

ВИВЧЕННЯ ЦИТОТОКСИЧНОСТІ ПІНОПОЛІУРЕТАНОВИХ КОМПОЗИЦІЙНИХ МАТЕРІАЛІВ З ЛІЗОЦИМОМ

Інститут хімії високомолекулярних сполук НАН України (м. Київ, Україна)

Анотація. Метою роботи було дослідження цитотоксичності пінополіуретанів (ППУ) та ППУ композиційних матеріалів наповнених лізоцимом методом тканинної культури фібробластів. Результати випробувань демонструють, що досліджувані полімерні матеріали не мають цитотоксичної дії. Встановлено більш активний ріст фібробластичних елементів та сповільнення процесу дегенерації клітин для ППУ композитів з лізоцимом, порівняно з контролем та ППУ. Отримані результати підтверджують перспективність ППУ композитів з лізоцимом як матеріалів медичного призначення з антимікробною дією ферменту, які можуть бути використані для лікування ран та опіків.

Ключові слова: пінополіуретан, композиційний матеріал, лізоцим, біосумісність.

Abstract. The aim of this study was to investigate the cytotoxicity of polyurethane foams (PUFs) and PUF composite materials filled with lysozyme using fibroblast tissue culture method. The test results demonstrate that the studied polymer materials under do not have a cytotoxic effect. A more active growth of fibroblastic elements and a slowdown in the process of cell degeneration have been established for PUF composites with lysozyme compared to controls and PUF. These results confirm the potential of PUF composites with lysozyme as medical materials with an antimicrobial activity of the enzyme, which can be used to treat wounds and burns.

Key words: polyurethane foam, composite material, lysozyme, cytotoxicity.

Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами.

Експериментальні дослідження виконувались в рамках науково-дослідної роботи «Створення багатофункціональних біологічно активних полімерних матеріалів на основі біодеструктуючих поліуретанів та гідрогелів», номер державної реєстрації 0123U100347.

Вступ.

Пінополіуретани (ППУ) стали одними з найпоширеніших полімерних матеріалів у медицині завдяки їхній біосумісності та властивостям, які можна контролювати. Вони мають широкий спектр біомедичних застосувань, зокрема в тканинній інженерії та системах контролюваного вивільнення лікарських речовин [1]. Пориста структура є однією із властивостей, що здатна забезпечити відповідне мікросередовище для регенерації тканин в місці імплантації [2, 3].

Одним із перспективних напрямів модифікації поліуретанових матеріалів є введення до їх складу біологічно активних сполук природного походження, зокрема ферментів. Лізоцим — природний антибактеріальний фермент проявляє широкий спектр біологічної активності, включаючи антибактеріальну, протизапальну, антиоксидантну, імуномодельючу дію і навіть протівірусну дію. Антибактеріальна дія лізоциму проявляється у пошкодженні бактеріальних мембран [4-6]. Це робить його доцільним кандидатом для створення полімерних композитів, здатних забезпечувати локальний захист ранової поверхні від інфекційних ускладнень.

Саме тому, на основі діізоціанатного форполімеру отримано ППУ композиційні матеріали наповнені лізоцимом як полімерні композити для лікування ран і опіків, які завдяки присутності ферменту будуть володіти гідролітичною й антимікробною дією [7]. Вивчення цитотоксичних властивостей цих композитів є важливим етапом, який дозволяє оцінити їх біосумісність і визначити доцільність проведення по-

дальших доклінічних випробувань та впровадження матеріалів у клінічну практику.

Мета дослідження.

Дослідження цитотоксичності ППУ композиційних матеріалів з лізоцимом методом тканинної культури фібробластів.

Об'єкт і методи дослідження.

Об'єктами досліджень були ППУ та ППУ композиційні матеріали наповнені лізоцимом у кількості 1, 3 і 5 мас. % синтезовані за методикою [7].

Методом тканинної культури фібробластів проводили дослідження цитотоксичності на культурі тканин підшкірно-жирової клітковини безпородних білих пацюків згідно гармонізованого стандарту ДСТУ EN ISO 10993-5:2015 [8]. Культуру тканин отримували шляхом експлантації шматочків підшкірно-жирової клітковини, які поміщали у флакони Карреля з живильною сумішшю, що складається з середовища 199 та курячої плазми. У флакони також вносили зразки досліджуваних матеріалів розміром 0,5 x 0,5 см, потім додавали ембріональний екстракт й отримували згусток плазми (тверду фазу). Після формування твердої фази (10-15 хв.) вносили живильне середовище 199 та сироватку великої рогатої худоби (рідка фаза). Культивування проводили при 37°C, рідку фазу змінювали кожні три доби. Культури досліджували під мікроскопом у нативному стані. Дослідження росту та розвитку клітинних елементів підшкірної клітковини білих щурів проводили на 3, 7, 10, та 14 добу.

Результати дослідження та їх обговорення.

Оцінку цитотоксичності полімерних матеріалів і вплив пролонгованої форми лізоциму на динаміку росту фібробластів проведено за допомогою методу тканинної культури, що використовується як експрес-тест біосумісності медичних виробів. Дослідні флакони містили зразки ППУ та ППУ композиційних матеріалів з лізоцимом. Контрольні флакони – флакони

ПЕРСПЕКТИВИ РОЗВИТКУ МОРФОЛОГІЧНИХ І КЛІНІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

з експлантатами підшкірно-жирової клітковини без додавання полімерних зразків.

На 3 добу культивування у всіх флаконах фіксували появу перших міграцій фібробластичних елементів. Первинна зона міграції характеризувалася одиничними веретеноподібними клітинами, і тяжами, орієнтованими перпендикулярно поверхні експлантата. Зустрічалися і одиничні клітини неправильної полігональної форми.

На 5-7 добу культивування усі флакони демонстрували 3 зони росту: компакту, сітководну та зону одиничних мігруючих елементів. Компактна зона складається з клітин веретеноподібної та полігональної форми, сітководна – з пучків і тяжів клітин, розташованих сітководно (рис. 1).

Однак, у флаконах з ППУ композитами, наповненими лізоцимом (рис. 1 в, г, д, е) ріст фібробластичних елементів відбувається набагато краще, ніж

навколо ППУ. Спостерігається утворення нових веретеноподібних клітин, що спричиняють ущільнення зони мігруючих фібробластів, а також були помічені клітини, які мігрують в пори полімеру. У флаконі з ППУ (рис. 1б) щільність зони мігруючих клітин була меншою, форма клітин варіює від веретеноподібної до полігональної.

На 10 добу культивування усі флакони демонстрували тканинноподібний ріст. Навколо ППУ композиційних матеріалів з лізоцимом площі зон росту клітин були значно ширше порівняно з контролем і ППУ. Зона росту одиничних мігруючих клітин відрізнялася розширенням та більшою розмаїтістю клітинних форм. Ознаки дегенеративних змін окремих клітин були присутні у компактній зоні (рис. 2). У флаконі з ППУ (рис. 2б) на 10 добу культивування відбувалося збільшення клітин полігональної форми. Проте, дегенеративні зміни були помічені в компактній і сітко-

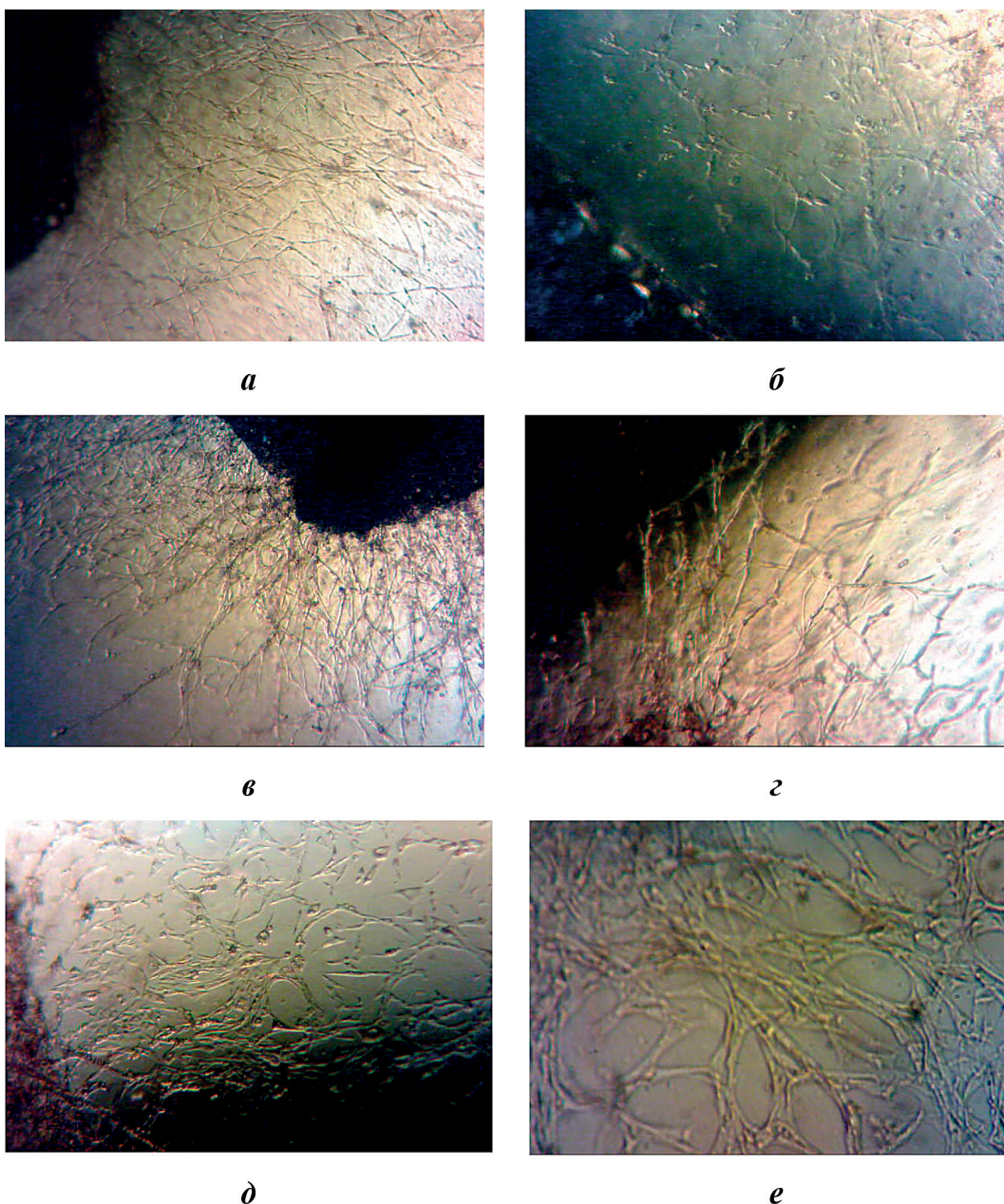
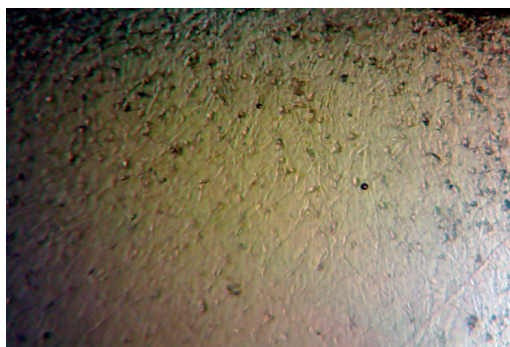
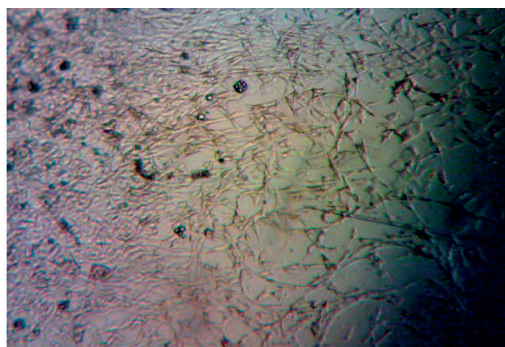


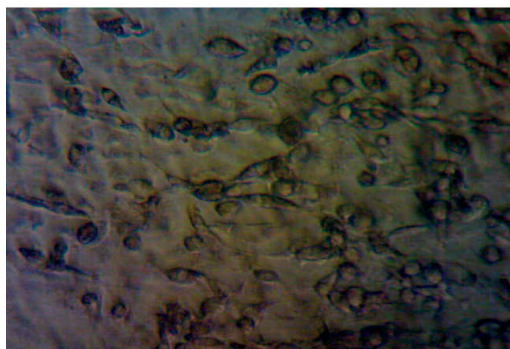
Рисунок 1 – Ріст культури фібробластів на 7 добу культивування у флаконі з контролем (а), ППУ (б), ППУ+лізоцим (1 % мас.) (в), ППУ+лізоцим (3 % мас.) (г), ППУ+лізоцим (5 % мас.) (д, е).



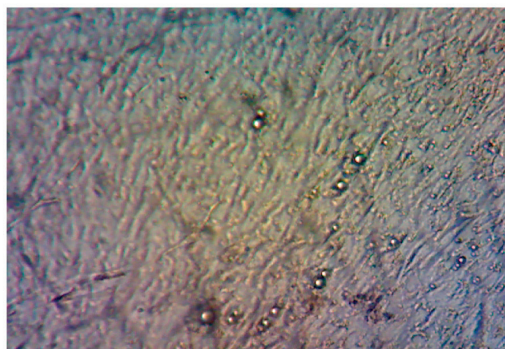
a



б

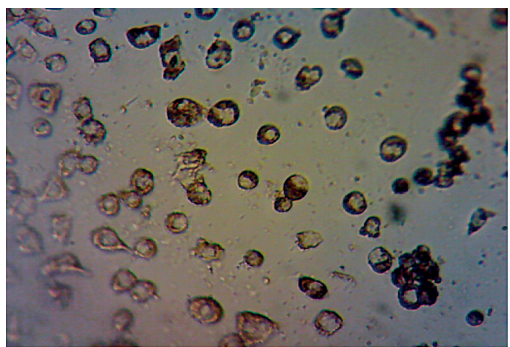


в



г

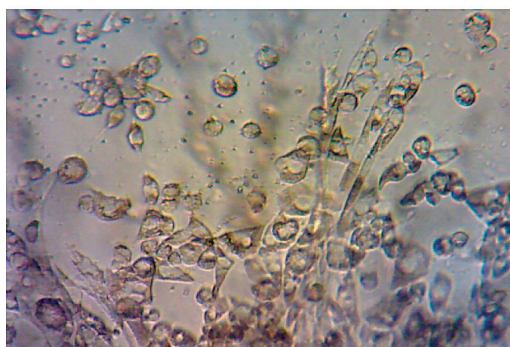
Рисунок 2 – Початок дегенеративних змін фібробластів на 10 добу культивування у флаконі з контролем (*a*), ППУ (*б*), ППУ+лізоцим (1 % мас.) (*в*), ППУ+лізоцим (5 % мас.) (*г*).



a



б



в

Рисунок 3 – Дегенеративні зміни культури фібробластів на 14 добу культивування у флаконі з контролем (*a*), ППУ (*б*), ППУ+лізоцим (3 % мас.) (*в*).

подібній зоні на відміну від флаконів з контролем та ППУ композитами з лізоцимом.

На 14 добу культивування у всіх флаконах була виявлена фаза дегенерації культур, що проявляється в значній вакуолізації цитоплазми та зернистому переродженні її в клітинах (рис. 3). Попри це, у флаконах зі зразками ППУ з лізоцимом (рис. 3в) у зоні мігруючих фібробластів продовжували з'являтися нові веретеноподібні та полігональні клітини.

Таким чином, за результатами морфологічного аналізу експлантатів підшкірно-жирової клітковини щурів, динаміка та характер росту клітинних елементів у дослідних флаконах суттєво не відрізнялися від контролю. Однак композиційні матеріали з лізоцимом демонстрували суттєві відмінності порівняно з ППУ та контролем.

Висновки.

Проведені дослідження методом тканинної культури фібробластів підтвердили, що пінополіуретанові композиційні матеріали, модифіковані лізоцимом, не мають цитотоксичного впливу на культивовані клітини. ППУ композити з лізоцимом демонстрували більш активний ріст фібробластичних елементів, ніж у контролі та ППУ, а на 14 добу досліджень – сповільнення дегенерації клітин. Отримані результати свідчать про те, що введення лізоциму до складу ППУ вказує на позитивний вплив ферменту на мікрооточення клітин. Це дозволяє зробити висновок, що ППУ композити з лізоцимом є перспективними матеріалами для використання в медицині, зокрема як полімерних матеріалів для лікування ран та опіків, тому потребують проведення подальших доклінічних та клінічних випробувань.

Література

1. Dong H, Li S, Jia Z, Luo Y, Chen Y, Jiang J, et al. A Review of Polyurethane Foams for Multi-Functional and High-Performance Applications. *Polymers*. 2024;16(22):3182. DOI: [10.3390/polym16223182](https://doi.org/10.3390/polym16223182).
2. Bružauskaitė I, Bironaitė D, Bagdonas E, Bernotienė E. Scaffolds and cells for tissue regeneration: different scaffold pore sizes-different cell effects. *Cytotechnology*. 2016;68(3):355-69. DOI: [10.1007/s10616-015-9895-4](https://doi.org/10.1007/s10616-015-9895-4).
3. Lavrador C, Mascarenhas R, Coelho P, Brites C, Pereira A, Gogolewski S. Elastomeric enriched biodegradable polyurethane sponges for critical bone defects: a successful case study reducing donor site morbidity. *J Mater Sci: Mater Med*. 2016;27:61. DOI: [10.1007/s10856-016-5667-8](https://doi.org/10.1007/s10856-016-5667-8).
4. Gnoumou E, Tran TA, Yang TT, Quach TT, Wang CY. Antibacterial, anti-inflammatory and anti-osteoclastogenic effects of synthetic mineralized lysozyme nanoparticles for treating infectious osteoporosis. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2025;320(4):145769. DOI: [10.1016/j.ijbiomac.2025.145769](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2025.145769).
5. Bastamy M, Raheel I, Elbestawy A, Diab M, Hammad E, Elebeedy L, et al. Postbiotic, anti-inflammatory, and immunomodulatory effects of aqueous microbial lysozyme in broiler chickens. *Animal Biotechnology*. 2024;35(1):2309955. DOI: [10.1080/10495398.2024.2309955](https://doi.org/10.1080/10495398.2024.2309955).
6. Bergamo A, Sava G. Lysozyme: A Natural Product with Multiple and Useful Antiviral Properties. *Molecules*. 2024;29(3):652. DOI: [10.3390/molecules29030652](https://doi.org/10.3390/molecules29030652).
7. Vislohuzova TV, Rozhnova RA, Galatenko NA. Development and research of polyurethane foam composite materials with lysozyme. *Polymer journal*. 2021;43(3):204-213. DOI: [10.15407/polymerj.43.03.204](https://doi.org/10.15407/polymerj.43.03.204).
8. Lebediev YeV, Konstantinov YuB, Galatenko NA, Yatsenko VP, Rozhnova RA, Maksymenko VB. Toksykolooho-hihienichni ta doklinichni doslidzhennia polimernykh materialiv i vyrobiv na yikh osnovi medychnoho pryznachennia. Kyiv: Naukova dumka; 2009. 99 s. [in Ukrainian].