (стрілками позначені клітини (К)). $\times 150$

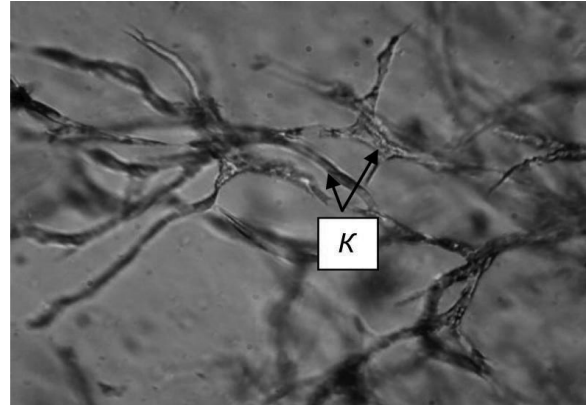


Рис. 6. Сіткоподібна зона фібробластних елементів на 7 добу культивування (екстракт зі зразка ПУ) (стрілками позначені клітини (К)). $\times 200$

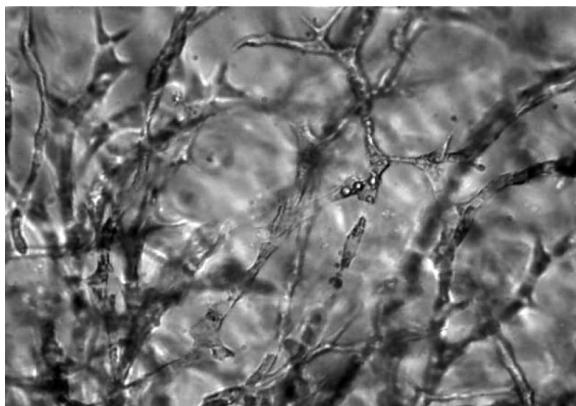


Рис. 7. Початок дегенеративних змін у компактній зоні на 10 добу культивування (флакон з екстрактом зі зразка ПУ). $\times 200$

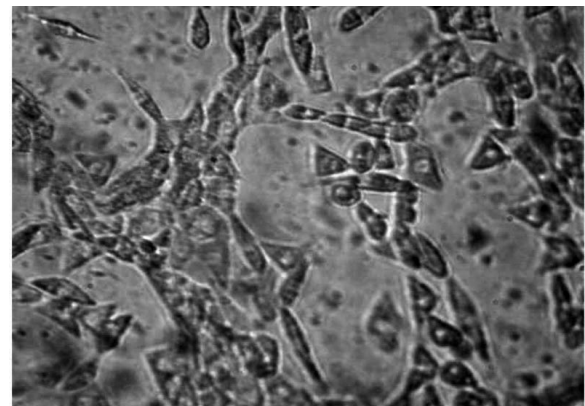


Рис. 8. Сіткоподібна зона фібробластоподібних клітин полігональної форми на 10 добу культивування (екстракт зі зразка ПУ з альбуцидом). $\times 200$

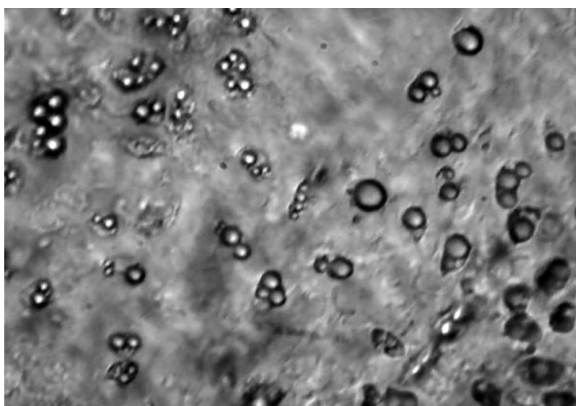


Рис. 9. Дегенеративні зміни в культурі фібробластів на 14 добу в контролі. $\times 200$

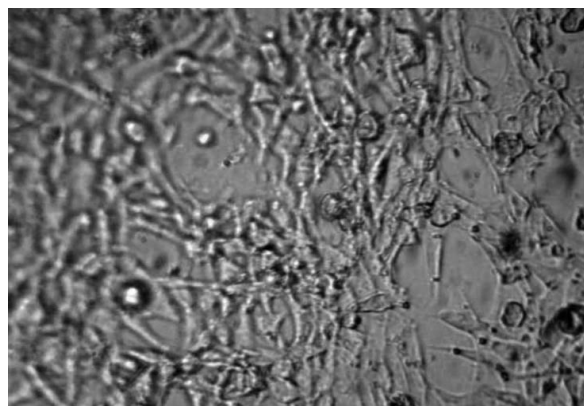


Рис. 10. Дегенеративні зміни в культурі фібробластів на 14 добу. Компактна та сіткоподібна зони у флаконі з екстрактом зі зразка ПУ з альбуцидом. $\times 200$

На 14 добу клітинна популяція вступала у фазу дегенеративних змін з округленням клітин, повною втра-тою міжклітинних контактів як в контролі (рис. 9), так і у дослідній групі з екстрактом зі зразку ПУ.

На 14 добу культивування при внесенні екстракту зі зразку ПУ з альбуцидом в культуральне середовище фаза дегенерації наступала в компактній та сіткоподіб-

ній зонах, але були присутні фібробластні елементи, клітини полігональної форми, що не мали дегенера-тивних змін (рис. 10).

Після 21 доби культивування у всіх флаконах контрольної та дослідних груп спостерігалася повна дегенерація клітин.

Таким чином, проведені дослідження цитотоксичності пінополіуретанових композиційних матеріалів з альбумидом свідчать про те, що культура фібробластів як в контролі, так і при дослідженні дослідних зразків перебуває в стадії стабільного росту, що говорить про відсутність їх токсичної дії на культивовані клітини.

2. *Визначення міри кислотності водних розчинів (рН).*

Величину рН та рНк розраховували як середнє арифметичне трьох результатів паралельних визначень (табл. 1).

Таблиця 1. Величина рН екстрактів зі зразків ПУ та ПУ з альбумидом

Матеріал	Показник рН
ПУ	6,8
ПУ з альбумидом	6,9
Допустимі норми	не менше або дорівнює 2, не більше або дорівнює 11,5

Таким чином, показники рН випробних матеріалів ПУ та ПУ з альбумидом мають нейтральне рН та не перевищують гігієнічних нормативів.

Заключення

Таким чином, проведене в умовах *in vitro* дослідження цитотоксичності та кислотності екстрактів з синтетичних полімерних матеріалів на основі ПУ та ПУ з іммобілізованим альбумидом показало, що культура фібробластів як в контролі, так в дослідних групах з екстрактами ПУ та ПУ з альбумидом перебувала в стадії стабільного росту, що свідчило про відсутність токсичної дії екстрактів з пінополіуретанових композиційних матеріалів на культивовані клітини. Встановлено, що пінополіуретанові композиційні матеріали з біологічно активною речовиною – альбумидом мають нейтральне рН, яке не перевищує гігієнічних нормативів.

Література

1. Астахов Ю. С. Использование политетрафторэтиленовых имплантатов в офтальмохирургии / Ю. С. Астахов, В. П. Николаенко, В. Е. Дьяков. – СПб.: Фолиант, 2007. – 256 с.
2. Галатенко Н. А. Биологически активные полимерные материалы для медицины / Н. А. Галатенко, Р. А. Рожнова. – К., Наукова думка, 2013. – 211 с.
3. Галатенко Н. А. Характер реакції м'яких тканин на імплантацію синтетичного полімерного матеріалу на основі сітчастого поліуретану з біологічно активною речовиною (альбумид, дакарбазин) при експериментальних дослідженнях / Н. А. Галатенко, Д. В. Кулеш, А. П. Малецький, О. С. Карпенко // Офтальмол. журнал – 2018. – №6 – С. 52-58.
4. Груша Я. О. Клинико-морфологические особенности использования ксеноперикарда при пластике век и орбиты / Я. О. Груша, А. А. Федоров, В. В. Дземешкевич, И. В. Блинова // Вестник офтальмол. – 2004. – №5 – С. 19-21.
5. Караян А. С. Одномоментное устранение посттравматических дефектов и деформаций скрулоносогласничного комплекса : дис. ... д-ра. мед. наук / А. С. Караян. М., 2008. – 250 с.
6. Красновид Т. А. Глазной травматизм в современных условиях. Оказание ургентной помощи в Украине / Т. А. Красновид // Матер. научно-практич. конф. офтальмологов Черниговской, Киевской и др. областей. – Чернигов, 2013. – С.40-44.
7. Малецкий А. П. Результаты применения полимерно-композиционного материала (Ikvan) при реконструктивных операциях на орбите и окулоорбитальной области / А. П. Малецкий, В. И. Дубкова, О. И. Маевская, Н. М. Бигун // Офтальмология. Восточная Европа. – 2013. – Спецвыпуск. – С. 188-197.
8. Рожнова Р. А. Структурно-морфологические исследования биологически активных имплантатов с пролонгированным лечебным действием / Р. А. Рожнова, В. В. Шилов, Н. А. Галатенко // Композиційні полімерні матеріали. – 2000. – Т. 22, №2. – С. 146–150.
9. Целомудрый А. И. Современная система этапного лечения боевых ранений глаз в зоне проведения АТО / А. И. Целомудрый, Г. Е. Венгер, Д. Н. Погорельный, А. В. Ризванюк // Вісник морської медицини. – 2016. – № 2 (71). – С. 196-203.
10. Chao D. L. Hydroxyapatite versus polyethylene orbital implants for patients undergoing enucleation for uveal melanoma / D. L. Chao, J. W. Harbour // Can. J. Ophthalmol. – 2015. – 50. – P.151-154.

Автори засвідчують про відсутність конфлікту інтересів, які б могли вплинути на їх думку стосовно предмету чи матеріалів, описаних та обговорених в даному рукопису.

Поступила 13.03.2020

Исследование цитотоксичности и кислотности экстрактов из синтетического полимерного материала на основе сетчатого полиуретана с иммобилизованным альбумином в условиях *in vitro*

Галатенко Н.А., Кулеш Д.В., Наражайко Л.Ф., Гриценко В.П., Закашун Т.Ю., Малецкий А.П., Бигун Н.М.

Институт химии высокомолекулярных соединений НАН Украины; Киев (Украина)

ГУ «Институт глазных болезней и тканевой терапии им. В.П. Филатова НАМН Украины»; Одесса (Украина)

КНП ЛОР «Львовская областная клиническая больница», Львов (Украина)

Актуальность. Процент глазного травматизма в Украине является стабильно высоким, в связи с чем проведение восстановительных операций на орбите и окулоорбитальной области имеет важное значение, а их успешное внедрение зависит от качества имплантируемых материалов. Одним из таких материалов является разработанный нами полимерный материал на основе сетчатого полиуретана (ПУ) с биологически активным веществом – альбумином.

Цель: изучить в условиях *in vitro* цитотоксичность и кислотность экстрактов из синтетических полимерных материалов на основе ПУ и ПУ с иммобилизованным альбумином.

Материал и методы. Для изучения цитотоксичности композиционных материалов на основе сетчатого ПУ и ПУ с альбумином, был применен метод клеточной культуры. В качестве источника клеток использовали подкожную клетчатку белых лабораторных крыс

линии Wistar, которая в условиях культивирования вызывает рост фибробластических и фибробластоподобных элементов.

Определение меры кислотности водных растворов (рН) проводилось путем исследования экстрактов из образцов ПУ и ПУ с альбумином. Величина рН характеризует кислотность или щелочность экстракта. Величину рН измеряли на универсальном иономере ЭВ-74 со стеклянными электродами.

Результаты. Установлено, что культура фибробластов как в контроле, так и при исследовании опытных образцов ПУ и ПУ с альбумином находилась в стадии стабильного роста, что свидетельствует об отсутствии токсического действия экстрактов на культивируемые клетки. Показано, что пенополиуретановые композиционные материалы с альбумином имеют нейтральное рН, не превышающее гигиенических нормативов.

Ключевые слова: сетчатый полиуретан, альбумин, имплантат, реконструктивные операции на органе зрения, цитотоксичность, величина рН