

УДК 616.8-085.011.4:661.12:547.458(047.31)

УКПП

№ держреєстрації 0120U101972

Інв. №

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
СУМСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ (СумДУ)

40007, м. Суми, вул.Римського-Корсакова, 2 тел. (0542)33-53-39 факс (0542)33-40-58

e-mail: info@sci.sumdu.edu.ua

ЗАТВЕРДЖУЮ

Проректор з наукової роботи

д-р фіз.-мат.наук, професор

_____ А.М. Черноус

ЗВІТ

ПРО НАУКОВО-ДОСЛІДНУ РОБОТУ

КОМПОЗИТНІ НЕРВОВІ КОНДУЇТИ ДЛЯ ЛІКУВАННЯ КРИТИЧНИХ ДЕФЕКТІВ НЕРВІВ НА

ОСНОВІ ПОЛІМЕРНИХ НАНОФІБРИЛ ТА СТРУМОПРОВІДНИХ МАТЕРІАЛІВ

РОЗРОБКА ПЕРЕДУМОВ ГЕНЕРАЦІЇ УПОРЯДКОВАНИХ ТА

РАНДОМНООРІЄНТОВАНИХ 2D-МАТРИЦЬ ІЗ

ЕЛЕКТРОПРОВІДНОГО/ПРИРОДНОГО ПОЛІМЕРНОГО РОЗЧИНУ

(ПОЛІПРОЛ, ПОЛІАНЛІН/ХІТОЗАН, КОЛАГЕН) У КОМБІНАЦІЇ З

ФІБРИНОВИМ БІОГЕЛЕМ

(проміжний)

Керівник НДР,

к.б.н.

С.Д. Кириленко

2020

Рукопис закінчено 16 грудня 2020 р.

Результати роботи розглянуто науковою радою СумДУ, протокол від 23 грудня

2020 р. № 6

СПИСОК АВТОРІВ

Керівник НДР, к.б.н.	(16.12.2020)	С.Д. Кириленко (реферат; вступ; висновки)
Відповідальний виконавець Старш. наук. співроб. к.мед.н.	(16.12.2020)	В.В. Корнієнко (розділи 1, 2)
Старш. наук. співроб. к.х.н.	(16.12.2020)	Г.О. Яновська (розділ 2)
Фахівець I категорії	(16.12.2020)	В.С. Казбан (розділ 2)
Студент	(16.12.2020)	І.В. Любчак (розділ 2)
Лаборант	(16.12.2020)	Н.І. Безкоровайна (розділ 1)

РЕФЕРАТ

Звіт про НДР: 55 с., 1 табл., 18 рис., 73 джерела

ХІТОЗАН, ЕЛЕКТРОСПІНІНГ, АЕРОГЕЛЬ, ГЕМОСТАЗ, БІОСУМІСНІСТЬ, АНТИБАКТЕРІАЛЬНІ ВЛАСТИВОСТІ

Об'єкт дослідження – особливості перебігу процесів гемостазу при використанні нового кровоспинного матеріалу із природного полімеру (хітозану), виготовленого методом електроспінінгу.

Предмет дослідження – вивчення біосумісності та гемостатичної ефективності хітозанових мембран, виготовлених методом електропрядіння (електроспінінгу), порівняно зі звичайною хітозановою губкою та хітозановим аерогелем на підставі оцінки їх функціональних властивостей.

Для досягнення поставленої мети були визначені наступні завдання:

1. вивчити пористість матеріалів на основі хітозану залежно від способу їх виготовлення;
2. дослідити динаміку деградації (біодеградації) хітозанових матеріалів;
3. провести аналіз життєздатності клітин на підставі показників їх адгезії та проліферації в різні терміни дослідження;
4. порівняти антибактеріальну дію різних матеріалів на основі хітозану проти *E. coli* та *S. aureus* в динаміці експеримента;
5. тестувати *in vitro* взаємодію матеріалів із компонентами крові та оцінити критичні параметри активації системи гемостазу;
6. гемостатичну та біоактивну ефективність матеріалів дослідити *in vivo*, використовуючи модель печінкової кровотечі у щурів;
7. оцінити зразки тканин гістологічно для оцінки деградації біоматеріалів, реакції імунітету господаря та ступеню відновлення печінки.

Методи дослідження:

1. визначення пористості матеріалів з використанням скануючої електронної мікроскопії;

2. дослідження деградації та біодеградації *in vitro*;
3. експеримент на культурах клітин;
4. бактеріологічні дослідження;
5. вивчення показників системи гемостазу *in vitro*;
6. оцінка біодеградації та гемостатичних властивостей засобів *in vivo*;
7. гістологічні та імуногістохімічні дослідження.

У поточних дослідженнях ми розробили високопористі електроспінінгові мембрани, які демонструють біосумісність, відповідний режим деградації та гемостатичну взаємодію із кров'ю *in vitro*. Експеримент з печінковою кровотечею *in vivo* довів високу гемостатичну ефективність матеріалу ChESM та посилену біодеградацію в пізньому післяопераційному періоді. Результати дослідження мають важливе значення у розробці ефективних та дешевих багатовимірних електроспінінгових нановолокон на основі хітозану для застосування при паренхіматозних кровотечах.

ЗМІСТ

	С.
Перелік скорочень, умовних познач, одиниць і термінів	7
ВСТУП	8
1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	10
2 БІОСУМІСНІСТЬ ТА ГЕМОСТАТИЧНІ ВЛАСТИВОСТІ НОВИХ ХІТОЗАНОВИХ МЕМБРАН ВИГОТОВЛЕНИХ МЕТОДОМ ЕЛЕКТРОСПІНІНГУ	12
2.1 Матеріали і методи	12
2.1.1 Виготовлення хітозанових матеріалів	12
2.1.2 Скануюча електронна мікроскопія (SEM)	13
2.1.3 Пористість і щільність	13
2.1.4 Дослідження деградації та біодеградації (in vitro).....	14
2.1.5 Антибактеріальний тест	15
2.1.6 Аналіз цитотоксичності та Live/Dead фарбування	15
2.1.7 Показники системи гемостазу in vitro	16
2.1.8 Експеримент на тваринах	17
2.1.9 Гістологічні та імуногістохімічні дослідження	18
2.1.10 Статистична обробка даних	19
2.2 Результати дослідження властивостей хітозанових мембран та хітозанових губок	20
2.2.1 Скануюча електронна мікроскопія (SEM)	20
2.2.2 Пористість і щільність	21
2.2.3 Деградація та біодеградація	22
2.2.4 Антибактеріальний тест	23
2.2.5 Аналіз цитотоксичності та Live/Dead фарбуванн	24
2.2.6 Показники системи гемостазу in vitro	25
2.2.7 Експеримент на тваринах	25
2.2.8 Гістологічні та імуногістохімічні дослідження	26

2.3 Результати дослідження властивостей хітозанових мембран та хітозанових аерогелів	32
2.3.1 Скануюча електронна мікроскопія (SEM)	32
2.3.2 Пористість і щільність	33
2.3.3 Деградація та біодеградація	33
2.2.4 Антибактеріальний тест	34
2.3.5 Аналіз цитотоксичності та Live/Dead фарбуванн	35
2.3.6 Показники системи гемостазу <i>in vitro</i>	36
2.3.7 Експеримент на тваринах	37
2.3.8 Гістологічні та імуногістохімічні дослідження	42
2.4 Обговорення	44
ВИСНОВКИ.....	48
ПЕРЕЛІК ДЖЕРЕЛ ПОСИЛАННЯ	49

ПЕРЕІК СКОРОЧЕНЬ, УМОВНИХ ПОЗНАК, ОДИНИЦЬ І ТЕРМІНІВ

Ch – хітозан

PLA – полілактид

PLGA – полилактид-ко-гликолид

PEO – поліетиленоксид

МГМ – місцеві гемостатичні матеріали

RBC – еритроцитів

PLT – активацією тромбоцитів

ChSp – хітозанова гемостатична губка

ChEsM – хітозанова електроспінінгова мембрана

SEM – Скануюча електронна мікроскопія

SBF – імітованій рідині тіла

ADSC – стовбурові клітини, отримані з жиру

FBS – фетальна бичача сироватка

PI – йодид прорідію

FDA – діацетат флуоресцеїну

ШС – швидкість сорбції крові

ЗАК – загальний аналіз крові

КТ – кількість тромбоцитів

ШПТ – ширина розподілу тромбоцитів

TRIS EDTA – трис-ацетатный буфер

DAB –діамінобензидин

ChAG – аерогель хітозану

VEGF – судинний фактор росту ендотелію

bFGF – основний фактор росту фібробластів

EGF – епідермальний фактор росту

Ang1 – ангіопоетин-1

PDGF – фактор росту тромбоцитів

HGF – фактор росту гепатоцитів

ВСТУП

Паренхіматозні органи в основному вразливі при тупій травмі живота. Незважаючи на прогрес у хірургічних методах гемостазу, пошкодження печінки все ще є серйозною проблемою при хірургічному втручанні, і близько 80% ізольованих проникаючих пошкоджень печінки можна успішно лікувати, використовуючи неоперативне лікування [1]. Це стало стандартом використання постійного спостереження або ангіоемболізації [2]. Але неконтрольована кровотеча при пошкодженні печінки високого ступеня (шкала травм органів IV-V ступеня) спричиняє смерть у 42–49% у перші 24 години після травми та близько 14–23% важких пошкоджень печінки потребує екстреної операції [3, 4]. Стратегії печінкової гемостатики включають ектомію лівої частки, резекційну дебридацію, перигепатичну фіксацію, внутрішньопечінкову балонну тампонаду або місцеве використання гемостатичних засобів [5, 6].

Більшість місцевих гемостатичних матеріалів (МГМ) є біологічного походження і діють як активні та пасивні агенти. Активний МГМ, виготовлений з компонентів крові (наприклад, тромбіну або фібрину), може безпосередньо впливати на механізми згортання крові, що призводить до швидкого її згортання. Пасивний МГМ, виготовлений з целюлози, желатину, колагену тощо, діє шляхом поглинання плазми та агрегування клітин крові, що призводить до утворення матриксу для кращого згортання [7]. Реалізація активних МГМ в хірургічній практиці значно покращилася, однак їх застосування обмежене через високу вартість, ризики забруднення, короткий термін зберігання, низьку портативність, мінливість продуктивності та імунологічні побічні ефекти [8]. Незважаючи на широкий спектр МГМ, доступних на медичному ринку, все ще існує потреба у розробці нових матеріалів. Висока ефективність як кровоспинного агента, безпека, низька вартість, простота підготовки, відмінна здатність до біодеградації та біосумісність є основними вимогами до МГМ [9].

Перспективним біополімером, що демонструє як гемостатичні властивості, так і високу біосумісність, є хітозан (Ch) – природний полікатіонний полісахарид, який

в основному отримують із хітинового покриву краба або деяких грибів. Він демонструє високу біосумісність, біологічну здатність до розкладання, нетоксичність та бактеріостатичні властивості. Гемостатична здатність хітозану проявляється агрегацією еритроцитів (RBC), активацією тромбоцитів (PLT), і впливом на контактну систему активації [10-11]. Аміно- та гідроксильна групи Ch подібні до глікозаміногліканів печінки, що робить його найбільш придатним для використання [12]. Але властивості хітозану сильно залежать від молекулярної маси, ступеня деацетилювання і фізичної форми матеріалу [13]. Хітозан спричиняє найкращу агрегацію крові із 75-88% деацетилюванням та молекулярною масою 50-190 кДа [14]. Також хітозан може мати різні форми, такі як гель, плівка, губка, аерогель, мембрана. Для кровоспинних цілей переважно використовуються губки або порошки на основі хітозану, які мають значну сорбцію і прості у використанні [15]. Критичним обмеженням для губки на основі Ch є час біодеградації, який може призвести до тривалих післяопераційних ускладнень та зменшити регенеративний потенціал печінки. Ці недоліки стимулюють впровадження нових технологій для покращення біосумісності і біодеградації матеріалів на основі хітозану. Методи електропрядіння забезпечують можливість створення нановолокнистої структури з низькою щільністю, що може подолати це обмеження [16].

Електроспінінг – це універсальна техніка для отримання нанорозмірних волокон з різних природних та синтетичних полімерів, включаючи хітозан, його похідні та кополімерні суміші [17]. Деякі дослідження продемонстрували електроспінінг як вдосконалену техніку розробки передових технологій для створення з хітозану заміників шкіри, конструкції тканинної інженерії, штучних органів тощо [18]. Волокниста електроспінінгова мембрана подібна до позаклітинного матриксу і має переваги через високу пористість із змінним розподілом пор за розміром та вищим співвідношенням їх до площі поверхні.

1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

Операція на печінці – це складна процедура, яка застосовується у випадку розриву печінки, пухлин, метастазів раку прямої кишки або трансплантації печінки, і кровотеча є ускладненням, що загрожує протягом усієї операції. Гемостаз може бути здійснений різними способами, такими як моно- або біполярна електрокаутеризація, герметизуючі пристрої, такі як Ligasure®, аргоно-плазмова коагуляція, відсікання доступних трубчастих структур, накладення швів, нанесення місцевих гемостатичних матеріалів, тампонада рани [19]. Серед цих стратегій застосування місцевих гемостатичних матеріалів МГМ показало високу ефективність. МГМ сприяють коагуляції та запобігають рецидивам кровотеч, що зменшують час операції, обсяг переливання крові та ймовірність повторної лапаротомії [20].

Впровадження активних МГМ в хірургічну практику значно покращило клінічні результати. Однак їх застосування обмежене через високу вартість, ризики забруднення, короткий термін зберігання, низьку портативність, мінливість продуктивності та імунологічні побічні ефекти [21]. Незважаючи на широкий асортимент МГМ, доступний на медичному ринку, все ще існує необхідність у розробці нових матеріалів. Очікуються високі гемостатичні показники, безпека, низька вартість, проста підготовка, відмінна біологічна здатність та біосумісність [22]. Колаген, желатин, шовк та хітозан є привабливими ресурсами для подальшого розвитку кровоспинних матеріалів [23-25]. Хітозан (Ch), поліаміносахарид, отриманий шляхом деацетилювання хітину, є найбільш перспективним матеріалом для МГМ завдяки високій біосумісності, біодеградації, гнучкості, а також антимікробній та гемостатичній активності [26]. Гемостатичні ефекти Ch включають агрегацію еритроцитів, стимуляцію тромбоцитів та активацію контактної системи з утворенням 3D-структури [27, 28]. Ch може бути модифікований у різні форми: плівки, губки, аерогелі, частинки та волокна, які придатні для гемостатичного застосування [29, 30].

Декілька гемостатичних матеріалів на основі Ch, схвалених для зовнішнього клінічного застосування, в основному для контролю артеріальних кровотеч (Celox®, TraumaStat®, пов'язка HemCon® тощо) [31]. В останні роки для контролю паренхіматозних кровотеч інтенсивно вивчаються численні губки на основі Ch [32, 33]. Наші попередні результати показали високу ефективність просоченої хітозаном марлі для зупинки артеріальних кровотеч. Ми продемонстрували достатню взаємодію речовин і крові та помітні антибактеріальні ефекти Ch-аерогелю *in vitro* [34-35]. Незважаючи на високу ефективність *in vitro*, сорбційну здатність крові та низьку токсичність, продемонстровані в різних дослідженнях, існують деякі недоліки матеріалів на основі Ch через використання оцтової кислоти як розчинника для його обробки. Оцінка довгострокових результатів *in vivo* вказувала на недостатню деградацію та місцеву запальну реакцію. Крім того, традиційні губки не можуть зберегти свою форму при стисненні через свою крихкість [36]. Ці недоліки стимулюють впровадження нових технологій для поліпшення біосумісності та біодеградації матеріалів на основі Ch.

Електроспінінг – це універсальна техніка, яка дозволяє отримувати нанорозмірні волокна з природних та синтетичних полімерів, включаючи хітозан, його похідні та суміші кополімерів [37-38]. Волокнисті мембрани, виготовлені методом електроспінінгу, подібні до позаклітинного матриксу та мають переваги високої пористості [39]. Попередні дослідження продемонстрували високу згортаючу активність крові та біосумісність електроспінінгових матеріалів на основі хітозанів. Однак чрез швидку деградацію їх використання у клінічній практиці обмежене [40]. Численні дослідження показали застосування різних полімерів, включаючи PLA, PLGA та PEO, для армування хітозанових мембран [41]. Проте дані щодо ефективності та властивостей електроспінінгових кополімерних матеріалів є обмеженими [42]. Це дослідження мало на меті оцінити гемостатичну ефективність, біосумісність та деградацію нещодавно розкритих хітозанових мембран, виготовлених методом електроспінінгу, порівняно з хітозановим аерогелем та звичайними хітозановими губками.

2 БІОСУМІСНІСТЬ ТА ГЕМОСТАТИЧНІ ВЛАСТИВОСТІ НОВИХ ХІТОЗАНОВИХ МЕМБРАН ВИГОТОВЛЕНИХ МЕТОДОМ ЕЛЕКТРОСПІНІНГУ

2.1 Матеріали і методи

2.1.1 Виготовлення хітозанових матеріалів

Порошок хітозану (Ch) з низькою молекулярною масою та 95% ступенем деацетилювання, порошок поліетиленоксиду (PEO) був придбаний у компанії Glentham Life Sciences. L-аспарагінова кислота та L-глутамінова кислота, 1,2-пропанодіол, 95% етанол та лізоцим людини у Sigma Aldrich, Сент-Луїс, Міссурі, США.

Хітозанові губки (ChSp) були виготовлені з хітозану та 1% оцтової кислоти (YuDa Chemicals, Циндао, КНР). Розчин перемішували протягом 24 годин при кімнатній температурі до повної однорідності. Готовий розчин поміщали в реакційний посуд з висотою колони не більше 1,0 см. Розчин полімеру заморожували при $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ протягом 24 годин, а потім сушили у вакуумній камері (0,1 Па, 24 години).

Виробництво аерогелю хітозану (ChAG) проводилось у мікрохвильових умовах відповідно до принципів зеленої хімії. 0,5 г Ch розчиняли у водному розчині суміші L-аспарагінової та L-глутамінової амінокислот. Через 30 хвилин додавали 10 мл пропіленгліколю. Випромінювання мікрохвиль впливало на однорідний розчин протягом 1 хв до повного випаровування води (потужність 900 Вт). Потім приготовлений розчин зшивали протягом 2 хв (потужність 900 Вт). Отримані Ch гідрогелі промивали дистильованою водою до рН 7 і ліофілізували для перетворення в аерогелі.

Хітозанові електроспінінгові мембрани (ChEsM) були виготовлені з порошку хітозану і поліетиленоксиду (PEO) порошку (400 г/моль). Ch (2 г) та PEO (3 г) розчиняли у 100 мл 50% оцтової кислоти при перемішуванні протягом 24 годин при

кімнатній температурі. Після повного отриманого розчинення розчини змішували у співвідношенні PEO/Ch=3/1. Провідність отриманого розчину становила 1487 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Процес електроспінінгу проводили при кімнатній температурі та відносній вологості повітря 15-20% в приладі RT-Advanced machine (Linari Engineering, Піза, Італія). Розчин Ch/PEO виливали у скляний шприц об'ємом 10 мл з діаметром голки 0,6 мм. Відстань між голкою та колектором становила 12 см. Параметри електроспінуну встановлювали наступним чином: швидкість потоку 0,2 мл/год, напруга, що подавалася на голку 17 кВ, швидкість обертання колектора (діаметром 10 см) становила 800 об/хв. Виготовлену мембрану сушили в вакуумі при кімнатній температурі протягом 12 годин.

В експерименті були використані *S. aureus* та *E. coli*, отримані з колекції бактерій Сумського державного університету. Усі бактеріологічні середовища були взяті з HiMedia (Махараштра, Індія), а Alamar Blue - від Invitrogen (Карлсбад, Каліфорнія, США). Для дослідження культури клітин усі середовища та реагенти були придбані у Gibco®, Gaithersburg, MD, США.

2.1.2 Скануюча електронна мікроскопія (SEM)

Зразки покривали тонким (30–50 нм шаро срібла у вакуумній установці ВУП-5М (SELMІ, Суми, Україна). Зображення губок SEM були спостережені FEI Inspect S50B (FEI, Брно, Чехія) за допомогою вторинного електронного детектора Еверхарта – Торнлі. Оцінку морфології нановолокна та аналізу волокнистої структури вимірювали на зображеннях SEM, використовуючи плагін DiameterJ 1.018w для Фіджі (розподіл ImageJ 1,51 w).

2.1.3 Пористість і щільність

Витіснення ізопропанолу було використане для визначення пористості та щільності матеріалів хітозану. Зважені зразки поміщали у відомий об'єм ізопропанолу на 5 хвилин. Об'єм просочених зразків та решту ізопропанолу

вимірювали після видалення гемостатичного матеріалу. Отримані дані використовувались для розрахунку щільності (рівняння (1)) та пористості (рівняння (2)):

$$d = W / (V2 - V3), \quad (1)$$

$$p = (V1 - V3) / (V2 - V3) \times 100\% \quad (2)$$

де:

d – щільність, г/см³;

p – пористість, %;

W – вага зразка, г;

$V1$ – початковий об'єм ізопропанолу, см³;

$V2$ – об'єм ізопропанолу з зануреним зразком, см³;

$V3$ – об'єм ізопропанолу після вилучення зразка, см³.

2.1.4 Дослідження деградації та біодеградації (in vitro)

Деградацію матеріалів (D) in vitro оцінювали в імітованій рідині тіла (SBF) з рН 7,4 та концентраціями іонів, приблизно рівними концентраціям у плазмі крові людини. Зважені зразки занурювали в стерильний розчин SBF на сім днів. Зразки виймали, промивали дистильованою водою, сушили і зважували кожні 12 годин.

Дослідження біодеградації (B) проводили з людським лізоцимом - ферментом, що гідролізує β-глікозидні зв'язки. Лізоцим розчиняли у стерильному SBF до концентрації 10 мг/л при 37 °С для імітації природних умов. Зважені зразки занурювали в розчин лізоциму на сім днів. Хітозанові матеріали виймали, промивали дистильованою водою, сушили та зважували кожні 24 год. Деградацію та біодеградацію розраховували, використовуючи таке рівняння (3):

$$(B) D = (W0 - Wt) / W0 \times 100\% \quad (3)$$

де:

(B) D – ступінь (біо) деградації, %;

W₀ – початкова вага аналізованого зразка, g;

W_t – вага зразка через час t, хв.

2.1.5 Антибактеріальний тест

Антибактеріальні властивості зразків досліджували щодо грамнегативної кишкової палички (*E. coli*, В 926) та грампозитивного золотистого стафілокока (*S. aureus*, В 918). Культури бактерій інкубували в поживному бульйоні протягом 24 годин. Зразки (50 мг) готували в асептичних умовах і розміщали в стерильних пробірках з мікроорганізми, у концентрації, еквівалентній 10^5 колонієутворюючих одиниць (КУО)/мл ($5 \log_{10}$ КУО), суспендованій у 2 мл живильного бульйонного середовища. В якості негативного контролю використовували зразки без мікроорганізмів та бактерії, суспендовані у живильному бульйонному середовищі без зразків. Зразки та контролю інкубували протягом 2, 4, 6, 8, 10 та 24 год при 37 °С. Аліквоти по 100 мкл з пробірок висівали на поверхню поживного агару і потім культивували при 37 °С протягом 24 годин. Мікроорганізми підраховували у \log_{10} .

2.1.6 Аналіз цитотоксичності та Live/Dead фарбування

Колориметричний аналіз Alamar Blue та фарбування Live/Dead проводили для оцінки впливу гемостатичних матеріалів хітозану на життєздатність клітинних ліній U2OS. Клітинні лінії U2OS були отримані з Університету Умео (Швеція) і культивовані в модифікованій Дульбекко середовищі/поживній суміші Eagle F-12 (DMEM, Gibco, США), доповненій 10% фетальною бичачою сироваткою, 100 од/мл пеніциліну, 100 мкг/мл стрептоміцину, 2,5 мкг/мл амфотерицину В (Gibco, США) за умови 37 °С, 5% CO₂. Клітини висівали в 24-лункові планшети при щільності 2×10^4 клітин/лунку. Після 12 годин інкубації зразки хітозану (40 мг) додавали до клітин у кожній лунці. Через 24 години в кожному лунку додавали 100 мкл (10% обсягу середовища) розчину Alamar Blue. Для контролю використовували лунки, що містять лише клітини та середовище без зразків. Планшети інкубували протягом 4

год при 37 °C у темряві. 100 мкл середовища з кожної лунки переносили в інший 96-лунковий планшет, і поглинання вимірювали за допомогою зчитувача планшетів Multiskan FC (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, США) при довжинах хвиль 570 і 600 нм. Тест на Alamar Blue повторювали на 3-й та 7-й день з трьома повторами для кожного зразка.

Для фарбування Live/Dead ADSC виділяли з ліпоаспірату ферментативним розщепленням в 0,1% колагенази IA та 0,1% пронази з 2% фетальної бичачої сироватки (FBS) (Sigma-Aldrich, США) протягом 1 год при 37 °C. Експерименти із використанням культури клітин людини *in vitro* проводились відповідно до питань експериментів Кодексу етики Всесвітньої медичної асоціації (Гельсінська декларація). У всіх випадках добровільні інформовані згоди були підписані донорами ADSC. Отриману суспензію клітин переносили в матрас площею 25 см² (SPL, Корея) і культивували в наступному контрольному середовищі росту: модифікований MEM- α (Sigma-Aldrich, США) з 10% FBS (Sigma-Aldrich, США), 2 мМ L-глутаміну, 100 ОД/мл пеніциліну, 100 мкг/мл стрептоміцину та 1 нг/мл bFGF-2 (Sigma-Aldrich, США). Клітини культивували в інкубаторі CB210 (Binder, Німеччина) при 37 °C в атмосфері насиченої вологості, 5% CO₂ і 5% O₂.

Для оцінки цитотоксичності клітини висівали зі щільністю 2×10^5 клітин на 1 зразок. Через 2 дні (48 год) зразки фарбували PI (йодидом пропідію) (Sigma-Aldrich, США) та FDA (діацетат флуоресцеїну) (Sigma-Aldrich, США). Кількість загиблих та живих ADSC у різних групах підраховували за допомогою флуоресцентної мікроскопії (фільтри FITC та Texas Red; Carl Zeiss, Німеччина) та програмного забезпечення ZEN 2012.

2.1.7 Показники системи гемостазу *in vitro*

Хітозанові кровоспинні матеріали вагою 40 мг поміщали в Becton Dickinson Vacutainers® з 3,6 мг ЕДТА 2 мл. 40 мл цільної людської цільної крові (WhB) було отримано від двох добровольців медсестрою в Медичному інституті Сумського державного університету. Дослідження було попередньо схвалено Комітетом з

етики Сумського державного університету, відповідна поінформована згода була отримана від усіх добровольців. Кров додавали в кожную пробірку. Вакутейнери струшували протягом 10 хвилин, а всі зразки виймали та зважували. Швидкість сорбції крові (BS) розраховували наступним чином (4):

$$BS = W2 - W1 \quad (4)$$

де:

W1 – початкова вага (40 мг);

W2 – вага після взаємодії з кров'ю, мг.

Загальний аналіз крові (ЗАК) проводили на гематологічному аналізаторі CELL-DYN 3700 (ABBOTT, Ірвінг, Техас, США) з використанням реагентів DIAGON (Будапешт, Угорщина). Оцінювали кількість тромбоцитів (КТ, $\times 10^9/\text{л}$), ширину розподілу тромбоцитів (ШРТ, %) та середній об'єм тромбоцитів (СОТ, fL). В якості контролю використовували необроблену кров.

Після зважування зразки фіксували у 2% глутаральдегіді протягом 2 год, потім його зневоднювали в етанолі. Всі зразки після висихання покривали шаром срібла (30-50 нм) для SEM.

2.1.8 Експеримент на тваринах

Для оцінки ефективності матеріалів на основі Ch використовували шістдесят 24-тижневих лабораторних щурів-самців з масою тіла 250–300 г. Тварин розміщували при 22 ± 2 °C протягом 12-годинного циклу світло/темрява з доступом до їжі та води за необхідності. Щурів розділили на три групи по 20 тварин у кожній. Наступні гемостатичні матеріали були розділені на групи: Tachocomb® (Takeda Austria GmbH) як стандартне лікування, ChAG, ChSp та ChEsM. Утримання тварин та всі експериментальні процедури проводились відповідно до Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовується для експериментальних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986 р.); Директива

2010/63/ЄС Європейського Парламенту та Ради про захист тварин, що використовуються в наукових цілях (2010 р.). Процедури були затверджені Комітетом з етики Сумського державного університету.

Тварин знеболювали шляхом внутрішньочеревної ін'єкції 7 мг/кг кетаміну (АТ «Фармак», Україна) та 10 мг/кг ксилазину (Alfasan International B.V, Нідерланди). Лапаротомію середньої лінії 2 см проводили в стерильних умовах. Для імітації кровотечі з рани на діафрагмальній поверхні лівої медіальної частини печінки повної товщини була проведена повністю проникаюча 4-мм ударна біопсія. Гемостатичний матеріал негайно застосовували для заповнення дефекту печінки (рис. 2.1). Час кровотечі оцінювали після нанесення гемостатичного матеріалу. Рана живота була закрита двома шарами розсмоктуючих швів.

Тварини були евтаназовані передозуванням кетаміном (100 мг/кг) на 7, 30 та 60 дні після операції. Уражену ділянку печінки з навколишніми тканинами видаляли і піддавали гістологічному дослідженню.

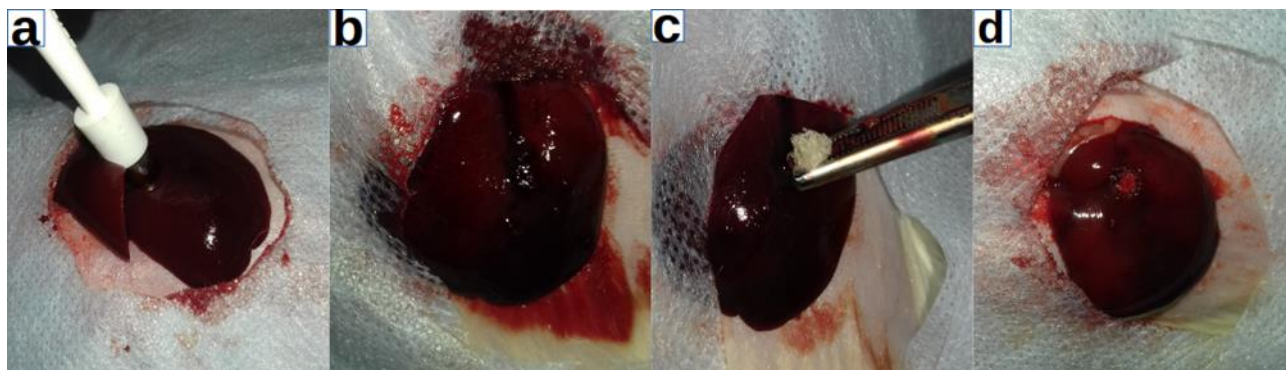


Рисунок 2.1 – Процедура біопсії перфорацією печінки (а), печінкової кровотечі (b), гемостатичного застосування (c) та зупиненої кровотечі (d)

2.1.9 Гістологічні та імуногістохімічні дослідження

Тканини печінки фіксували в 10% нейтральному забуференому формаліні протягом 24 годин і обробляли в автоматизованому гістопроесорі (Milestone LOGOS Hybrid Tissue Processor, Milestone, Італія). Блоки, вкладені в парафін, вирізали товщиною 4 мкм (мікротом Thermo Scientific HM 340E). Зрізи фарбували

гематоксиліном та еозином, використовуючи Dako Cover Stainer (Agilent, США) для рутинної гістологічної оцінки. Крім того, використовували гістохімічне фарбування: фарбування толуїдиновим синім для візуалізації опасистих клітин, фарбування толуїдиновим синім для диференційованих колагенових волокон та фарбування Гоморі для візуалізації ретикулярних волокон.

Гістологічний аналіз включав оцінку ремоделювання тканин, поступової деградації матеріалу, вогнищевої проліферації та реакції клітинних елементів, відповідальних за деградацію в місці резекції з часом. Оцінку запальної інфільтрації проводили на різних термінах дослідження, використовуючи систему напівкількісних балів. Оцінювали кожну пробу в 5 точках у гемостатичному матеріалі та навколо нього при великому збільшенні відповідно до ISO 10993-6 "Біологічна оцінка біомедичних зразків, частина 6 – тест на місцеві ефекти після імплантації".

Імуногістохімія проводилася згідно стандартного протоколу. Тканини депарафінізували та гідратували, а активність ендогенної пероксидази блокували, використовуючи 3% метанол у перексиді водню. Далі проводили пошук антигену на водяній бані при 98 °C за допомогою TRIS EDTA або цитратного буфера (pH 6) з подальшою інкубацією з первинними антитілами. Після промивання додавали мічене вторинне антитіло (Envision Detection System, Dako). Активність пероксидази визначали за допомогою діамінобензидину (DAB) - тетрагідрохлоридної рідини та субстрату системи хромогену (Dako). Реакцію зупиняли дистильованою водою, зрізи фарбували гематоксиліном і встановлювали в монтажному середовищі Річарда-Аллана (ThermoFisher). Для візуалізації макрофагів використовували наступні антитіла: CD68 (DAKO, Клон KP1) та CD163 (Cell Marque, Клон MRQ-26) та Ki-67 (DAKO, Клон MIB-1) для оцінки проліферації клітин.

2.1.10 Статистична обробка даних

Результати представлялися як середнє значення±стандартні відхилення. Дві групи порівнювали за допомогою t-критерію. Коли порівнювали більше двох груп,

вводили ANOVA. $p < 0,05$ вважали статистично значущим. Статистичний аналіз проводили за допомогою GraphPad Prism 8.0. та IDE Rstudio (версія 1.2.5033) для програмного пакету R (версія 3.4.4) (з <http://www.rstudio.org> та <https://www.R-project.org>).

2.2 Результати дослідження властивостей хітозанових мембран та хітозанових губок

2.2.1 Скануюча електронна мікроскопія (SEM)

Матеріали на основі Ch демонстрували адекватну пористість з різними структурами залежно від способу виготовлення (рис. 2.2). ChSp виготовляли з пластівців різної форми, які оточують пори з медіаною площі пор 164 мкм^2 (IQR 47-767). Великі відкриті пори можуть прискорити поглинання рідини, яка необхідна для гемостатичних матеріалів. Пластини ChSp мали звивисту поверхню, що додатково збільшувало ефективну площу контакту. На противагу ChSp ChEsM був виготовлений з випадково орієнтованих волокон із середньою товщиною 160 нм (IQR від 86 до 236). Деякі дослідження продемонстрували, що випадково орієнтовані волокна демонструють прогресивний потенціал регенерації тканин завдяки подібності із позаклітинним матриксом [43-44]. Вважається, що нанодіаметр волокна сприяє швидшій біодеградації ChEsM [45]. На відміну від ChSp, середня площа пор ChEsM становила $0,06 \text{ мкм}^2$ (IQR 0,02-0,16). Однорідність волокон та пор може передбачати рівну взаємодію з клітинами крові із збільшенням гемостатичної здатності.

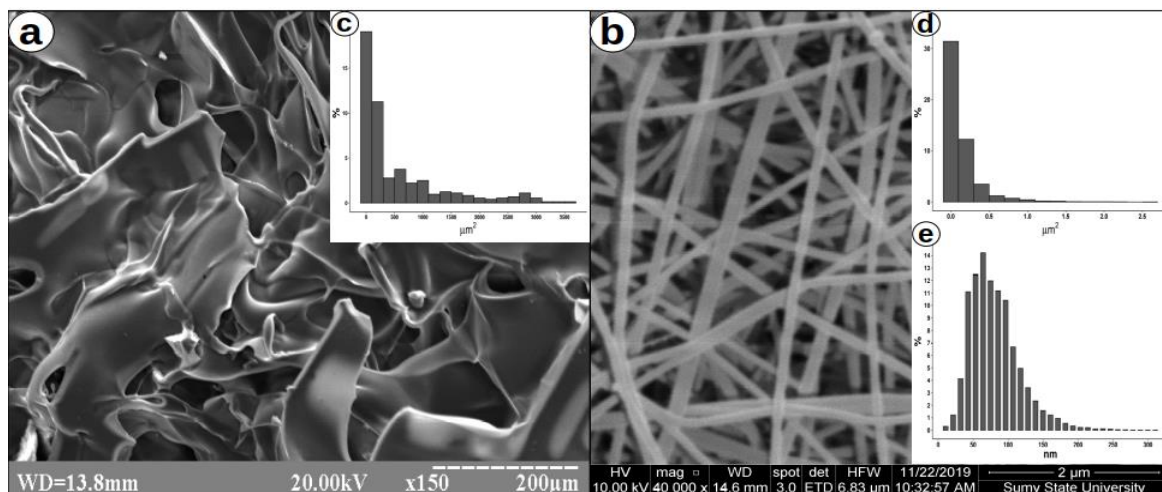


Рисунок 2.2 – Скануюче електронно-мікроскопічне зображення ChSp (a) з аналізом площі пор (c), структури (b), площі пор (e) та діаметр волокна (d) ChEsM

2.2.2 Пористість і щільність

Вимірювання витісненої частки ізопропанолу (рис. 2.3. а, с) показали, що ChEsM мав значно вищу пористість $77\pm 3\%$ проти ChSp $71\pm 5\%$ ($p < 0,001$). Менша пористість губок, ймовірно, зумовлена великою кількістю закритих пір. Щільність матеріалів на основі хітозану була значно нижчою ($p < 0,05$) для ChEsM $0,08\pm 0,07$ г/см³, тоді як для ChSp вона становила $0,089\pm 0,05$ г/см³. Маса матеріалу, що використовується для створення одиниці об'єму гемостатичного матеріалу, в першу чергу залежить від способу синтезу, а також властивостей полімеру. Щільність гемостатику додає скелетну функцію, необхідну при тампонаді рани [46]. Але після зупинки кровотечі щільно упакована губка повільніше розсмоктується [47].

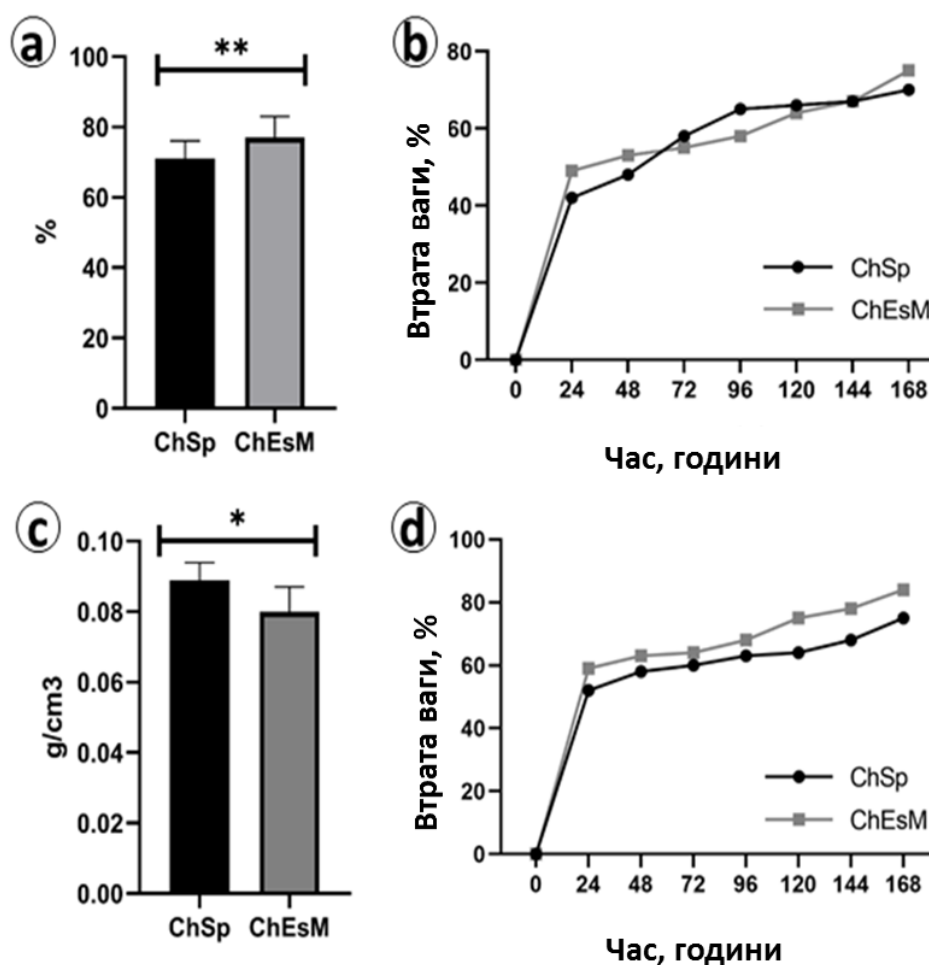


Рисунок 2.3 – Пористість (а), щільність (с), розпад у SBF (b) та біодеградація в розчині лізоциму (d) гемостатичних матеріалів

2.2.3 Дослідження деградації та біодеградації (in vitro)

Дослідження деградації показали, що обидва матеріали швидко втрачали вагу в SBF та розчині лізоциму (рисунок 2.3 b, d). Протягом перших 2 днів дослідження рівень деградації був вищим для ChEsM і досяг 53%. На 3 та 4 день деградація ChEsM стала повільнішою, однак вона була значно ($p < 0,05$) більшою, ніж ChSp (65% проти 58%). У наступні два дні швидкість деградації ChSp стабілізувалась і наприкінці дослідження (день 7) досягла 70%. З іншого боку, деградація ChEsM поступово прискорювалась і досягла 75%, що було значно вищим ($p < 0,05$) порівняно з ChSp.

Біодеградація в розчині лізоциму дещо відрізнялася від деградації в розчині FBS. Примітно, що в перший день дослідження втрата ваги в лізоцимі була на 10% вищою для обох зразків порівняно з розчином FBS. Ферментативне розщеплення ChSp було більш рівномірним і на 7 день досягло 75% втрати ваги. Навпаки, спостерігалось прискорення швидкості біодеградації ChEsM з 5-го дня ($p < 0,05$), що призвело до 84% втрати ваги в кінці дослідження. Для місцевих гемостатичних матеріалів важливим є баланс ефективності та швидкості деградації [23]. Занадто швидка деградація збільшує ризик повторної кровотечі, занадто тривала деградація може порушити регенерацію органів [48].

2.2.4 Антибактеріальний тест

Існує загальний ризик зараження рани під час кровотечі через відсутність захисних бар'єрів в організмі. Гемостатичні матеріали, такі як губки, повинні мати антибактеріальні властивості, щоб зменшити ризик системної інфекції [49]. Дві репрезентативні бактерії (*S. aureus* та *E. coli*) використовувались для аналізу потенційної антибактеріальної активності губок та мембран. Криві росту обох штамів після інкубації з ChEsM та ChSp протягом 24 год показані на рисунку 2.4. Через 2 години активний ріст мікроорганізмів був відзначений для зразків ChEsM. Кількість мікробних колоній дорівнювала позитивному контролю через 6 год для *E. Coli* та 8 год для *S. aureus*. 24-годинне дослідження інгібуючої активності показало слабкий антибактеріальний ефект ChEsM щодо обох патогенів, що вказує на те, що модифікація хітозану методом електроспінінгу не покращила його антибактеріальну активність. ChSp показав вищу протимікробну активність у порівнянні з ChEsM (більш виражену щодо грам-негативних бактерій). Зразок ChSp проявляв антимікробну дію в відношенні обох штамів в протягом 6 годин. Проте після 8 годин спільного культивування з цими зразками КУО/мл відповідали даним позитивного контролю. Його нижча швидкість деградації може пояснити більш тривалий інгібуючий ефект ChSp на відміну від ChEsM [50]. Отже, губка ChSp може бути застосована для запобігання росту бактерій у перші години

після операції через її явний бактеріостатичний ефект на ранніх етапах аналізу *in vitro*.

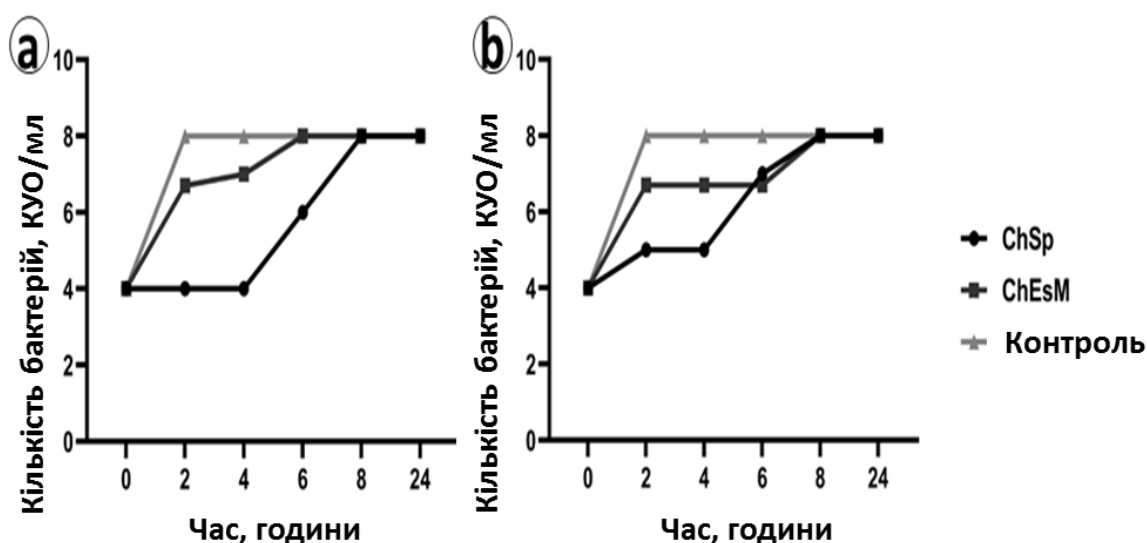


Рисунок 2.4 – Кількість бактеріальних клітин, індукованих ChSp та ChEsM на *S. aureus* та *E. coli*

2.2.5 Аналіз цитотоксичності та Live/Dead фарбування

Обидва гемостатичні матеріали показали свою нетоксичність після 48 годин культивування та Live/Dead фарбування за допомогою FDA/PI (рис. 2.5. а, б). Клітини були добре прикріплені і рівномірно розподілені на поверхні зразків.

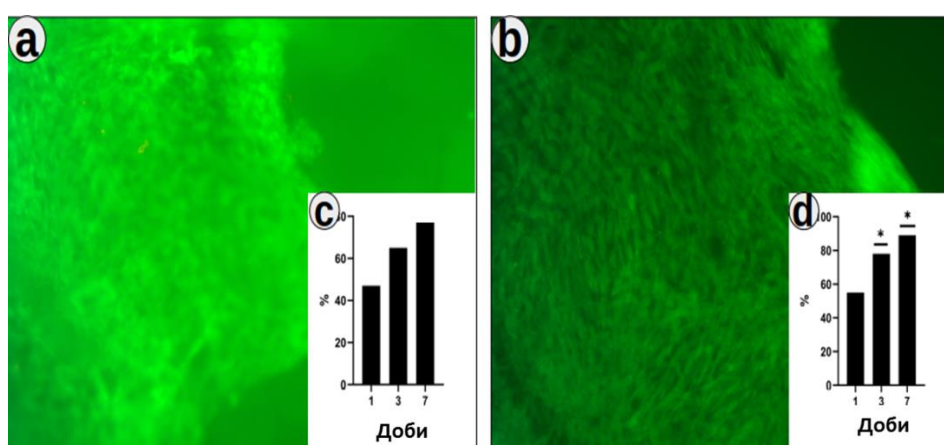


Рисунок 2.5 – ChSp (а), ChEsM (б) фарбування FDA/PI через 48 годин культивування клітин та життєздатність клітин ChSp (с), ChEsM (д) з використанням аналізу відновлення резазурину

Аналіз зниження рівня резазурину (рис. 2.5 с, d) продемонстрував достовірно ($p < 0,05$) кращу адгезію клітин у перший день для ChEsM. Адгезійні властивості необхідні як для швидкого гемостазу, так і для прискорення запуску процесів регенерації. ChEsM має значно ($p < 0,05$) більш високу клітинну проліферацію на своїй поверхні як на 3-й день і 7-й день культивування. Структура мембрани сприяла зростанню клітин на її поверхні та проникненню клітин у глибші шари. Це важливо для повної біодеградації гемостатичного матеріалу та відновлення пошкодженого органу.

2.2.6 Тест на взаємодію з кров'ю

Після взаємодії з цільною кров'ю обидва матеріали адгезували на своїй поверхні значу кількість клітин крові (рис. 2.6). ChSp мав більші показники сорбції крові ($p < 0,05$) у порівнянні з ChEsM. Обидва гемостатичні матеріали значно ($p < 0,05$) знижували кількість тромбоцитів без різниці між групами. Хітозанові гемостатики не виявили різниці ($p > 0,05$) для ширини розподілу тромбоцитів та середнього об'єму тромбоцитів, хоча була значна ($p < 0,05$) різниця з контролем. Ці гематологічні параметри можуть свідчити про активацію тромбоцитів, яка є важливим компонентом першої фази гемостазу [51].

2.2.7 Експеримент на тваринах

Під час гемостатичного дослідження жодна тварина не загинула. Експериментальні групи між собою суттєво не відрізнялись за віком вагою, втратою крові до дослідження або вагою пошкодженої печінки. У щурів не виявлено порушень гемодинаміки або погіршення поведінкової реакції. Очевидної різниці в часі кровотечі не спостерігалось ($p > 0,05$). ChSp повністю зупинив кровотечу на $80,6 \pm 5,7$ с. а для часу ChEsM повний гемостаз становив $84,5 \pm 4,8$ с. Повторне застосування гемостатичних засобів не було необхідним ні в якому випадку.

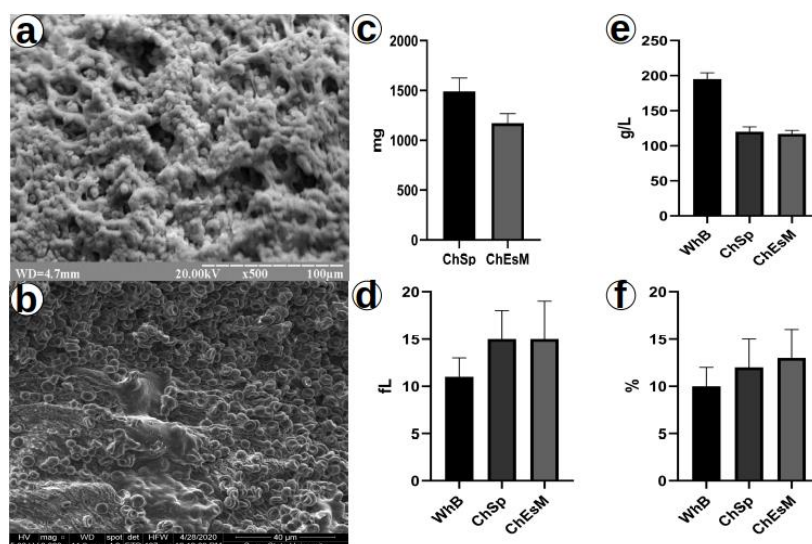


Рисунок 2.6 – SEM ChSp (a), ChEsM (b) та гематологічні параметри: кількість тромбоцитів (e), середній об'єм тромбоцитів (f) та ширина розподілу тромбоцитів (d) після взаємодії з кров'ю

2.2.8 Гістологічні та імуногістохімічні дослідження

Через тиждень після хірургічного втручання та застосування біоматеріалів гістологічний аналіз виявив, що обидва гемостатичні засоби добре адаптовані до дефекту печінки. Матеріали заповнювали порожнини, зроблені під час перфораційної біопсії, і були відділені від тканин печінки товстою капсулою з незрілої сполучної тканини, багатою численними клітинами. Важливо, що пошкодження печінки та застосування матеріалів супроводжувались запальною реакцією, яка відрізнялася за інтенсивністю та клітинним складом залежно від застосовуваного біоматеріалу. Крім того, особливості активної регенерації були виявлені на межі з навколишніми тканинами печінки через тиждень після операції.

Оцінюючи динаміку біодеградації зразків *in vivo*, ми виявили, що незважаючи на однаковий розмір імплантованих матеріалів на ранніх термінах після операції ($p=0,123$ за 1 тиждень), діаметр ChEsM поступово зменшувався на 4 ($p=0,005$) та 8 тижні ($p=0,0001$) порівняно з ChSp. Як результат, наприкінці експерименту діаметр ChEsM був приблизно вдвічі меншим за початковий розмір (рис. 2.7). На відміну від цього, темпи біодеградації ChSp були набагато повільнішими.

Відповідно, розмір печінки мав подібні характеристики. Хоча ChSp залишався незмінним протягом 1-го місяця після операції, щури із застосуванням ChEsM продемонстрували поступове зменшення дефекту тканини печінки. Це було пов'язано з витонченням капсули навколо ChEsM (рис. 2.7 с) та прогресивним вrostанням тканин в межі зразка ($p=0,014$ на 4 тижні та $p=0,002$ на 8 тижні). Менш явним було скорочення дефекту печінки у щурів із застосуванням ChSp, яке корелювало із вrostанням тканин у гемостатичну губку. Варто зазначити, що різновиди в структурі біоматеріалів впливали на взаємодію з клітинами хазяїна. На додаток до вrostання сполучної тканини (рис. 2.7 d) та наявності численних макрофагів в обох групах, зразок ChEsM створив основу для адгезії клітин. З 1-го тижня після хірургічного втручання на мембранах були відмічені особливості у вигляді вистилання клітинних шарів.

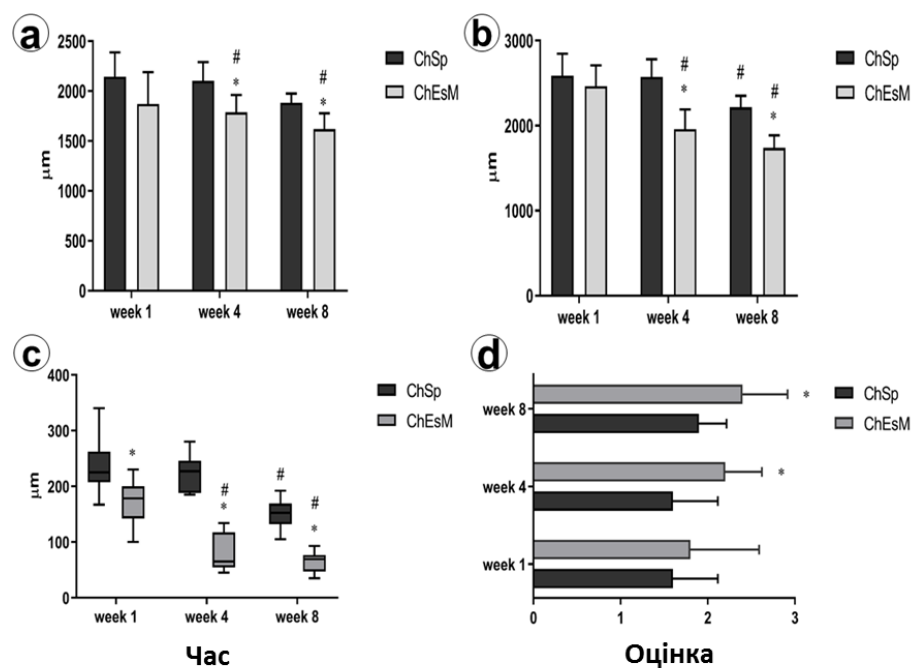


Рисунок 2.7 – Динамічні зміни розміру ураження печінки та деградації біоматеріалів: а - показує динаміку гемостатичних можливостей та б - відображає зміни розміру дефектів печінки за час експерименту; с - товщина капсули, що оточує кровоспинні матеріали; d - вrostання тканин господаря в гемо статичний матеріал. * показує достовірні відмінності між групами при $z < 0,05$, # - відмінності при порівнянні з попереднім терміном.

Відмінності в товщині матеріалу та взаємодії з клітинами та тканинами хазяїна були помітні. Хоча ChSp мав нерегулярну товщину, ChEsM розташовувались у тонкомембранних правильних напрямках (рис. 2.8). Через 2 місяці після резекції печінки повільна деградація ChSp була пов'язана з агрегацією матеріалу, оточеною гігантськими клітинами сторонніх тіл. У випадку ChEsM мембрани занурюються у тканини господаря, які врастають в залишки біоматеріалу.

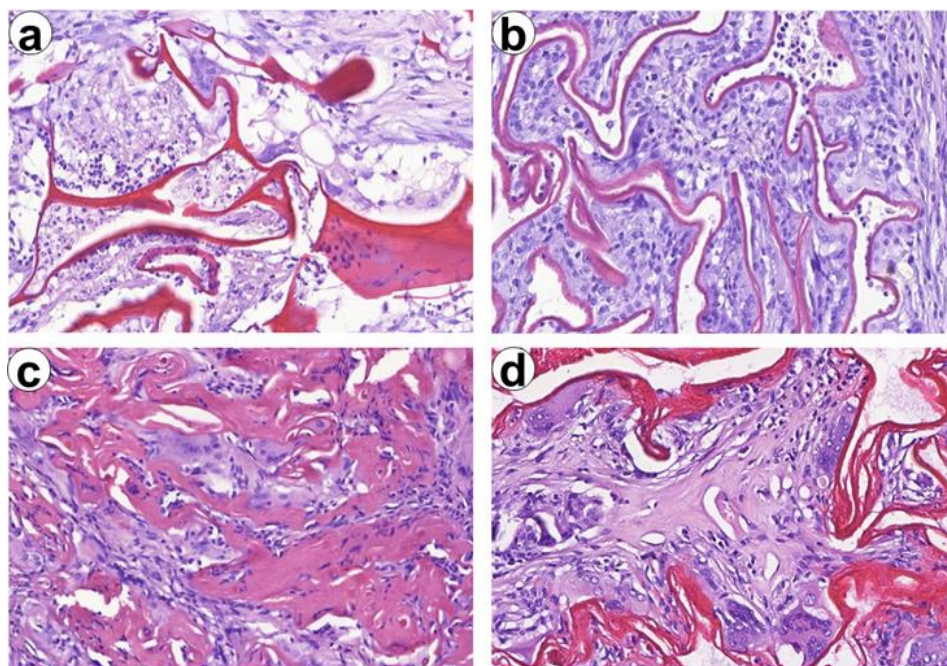


Рисунок 2.8 – Відмінності в деградації матеріалів на основі Ch та біосумісність на різних термінах після операції (a та b демонструють гемостатичні матеріали ChSp та ChEsM відповідно на ранніх стадіях після операції через тиждень; c і d вказують на ті самі матеріали через 2 місяці після травми печінки)

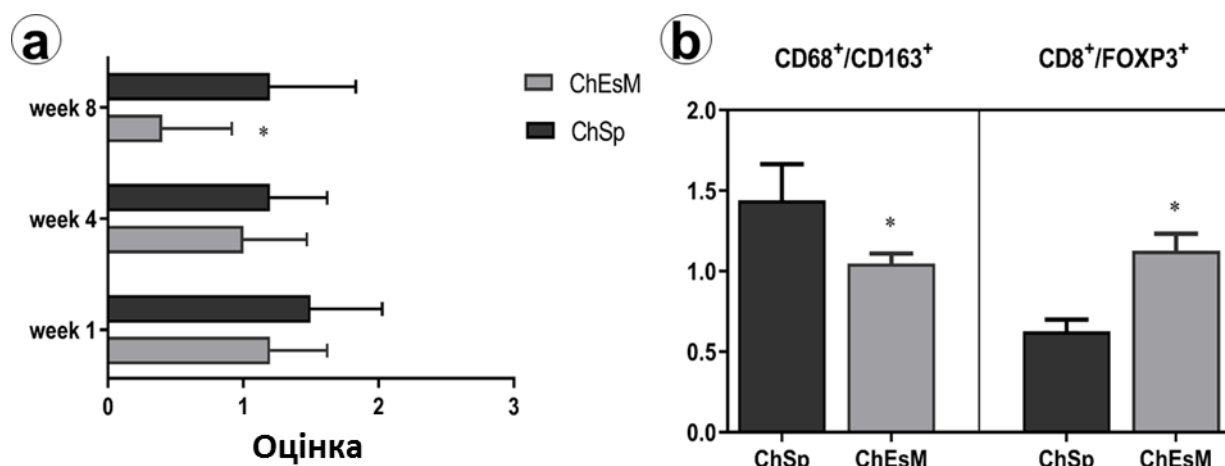


Рисунок 2.9 – Запальна реакція та співвідношення імунних клітин в капсулі, що оточує кровоспинні агенти. а - демонструє оцінку запальної інфільтрації в капсулі, що оточує кровоспинні матеріали, та відділення їх від тканин печінки. б - показує відмінності у M1/M2-макрофагах та співвідношенні підтипів лімфоцитів CD8/FOXP3 у капсулі навколо ChSp та ChEsM

Запалення в капсулі було пов'язано з залученням макрофагів M1 та M2. Макрофаги M2-типу були численні в периваскулярних зонах і на зовнішньому шарі капсули (рис.2.10). Також у капсулі були виявлені клітини CD8 та FOXP3. Ми не виявили суттєвих відмінностей у кількості підтипів макрофагів та лімфоцитів. Однак співвідношення CD68/CD163 було зміщено в бік макрофагів M2 в групі ChEsM, тоді як у ChSp було викликано незначний Treg-switch. Ці висновки можуть відображати відмінності в реакціях імунних клітин на різні модифіковані матеріали на основі хітозану. Незважаючи на відсутність суттєвих відмінностей в оцінці запальної реакції (рис. 2.10 а) на ранніх термінах після операції, на 8-му тижні експерименту група ChEsM продемонструвала зниження запалення та кращу регенерацію печінки. Хоча абсолютна кількість макрофагів і лімфоцитів не продемонструвала відмінностей між групами, існували деякі особливості між M1/M2-макрофагами та балансом підтипів лімфоцитів CD8/FOXP3.

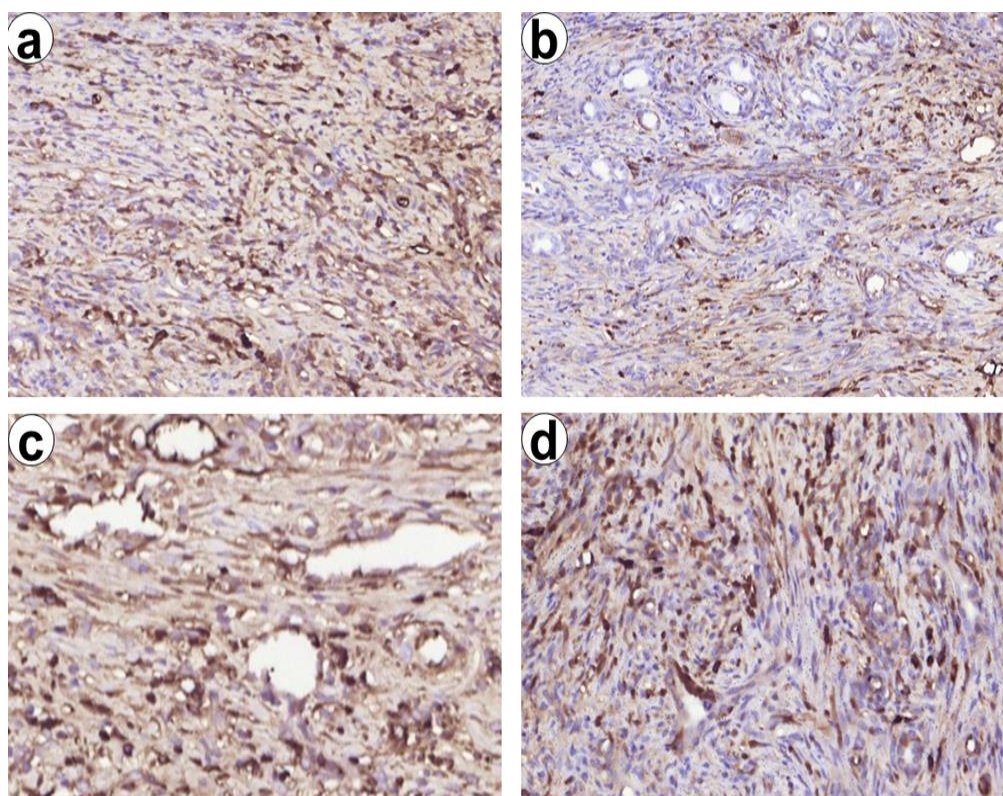


Рисунок 2.10 – Інфільтрація капсули, що оточує матеріали на основі хітозану, макрофагами CD68+ та CD163+ (а та b) та лімфоцитами (с та d) через 7 днів після гемостазу

Імуногістохімічне дослідження. а - численні дифузно розповсюджені клітини CD68+ в капсулі, що оточує дефект печінки, заповнений гемостатичним матеріалом. b - клітини CD163+, що зосереджуються переважно навколо судин та холангіол, що відображає їх зв'язок із репарацією. с і d - лімфоцити CD8+ і FOXP3+ в капсулі, що оточує дефект печінки, заповнений гемостатичним матеріалом.

Вивчаючи потенційні механізми, що відповідають за покращення біоактивних властивостей ChEsM, ми порівняли кількість імунних клітин (макрофаги M1/M2 та CD8 проти лімфоцитів FOXP3) в капсулі, яка відмежовує матеріал від печінки та відображає реакцію господаря на цей матеріал. Існують суперечливі дані про вплив хітозану та його похідних на активацію та поляризацію макрофагів. Морі Т. та співавт. [52] показали, що хітозан активує макрофаги, однак він може викликати їх апоптоз у відповідь на фагоцитоз. З іншого боку, було визначено поширеність

поляризації M2-макрофагів після застосування матеріалів на основі Ch, хоча була продемонстрована роль зразків різного ступеня ацетилювання у поляризації макрофагів [53].

У нашому дослідженні ми виявили реакцію макрофагів M1 та M2 у групах ChSp та ChEsM. Незважаючи на відсутність суттєвих відмінностей у абсолютній кількості, у групі ChEsM відбувся перехід до макрофагів M2. M2-макрофаги відомі як протизапальні фенотипи, що виробляють широкий спектр факторів росту і відіграють життєво важливу роль у припиненні запалення, ангиогенезі та відновленні тканин [54]. Важливо, що клітини CD163+ переважали, були розташовані навколо місць гепатоцелюлярної регенерації та ангиогенезу, що могло б пояснити прогресивний ріст тканин та відновлення уражень у групі ChEsM.

Крім того, присутність PEO в ChEsM може впливати на реакцію адаптивних імунних клітин, індукуючи апоптоз лімфоцитів та диференційовано модулюючи активність різних лімфоцитів [55]. Тут ми виявили зміщення співвідношення CD8/FOXP3 у бік лімфоцитів T-reg в капсулі групи ChSp, що може бути компенсаторним механізмом пригнічення запальної реакції проти ChSp, оскільки вони виробляють численні протизапальні медіатори, важливі для відновлення тканин [56]. Також відомо, що клітини FOXP3 відповідають за імунну толерантність і запобігають аутоімунним реакціям[57-58].

З іншого боку, збільшена кількість клітин T-reg може бути пов'язана з фіброзними змінами [59]. Однак, щоб виявити імунну структуру при застосуванні матеріалів на основі Ch та взаємодії матеріалу та імунітету, необхідні подальші дослідження.

Порівняння гістологічних змін у групах ChSp та ChEsM показало, що модифікація хітозану в наномасштабі може значно покращити його біоактивні властивості та регенерацію тканини хазяїна. ChESM мав нижчу імуногенність та вищу біосумісність, як клітинний субстрат, що полегшує адгезію клітин хазяїна та прогресивний ріст тканин. Прискорена біодеградація ChEsM була пов'язана з вдосконаленою репарацією уражень печінки.

2.3 Результати дослідження властивостей хітозанових мембран та хітозанових аерогелів

2.3.1 Скануюча електронна мікроскопія (SEM)

ChAG продемонстрував складну пористу структуру (рис. 2.11 а) із середньою площею пор 414 ± 41 μm^2 . Відносно рівномірний розподіл пор (рис. 2.11 в) у мікронному вимірі дозволяє швидко всмоктувати кров. Однак ChAG продемонстрував низьке відношення поверхні/об'єму, що може обмежити взаємодію ChAG/клітин крові. На відміну від цього, ChEsM мав нановолокнисту архітектуру (рис. 2.11 б) випадково орієнтованих волокон діаметром 180 ± 14 нм (максимальна товщина - 353 ± 17 нм) (рис. 2.11 д). Зв'язані між собою пори між волокнами, що перетинаються, були невеликими, площею $0,16 \pm 0,013$ μm^2 і не перевищували 1 μm^2 (рис. 2.11 е). Така структура значно збільшила активну поверхню для кращої адгезії клітин та сорбції крові.

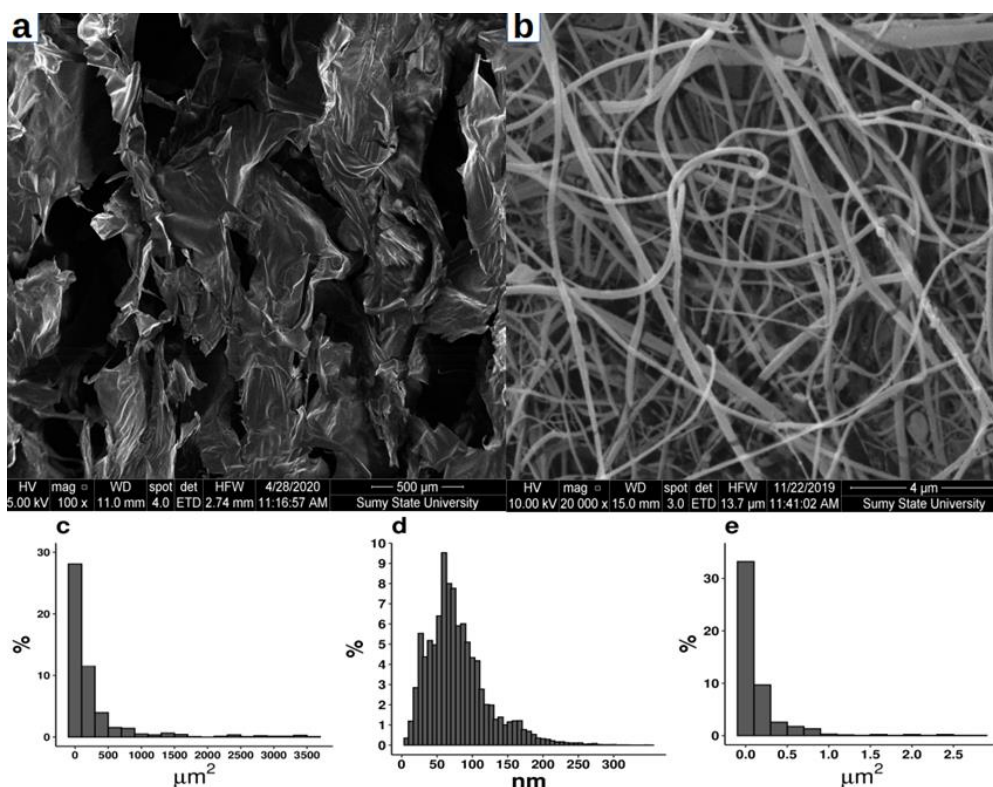


Рисунок 2.11 – Скануюче електронно-мікроскопічне зображення ChAG (а) з аналізом площі пор (с). Структура (б), площа пор (е) та діаметр волокна (д) ChEsM

2.3.2 Пористість і щільність

Усі матеріали продемонстрували високу пористість, яка досягала 80% без суттєвих відмінностей (рисунок 2.11 а, b), що має велике значення для гемостатичних показників, оскільки гарантує кращу сорбцію крові. Крім того, обидва гемостатичні матеріали мали дуже низьку щільність. Але ChEsM показав значно вищу щільність порівняно з ChAG ($p < 0,05$). Обидва параметри залежать від технологічного процесу виготовлення матеріалу - ліофілізації або електроспінінгу. Важливо те, що низька щільність може призвести до швидшої біодеградації біоматеріалів після зупинки кровотечі.

2.3.3 Дослідження деградації та біодеградації (in vitro)

Рисунки 2.12 с і d демонструють, що обидва гемостатичні агенти хітозану мали подібну динаміку деградації в розчині SBF із швидким первинним зниженням до 40% (ChAG) або 50% (ChEsM) своєї ваги протягом перших 24 годин і сповільненою деградацією під час наступних днів. Однак темпи деградації ChEsM були вищими ($p > 0,05$), досягнувши 75% ваги, втраченої на 7-й день, тоді як ChAG продемонстрував лише 65% втрати маси ($p < 0,05$).

Занурення зразків у лізоцим показало набагато вищі темпи втрати ваги порівняно з SBF, що може бути пов'язано зі специфічною ферментативною деградацією хітозану. Обидва гемостатичні матеріали втратили більше 50% від початкової ваги протягом перших 24 годин. подальша біологічна деградація призвела до додаткової втрати ваги до 75% для ChAG та понад 82% для ChEsM ($p < 0,05$). Помірний темп деградації є важливим у двох аспектах. З одного боку, матеріал не повинен розкладатися занадто швидко, оскільки швидка резорбція збільшує ризик повторного кровотечі. З іншого боку, занадто тривала деградація може призвести до капсулювання та порушення відновлення органів.

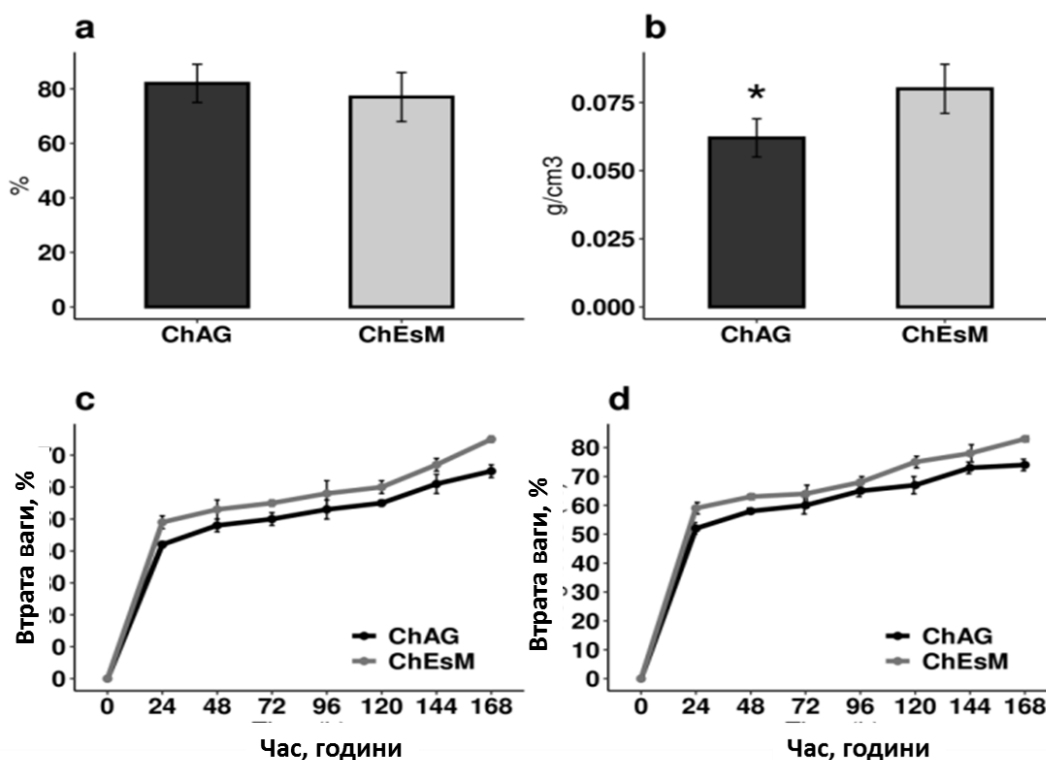


Рисунок 2.12 – Пористість (а) та щільність (b) гемостатичних матеріалів (верхній ряд); динаміка деградації в SBF (c) та біодеградація в розчині лізоциму (d)

2.3.4 Антибактеріальний тест

Рисунок 2.13 ілюструє антибактеріальну дію матеріалів на основі Ch проти *E. coli* та *S. aureus*, які оцінювали підрахунком кількості колоній після різного часу інкубації. Наші результати показали низьку інгібуючу здатність зразків ChEsM проти *S. aureus* та *E. coli*. Однак кількість мікробних колоній в пробірках з ChEsM була нижчою, ніж у позитивному контролі протягом перших шести годин інкубації. На противагу цьому, ChAG виявляв значно вищу антибактеріальну активність. Ми виявили, що ChAG проявляв тривалу антибактеріальну активність проти кишкової палички, що призводило до повного пригнічення росту через 24 години інкубації. Антимікробна дія ChAG проти *S. aureus* була різною і демонструвала значне гальмування протягом перших 2 годин. Однак наступний період був пов'язаний зі

збільшенням росту бактерій. Загалом ChAG був більш ефективним проти грамнегативних бактерій, а ніж грампозитивних мікробів.

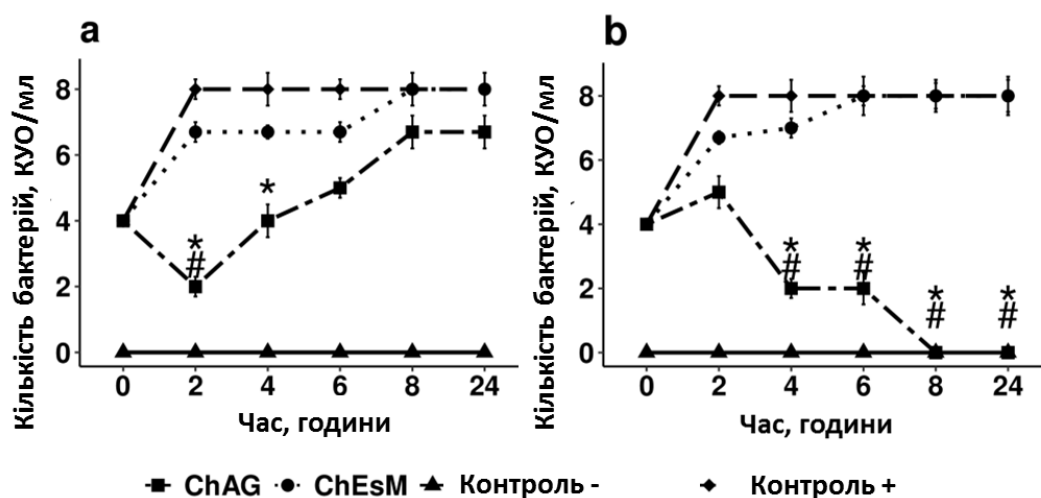


Рисунок 2.13 – Кінетика кількості бактеріальних клітин, індукованих ChAG та ChEsM: *S. aureus* (a) та *E. coli* (b); # вказує на значення p між групами аерогелю та електроспінінгових мембран ($<0,05$); * позначає значення p між групами ChAG та ChEsM та позитивним контролем ($<0,05$).

2.3.5 Експеримент на культурах клітин

Аналіз відновлення резазурину (рисунок 2.14 b) продемонстрував однакову адгезію клітин до обох біоматеріалів у перший день дослідження та збільшення кількості клітин з 3-го дня культивування. Тим не менше, швидкість редукції резазурину на ChEsM була значно вищою ($p<0,05$) на 3 та 7 день, що відображає підвищену проліферацію клітин.

Через 48 годин культивування клітин, Live/Dead фарбування за допомогою FDA та PI показало, що більшість клітин прикріпилися і почали розмножуватися (рисунок 2.14 a). Поверхня ChEsM містила більше клітин, тоді як ChAG мала неправильну 3D-структуру з меншою кількістю прикріплених клітин.

Вища життєздатність клітин при інкубації з ChEsM порівняно з ChAG може бути пов'язана як з кращою біосумісністю матеріалу, так і/або меншою цитотоксичністю. Вирігідно, волокниста архітектура ChEsM сприяла адгезії та

проліферації клітин, отже вона могла б служити конструкцією тканини для поліпшення відновлення печінки після операції.

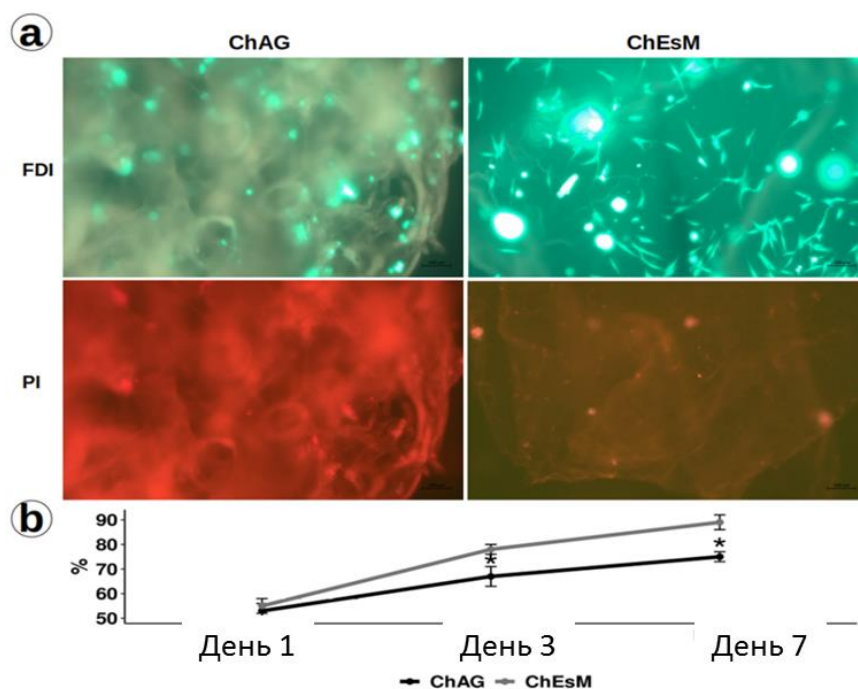


Рисунок 2.14 – а)-Live/Dead фарбування FDA та PI через 48 годин культивування клітин; б) - Життєздатність клітин визначена за допомогою аналізу редукування резазурину. * зірочками вказується значення р між аерогелем та електроспінінговими мембранами (<math>p < 0,05</math>).

2.3.6 Показники системи гемостазу *in vitro*

На рис. 2.15 а та б показано SEM взаємодії крові з гемостатичними матеріалами. На поверхні обох агентів були великі скупчення еритроцитів і тромбоцитів - активовані тромбоцити утворювали щільну сітку з фібриновими волокнами. Еритроцити були міцно прикріплені до відкладень фібрину. Крім того, були прямі контакти клітин крові з електроспінінговими волокнами, що може відображати електростатичну взаємодію з еритроцитами та стимуляцію тромбоцитів.

ChAG мав значно вищі ($p < 0,05$) сорбційні властивості - він може поглинати вагу плазми крові, в 25 разів перевищуючи власну. Обидва матеріали на основі Ch

демонстрували помітну адгезивність до тромбоцитів, що призводило до значного зменшення кількості тромбоцитів ($p < 0,05$) при взаємодії з кров'ю (рис. 2.15 а). Також взаємодія з матеріалами на основі Ch змінила функціональні параметри тромбоцитів, що відображає їх активацію. Контакт з обома матеріалами хітозану призвів до значного збільшення кількості тромбоцитів у порівнянні з цільною кров'ю (рис. 2.15 b, c). Зміна форми та збільшення об'єму тромбоцитів свідчить про їх активацію як важливий крок для зупинки кровотечі.

2.3.7 Експеримент на тваринах

Найкоротший час кровотечі був у групи повного гемостазу, індукованого тахокомбом, протягом $78,8 \pm 5,79$ с. ChAG повністю зупинив кровотечу на $81,33 \pm 5,48$ с. Середній час завершення зупинки кровотечі для ChEsM становив $84,53 \pm 4,88$ с. Суттєвих відмінностей між групами не було ($p > 0,05$). Жодна з тварин не потребувала додаткового застосування гемостатичних засобів.

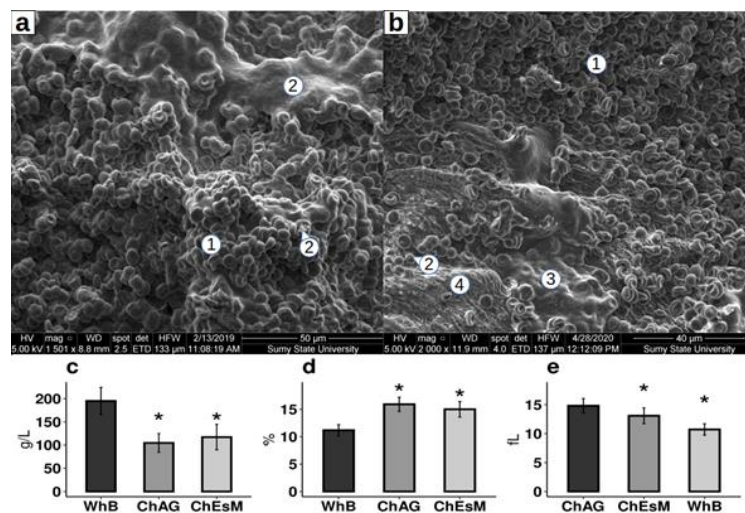


Рисунок 2.15 – SEM ChAG (a) та ChEsM (b), що взаємодіють з кров'ю: еритроцити (1), тромбоцити (2), відкладення фібрину (3) та клітинна мембрана (4). Взаємодія крові з матеріалами на основі Ch, що відображаються у кількості тромбоцитів (c), середньому об'ємі тромбоцитів (Dv та ширині розподілу тромбоцитів (y). * зірочки позначають значення p між групами ChAG та ChEsM та контролем цільної крові ($< 0,05$).

Через тиждень після резекції печінки ділянка, заповнена біоматеріалами, була оточена капсулою, що відокремлювала кровоспинні засоби від тканин печінки. Біоматеріали виглядали як сітка з розгалужених і петельних оксифільних мембран, що утворюють губчасту пробку. Цікаво, що мембрани гемостатичних засобів мали різні особливості, що відрізнялися за товщиною та взаємодією з різними клітинами господаря. У групі застосування тахокомбу було небагато випадків з локусами некрозу всередині дефекту печінки, наповненого біоматеріалом, оточеним запальними клітинами (переважно нейтрофілами, макрофагами, лімфоцитами та еозинофілами). Група ChAG продемонструвала інтенсивну запальну інфільтрацію гемостатичного матеріалу та утворення капсули навколо нього. Тоді як у групі ChEsM були особливості вrostання у тканини хазяїна численних гігантських клітин чужорідного тіла, що оточують петлі ChEsM (рис. 2.16). Більшість випадків продемонстрували запальну інфільтрацію, яка була пов'язана з різним ступенем деградації гемостатичного агента.

У групі застосування тахокомбу фібрин або плазма з невеликою кількістю лейкоцитів (а) та гігантськими клітинами чужорідного тіла (б) знаходились у межах гемостатичного агента. Капсула навколо неї містила помірну кількість лейкоцитів (с), з невеликою кількістю колагенових волокон (d), щільною сітчастою волокнистою сіткою (e) і невеликою кількістю проліферуючих клітин (f). У групі ChAG ділянка сильно інфільтрувалась лейкоцитами PMN (g), які перетравлювали фрагменти біоматеріалів (h) та інфільтрованою капсулою навколо нього (i). Товста капсула, що відмежовує ChAG від тканин печінки, включала невелику кількість колагену та більше ретикулярних волокон (j-k) з невеликою кількістю проліферуючих клітин. ChEsM демонстрував помітне вrostання тканин хазяїна (m) та адгезію (n) епітеліоїдоподібних клітин до ChEsM. У капсулі була щільна мережа колагену (p) та ретикулярних волокон (q) з великою кількістю холангіол та проліферуючих клітин.

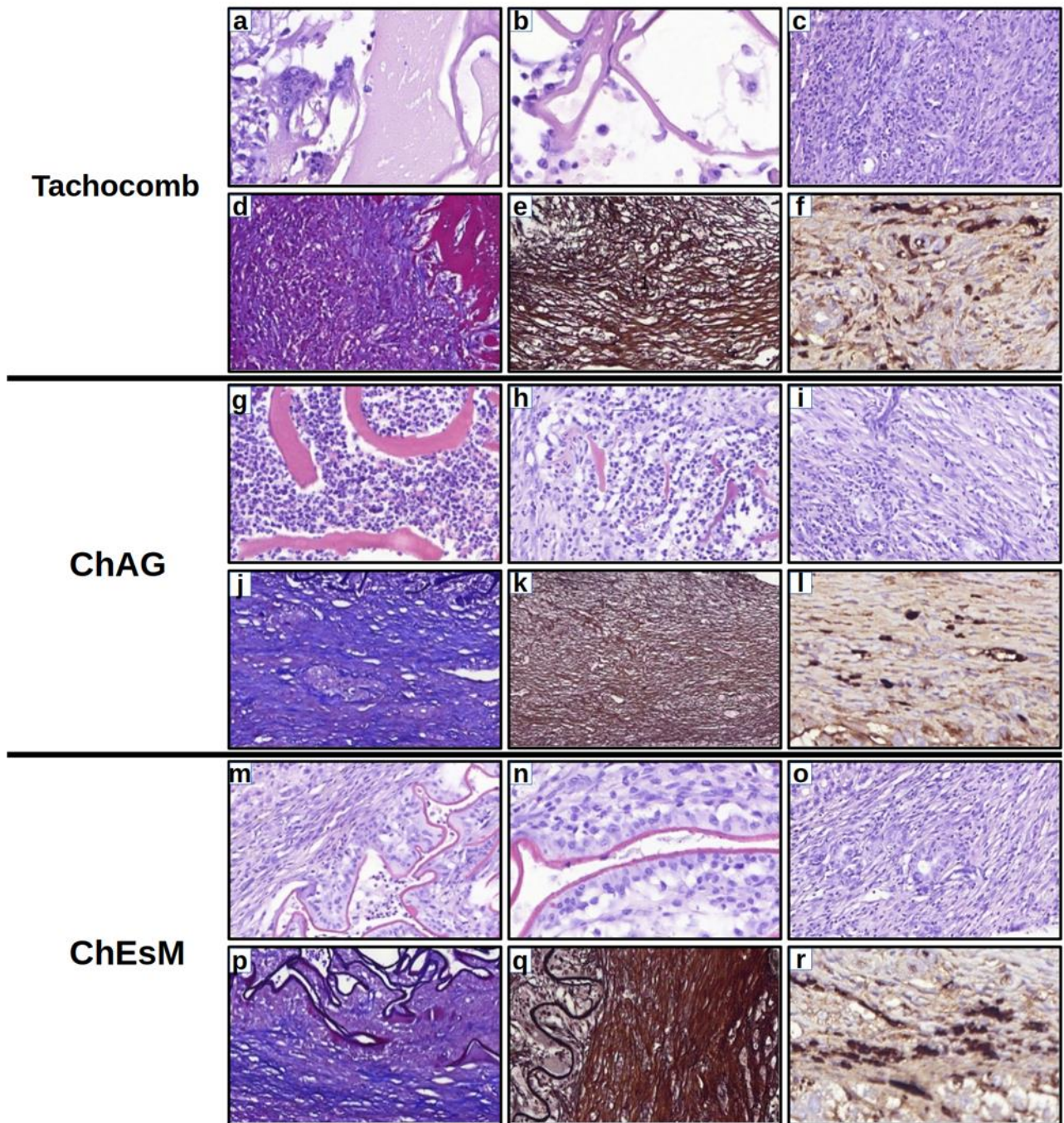


Рисунок 2.16 – Взаємодія між гемостатичним матеріалом та клітинами тварин різних груп через 7 днів дослідження *in vivo*. a-c, j-l, m-o - фарбування Н&Е, $\times 200-400$; d, j, p - фарбування Массона; e, k, q - фарбування Гоморі, $\times 200$; f, l, r - імуногістохімія для Кі-67, що візуалізує проліферуючі клітини, $\times 400$.

Розмір дефекту тканини та динаміка деградації гемостатичного матеріалу суттєво варіювали серед тварин різних груп (табл. 2.1). За один тиждень експерименту щури з ChAG мали найбільший розмір дефекту тканини - його

діаметр був навіть більше, ніж початковий розмір пошкодження через абсцесоподібну запальну інфільтрацію та утворення товстих капсул навколо. На противагу цьому, тахокомб та ChEsM продемонстрували значне скорочення області рани печінки ($p < 0,001$) протягом 1-го тижня після гемостазу, що було пов'язано як з менш вираженою запальною реакцією, так і з особливостями деградації біоматеріалу.

Довгострокова оцінка показала найшвидший темп деградації біоматеріалів у групі застосування тахокомбу, де загальне зменшення розміру гемостатичного агента приблизно втричі з 1 по 8 тижень (рис. 2.16). Динаміка деградації ChEsM була порівнянна з тахокомбом протягом першого місяця експерименту. Однак протягом другого місяця дослідження темпи скорочення ChEsM уповільнились.

На відміну від них, ChAG демонстрував незначні зміни у розмірі губки. Повільна швидкість деградації була пов'язана з фіброзними змінами в капсулі та навколишніх тканинах, так що через два місяці експерименту діаметр дефекту печінки дорівнював початковому об'єму резекції.

На рисунку 2.17 d-f показано розмір, внутрішню структуру та товщину капсули навколо кровоспинних засобів через 8 тижнів після операції та гемостазу.

Таблиця 2.1 – Характеристика гемостатичного агента-клітини-господаря взаємодії в різних групах

Клітини/тканини	Часові моменти	Tachocomb	ChAG	ChEsM
Характеристика біоматеріалу				
ВМ витончення і фрагментація ВМ	1 тиждень	2	1	3
	4 тиждень	2	1	2
	8 тиждень	2	1	1
Клітини хазяїна в біоматеріалі				
Пліморфноядерні лейкоцити	1 тиждень	1	3	1
	4 тиждень	0	3	0
	8 тиждень	0	2	0
Лімфоцити	1 тиждень	1	1	1
	4 тиждень	0	0	0
	8 тиждень	0	0	0
Вростання сполучної тканини	1 тиждень	1	0	2
	4 тиждень	2	0	2
	8 тиждень	3	1	2
Імунні клітини в капсулі навколо біоматеріалу				
Нейтрофіли	1 тиждень	1	2	1
	4 тиждень	0	1	0
	8 тиждень	0	0	0
M1-макрофаги	1 тиждень	1	3	2
	4 тиждень	1	2	1
	8 тиждень	1	2	1
M2-макрофаги	1 тиждень	3	1	2
	4 тиждень	2	1	2
	8 тиждень	1	2	1

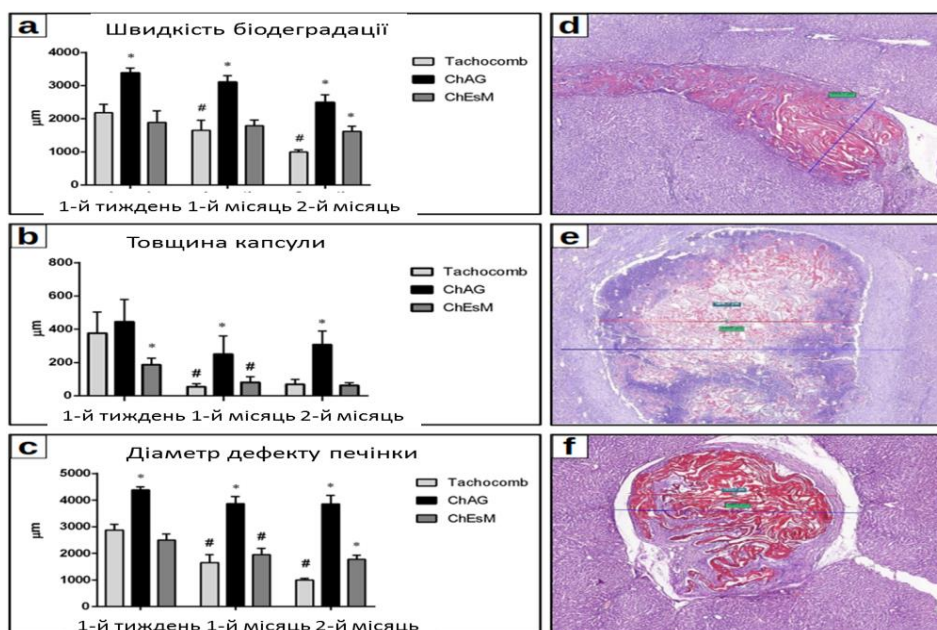


Рисунок 2.17 – Параметри біодеградації in vivo гемостатичних засобів протягом 2 місяців дослідження

2.3.8 Гістологічні та імуногістохімічні дослідження

Активний кровоспинний засіб Тахокомб викликав помірно гостре запалення протягом першого тижня. Численні поліморфно-ядерні лейкоцити проникли в залишки некротичних клітин печінки. Запальна інфільтрація супроводжувалась макрофагами типу M1, присутніми в капсулі. Однак їх кількість була меншою, ніж кількість макрофагів типу M2. Численні клітини CD163+ були виявлені на периферії капсули, навколо областей ангіогенезу та проліферації клітин печінки. Відновлення печінки було пов'язане з утворенням холангіол або щільних клітинних скупчень. На 4-му тижні було кілька запальних клітин, що відображали роздільну здатність імунної реакції. Капсула містила помірну кількість M1- та M2-макрофагів. Деградація біоматеріалу супроводжувалася різким зменшенням товщини капсули та ремоделюванням навколишніх тканин печінки. В результаті на 8-му тижні дефект печінки був мінімальним. Залишки гемостатичного матеріалу містили вrostання у тканинм господаря гігантських клітин чужорідного тіла, що беруть участь у резорбції біоматеріалів.

Група ChAG продемонструвала гостру запальну реакцію (1 тиждень), пов'язану з інфільтрацією поліморфно-ядерними клітинами як у центральних областях губки ChAG, так і в капсулі навколо. Капсула містила незначну кількість лімфоцитів та численні макрофаги, які були представлені здебільшого типом M1. Виражена запальна реакція була пов'язана з утворенням товстої капсули. Щодо відновлення печінки, деякі холангіоли були присутніми навколо зони дефекту печінки. Однак швидкість розповсюдження була нижчою, ніж при використанні Тахокомбу. Особливості гострої запальної реакції зберігаються на 4-му та 8-му тижнях, що відображає низьку біосумісність ChAG. На додаток до великої кількості макрофагів M1, що підтримують запальну інфільтрацію, на 4-му тижні було виявлено збільшення макрофагів типу M2. Це було пов'язано з відкладенням колагену в капсулі. Більш того, колагенові та ретикулярні волокна вирівнюються з поверхнею біоматеріалу, утворюючи товсті фіброзні смуги на периферії гемостатичної пробки.

У порівнянні з ChAG, високопористий біоматеріал ChEsM викликав значно нижчу імунну відповідь протягом першого тижня. Крім того, ChEsM продемонстрував високу адгезивність до клітин господаря, які робили листи на поверхні біоматеріалу. Низька ступінь запальної реакції була пов'язана з рівною кількістю макрофагів M1- та M2-типів на 1-му тижні дослідження. Гостра запальна реакція пройшла після 4-го тижня, що супроводжувалось інтенсивним вrostанням тканин хазяїна всередину гемостатичної губки, зменшенням товщини капсули та загальним зменшенням дефекту печінки. Хоча остаточна деградація ChEsM була нижчою, ніж у випадку використання Тахокомбу, електроспінінгові мембрани мали набагато вищу біосумісність порівняно з ChAG.

M2-фенотип макрофагів переважав в капсулі тварин групи використання Тахокомбу (рис. 2.18). ChAG продемонстрував найбільшу кількість прозапальних типів макрофагів з низьким числом клітин CD163+. Група ChEsM показала однакову кількість CD68 та CD163 в капсулі. У більшості випадків клітини CD163 розташовувались на зовнішньому шарі капсули, що відповідає ділянкам ремоделювання з особливістю відновлення тканин печінки та ангиогенезу.

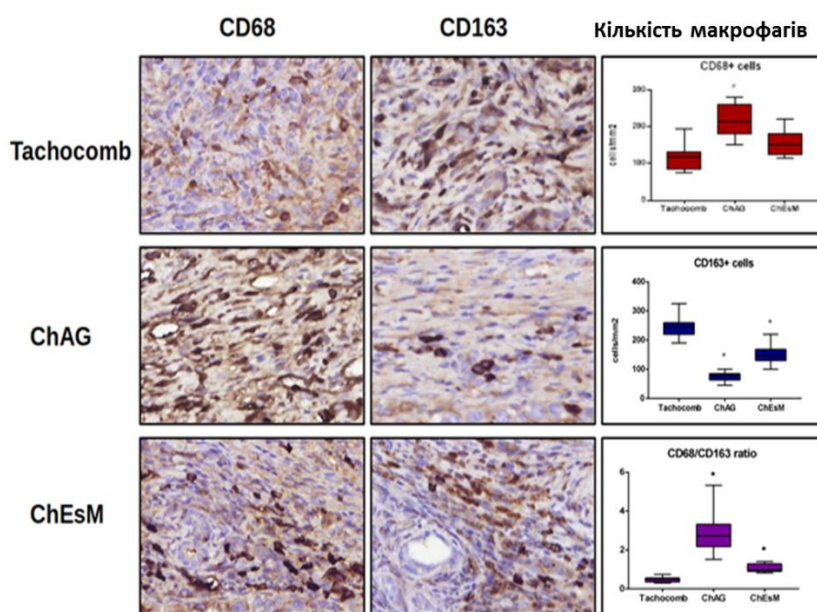


Рисунок 2.18 – Кількість та просторовий розподіл макрофагів M1 (CD68) та M2 (CD163) у капсулі навколо ВМ-пробки у різних групах через 7 днів після застосування різних гемостатичних засобів

2.4 Обговорення

Це дослідження продемонструвало відмінні функціональні характеристики, ефективність та безпеку препаратів на основі хітозану незалежно від способу їх синтезу. Ми підтвердили високі гемостатичні показники матеріалів на основі Ch, які були порівнянні з активним гемостатичним засобом біологічного походження. Ефективність зупинки кровотечі залежить від взаємодії біоматеріалу з клітинами крові та поглинання плазми. Взаємодія крові та активація гемостазу є критичними параметрами для гемостатичних матеріалів. Тестування *in vitro* показало, що як ChAG, так і ChEsM ефективно взаємодіють з тромбоцитами, індукуючи їх активацію. Гемостатичний ефект хітозану включає аглютинацію білків крові та активацію тромбоцитів, що сприяє утворенню фібринового згустку. Як було показано раніше, чудовий гемостатичний потенціал препаратів на основі Ch пояснюється полікатіонною природою хітозану. Він легко взаємодіє з клітинами крові, оскільки плазмалема тромбоцитів та еритроцитів заряджена негативно. Матеріали на основі Ch стимулюють адгезію та агрегацію тромбоцитів, що важливо для початку гемостазу. Крім того, аміногрупи (такі як полі-N-ацетилглюкозамін), присутні в хітозані, сприяють агрегації еритроцитів [60]. Препарати на основі Ch показали міцну взаємодію з клітинами крові *in vitro* та короткий час кровотечі *in vivo*.

Більше того, як аерогель Ch, зшитий L-аспарагіною та L-глутаміною кислотами, так і електроспіннінгові мембрани, виготовлені з Ch-PEO-кополімеру, мали високу пористість, яка важлива для всмоктування крові, але ChEsM продемонстрував значно вищий коефіцієнт площі поверхні. Попередні дослідження показали, що нановолокнисті матеріали проявляють високу біоактивність і можуть посилювати гемостатичні параметри [61]. Однак ми не виявили відмінностей у часі кровотечі між ChAG та ChEsM.

Що стосується пошкодження тканин і кровотеч, є ще одна важлива властивість хітозану - він виявляє інгібуючу ефективність проти різних бактерій. Порівнюючи антимікробні властивості засобів на основі Ch, ми виявили, що Ch-

аерогель продемонстрував значно вищу антибактеріальну активність щодо грамнегативних бактерій. Деякі автори вказують, що сприйнятливість бактерій залежить від грам-приналежності, і підтверджують, що більш високий інгібуючий ефект може бути виявлений до грамнегативних бактерій [62]. Антибактеріальна активність є дуже складним процесом, який варіюється між грампозитивними та грамнегативними бактеріями, базуючись на відмінностях у структурі клітин. Грамнегативні бактерії мають зовнішню мембрану, яка містить ліпополісахариди, що забезпечують гідрофільні властивості поверхні. Поверхні грампозитивних бактерій побудовані з пептидогліканів та тейхоєвої кислоти і відіграють вирішальну роль у функціонуванні багатьох мембрано-пов'язаних ферментів [63]. Ліпополісахариди зовнішньої мембрани грамнегативних бактерій, що містять фосфатні та карбонові групи, забезпечують поверхні високий полярний характер і щільність негативних зарядів. Висока поверхнева щільність заряду та гідрофільність бактерій підтримують взаємодію та адсорбцію хітозану до клітинної стінки та більш високе пригнічення росту для грамнегативних бактерій [64]. Приєднання та розмноження бактерій залежать від розміру волокна та хімічного складу поверхні. Діаметр волокна, близький до довжини бактерії, стимулює найвищі показники проліферації, тоді як нановолокна можуть викликати конформаційні зміни паличкоподібних бактерій, стримуючи процес колонізації бактерій [65]. Більш висока сприйнятливість бактерій до ChAG може бути обумовлена ефектом більшої площі поверхні цих зразків, що призводить до високих антибактеріальних показників [66].

Випробовуючи застосування препаратів на основі Ch для внутрішнього використання, важливо було перевірити їх безпеку та біосумісність. Агенти на основі Ch показали високу біосумісність у численних дослідженнях [36], [39], [41]. Наші тести *in vitro* довели біосумісність як ChAG, так і ChEsM. Однак швидкість проліферації клітин була значно вищою для нановолокнистих матеріалів. Деякі дані демонструють переваги електроспінінгу для тканинної інженерії через можливу міграцію клітин у порах та зв'язок між клітиною та нановолокнами [67]. Відмінності в біосумісності ChAG та ChEsM були ще більш значними під час дослідження *in*

in vivo. ChEsM стимулював ріст тканин печінки, а ChAG асоціювався із запальною інфільтрацією. Така протилежна взаємодія між матеріалами на основі Ch та тканинами господаря може бути пов'язана як зі специфічністю Ch-біоматеріалів після обробки, так і з характером імунологічної відповіді на них.

Як вже згадувалося раніше, хітозан викликає адгезію та агрегацію тромбоцитів, активацію імунних клітин та відновлення тканин. Після активації тромбоцити оголюють різні рецептори на своїй мембрані та вивільняють численні розчинні медіатори, які регулюють запалення, ангиогенез та проліферацію клітин. Серед прозапальних молекул найважливішими є ліпідні медіатори (такі як простагландини, тромбоксан A₂). Також активовані тромбоцити синтезують та секретують широкий спектр цитокінів, включаючи IL-1 β , що полегшує експресію молекул адгезії та експресію хемокінів ендотеліальними клітинами [68]. Крім того, тромбоцити є джерелом численних хемокінів, таких як RANTES, PF-4, MCP-1, що залучають моноцити/макрофаги до місця пошкодження [67]. Крім того, тромбоцити містять різноманітні фактори росту, такі як судинний фактор росту ендотелію (VEGF), основний фактор росту фібробластів (bFGF), епідермальний фактор росту (EGF), ангиопоетин-1 (Ang1), фактор росту тромбоцитів (PDGF), фактор росту гепатоцитів (HGF) [69]. Ці фактори є важливими як для ангиогенезу, так і для відновлення тканин печінки.

Таким чином, стимулюючи активацію тромбоцитів, біоматеріали можуть сприяти як запальній реакції, так і відновленню. Усі біоматеріали можуть викликати запалення та реакцію на стороннє тіло, однак ступінь тяжкості та клінічний прояв цих реакцій широко відрізняються [70]. Проте, імуногенність та стимулюючі ефекти *in vivo* матеріалів на основі Ch були абсолютно різними, що відображає чітку взаємодію ChAG та ChEsM з імунними клітинами та клітинами печінки. ChAG сприяв переважно реакціям вродженого імунітету з активною нейтрофільною інфільтрацією та активацією макрофагів M1. Важка запальна реакція все частіше визнається вирішальним компонентом впливаючи на регенерацію, і в нашому дослідженні ми показали, що асоційоване із ChAG запалення негативно корелювало з відновленням дефекту печінки.

Навпаки, застосування ChEsM асоціювалося з легким запаленням та переважною активацією макрофагів типу M2 та супроводжувало кращу деградацію біоматеріалу та сприяло відновленню печінки. Одним із можливих механізмів цих відмінностей є використання РЕО як компонента Ch-кополімеру в мембранах при використанні електроспінінгу. Крім того, висока пористість, наноструктурні та електростатичні ефекти можуть бути важливими для прямої взаємодії електроспінінгової мембрани з клітинами хазяїна. Роль структури біоматеріалів та їх фізико-хімічних властивостей у визначенні його взаємодії з клітинами та тканинами була показана в дослідженнях [71]. Модифікація поверхні РЕО-вмісних біоматеріалів може зменшити запальну адгезію клітин та запальну реакцію [72]. Імуномодулюючі властивості біоматеріалів можуть бути пов'язані з їх впливом на дендритні клітини господаря та макрофаги шляхом модуляції секреції цитокінів, що полегшує поляризацію M2-макрофагів [73].

Результати нашого дослідження продемонстрували, що фізико-хімічна модифікація біоматеріалу на основі Ch впливає на його біологічну сумісність, покращуючи імунну відповідь господаря та відновлення тканин.

Розділ 2 висвітлений у статтях:

1. Radwan-Pragłowska, J. et al. Chitosan-based bioactive hemostatic agents with antibacterial properties - synthesis and characterization. *Molecules*. 2019, Volume 24, Issue 14, 2629.
2. Deineka, V. et al. Hemostatic performance and biocompatibility of chitosan-based agents in experimental parenchymal bleeding. *Materials Science and Engineering C*. 2020, 111740 (article in press).

ВИСНОВКИ

1. Засоби на основі хітозану демонстрували значну гемостатичну ефективність, помірний темп біодеградації та високу біосумісність *in vitro*. Електроспінінг значно збільшує пористість матеріалу та активну поверхню на відміну від Ch-аерогелю та ChSp.

2. Хітозанові електроспінінгові мембрани продемонстрували високу біосумісність та рівень біодеградації, значну гемостатичну ефективність, але низькі антибактеріальні властивості порівняно із хітозановими губками та аерогелями.

3. Дослідження *in vivo* підтвердили поглиблене відновлення печінки при використанні електроспінінгових мембран, що забезпечує можливості для їх застосування з метою управління вісцеральними кровотечами.

4. Гістологічні та імуногістохімічні аналізи довели, що застосування Ch-аерогелю для зупинки печінкової кровотечі асоціюється з помірною запальною реакцією та виявляє повільну деградацію. Проте хітозановий аерогель можна ефективно застосовувати у якості гемостатичного пластиру завдяки високій антибактеріальній активності, але його застосування вісцерально є обмеженим через помірний запальний ефект та повільну деградацію.

5. Вироблений електроспінінгом Ch-кополімер продемонстрував високу біологічну сумісність та швидкість деградації *in vivo*, що забезпечує можливості для його застосування для управління вісцеральними кровотечами.

ПЕРЕЛІК ДЖЕРЕЛ ПОСИЛАННЯ

1. Viridis F. et al. Clinical outcomes of primary arterial embolization in severe hepatic trauma: A systematic review, *Diagn. Interv. Imaging.* – 2019. – Vol. 100, Issue 2. – P. 65–75.
2. Cimbanassi S. et al. Nonoperative management of abdominal solid-organ injuries following blunt trauma in adults: Results from an International Consensus Conference. *J. Trauma Acute Care Surg.* – 2018. – Vol. 84, Issue 3. – P. 517–531.
3. Carver D. et al. A Prospective Evaluation of the Utility of a Hybrid Operating Suite for Severely Injured Patients: Overstated or Underutilized? *Ann. Surg.* – 2020. – Vol. 271, Issue. 5. – P. 958–961.
4. Gaski A. et al. Decreased mortality, laparotomy, and embolization rates for liver injuries during a 13-year period in a major Scandinavian trauma center. *Trauma Surg. Acute Care Open.* – 2018. – Vol. 3, Issue 1, – P. 1–6.
5. Afifi, Abayazeed et al. Blunt liver trauma: a descriptive analysis from a level I trauma center. *BMC Surg.* –2018. – Vol. 18, Issue 1. – P. 42.
6. Kodadek L. M. et al. Intrahepatic Balloon Tamponade for Penetrating Liver Injury: Rarely Needed but Highly Effective. *World J. Surg.* – 2019. – Vol. 43, Issue 2 – P. 486–489.
7. Huang L. et al. Advances in Topical Hemostatic Agent Therapies: A Comprehensive Update. *Adv. Ther.* – 2020. – Vol. 37, Issue 10. – pp. 4132–4148.
8. Wang L., et al. Hemostatic nanotechnologies for external and internal hemorrhage management. *Biomater. Sci.* – 2020. – Vol. 8, Issue 16.–. pp. 4396–4412.
9. Tompeck J. et al., A comprehensive review of topical hemostatic agents: The good, the bad, and the novel. – 2020. – Vol. 88, Issue 1. – P. 136–141.
10. Liu Y. et al. A systematic review and meta-analysis of associating liver partition and portal vein ligation for staged hepatectomy (ALPPS) versus traditional staged hepatectomy. *Medicine (Baltimore).* – 2019. – Vol. 98, Issue 15 – P. e15229.
11. Hu Z., et al. Chitosan-Based Composite Materials for Prospective Hemostatic Applications. *Mar. Drugs.* – 2018. – Vol. 16, Issue 8. – P. 273.

12. Rad T. et al. Conducting scaffolds for liver tissue engineering. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A.* – 2014. – Vol. 102, Issue 11. – P. 4169–4181.
13. Rodríguez-Vázquez M. et al. Chitosan and Its Potential Use as a Scaffold for Tissue Engineering in Regenerative Medicine. *Biomed Res. Int.* – 2015. – Vol. 2015. – Article ID 821279.
14. Hattori H. and Ishihara M. Changes in blood aggregation with differences in molecular weight and degree of deacetylation of chitosan. *Biomed. Mater.* – 2015. – Vol. 10, Issue 1. – P. 15014, 2015.
15. Khan M. A. and Mujahid M. A review on recent advances in chitosan based composite for hemostatic dressings. *Int. J. Biol. Macromol.* – 2018. – Vol. 124. – P. 138–147.
16. Sun J., Perry S. L., and Schiffman J. D. Electrospinning Nanofibers from Chitosan/Hyaluronic Acid Complex Coacervates. *Biomacromolecules.* – 2019. – vol. 20, Issue 11.– P. 4191–4198.
17. Ding J. et al. Electrospun polymer biomaterials. *Prog. Polym. Sci.* – 2019. – Vol. 90. – P. 1–34.
18. Xie X. et al. Electrospinning nanofiber scaffolds for soft and hard tissue regeneration. *J. Mater. Sci. Technol.* – Vol. 59. – P. 243–261.
19. Butler N. and Toogood G. Principles of liver resection. *Surg.* – 2017. – Vol. 35, Issue 12. – P. 692–699.
20. Hickman D. S. A. et al. Biomaterials and Advanced Technologies for Hemostatic Management of Bleeding. *Adv. Mater.* –2018. – Vol. 30, Issue 4. – P. 1–40.
21. Hickman D. S. A. et al. Biomaterials and Advanced Technologies for Hemostatic Management of Bleeding. *Adv. Mater.* –2018. – Vol. 30, Issue 4. – P. 1–40.
22. Wang B., Johnson A., and Li W. Development of an Extracellular Matrix Enriched Gelatin Sponge for Liver Wound Dressing. *J. Biomed. Mater. Res. Part A.* – 2020. – Vol.108, Issue10. – P. 2057-2068.
22. Liu J. Y. et al. Hemostatic porous sponges of cross-linked hyaluronic acid/cationized dextran by one self-foaming process. *Mater. Sci. Eng. C* – 2020. – vol. 83, Issue 2. – P. 160–168.

23. Seo Y. B. et al. In vitro and in vivo evaluation of the duck's feet collagen sponge for hemostatic applications. *J. Biomater. Appl.* –2017. – Vol. 32, Issue 4. – P. 484–491.
24. Slezak P. et al. An Efficacy Comparison of Two Hemostatic Agents in a Porcine Liver Bleeding Model: Gelatin/Thrombin Flowable Matrix versus Collagen/Thrombin Powder. *J. Investig. Surg.*, –2019. – Vol. 2019. – P. 828-838.
25. Khan M. A. and Mujahid M. A review on recent advances in chitosan based composite for hemostatic dressings. *Int. J. Biol. Macromol.* –2019. – Vol. 124. – P. 138–147.
26. Wang Y. et al. Hemostatic Ability of Chitosan-Phosphate Inspired by Coagulation Mechanisms of Platelet Polyphosphates. *Macromol. Biosci.* – 2018. – Vol. 18, Issue 4. – P. 1700378.
27. Shariatnia Z. Pharmaceutical applications of chitosan. *Adv. Colloid Interface Sci.* – 2018. – Vol. 263. – P. 131–194.
28. Ouyang Q. et al. Construction of a composite sponge containing tilapia peptides and chitosan with improved hemostatic performance. *Int. J. Biol. Macromol.* – 2019. – Vol. 139. – P. 719–729.
29. Okada T. et al. A biomimetic approach to hormone resistant prostate cancer cell isolation using inactivated Sendai virus (HVJ-E) *Biomater. Sci.* – 2016. – Vol. 4, Issue 1. – P. 96–103.
30. Huang X. et al. Using absorbable chitosan hemostatic sponges as a promising surgical dressing. *Int. J. Biol. Macromol.* – 2015. – Vol. 75. – P. 322–329.
31. Lan G. et al. Chitosan/gelatin composite sponge is an absorbable surgical hemostatic agent. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* – 2015. – Vol. 136. – P. 1026–1034.
32. Zhang W., Sun Y.-L. and Chen D.-H. Effects of Chitin and Sepia Ink Hybrid Hemostatic Sponge on the Blood Parameters of Mice. *Mar. Drugs.* – 2014. – Vol. 12, Issue 4. – P. 2269–2281.
33. Qian Z. et al. A porous sodium polyacrylate-grafted chitosan xerogel for severe hemorrhage control synthesized from one-pot reaction. *J. Mater. Chem. B.* – 2017. – Vol. 5, Issue 25. – P. 4845–4851.

34. Pogorielov M. et al. Haemostatic chitosan coated gauze: In vitro interaction with human blood and in-vivo effectiveness. *Biomater. Res.* – Vol. 19, Issue 1. – P. 1–10.
35. Radwan-Pragłowska J. et al. Chitosan-Based Bioactive Hemostatic Agents with Antibacterial Properties–Synthesis and Characterization. *Molecules.* – Vol. 24, Issue 14. – P. 2629.
36. Kang P. L. et al. Development and assessment of hemostasis chitosan dressings. *Carbohydr. Polym.* –2011. – Vol. 85, Issue 3. – P. 565–570.
37. Qasim S. et al. Electrospinning of Chitosan-Based Solutions for Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Int. J. Mol. Sci.* – 2018. – Vol. 19, Issue 2. – P. 407.
38. Sun J., Perry S. L. and Schiffman J. D. Electrospinning Nanofibers from Chitosan/Hyaluronic Acid Complex Coacervates. *Biomacromolecules.* – 2019. – Vol. 20, Issue 11. – P. 4191–4198.
39. Rasouli R., Barhoum A., Bechelany M. and Dufresne A. Nanofibers for Biomedical and Healthcare Applications. *Macromol. Biosci.* – 2019. – Vol. 19, Issue 2. – P. 1–27.
40. Hu Z. et al. Chitosan-Based Composite Materials for Prospective Hemostatic Applications. *Mar. Drugs.* – 2019. – Vol. 16, Issue 8. – P. 273.
41. Barhoum, Pal K. et al. Nanofibers as new-generation materials: From spinning and nano-spinning fabrication techniques to emerging applications. *Appl. Mater. Today.* – 2019. – Vol. 17. – P. 1–35.
42. Zhou Y. et al. Electrospinning of carboxyethyl chitosan/poly(vinyl alcohol)/silk fibroin nanoparticles for wound dressings. *Int. J. Biol. Macromol.* –2013. – Vol. 53. – P. 88–92.
43. Yi B. et al. Fabrication of high performance silk fibroin fibers: Via stable jet electrospinning for potential use in anisotropic tissue regeneration. *J. Mater. Chem. B.* – Vol. 6, Issue 23. – P. 3934–3945.
44. Casanova M. R., Reis R. L., Martins A. and Neves N. M. The Use of Electrospinning Technique on Osteochondral Tissue Engineering. *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2018. – Vol. 1058. – P. 247–263.

45. Lin Y. et al. In vitro behavior of tendon stem/progenitor cells on bioactive electrospun nanofiber membranes for tendon-bone tissue engineering applications. *Int. J. Nanomedicine*. – 2019. – Vol. 14. – P. 5831–5848.
46. Ye H. et al. Enhanced osteogenesis and angiogenesis by PCL/chitosan/Sr-doped calcium phosphate electrospun nanocomposite membrane for guided bone regeneration. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* – 2019. – Vol. 30, Issue 16. – P. 1505–1522.
47. Luo J. et al. Fabrication and characterization of Chinese giant salamander skin composite collagen sponge as a high-strength rapid hemostatic material. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* – 2019. – Vol. 30, Issue 4. – P. 247–262.
48. Li D., Li P., Zang J. and Liu J. Enhanced hemostatic performance of tranexamic acid-loaded chitosan/alginate composite microparticles. *J. Biomed. Biotechnol.* – 2012. – Vol. 2012. – Article ID 981321.
49. Takagi T. et al. Two-layer sheet of gelatin: A new topical hemostatic agent. *Asian J. Surg.* – 2018. – Vol. 41, Issue 2. – P. 124–130.
50. Che C. et al. Surface-Adaptive and On-Demand Antibacterial Sponge for Synergistic Rapid Hemostasis and Wound Disinfection. *ACS Biomater. Sci. Eng.* – 2020. – Vol. 6, Issue 3. – P. 1776–1786.
51. Jana S, Jana S, Yilmaz Atay H. Antibacterial Activity of Chitosan-Based Systems Functional Chitosandrug Delivery and Biomedical Applications. – 2020. – Vol.1. – P. 457-489.
52. Tzur et al. Platelet distribution width: a novel prognostic marker in an internal medicine ward. *J. Community Hosp. Intern. Med. Perspect.* – 2019. – Vol. 9, Issue 6. – P. 464–470.
53. Mori T. et al. Mechanism of macrophage activation by chitin derivatives. *J. Vet. Med. Sci.* – 2005. – Vol. 67, Issue 1. – P. 51–56.
54. Vasconcelos D. P. et al. Macrophage polarization following chitosan implantation. *Biomaterials*. – 2013. – Vol. 34, Issue 38. – P. 9952–9959.
55. Moore L. B. and Kyriakides T. R. Molecular characterization of macrophage-biomaterial interactions. *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2015. – Vol. 865. – P. 109–122.

56. Farace C. et al. Immune cell impact of three differently coated lipid nanocapsules: Pluronic, chitosan and polyethylene glycol. *Sci. Rep.* – 2015. – Vol. 6, Issue 1. – P. 1–14.
57. Lei H. et al. Regulatory T cell-mediated anti-inflammatory effects promote successful tissue repair in both indirect and direct manners. *Front. Pharmacol.* – 2015. – Vol. 6. – P. 1–10.
58. Korn T. and Muschaweckh A. Stability and Maintenance of Foxp3+ Treg Cells in Non-lymphoid Microenvironments. *Front. Immunol.* – 2019. – Vol. 10. – P. 1–8.
59. Kumar P. et al. Restoring self-tolerance in autoimmune diseases by enhancing regulatory T-cells. *Cell. Immunol.* – 2019. – Vol. 339. – P. 41–49.
60. Bal S. M. and Stadhouders R. Tregs in fibrosis: To know your enemy, you must become your enemy. *Sci. Immunol.* – 2019. – Vol. 4, Issue 39. – P. 6–9.
61. Gu B. K., Park S. J., Kim M. S., Kang C. M., Il Kim J. and Kim C. H. Fabrication of sonicated chitosan nanofiber mat with enlarged porosity for use as hemostatic materials. *Carbohydr. Polym.* – 2013. – Vol. 97, Issue 1. – P. 65–73.
62. Yan T. et al. Biodegradable collagen sponge reinforced with chitosan/calcium pyrophosphate nanoflowers for rapid hemostasis. *Carbohydr. Polym.* – 2017. – Vol. 170. – P. 271–280.
63. Kong M., Chen X. G., Xing K. and Park H. J. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. *Int. J. Food Microbiol.* – 2010. – Vol. 144, Issue 1. – P. 51–63.
64. Kravanja G., Primožič M., Knez Ž. and Leitgeb M. Chitosan-Based (Nano)Materials for Novel Biomedical Applications. *Molecules.* – 2019. – Vol. 24, Issue 10. – P. 1960.
65. Arkoun M., Daigle F., Heuzey M.-C. and A. Ajji. Mechanism of Action of Electrospun Chitosan-Based Nanofibers against Meat Spoilage and Pathogenic Bacteria. *Molecules.* – 2017. – Vol. 22, Issue 4. – P. 585.
66. Rodríguez K., Sundberg J., Gatenholm P. and Renneckar S. Electrospun nanofibrous cellulose scaffolds with controlled microarchitecture. *Carbohydr. Polym.* – 2014. – Vol. 100. – P. 143–149.

67. Sulaieva O., Deliy V. and Zharikov S. Relationship between leukocytes recruitment and risk of rebleeding in patients with peptic ulcers. *Pathophysiology* – 2015. – Vol. 22, Issue 4. – P. 175–182.
68. Eisinger F. and Langer H. F. The Mutual Relation of Platelet Activation and Innate Immunity. *Hamostaseologie*. –2018. – Vol. 38, Issue 4. –P. 186–202.
69. Eisinger F., Patzelt J. and Langer H. F. The platelet response to tissue injury, *Front. Med.* – 2018. – Vol. 5. – P. 1–15.
70. Vishwakarma A. et al. Engineering Immunomodulatory Biomaterials To Tune the Inflammatory Response. *Trends Biotechnol.* –2016. – Vol. 34, Issue 6. – P. 470–482.
71. CR J. and JM A. Effects of Surface-Coupled Polyethylene Oxide on Human Macrophage Adhesion and Foreign Body Giant Cell Formation in Vitro. *J. Biomed. Mater. Res.* – 1999. – Vol. 44, Issue 2. – P. 206–16.
73. Moore L. B. and Kyriakides T. R. Immune Responses to Biosurfaces. *Adv. Exp. Med. Biol.* – Vol. 865, Issue 10. – P. 93–108.