

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
СУМСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

Кваліфікаційна наукова праця
на правах рукопису

Дейнека Володимир Миколайович

УДК 616.36-002.16-005.1:616-003.93-092.9(043)

ДИСЕРТАЦІЯ

**ГЕМОСТАТИЧНІ ВЛАСТИВОСТІ НОВИХ ТРИВИМІРНИХ
ХІТОЗАНОВИХ МАТЕРІАЛІВ**

222 – Медицина

22 – Охорона здоров'я

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії.

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ В. М. Дейнека

Науковий керівник – **Погорєлов Максим Володимирович**, доктор медичних
наук, професор

Суми – 2022

АНОТАЦІЯ

Дейнека В. М. Гемостатичні властивості нових тривимірних хітозанових матеріалів. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 222 «Медицина». – Навчально-науковий медичний інститут, Сумський державний університет, Суми, 2022.

Ефективне припинення кровотечі попри розвиток сучасної медицини й до цього часу є значним викликом як на дошпитальному етапі, так і в умовах стаціонарної хірургічної допомоги, особливо у разі травми паренхіматозних органів. Серед безлічі способів припинення паренхіматозної кровотечі одним із найбільш пріоритетних є використання місцевих гемостатичних засобів. Це доступні, ефективні та зручні у використанні матеріали, що можуть застосовуватись як самостійно, так і в поєднанні з іншими методами. Місцеві гемостатики існують у вигляді порошків, губок, клеїв, аерогелів, гідрогелів, пластин, мембран тощо і можуть бути синтетичного, біологічного чи неорганічного походження. Одним із найбільш перспективних матеріалів є катіонний полісахарид хітозан (ХТ) завдяки таким властивостями, як нетоксичність, біосумісність, контрольована біодеградація, відсутність імуногенності, висока гемостатична та протимікробна активність. Він може бути застосований у вигляді перев'язувального матеріалу чи ранового покриття, гемостатичного засобу чи скафолду для тканинної інженерії. Проте властивості хітозану та їх вираженість значно залежать від фізичної форми, макро- та мікроструктури біоматеріалу, що особливо важливо для припинення кровотечі з паренхіматозних органів, коли гемостатичний засіб залишається в рані.

Дисертація присвячена розробленню та створенню тривимірних хітозанових місцевих гемостатичних матеріалів для припинення паренхіматозної кровотечі, вивченню їх просторової структури, фізичних характеристик, біосумісності, токсичності та антибактеріальних властивостей,

а також визначенню ефективності гемостазу, особливостей реакції тканин і регенерації печінки після припинення кровотечі (на прикладі печінки щура).

У дослідженні використовували три види хітозанових матеріалів, які розрізнялися за структурою та методом синтезу (кожний із яких використовували в трьох варіантах, залежно від хімічного складу). Так, хітозанові губки, отримані за допомогою ліофільного висушування, розподіляли за видом розчинника на ацетат, аскорбат та оксалат хітозану. Хітозанові аерогелі, синтезовані за принципами «зеленої хімії», розрізнялися залежно від концентрації аспарагінової (Асп) та глутамінової (Глу) амінокислот, що входили до їх складу у співвідношеннях 5:1, 1:1 та 1:5. Хітозанові мембрани, які були створені методом електропрядіння виготовляли з чистого хітозану, а також хітозану в поєднанні з поліетиленоксидом (ПЕО) у співвідношеннях 1:1 та 1:3 відповідно. Основною особливістю мембран, отриманих методом електропрядіння, була їх тривимірна будова з різноспрямованими нановолокнами.

Для всіх зразків були проведені такі методи дослідження, як сканувальна електронна мікроскопія, інфрачервона спектроскопія, визначення пористості й щільності, вимірювання контактного кута мембран, дослідження деградації та біодеградації (*in vitro*), визначення антибактеріальних властивостей і цитотоксичності, дослідження сорбції та гематологічних показників після взаємодії з кров'ю.

Хітозанові губки та аерогелі мали трабекулярну структуру з складним рельєфом та порами різного діаметру. Мембрани отримані шляхом електропрядіння складалась з розгалуженої пористої сітки з нановолокон різного діаметру.

Дослідження на культурі фібробластів продемонструвало безпечність Хт ацетату, проте губки на основі аскорбату та оксалату проявляли токсичний ефект. Аерогелі незалежно від співвідношення амінокислот мали високу біосумісність. Нановолоконні матеріали з чистого хітозану проявляли помірну токсичність, тоді як додавання ПЕО до розчину Хт підвищувало пористість та

гідрофільність мембрани. Співвідношення Хт/ПЕО = 1/3 дозволило одержати однорідні різноспрямовані волокна, що продемонстрували вищу адгезію клітин на своїй поверхні та стимуляцію проліферації.

Одержавши результати та провівши їх аналіз, були визначені три кращі зразки, по одному з кожної групи – Хт ацетат, Хт Асп/Глу = 1/1 та Хт/ПЕО = 1/3. Ці матеріали використовували для оцінювання кровоспинної ефективності та біосумісності на моделі травми печінки щурів. Як групу порівняння використовували один із найбільш поширених у клінічній практиці ефективних місцевих гемостатичних засобів – Тахокомб. Було проведено визначення швидкості гемостазу, оцінювання спайкового процесу, гістологічне, гістохімічне та імуногістохімічне дослідження, статистичне оброблення даних.

У разі застосування хітозанових матеріалів гемостаз було досягнуто в усіх випадках. Час повного припинення кровотечі не мав статистично значущої різниці між групами ($p = 0,083$). Усі досліджувані матеріали мали здатність до біодеградації, що повинна забезпечити їх елімінацію та розвиток власних тканин у місці застосування. Хт ацетат спричиняв виражений спайковий процес у черевній порожнині в 42,85 % щурів на 60-ту добу дослідження, тоді як Хт/ПЕО = 1/3 – лише в 14,29 % тварин. Серед матеріалів на основі хітозану найшвидшу біодеградацію продемонстрував зразок Хт/ПЕО = 1/3, який добре піддавався фрагментуванню, мав значну гетерогенність та вrostання тканин. На 60-ту добу дослідження площа цього матеріалу становила 1,49 (0,17) мм², що менше від Хт ацетату в 1,54 раза та в 3,03 раза менше від Хт Асп/Глу = 1/1.

Застосування нановолоконної мембрани супроводжувалося менш вираженою запальною реакцією як в самому біоматеріалі, так і в оточуючих тканинах порівняно з хітозановими губками та аерогелем. Так, довкола Хт/ПЕО = 1/3 в останній термін дослідження було значне переважання макрофагів М2-типу над М1, а також співвідношення Т-цитотоксичних до Т-регуляторних лімфоцитів становило 0,68, що демонструє протизапальний

ефект матеріалу. Ацетат хітозану демонстрував відносно врівноваження запальної реакції: співвідношення CD68/CD163-позитивних клітин знижувалося з 1,44 на 7-му добу до 1,04 на 60-ту добу дослідження. Застосування Хт Асп/Глу = 1/1 теж приводило до поступового зменшення запалення в капсулі, проте наприкінці експерименту співвідношення M1/M2-типу макрофагів було 1,52, а співвідношення CD8/FOXP3-позитивних клітин становило 1,77, що підтверджувало прозапальний ефект Хт аерогелю. Активна запальна реакція призводила до утворення товстої капсули навколо Хт Асп/Глу = 1/1, розміри якої становили 233,37 (11,69) мкм, що в 2,12 рази більше порівняно з Хт ацетатом та в 3,69 рази більше від Хт/ПЕО = 1/3.

У ранні терміни дослідження застосування Хт губок та мембран призводило до значної проліферації клітин. Визначення експресії Ki-67 продемонструвало, що найбільше Ki-67-позитивних клітин спостерігалось у місцях ремоделювання паренхіми печінки та місцях вrostання сполучної тканини в біоматеріал. Проте на 60-ту добу експерименту індекс проліферації переважав у групі Хт аерогелю і становив 11,89, що більше порівняно з Хт ацетатом і Хт/ПЕО = 1/3 в 1,11 та 1,62 рази відповідно.

Наведені дані поглиблюють розуміння процесу регенерації печінки в разі застосування хітозанових біоматеріалів. Ремоделювання паренхіми та розвиток сполучної тканини залежать від розмірів дефекту, кількості біоматеріалу, швидкості біодеградації й вираженості запальної реакції навколо нього.

Результати дослідження доводять, що хітозанові тривимірні матеріали є ефективними гемостатичними засобами для припинення паренхіматозної кровотечі. Причому внутрішня архітектоніка, пористість, метод синтезу та хімічний склад відіграють значну роль у властивостях кровоспинних матеріалів. Продемонстровано можливість моделювання властивостей кровоспинних матеріалів змінами внутрішньої архітектоніки, пористості, методом синтезу, хімічним складом.

Розроблена та виготовлена методом електропрядіння нановолоконна

мембрана продемонструвала переваги порівняно з губкою й аерогелем швидшою резорбцією, заміщенням власними тканинами та стимулюванням проліферації клітин, що сприяло регенерації печінкової паренхіми.

Таким чином, одержані порівняльні дані, параметри та умови синтезу можуть бути використані для створення засобу медичного призначення на основі хітозану для припинення паренхіматозної кровотечі чи ранового покриття для використання в хірургії з метою закриття значних ранових поверхонь.

Тривимірною будовою хітозанових нановолоконних матеріалів може бути основою для розроблення та створення скафолдів для тканинної інженерії печінки. Контрольована деградація хітозанових мембран, отриманих за допомогою електропрядіння, та можливість поєднання з іншими біополімерами, лікарськими речовинами є перспективним напрямком подальших досліджень адресного доставлення фармакологічного засобу до певного органа чи тканин організму.

Ключові слова: хітозан, електропрядіння, гемостаз, полісахариди, нановолокна, місцевий гемостатичний матеріал, паренхіматозна кровотеча, травма печінки.

SUMMARY

Deineka V. M. Hemostatic properties of new three-dimensional chitosan materials. – Qualifying scientific work on the rights of the manuscript. Thesis for the degree of Doctor of Philosophy on a specialty 222 "Medicine". – Sumy State University, Sumy, 2022.

Despite all the advances in modern medicine, stopping the bleeding is still a severe challenge, both at the hospital stage and in inpatient surgery. An additional problem is the achievement of hemostasis of parenchymal organs due to anatomical and surgical features. Among the many ways to stop parenchymal bleeding, one of the most effective is local hemostatic agents. These are affordable, effective, and easy-to-use materials that can be used alone or with other methods. Local

hemostatics exist in powders, sponges, adhesives, aerogels, hydrogels, plates, membranes, etc., and can be of synthetic, biological, inorganic origin, and polysaccharide derivatives. One of the most promising materials is the cationic polysaccharide chitosan (Ch). Due to its properties such as non-toxicity, biocompatibility, biodegradation, lack of immunogenicity, hemostatic and antimicrobial action can be used as a dressing or wound dressing, hemostatic agent, or scaffold for tissue engineering. However, the properties of chitosan and their severity significantly depend on the physical form, macro, and microstructure of the biomaterial, which is especially important for stopping bleeding from parenchymal organs when hemostatic seeding remains in the wound.

The dissertation is devoted to developing and creating three-dimensional chitosan local hemostatic materials for stopping parenchymal bleeding, studying their structure, physical characteristics, biocompatibility, toxicity, and antibacterial properties, as well as determining the effectiveness of hemostasis and features of tissue response and hepatic regeneration after liver regeneration (for example, rat liver).

The study used three types of chitosan materials, which differed in structure and synthesis method, each of which was divided into three subspecies, depending on the chemical composition. Thus, chitosan sponges obtained by freeze-drying were divided into chitosan acetate, ascorbate, and oxalate. Chitosan aerogels synthesized according to the principles of "green chemistry" differed depending on the concentration of aspartic (Asp) and glutamic (Glu) amino acids that were part of them: 5:1, 1:1, 1:5. Chitosan membranes were synthesized by electrospinning, among which a membrane of pure chitosan was distinguished, as well as chitosan in combination with polyethylene oxide (PEO) in the ratios 1:1 and 1:3, respectively. The main feature of the membranes was that they consisted of a three-dimensional grid of multidirectional nanofibers.

For these samples, research methods such as scanning electron microscopy, infrared spectroscopy, determination of density porosity, measurement of contact angle of membranes, the study of degradation and biodegradation (in vitro),

determination of antibacterial properties and cytotoxicity, the analysis of sorption, and hematological parameters after interaction with blood.

Chitosan sponges and aerogels had a trabecular structure with a complex relief and pores of different diameters. Membranes obtained by electrospinning consisted of a branched porous mesh of nanofibers of different diameters.

Studies of the fibroblast culture have demonstrated the safety of Ch acetate, but ascorbate and oxalate-based sponges have been shown to be toxic. Aerogels, regardless of the ratio of amino acids, had high biocompatibility. Nanofiber materials made of pure chitosan showed moderate toxicity, while the addition of PEO to the solution of Chitosan increased the porosity and hydrophilicity of the membrane. The ratio of Ch/PEO = 1/3 allowed to obtain homogeneous multidirectional fibers, which showed higher adhesion of cells on its surface and stimulation of proliferation.

After obtaining the results and data analysis, three best samples were identified, one from each group – Ch acetate, Ch Asp/Glu = 1/1, and Ch/PEO = 1/3, to assess hemostatic efficacy and biocompatibility in a rat liver injury model. One of the most common in clinical practice effective local hemostatic agents, TachoComb, was used as a control. Determination of the rate of hemostasis, assessment of the adhesion process, histological, histochemical, and immunohistochemical examination, statistical data processing was performed.

With the use of chitosan materials, hemostasis was achieved in all cases. The time of complete cessation of bleeding did not have a statistically significant difference between groups and in comparison, with the control ($p = 0.083$). All studied materials had the ability to biodegrade, which should ensure their elimination and development of their own tissues at the site of application. Ch acetate caused pronounced adhesions in the abdomen in 42.85 % of rats on day 60 of the study, whereas Ch/PEO = 1/3 in only 14.29 % animals. Among the materials based on chitosan, the fastest biodegradation was demonstrated by the sample Ch/PEO = 1/3, which was well fragmented, had significant heterogeneity and tissue growth. On the 60th day of the study, the area of this material was

1.49 (0.17) mm², which is 1.53 times less than Ch acetate and 3.03 times less than Ch Asp/Glu = 1/1.

The use of a nanofiber membrane was accompanied by a less pronounced inflammatory reaction, both in the biomaterial itself and in the surrounding tissues, compared to chitosan sponges and aerogel. So, around Ch/ PEO = 1/3, so there was a significant predominance of M2-type macrophages over M1 in the last term of research. Also, the ratio of T-cytotoxic to T-regulatory lymphocytes made 0,68, which shows an anti-inflammatory cell structure. Chitosan acetate caused a relative balance of the inflammatory response, and the CD68/CD163 ratio decreased from 1.44 on day 7 to 1.04 on day 60 of the study. The use of Ch Asp/Glu = 1/1 also led to a gradual decrease in inflammation in the capsule. Still, at the end of the experiment, the ratio of M1/M2 macrophages was 1.52, and the ratio of CD8/FOXP3 positive cells was 1.77, which confirmed the proinflammatory effect of Ch aerogel. The active inflammatory reaction led to forming a thick capsule around Ch Asp/Glu = 1/1, which was 233.37 (11.69) μm, which is 2.12 times more than Ch acetate 3.69 times more than Ch/PEO = 1/3.

In the early stages of the study, the use of Ch sponges and membranes led to significant cell proliferation. Determination of Ki-67 expression showed that most Ki-67 positive cells were observed at sites of liver parenchyma remodeling at sites of connective tissue ingrowth into the biomaterial. However, on the 60th day of the experiment, the proliferation index prevailed in the Ch group of the aerogel and was 11.89, which is 1.11 and 1.62 times higher, respectively, in comparison with Ch acetate and Ch/PEO = 1/3.

These data deepen the understanding of the processes of liver regeneration with the use of biomaterials. Remodeling of the liver parenchyma and the development of connective tissue depend on the size of the defect, the amount of biomaterial, the rate of biodegradation and the severity of the inflammatory reaction around it.

The results of the study prove that three-dimensional chitosan materials are effective hemostatic agents to stop parenchymal bleeding. Internal architecture,

porosity, synthesis method, chemical composition model the properties of hemostatic materials.

The developed nanofiber membrane obtained by the electrospinning method demonstrated advantages in comparison with the sponge and airgel. The ultrastructure of the nanofiber mesh was rapidly resorbed, replaced by its tissues, and stimulated cell proliferation, which contributed to the regeneration of the liver parenchyma.

The obtained comparative data, parameters, and synthesis conditions can create a hemostatic medical device based on chitosan or wound dressing.

Thus, the obtained comparative data, parameters and conditions of synthesis can be used to create a medical device based on chitosan to stop parenchymal bleeding or wound dressing for use in surgery to close significant wound surfaces.

The three-dimensional structure of chitosan nanofiber materials can be the basis for developing and creating scaffolds for liver tissue engineering. Controlled degradation of chitosan membranes obtained by electrospinning and the possibility of combining with other biopolymers, drugs are promising areas for further research on the targeted delivery of pharmacological agents to specific organs or tissues of the body.

Key words: chitosan, electrospinning, hemostatic biomaterials, hemostasis, polysaccharides, nanofibers, local hemostatic material, parenchymal bleeding, liver.

Список публікацій здобувача за темою дисертації

1. Deineka V., Sulaieva O., Pernakov M., Korniienko V., Husak Y., Yanovska A., Yusupova A., Tkachenko Y., Kalinkevich O., Zlatska A., Pogorielov M. Hemostatic and Tissue Regeneration Performance of Novel Electrospun Chitosan-Based Materials. *Biomedicines*. (*Scopus*) 2021. № 9, P. 588. (Дисертант провів експериментальне дослідження, виконав огляд літератури, сформулював результати дослідження).
2. Deineka V., Sulaieva O., Pernakov N., Radwan-Pragłowska J., Janus L., Korniienko V., Husak Y., Yanovska A., Liubchak I., Yusupova A., Piątkowski M.,

Zlatska A. Hemostatic Performance and Biocompatibility of Chitosan-Based Agents in Experimental Parenchymal Bleeding. *Materials Science and Engineering C. (Scopus)* 2021. № 120. 111740. DOI: 10.1016/j.msec.2020.111740. (Здобувач провів експериментальне дослідження, сформулював результати дослідження та висновки, підготував статтю до друку).

3. Radwan-Pragłowska J., Korniienko V., Husak Y., Deineka V., Janus Ł., Matysek D., Holubnycha V., Oleshko O., Piątkowski M., Pogorielov M. Nanostructured hemostatic sponges made from chitosan: Structural and biological evaluation. Paper presented at the Springer Proceedings in Physics. (*Scopus*) 2020. № 244. P. 95–110. DOI: 10.1007/978-981-15-3996-1_10. (Автор провів дослідження цитотоксичності, опрацював результати дослідження, сформулював висновки).

4. Radwan-Pragłowska J., Piątkowski M., Deineka V., Janus Ł., Korniienko V., Husak E., Holubnycha V., Liubchak I., Zhurba V., Sierakowska A., Pogorielov M., Bogdał D. Chitosan-Based Bioactive Hemostatic Agents with Antibacterial properties – synthesis and Characterization. *Molecules. (Scopus)* 2020. № 24. (14). 2629. DOI: 10.3390/molecules24142629. (Дисертант провів мікробіологічне дослідження, визначив цитотоксичності, виконав огляд літератури та описав результати дослідження).

5. Pogorielov M., Deineka V., Oleshko O., Liubchak I., Dedkova K., Vasyliiev R., Zubov D., Kalinkevich A., Kalinkevich O. Development of chitosan hemostatic sponges with different solvents and tranexamic acid. Paper presented at the Proceedings of the 2018 IEEE 8th International Conference on Nanomaterials: Applications and Properties NAP. (*Scopus*) 2018. № 8914877. DOI: 10.1109/NAP.2018.8914877. (Автор провів дослідження фізичних властивостей та експеримент in vitro, опрацював результати дослідження).

6. Qasim S. B., Husain S., Huang, Y., Pogorielov M., Deineka V., Lyndin M., Rawlinson A., Rehman I. U. In-vitro and in-vivo degradation studies of freeze gelled porous chitosan composite scaffolds for tissue engineering applications. *Polymer Degradation and Stability. (Scopus)* 2017. № 136. P. 31–38.

DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2016.11.018. (Здобувач провів експериментальне дослідження, виконав огляд літератури).

7. Pogorielov M., Kalinkevich O., Deineka V., Garbuzova V., Solodovnik A., Kalinkevich A., Kalinichenko T., Gapchenko A., Sklyar A., Danilchenko S. Haemostatic chitosan coated gauze: In vitro interaction with human blood and in-vivo effectiveness. *Biomaterials Research. (Scopus)* 2015. № 19 (1). P. 22.

DOI: 10.1186/s40824-015-0044-0/. (Дисертант провів експериментальне дослідження, виконав огляд літератури, опрацював статистичні дані).

8. Radwan-Pragłowska J., Janus Ł., Piątkowski M., Sierakowska A., Deineka V., Korniienko V., Husak E., Holubnycha V., Liubchak I., Zhurba V., Pogorielov M. Novel hemostatic agents for biomedical applications. *Book of Abstracts International conference “Nanomaterials for biosensors and biomedical applications”*. Jurmala, Latvia, 2–4 July, 2019. P. 31 (Автор провів експериментальне дослідження, виконав огляд літератури, опрацював статистичні дані).

9. Deineka V., Radwan-Pragłowska J., Liubchak I. Influence of different solvent to hemostatic activity of chitosan sponge. *Book of Abstracts International conference “Nanomaterials for biosensors and biomedical applications”*. Jurmala, Latvia, 2–4 July, 2019. P. 54. (Дисертант провів експериментальне дослідження, опрацював отримані результати, сформував висновки, підготував тези до друку).

10. Deineka V., Liubchak I., Kalinkevich O. Cytotoxicity of chitosan-based hemostatic materials. *Topical issues of theoretical and clinical medicine: abstract book of International scientific and practical conference of students, postgraduates and young scientists, Sumy, October 17–19, 2018*. P. 116. (Автор провів експериментальне дослідження та літературний пошук, опрацював отримані результати, сформував висновки).

11. Deineka V., Liubchak I. New hemostatic sponge – in vitro study. *8th International Student Medical Congress, Košice, June 22–24, 2016*. Abstract

book. P. 22. (Здобувач провів експериментальне дослідження, опрацював отримані результати, підготував тези до друку).

12. Дейнека В. М., Погорелов М. В. Визначення гемостатичних властивостей губки на основі хітозану *in vitro*. Теорія та практика сучасної морфології: матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю, м. Дніпро, 5–7 жовтня 2016. С. 48. (Дисертант провів експериментальне дослідження, опрацював отримані результати, сформував висновки та підготував тези до друку).

13. Pogorielov M., Kalinkevich O., Deineka V., Garbuzova V., Kalinkevich A., Garchenko A. Effect of chitosan molecular weight, percentage in solution and method of production to human blood cells. Морфологічні дослідження – виклики сучасності. Збірник тез доповідей науково-практичної конференції, м. Суми, 23–24 квітня 2015, С. 58–59. (Автор провів експериментальне дослідження, опрацював результати, підготував тези до друку).

14. Погорелов М. В., Дейнека В. М., Гарбузова В. Ю., Солодовник О. В., Калінкевич О. В., Калінкевич О. В., Данильченко С. М. Спосіб зупинки кровотечі із судин різного типу: патент на корисну модель № 105516 Україна, МПК А61L 15/28 (2006.01); заявл. 07.09.2015; опубл. 25.03.2016, Бюл. № 6. (Здобувач провів експериментальне дослідження, сформулював реферат та формулу корисної моделі).

15. Погорелов М. В., Дейнека В. М., Гарбузова В. Ю., Солодовник О. В., Калінкевич О. В., Калінкевич О. В., Данильченко С. М. Спосіб отримання місцевого гемостатичного матеріалу для зупинки кровотечі з паренхіматозних органів: патент на корисну модель № 129196 Україна, МПК (2018.01) А61В 7/00; заявл. 16.04.2018; опубл. 25.10.2018, Бюл. № 20. (Дисертант провів експериментальне дослідження, проаналізував результати, сформулював реферат та формулу корисної моделі).

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	15
ВСТУП.....	16
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	24
1.1. Особливості припинення паренхіматозної кровотечі.....	24
1.2. Місцеві гемостатичні засоби.....	33
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	49
2.1. Виготовлення гемостатичних матеріалів із хітозану.....	49
2.2. Дослідження структури та властивостей матеріалів.....	51
2.3. Оцінювання ефективності на моделі травми печінки щурів.....	55
2.4. Статистичний аналіз.....	61
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	63
3.1. Дослідження фізико-хімічних та структурних властивостей хітозанових біоматеріалів.....	63
3.2. Вивчення біологічних властивостей хітозанових гемостатичних матеріалів.....	75
3.3. Оцінювання ефективності на моделі травми печінки щурів.....	90
РОЗДІЛ 4. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	147
ВИСНОВКИ.....	165
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	168
ДОДАТКИ.....	197

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

Хт	–	хітозан.
БМ	–	біоматеріал.
Асп	–	аспарагінова кислота.
Глу	–	глутамінова кислота.
ПЕО	–	поліетиленоксид.
ХтГ	–	хітозанові губки.
ХтА	–	хітозанові аерогелі.
ХтМ	–	хітозанові мембрани.
SBF	–	simulated body fluid.
КУО	–	колонієутворювальні одиниці.
ПЕГ	–	поліетиленгліколь.
СТ	–	сполучна тканина.

ВСТУП

Актуальність проблеми. Гостра неконтрольована кровотеча в разі травматичних ушкоджень, бойових поранень чи хірургічних втручань може призвести до тяжких наслідків. Так, близько 50 % військових втрат та 33–56 % летальних цивільних випадків пов'язаних з масивною крововтратою [1], [2]. Абдомінальна травма зазвичай асоційована з пошкодженням паренхіматозних органів, серед яких одним із найбільш частих є ураження печінки [3]. Пошкодження печінки спостерігаються в 16 % постраждалих у разі закритої травми живота і 37 % у разі проникних поранень живота [4]. Значні розриви паренхіми можуть супроводжуватися втратою крові від 500 мл до 3 500 мл, а припинення кровотечі може займати близько 85 % часу оперативного втручання [5]. Навіть під час планового оперування пацієнтів із патологією печінки причиною 39,4 % релапаротомій є післяопераційна кровотеча з її паренхіми [6].

До найбільш використовуваних методів припинення паренхіматозної кровотечі відносять: емболізацію, гепатопексію, накладення гемостатичних швів, використання електро-, лазерної, аргоноплазмової чи ультразвукової коагуляції тощо [7]. Проте одним із найефективніших способів досягнення надійного гемостазу є застосування місцевих гемостатичних матеріалів як самостійно, так і в поєднанні з іншими методами [8].

Місцеві гемостатики можуть бути у вигляді порошків, губок, пов'язок, мембран, клеїв та ін. Вони зручні у використанні, ефективні та доступні на всіх рівнях надання хірургічної допомоги. За походженням розрізняють гемостатичні матеріали біологічного, синтетичного, неорганічного походження та продукти на основі полісахаридів [9]. Попри велику різноманітність постійно розробляють нові кровоспинні матеріали які, з одного боку, будуть ефективно та швидко припиняти паренхіматозну кровотечу, а з іншого – після досягнення гемостазу безпечні для оточуючих тканин та організму загалом. Крім того, розроблений гемостатичний матеріал

повинен забезпечувати біосумісність, відсутність імуногенності та зазнавати біодеградації [10].

Найбільш перспективним для розроблення місцевого гемостатичного матеріалу є хітозан (ХТ) – катіонний полісахарид, що синтезується за допомогою деацетилювання хітину. Він набув широкого використання як біополімер для лікування ран у наслідок своїх протимікробних та протигрибкових властивостей [11]. ХТ є біосумісним та нетоксичним БМ, що повністю зазнає біодеградації. Виявлені гемостатичні властивості обумовлені здатністю аглютинувати еритроцити, активувати тромбоцити, сприяти їх адгезії та агрегації, що розширило спектр застосування ХТ [12].

Структурна стабільність ХТ, здатність розчинятися в органічних розчинниках полегшують виготовлення різноманітних фізичних форм, таких як порошок, плівка, губка, гідрогель, мембрана тощо [13]. Відомо, що форма та фізичні характеристики кровоспинного засобу впливають на вираженість гемостатичних властивостей. Пориста структура й велика площа активної поверхні матеріалу підвищують сорбційну здатність та сприяють більшій взаємодії з тромбоцитами і факторами згортання крові, необхідними для формування згустка [14].

Останнім часом усе більшого поширення набуває метод електропрядіння, що дозволяє створювати тривимірну, нановолоконну мембрану, яку можна застосовувати як ранове покриття [15]. Залежно від виду полімера чи їх комбінації, додаткових параметрів, таких як сила струму, швидкість подачі та відстань до колектора, електропрядіння дозволяє моделювати товщину й спрямованість волокон, величину і форму пор, а також товщину готової мембрани [16]. Цей метод забезпечує високу пористість та більшу площу активної поверхні. Нановолокна покращують адгезію, проліферацію та диференціацію фібробластів. З'єднана система пор полегшує вrostання грануляційної тканини, що забезпечує рівномірну деградацію мембрани [17], [18].

Проте достеменно невідомі вираженість гемостатичних властивостей мембрани, отриманої шляхом електропрядіння, вплив нанорозмірної структури та її біологічне значення на регенерацію паренхіми печінки.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконана відповідно до плану наукових досліджень Навчально-наукового медичного інституту Сумського державного університету в рамках держбюджетного проекту «Розроблення та дослідження засобів місцевого призначення з гемостатичними властивостями для невідкладної допомоги та хірургії» (0116U006817), проекту в рамках програми Horizon-2020 RISE-MSCA «Nanostructural surface development for dental implant manufacturing» (777926) та проекту за фінансування Національного фонду досліджень України «Персоналізовані біоінженерні скафолди для остеохондральної регенерації, отримані методом адитивного виробництва з покращеними властивостями поверхні» (реєстраційний номер 2020.02/0223). Дисертант був виконавцем усіх проектів.

Мета дослідження – визначити ефективність припинення кровотечі та показники регенерації паренхіматозних органів (на моделі рани печінки щурів) у разі застосування нових тривимірних хітозанових матеріалів різних методів синтезу.

Завдання дослідження:

1. Розробити технологію створення нових тривимірних матеріалів з хітозану з використанням різних методів синтезу та дослідити їх структурні й фізико-хімічні властивості.
2. Визначити біосумісність, токсичність, антибактеріальні властивості та *in vitro* ефективність нових кровоспинних хітозанових матеріалів різної структури та методів синтезу.
3. Оцінити ефективність припинення паренхіматозної кровотечі хітозановими біоматеріалами на моделі рани печінки щурів.

4. Вивчити особливості біодеградації хітозанових кровоспинних матеріалів та клітинну відповідь у різні терміни після досягнення гемостазу рани печінки.
5. Дослідити процеси регенерації травмованої ділянки печінки та реакцію оточуючих тканин після застосування хітозанових гемостатичних матеріалів.
6. Провести аналіз ефективності використання різних методів отримання тривимірних хітозанових матеріалів для створення нових гемостатичних засобів медичного призначення.

Об'єкт дослідження: процеси гемостазу та регенерації рани печінки.

Предмет дослідження: гемостатичні властивості хітозанових кровоспинних матеріалів різних методів синтезу.

Методи дослідження:

1. Дослідження структури та властивостей матеріалів: сканувальна електронна мікроскопія, аналіз інфрачервоної спектроскопії з перетворенням Фур'є, визначення контактного кута мембран, вимірювання пористості та щільності, дослідження деградації та біодеградації (in vitro), визначення антибактеріальних властивостей, дослідження цитотоксичності, а також взаємодії з кров'ю.
2. Візуальне визначення ефективності та швидкості гемостазу на моделі рани печінки щурів.
3. Візуальне оцінювання спайкового процесу в черевній порожнині щурів після застосування місцевих гемостатичних матеріалів.
4. Гістологічний метод: забарвлення тканин гематоксилином та еозином.
5. Гістохімічний метод: забарвлення толуїдиновим синім, трихромне забарвлення за Массоном, забарвлення за Гоморі.
6. Імуногістохімічний метод (застосування CD68, CD8, FOXP3, альфа-SMA, Ki-67).
7. Морфометричний метод: визначення основних обсягів структурних компонентів біоматеріалу і тканин.
8. Лабораторний метод: визначення показників клінічного аналізу крові та

системи згортання крові після взаємодії з гемостатичним матеріалом.

9. Статистичні методи (застосування параметричних та непараметричних статистичних показників).

Наукова новизна одержаних результатів. Уперше доведено, що хітозанові матеріали не поступаються за своєю ефективністю загальноуживаним гемостатичним матеріалам біологічного походження (Тахокомб), під час припинення паренхіматозної кровотечі

Виявлено, що хітозан у вигляді губки, отриманої за допомогою ліофільного висушування, має значну сорбційну здатність, а вираженість фізичних характеристик губки та цитотоксичність залежать від виду органічного розчинника хітозану.

Продемонстровано, що хітозанові аерогелі, синтезовані за принципами зеленої хімії, проявляють виражену антибактеріальну дію. Включення аспарагінової та глутамінової амінокислот і їх співвідношення модифікують властивості аерогелів.

Розроблений спосіб синтезу тривимірної, нановолоконної мембрани на основі хітозану методом електропрядіння для припинення кровотечі. Визначено оптимальні фізичні характеристики робочого розчину та параметри процесу електропрядіння. Доведено, що гемостатичні, нановолоконні матеріали мають протизапальну дію та швидше зазнають біодеградації, стимулюють проліферацію гепатоцитів та мінімізують утворення сполучної тканини.

Уперше на моделі травми печінки встановлений задовільний гемостатичний ефект Хт мембран, виготовлених методом електропрядіння, а також визначені терміни біодеградації та вплив на процеси регенерації паренхіматозного органа. Експериментально встановлена безпечність застосування нового матеріалу та визначене потенціювання регенерації паренхіми печінки у віддалені терміни після припинення кровотечі.

Практичне значення одержаних результатів.

Результати дисертаційного дослідження демонструють особливості хітозанових кровоспинних матеріалів під час припинення паренхіматозної кровотечі печінки та залежність гемостатичних властивостей від форми гемостатичного засобу. Ці дані можуть бути враховані в разі створення засобу медичного призначення для припинення паренхіматозної кровотечі чи ранового покриття для використання в хірургії з метою закриття значних ранових поверхонь паренхіматозних органів.

Створено нановолоконну мембрану на основі хітозану та розроблено оптимальні параметри її синтезу методом електропрядіння. Тривимірною будовою гемостатичних матеріалів із хаотично розміщеними, ультратонкими волокнами сприяла регенерації печінкової паренхіми, що може бути використано з метою розроблення та створення скафолдів для тканинної інженерії печінки.

Контрольована деградація хітозанових мембран, отриманих за допомогою електропрядіння, та можливість поєднання з іншими біополімерами, лікарськими речовинами чи іонами металів є перспективним напрямком подальших досліджень адресного доставлення (drug delivery) фармакологічного засобу до певного органа чи клітин організму.

Виражені сорбційні властивості хітозанових губок та протимікробна дія аерогелів можуть бути застосовані під час запальної фази ранового процесу для лікування гнійних ран із метою абсорбції гнійно-некротичного ексудату та боротьби з мікробним забрудненням.

Результати експериментальних досліджень упроваджені в навчальній та науковій процесі на кафедрі біологічної хімії Харківського національного медичного університету, в ТОВ «СІ ЕС ДІ ХЕЛС КЕА» (м. Київ), на кафедрі стоматології післядипломної освіти Запорізького державного медичного університету та кафедрі патологічної анатомії з секційним курсом Полтавського державного медичного університету, в клініці «Ексіма» (м. Запоріжжя), на кафедрі анатомії людини імені М.Г. Туркевича

Буковинського державного медичного університету та кафедрі патологічної фізіології Національного фармацевтичного університету.

Особистий внесок здобувача. Дисертант самостійно провів патентно-інформаційний пошук та аналіз літературних джерел за темою наукового дослідження, визначив мету, завдання та розробив дизайн дослідження. Автор створив тривимірну біополімерну мембрану методом електропрядіння, проведено визначив фізичні характеристики, провів мікробіологічне дослідження та визначив цитотоксичність. Здобувач виконав експериментальну частину роботи на лабораторних тваринах, статистично опрацював та проаналізував одержані дані. За безпосередньої участі дисертанта проведено гістологічні, гістохімічні та імуногістохімічні дослідження. Дисертант написав усі розділи дисертації та висновки. Основна частина дослідження була виконана на базі Центру біомедичних досліджень ННМІ СумДУ. Хітозанові губки сумісно синтезувались на базі Інституту прикладної фізики Національної академії наук України. Хітозанові аерогелі були отримані в результаті співпраці з факультетом хімічної інженерії та технологій Краківського технологічного університету (Польща). Електропрядіння хітозанових мембран проводили на базі компанії Nano Prime (Польща). Гістологічні, гістохімічні та імуногістохімічні дослідження були виконані в співпраці з компанією CSD (м. Київ). Флуоресцентну мікроскопію досліджуваних зразків проводили спільно з компанією Пауа (м. Київ). Разом із науковим керівником проведені узагальнення результатів роботи та обговорення висновків.

Апробація результатів дисертації. Основні положення та результати роботи оприлюднені на: науково-практичній конференції «Морфологічні дослідження, виклики сучасності» (Суми, 2016), 8-му Міжнародному студентському медичному конгресі «8th International Student Medical Congress in Košice» (Кошице, Словаччина, 2016), науково-практичній конференції з міжнародною участю «Теорія та практика сучасної морфології»

(Дніпро, 2016), Міжнародній науково-практичній конференції студентів, аспірантів та молодих вчених «Topical issues of theoretical and clinical medicine» (Суми, 2018), Міжнародній конференції «Nanomaterials: Applications & Properties» (Затока, 2018), Міжнародній конференції «Nanomaterials for biosensors and biomedical application» (Юрмала, Латвія, 2019).

Публікації. Матеріали дисертаційної роботи опубліковані в 15 наукових працях, серед яких 7 статей, що індексуються наукометричною базою Scopus, 2 патенти на корисну модель та 6 тез доповідей у матеріалах науково-практичних конференцій.

Структура та обсяг дисертації. Дисертацію викладено українською мовою на 207 сторінках. Робота складається з анотації, вступу, огляду літератури, матеріалів та методів дослідження, 3 розділів власних досліджень, аналізу та узагальнення результатів дослідження, висновків, списку використаних джерел та додатків. Дисертація містить список цитованої літератури до якого входять 257 найменувань, серед яких 11 кирилицею та 246 латиницею, 113 рисунків і 5 таблиць.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Особливості припинення паренхіматозної кровотечі

Хірургія паренхіматозних органів завжди була викликом для хірурга у зв'язку з інтраопераційною чи післяопераційною кровотечею як під час планових, так і невідкладних оперативних втручань. Травматичні пошкодження є основною причиною смерті осіб віком до 40 років. У разі травми органів черевної порожнини найбільш часто пошкоджується печінка, у 10–12% це ізольовані ураження та у 20–40% поєднані травми [19], [20], [21], [22].

Тяжкість травми печінки, за рекомендацією Всесвітнього товариства екстреної хірургії, поділяється на 4 ступені: легка травма – I ст., середньої тяжкості – II ст., тяжка – III–IV ст. [23]. Згідно із сучасною тактикою травми печінки I–III ст. тяжкості з стабільною гемодинамікою лікуються консервативно [24], [25]. Ефективність такого підходу досягає близько 90 % [26], [27]. Консервативна терапія та сучасні методи візуалізації дозволили знизити кількість оперативних втручань у разі тупої травми живота до 10–14 %. Травми IV ступеня потребують невідкладного оперативного лікування [28], [29]. У 5–10 % консервативна терапія виявляється неефективною, що вимагає екстреного оперування [30], [31], [32]. Смертність у разі тяжкої травми печінки (IV ст.) коливається від 46 % до 66 %, що в 59 % пацієнтів пов'язано з неконтрольованою кровотечею [33], [34].

Показаннями до екстреного оперативного лікування є кровотеча з паренхіматозних органів, проникні поранення, нестабільна гемодинаміка навіть за незначної травми, перитонеальні ознаки, наявність крові в черевній порожнині [35]. Близько 70,5 % пацієнтів потребують переливання компонентів крові [36]. У деяких пацієнтів за наявності обладнання та кваліфікації медичного персоналу на першому етапі можливе проведення лікувально-діагностичної лапароскопії [37]. Проте здебільшого необхідна повноцінна лапаротомія, що дозволяє виявити джерело кровотечі та провести всі необхідні маніпуляції для її припинення [38], [39].

Друга найбільш часта причина оперативних втручань на печінці – це вогнищеві ураження, такі як доброякісні або злроякісні новоутворення, паразитарні чи непаразитарні кісти [40]. Гепатоцелюлярна карцинома виникає у 5,6 % пацієнтів серед усієї онкопатології [41]. Проте більшість злроякісних уражень паренхіми печінки припадає на метастази раку інших локалізацій. Так, 32,7–35,6 % – це метастази колоректального раку в печінку [40], [41]. Згідно з онкологічними принципами у разі операбельності процесу виконують сегментектомії, атипіві резекції під час метастатичного процесу, або ж гемігепатектомії в разі гепатоцелюлярної карциноми. Ці втручання можливі як у варіанті відкритої, так і лапароскопічної чи роботизованої хірургії [44], [45], [46].

Не менш важливим є досягнення повного гемостазу під час операції з приводу забору імплантата в живого донора [47]. Трансплантація печінки – це найбільш ефективний метод лікування захворювань печінки на термінальній стадії [48]. Кількість таких трансплантацій від живого донора постійно збільшується у зв'язку з недостатністю трупних донорських органів [49]. Але особливістю цих втручань є обережне поводження з паренхімою та судинами для збереження життєздатності й максимального об'єму залишкового і донорського фрагментів печінки [50], [51]. Хоча інтраопераційна крововтрата в середньому не перевищує 500 мл [52], будь-яка трансфузія компонентів може погіршити стан як донора, так і трансплантата [53].

Незалежно від причин оперативного втручання на печінці в ранньому післяопераційному періоді (перші 24 год) можлива кровотеча внаслідок неадекватного припинення, технічних недоліків чи коагулопатії. Вторинна кровотеча можлива переважно між 5-ю та 10-ю післяопераційним добами, що може бути пов'язано з інфекційними ускладненнями чи дефектами згортання крові [54].

Печінка – це високоваскуляризований орган людського організму, який можна поділити на чотири частки, або вісім сегментів. Близько 75 % крові вона отримує з ворітної вени і 25 % – із власної печінкової артерії. Найменшою структурно-функціональною одиницею є часточка, що має гексагональну

форму та побудована з радіально розміщених балок [55]. Міжчасточкові вени продовжуються в специфічні широкі капіляри – синусоїди, що впадають у центральну вену. Синусоїдальні пори добре пропускають рідку частину крові у простір Діссе до гепатоцитів, водночас затримуючи клітини. Синусоїди складаються з унікальних фенестрованих синусоїдальних ендотеліальних клітин печінки, в яких відсутня базальна мембрана. Вони формують гетерогенну клітинну популяцію, що очищає кров від макромолекулярних відходів, імунних комплексів, ліпополісахаридів, а також можуть виконувати антигенпрезентувальну функцію. Центральні вени часточок збирають кров від часточок, поступово зливаються, утворюючи здебільшого три печінкові вени, що впадають у нижню порожнисту вену [56].

Така унікальна структура паренхіми печінки пояснює всю складність припинення печінкової кровотечі. Передусім це два джерела кровопостачання, що вимагає контролювати порталну тріаду під час оперативних втручань. Також анатомічно складна локалізація печінкових вен, оскільки місце впадання в нижню порожнисту вену повністю закрито печінкою, а доступ до нього неможливо виконати швидко навіть під час планової операції. До того ж особливості будови синусоїдальних капілярів не дозволяють їм скорочуватися для зменшення свого діаметра, як це відбувається в інших тканинах. Така особливість призводить до того, що навіть незначна паренхіматозна печінкова кровотеча може стати серйозною хірургічною проблемою, оскільки не здатна самостійно припинитись і завжди вимагає лікувальних дій [57].

Загоєння ран відбувається в чотири фази, де одна фаза поступово змінює іншу: гемостаз, запалення, проліферація, ремоделювання. Непошкоджений ендотелій судин запобігає згортанню крові виділенням гепариноподібних молекул, тромбомодуліну, оксиду азоту та простагліцину. Також ендотеліальний глікокалікс попереджає адсорбцію білків на судинній стінці. Гемостаз – це процес, що припиняє кровотечу за допомогою утворення тромбу. Розрізняють судинно-тромбоцитарний та коагуляційний гемостаз. У

разі порушення цілісності тканин із виникненням кровотечі першим настає судинно-тромбоцитарний гемостаз. Пошкодження ендотелію призводять до звуження просвіту капілярів для зменшення об'єму крові у місці травми та секреції прокоагулянтних білків і факторів. Потім виникають адгезія тромбоцитів до фактора фон Віллебранда та підендотеліального колагену, їх агрегація й активація з утворенням пухкої тромбоцитарної пробки [58].

Якщо процес на цьому етапі не припинився, то виникають незворотна агрегація тромбоцитів та запускання коагуляційного гемостазу. Під дією тканинного тромбопластину утворюється тромбін, що спричиняє фосфорилування внутрішньоклітинних білків тромбоцитів. Це призводить до вивільнення іонів кальцію, активації фосфоліпази A_2 , утворення простагландинів G_2 та H_2 , тромбоксану A_2 , а в подальшому – дегрануляції тромбоцитів і перетворення розчинного фібриногену на нерозчинний фібрин з утворенням червоного тромбу [59].

На основі цього складного комплексу механізмів гемостазу формуються підходи до розроблення нових матеріалів та методів припинення кровотечі. Вони можуть бути спрямовані на зменшення кровотоку в пошкодженій судині чи її повну оклюзію, стимуляцію та прискорення адгезії, агрегації й активації тромбоцитів, сорбції плазми, концентрації формених елементів та білків у місці кровотечі, збільшення кількості речовин, необхідних для утворення нерозчинного тромбу, таких як фібрин, тромбін, кальцій [60].

Сучасні шляхи припинення печінкової паренхіматозної кровотечі можна поділити на три групи: 1) методи, що впливають на гемодинаміку; 2) консервативну гемостатичну терапію; 3) хірургічні процедури [61]. До впливу на системну гемодинаміку відносять зниження центрального венозного тиску (ЦВТ). Рівень ЦВТ корелює з величиною крововтрати під час оперативних втручань на печінці. У разі підвищення ЦВТ різко збільшується об'єм крововтрати [62]. Зниження ЦВТ досягають переважно судинорозширювальними препаратами та зменшенням внутрішньосудинного

об'єму рідини. Проте така тактика становить ризик виникнення повітряної емболії, гіперперфузії органів та гострої ниркової недостатності [63].

Згідно з Європейськими рекомендаціями з лікування тяжкої посттравматичної кровотечі консервативна гемостатична терапія показана всім травмованим пацієнтам із діагностованою кровотечею або високим ризиком кровотечі. Розпочинати лікування необхідно з уведення 1 г транексамової кислоти в перші 3 год після травми, оптимальним є введення ще на догоспітальному етапі. У подальшому залежно від клінічної ситуації, якщо кровотеча продовжується, протромбіновий час та активований частковий тромбoplastиновий час збільшений в 1,5 раза чи більше, рекомендоване переливання свіжозамороженої плазми. Якщо рівень фібриногену менший від 1,5 г/л, показане вливання концентрату фібриногену чи криопреципітату. У разі зниження іонізованого кальцію необхідне введення хлориду кальцію до відновлення його рівня. Рівень тромбоцитів менший ніж $50 \times 10^9/\text{л}$ є показанням для переливання тромбоцитарної маси. Цільовим показником є досягнення кількості тромбоцитів $100 \times 10^9/\text{л}$. Паралельно з гемостатичною терапією вводять кристалоїдні чи колоїдні розчини для нормалізації рН та об'єму циркулюючої крові [64], [65].

Консервативне гемостатичне лікування як монотерапія буде ефективним лише за незначної кровотечі, в решті випадків його завдання – продовжити час до початку оперативного лікування та хірургічного припинення кровотечі [66]. Не менш важливим є коригування системи згортання крові під час хірургічного втручання [67]. Агресивна гемостатична терапія становить ризик гіперкоагуляції та тромбоемболії. Застосування препаратів крові небезпечне інфікуванням ВІЛ, вірусними гепатитами чи виникненням гемотрансфузійних алергічних реакцій. До того ж переливання великих об'ємів плазми може призвести до розвитку синдромів перевантаження кровообігу та гострого пошкодження легень, пов'язаних із гемотрансфузією, чи в більш складних випадках – синдрому поліорганної

недостатності [68]. А власне факт переливання свіжозамороженої плазми є незалежним предиктором вищого рівня ускладнень та смертності [69].

Хірургічні методи припинення паренхіматозної кровотечі можна поділити на тимчасові та остаточні. До тимчасових методів відносять тампонаду печінки і тимчасове стиснення великих судин. Їх використовують переважно в екстрених випадках, за значних розривів печінки або ж для досягнення «сухого» операційного поля з метою кращої візуалізації анатомічних структур та місця кровотечі для остаточного її припинення [70]. Тампонада печінки може бути виконана марлевими серветками, великим чепцем чи спеціальними пристроями, які заповнюють повітрям або рідиною [71], [72]. Інколи за значного діаметра ранового каналу печінки можливе проведення «внутрішньої тампонади» [73]. Механізм тампонади полягає в стисненні паренхіми печінки, яка віддалено зможе стиснути кровоточиві судини в її товщі. Проте за недостатньо щільної тампонади кровотеча не буде призупинена, а занадто великий тиск може призвести до ішемічного ураження непошкодженої печінкової паренхіми чи розвитку синдрому підвищеного внутрішньочеревного тиску [74]. До того ж причину функціональних ускладнень із боку печінки важко диференціювати в ранньому післяопераційному періоді, тому що це може бути викликано як власне травмою печінкової паренхіми, так і занадто сильним тампонуванням. А використання чужорідного матеріалу підвищує ризик абдомінальної інфекції та септичних ускладнень [75]. Тимчасові методи припинення кровотечі ефективні особливо у разі тяжких травм, що вкладається в концепцію тактики «Damage control», де надають перевагу фізіологічному відновленню перед анатомічним. Він ґрунтується на реанімаційних заходах, пов'язаних із швидким гемостазом, та запобіганні або корекції смертельної тріади: гіпотермії, ацидозу та порушень згортання крові [76].

Серед варіантів стиснення великих судин переважно застосовують маневр Прингла – стиснення всіх трубчастих структур порталних воріт печінки [77]. Але цей маневр не можна застосовувати більше ніж 15 хв

першого разу та більше ніж 10 хв – під час повторного перетиснення з 5-хвилинною реперфузією. Сумарна тривалість ішемії в разі повторення циклу не повинна перевищувати 60 хв [78]. Більш тривале призупинення кровотоку небезпечно ішемічним пошкодженням печінки, функція якої й так порушена через кровотечу. У деяких випадках виділяють і перетискують лише судини правої чи лівої часток печінки і, за необхідності, це може стати остаточним методом припинення кровотечі, що продовжить проведення гемігепатектомії [79].

Одині з перших розроблених методів остаточного припинення кровотечі – накладання гемостатичних швів М. М. Кузнєцова і Ю. Р. Пенського (1894), матрацні шви В. А. Опеля (1906), (1936), блокоподібний шов Б. І. Альперовича (1955). Останній ефективний у разі дифузної паренхіматозної кровотечі, якщо не можна виділити окремо пошкоджену судину. Суть гемостатичних швів печінки полягає в прошиванні всієї товщі паренхіми та стисненні її шовним матеріалом. Проте шовний матеріал може прорізати паренхіму та посилити кровотечу. Глибоко накладені шви небезпечні ішемією органа чи його частини з порушенням функції, або некрозом. Крім того, накладання швів вимагає досить тривалого часу та майстерності хірурга. Часто печінкові шви поєднують з оментопексією. Однак цей метод може призвести до запалення чи рубцювання пасма чепця або ж спричинити його некроз [80].

За умов трансекції печінкової паренхіми надійним способом гемостазу є накладання лігатур чи кліпсів на великі печінкові судини. Для припинення кровотечі з дрібних судин можна застосовувати лінійні зшивальні апарати або різні види електроенергетичного впливу. Лінійні зшиваючі апарати дозволяють скоротити час операції та зменшують крововтрату. Проте цей метод не набув значного поширення у зв'язку з технічними обмеженнями та економічною доцільністю [81]. Зшивальний апарат не можна накладати у складних анатомічних ділянках, що вимагає наявності додаткового обладнання, до того ж проведення трансекції паренхіми лише зшивальним апаратом значно підвищує витрати на операцію [82].

Останнім десятиліттям проводяться активне розроблення, вдосконалення та впровадження засобів для коагуляції судин, які використовують різні типи енергії [83]. Одна з найбільш поширених – це монополярна електрокоагуляція, коли активний електрод знаходиться в руках хірурга, а пасивний кріпиться до тіла пацієнта. Її частіше використовують для роз'єднання тканин, проте залежно від виду обраного режиму можливе досить ефективно припинення кровотечі з дрібних судин та капілярів. Недоліки цього типу інструментів є робота в «сухому» полі, що знижує ефективність за значної кровотечі чи надлишку інших рідин, а також обуглювання тканин, що може досягати 7 мм. До того ж у разі неправильного розміщення пасивного електрода є ризик ураження електричним струмом [84]. Більш безпечною та ефективною є біполярна коагуляція, коли струм проходить між двома браншами затискача чи пінцета. Вони відносно швидко працюють досягаючи близько 3,0 см²/хв і мають помірне обуглювання тканин [85]. У сучасному варіанті біполярні інструменти, наприклад найбільш поширений LigaSure (Covidien), мають додатково ніж, що дозволяє швидко роз'єднувати тканини після завершення коагуляції. До того ж бранші інструмента мають теплоізоляцію, що значно зменшує термічні пошкодження оточуючих тканин. Виробники стверджують, що ці інструменти здатні коагулювати артерії діаметром до 7 мм, а вени – до 12 мм [86].

Інший тип використовуваних кровоспинних інструментів – використовує ультразвук. Найбільш відомі представники – це: Thunderbeat[®] (Olympus, Tokyo, Japan) та Harmonic[™] (Ethicon Endo-Surgery, Cincinnati, Ohio, USA). Механізм коагуляції полягає у високочастотній (55 500 Гц) вібрації, що забезпечує різання та коагуляцію м'яких тканин. Кавітація, тепло й тертя, що виникають, в цьому разі приводять до вивільнення енергії, яка денатурує тканинний білок. Ультразвукові інструменти здатні герметизувати жовчні протоки та судини діаметром до 5 мм [87]. Швидкість трансекції печінки можлива до 2,3 см²/хв.

Попри те, що одна бранша інструменту має термоізоляційний захист, некроз паренхіми в місці коагуляції може досягати 4,8 мм [88].

Не менш ефективною є мікрохвильова коагуляція судин, проте ці інструменти менш поширені в гепатобіліарній хірургії. Для коагуляції судин, жовчних проток та печінкової паренхіми можна використовувати різні режими мікрохвильового випромінювання – від 925 МГц до 2 450 МГц. Залежно від конкретних налаштувань та місця застосування коагуляція тканин відбувається до 5 мм від антени інструмента [89]. Проте цей пристрій не продемонстрував значних переваг перед біполярними та ультразвуковими інструментами ні щодо швидкості роботи, ні щодо надійності гемостазу і пропонується для поєданого використання з іншим обладнанням [90].

Існують безконтактні методи гемостазу, такі як аргоноплазмова та лазерна коагуляція. Аргоноплазмова коагуляція полягає в передаванні високочастотного струму від джерела енергії до місця кровотечі, використовуючи водночас іонізований аргон. Струм потужністю 10–100 Вт під час проходження через газ формує плазму, яка й коагулює місце кровотечі [91]. Аргон – інертний газ, що витісняє кисень, тому практично відсутні обвуглювання тканин та димоутворення під час роботи. Глибину коагуляції можна чітко налаштувати залежно від виду тканин, максимальна глибина досягає 5–6 мм. Проте цей вид гемостазу печінки може призвести до коагуляційного струпу на поверхні паренхіми та утворення мікроабсцесів під ним, що може ускладнювати післяопераційний період [92]. Лазерну коагуляцію поступово усе більше досліджують для застосування в хірургії, оскільки з її допомогою можна ефективно проводити як трансекцію печінкової паренхіми, так і припиняти кровотечу з дрібних судин. Проте цей метод має досить вузький робочий діапазон, коли недостатня потужність може призвести до ненадійного гемостазу, а підвищення потужності – до обвуглювання тканин [93].

Хірургія печінки та її гемостаз є складними процесами, що повиненні враховувати не лише ефективність під час припинення кровотечі, а й

економічну доцільність того чи іншого хірургічного обладнання. Частина інструментів широко використовують, а решта – лише доводить свої переваги. Але ціна енергетичних установок та витратних матеріалів, наприклад, для мікрохвильової та аргоноплазмової коагуляції, відіграє не останню роль у виборі гемостатичного устаткування [94].

1.2. Місцеві гемостатичні засоби

Незалежно від ефективності енергетичного гемостатичного обладнання багато досліджень доводять доцільність рутинного застосування місцевих гемостатичних матеріалів у поєднанні або після застосування електрокоагуляції. Їх використання достовірно зменшує кількість гемотрансфузій, тривалість оперативного втручання та часу перебування пацієнта в стаціонарі [95], [96]. Місцевий гемостатичний матеріал насамперед повинен швидко та ефективно припиняти кровотечу, проте сучасний розвиток хірургії потребує також додаткових властивостей. Так, ідеальний місцевий гемостатик повинен стимулювати загоєння рани, неоангіогенез та регенерацію тканин, виявляти антибактеріальні властивості, бути біосумісним і нетоксичним, зазнавати біодеградації, бути легким у використанні й стабільним під час зберігання. У зв'язку з тим що жодний матеріал не має всього спектра властивостей, до цього часу проводять розроблення нових гемостатиків. [97], [98], [99]. Дослідження переважно спрямованні, або ж на пошук нових речовин, що здатні сприяти згортанню крові, або ж на удосконаленні чи поєднанні вже існуючих матеріалів.

Під час розроблення та оцінювання гемостатичних матеріалів передусім ураховують основну діючу речовину, її походження та фізичну форму готового виробу. Більшість гемостатиків класифікують саме за походженням, їх поділяють на: синтетичні, матеріали неорганічного, біологічного походження й на основі полісахаридів, що значно відрізняються за своєю фізичною формою (табл. 1.1) [100], [101].

Таблиця 1.1

Класифікація гемостатичних засобів для використання в хірургії

Група	Комерційна назва	Виробник	Фізична форма	Основний компонент
1	2	3	4	5
Синтетичні гемостатичні матеріали	Dermabond	Johnson & Johnson	Клей	Ціаноакрилат
	Histoacryl	B. Braun	Клей	Ціаноакрилат
	DuraSeal	Covidien	Герметик	Поліетиленгліколь
	CoSeal	Baxter	Герметик	Поліетиленгліколь
	Surgiseal	Adhezion Biomedical	Клей	Ціаноакрилат
Гемостатичні матеріали неорганічного походження	Quickclot	Z-Medica	Гранули	Цоліт
	Combat Gauze	Z-Medica	Бинт	Каолін
	Wound Stat	TraumaCure Inc	Гранули	Смектит
	Кровоспас	Тетерів	Бинт, пов'язка	Невідомо
Гемостатичні матеріали біологічного походження	Recothrom	ZymoGenetics	Розчин	Тромбін
	Thrombin-JMI	King Pharmaceuticals	Порошок	Тромбін
	Evithrom	Johnson & Johnson	Розчин	Тромбін
	TachoSil	Takeda	Пластина	Тромбін, фібриноген (людський)
	TachoComb	Takeda	Пластина	Тромбін, фібриноген (тваринний)
	Tisseel	Baxter	Герметик	Фібрин
	Evicel	Ethicon	Герметик	Фібрин
	Vitagel	Strycker	Герметик	Фібрин
	Evarrest	Omrix Biopharmaceuticals	Пластир	Фібрин
	Artiss	Baxter	Герметик	Фібрин
	Губка гемостатична	Biopharma	Губка	Фібрин

Продовження таблиці 1.1

	2	3	4	5
Гемостатичні матеріали біологічного походження	Stypro	Curasan	Губка	Колаген
	Hemoblast	Biom'Up	Порошок	Колаген
	Avitene	Becton Dickinson	Порошок	Колаген
	Floseal	Baxter	Матриця	Желатин, тромбін
	Surgiflo	Johnson & Johnson	Матриця	Желатин
	Gelfoam	Pfizer	Губка	Желатин
	Bioglue	CryoLife	Клей	Бичачий альбумін
	PreveLeak	Baxter	Клей	Бичачий альбумін
Гемостатичні матеріали на основі полісахаридів	Kaltostat	ConvaTec	Плівка	Альгінат
	Sorbalgon	Harmann	Плівка	Альгінат
	Arista	Bard	Мікросфери	Крохмаль
	Surgicel	Johnson & Johnson	Марля	Целюлоза
	Traumastm	Baxter	Марля	Целюлоза
	Alpe Гемостоп	Schonen	Марля	Целюлоза
	Hemcon	MedTrade	Пов'язка	Хітозан
	Celox	OreMedix	Гранули, марля	Хітозан
	TraumaStat	Bard	Марля	Хітозан
	XStat	RevMedx	Губки	Хітозан, целюлоза

Синтетичні місцеві гемостатичні матеріали

Їх використовують переважно для лікування ран за допомогою їх герметизації та склеювання. До цієї групи відносять два найбільш поширених представники: поліетиленгліколь (ПЕГ) та ціанокрилат. ПЕГ – багаторівневий сополімер з ефіром N-гідроксисукциніміду на кожному кінці. Гемостатики на його основі мають хорошу адгезію до тканин та здатність до гелеутворення [102]. Укриваючи ранову поверхню, вони формують бар'єр для попередження висихання рани та проникнення бактерій, це створює умови для асептичного загоєння. Моделювання властивостей матеріалів на основі ПЕГ відбувається

поєднанням антибактеріальними, антисептичними, стимулювальними препаратами [103]. Здатність швидко концентрувати тромбоцити, еритроцити та фактори згортання крові в разі первинного гемостазу в місці застосування допомагає припинити кровотечу, проте сам ПЕГ ніяк не впливає на систему згортання крові [104].

Ціанокрилат – рідкий мономер, що під час контакту з аніонними речовинами, наприклад кров'ю, полімеризується утворюючи плівку та склеює краї рани. Гемостатична дія ціанокрилату обумовлена закупоренням отворів судин та заклеюванням рани [105]. Механічна міцність та фізичні властивості клею прямо залежать від довжини й складності бічного ланцюга ціанокрилату. Етил або бутилціанокрилат (похідні з коротких ланцюгів) формують більш міцні зв'язки порівняно з октилціанокрилатом (похідне довгих ланцюгів), проте останній менш токсичний та практично не виявляє подразнювальної дії [106].

Загалом синтетичні гемостатичні матеріали ефективні лише для чистих поверхневих ран із невеликою капілярною кровотечею. В інших випадках їх застосування не виправдане. Залежно від виду та кількості матеріалу здатні спричиняти алергічну, подразнювальну дію, викликати реакцію організму на стороннє тіло чи бути токсичними [107].

Гемостатичні матеріали неорганічного походження

Деякі неорганічні речовини також мають прокоагуляційні властивості. Серед них найбільш поширені цеоліт, каолін, смектит. Значною перевагою цих матеріалів є те, що вони знаходяться у великій кількості в природі, а їх виготовлення має низьку собівартість. Цеоліт – це мікропористий кристалічний алюмосилікатний мінерал, що має на своїй поверхні позитивно заряджені катіони Ca^{2+} та Na^{+} . Висока гемостатична активність цеоліту обумовлена високою абсорбційною здатністю, що дозволяє швидко концентрувати формені елементи та білки крові в місці кровотечі, а також контактено прискорювати активацію факторів згортання крові за допомогою вивільнення Ca^{2+} [108]. Але під час взаємодії цеоліту з рідинами, зокрема кров'ю, виникає сильна екзотермічна реакція, що може призвести до

термічного пошкодження м'яких тканин. Така властивість значно обмежує застосування цього матеріалу. Цеоліт застосовують лише для припинення зовнішньої кровотечі і після досягнення гемостазу його обов'язково потрібно видалити з рани [109].

Каолін – це глиниста гірська порода, що складається переважно з каолініту. Порівнянно з цеолітом чистий каолін має значно менші сорбційні властивості та низький поверхневий заряд. Це пов'язано з малою площею активної поверхні та заміною заліза на алюміній чи кремній. Проте каолін під час взаємодії з кров'ю може активувати каскад внутрішньої коагуляції. До того ж негативно заряджена поверхня каоліну призводить до автокаталітичної активації XI, XII факторів гемостазу та кофактору кініногену. Каолін не викликає термічної реакції, але використовується переважно на поверхні марлевих серветок чи бинта і обов'язково повинен бути видалений з рани після припинення кровотечі [110].

Смектит – це речовина, що належить до ди- чи триоктаедричних шаруватих мінералів, кристалічна ґратка яких здатна до набухання. Переважно це поєднання оксиду кремнію та алюмінію. Основними особливостями смектитів є розміри частинок, що не перевищують 1 мкм, та велика площа активної поверхні. Вони мають значно більшу абсорбційну здатність порівняно з каоліном, а також високу пластичність та здатність до набухання. А негативний поверхневий заряд може активувати внутрішній шлях згортання крові. Попри хороші гемостатичні властивості, смектит може спричинити запальну та подразнювальну реакції, призвести до некрозу м'яких тканин у місці застосування [111].

Гемостатичні матеріали біологічного походження

Місцеві гемостатичні засоби біологічного походження зазвичай є факторами згортання крові, такі як тромбін та фібрин, що безпосередньо впливають на той чи інший етап утворення тромбу. У разі їх застосування підвищується концентрація активних агентів у місці пошкодження судин, що прискорює припинення кровотечі. Проте до цієї групи відносять також

бичачий альбумін, що частіше відіграє роль клею чи герметика, а також колаген та желатин, що переважно виявляють опосередковану гемостатичну дію.

Бичачий сироватковий альбумін – білок плазми великої рогатої худоби, що становить близько 70 % протеїнового складу крові. Досить поширений для медико-біологічного застосування через невелику ціну та легке виділення. Зазвичай бичачий альбумін становить близько 45–50 % хірургічного клею, решта припадає на 10 % глютаральдегіду, як агента для полімеризації та інші компоненти. Він сполучається з білками в місці пошкодження та вкриває ранову поверхню [112], проте здатний ефективно працювати лише в сухому операційному полі і не може бути застосований для припинення активної кровотечі. До того ж клеї на основі бичачого альбуміну становлять загрозу алергічних реакцій та емболії судин [113].

Колаген – найпоширеніший структурний білок, що переважно міститься в сполучній тканині і становить близько 25–35 % умісту білка в усьому тілі. Сьогодні класифіковано 28 типів колагену, проте 90 % складає колаген I, II, III, IV типів. Завдяки біосумісності, біодеградації, простому виробництву та низькій собівартості він став одним із найпоширеніших БМ серед медичних виробів [114]. Розрізняють непрямий та прямий впливи колагену на гемостатичні процеси. Непрямий вплив виникає, коли «оголений» колаген судин під час контакту з рецепторами тромбоцитів GPIa/IIa та GPIIb/IIIa спричиняє їх адгезію й активацію, а в подальшому – активну агрегацію з утворенням тромбоцитарної пробки. Прямий – полягає в активації внутрішнього шляху згортання крові за рахунок активації XII фактору, зв'язування IX фактору з колагеном IV типу та взаємодії з фактором фон Віллебранда [115]. Ці властивості колагену привели до розроблення широкого спектра місцевих гемостатичних матеріалів на його основі, таких як порошки, губки, піни, гідрогелі, мембрани тощо.

Окрім гемостатичних властивостей у рані колагенові матеріали здатні стимулювати міграцію, проліферацію та диференціацію фібробластів,

прискорювати ангіогенез, дозрівання грануляційної тканини і біосинтез власного колагену [116]. Переважну більшість готової продукції на основі колагену виготовляють з сировини тваринного походження, що становить ризик вірусних, пріонних інфекцій чи імунних реакцій організму. У зв'язку з цим на заміну тваринному пропонується рекомбінантний людський колаген. Рекомбінантні білки мають високу чистоту, однорідність між партіями, біосумісність та низьку імуногенність. Він не поступається за ефективністю бичачому колагену та позбавлений його недоліків, проте висока собівартість цього матеріалу заважає його поширенню [117].

Інший шлях зменшення побічних ефектів колагену – отримання желатину. Желатин – продукт необоротного гідролізу колагену, який широко використовують у харчовій промисловості, він має подібні з колагеном гемостатичні властивості. Місцеві гемостатичні матеріали на основі желатину можуть мати варіабельну фізичну форму: гранули, губки, гідрогелі, плівки, мембрани тощо [118]. Тверді желатинові матеріали не виявляють прямої гемостатичної дії, що обмежує їх застосування за сильної кровотечі, проте за рахунок абсорбції, що значно більша порівняно з колагеном, вони швидко концентрують тромбоцити та фактори згортання крові у ділянці пошкодження судини. Це пришвидшує власні процеси згортання крові, а набухання желатину, що вдвічі збільшує свій об'єм, створює компресію та зменшення кровотоку в місці застосування [119]. Рідкі форми желатинових матеріалів використовують переважно як матрицю для комбінації з факторами згортання крові [120]. Желатин повністю біосумісний, зазнає біодеградації, але не позбавлений імуногенної дії. До того ж сильне набухання може мати негативні наслідки в разі застосування поблизу нервів, що може спричинити їх стиснення з розвитком неврологічної дисфункції [121].

Фібрин і тромбін поряд з активованими тромбоцитами є основними компонентами утворення кров'яного згустка, тому саме розробленню гемостатичних засобів на їх основі приділяють значну увагу. Фібрин – це нерозчинний білок, що утворюється внаслідок взаємодії розчинного

фібриногену з тромбіном. Він утворює тривимірну сітку, що агрегує на собі формені елементи крові, які обтурують просвіт пошкодженої судини. Фібрин можна використовувати у вигляді твердих гемостатичних метеріалів як порошок, піну, губку. Його отримують від людини чи тварин, ліофілізують та переробляють у готовий для використання виріб або поєднують із якоюсь матрицею. Гемостатичний ефект полягає у високій концентрації фібрину в безпосередньому контакті з місцем кровотечі та прискоренні утворення фібринового згустка. Можливе застосування фібрину в рідкому вигляді як герметика. Герметик складається переважно з фібрину або фібрину та тромбіну, існують також поєднання з Ca^{2+} чи антифібринолітичними агентами. Але фібринові герметики хоча й мають розчинений фібрин під час активної кровотечі, однак не мають прямих кровоспинних властивостей. Проте вони здатні до склеювання країв рани та її герметизації, що само по собі обмежує витікання крові [122].

Тромбін – це серинова протеїназа, що утворюється при ферментативному відщепленні від протромбіну двох активних ділянок активованим X фактором згортання крові. Він має обмежену субстратну специфічність, а основною його функцією є перетворення фібриногену на фібрин. Існує три джерела тромбіну: бичача плазма, людська плазма та рекомбінантний тромбін. Тромбін може застосовуватись як сухий порошок, який потрібно розчиняти фізіологічним розчином перед застосуванням, або збагачена тромбіном заморожена людська плазма, яку потрібно розморозити перед використанням [123]. Проте здебільшого випадків тромбін не використовується самостійно, а є складовою частиною комбінованих місцевих гемостатичних засобів на основі желатинової матриці (Floseal) чи колагенової пластини (Тахокомб, Тахосіл) [124], [125]. Останній у поєднанні з фібриногеном набув широкого використання як за значних кровотеч, де фізична форма пластини дозволяє створювати механічний тиск на зону кровотечі, так і при паренхіматозних, капілярних кровотечах для вкриття значної площі кровоточивої поверхні. У деяких клінічних випадках можливе

застосування з профілактичною метою в ділянці рани вже після припинення кровотечі або ж попередження підтікання жовчі, панкреатичного соку, як додаткова герметизація легеневої паренхіми чи судинних анастомозів [126]. Проте рутинне застосування цих гемостатичних матеріалів на сьогодні не рекомендується [127].

Незважаючи на високу ефективність і широке впровадження, фібрин-тромбінові гемостатичні матеріали мають певні недоліки, пов'язані з походженням сировини та захворювань, що передаються гематогенним шляхом. Фібрин і тромбін тваринного походження можуть не лише призвести до ксеногенних імунних реакцій та післяопераційних ускладнень, а й передавати збудника губчастої енцефалопатії великої рогатої худоби. Білки, отримані з людської плазми, значно зменшують, хоча й не виключають імунних реакцій, але становлять потенційний ризик передавання збудників, таких як ВІЛ, гепатит В, С, парвовірус В19 чи хвороба Кройцфельда–Якоба [128].

Питання безпеки під час використання фібрину і тромбіну вирішують за допомогою їх рекомбінантних аналогів. Ефективність рекомбінантного тромбіну й фібрину однакова порівняно з бичачим чи людським тромбіном із значно меншою імунною реакцією. Проте отримання рекомбінантних білків більш високотехнологічне і вартісне на сьогодні, тому гемостатичні матеріали на їх основі лише набувають поширення для застосування в медицині [129].

Гемостатичні матеріали на основі полісахаридів

Полісахариди – високомолекулярні вуглеводи, що являють собою довгі лінійні чи розгалужені ланцюги моносахаридних залишків. До загальних переваг полісахаридів відносять біосумісність, здатність до біодеградації, відсутність імуногенності та гемостатичні властивості. До того ж у природі досить велика кількість джерел полісахаридів, які належать до відновлюваних ресурсів та легко підлягають фізичній чи хімічній модифікації. Серед різноманітності полісахаридів із гемостатичною метою найбільш часто використовують альгінат, крохмаль, целюлозу, хітозан, із яких виробляють практично весь спектр фізичних форм місцевих гемостатичних матеріалів [130].

Альгінат – це лінійний аніонний полісахарид, який отримують із бурих водоростей. Він має низьку токсичність та високі сорбційні властивості, що дозволяють швидко поглинати рідку частину крові у місці кровотечі. Але прямих гемостатичних властивостей альгінат не має. Негативно заряджені ланцюги уронової кислоти альгінату за наявності двовалентних чи полівалентних катіонів, таких як Ca^{2+} , можуть зшиватися за допомогою утворення гелю. Саме Ca^{2+} є кофактором активації тромбоцитів, а також інших каскадних реакцій коагуляції [131]. Тому для виготовлення місцевих гемостатиків альгінат використовують переважно з катіонами кальцію. Гідрогелевий стан альгінатних пов'язок зберігає вологу в рані, що покращує загоєння тканин [132]. Проте для посилення гемостатичних властивостей альгінат використовують переважно в комбінації з біологічними факторами такими як тромбін чи антифібринолітики, як транексамова кислота [133].

Крохмаль – поширений дешевий біополімер, що складається із суміші полісахаридів амілози та амінопектину. Він синтезується рослинами під дією світла в процесі фотосинтезу, біосумісний та нетоксичний, що зробило його привабливим для застосування в медицині. Під дією ферментів крохмаль розщеплюється до олігосахаридів мальтози та глюкози, після цього швидко метаболізується клітинами [134]. Крохмаль не має прокоагулянтних властивостей, але відмінна здатність поглинати воду відіграє роль механічного бар'єра з швидким зневодненням крові, концентрацією клітин та факторів згортання у місці кровотечі, що призводить до формування згустку та робить його ефективним у разі клінічного застосування [135]. У зв'язку з відсутністю прямої гемостатичної дії крохмаль неефективний у випадках сильної кровотечі, проте він дуже легко модифікується завдяки численним гідроксильним групам. Для посилення кровоспинної дії його поєднують із рекомбінантним фактором VIIa, фібриногеном чи тромбіном або формують мікросфери з мезопористим силікатом цинку і кальцію [136].

Іншим рослинним біополімером є целюлоза – це найпоширеніший полісахарид у природі, що складається з великої кількості залишків D-глюкози

зв'язаної $\beta(1\rightarrow4)$ -глікозидним зв'язком. Целюлоза є одним з основних компонентів клітинної стінки вищих рослин, залежно від типу тканини її вміст коливається від 2 % до 90 %. Із промисловою метою її отримують зазвичай із деревини. Природна целюлоза нерозчинна у воді, тому в медицині використовують переважно її похідні, такі як окиснену целюлозу (з неорганізованими волокнами) та окиснену регеновану целюлозу (з організованими волокнами). Завдяки окисненню целюлоза набуває гемостатичних та протимікробних властивостей [137]. Обидва види похідних целюлози мають подібну хімічну структуру, що на 16–24 % складається з карбоксильних груп, що приводять до зниження рН. Вважається, що саме низький рН активує тромбоцити з утворенням тромбоцитарної пробки, а також пригнічує ріст мікроорганізмів, що позитивно впливає на загоєння рани [138]. Ступінь окиснення та регенерації целюлози впливає на вираженість її властивостей. Так, окиснена целюлоза має незначно кращу антибактеріальну дію і за рахунок більшої площі поглинання – вищу сорбційну здатність, тоді як окиснена регенована целюлоза демонструє кращу біосумісність, швидше зазнає біодеградації та практично не проявляє цитотоксичної дії [139]. Проте використання цих матеріалів за рахунок зниження рН у рані може спричинити асептичне запалення, мати подразнювальну дію під час застосування поблизу нервів, а також призводити до утворення кіст у ділянках пошкодження кісток, що частково обмежує їх застосування [140], [141].

Одним із найбільш перспективних місцевих гемостатичних матеріалів є хітозан (Хт) – позитивно заряджений полісахарид, сополімер N-ацетилглюкозаміну та глюкозаміну, який отримують за допомогою деацетилювання хітину. Хітин – другий за поширеністю після целюлози, природний полісахарид, що є побічним продуктом рибної промисловості. Щорічні масштаби виробництва досягають близько 1 000 тонн, 70 % яких становить хітин, отриманий від морських видів тварин. Він трапляється у великій кількості саме в екзоскелеті членистоногих, зокрема ракоподібних та комах, а також у меншій кількості – у грибах [142]. Ферментативне або лужне

деацетилювання хітину призводить до утворення лінійного полісахариду хітозану, властивості якого залежать від ступеня деацетилювання та молекулярної маси. Під час ферментативного гідролізу хітозану утворюється N-ацетилглюкозамін – органічна сполука, поширена серед усіх ссавців, тому абсолютно безпечна для навколишнього середовища. В організмі людини N-ацетилглюкозамін здатний трансформуватися в гіалуронову кислоту, що є одним з основних компонентів позаклітинного матриксу [143].

Хт – це досить пластичний матеріал, із якого залежно від кінцевих завдань можна виготовити різні фізичні форми: плівки, волокна, аерогелі, гідрогелі, губки, мембрани, порошок, гранули тощо. Біосумісність, нетоксичність вихідної сировини та здатність до біодеградації роблять його універсальним біоматеріалом для біомедичного застосування. Так, Хт залежно від своєї структури здатний проявляти бактерицидні чи бактеріостатичні властивості [144]. За допомогою вільних аміногруп Хт прикріплюється до стінки бактерії та збільшує проникність, що призводить до її загибелі. До того ж Хт здатний адсорбувати електронегативний субстрат бактеріальних білків, що істотно порушує фізіологічну активність мікроорганізму. Малі олігомери Хт здатні проникати через бактеріальну стінку та пригнічувати транскрипцію РНК, що зупинить ріст мікроорганізму [145].

Іншим напрямом застосування Хт є стимуляція загоєння ран. Хт здатний сорбувати надлишкові виділення в рані, пригнічувати ріст мікроорганізмів, у вигляді пов'язки створювати напівпроникний шар із доступом повітря та збереженням вологого середовища [146]. Хт покращує загоєння ран, прискорюючи хемотаксис макрофагів та стимулюючи фібробласти, за рахунок цього посилюється фаза запалення, проте зменшується її тривалість і раніше починається фаза проліферації. Також Хт стимулює розвиток грануляційної тканини, неоангіогенез та формування колагенових волокон, що пришвидшує ремоделювання тканин [147].

Варіабельність розміру пор твердих форм Хт і термінів його деградації дозволила Хт стати одним із перспективних матеріалів для тканинної

інженерії. Він має велику активну площу поверхні для заселення клітинами, здатність стимулювати проліферацію та диференціацію фібробластів. Розгалужені тривимірні форми Хт відтворюють екстрацелюлярний матрикс тканин. Хт добре компонується з іншими речовинами залежно від необхідних умов. Так, наприклад, із метою створення тканинно-інженерних конструкцій для заміщення кістки використовують гідроксіапатит, створення штучної шкіри – комбінації з колагеном, полікапронолактон для відновлення провідності периферичних нервів [148].

Проте одним із найважливіших є кровоспинний ефект Хт. Він посилюється за вищого ступеня ацетилювання та низької молекулярної маси Хт. Гемостатична властивість обумовлена трьома механізмами. Перший – агрегація еритроцитів, що виникає внаслідок контакту позитивно зарядженого глюкозаміну Хт з негативно зарядженими еритроцитами, це призводить до коагуляції незалежно від класичного каскаду коагуляції [149]. Другий – активація тромбоцитів, ймовірно після взаємодії з Хт підвищується мобілізація Ca^{2+} у тромбоцитах та експресія глікопротеїну Пв/Ша на їх мембрані, що в результаті приводить до адгезії та агрегації тромбоцитів із утворенням тромбоцитарної пробки [150]. Третій – зміна структури фібриногену, пов'язана з електростатичними силами після іонізації хітозану, що полегшує ферментативне розщеплення та прискорює утворення фібрину [151].

Незважаючи на істотні позитивні сторони Хт як ефективного БМ для припинення кровотечі, більшість існуючих місцевих гемостатичних засобів на основі хітозану призначені лише для зовнішнього застосування. У випадках глибоких ран чи внутрішньопорожнинного гемостазу рекомендовано видаляти гемостатичний засіб [152]. Ця особливість обмежує застосування Хт гемостатичних матеріалів інтраопераційно, коли здебільшого недоцільно знімати гемостатичний засіб із місця аплікації. До того ж будьякі перев'язки, що потребують видалення гемостатика з рани, призводять до дискомфорту та ризику повторної кровотечі [153]. Ця особливість полягає в кількох причинах: 1) більшість зареєстрованих гемостатичних засобів із Хт мають у своєму

складі компоненти, що не зазнають біодеградації, наприклад марля; 2) невизначений, або занадто довгий, період деградації, що може призвести до інкапсуляції; 3) токсичність, що може виникнути під час деградації БМ; 4) відсутня оптимальна фізична форма для різних клінічних випадків залежно від типу кровотечі та місця застосування.

Якщо використання високоочищеного хітозану без токсичних домішок та розчинників із невеликим терміном деградації вирішує перші три питання, то оптимальна фізична форма місцевого гемостатика й до цього часу не визначена. Найбільш поширені форми для інтраопераційного застосування: порошки (частинки), гідрогелі, губки (аерогелі), волокна. Властивості різних форм мають певні відмінності та особливості застосування.

Порошки та гранули дозволяють наносити їх на різні за формою ранові поверхні. Мають велику активну площу, що дозволяє швидко адсорбувати плазму крові. Проте зазвичай важко контролювати їх об'єм, необхідний для досягнення гемостазу. До того ж їх неможливо помістити в глибокий рановий канал чи добре закріпити на вертикальній рановій поверхні, що утворюється наприклад, під час резекції печінки. Також вони неефективні в разі сильної кровотечі, коли гранули вимиваються струменем крові [154].

Гідрогелі характеризуються переважно високою адгезією до ранової поверхні. Добре ущільнюють рану, цим часто й досягається гемостаз, та підтримують вологий стан рани, що покращує регенерацію тканин. Недоліками цієї форми є можлива токсичність, пов'язана з розчинниками, та порівняно невелика сорбційна здатність. Також гідрогелі погано контактують із рановою поверхнею в разі сильної кровотечі, що обмежує спектр їхнього застосування [155].

Губки (аерогелі) – пориста форма гемостатичних матеріалів, яка має низьку щільність та демонструє високу сорбційну здатність, що є важливим компонентом швидкого гемостазу, за рахунок поглинання рідкої частини крові. Їх досить легко використовувати, проте переважно на рівних ранових поверхнях. Ефективні стосовно сильної кровотечі у зв'язку із зручним механічними

тисненням. Можуть мати лише одну робочу поверхню та становлять труднощі в разі застосування у важкодоступних місцях. Під час первинного змочування втрачають адгезивні властивості, тому потребують обережного поводження з місцем застосування після припинення кровотечі [156].

Волокна можуть бути отримані за допомогою різних фізичних та хімічних методів, таких як витягування, самозбирання, поділ фаз, двокомпонентне прядіння, флеш-відтискання, видування, електропрядіння та ін. Найбільш широкого практичного використання набуло електропрядіння – метод, здатний формувати волокна за допомогою проходження струму високої напруги через полімер. Залежно від параметрів: напруга струму, дистанція, швидкість подачі та обертання колектора, в'язкість електрокондуктивність полімеру можна формувати волокна різного діаметра та спрямованості [157].

Мембрани, синтезовані електропрядінням, мають відмінні фізичні властивості, такі як міцність, пружність, волого- та повітропроникність. Найбільш виправдане застосування гемостатичних мембран, що складаються з нанорозмірних волокон. Таким чином, значно збільшується активна площа поверхні для сорбції плазми та контакту з форменими елементами крові, що значно прискорює згортання крові. Після припинення кровотечі нановолокна будуть швидше деградувати та замінюватися власними тканинами [158].

Тривимірні сітки мікропор, сформованих електропрядінням, добре підходять для міграції та проліферації фібробластів у товщі гемостатичної мембрани. Електропрядіння дозволяє отримувати як однорідні так і неоднорідні волокна, що за необхідності можуть виконувати функцію армування певної частини мембрани та контролювати її деградацію чи вивільнення біологічно активних речовин, або формувати сендвіч-систему з різними функціональними шарами мембрани. Коаксіальне електропрядіння дозволяє одночасно формувати кількочарові волокна з однакового, або різних полімерів, що дозволяє врівноважувати механічні та функціональні властивості [159].

Таким чином, Хт володіє всіма необхідними властивостями для місцевого гемостатичного матеріалу. Проте залишається невивченим питання оптимальної фізичної форми та методу синтезу у разі інтраопераційного його застосуванні, а також безпечність Хт гемостатичного біоматеріалу при залишенні його в тканинах після зупинки кровотечі до повної біодеградації.

Основні результати цього розділу опубліковані в працях [160].

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Виготовлення гемостатичних матеріалів із хітозану

У роботі досліджували три гемостатичних матеріали на основі хітозану, що розрізнялися за своєю структурою.

Хітозанові губки (ХтГ) були виготовлені в співпраці з Інститутом прикладної фізики НАН України (м. Суми). Використовували Хт у вигляді порошку з молекулярною масою 300 кДа та ступенем деацетилювання 95 %. Для приготування 2 % розчину хітозану використовували три різні розчинники: 1 % оцтову кислоту, 1 % аскорбінову кислоту та 1 % щавлеву кислоту. Порошок розчиняли впродовж 24 годин за кімнатної температури. Готові розчини полімеру заморожували поза температури $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ впродовж 24 годин, а потім висушували у вакуумній камері (0,1 Па, 24 год).

Хітозанові аерогелі (ХтА) були синтезовані в співпраці з Краківським технологічним університетом (м. Краків, Польща) методом хімічного зшивання за принципами «зеленої хімії». Використовували порошок Хт з молекулярною масою 300 кДа та ступенем деацетилювання 95 %. Хт розчиняли у водному розчині суміші l-аспарагінової та l-глутамінової амінокислот упродовж 36 годин. Залежно від співвідношення останніх (5/1, 1/1, 1/5) було отримано три види розчину Хт. Після цього до всіх розчинів додавали пропіленгліколь. На гомогенний розчин впливали мікрохвильовим випромінюванням (900 Вт) упродовж 3 хв до повного випаровування води та «зшивання» біополімеру. Отримані Хт гідрогелі промивали дистильованою водою для досягнення $\text{pH} = 7,0$ та ліофілізували у вакуумній сушарці (0,05 Па) впродовж 24 годин для перетворення на аерогелі.

Хітозанові мембрани (ХтМ) виготовляли в співпраці з компанією «Nano Prime» (м. Дембиця, Польща) з порошку Хт (молекулярна маса – 300 кДа та 95 % ступінь деацетилювання) та порошку поліетиленоксиду (ПЕО, 400 г/моль). Хт (2 г) і ПЕО (3 г) окремо розчиняли в 100 мл 50 % оцтової

кислоти з перемішуванням упродовж 24 годин за кімнатної температури. Після повного розчинення отримані розчини змішували у відношенні ХТ/ПЕО = 1/1 та ХТ/ПЕО = 1/3. Окремо був приготований 2 % розчин хітозану, розчиненого в 90 % оцтовій кислоті. Процес електропрядіння проводили за кімнатної температури та відносної вологості повітря 15–20 % в ізолюваній шафі з ламінарним потоком повітря в машині RT-Advanced (Linari Engineering, Піза, Італія) (рис 2.1). Розчин ХТ/ПЕО набирали в скляний шприц 10,0 мл з діаметром голки 0,6 мм. Відстань між голкою і колектором становила 12,0 см. Параметри електропрядіння встановлювали таким чином: 1) для чистого ХТ швидкість потоку – 0,1 мл/год, напруга на голці – 12 кВ; 2) для ХТ/ПЕО = 1/1 швидкість потоку – 0,1 мл/год, напруга на голці – 15 кВ; 3) для ХТ/ПЕО = 1/3 швидкість потоку – 0,2 мл/год, напруга на голці – 17 кВ. Дистанція 12 см та швидкість обертання колектора (діаметром 10,0 см) 800 об/хв становила для всіх зразків. Після завершення процесу електропрядіння синтезовані мембрани висушували у вакуумній сушарці (0,05 Па) впродовж 12 годин.

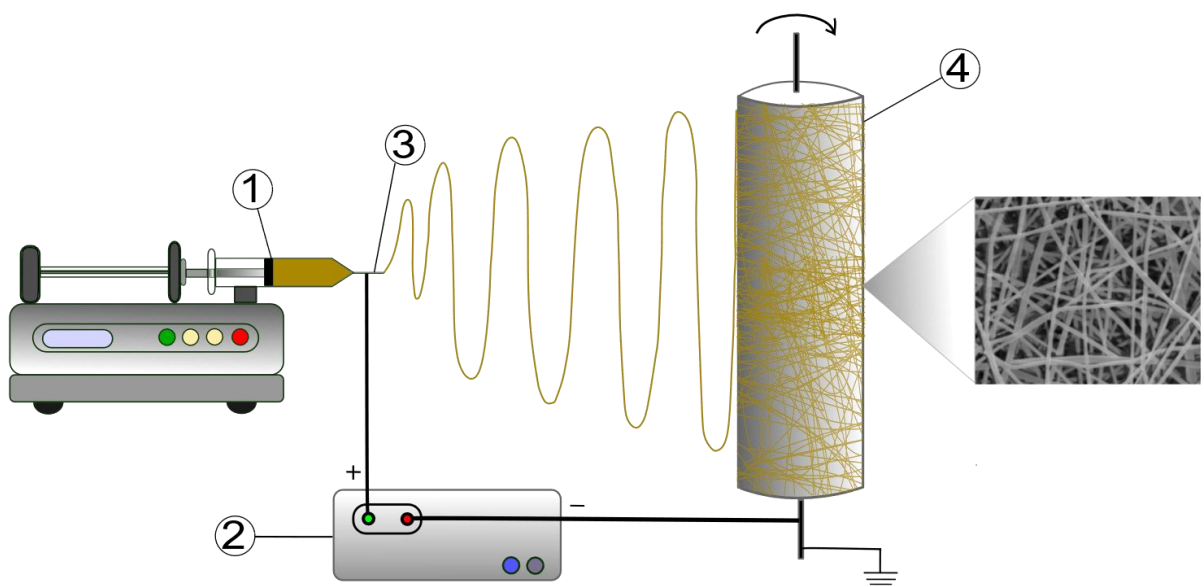


Рисунок 2.1 – Схематичне зображення процесу електропрядіння. Позначення: 1 – розчин полімеру з контрольованою швидкістю подачі; 2 – джерело високої напруги; 3 – подача високої напруги на голку з полімером; 4 – колектор, що обертається із заданою швидкістю.

2.2. Дослідження структури та властивостей матеріалів

2.2.1. Сканувальна електронна мікроскопія

Зображення досліджуваних зразків спостерігали за допомогою сканувального електронного мікроскопа SEO-SEM Inspect S50-B «FEI Company», Чехія. Щоб уникнути накопичення поверхневого заряду, матеріали покривали шаром срібла (30–50 нм) у вакуумній установці ВУП-5М (SELMI, Суми, Україна). Діаметр нановолокон та розміри пор, оцінювання морфології зображень СЕМ вимірювали за допомогою плагіна DiameterJ 1.018w для Fiji (дистрибутив ImageJ 1,51 w, National Institutes of Health).

2.2.2. Аналіз інфрачервоної спектроскопії з перетворенням Фур'є (FT-IR)

Усі аналізи FT-IR/ATR (загальне відбиття) були проведені з використанням спектрометра IR Thermo Nicolet Nexus X 470 (кристал алмазу ATR), Уолтем, Массачусетс, США. Діапазон був між 400 та 4 000 cm^{-1} за 32 сканування та роздільної здатності 4 cm^{-1} .

2.2.3. Визначення контактного кута мембран

Дослідження контактного кута мембран проводили за допомогою оцінювання змочуваності поверхні приладом для вимірювання оптичного контактного кута на основі відео (OCA 15 EC, Series GM-10-473 V-5.0, Data Physics, Filderstadt, Germany) з програмним забезпеченням (SCA_20U version 5.0.32, DataPhysics Instruments, Filderstadt, Germany). Краплі дистильованої води 0,2 мкл наносили на поверхню зразків через шприц за кімнатної температури. Вимірювання проводили в п'яти різних ділянках кожної поверхні зразка та реєстрували середнє значення.

2.2.4. Вимірювання пористості та щільності

Для визначення пористості та щільності матеріалів хітозану використовували метод заміщення ізопропанолу. Зважені зразки поміщали у відомий об'єм ізопропанолу на 5 хв, після цього матеріал видаляли, вимірювали залишок ізопропанолу та визначали об'єм ізопропанолу, що був

поглинутий зразком. Одержані дані використовували для розрахунку щільності (рівняння 1):

$$d = W/(V_2 - V_3), \quad (1)$$

та пористості (рівняння 2):

$$p = (V_1 - V_3)/(V_2 - V_3) \cdot 100 \%, \quad (2)$$

де d – щільність, г/см³;

p – пористість, %;

W – вага зразка, г;

V_1 – об'єм ізопропанолу до початку дослідження, см³;

V_2 – об'єм ізопропанолу, що просякнув зразок, см³;

V_3 – залишок ізопропанолу після видалення зразка, см³.

2.2.5. Дослідження деградації та біодеградації (in vitro)

Деградацію матеріалів *in vitro* оцінювали в розчині simulated body fluid (SBF), що містить концентрації іонів, приблизно такі, як і концентрації в плазмі крові людини. Дослідження проводили за температури 37 °C та pH 7,4. Зразки з попередньо визначеною вагою занурювали в стерильний розчин SBF на 7 діб, після цього діставали, промивали дистильованою водою, висушували і зважували кожні 12 годин. Деградацію розраховували за таким рівнянням (3):

$$D = (W_0 - W_t)/W_0 \cdot 100 \%, \quad (3)$$

де D – деградація, %;

W_0 – початкова вага зразка, г;

W_t – вага зразка через певний проміжок часу, г.

Дослідження біодеградації *in vitro* проводили з людським лізоцимом – ферментом, що гідролізує β-глікозидні зв'язки. Лізоцим розчиняли в

стерильному SBF до концентрації, що дорівнює 10 мг/л за температури 37 °С для імітації природних умов. Зважені зразки занурювали в розчин лізоциму на 7 діб. Хт матеріали діставали, промивали дистильованою водою, висушували та зважували кожні 24 години. Біодеградацію розраховували за допомогою рівняння 4:

$$B = (W_0 - W_t) / W_0 \cdot 100 \%, \quad (4)$$

де B – біодеградація, %;

W_0 – початкова вага зразка, г;

W_t – вага зразка через певний проміжок часу, г.

2.2.6. Антибактеріальні властивості

Антибактеріальну активність гемостатичних матеріалів на основі хітозану оцінювали щодо грамнегативних *Escherichia coli* (В 926) та грампозитивних *Staphylococcus aureus* (В 918). Зразки (50 мг) поміщали в стерильну пробірку, що містила мікроорганізми в концентрації, еквівалентній 10^4 колонієутворювальній одиниці (КУО)/мл ($4 \log_{10}$ КУО), суспендованій у 2,0 мл живильного бульйонного середовища. Як негативний контроль використовували пробірки зі стерильним середовищем для росту та зразки без мікроорганізмів. Також використовували зразки бактерій, суспендованих у живильному бульйонному середовищі без зразків. Досліджені зразки та контроль інкубували впродовж 2, 4, 6, 8 та 24 годин за температури 37 °С. Аліквоти 100 мкл бактеріальної суспензії з пробірок розподіляли на поверхню агарових пластин, а потім культивували за температури 37 °С впродовж 24 год. Мікроорганізми, які вижили підраховували в \log_{10} КУО.

2.2.7. Дослідження цитотоксичності

Цитотоксичність гемостатичних матеріалів визначали використовуючи клітинну лінію U2OS, отриману від Університету Умео (Швеція). Клітини культивували в CO_2 -інкубаторі (Biosan, Латвія) з використанням середовища

Ігла в модифікації Дульбеко з додаванням живильної суміші F-12 (DMEM/F-12, Gibco, США), доповненої ампіциліном натрієвої солі в концентрації 100 одиниць/мл, стрептоміцином (100 мкг/мл), амфотерицином В (2,5 мкг/мл), фетальною бичачою сироваткою (10 % від об'єму середовища) (Gibco, США), за температури 37 °С, 5 % CO₂ та вологості 98 %. Клітини засівали в 24-лункові планшети зі щільністю 2×10^4 клітин/см². Після 12 годин інкубації зразки хітозану (40 мг) додавали до клітин у кожній лунці. Через 24 години до кожної лунки додавали 100 мкл (10 % об'єму середовища) розчину резазурину в концентрації 15 мг/мл⁻¹. Для контролю використовували лунки, що містять лише клітини та середовище без зразків. Планшети інкубували впродовж 4 годин при температурі 37 °С у темряві; 100 мкл середовища з кожної лунки переносили в 96-лунковий планшет і вимірювали поглинання за допомогою Multiskan FC (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) за довжин хвиль 570 і 595 нм. Визначення редукції резазурину проводили на 1-шу, 3-тю та 7-му добу з трьома повторами.

Для дослідження життєздатності клітин Live/Dead мезенхімальні стовбурові клітини (ADSC) отримували з жирової тканини донорів ферментативним розщепленням ліпоаспірату в 0,1 % колагенази ІА та 0,1 % пронази з 2 % фетальної бичачої сироватки (FBS) (Sigma-Aldrich, США) впродовж 1 години при температурі 37 °С. Отриману суспензію клітин переносили в колбу культур клітин площею 25 см² (SPL, Корея) і культивували в такому середовищі росту: модифікований α -MEM із 10 % FBS, 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) за температури 37 °С в атмосфері насиченої вологості за 5 % CO₂ і 5 % O₂. Для оцінювання цитотоксичності клітини висівали на зразки за щільності 2×10^5 клітин/см² скафолду. Через 48 годин зразки фарбували PI (йодидом пропідію) (Sigma-Aldrich, США) та FDA (діацетатом флуоресцеїну) (Sigma-Aldrich, США). Кількість загиблих та живих ADSC у різних групах підраховували за допомогою флуоресцентної мікроскопії (фільтри FITC і Texas

Red, Carl Zeiss, Німеччина) та програмного забезпечення ZEN 2012.

2.2.8. Дослідження взаємодії з кров'ю

Зразки хітозанових кровоспинних матеріалів вагою 40 мг поміщали в пробірки (Becton Dickinson Vacutainers[®]) з 3,6 мг ЕДТА 2,0 мл; 40 мл цільної людської крові, яку було отримано від добровольців, додавали до кожної пробірки. Пробірки поступово перевертали впродовж 10 хв, після цього всі зразки видаляли та зважували. Сорбцію крові розраховували таким чином (5):

$$S = W_2 - W_1, \quad (5)$$

де W_1 – початкова вага (40 мг);

W_2 – вага зразка після взаємодії з кров'ю, мг.

Після видалення зразків кров досліджували на гематологічному аналізаторі CELL-DYN 3700 (ABBOTT, США) з використанням реагентів DIAGON (Угорщина) (медичний центр «Флоріс»), де визначали рівень гемоглобіну (г/л), кількість еритроцитів ($\times 10^{12}/\text{л}$), кількість тромбоцитів (г/л), середній об'єм тромбоцитів (фл) та ширину розподілу тромбоцитів (%). Дослідження згортання крові: протромбіновий час (с), індекс протромбіну (%), міжнародне нормалізоване співвідношення (yo), фібриноген (г/л) і активований частковий тромбопластиновий час (АЧТЧ, с), проводили на автоматизованому аналізаторі ACL 7000 (Instrumentation Laboratory, США) з використанням реактивів RecombiPlasTin 2G і SynthASil (HemosIL, США). Як контроль використовували цільну кров з ЕДТА.

2.3. Оцінювання ефективності на моделі травми печінки щурів

2.3.1. Визначення швидкості гемостазу

Вивчення особливостей гемостатичного ефекту хітозанових матеріалів проводили на 84 білих лабораторних щурах 6-місячного віку вагою 250–300 г. Під час проведення досліджень усі тварини перебували в однакових умовах: за температури 22 (2) °С впродовж 12-годинного циклу світло / темрява з повним

доступом до їжі та води. Утримання тварин та всі експериментальні процедури проводили відповідно до Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986), Етичних принципів та вказівок для експериментів на тваринах, 3-є видання (Швейцарія, 2005 р.), типових положень з питань етики МОЗ України № 690 від 23.09.2009 р., Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» № 3477-IV від 21.02.2006 р., Директиви 2010/63/ЄС Європейського парламенту та Ради про захист тварин, що використовуються в наукових цілях (2010). Процедури були затверджені комісією з питань дотримання біоетики при проведенні експериментальних та клінічних досліджень ННМІ Сумського державного університету, (Протокол № 3/11 від 15.11.2021).

Щурів поділили на чотири групи по 21 тварині в кожній: I – група порівняння, для припинення кровотечі використовували пластини Тахокомб, у II групі застосовували ХтГ, у III – групі ХтА, у IV групі гемостазу досягали за допомогою використання ХтМ.

Ефективність місцевих, хітозанових, гемостатичних матеріалів перевіряли на стандартній рані печінки щурів. Тварин знеболювали за допомогою внутрішньоочеревної ін'єкції – 7 мг/кг кетаміну (АТ «Фармак», Україна) та 10 мг/кг ксилазину (Alfasan International B.V., Нідерланди). Після гоління передньої черевної стінки в асептичних умовах виконували верхньосерединну лапаротомію довжиною 2 см. Паренхіматозну кровотечу моделювали шляхом нанесення рани в середині діафрагмальної поверхні лівої медіальної частки печінки на всю товщу паренхіми за допомогою біопсійного панчу DERMO-PUNCH® діаметром 4 мм. Після появи кровотечі відразу застосовували гемостатичний матеріал (рис. 2.2).

Час кровотечі оцінювали після нанесення гемостатичного матеріалу й до повного припинення кровотечі. Рана передньої черевної стінки була закрита двома шарами розсмоктувальних швів (Vicryl 4/0, Ethicon). Тварин виводили з експерименту передозуванням кетаміну (100 мг/кг) на 7-му, 30-ту та 60-ту добу після операції.



Рисунок 2.2 – Моделювання паренхіматозної кровотечі та її припинення за допомогою використання місцевого гемостатичного засобу. Нанесення травми печінки (а), печінкова кровотеча (б), застосування гемостатичного засобу (в) та припинення кровотечі (г).

2.3.2. Оцінювання спайкового процесу в черевній порожнині щурів після застосування місцевих гемостатичних матеріалів

Відразу після виведення щурів з експерименту проводили оцінювання спайкового процесу за шкалою Перитонеального індексу адгезії від 0 до 30 балів, згідно якого оцінювали 9 ділянок черевної порожнини та спайки між вісцеральною поверхнею органів. Для кожної ділянки тяжкість спайкового процесу оцінювали від 0 до 3 балів [161].

2.3.3. Гістологічне та гістохімічне дослідження

Гістологічне дослідження було проведене на базі Медичної лабораторії CSD (м. Київ). Для гістологічного дослідження забирали всю ліву медіальну частку печінки з ділянкою імплантації. Тканину печінки фіксували у 10 % розчині нейтрального формаліну (pH 7,2) впродовж 24 годин. Потім зразки обробляли в автоматичному гістопроесорі (Milestone LOGOS Microwave Hybrid Tissue Processor, Milestone, Italy) та заливали в парафінові блоки. Зрізи товщиною 4 мкм отримували за допомогою мікротома (Thermo Scientific HM 340E microtome) і фарбували гематоксиліном та еозином, використовуючи Dako CoverStainer (Agilent, США) для рутинного гістологічного оцінювання, а також гістохімічне забарвлення:

1. забарвлення толуїдиновим синім – для візуалізації тучних клітини та оцінювання хімічного складу основної речовини (глікозаміноглікани) в матриці капсули навколо пошкодження печінки та БМ;
2. трихромне забарвлення за Массону – для визначення диференційованих колагенових волокон;
3. забарвлення за Гоморі – для візуалізації ретикулярних волокон.

2.3.4. Імуногістохімічне дослідження

Послідовні зрізи товщиною 4 мкм були використані для імуногістохімічного (ІГХ) дослідження. Для цього проводили депарафінізацію та гідратацію тканини. Ендогенну пероксидазну активність у них блокували використовуючи 3 % метанол у перекисі водню. Для демаскування рецепторів виконували термічне оброблення на водяній бані за температури 98 °C за допомогою TRIS EDTA або цитратного буфера (pH 6,0) з подальшою інкубацією з первинними антитілами. Після промивання додавали мічені полімерні вторинні антитіла (Envision Detection System, Dako). Активність пероксидази була виявлена за допомогою діамінобензидину (ДАБ) – тетрагідрохлоридної рідини плюс субстрат хромогенної системи (Dako). Реакцію припиняли дистильованою водою, а зрізи контрастували гематоксиліном і фіксували в середовищі Річарда–Аллана (Richard–Allan Scientific Mounting Medium, ThermoFisher).

Для ІГХ були використані наступні антитіла:

- CD68 (ДАКО, клон KP1) та CD163 (Cell Marque, клон MRQ-26) для візуалізації макрофагів різних фенотипів (M1 та M2);
- CD8 (ДАКО, клон C8/144B) для цитотоксичних Т-лімфоцитів, як ефektorних клітин клітинно-опосередкованого протипухлинного імунітету;
- FOXP3 (Cell Marque, клон EP340) для ідентифікації Т-регуляторних лімфоцитів, що продукують протизапальні та профіброгенні агенти;

- Актин гладкої мускулатури альфа – альфа-SMA (DAKO, клон 1A4) для оцінювання кількості міофібробластів у капсулі навколо дефекту тканин та відкладень БМ;
- Ki-67 (DAKO, клон MIB-1) для оцінювання проліферації клітин.

2.3.5. Оцінювання взаємозв'язку БМ – оточуючі тканини та морфометрія

Первинне гістологічне оцінювання проводили за допомогою мікроскопа NIKON ECLIPSE E200 (NIKON CORPORATION, Японія). Цифрові зображення зрізів були виконані за допомогою цифрового сканера слайдів (3DHISTECH, Угорщина). Усі морфометричні параметри оцінювали в 10 полях зору при збільшенні $\times 400$.

Під час оцінювання взаємодії між БМ і тканиною печінки були враховані такі параметри: біодеградація, біосумісність / імуногенність, біостимуляція.

2.3.5.1. Біодеградація матеріалу

Деградація БМ *in vivo* опосередковується специфічною біологічною діяльністю та взаємодією між БМ та оточуючими тканинами або клітинами хазяїна, включаючи імунну систему та спеціалізовані клітини. Руйнування БМ оцінювали використовуючи такі критерії: фрагментацію БМ (за шкалою від 0 до 3 балів, де 0 балів – немає змін; 1 бал – слабка фрагментація; 2 бали – помірна; 3 бали – БМ повністю фрагментований), гомогенність / гетерогенність БМ (за шкалою від 0 до 3 балів, де 0 балів – БМ гомогенний; 1 бал – слабка гетерогенність; 2 бали – помірна гетерогенність; 3 бали – БМ гетерогенний). Площі БМ та дефекту паренхіми печінки оцінювали в мм^2 . У зв'язку з тим що біодеградація проходить переважно під дією клітинних ферментів, то визначали кількість лейкоцитів чи інших клітин, що мають безпосередній контакт із БМ за шкалою від 0 до 3 балів, де 0 – відсутні; 1 – мало клітин; 2 - помірна кількість клітин, які контактують з БМ, але є безклітинні зони БМ; 3 – більша частина поверхні БМ покрита клітинами. Також досліджували кількість гігантських клітин сторонніх тіл, що виражали

за допомогою шкали від 0 до 3 балів, де 0 – відсутні клітини; 1 – незначна кількість, 2 – помірна кількість; 3 – велика кількість.

2.3.5.2. Оцінювання біосумісності

Для оцінювання біосумісності аналізували інтенсивність запальної реакції, спричинену імплантацією БМ, характеристики оточуючої сполучнотканинної капсули навколо БМ та стан сусідніх спеціалізованих клітин печінки поза капсулою. Інтенсивність запальної реакції оцінювали, як між фрагментами БМ, так і в оточуючих тканинах за шкалою від 0 до 3 балів, де 0 – відсутня запальна реакція; 1 – слабка запальна реакція; 2 – помірна запальна реакція; 3 – сильна запальна реакція. Напівкількісний підхід також був використаний під час оцінювання щільності клітин між фрагментами БМ, за шкалою від 0 до 3 балів, де 0 – клітини відсутні; 1 – мало клітин; 2 – помірна кількість клітин, але є безклітинні зони БМ; 3 – велика кількість клітин. Оцінюючи реакцію оточуючих тканин на БМ, ми вимірювали товщину капсули навколо БМ, в мкм, та різну кількість імунних клітин, серед яких кількість мастоцитів, макрофагів (типи M1 та M2), цитотоксичні Т-лімфоцити, Т-регуляторні лімфоцити. Кількість цих клітин розраховували на 1 мм². Крім того, обчислювали співвідношення – CD68/CD163 та CD8/FOXP3-позитивних клітин. Вростання тканин усередині БМ розглядали як особливості біосумісності БМ та оцінювали від 0 до 3 балів, де 0 – відсутнє вростання; 1 – незначне вростання на окремих ділянках; 2 – помірне вростання, але залишаються зони БМ, не оточені СТ; 3 – БМ повністю оточений тканинами. Інтенсивність запальних та дистрофічних змін у паренхімі печінки, що прилягає до зони імплантації БМ, використовували для оцінювання негативного (токсичного) ефекту БМ. Інтенсивність запалення оцінювали від 0 до 3 балів, де 0 – відсутнє запалення; 1 – слабке запалення; 2 – помірне запалення; 3 – сильна запальна реакція. Також визначали кількість дво- та багатоядерних гепатоцитів, які оцінювали від 0 до 3 балів, де 0 – відсутні

двоядерні гепатоцити; 1 – кількість клітин < 10 %; 2 – кількість клітин від 10 % до 20 %; 3 – кількість двоядерних гепатоцитів > 20 %.

2.3.5.3. Біостимуляція

Вплив БМ на ріст та регенерацію тканин оцінювали реакцію міофібробластів, які розглядали як ключові клітини у формуванні грануляційної тканини та регенерації печінки. Їх кількість оцінювали за шкалою від 0 до 3 балів, що відображала відсоток позитивнозбарвлених клітин (0 – відсутні міофібробласти; 1 бал – міофібробласти становлять менше 25 % клітин у капсулі; 2 бали – 26–50 % клітин у капсулі представлені міофібробластами; 3 бали – більше 50 % клітин представлені міофібробластами. Крім того, вплив БМ на фіброгенез було враховано за допомогою оцінювання щільності ретикулярних та колагенових волокон у капсулі навколо БМ, що оцінювали за шкалою від 0 до 3 балів де 0 – поодинокі волокна; 1 – пухкі волокна; 2 – помірна щільність волокон; 3 – висока щільність волокон. Як орієнтир щільність волокон у печінковій капсулі була використана за еквівалентну оцінку 2 бали. Крім того, швидкість проліферування клітин розраховували у співвідношенні кількості позитивних клітин Кі-67 на 1 мм² навколо БМ та визначали індекс проліферації Кі-67-позитивних клітин у відсотках до загальної кількості клітин.

2.4. Статистичний аналіз

Безперервні дані наведені як середнє значення (та стандартне відхилення) для нормального розподілу значень або медіана та (інтерквартильний розмах) для розподілу відмінного від нормального. Номінальні дані подані у відсотках. Перевірку гіпотези про нормальність розподілу досліджуваної вибірки проводили згідно з критерієм Шапіро – Уїлка та Q–Q графіка. Порівняння груп проводили за допомогою дисперсійного аналізу (ANOVA) з поправкою Бонфероні для нормального розподілення, або за допомогою критерію Краскела – Уолліса. Рівень значущості був встановлений 0,05. Прогнозування термінів повної деградації біоматеріалу

проводили за допомогою лінійного регресійного аналізу та методу Холта – Вінтерса. Статистичний аналіз здійснювали за допомогою програмного середовища R (версія 3.4.4, The R Foundation For Statistical Computing, Vienna, Austria) та IDE Rstudio (версія 1.2.5033, <http://www.rstudio.org> та <https://www.R-project.org>).

Основні результати цього розділу опубліковані в працях [162], [163], [253], [257], [258].

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Дослідження фізико-хімічних та структурних властивостей хітозанових біоматеріалів

3.1.1. Сканувальна електронна мікроскопія хітозанових матеріалів різного синтезу

Властивості хітозанових матеріалів залежать від комплексу характеристик, таких як фізична форма, ступінь деацетилювання, молекулярна маса, рН, параметри технологічного процесу створення, чистота сировини та ін. Сканувальна електронна мікроскопія (SEM) поверхні зразків виявила складну структуру матеріалів, що прямо залежала від методу синтезу та хімічного складу гемостатиків (рис. 3.1).

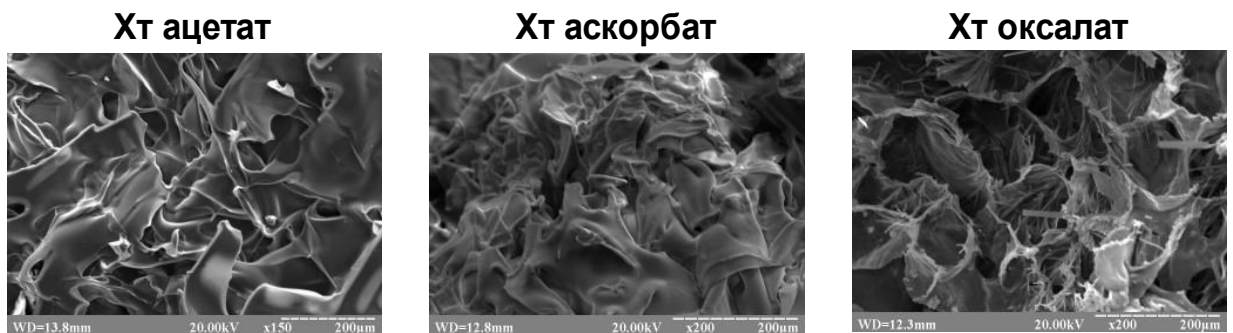


Рисунок 3.1 – Сканувальна електронна мікроскопія поверхні хітозанових губок із різного складу розчинників. Збільшення зазначене у правому нижньому куті мікрофото.

Усі зразки ХТГ демонстрували розгалужену пористу структуру, що розрізнялася залежно від розчинника. Аналіз поверхні показав, що медіана площі перерізу пор Хт ацетату становила 281,25 (61,31–1243,42) мкм², це достовірно більше ($p = 0,0014$) від аскорбату – 148,15 (36,59–335,93) мкм² та оксалату – 91,81 (17,15–5830,31) мкм², хітозану ($p = 0,001$). Статистично значущої відмінності площі перерізу пор між аскорбатом та оксалатом хітозану не виявлено ($p = 0,49$). Розмах значень ацетату Хт засвідчив про

нерівномірний розподіл пор, а їх форма та розміщення – про те, що більшість – це відкриті пори. Аскорбат Хт мав більш компактну структуру з вираженими хітозановими балками та пори у вигляді щілин неправильної форми. Основна маса пор мала площу перерізу до 1 000 мкм² (рис. 3.2).

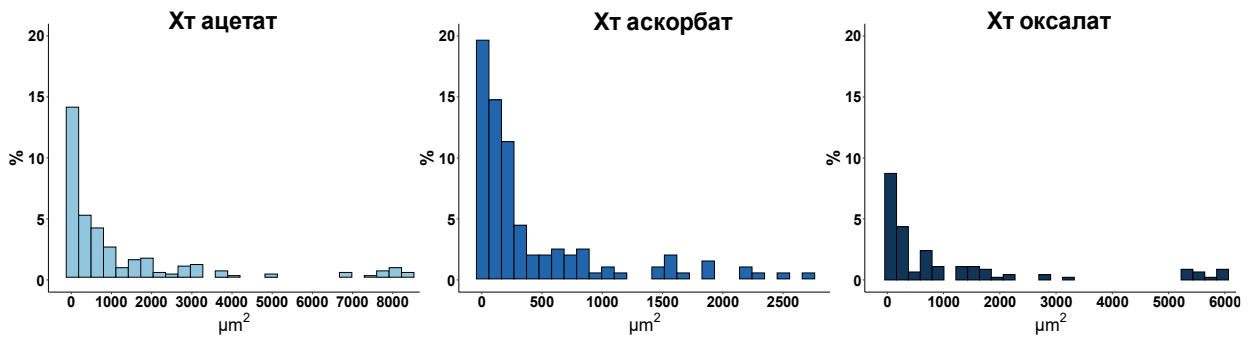


Рисунок 3.2 – Розподіл площі перерізу пор (%) хітозанових губок залежно від складу розчинників.

Поверхня балок оксалату та аскорбату Хт мала розгалужений рельєф, що відповідно збільшувало площу активної поверхні. Проте аскорбат Хт за рахунок товстих трабекул утворювали переважно закриті пори. Оксалат хітозану мав бімодальний розподіл пор за наявності «великих» (від 5 000 мкм² до 6 000 мкм²) і значної кількості «малих» (до 2 000 мкм²) пор. Балки оксалату Хт були вкриті різноспрямованими відкладеннями дрібних кристалів солей.

Поверхня ХтА мала нерівномірний пластинчастий рельєф (рис. 3.3).

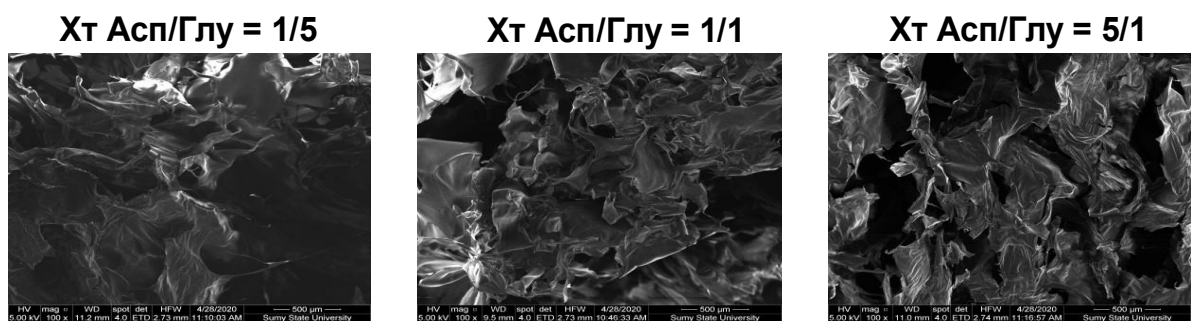


Рисунок 3.3 – Сканувальна електронна мікроскопія поверхні хітозанових аерогелів з різного складу розчинників. Збільшення зазначене у правому нижньому куті мікрофото.

Найбільша медіана площі перерізу пор ХтА 272,58 (94,22–1498,74) мкм² спостерігалась у Хт Асп/Глу = 1/5, що достовірно ($p = 0,0021$) відрізнялася від Хт Асп/Глу = 5/1 з медіаною площі перерізу пор, що становила 149,33 (49,84 – 542,28) мкм² (рис. 3.4).

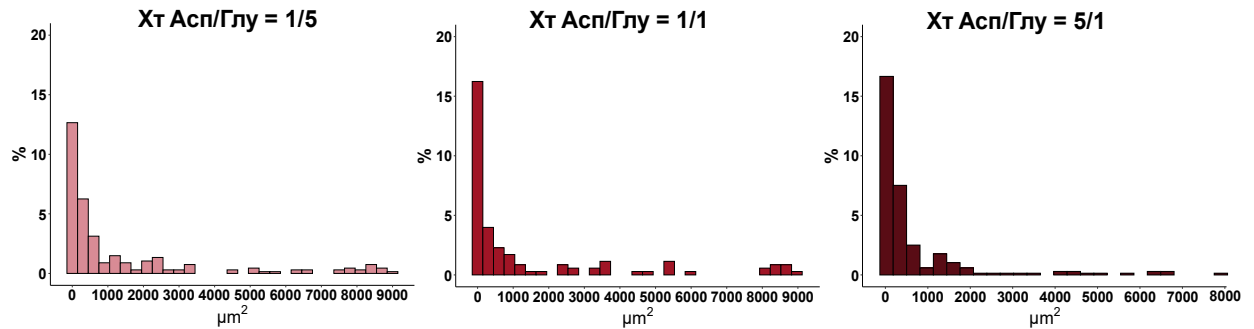


Рисунок 3.4 – Розподіл площі перерізу пор (%) хітозанових аерогелів залежно від складу розчинників.

Зразок Хт Асп/Глу = 1/1 із медіаною пор 165,35 (56,87–1214,27) мкм² не мав статистично значущих відмінностей від решти груп ($p = 0,091$). Пошарові зрізи всіх ХтА свідчили про переважну більшість відкритих пор, розгалужено-ребристий рельєф балок.

СЕМ ХтМ мала істотні відмінності (рис. 3.5). Чистий Хт формувал сітку з різноспрямованих нановолокон, медіана діаметра становила 240,07 (126,74–353,31) нм. Розподіл діаметра волокон був асиметричним, 85 % волокон мали товщину меншу ніж 100 нм.

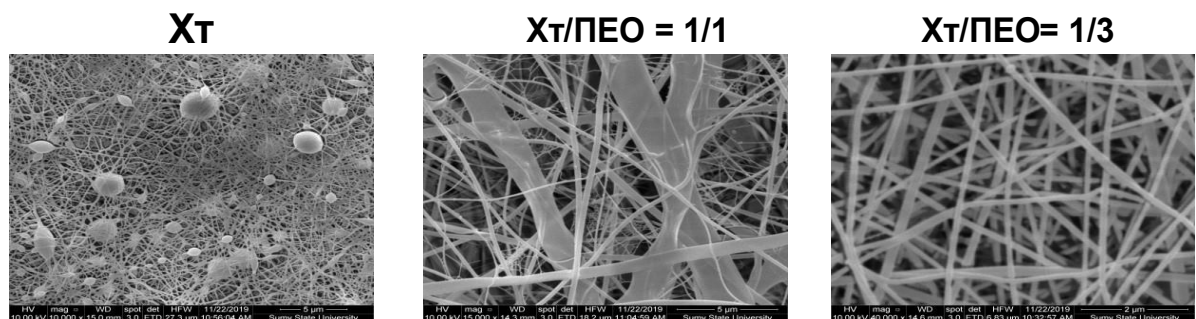


Рисунок 3.5 – Сканувальна електронна мікроскопія поверхні хітозанових мембран з різного складу розчинників. Збільшення зазначене у правому нижньому куті мікрофото.

На поверхні та в товщі мембрани спостерігалися депозити біополімеру округлої форми з діаметром від 0,52 мкм до 4,74 мкм. Це пов'язано з особливостями процесу електропрядіння – відрив волокна від конуса Тейлора, та переходу від електропрядіння до електророзпилення. Хт/ПЕО = 1/1 не мав депозитів на своїй поверхні, але медіана діаметра волокон становила 457,40 (237,64 – 677,25) нм, що значно перевищувала решту ХтМ ($p = 0,0023$). Чистий Хт та Хт/ПЕО = 1/3 не мали статистично значущої відмінності діаметра волокон між групами (рис. 3.6).

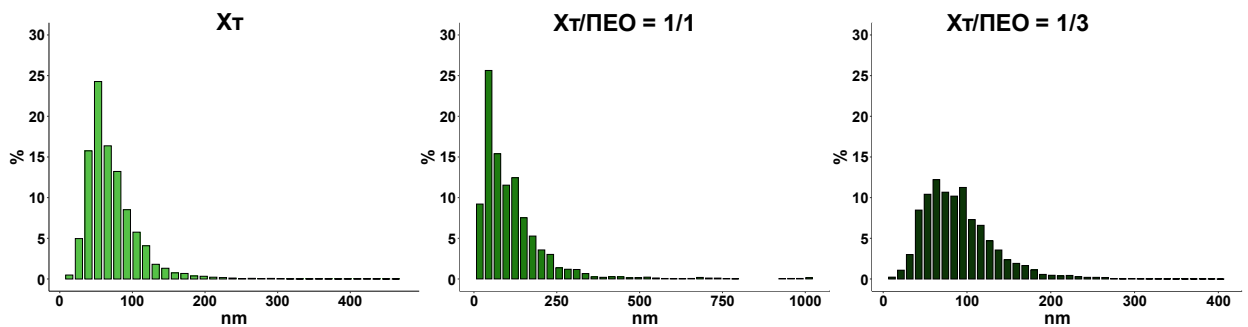


Рисунок 3.6 – Розподіл діаметра волокон хітозанових мембран залежно від складу розчинників.

Широкий діапазон діаметра волокон від 17,85 нм до 1013,62 нм свідчив про неоднорідність мембрани, яка значно зменшувала площу активної поверхні. Найбільш рівномірно розподілений діаметр волокон спостерігали для Хт/ПЕО = 1/3. Різноспрямованість нановолокон створювала однорідну мембрану з медіаною діаметра волокон 207,59 (109,11–305,74) нм.

Медіана площі перерізу пор мембран чистого Хт становила 32,54 (13,22–81,61) нм² (рис. 3.7), вона мала значний розмах (від 2,11 нм² до 1470,26 нм²) і була достовірно меншою порівняно з Хт/ПЕО = 1/3 ($p = 0,022$). Площа перерізу пор Хт/ПЕО = 1/1 із медіаною 34,38 (7,8–181,05) не мала статистичних відмінностей від чистого Хт ($p = 0,15$), проте максимальна площа перерізу пор досягала 2478,39 нм². Мембрани Хт/ПЕО = 1/3 мали медіану площі перерізу пор 58,47 (24,03–164,52) нм², що статистично значуще

була більша від мембран чистого хітозану ($p = 0,022$) та Хт/ПЕО = 1/1 ($p = 0,025$) і мала найменший міжквартильний розмах (120,41 нм²).

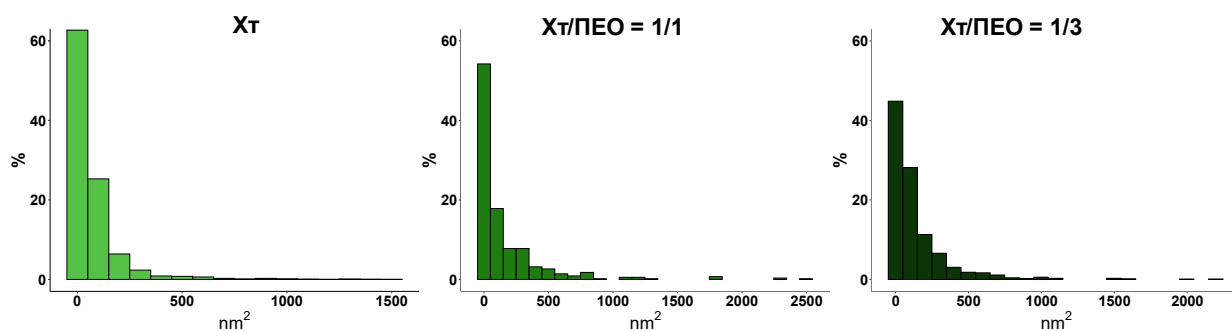


Рисунок 3.7 – Розподіл площі перерізу пор хітозанових мембран залежно від складу розчинника.

3.1.2. ІЧ-Фур'є спектроскопія гемостатичних матеріалів на основі хітозану

ІЧ-Фур'є спектроскопія ХтГ (рис. 3.8) демонструвала характерні для полісахаридів смуги поглинання між 3 500 і 2 800 см⁻¹ (νO-H смуга між 3 700 і 3 000 см⁻¹ та νC-H смуга між 3 000 і 2 800 см⁻¹). ІЧ-спектри, характерні для похідних хітозану, знаходилися між 1 600 і 1 500 см⁻¹ для νC=O та між 1400 та 1500 см⁻¹ для δNH₂, що відповідало аміді I та аміді II. Для ХтГ ІЧ спектри істотно відрізнялися лише на відрізку смуги поглинання між 1 420 і 960 см⁻¹, що зумовлено різними кислотними залишками залежно від зразка кислоти, в якій був розчинений хітозан.

На рисунку 3.9 наведено ІЧ-спектри ХтА, де спостерігалася підвищена інтенсивність типових для хітозану смуг поглинання для амідних зв'язків та вільних аміногруп. Істотною відмінністю для ХтА було збільшення інтенсивності смуг для амідних зв'язків, це підтверджує реакцію між карбоновими групами, що походили з амінокислот та вільними аміногрупами, які походили з хітозану між 1 668 і 1 634 см⁻¹. У той самий час смуги, що відповідали вільним аміногрупам, усе ще були наявні та виявлялися на проміжках 1 588–1 578 см⁻¹ та 1 156–1 148 см⁻¹.

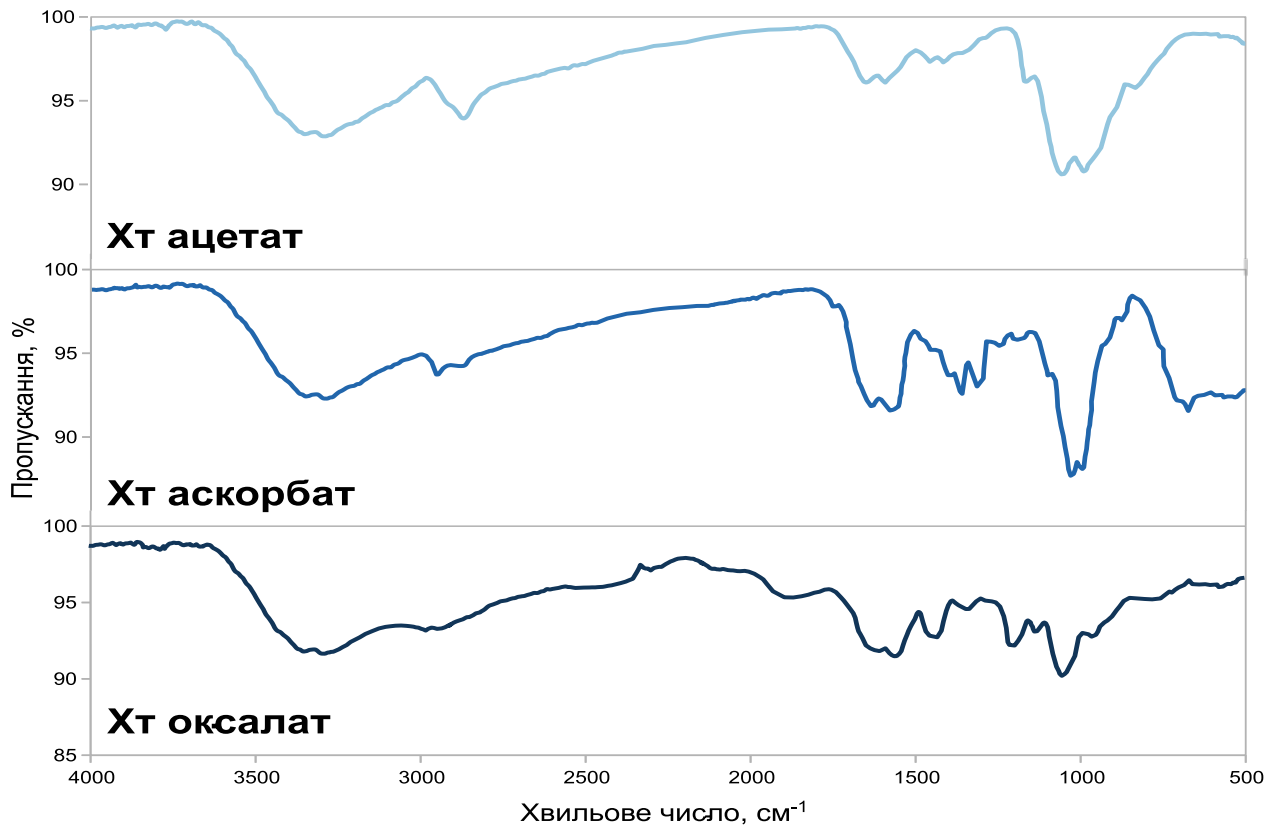


Рисунок 3.8 – Інфрачервона спектроскопія хітозанових губок.

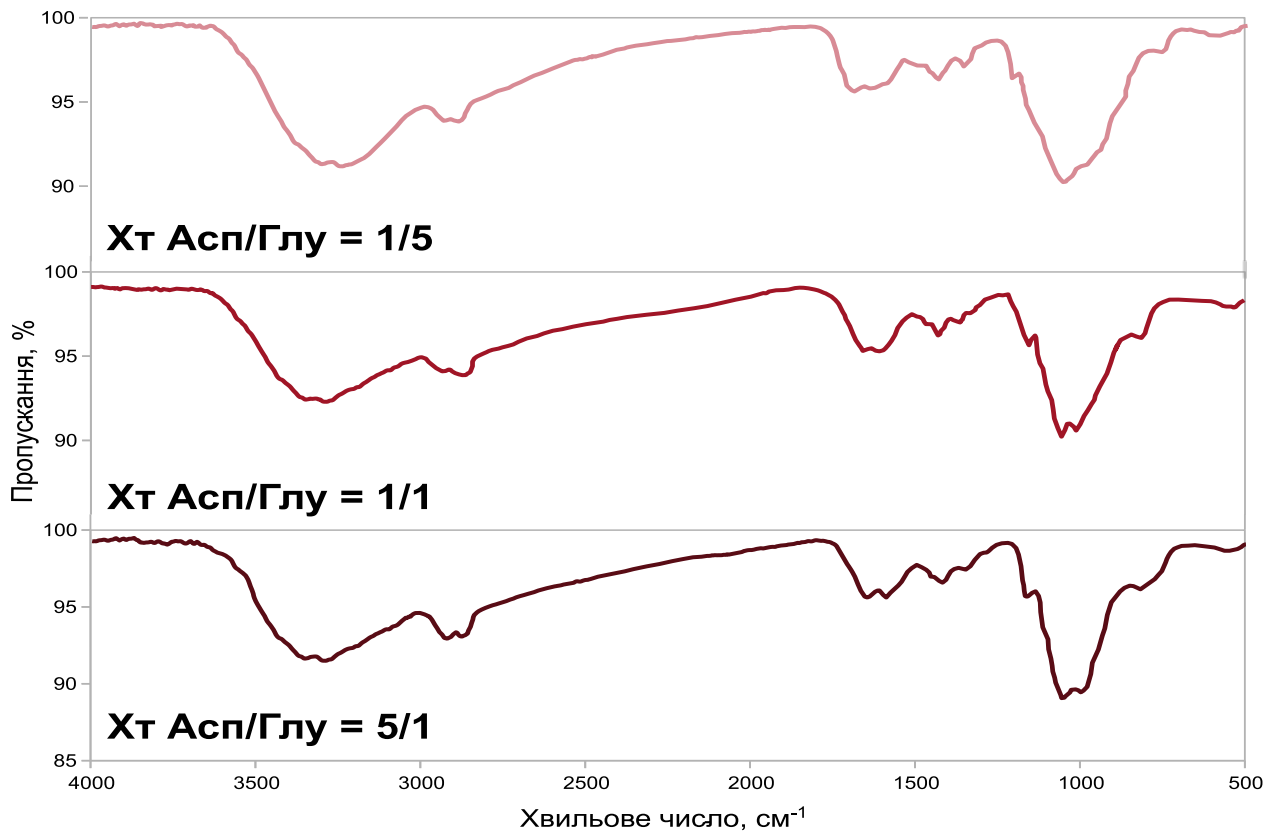


Рисунок 3.9 – Інфрачервона спектроскопія хітозанових аерогелів.

Нановолокна чистого хітозану продемонстрували характерні смуги поглинання, що відповідали ХтГ (рис. 3.10). Додавання ПЕО до хітозану зменшило інтенсивність поглинання на проміжку $3\,500\text{--}3\,100\text{ см}^{-1}$. Інтенсивний спектр поглинання між $2\,890$ та $2\,875\text{ см}^{-1}$, характерний для чистого ПЕО добре візуалізується і в комбінації з хітозаном незалежно від співвідношення полімерів.

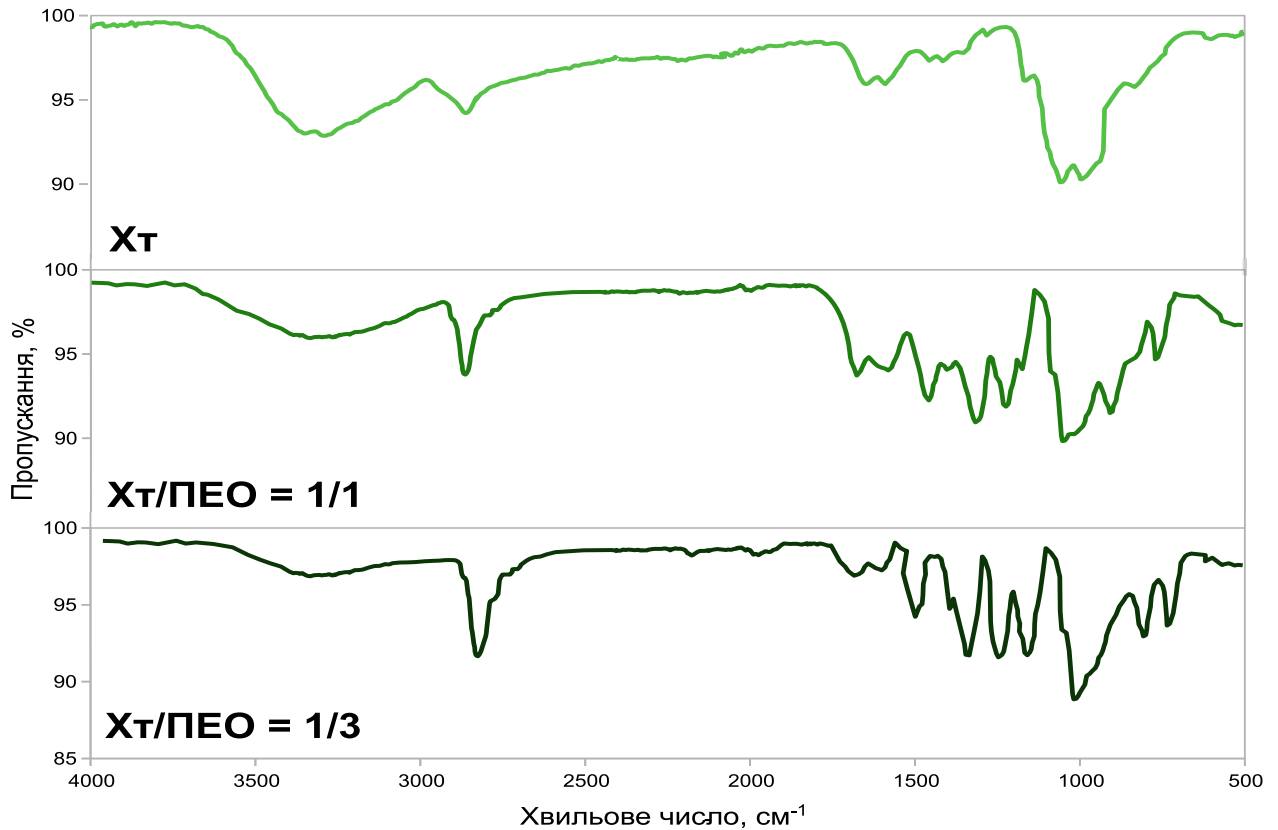


Рисунок 3.10 – Інфрачервона спектроскопія хітозанових мембран.

Також додавання ПЕО підтверджувалося збільшенням інтенсивності смуг поглинання на відрізку $1\,095\text{--}1\,025\text{ см}^{-1}$ і триpletними піками, пов'язаними з деформаційним розтягненням С-О-С. Додаткових смуг, які б могли свідчити про наявність формування другої фази, в жодному з зразків хітозанових гемостатиків не було виявлено.

3.1.3. Контактний кут хітозанових мембран

Дослідження змочування Хт матеріалів за допомогою визначення контактного кута технічно було можливим лише для Хт мембран завдяки їх

макроскопічно рівній поверхні (рис. 3.11). Розгалуджена трабекулярна поверхня Хт губок та аерогелів не дозволила провести даний експеримент. Аналіз контактного кута нановолоконних мембран засвідчив, що всі зразки мають гідрофільну поверхню, що є необхідною умовою ефективних гемостатичних матеріалів. Гідрофільність прямо залежала від умісту в мембрані ПЕО. Так, чистий Хт мав контактний кут $28 (3,7)^\circ$, тоді як Хт/ПЕО = 1/1 продемонстрував достовірно кращу змочуваність ($p = 0,025$) з кутом $20 (2,5)^\circ$. Для Хт/ПЕО = 1/3 визначити контактний кут виявилось неможливо у зв'язку з тим, що детектор не встигав зафіксувати краплю, яку дуже швидко поглинала мембрана.

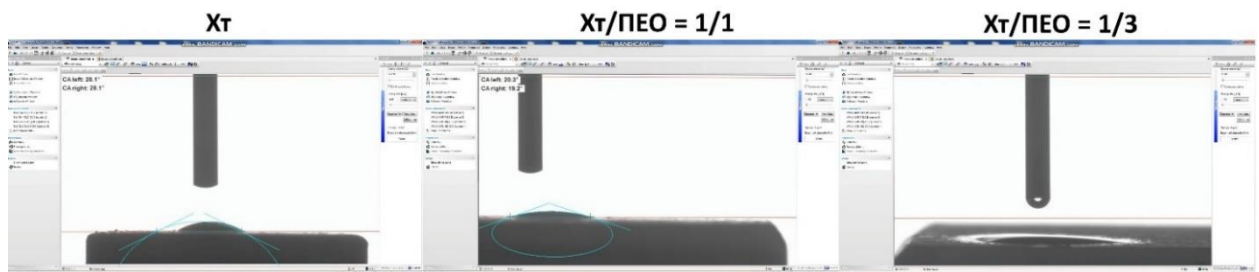


Рисунок 3.11– Дослідження контактного кута хітозанових мембран.

3.1.4. Пористість та щільність хітозанових матеріалів різної структури

Усі види Хт матеріалів продемонстрували досить високу пористість (рис. 3.12). Серед ХтГ найбільшу пористість $71,67 (3,21) \%$ мав Хт ацетат ($p < 0,001$). Хт аскорбат – $65,04 (2,39) \%$ та Хт оксалат – $66,17 (4,27) \%$ не мали статистично значущих відмінностей між собою ($p = 0,46$). У групі ХтА пористість зразків статистично не відрізнялася ($p = 0,57$), хоча Хт Асп/Глу = 5/1 мав найвищі показники – $84,10 (2,52) \%$. Мембрани з чистого Хт показали найнижчу пористість – $72,94 (3,41) \%$ ($p = 0,027$), тоді як зразки з ПЕО не мали достовірних відмінностей ($p = 0,94$) між собою. Порівнюючи групи між собою, зразки ХтА виявилися найбільш пористими, тоді як, ХтГ мали порівняно нижчі показники.

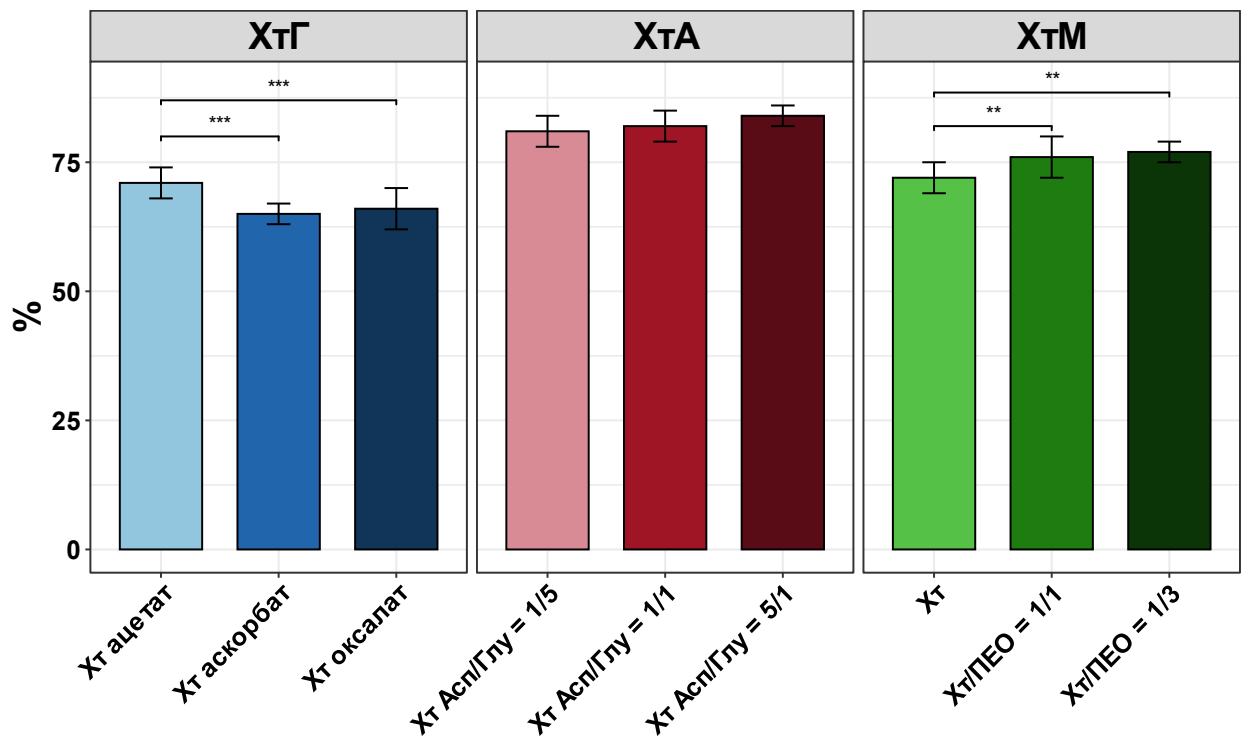


Рисунок 3.12 – Пористість різних груп хітозанових гемостатиків.

Найвищу щільність продемонстрували Хт губки (рис. 3.13), що коливалася від 0,089 (0,012) г/см³ для Хт ацетату до 0,094 (0,009) г/см³ для Хт аскорбату, проте статистично значущої відмінності не спостерігалось ($p = 0,72$). Найнижча щільність була характерна для Хт аерогелів, що узгоджувалось з їхньою високою пористістю. Вона знижувалася від Хт Асп/Глу = 1/5 з показником 0,067 (0,007) г/см³ до 0,062 (0,008) г/см³ для Хт Асп/Глу = 1/1 та 0,060 (0,008) г/см³ для Хт Асп/Глу = 5/1. Проте достовірна відмінність спостерігалася лише між Хт Асп/Глу = 1/5 та Хт Асп/Глу = 5/1 ($p = 0,024$). Найменшу щільність серед Хт мембран продемонстрував чистий Хт із показником 0,060 (0,003) г/см³, що достовірно нижче порівняно з Хт/ПЕО = 1/1 з результатом 0,077 (0,012) ($p = 0,004$) та Хт/ПЕО = 1/3 з показником 0,080 (0,009) ($p = 0,009$). Хт/ПЕО = 1/1 та Хт/ПЕО = 1/3 між собою не мали достовірної відмінності ($p = 0,43$). Усі зразки ХтМ мали достовірну меншу щільність порівняно із зразками ХтГ.

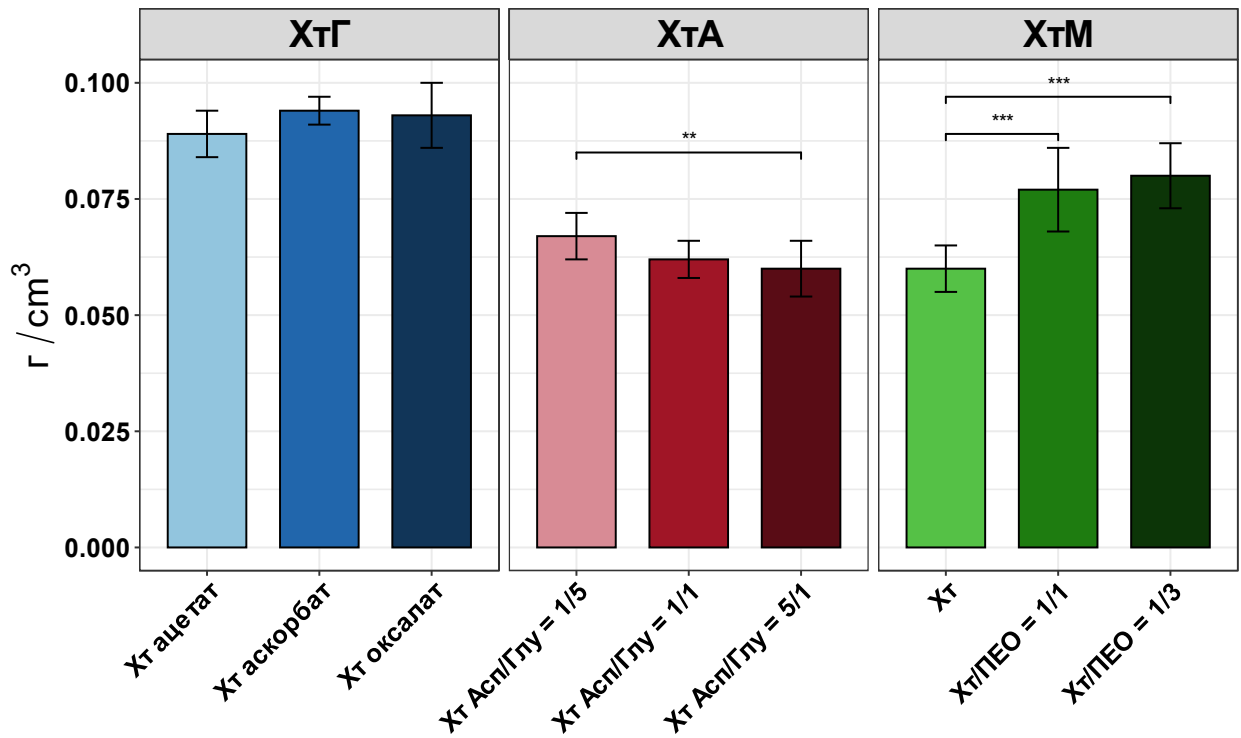


Рисунок 3.13 – Щільність різних груп хітозанових гемостатиків.

3.1.5. Деградація та біодеградація хітозанових матеріалів залежно від складу та методу синтезу

Хітозан – це біополімер, що зазнає деградації, швидкість якої залежить як від складу зразка, так і від його фізичної форми. Так, у розчині SBF за перші 24 години всі зразки хітозану втрачали понад 40 % ваги. У подальшому швидкість деградації дещо сповільнювалася (рис 3.14).

ХтГ через 7 діб втрачали близько 70 % своєї ваги. Найбільш швидко деградацію в перші 24 години в цій групі продемонстрував Хт аскорбат, що мав 46 (4) % зменшення ваги, проте, починаючи з 3-ї доби, швидкість його деградації сповільнилась і через 168 годин втрата ваги досягала 69 (3) %, що достовірно більше порівняно з Хт оксалатом ($p = 0,01$) та не мало суттєвих відмінностей від Хт ацетату ($p = 0,067$). Хт оксалат мав найменшу швидкість деградації у порівнянні з рештою зразків ХтГ, проте на нприкінці дослідження втрата ваги становила 67 (2) %.

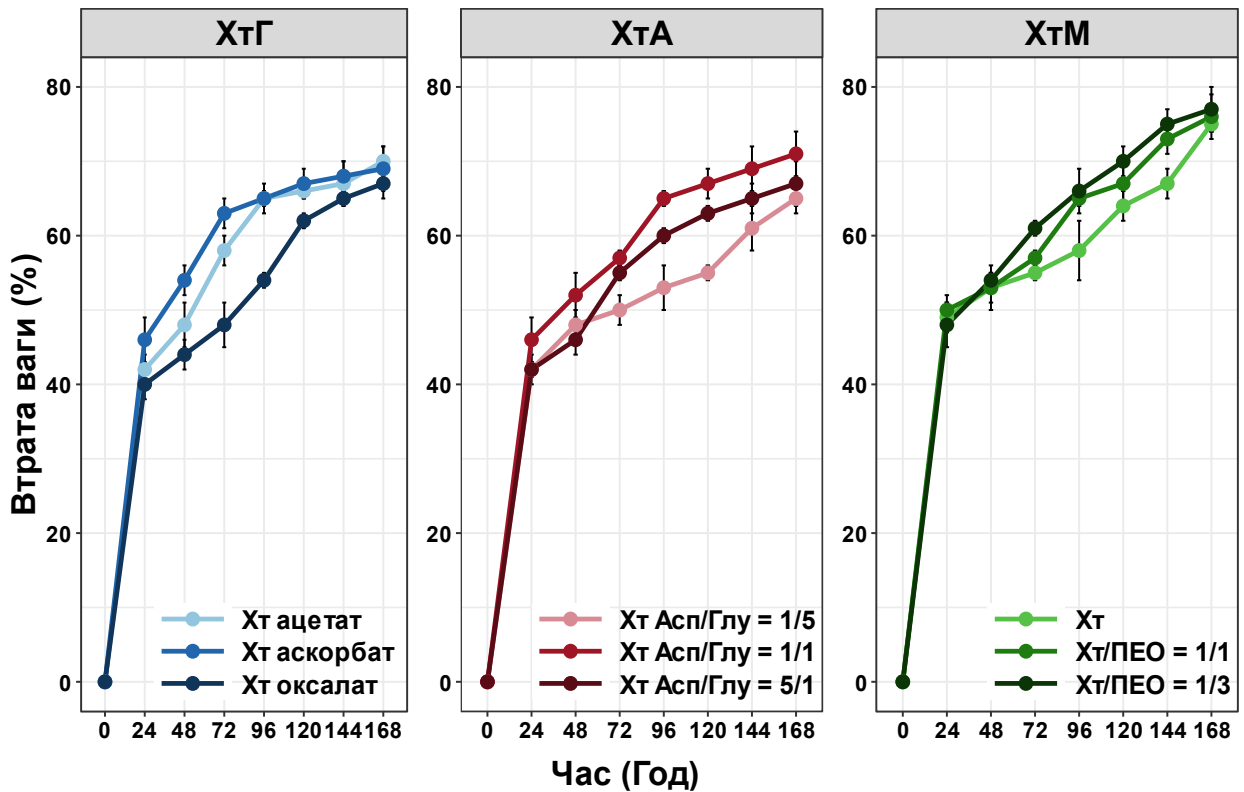


Рисунок 3.14 – Швидкість деградації хітозанових матеріалів у розчині SBF.

ХтА показали відносну вищу швидкість деградації порівняно з ХтГ. Так, за перші 24 години найбільшу втрату ваги продемонстрував Хт Асп/Глу = 1/1 із показником 47 (3) %, на 7-му добу дослідження втрата ваги становила 71 (3) %, що статистично значуще було більше від інших аерогелів ($p = 0,011$). Починаючи із 48 годин швидкість деградації Асп/Глу = 5/1 зменшилась, і через 168 годин втрата ваги досягала лише 65 (2) %. Асп/Глу = 5/1 наприкінці дослідження мав втрату ваги 67 (3) %, що достовірно відрізнялося від решти аерогелів ($p = 0,022$).

Найбільше зазнавали деградації ХтМ, які незалежно від хімічного складу через 168 годин втрачали майже 80 % ($p = 0,015$) своєї ваги. Найбільш рівномірно цей процес проходив для Хт/ПЕО = 1/3, тоді як для чистого Хт і для Хт/ПЕО = 1/1 відмічалася певна стабілізація процесу з 2-ї до 5-ї доби. До того ж, лише в цей період зразки ХтМ мали статистично значущі відмінності один від одного ($p = 0,03$).

Біодеградацію досліджували в лізоцимі, моделюючи ферментативний розпад хітозану (рис. 3.15).

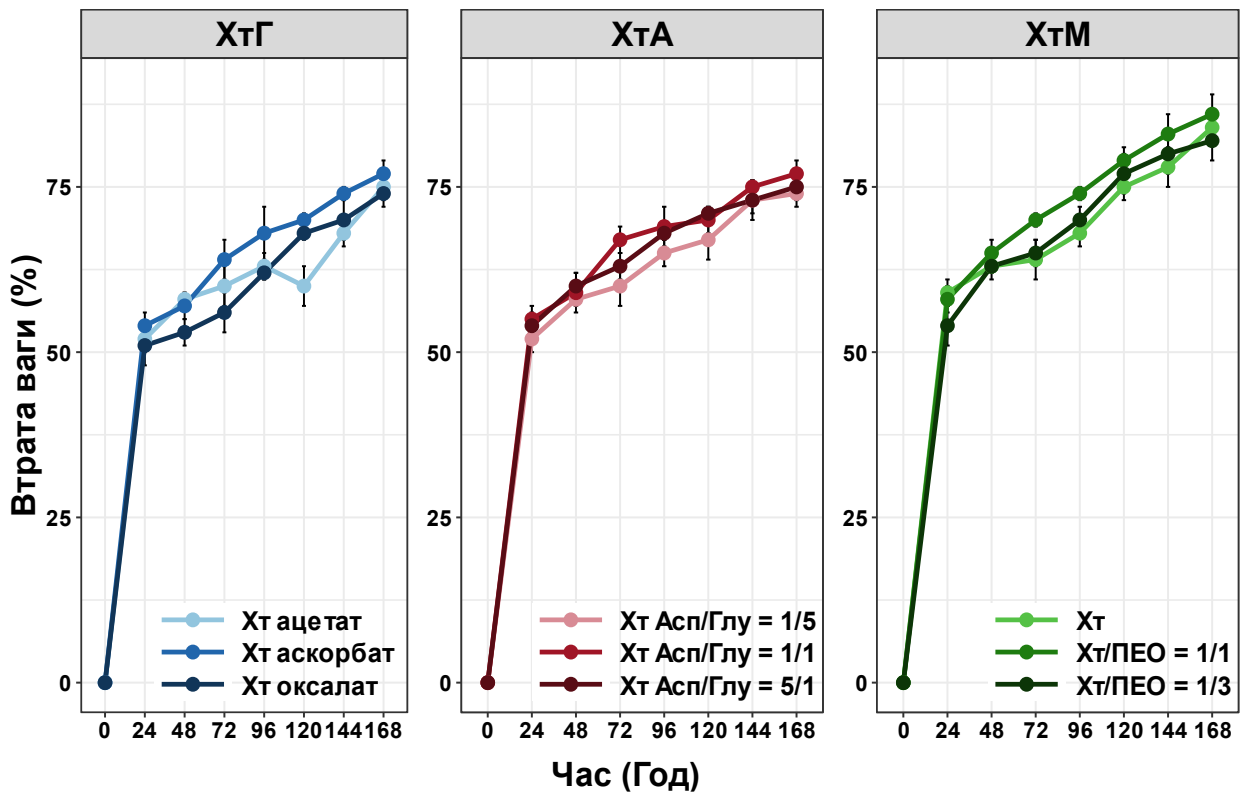


Рисунок 3.15 – Швидкість біодеградації хітозанових матеріалів у розчині лізоциму.

Біодеградація хітозанових зразків у лізоцимі була достовірно швидшою порівняно з розчином SBF ($p = 0,001$) для всіх груп матеріалів. У групі ХтГ на 4-ту та 5-ту доби спостерігалися відмінності між групами ($p = 0,03$), оскільки Хт ацетат на 3-тю добу знизив швидкість біодеградації, проте на 7-му добу втрата ваги становила 75 (2) %, що статистично значуще не відрізнялося ($p = 0,024$) від решти зразків ХтГ. ХтА впродовж всього дослідження, за винятком 3-ї доби, не мали достовірної відмінності між зразками ($p = 0,33$). Через 168 годин найменша втрата ваги була 74 (2) % для Асп/Глу = 1/5 та найбільша – 77 (2) % для Асп/Глу = 5/1. У групі ХтМ на всіх часових проміжках не було статистично значущої відмінності між зразками ($p = 0,071$). Наприкінці дослідження всі мембрани втратили більше ніж 80 % своєї ваги, що було достовірно більше порівняно з ХтГ та ХтА ($p = 0,024$).

3.2. Вивчення біологічних властивостей хітозанових гемостатичних матеріалів

3.2.1. Антибактеріальні властивості хітозанових гемостатичних матеріалів

Наявність антибактеріальних властивостей є не обов'язковою характеристикою гемостатичних біоматеріалів, проте ця властивість значно покращує віддалені результати застосування матеріалів, що залишаються в людському організмі. Антибактеріальні властивості перевіряли стосовно класичного представника грампозитивних бактерій – *S. aureus* (рис. 3.16), та грамнегативних бактерій – *E. coli* (рис 3.17).

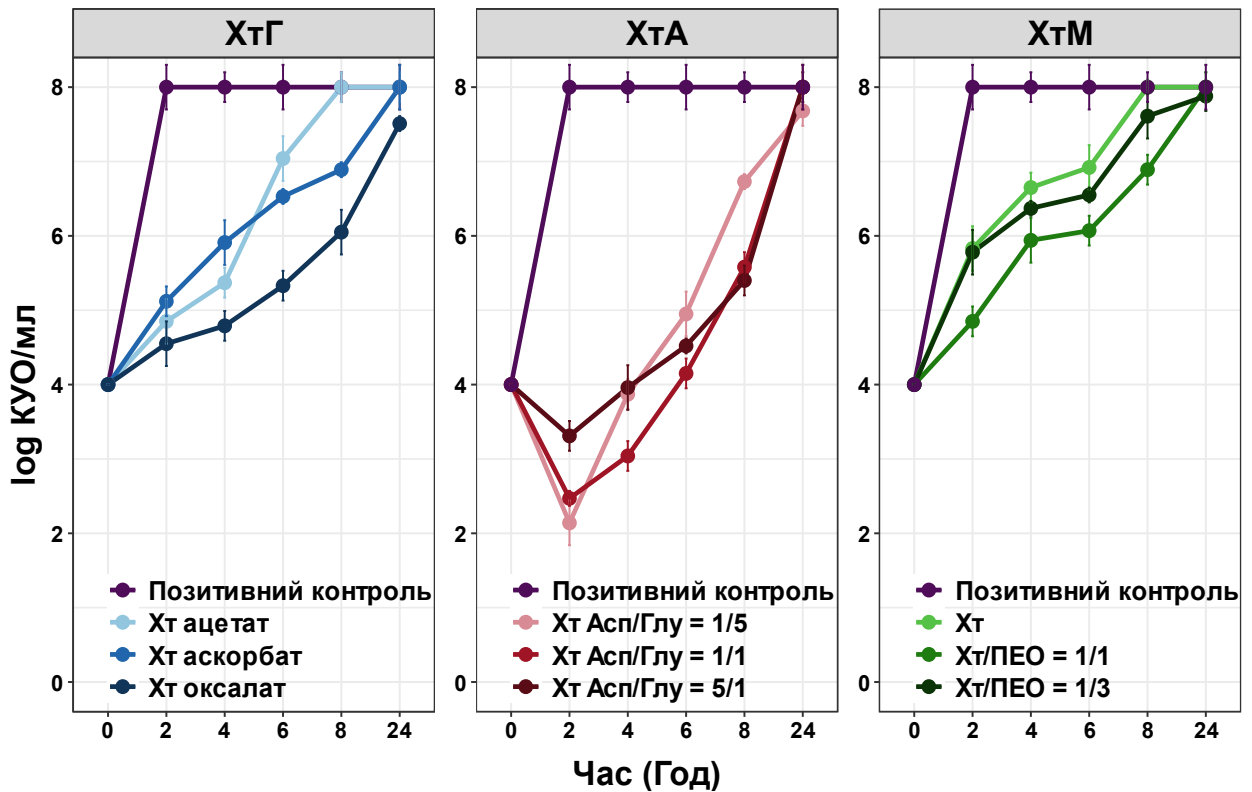


Рисунок 3.16 – Кількість життєздатних мікроорганізмів *S. aureus* після інкубації з хітозановими матеріалами через різні проміжки часу.

Позитивний контроль *S. aureus*, що не взаємодіяв із гемостатиками, через 2 години інкубації налічував 8,0 log КУО/мл. Хт губки проявили помірний бактеріостатичний ефект щодо грампозитивних бактерій, Хт ацетат

і Хт оксалат практично стримували ріст мікроорганізмів упродовж 4 годин. Проте через 8 годин інкубації для Хт ацетату кількість КУО *S. aureus* вирівнялася з контролем, тоді як Хт аскорбат та Хт оксалат продовжували стримувати ріст бактерій. Через 24 години інкубації статистично значуща кількість мікроорганізмів відрізнялася лише для Хт оксалату – 7,51 (0,14) log КУО/мл ($p = 0,033$).

Хт аерогелі впродовж перших 2 годин інкубації продемонстрували бактерицидний ефект, знизивши кількість живих мікроорганізмів нижче від вихідного рівня до 2,14 (0,31) log КУО/мл для Хт Асп/Глу = 1/5, до 2,47 (0,17) log КУО/мл – для Хт Асп/Глу = 1/1 та до 3,31 (0,28) log КУО/мл – для Хт Асп/Глу = 5/1. Зразки Хт Асп/Глу = 1/1 і Хт Асп/Глу = 5/1 на цьому етапі мали істотно меншу кількість мікроорганізмів порівняно з Хт Асп/Глу = 1/5 ($p = 0,015$). Через 4 години кількість бактерій повернулася до попереднього рівня для зразків Хт Асп/Глу = 1/5 і Хт Асп/Глу = 5/1, тоді як аерогель Хт Асп/Глу = 1/1 інгібував ріст мікроорганізмів упродовж 6 годин. Починаючи із 6 години, для всіх зразків характерний значний ріст мікроорганізмів, кількість яких через 24 год досягла 8,0 log КУО/мл і не мала достовірних відмінностей від позитивного контролю ($p = 0,18$).

Зразки Хт мембран не виявили значного бактеріостатичного ефекту на грампозитивні бактерії порівняно з попередніми групами. Через 2 години було відмічено ріст мікроорганізмів, що досягав 5,83 (0,37) log КУО/мл для чистого Хт і 4,85 (0,23) log КУО/мл – для Хт/ПЕО = 1/1. Проте з 2 до 6 годин інкубування спостерігалася «стабілізація» росту бактерій, швидкість якої знову зросла після 6 годин. Через 8 годин кількість *S. aureus*, проінкубована з чистим Хт, відповідала позитивному контролю, тоді як Хт/ПЕО = 1/1 та Хт/ПЕО = 1/3 ще мали незначний антибактеріальний вплив. Через 24 годин рівень живих мікроорганізмів для всіх зразків досягнув 8,0 log КУО/мл і не мав статистичної відмінності між групами ($p = 0,96$).

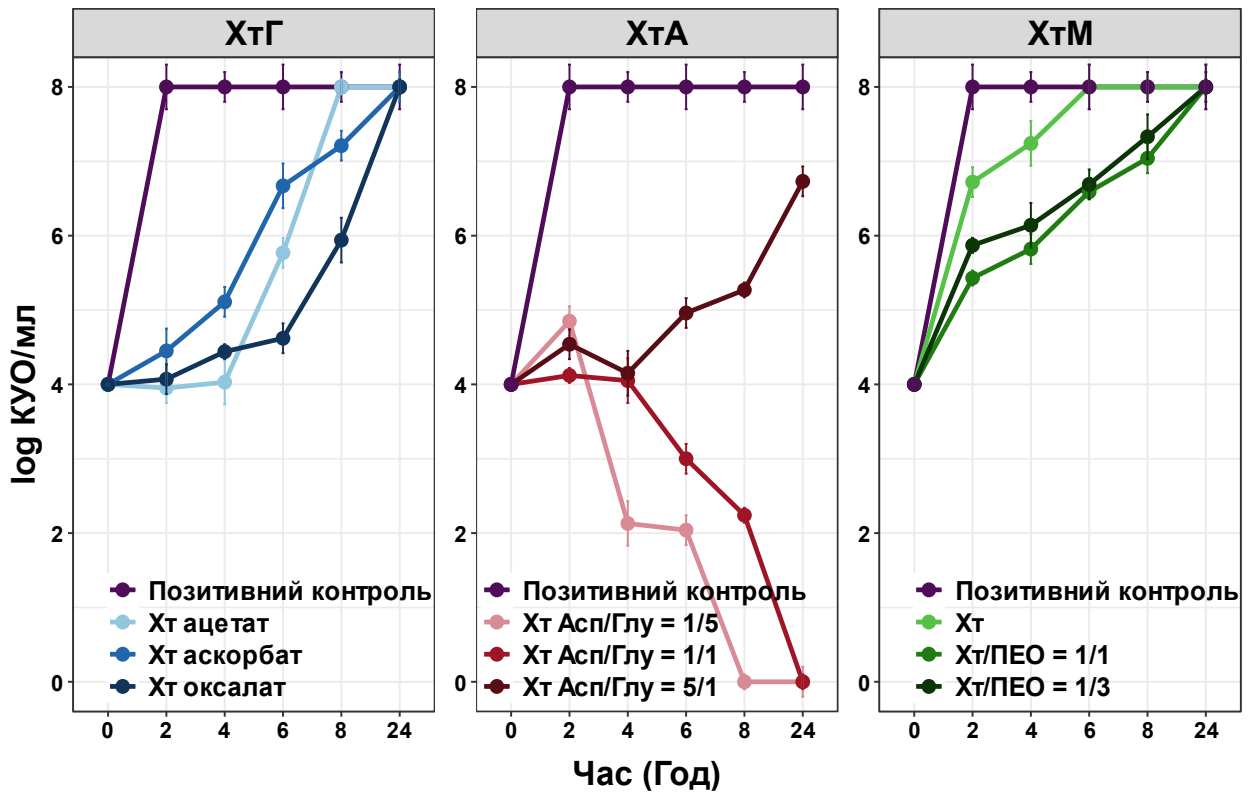


Рисунок 3.17 – Кількість життєздатних мікроорганізмів *E. coli* після інкубації з хітозановими матеріалами через різні проміжки часу.

Щодо грамнегативних бактерій *E. coli*, губки на основі хітозану показали незначну антибактеріальну активність. Затримка росту мікроорганізмів, які інкубували з Хт ацетатом та Хт аскорбатом, спостерігалася лише до 4 годин, потім відмічали різке збільшення кількості *E. coli*. Хт оксалат інгібував ріст до 6 годин ($p = 0,018$), кількість мікроорганізмів інкубованих із ним, за 8 годин дослідження відповідала позитивному контролю ($8,0 \log \text{ КУО/мл}$). Для Хт оксалату та Хт аскорбату цей рівень був зареєстрований на 24 годин дослідження.

Аерогелі на основі хітозану показали значно кращий результат. Хт Asp/Глу = 1/1 інгібував ріст *E. coli* впродовж 4 годин на рівні $4,05 (0,31) \log \text{ КУО/мл}$, а в подальшому концентрація мікроорганізмів знизилася нижче від вихідного рівня, і через 24 годин дослідження живі бактерії були відсутні ($p = 0,0001$). У зразках, що інкубувалися з Хт Asp/Глу = 5/1 і Хт Asp/Глу = 1/5, через 2 години відмічали збільшення

концентрації кишкової палички до 4,85 (0,28) log КУО/мл і 4,54 (0,23) log КУО/мл відповідно. Для Хт Асп/Глу = 5/1 на 4-ту годину дослідження кількість мікроорганізмів відповідала вихідному рівню, проте це був короточасний бактеріостатичний вплив, оскільки з 6 години експерименту концентрація мікроорганізмів почала зростати і на 24-ту годину дослідження досягла 6,73 (0,25) log КУО/мл. Хт Асп/Глу = 1/5, починаючи з 4 години дослідження, почав проявляти виражені антибактеріальні властивості – через 8 годин життєздатних мікроорганізмів виявлено не було ($p = 0,0001$).

Найбільш слабкий антибактеріальний вплив проявили Хт мембрани. Для всіх зразків було характерним поступове збільшення концентрації *E. coli*. Результати для зразків Хт з ПЕО відповідали позитивному контролю на 24 години дослідження, і починаючи з 6 годин інкубації не мали статистично значущих відмінностей між собою, тоді як чистий хітозан досягнув кількості 8,0 log КУО/мл через 6 годин експерименту.

3.2.2. Визначення цитотоксичності хітозанових скафолдів

Дослідження цитотоксичності ХтГ наведено на рисунку 3.18 продемонструвало відсоток редукції резазурину, що відображає кількість життєздатних клітин. Оцінювання адгезії клітин на перший день дослідження продемонструвало помірну адгезію для всіх видів губок. Близько 45 % клітин під час засівання прикріплювалися до досліджуваних зразків, що не мало статистично значущої відмінності ($p = 0,98$). На 3-тю добу дослідження найбільша проліферація клітин спостерігалася для Хт ацетату, редукція резазурину досягла 65,21 (7,24) %, що було достовірно більше від Хт аскорбату, де цей показник становив 50,08 (5,25) % ($p = 0,034$). Хт оксалат проявив помірну цитотоксичність, кількість життєздатних клітин утрічі зменшилася.

На 7-му добу дослідження лише Хт ацетат продемонстрував відсутність цитотоксичності та проліферативну активність. Рівень редукції резазурину

досяг 77,17 (5,27) %, що статично достовірно відрізнялося від решти зразків ($p = 0,0001$). Хт аскорбат проявив незначну цитотоксичність і значне зменшення кількості життєздатних клітин, рівень редукції резазурину становив 27,41 (4,73) %. Хт оксалат через 7 діб інкубації був абсолютно токсичний, на його поверхні життєздатні клітини були відсутніми.

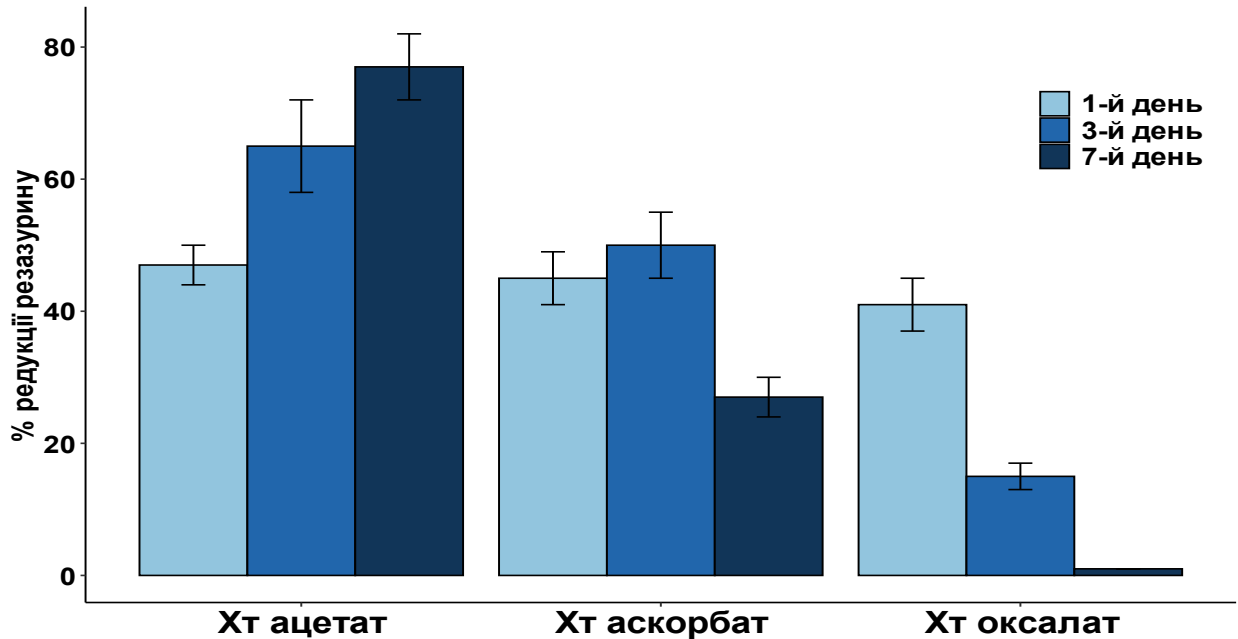


Рисунок 3.18 – Визначення цитотоксичності ХТГ за допомогою визначення рівня редукції резазурину за різні проміжки часу.

Флуоресцентна мікроскопія поверхні зразків ХТГ (рис. 3.19) із мезенхімальними стовбуровими клітинами відображає токсичний ефект Хт аскорбату та Хт оксалату.

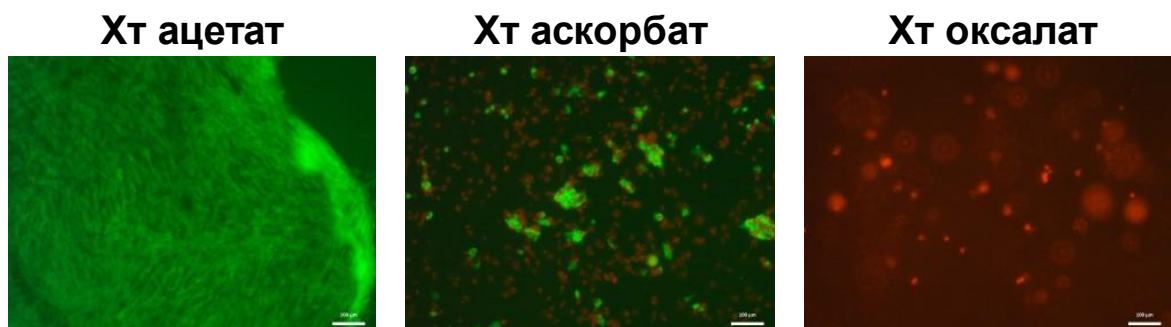


Рисунок 3.19 – Визначення життєздатності клітин на поверхні ХТГ за допомогою забарвлення PI (пропідію йодидом) та FDA (діацетатом флуоресцеїну) через 48 годин інкубації.

Через 48 годин інкубації з Хт оксалатом життєздатні клітини не були зареєстровані, тоді як на поверхні Хт аскорбату знаходилися практично в рівній кількості життєздатні та нежиттєздатні клітини. Хт ацетат продемонстрував як відсутність токсичності, так і проліферативну активність, за час дослідження клітини на його поверхні почали утворювати щільний моношар.

Усі зразки ХтА продемонстрували відсутність цитотоксичного впливу та помірну адгезію на перший день дослідження (рис. 3.20). Хт Асп/Глу = 1/1 показав достовірно більший ($p = 0,024$) відсоток редукції резазурину 55,82 (4,08) % порівняно із 47,92 (4,62) % для Хт Асп/Глу = 1/5 та 50,01 (5,36) % – для Хт Асп/Глу = 5/1.

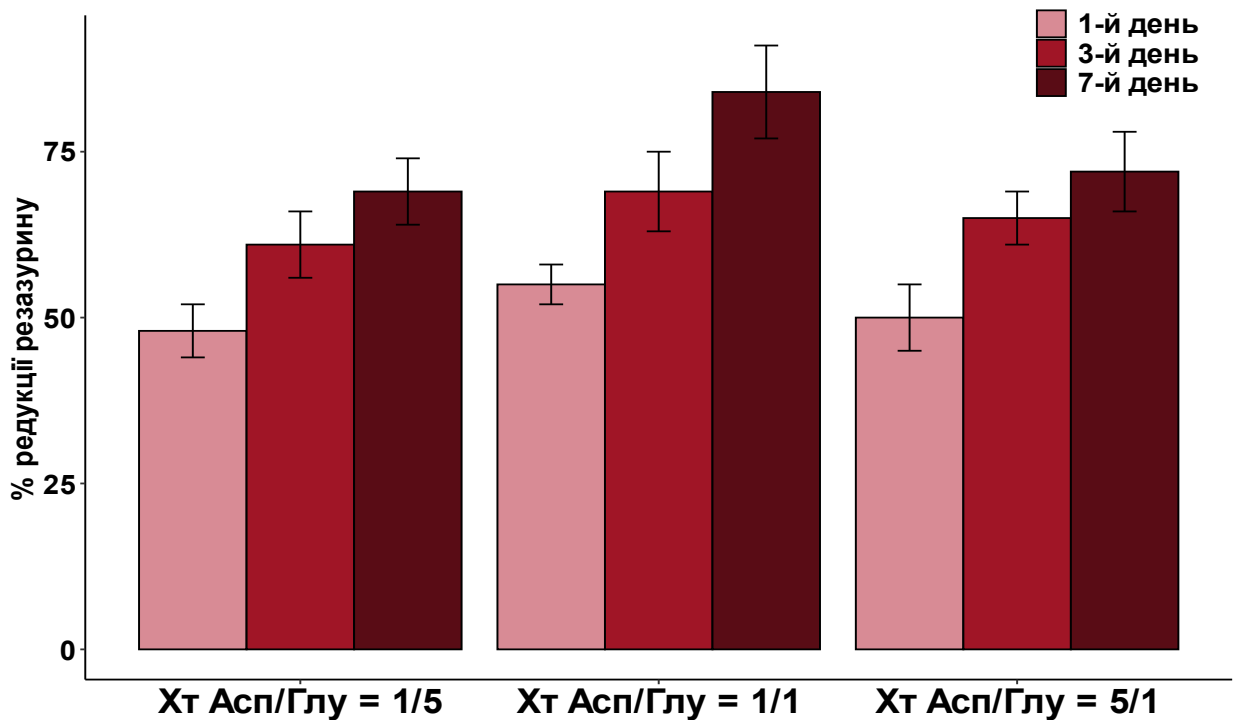


Рисунок 3.20 – Визначення цитотоксичності ХтА за допомогою визначення рівня редукції резазурину за різні проміжки часу.

На 3-тю добу експерименту на поверхні всіх ХтА відмічали значну проліферацію клітин. Найбільший рівень редукції резазурину 69,38 (6,15) % продемонстрував Хт Асп/Глу = 1/1, що було достовірно більше лише порівняно з Хт Асп/Глу = 1/5 з показником 61,31 (5,82)% ($p = 0,03$). Зразки

Хт Асп/Глу = 5/1 та Хт Асп/Глу = 1/5 не мали достовірних відмінностей між собою ($p = 0,39$). Клітини на поверхні Хт Асп/Глу = 1/5 поступово знижували швидкість проліферації і на 7-му добу дослідження редукція резазурину становила лише 68,75 (5,34) %. Хт Асп/Глу = 1/1 показав найвищу проліферативну активність, рівень редукції резазурину становив 84,58 (5,69) % і був достовірно вищим ($p = 0,012$) від решти зразків ХтА. Хт Асп/Глу = 5/1 проявив недостовірну вищу ($p = 0,32$) проліферацію клітин порівняно з Хт Асп/Глу = 1/5.

Мікрофото флуоресцентної мікроскопії зразків підтверджує відсутність токсичного впливу ХтА (рис. 3.21). Хт Асп/Глу = 1/1 та Хт Асп/Глу = 5/1 мали стимуляційний ефект на проліферацію клітин. Так, через 48 годин дослідження був практично сформований моношар клітин, тоді як ХтАсп/Глу = 1/5 мав лише окремі острівці проліферації.

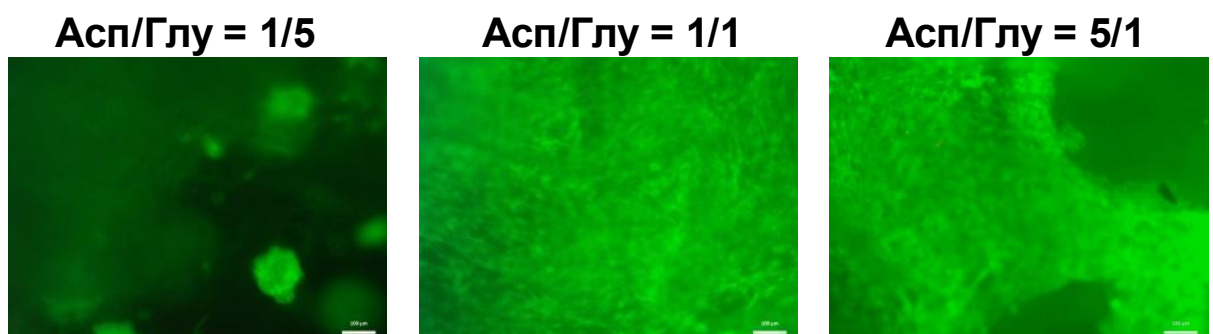


Рисунок 3.21 – Визначення життєздатності клітин на поверхні ХтА за допомогою забарвлення PI (пропідію йодидом) та FDA (діацетатом флуоресцеїну) через 48 годин інкубації.

Хт мембрани (рис. 3.22) на 1-й день дослідження не продемонстрували статистичних відмінностей адгезії між зразками ($p = 0,45$). Близько 50 % клітин прикріпилося до кожного скафолду. На 3-й день дослідження мембрани чистого Хт проявили цитотоксичну дію, проте ще були наявними життєздатні клітини, оскільки відсоток редукції резазурину становив 17,20 (2,31) % і був достовірно нижчим від інших мембран ($p = 0,004$).

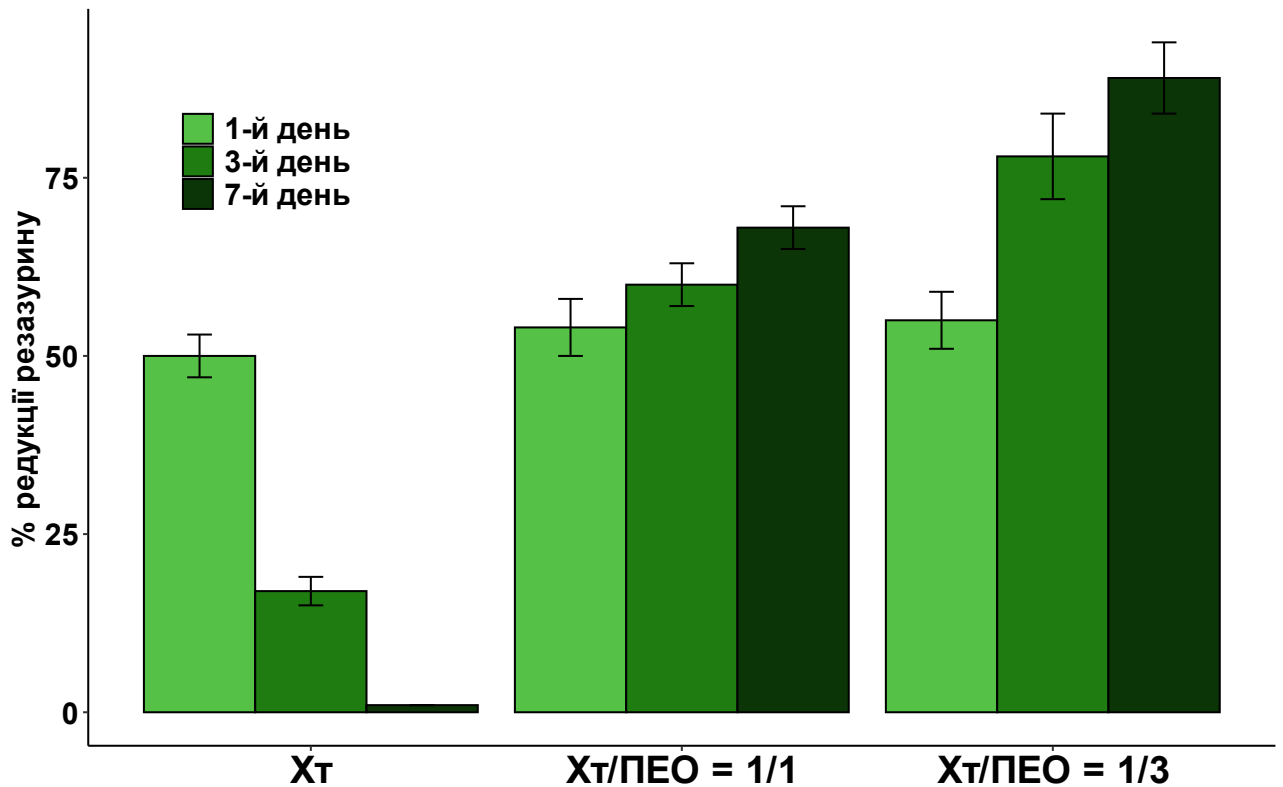


Рисунок 3.22 – Визначення цитотоксичності ХтМ за допомогою визначення рівня редукції резазурину за різні проміжки часу.

На поверхні зразків $Xт/ПЕО = 1/1$ і $Xт/ПЕО = 1/3$ кількість клітин була достовірно більшою порівняно з попереднім терміном ($p = 0,001$), редукція резазурину становила становила 60,34 (3,84) % та 78,57 (5,94) % відповідно. Через 7 днів від початку дослідження на поверхні чистого Хт не залишилося життєздатних клітин. $Xт/ПЕО = 1/1$ зберігав проліферативну активність, але рівень редукції резазурину досяг лише 68,18 (3,69) % і був достовірно меншим ($p = 0,032$) порівняно з $Xт/ПЕО = 1/3$. Редукція резазурину для $Xт/ПЕО = 1/3$ становила 89,22 (5,45) %, що було найвищим показником для зразків ХтМ.

Після 48 годин інкубації мезенхімальних стовбурових клітин на скафолдах чистого Хт (рис 3.23) флуоресцентна мікроскопія не виявила життєздатних клітин, що підтверджує токсичність цих зразків. Мембрани $Xт/ПЕО = 1/1$ не проявили цитотоксичного впливу, але практично не стимулював проліферації клітин. На поверхні зразка візуалізувалися лише поодинокі клітини та незначна кількість острівців проліферації. $Xт/ПЕО = 1/3$

не проявив токсичної дії і продемонстрував виражену стимуляцію проліферації клітин у вигляді щільного моношару.

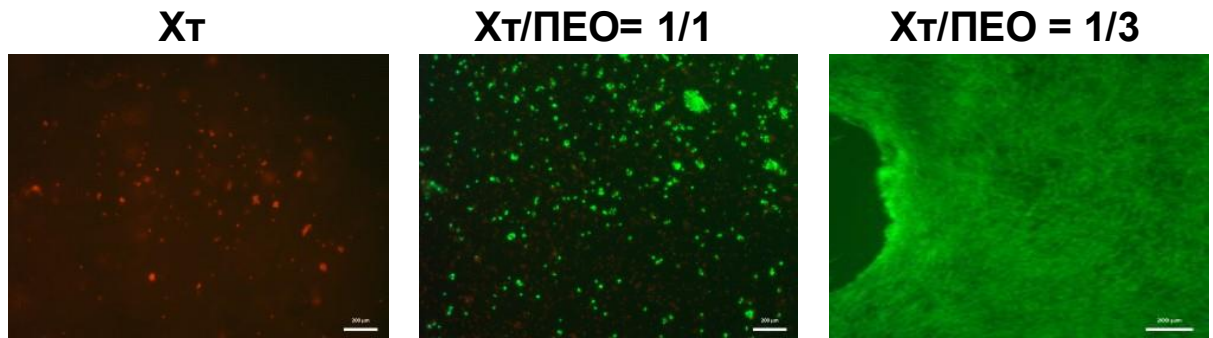


Рисунок 3.23 – Визначення життєздатності клітин на поверхні ХтМ за допомогою забарвленням PI (пропідію йодидом) та FDA (діацетатом флуоресцеїну) через 48 годин інкубації.

3.2.3. Дослідження взаємодії хітозанових кровоспинних матеріалів із кров'ю

Усі зразки Хт губок продемонстрували виражені сорбційні властивості (рис. 3.24). Вага Хт ацетату після експозицій із цільною кров'ю становила 1 490,15 (38,23) мг, що в 37 раз перевищували вихідну вагу та мала статистично значущу ($p = 0,041$) відмінність порівняно з іншими губками. Хт аскорбат продемонстрував найменшу сорбцію – 1 454,41 (30,71) мг, серед ХтГ, що також достовірно ($p = 0,043$) відрізнялася від Хт оксалату з вагою 1 477,69 (37,58) мг.

Хт аерогелі з середньою вагою групи 1 250,48 (43,21) мг у 31 раз збільшували свою вагу під час сорбції крові, проте статистично значущої відмінності між зразками не було ($p = 0,75$).

Серед Хт мембран найменшу сорбцію показав чистий Хт із показником 1 153,92 (47,28) мг. Додавання ПЕО збільшувало сорбційну здатність зразків. Так вага Хт/ПЕО = 1/1 була 1 203,42 (39,51), а найкращу сорбцію крові продемонструвала мембрана Хт/ПЕО = 1/3 з вагою 1 220,13 (40,28) мг. Усі зразки мембран мали достовірні відмінності між собою ($p = 0,037$).

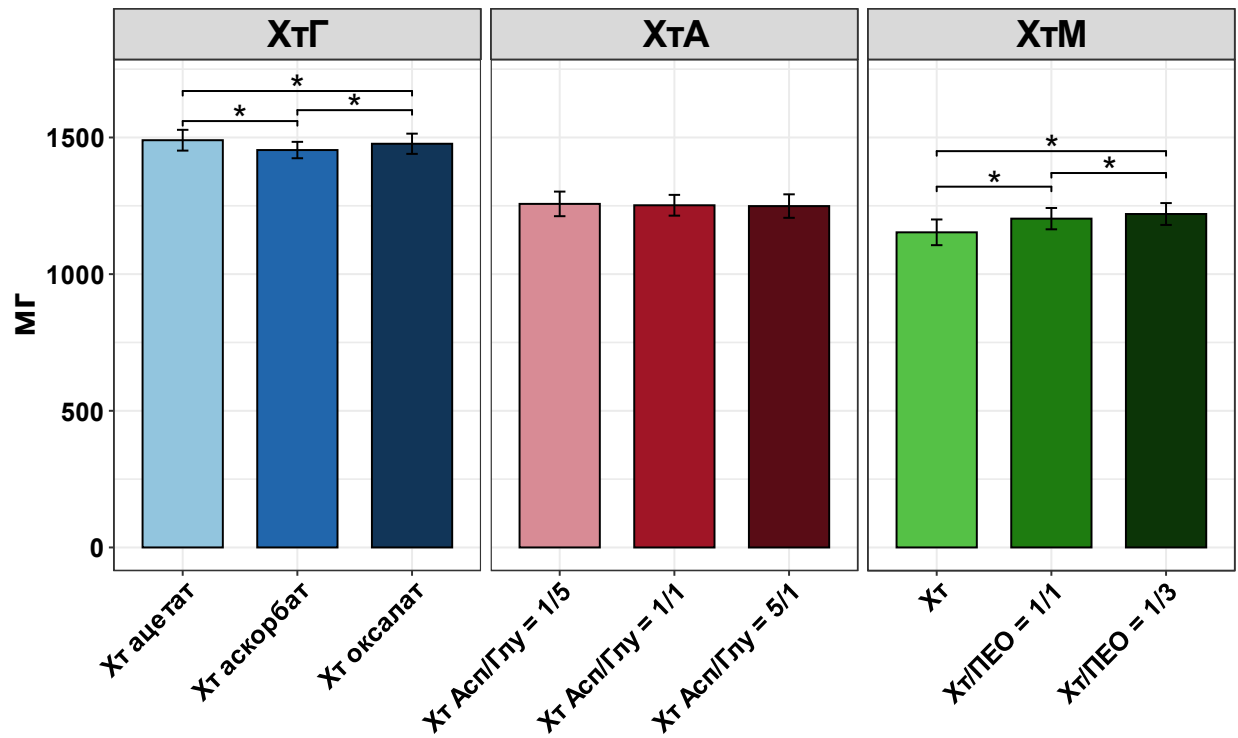


Рисунок 3.24 – Сорбційна здатність хітозанових матеріалів під час взаємодії з кров'ю.

Визначення клінічних показників крові в досліджуваній крові після експозиції із зразками хітозану показало, що кількість еритроцитів та гемоглобіну порівняно з цільною кров'ю була дещо знижена, проте не мала статистично значущої відмінності (табл. 3.1).

Таблиця 3.1

Показники крові у вакутайнері після взаємодії з хітозановими матеріалами.

	Гемоглобін, г/л (p = 0,77)	Еритроцити, x10⁹/л (p = 0,82)
1	2	3
Цільна кров	143,21 (2,44)	5,14 (0,25)
Хт ацетат	141,67 (2,15)	4,97 (0,41)

Продовження таблиці 3.1

1	2	3
Хт аскорбат	142,39 (2,36)	5,05 (0,33)
Хт оксалат	141,48 (2,75)	5,0 (0,27)
Хт Асп/Глу = 1/5	140,32 (2,54)	5,08 (0,28)
Хт Асп/Глу = 1/1	142,68 (1,77)	4,94 (0,33)
Хт Асп/Глу = 5/1	141,59 (3,18)	5,10 (0,19)
Хт	142,47 (2,36)	5,06 (0,32)
Хт/ ПЕО = 1/1	142,40 (2,82)	5,01 (0,22)
Хт/ ПЕО = 1/3	140,81 (2,41)	4,81 (0,24)

Експериментальні гемостатичні матеріали всіх груп достовірно зменшували кількість тромбоцитів (рис. 3.25) у досліджуваній крові ($p = 0,0001$). Зразки Хт губок не мали значущої відмінності між собою ($p = 0,097$). Серед Хт аерогелів найнижчий рівень тромбоцитів продемонстрував Хт Асп/Глу = 1/1 – 100,28 (7,34) г/л, що істотно відрізнявся від інших аерогелів ($p = 0,012$). Рівень тромбоцитів для Хт Асп/Глу = 1/5 з показником 104,73 (9,21) г/л був нижчим порівняно з Хт Асп/Глу = 5/1, що становив 109,38 (6,29) г/л, проте ця відмінність не мала статистичної значущості ($p = 0,075$). Найбільше зниження тромбоцитів із групи Хт мембран показав Хт/ПЕО = 1/3 з показником 108,52 (7,43) г/л, що мало статистично значущу відмінність порівняно з іншими мембранами ($p = 0,019$). Кількість

тромбоцитів чистого ХТ – 117,45 (9,32) г/л, та ХТ/ПЕО = 1/1 – 115,58 (5,62) г/л, не мала достовірної відмінності між собою ($p = 0,81$).

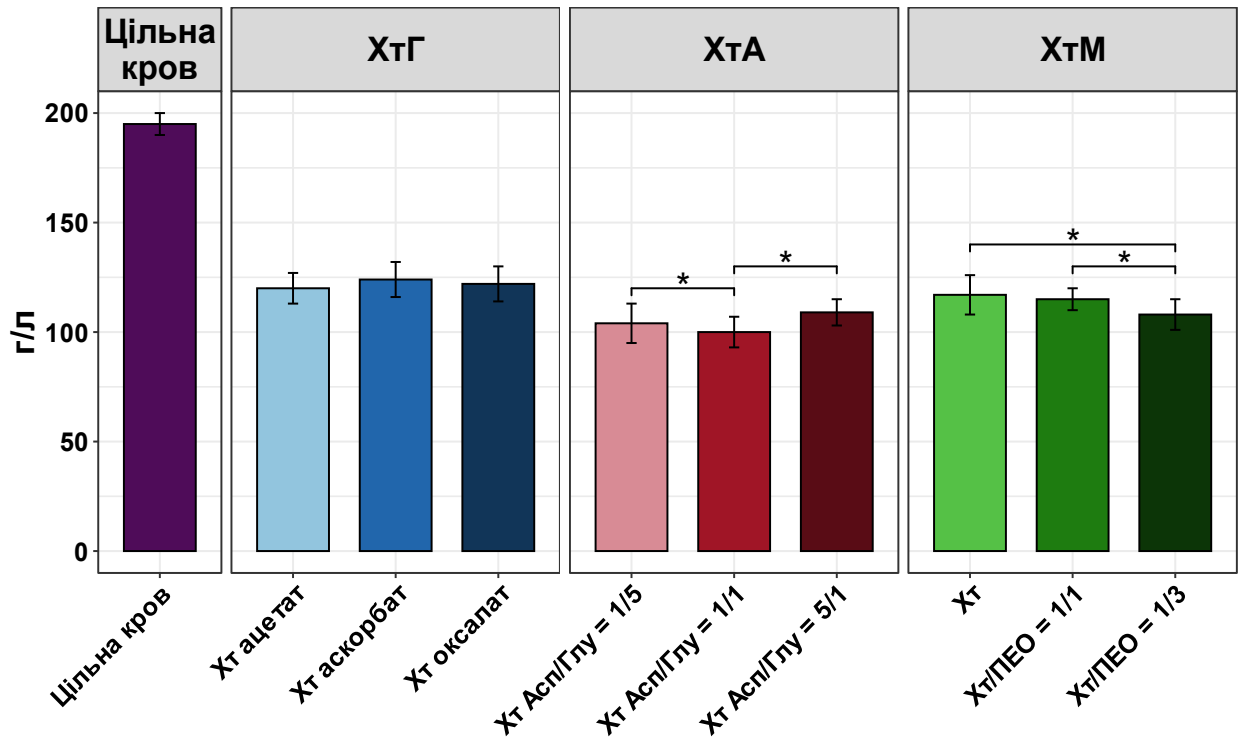


Рисунок 3.25 – Кількість тромбоцитів у досліджуваній крові після взаємодії з хітозановими матеріалами порівняно з цільною кров'ю. Усі досліджувані зразки мали статистично менші показники порівняно з цільною кров'ю ($p = 0,001$).

Взаємодія з хітозановими матеріалами збільшувала відносну ширину розподілу тромбоцитів (рис. 3.26) для всіх досліджуваних зразків порівняно з цільною кров'ю. Цей показник був дещо більшим для ХТ ацетату – 15,41 (1,58) %, серед ХТ губок та ХТ Асп/Глу = 1/1 з результатом 16,67 (1,82) % серед ХТ аерогелів, проте ці відмінності не мали статистичної значущості ($p = 0,071$). У групі ХТ мембран найбільше збільшення відносної ширини розподілу тромбоцитів продемонстрував ХТ/ПЕО = 1/3 з показником 17,18 (1,12) %, що мало достовірну відмінність лише порівняно з чистим ХТ ($p = 0,036$). Порівняння ХТ/ПЕО = 1/3 з ХТ/ПЕО = 1/1 та чистого ХТ із ХТ/ПЕО = 1/1 не виявило статистично значущих відмінностей ($p = 0,078$).

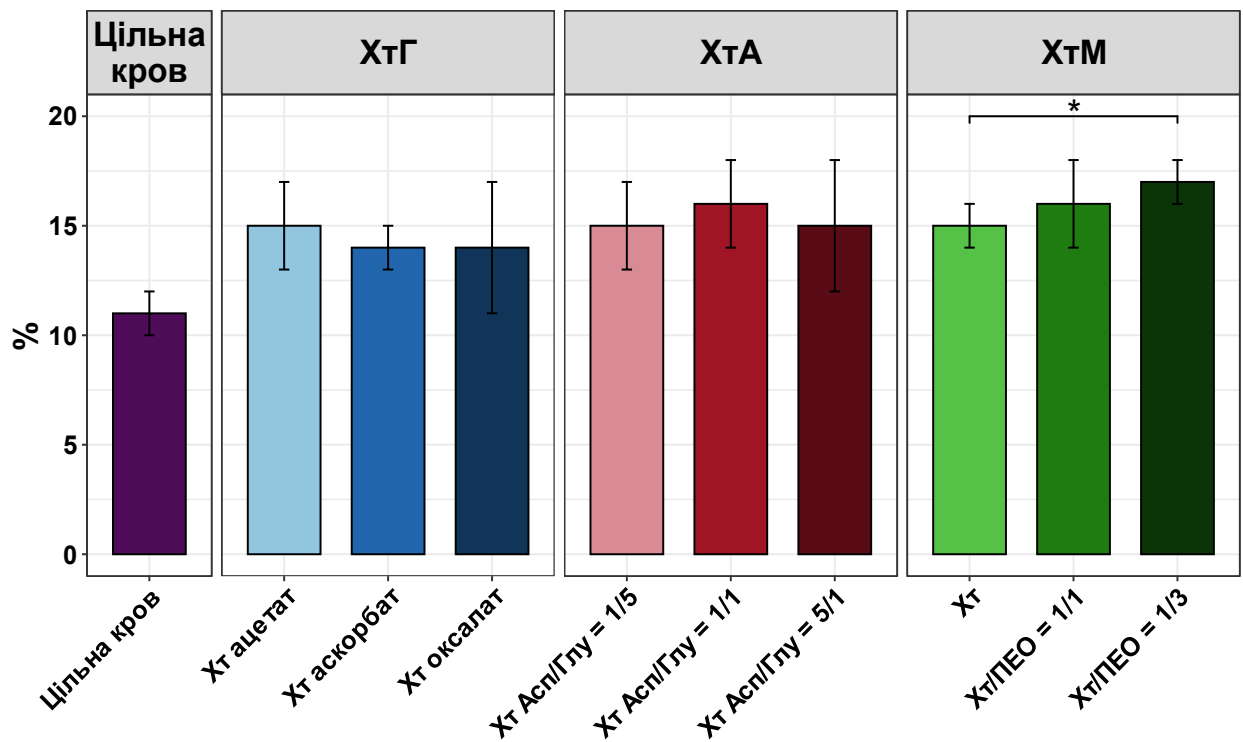


Рисунок 3.26 – Відносна ширина розподілу тромбоцитів за об'ємом у досліджуваній крові після взаємодії з хітозановими матеріалами порівняно з цільною кров'ю. Усі досліджувані зразки мали статистично більші показники порівняно з цільною кров'ю ($p = 0,001$).

Середній об'єм тромбоцитів (рис. 3.27) у досліджуваній крові серед Хт губок був достовірно більшим ($p = 0,025$) лише для Хт ацетату (13,07 (0,77) фл), як порівняно з цільною кров'ю, так і щодо інших Хт губок ($p = 0,041$). Показники об'єму тромбоцитів для Хт аскорбату – 10,94 (1,12) фл та Хт оксалату – 12,05 (0,84) фл не мали достовірної різниці між собою ($p = 0,088$), але були вищими порівняно з цільною кров'ю, і відмінність не мала статистичної значущості ($p = 0,083$). Після взаємодії зі зразками Хт аерогелів середній об'єм тромбоцитів був достовірно вищим від контролю ($p = 0,023$). Між собою зразки не мали істотних відмінностей ($p = 0,037$). У досліджуваній крові після експозиції з Хт мембранами середній об'єм тромбоцитів мав достовірно вищі показники порівняно з цільною кров'ю. Значення чистого Хт (13,23 (1,15) фл) та Хт/ПЕО = 1/1 (15,17 (1,21) фл) не мали статистично

значущої відмінності між собою ($p = 0,081$), тоді як Хт/ПЕО = 1/3 продемонстрував достовірно вищий ($p = 0,03$) показник (16,25 (0,98) фл) порівняно з чистим Хт.

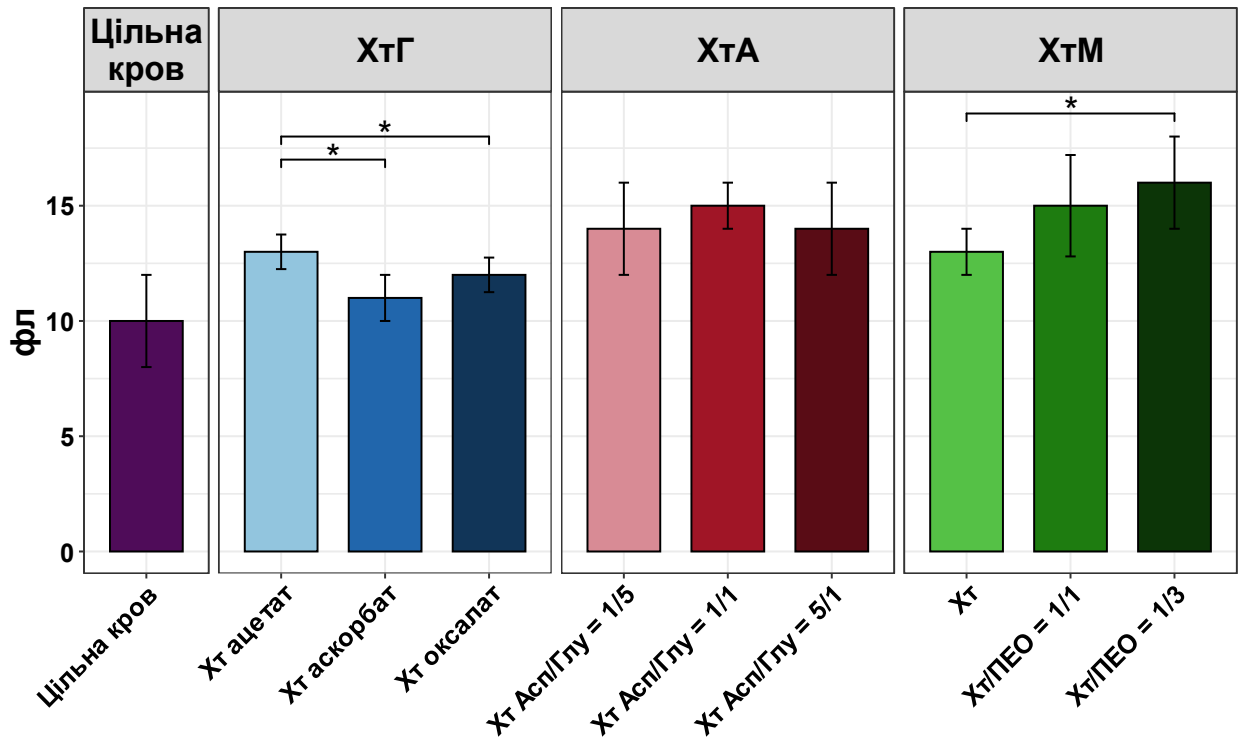


Рисунок 3.27 – Середній об’єм тромбоцитів у досліджуваній крові після взаємодії з хітозановими матеріалами порівняно з цільною кров’ю.

Показники системи згортання крові, такі як фібриноген, протромбіновий індекс, протромбіновий час, міжнародне нормалізоване співвідношення та активований частковий тромбопластиновий час після взаємодії цільної крові з Хт зразками (табл. 3.2), не мали суттєвих відхилень від норми. Порівняно з цільною кров’ю, а також між собою групи не мали статистично значущих відмінностей ($p > 0,05$). Це може свідчити про те, що хітозанові матеріали за механізмом здатні проявляти лише місцеву кровоспинну дію, прискорюючи судинно-тромбоцитарний гемостаз, і не мають системних ефектів та не впливають на коагуляційний гемостаз, що розширює спектр їх застосування та зменшує кількість небажаних ефектів.

Таблиця 3.2

Показники системи згортання крові у вакутайнері після взаємодії з хітозановими матеріалами.

	Фібриноген (г/л)	Протром- біновий час (с)	Протром- біновий індекс (%)	Міжнародне нормалізоване співвідношення	Активованій частковий тромбо- пластиновий час (с)
Цільна кров	3,31 (0,24)	10,21 (1,51)	101,22 (1,53)	1,12 (0,05)	28,62 (0,51)
ХТ ацетат	3,17 (0,19)	10,09 (0,93)	102,14 (1,17)	1,18 (0,09)	29,34 (0,55)
ХТ аскорбат	3,24 (0,23)	10,22 (1,16)	101,32 (1,44)	1,14 (0,07)	29,54 (0,50)
ХТ оксалат	3,27 (0,25)	9,86 (0,86)	100,69 (1,48)	1,12 (0,05)	28,16 (0,53)
ХТ Асп/Глу = 1/5	3,44 (0,24)	9,26 (0,53)	101,92 (1,23)	1,12 (0,07)	28,92 (0,44)
ХТ Асп/Глу = 1/1	3,18 (0,28)	9,64 (1,28)	103,25 (1,15)	1,05 (0,02)	29,71 (0,49)
ХТ Асп/Глу = 5/1	3,32 (0,25)	10,05 (1,05)	102,42 (1,36)	1,13 (0,03)	28,55 (0,5)
ХТ	3,26 (0,23)	10,28 (0,73)	101,55 (1,37)	1,19 (0,07)	29,02 (0,52)
ХТ/ ПЕО = 1/1	3,40 (0,27)	10,18 (1,24)	101,73 (1,51)	1,12 (0,05)	29,37 (0,48)
ХТ/ ПЕО = 1/3	3,28 (0,24)	9,65 (1,12)	102,31 (1,24)	1,14 (0,07)	28,73 (0,42)

3.3. Оцінювання ефективності на моделі травми печінки щурів

Дослідження фізико-хімічних, структурних та біологічних властивостей хітозанових гемостатичних матеріалів показало, що найбільш ефективним та нетоксичним серед Хт губок був Хт ацетат, серед Хт аерогелів – Хт Асп/Глу = 1/1 і серед Хт мембран – Хт/ПЕО = 1/3. Саме ці зразки були відібрані для подальшого дослідження *in vivo*.

3.3.1. Визначення ефективності та швидкості припинення експериментальної паренхіматозної кровотечі

Після застосування пластини Тахокомб та Хт матеріалів летальних випадків серед лабораторних тварин не було, паренхіматозна печінкова кровотеча була припинена в 100 % випадків. У додатковій кількості місцевого гемостатичного матеріалу чи його повторному застосуванні потреба не виникла. Найшвидше кровотеча була припинена після застосування пластини Тахокомб – 78,82 (5,85) с (рис. 3.28).

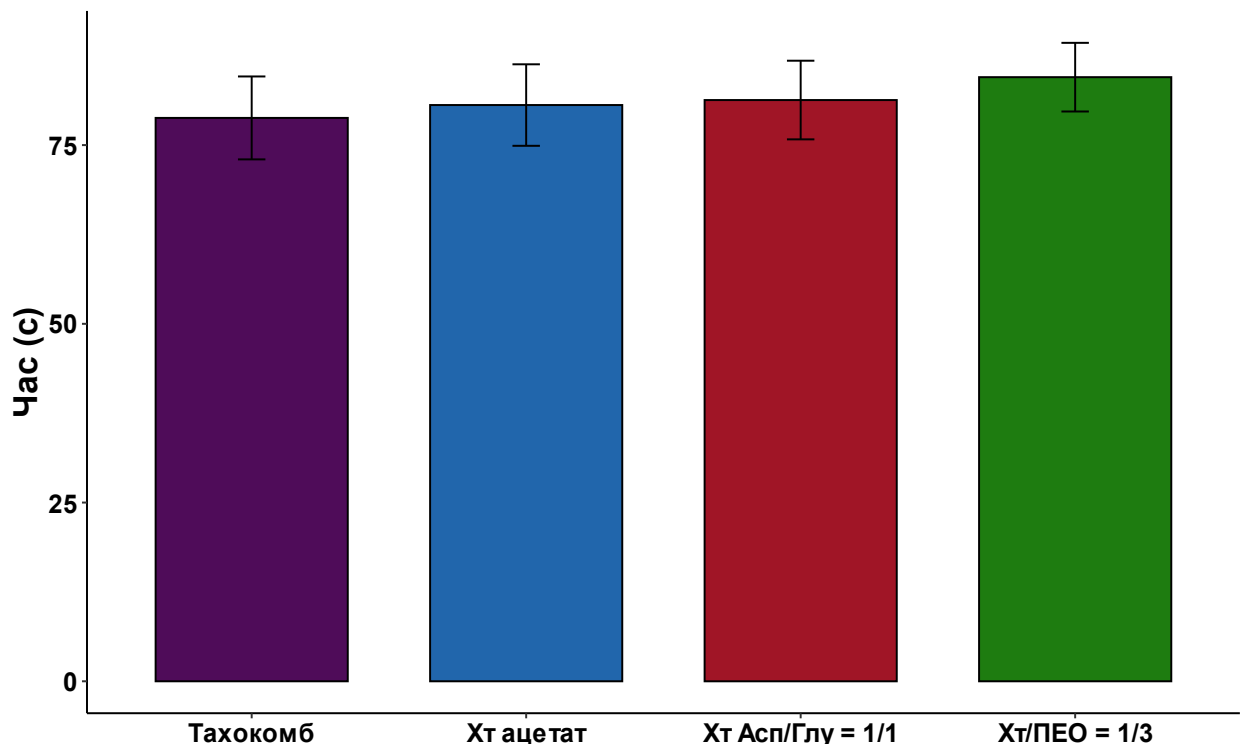


Рисунок 3.28 – Час припинення експериментальної паренхіматозної кровотечі за допомогою застосування місцевих гемостатичних матеріалів.

Найбільше часу для досягнення надійного гемостазу знадобилося в разі застосування Хт мембрани – 84,55 (4,84) с. Проте між усіма зразками місцевих гемостатичних матеріалів не було статистично значущої відмінності ($p = 0,083$). Дві тварини (одна з групи порівняння, друга – з групи Хт аерогелю) мали ускладнення у вигляді запалення в ділянці післяопераційного шва. У обох випадках запальний процес був обмежений м'якими тканинами передньої черевної стінки і не проникав в черевну порожнину щурів.

3.3.2. Оцінювання спайкового процесу в черевній порожнині щурів після застосування місцевих гемостатичних матеріалів

Дослідження поширеності та вираженості спайкового процесу в черевній порожнині лабораторних щурів (табл. 3.3) продемонструвало, що на 7-му добу дослідження спайки були наявними лише в групі, де кровотечу припинення використовуючи пластини Тахокомб – у 1-ї тварини (14,29 %) та Хт ацетат – у 2-х тварин (28,57 %) у лабораторних тварин. Медіана перитонеального індексу адгезії (ПІА) за групами становила 3,0 і 5,5 балів відповідно.

Таблиця 3.3

Перитонеальний індекс адгезії щурів у різні строки після застосування місцевих гемостатичних матеріалів

	Кількість щурів (%) / ПІА (бали)		
	7-ма доба	30-та доба	60-та доба
Тахокомб	14,29/3,0	28,57/7,0	28,57/12,5
Хт ацетат	28,57/5,5	28,57/7,5	42,85/12,3
Хт Асп/Глу = 1/1	0	14,29/6,0	28,57/11,0
Хт/ПЕО = 1/3	0	14,29/5,0	14, 29/8,0

На 30-ту добу дослідження спайки виявляли в усіх групах щурів. Проте найбільш значні спайки були виражені в групі Тахокомбу (2-і тварини (28,57 %) і 7,0 бала ППА), а також у групі Хт ацетату (2-і тварини (28,57 %) і 7,5 бала ППА). Помірно виражений спайковий процес спостерігався в разі застосуванні Хт/ПЕО = 1/3 (1-на тварина (14,29 %) і 6,0 бала ППА) та Хт Асп/Глу = 1/1 – 1-а тварина (14,29 %) зі спайками в черевній порожнині, але ППА був 5,0 бала, найменший серед усіх зразків. Через 60 діб спостереження найбільш виражений спайковий процес визначався у Хт ацетату – 3 тварини (42,85 %) та 12,3 бала ППА. Групи Тахокомбу та Хт Асп/Глу = 1/1 мали по 2 тварини з спайковими ускладненнями (28,57 %), але Хт Асп/Глу = 1/1 мав менший ППА – 11,0 бала, порівняно з 12,5 бала в Тахокомбу. Найменша кількість спайок через 60 діб дослідження спостерігалась у Хт/ПЕО = 1/3 – 1 тварина (14,3 %) та 8,0 балів ППА.

Для 7-ї доби дослідження були характерні пливчасті пухкі спайки, що досить легко роз'єднувалися (рис. 3.29). Вони знаходились між органами краніальної частини черевної порожнини щурів, переважно в епігастрії (локалізація нанесеної травми печінки), та обох підребер'ях.

Через 30 діб дослідження у щурів сформувалися більш щільні, фіброзні спайки у вигляді мембран або шварт, більшість із яких знаходилися також у краніальній частині черевної порожнини, проте в групі Тахокомбу з'являлися спайки і в інших ділянках. У 75 % спайки з'єднували діафрагмальну поверхню печінки з черевною стінкою, у 25 % – вісцеральну поверхню печінки із шлунком та кишечником. У поодиноких випадках адгезія відбувалася між частками печінки та великим чепцем.

На 60-ту добу експерименту всі наявні спайки мали фіброзну міцність та хорошу васкуляризацію, що викликало труднощі при їх розділенні. Локалізація та поширеність спайок практично збігалася з попереднім терміном і не поширювалась на інші ділянки черевної порожнини.

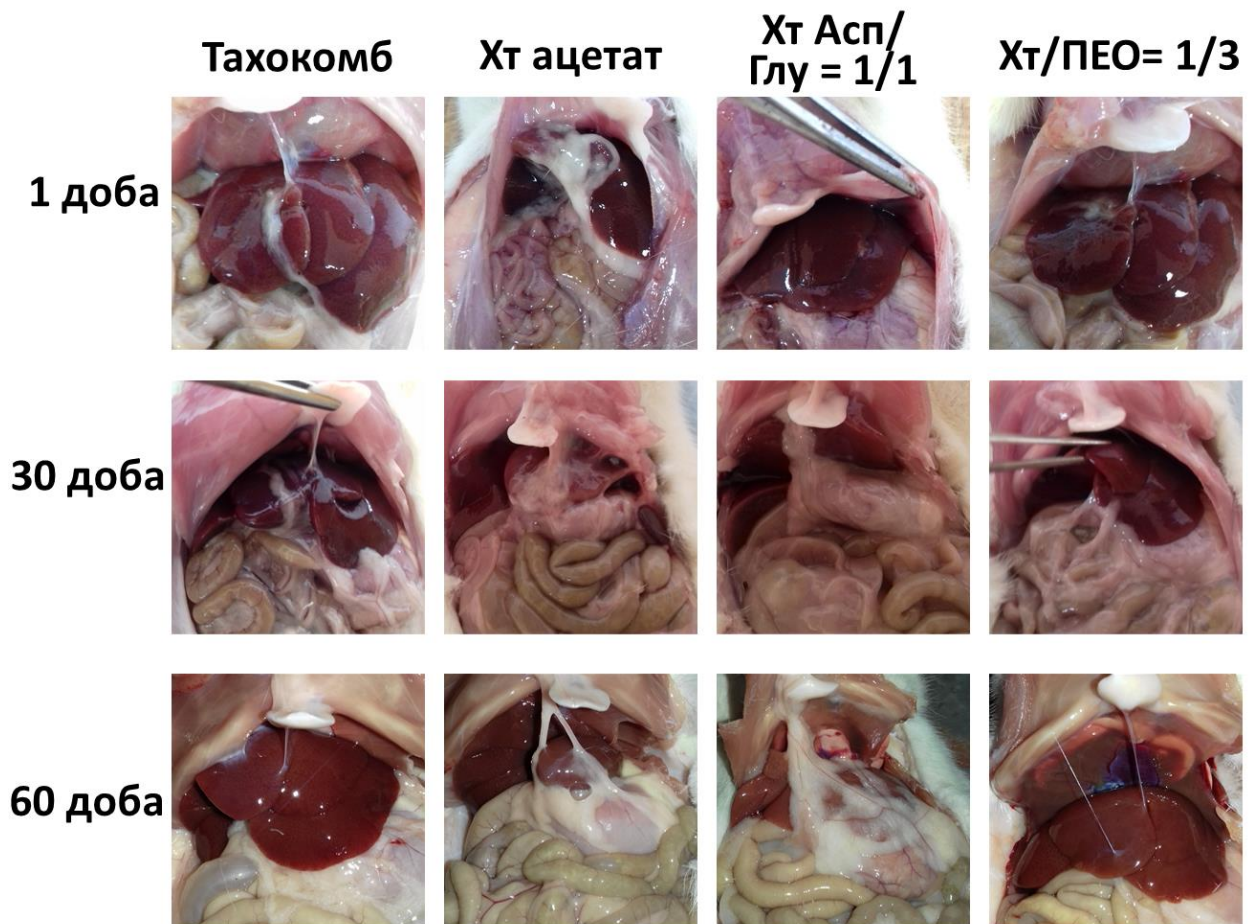


Рисунок 3.29 – Спайковий процес у черевній порожнині лабораторних щурів після застосування місцевих гемостатичних матеріалів.

3.3.3 Морфологічна характеристика закриття ран печінки після застосування Тахокомбу

Тахокомб як зареєстрований місцевий гемостатичний матеріал, широко використовуваний у клінічній практиці, був обраний для припинення паренхіматозної кровотечі в групі порівняння лабораторних тварин. На 7-му добу дослідження площа дефекту печінки становила 6,60 (0,13) мм², тоді як площа мембрани Тахокомб у дефекті досягала 3,40 (0,14) мм² (рис. 3.30). Проміжки між сіткою БМ були заповнені трансудатом та фібриновими згустками з незначною кількістю лейкоцитів, включаючи поодинокі нейтрофіли та макрофаги. Спостерігаються поодинокі контакти клітин із фрагментами БМ, але більшість поверхні БМ була вільною та мала лише

поодинокі ділянки фрагментації. Ступінь фрагментації згідно зі шкалою оцінювали як слабкий із показником 0,91 (0,06). Загалом Тахокомб на 7-му добу зберігав свою гомогенну структуру, за винятком декількох периферичних зон. В інтактній печінковій паренхімі спостерігалися стаз у кровоносних судинах, ділянки помірного інтерстиціального набряку та значна кількість дво- і багатоядерних гепатоцитів – 23,34 (4,56) % від усіх клітин перикапсулярної зони.

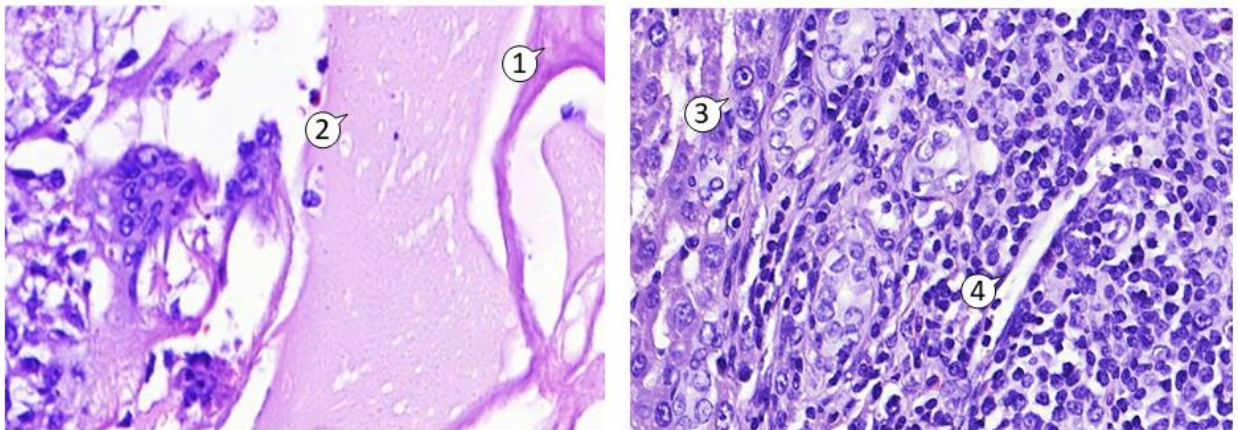


Рисунок 3.30 – Фрагмент паренхіми печінки щура на 7-му добу після застосування Тахокомбу. Забарвлення гематоксилін-еозином. Збільшення $\times 400$. Позначення: 1 – Тахокомб; 2 – фібриновий згусток; 3 – двоядерні гепатоцити; 4 – ендотеліальні клітини.

У верхній частині «ніші» відмічали тонкий шар набряклої сполучної тканини, що складалася з рідких волокон із численними судинами та тучними клітинами й повністю відмежовувала БМ від органів черевної порожнини. З боку паренхіми печінки навколо БМ розміщувалася капсула товщиною 363,51 (38,7) мкм. Для ідентифікації волокон, і яких складалася капсула використовували забарвлення за Гоморі (рис. 3.31 а) для візуалізації ретикулярних волокон, а також забарвлення за Массоном (рис. 3.31 б) – для виявлення колагенових волокон. Капсула складалася переважно з густої сітки ретикулярних волокон, по периферії розміщувалася незначна кількість колагенових волокон.

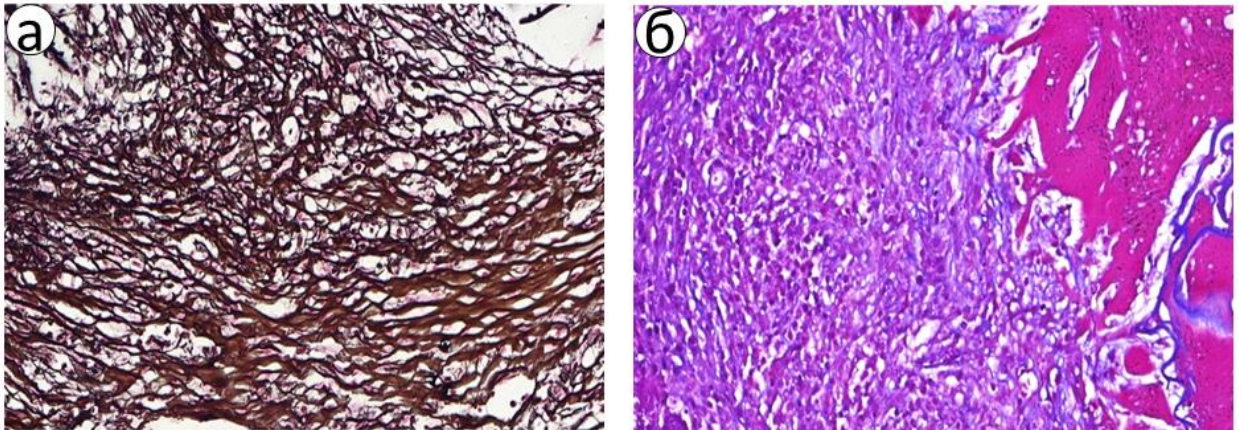


Рисунок 3.31 – Фрагмент капсули навколо БМ на 7 добу після застосування Тахокомбу: а – забарвлення по Гоморі, збільшення $\times 200$; б – трихромне забарвлення по Массону, збільшення $\times 200$.

Усі волокна були пухко упаковані (0,73 (0,05) бала для ретикулярних волокон та 0,88 (0,09) бала для колагенових волокон) з великою кількістю лімфоїдних і фібробластоподібних клітин. На зовнішньому шарі капсули, що контактує з інтактною печінковою паренхімою, були скупчення щільно розміщених, дрібних епітеліоїдних клітин, які утворювали трубчасті структури. Між БМ і капсулою лише в деяких ділянках спостерігалось незначне вrostання сполучної тканини з фібробластоподібними клітинами в товщу пластини Тахокомб. На периферії БМ у ділянках, що підлягали фрагментуванню, спостерігалась помірна кількість мастоцитів – 15,0 (2,18) кл/мм², що перебували в тісному контакті зі структурами гемостатичного матеріалу (рис 3.32 а).

ІГХ дослідження з використанням антитіл до alpha-SMA (рис 3.32 б) продемонструвало, що між сполучнотканинними компонентами капсули навколо БМ знаходилась велика кількість позитивних α -SMA міофібробластів, що значно переважали над поліморфноядерними нейтрофілами. Кількість міофібробластів оцінювали, як значну – 2,73 (0,23) бала. В інтактній паренхімі печінки реєструвалися лише поодинокі α -SMA-позитивні клітини, що відповідає наявності зірчастих клітин.

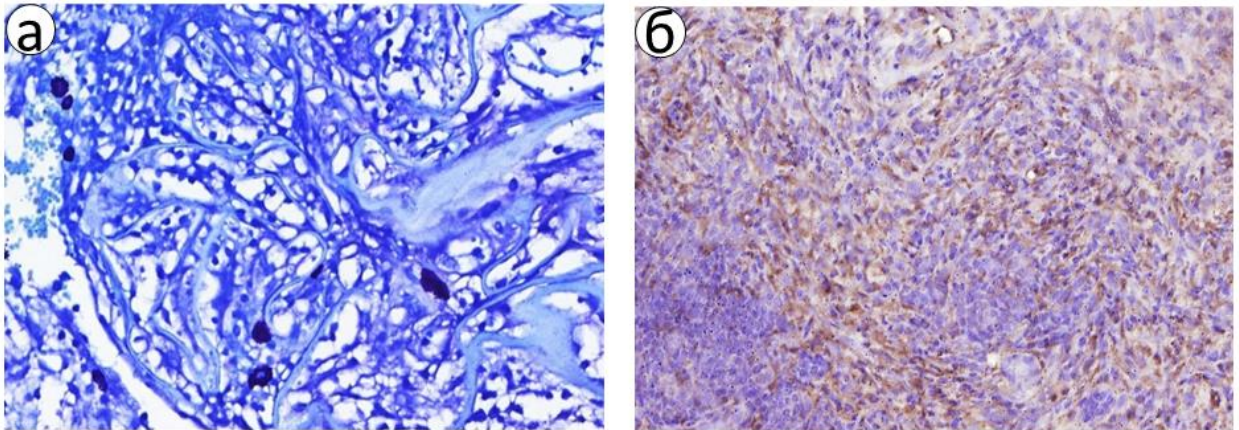


Рисунок 3.32 – Фрагмент капсули печінки щура на 7-му добу після застосування Тахокомбу: а – забарвлення толуїдиновим синім, збільшення $\times 400$; б – ІГХ дослідження експресії до alpha-SMA, збільшення $\times 200$.

Оцінювання проліферації клітин за допомогою ІГХ дослідження з використанням антитіл до Ki-67 (рис. 3.33) виявило високу щільність позитивних клітин переважно на межі паренхіми печінки та капсули, а також у самій капсулі навколо БМ. Індекс проліферації Ki-67 позитивно забарвлених клітин становив 31,45 (4,59) %, що оцінювалось, як сильно виражена позитивна реакція.

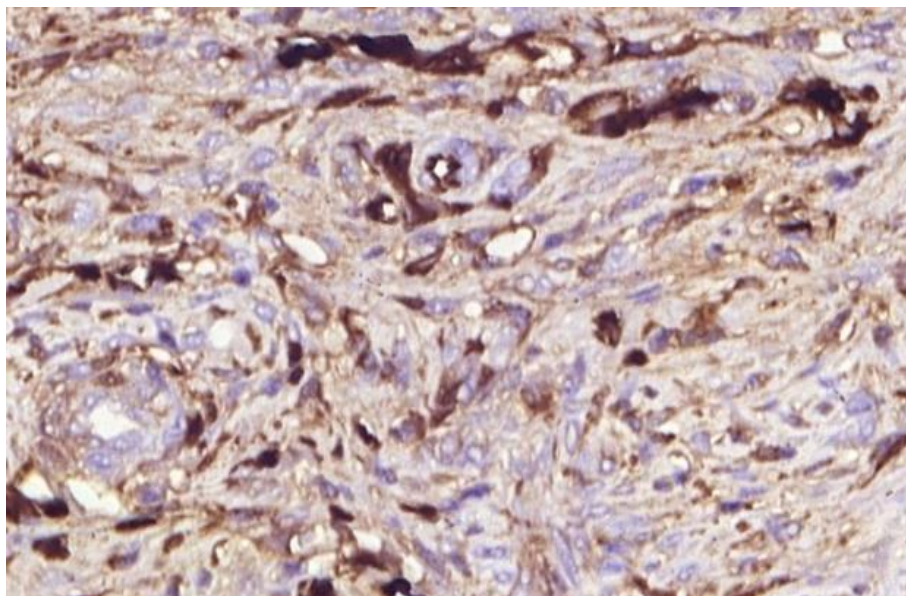


Рисунок 3.33 – Фрагмент печінки щура на 7-му добу після застосування Тахокомбу. ІГХ дослідження експресії Ki-67. Збільшення $\times 400$.

Визначення кількості M1-типу та M2-типу макрофагів проводили за допомогою ІГХ дослідження з використанням антитіл до рецепторів CD68 та CD163 (рис. 3.34). Імунні клітини були представлені переважно в капсулі численними макрофагами M2-типу CD163 (240,73 (11,93) кл/мм²), що значно перевищувало кількість CD68 (114,43 (10,42) кл/мм²). Співвідношення CD68/CD163 становило 0,48 (0,04), що демонструє переважання протизапального типу макрофагів.

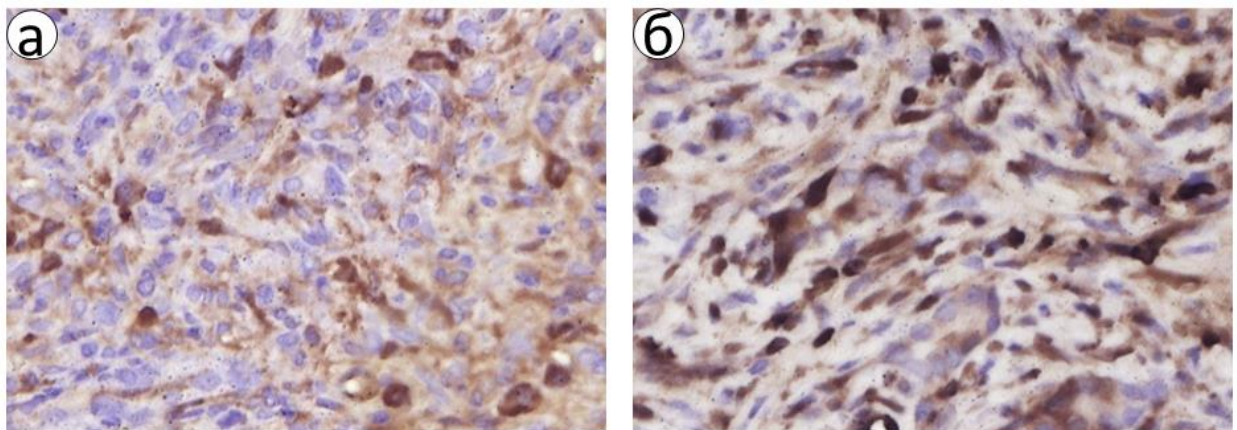


Рисунок 3.34 – Фрагмент печінки щура на 7-му добу після застосування Тахокомбу. ІГХ дослідження експресії: а – CD68; б – CD163. Збільшення $\times 400$.

Кількість цитотоксичних і регуляторних Т-лімфоцитів оцінювали за допомогою ІГХ дослідження, використовуючи антитіла до CD8 та FOXP3 відповідно (рис. 3.35 а, б). CD8- і FOXP3-позитивні клітини були розміщені переважно на межі капсули та інтактної паренхіми печінки й мали тісні контакти з мережею ретикулярних і колагенових волокон. Цитотоксичні Т-лімфоцити були представлені окремими групами нерівномірно розподілених клітин загальною кількістю 107,55 (12,15) кл/мм². Т-регуляторні клітини більш рівномірно розподілялися по периферії капсули та в прилеглий печінковій паренхімі, їх кількість була 149,9 (8,02) кл/мм², переважала цитотоксичні Т-лімфоцити, що мало протизапальне співвідношення CD8/FOXP3-позитивних клітин, що становило 0,73 (0,08). Загальна кількість Т-лімфоцитів вказувала на активну імунну реакцію.

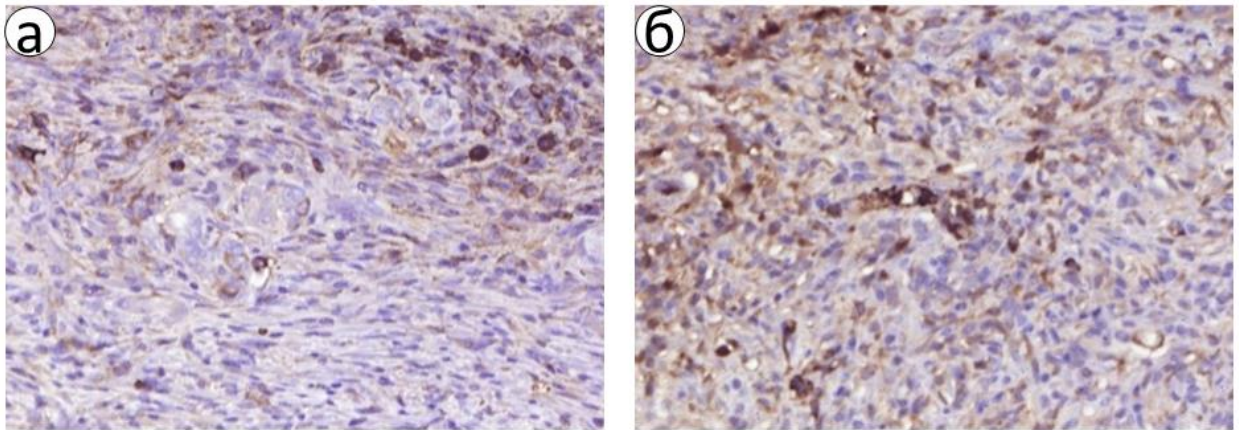


Рисунок 3.35 – Фрагмент печінки щура на 7-му добу після застосування Тахокомбу. ІГХ дослідження експресії: а – CD8; б – FOXP3. Збільшення $\times 400$.

На 30-ту добу дослідження в усіх периферичних зонах, за винятком центра пластина Тахокомбу була фрагментована (рис. 3.36). Згідно зі шкалою фрагментація 2,69 (0,09) оцінена як сильна. Відмічалися виражена гетерогенність БМ та втрата його структурної цілісності. Площа дефекту паренхіми печінки суттєво зменшилася на 59,25 % і становила 2,69 (0,19) mm^2 ($p = 0,0029$).

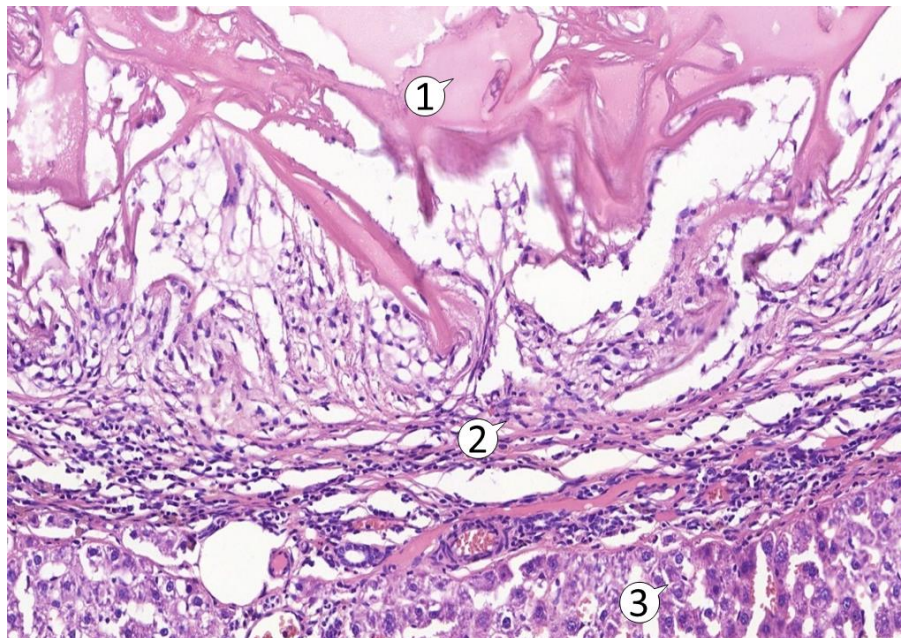


Рисунок 3.36 – Фрагмент паренхіми печінки щура на 30-ту добу після застосування Тахокомбу. Забарвлення гематоксилін-еозином. Збільшення $\times 200$. Позначення: 1 – Тахокомб; 2 – капсула; 3 – гепатоцити.

Площа власне пластини Тахокомб також зменшилася 25,29 % і становила 2,54 (0,18) мм² (p = 0,012). На поверхні БМ у тісному контакті з елементами пластини перебувала велика кількість макрофагів та помірна кількість гігантських клітин сторонніх тіл. У проміжках між фрагментованими елементами відмічалось вrostання сполучної тканини, що повністю охоплювало БМ. В інтактній печінковій паренхімі спостерігалась велика кількість двоядерних гепатоцитів, значні ділянки ремоделювання. Візуалізувались нові судини, що хаотично розміщувались, як на межі з паренхімою, так і в товщі капсули. На ділянках регенерації паренхіми наявні різного діаметра та довжини трубчасті структури. У деяких обмежених ділянках залишався інтерстиціальний набряк паренхіми з дистрофічно зміненими гепатоцитами. Запальну реакцію паренхіми на 30-ту добу оцінювали як незначну у 0,37 (0,14) бали.

Капсула сильно стоншилася порівняно з 7-ю добою і становила 154,83 (8,45) мкм (p = 0,005), але змінилася її структура та компактність (рис. 3.37 а, б). Так, на периферії та в безпосередньому контакті з інтактною паренхімою розміщувались переважно колагенові волокна, що мали більш щільне пакування та односпрямоване розміщення волокон.

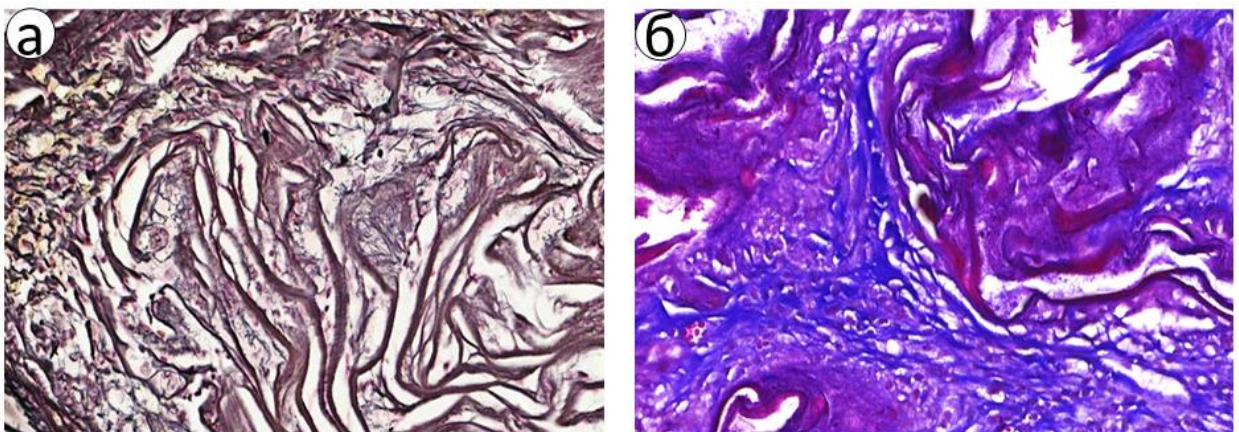


Рисунок 3.37 – Фрагмент капсули навколо БМ на 30-ту добу після застосування Тахокомбу: а – забарвлення за Гоморі; б – трихромне забарвлення за Массоном. Збільшення $\times 400$.

Щільність колагенових волокон оцінювали як помірну – 1,30 (0,15) бала. У середній та внутрішній частинах капсула складалася переважно з ретикулярних волокон, які в середній частині капсули були значно щільнішими – 1,17 (0,18) бала і поступово ставали пухкішими до внутрішньої частини капсули та периферичних фрагментів БМ. Периферична частина капсули була добре васкуляризованою зі значною кількістю клітин, кількість яких поступово зменшувалася до середини капсули та знову збільшувалася за безпосереднього контакту з БМ.

Забарвлення толуїдиновим синім (рис. 3.38 а) продемонструвало незначну кількість тучних клітин – 7,93 (0,26) кл/мм², що вдвічі менше порівняно з 7 добою ($p = 0,0013$). Мастоцити розміщувались окремими групами, переважно в місцях найбільшої фрагментації та деградації БМ і вrostання СТ.

ІГХ дослідження експресії до α -SMA (рис. 3.38 б) показало зменшення кількості міофібробластів порівняно із 7-ю добою, проте їх кількість була оцінена як досить велика та становила 1,68 (0,25) бала ($p = 0,021$). Позитивні α -SMA клітини розміщувалися в усій товщі капсули, але найбільша їх концентрація спостерігалась у периферичній зоні.

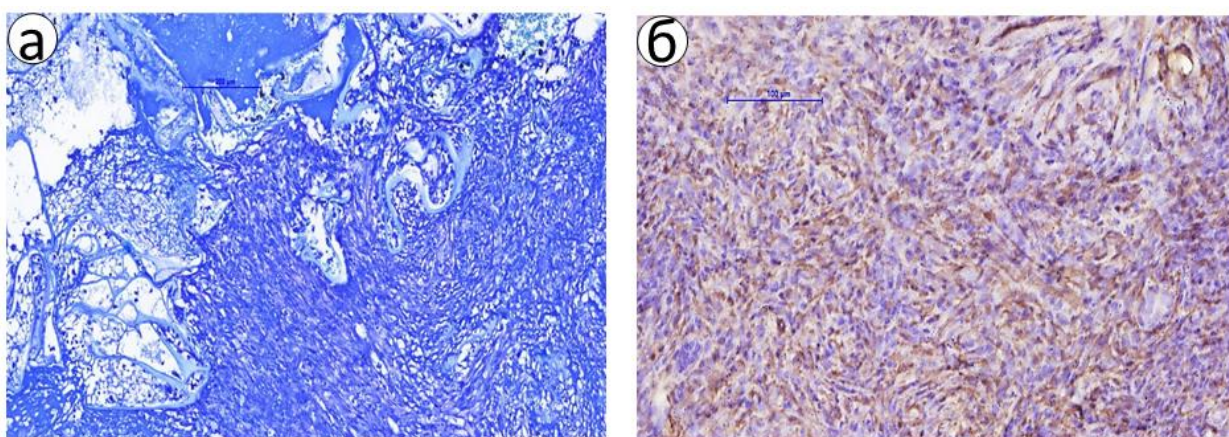


Рисунок 3.38 – Фрагмент капсули навколо БМ на 30-ту добу після застосування Тахокомбу: а – забарвлення толуїдиновим синім; б – ІГХ дослідження експресії до α -SMA. Збільшення $\times 200$.

Експресія Ki-67 на 30-ту добу дослідження (рис. 3.39) зменшилася на 9,15 % ($p = 0,014$) проте залишилася сильною і становила 22,23 (3,94) %. Переважна більшість Ki-67 позитивних клітин розміщувались у місцях регенерації печінки – навколо капсули та в її периферичній зоні.

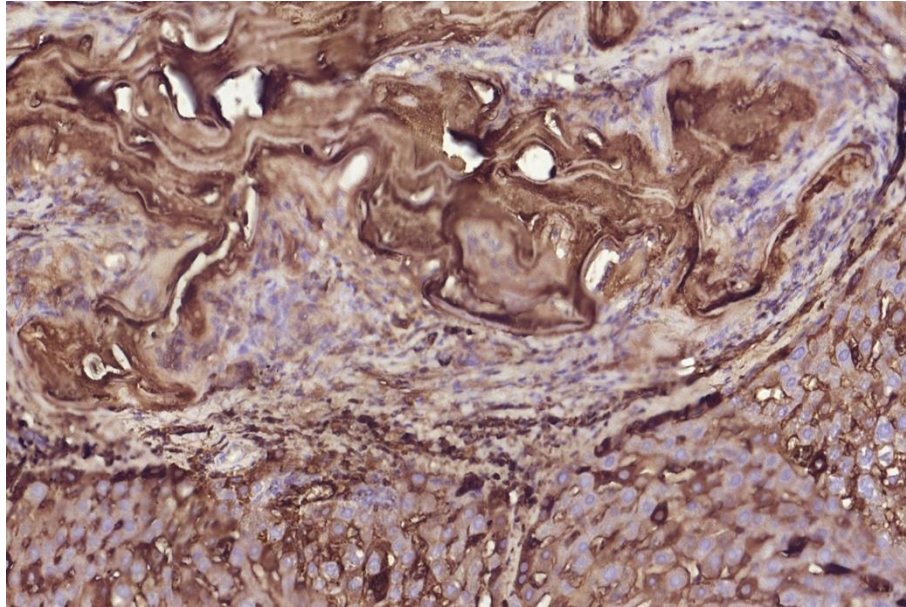


Рисунок 3.39 – Фрагмент печінки щура на 30-ту добу після застосування Тахокомбу. ІГХ дослідження експресії Ki-67. Збільшення $\times 400$.

Наявність CD68- та CD163-позитивних клітин підтверджувалось ІГХ дослідженням на 30-ту добу експерименту (рис 3.40 а, б). Кількість макрофагів M1-типу була достовірно меншою порівняно з 7 добою і становила 92,62 (6,73) кл/мм² ($p = 0,003$).

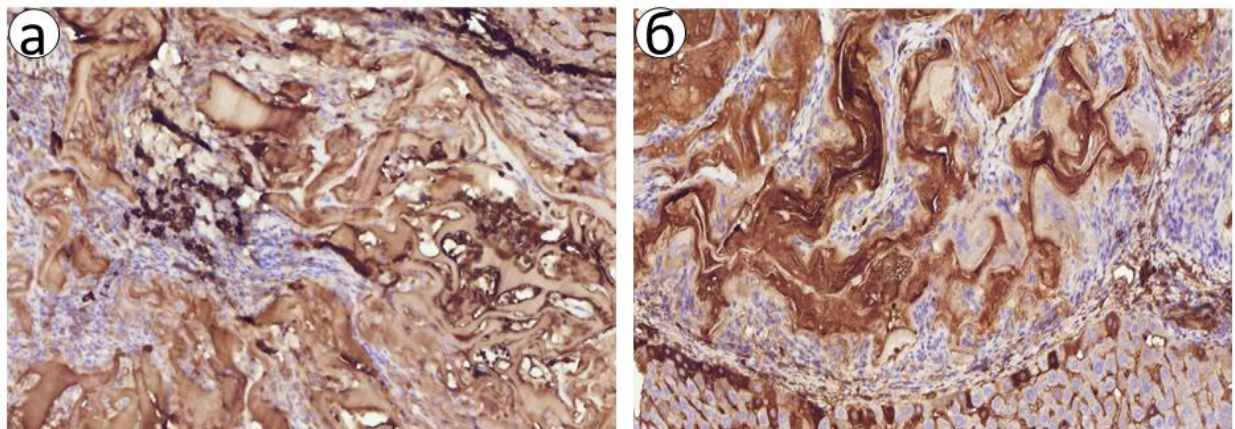


Рисунок 3.40 – Фрагмент печінки щура на 30-ту добу після застосування Тахокомбу. ІГХ дослідження експресії: а – CD68; б – CD163. Збільшення $\times 400$.

Макрофагів М2-типу налічувалося 116,72 (8,94) кл/мм², що значно менше порівняно з попереднім терміном і мало статистично значущу різницю ($p = 0,0001$). У співвідношенні CD68/CD163 0,81 (0,02) збільшилася частка CD68-позитивних клітин, але загалом переважали CD163-позитивні клітини, що зберігало свій протизапальний характер клітинної відповіді.

Визначення експресії CD8- та FOXP3- позитивних клітин показало зменшення кількості обох популяції (рис 3.41). Так, кількість цитотоксичних Т-лімфоцитів зменшилася на 31,8 % ($p = 0,002$), тоді як, регуляторних Т-лімфоцитів – на 41,3 % ($p = 0,001$). Проте співвідношення CD8/FOXP3 0,83 (0,02) зберігало істотну перевагу регуляторних Т-лімфоцитів.

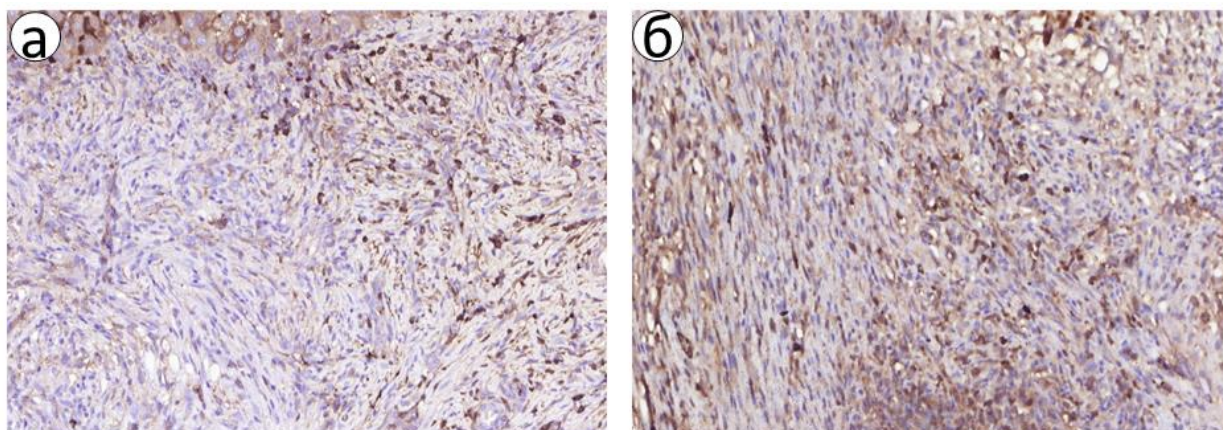


Рисунок 3.41 – Фрагмент печінки щура на 30 добу після застосування Тахокомбу. ІГХ дослідження експресії: а – CD8; б – FOXP3. Збільшення $\times 200$.

Через 60 діб дослідження пластина Тахокомбу повністю не деградувала і була помітною на гістологічних зрізах (рис. 3.42). Проте як на периферії, так і центральній частині вона втратила цілісну структуру, стала гетерогенною та фрагментувалася на дрібні безформні елементи, які часто були розділені між собою. Порівнянно з 30-ю добою дослідження площа дефекту скоротилася на 26,35 % ($p = 0,003$) і становила 0,95 (0,04) мм², а площа БМ скоротилася на 53,82 % ($p = 0,0012$). Між усіма фрагментами БМ визначалося сильне вrostання СТ – 2,54 (0,23) бала.

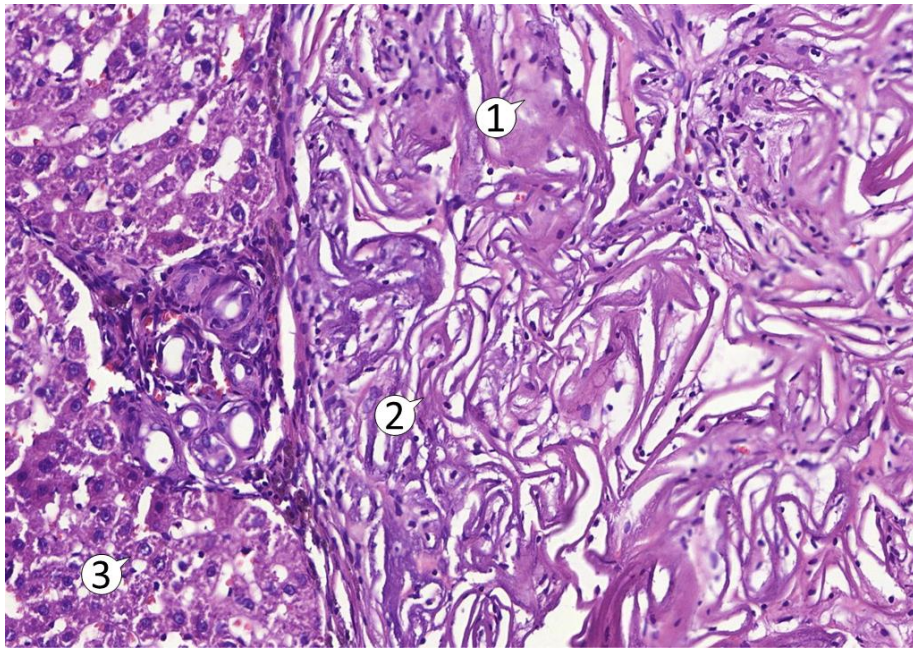


Рисунок 3.42 – Фрагмент паренхіми печінки щура на 60-ту добу після застосування Тахокомбу. Забарвлення гематоксилін-еозином. Збільшення $\times 400$. Позначення: 1 – Тахокомб; 2 – капсула; 3 – гепатоцити.

Щільність лейкоцитів у середині БМ оцінювали як низьку – 0,47 (0,06) бала, проте вони мали виражену пряму взаємодію з БМ – 2,64 (0,26) бала. Навколо Тахокомбу реєстрували лише поодинокі гігантські клітини сторонніх тіл. Печінкова паренхіма в безпосередній близькості до капсули перебувала в стані ремоделювання, відмічалася значна кількість тубулярних структур різного діаметра. У деяких ділянках спостерігалися дистрофічні зміни паренхіми, незрілість гепатоцитів. Значно знизилася кількість двоядерних гепатоцитів – до 5,59 (3,93) %.

На 60-ту добу дослідження товщина капсули скоротилася на 23,39 % порівняно з 30-ю добою і становила 72,69 (5,32) мкм ($p = 0,02$). У центрі між фрагментами БМ розміщувалися переважно ретикулярні волокна (рис. 3.43 а). Їх щільність порівняно з попередніми термінами дослідження значно збільшилась – 1,45 (0,16) бала ($p = 0,032$). На периферії БМ та капсули спостерігався стоншений компактний шар колагенових волокон (рис. 3.43 б).

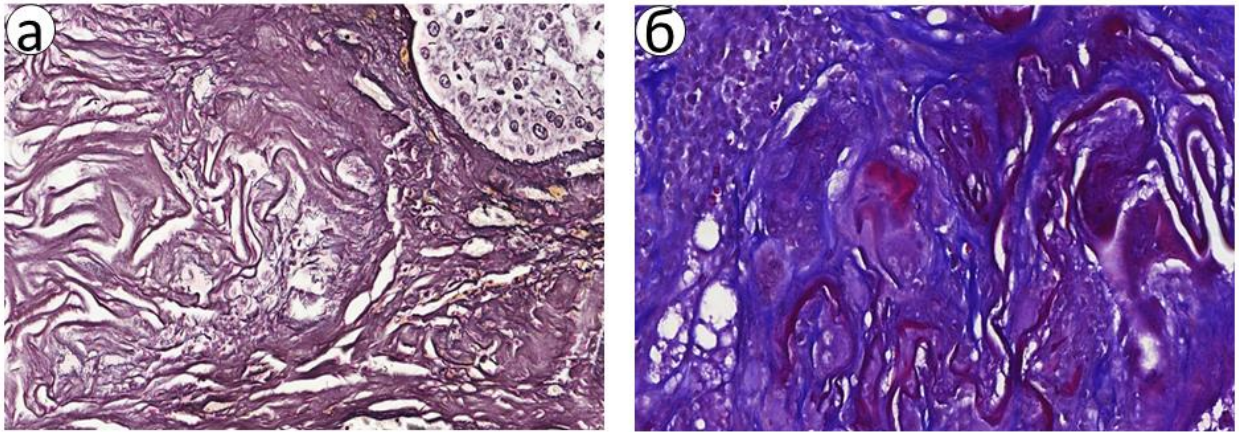


Рисунок 3.43 – Фрагмент капсули навколо БМ на 60-ту добу після застосування Тахокомбу: а – забарвлення за Гоморі; б – трихромне забарвлення за Массоном. Збільшення $\times 400$

Щільність колагенових волокон також збільшилася до 1,67 (0,13) ($p = 0,028$), проте як для ретикулярних, так і для колагенових волокон цей показник оцінювали як помірний. На межі з печінковою паренхімою та периферії капсули відмічали виражену судинну сітку, густота якої зменшувалася під час просування до центра фрагментів БМ. Відповідно в ділянках зі зменшеним кровотоком була значно менша кількість проліферуючих гепатоцитів та більш виражена сполучна тканина.

Біля найбільших фрагментів Тахокомбу при забарвленні толуїдиновим синім (рис. 3.44 а) можна було знайти поодинокі тучні клітини, кількість яких достовірно зменшилася на 50,14 % порівняно з 30-ю добою експерименту і становила 0,41 (0,01) кл/мм² ($p = 0,0001$). Визначення експресії α -SMA (рис. 3.44 б) показало значне зменшення міофібробластів, кількість яких оцінювали в 0,75 (0,18) бала ($p = 0,003$). Основна їх кількість містилася у товщі капсули між колагеновими та ретикулярними волокнами. Це вказувало на зменшення основної речовини та ущільнення сполучної тканини не лише в капсулі довкола БМ, а також між його фрагментами, що не зазнали повної деградації.

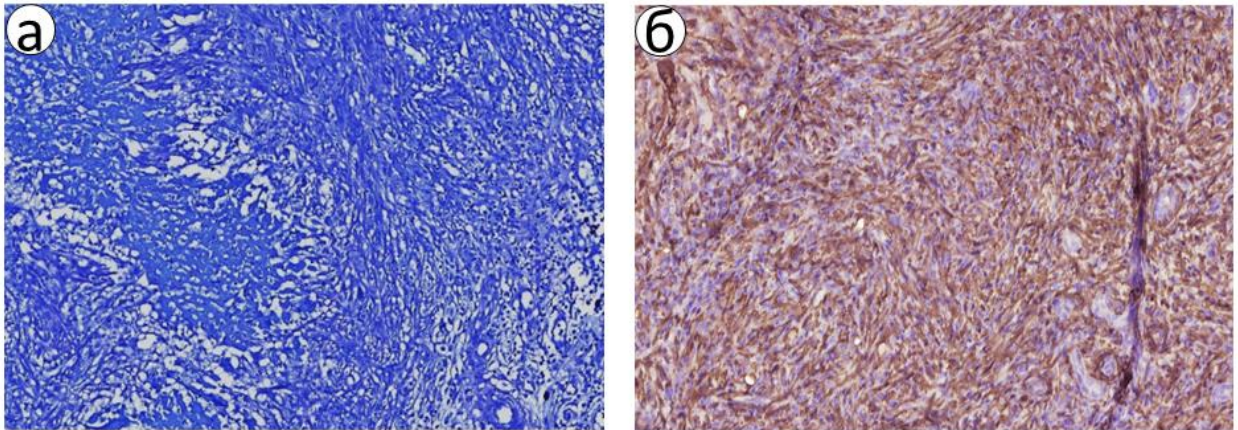


Рисунок 3.44 – Фрагмент капсули навколо БМ на 60-ту добу після застосування Тахокомбу: а – забарвлення толуїдиновим синім; б – ІГХ дослідження експресії до alpha-SMA. Збільшення $\times 200$.

Кількість Ki-67 позитивних клітин під час ІГХ дослідження на 60-ту добу (рис. 3.45) зменшилась на 53,03 % порівняно з 30-ю добою ($p = 0,018$). Індекс проліферації становив 6,57 (0,84). Найбільше Ki-67-позитивних клітин спостерігалось в місцях ремоделювання паренхіми печінки, поодинокі клітини були виявлені в периферичних зонах капсули.

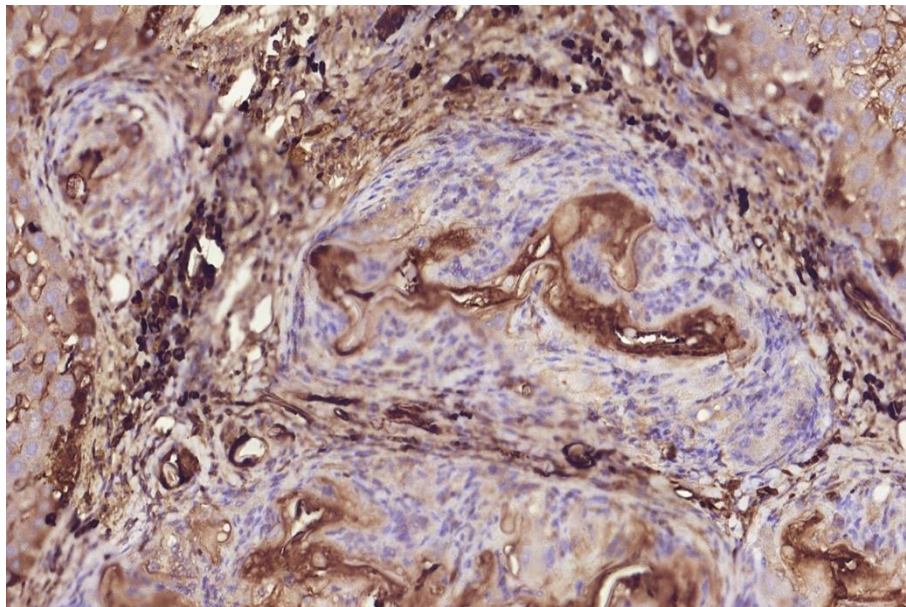


Рисунок 3.45 – Фрагмент печінки щура на 60-ту добу після застосування Тахокомбу. ІГХ дослідження експресії Ki-67. Збільшення $\times 400$.

Кількість CD68-позитивних клітин (рис. 3.46 а) достовірно зменшилася на 37,8 % порівняно з 30-ю добою ($p = 0,022$) і становила 49,36 (4,58) кл/мм². Для CD163-позитивних клітин (рис. 3.46 б) зменшення відбулося на 22,13 % ($p = 0,039$), кількість яких становила 53,83 (5,32) кл/мм² відповідно. Макрофаги M1-типу спостерігалися переважно в безпосередньому контакт з БМ, тоді як макрофаги M2-типу перебували як у контакті з Тахокомбом, так і в товщі капсули між сполучнотканинними волокнами. Співвідношення M1/M2-макрофагів становило 0,92 (0,19).

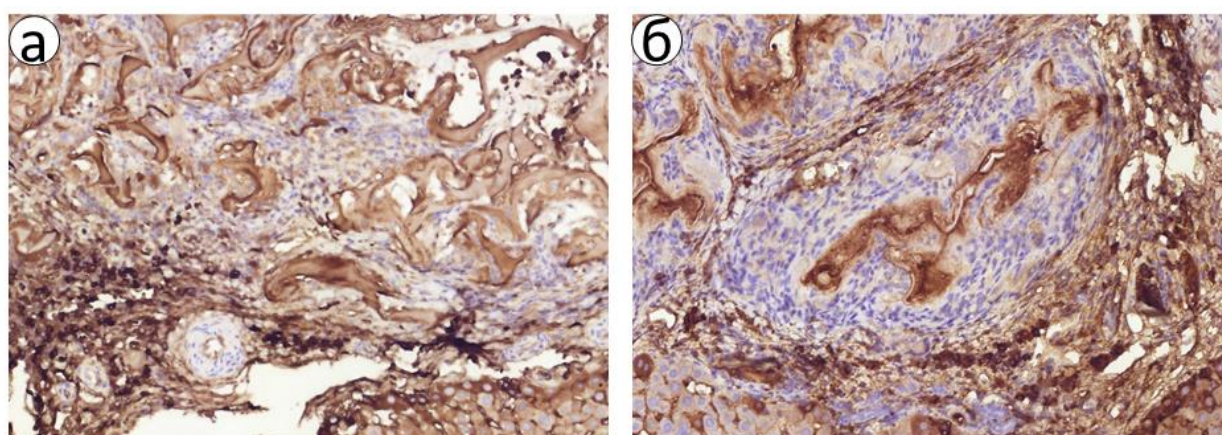


Рисунок 3.46 – Фрагмент печінки щура на 60-ту добу після застосування Тахокомбу. ІГХ дослідження експресії: а – CD68; б – CD163. Збільшення $\times 400$.

Дослідження експресії цитотоксичних та регуляторних Т-лімфоцитів (рис. 3.47 а, б) показало зменшення популяції обох типів клітин у порівнянні з 30-ю добою. Кількість CD8-позитивних клітин зменшилася на 47,21 % ($p = 0,0016$) до 23,04 (2,43) кл/мм². Для FOXP3-позитивних клітин характерним було зменшення на 25,81 % ($p = 0,024$) і становило 50,23 (2,90) кл/мм². Значне зменшення обох груп Т-лімфоцитів демонструвало співвідношення CD8/FOXP3 0,46 (0,04) із незначною перевагою прозапальних цитотоксичних Т-лімфоцитів. Проте, у зв'язку з незначним абсолютним числом клітин у капсулі та оточуючій тканині запалення на 60-ту добу оцінювали як слабке в 0,30 (0,05) бала.

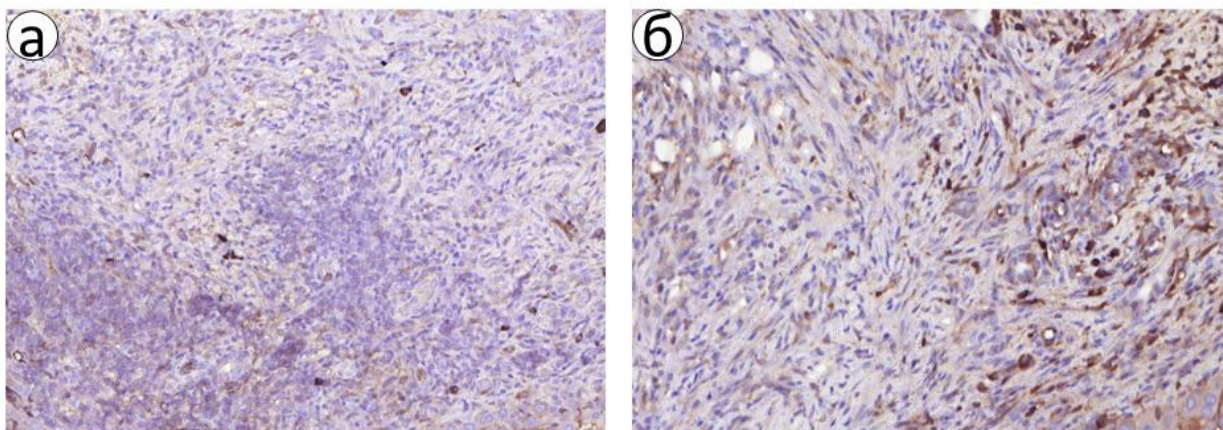


Рисунок 3.47 – Фрагмент печінки щура на 60-ту добу після застосування Тахокомбу. ІГХ дослідження експресії: а – CD8; б – FOXP3. Збільшення $\times 200$.

Переважаання CD163- та FOXP3-позитивних клітин, незначні інфільтративні зміни, значне зменшення дефекту демонструвало, що Тахокомб взаємодіяв із паренхімою печінки з низькою запальною реакцією, але не повною біодеградацією впродовж 60 діб.

3.3.4. Морфологічна характеристика закриття ран печінки після використання Хт ацетату

Друга група в якій використовували губки Хт ацетату отримані методом ліофільного висушування, продемонструвала втрату гомогенності структури та фрагментацію периферичних зон уже на 7-му добу дослідження (рис. 3.48 а, б). Дефект паренхіми становив $4,90 (0,26) \text{ мм}^2$. БМ, що тісно розміщувався в цьому дефекті, мав складну полігональну поверхню та різну товщину трабекул за рахунок як власне структури Хт губки, так і завдяки процесам біодеградації. Площа БМ становила $4,52 (0,23) \text{ мм}^2$. Між фрагментами губки та капсулою відмічалась значна кількість лімфоцитів та поліморфноядерних нейтрофілів, що дещо зменшувалась до середини гемостатичного матеріалу. Щільність цих клітин оцінювали як високу в $2,49 (0,27)$ бала. У центральній частині губки були лише поодинокі фрагменти, що не мали клітинних контактів і оточувались лише фібрином та транссудатом.

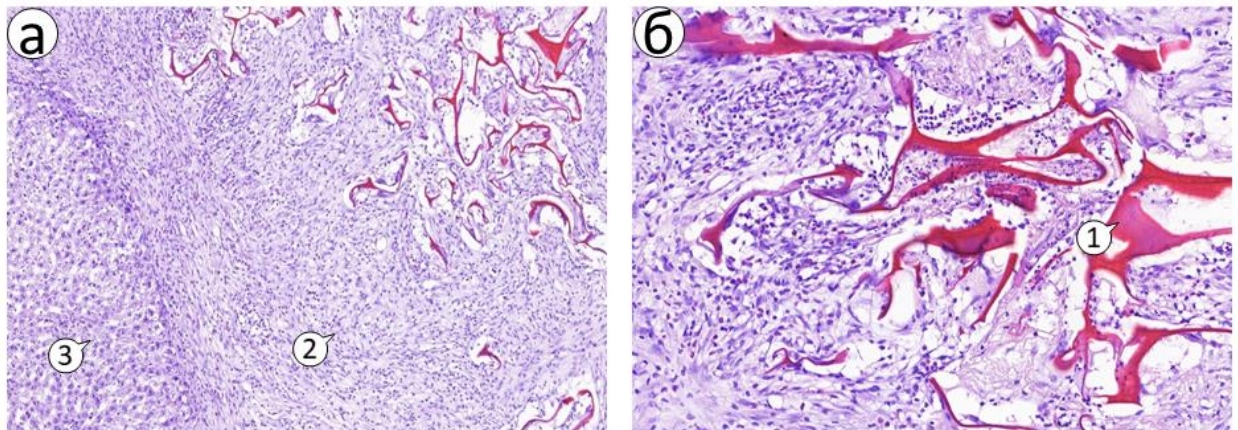


Рисунок 3.48 – Фрагмент паренхіми печінки щура на 7-му добу після застосування Хт ацетату. Забарвлення гематоксилін-еозином. Позначення: 1 – Хт ацетат; 2 – капсула; 3 – гепатоцити. Збільшення: а – $\times 100$; б – $\times 200$.

У паренхімі, що безпосередньо контактувала з капсулою, визначались явища інтерстиціального набряку, помірних дистрофічних змін та поодинокі апоптози гепатоцитів. Проте вираженість запальної реакції печінки оцінювали як низьку в 1,04 (0,11) бала. 25,56 (5,35) % гепатоцитів прилеглих зон паренхіми були дво- та багатоядерними.

Товщина капсули навколо Хт губки, залежно від щільності БМ, істотно відрізнялася в різних ділянках, середній показник якої становив 229,4 (34,47) мкм. Основну масу капсули складала ретикулярні волокна, щільність яких збільшувалася від БМ, де вони розміщувалися між фрагментованими елементами Хт губки до контакту з паренхімою печінки (рис. 3.49 а). На периферії капсули визначалася незначна кількість пухко розміщених колагенових волокон, що відмежовували непошкоджену паренхіму (рис. 3.49 б). У товщі капсули визначалася помірна запальна реакція (1,5 (0,28) бала) з дифузним розподілом нейтрофілів, еозинофілів та макрофагів. У капсулі переважно з боку паренхіми відмічалася значна кількість тубулярних структур різного діаметра та довжини, що стоншувались у напрямку гемостатичного матеріалу.

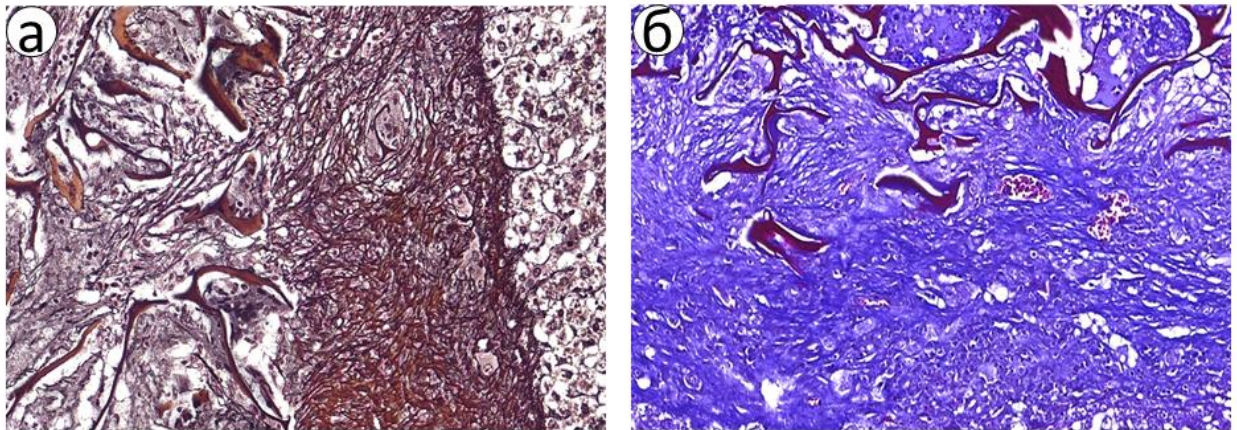


Рисунок 3.49 – Фрагмент капсули навколо губки БМ на 7-му добу після застосування Хт ацетату: а – забарвлення за Гоморі, збільшення $\times 400$; б – трихромне забарвлення за Массоном, збільшення $\times 200$.

У безпосередньому контакті з Хт губкою визначали помірну кількість тучних клітин – $10,91 (2,92) \text{ кл/мм}^2$ (рис. 3.50 а). Кількість αSMA позитивних клітин оцінювали як велику в $1,73 (0,14)$ бала (рис. 3.50 б). Міофібробласти відносно рівномірно розміщувалися по всій товщі капсули.

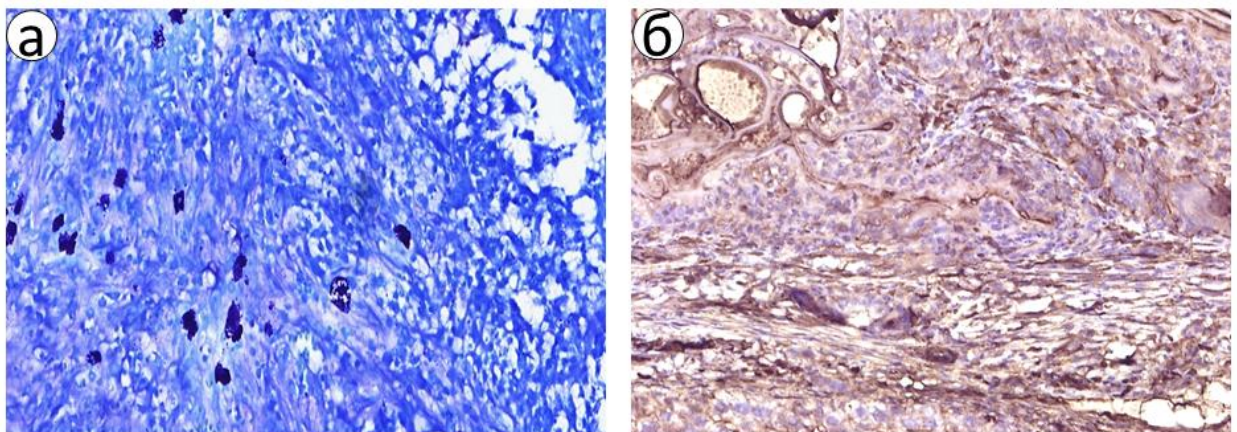


Рисунок 3.50 – Фрагмент капсули навколо БМ на 7-му добу після застосування Хт ацетату: а – забарвлення толуїдиновим синім; б – ІГХ дослідження експресії до $\alpha\text{-SMA}$. Збільшення $\times 200$.

Дослідження експресії Ki-67 (рис. 3.51) на 7-му добу дослідження показало високий індекс проліферації клітин, що становив $34,18 (2,23) \%$. Активна проліферація клітин спостерігалася переважно в периферичних зонах

капсули та прилеглих ділянках печінкової паренхіми. А також поодинокі скупчення Кі-67-позитивних клітин були наявні в значних вростаннях СТ.

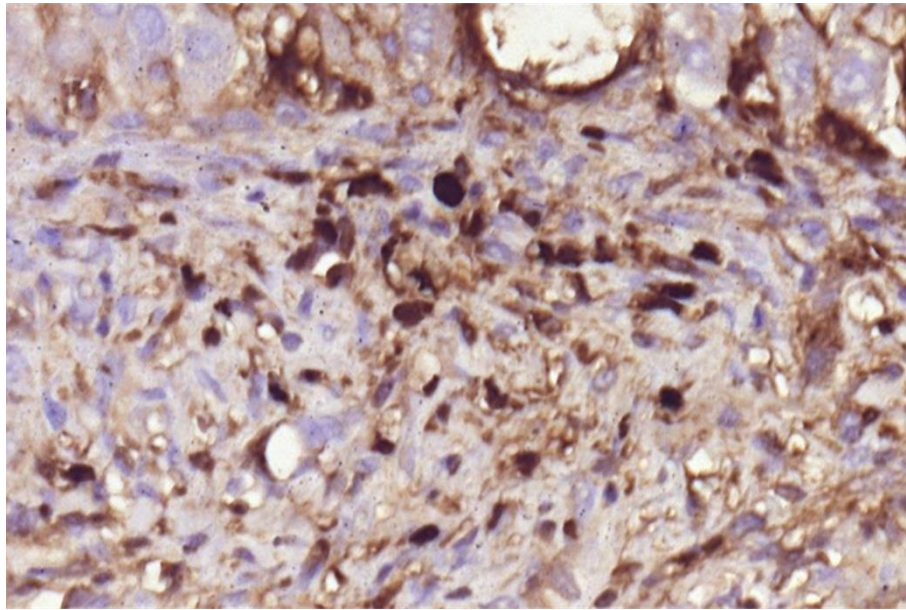


Рисунок 3.51 – Фрагмент печінки щура на 7-му добу після застосування Хт ацетату. ІГХ дослідження експресії Кі-67. Збільшення $\times 400$.

На 7-му добу дослідження в капсулі навколо губки Хт ацетату визначалася значна кількість макрофагів. Визначення експресії CD68 та CD163 (рис. 3.52 а, б) показало, що кількість макрофагів М1-типу становила 157,82 (19,39) кл/мм², тоді як макрофагів М2-типу було 131,27 (11,35) кл/мм². Співвідношення CD68/CD163 – 1,44 (0,22) підтверджувало помірний прозапальний клітинний склад капсули. CD68-позитивні клітини розміщувалися в товщі капсули і навколо гемостатичного, формуючи прямі контакти з Хт губкою. Вираженість запальної реакції в товщі БМ була оцінена як помірна в 1,25 (0,16) бала. CD163-позитивні клітини містилися переважно на периферії капсули та крайових ділянках паренхіми.

Даний розподіл макрофагів вказував, що безпосередню участь в резорбції периферичних фрагментів Хт губки брали участь макрофаги М1-типу, тоді як макрофаги М2-типу сприяли зменшенню запальної реакції на периферії капсули та стимулювали проліферацію гепатоцитів.

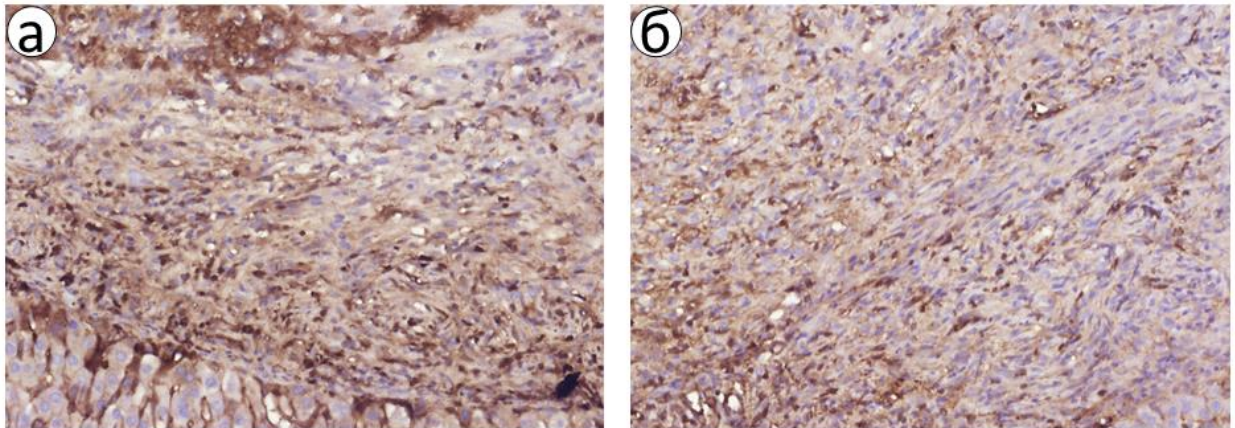


Рисунок 3.52 – Фрагмент печінки щура на 7-му добу після застосування Хт ацетату. ІГХ дослідження експресії: а – CD68; б – CD163. Збільшення $\times 400$.

Визначення експресії CD8 та FOXP3 (рис 3.53 а, б) показало, що кількість цитотоксичних Т-лімфоцитів становила 99,09 (9,73) кл/мм², а кількість регуляторних Т-лімфоцитів – 163,1 (9,83) кл/мм². Співвідношення CD8/FOXP3-позитивних клітин становило 0,62 (0,07), зі значним переважанням FOXP3-позитивних клітин, що відповідало за протизапальну реакцію адаптивного імунітету. Більшість регуляторних Т-лімфоцитів знаходилися у периферичних ділянках капсули та паренхіми печінки. CD8-позитивні клітини дифузно розміщувалися між ретикулярними та колагеновими волокнами.

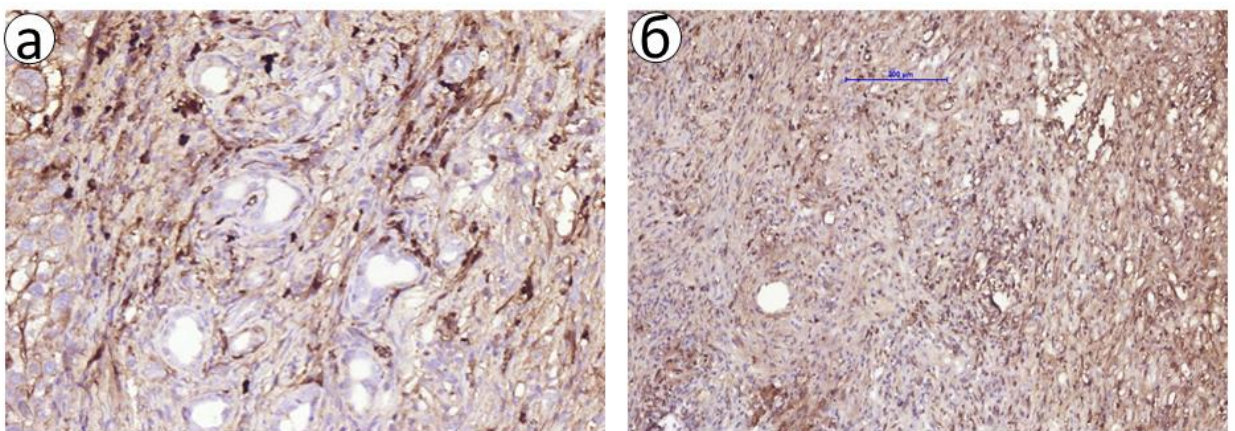


Рисунок 3.53 – Фрагмент печінки щура на 7-му добу після застосування Хт ацетату. ІГХ дослідження експресії: а – CD8, збільшення $\times 400$; б – FOXP3, збільшення $\times 200$.

На 30-ту добу дослідження губка Хт ацетату була повністю фрагментована на елементи різного розміру та форми (рис. 3.54). Між ними вросла СТ із помірною кількістю лімфоцитів та нейтрофілів. Щільність імунних клітин усередині БМ стала меншою порівняно з 7-ю добою експерименту – 2,11 (0,24) бала ($p = 0,033$). А запальну реакцію оцінювали в 1,01 (0,23) бала, як незначну. Площа дефекту паренхіми скоротилася на 31,84 % ($p = 0,0089$) і становила 3,34 (0,22) мм². Площа власне БМ зменшилась на 36,32 % ($p = 0,0037$) і становила 3,46 (0,18) мм². Завдяки процесам біодеградації та резорбції губка втратила свою структуру та стала більш гетерогенною. На поверхні структур Хт ацетату спостерігалася велика кількість гігантських клітин сторонніх тіл – 2,48 (0,26) бали. Печінкова паренхіма відновлювала свою структуру шляхом проліферації гепатоцитів, утворення нових судин та жовчних протоків. У деяких ділянках спостерігалися дистрофічні зміни та розширення печінкових балок. Кількість двоядерних гепатоцитів зменшилася на 8,31 % ($p = 0,039$), проте залишалася досить високою 17,25 (4,56) %. Запальну реакцію паренхіми оцінювали, як низьку 0,94 (0,13) бала.

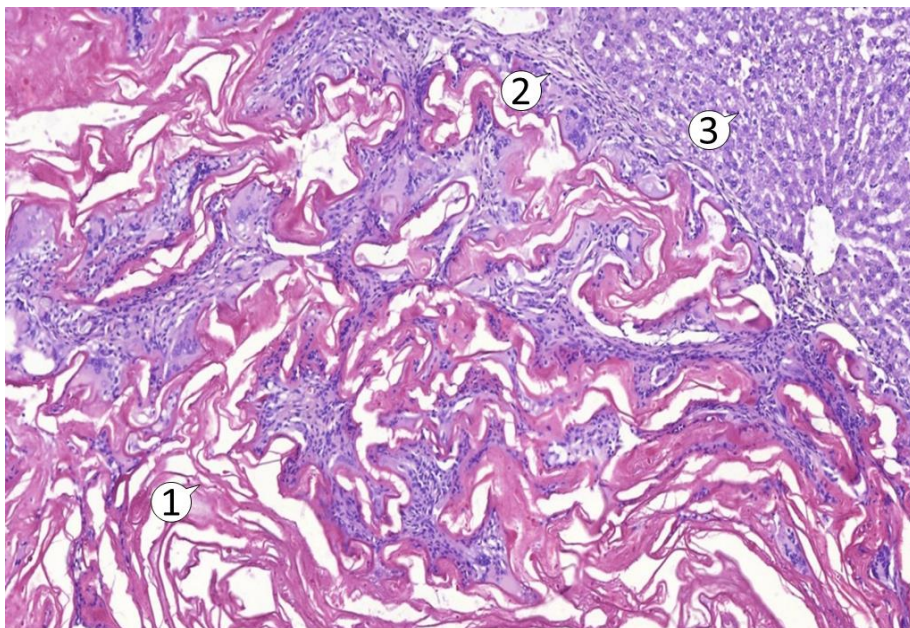


Рисунок 3.54 – Фрагмент паренхіми печінки щура на 30-ту добу після застосування Хт ацетату. Забарвлення гематоксилін-еозином. Позначення: 1 – Хт ацетат; 2 – капсула; 3 – гепатоцити. Збільшення $\times 200$.

Товщина капсули зменшилася на 23,6 % ($p = 0,0041$) порівняно з 7-ю добою і становила 175,28 мкм. Ретикулярні волокна розміщувалися ближче до БМ та оточували його фрагменти (рис. 3.55 а). Щільність ретикулярних волокон незначно зросла, але оцінювалась як помірна в 1,57 (0,19) бала. За 30 діб дослідження зросла частка колагенових волокон капсули (рис. 3.55 б), які розміщувалися переважно циркулярно, навколо капсули. Щільність колагенових волокон була помірною – 1,45 (0,14) бала. У периферичних зонах та частково в товщі капсули збільшилася сітка кровоносних судин, навколо яких розміщувалися фібробластоподібні клітини. Між ретикулярними волокнами контактуючи з Хт губкою, містилися переважно поліморфноядерні нейтрофіли та макрофаги. Запальну реакцію в капсулі оцінювали як слабку – 1,23 (0,21) бала.

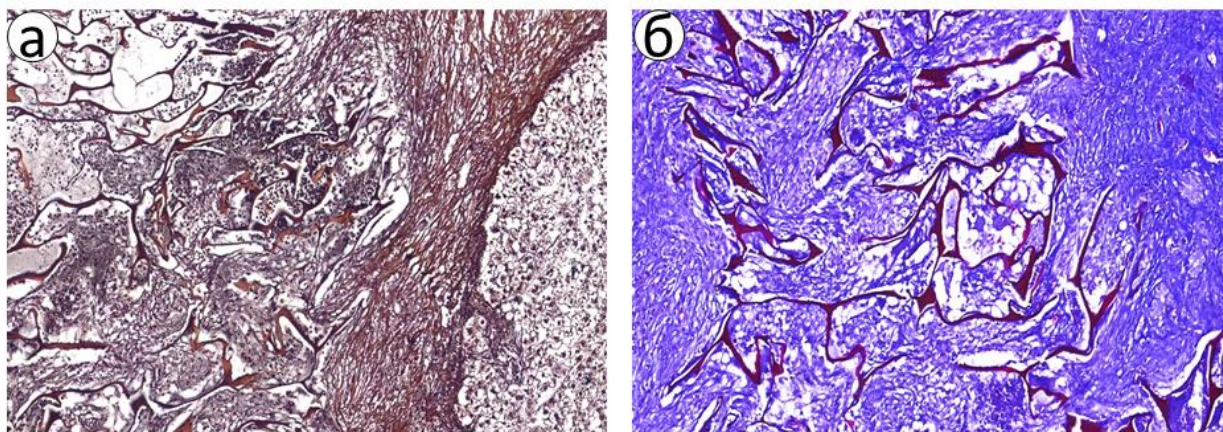


Рисунок 3.55 – Фрагмент капсули навколо губки БМ на 30-ту добу після застосування Хт ацетату: а – забарвлення за Гоморі; б – трихромне забарвлення за Массоном. Збільшення $\times 200$.

Під час забарвлення толуїдиновим синім (рис. 3.56 а) було виявлено зниження кількості тучних клітин на 60,22 % ($p = 0,007$), що становило 4,34 (0,22) кл/мм², які містилися в ділянці фрагментів губки Хт. Дослідження експресії α -SMA (рис. 3.56 б) показало, що кількість міофібробластів була оцінена як низька – 1,25 (0,21) бала, що статистично менше ($p = 0,022$)

порівняно з 7-ю добою експерименту. Кількість міофібробластів збільшувалася від фрагментів БМ до периферичних ділянок капсули.

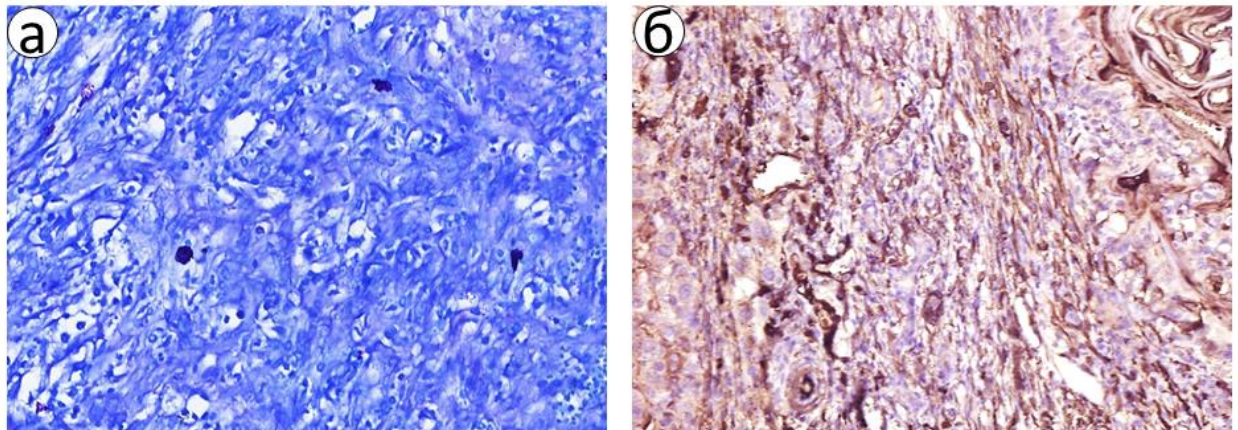


Рисунок 3.56 – Фрагмент капсули навкола БМ на 30-ту добу після застосування Хт ацетату: а – забарвлення толуїдиновим синім; б – ІГХ дослідження експресії до alpha-SMA. Збільшення $\times 200$.

Визначення експресії Ki-67 (рис. 3.57) продемонструвало зниження кількості клітин на 36,95 % порівняно з 7-ю добою ($p = 0,014$). Індекс проліферації становив 21,66 %. Ki-67-позитивні клітини розміщувалися переважно в прилеглій паренхімі печінки та на деяких ділянках капсули.

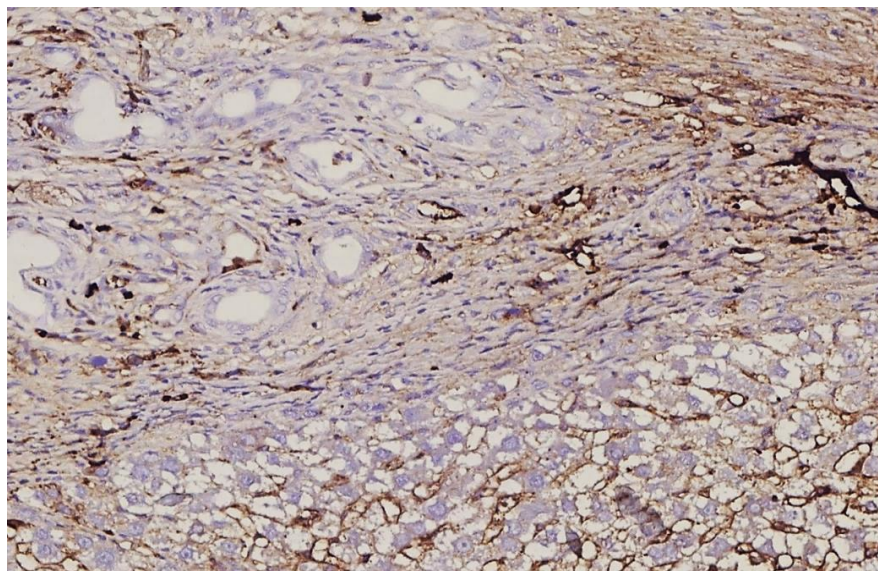


Рисунок 3.57 – Фрагмент печінки щура на 30-ту добу після застосування Хт ацетату. ІГХ дослідження експресії Ki-67. Збільшення $\times 400$.

На 30-ту добу експерименту ІГХ дослідження показало зниження кількості всіх імунних клітин. Так, кількість макрофагів М1-типу (рис. 3.58 а) знизилася на 16,05 % ($p = 0,017$) і становила 132,49 (4,18) кл/мм². Кількість макрофагів М2-типу (рис. 3.58 б) знизилася на 23,57 % ($p = 0,012$) до 100,33 (5,28). До того ж зберігалось співвідношення CD68/CD163-позитивних клітин становило 1,32 (0,02) з перевагою прозапальних макрофагів.

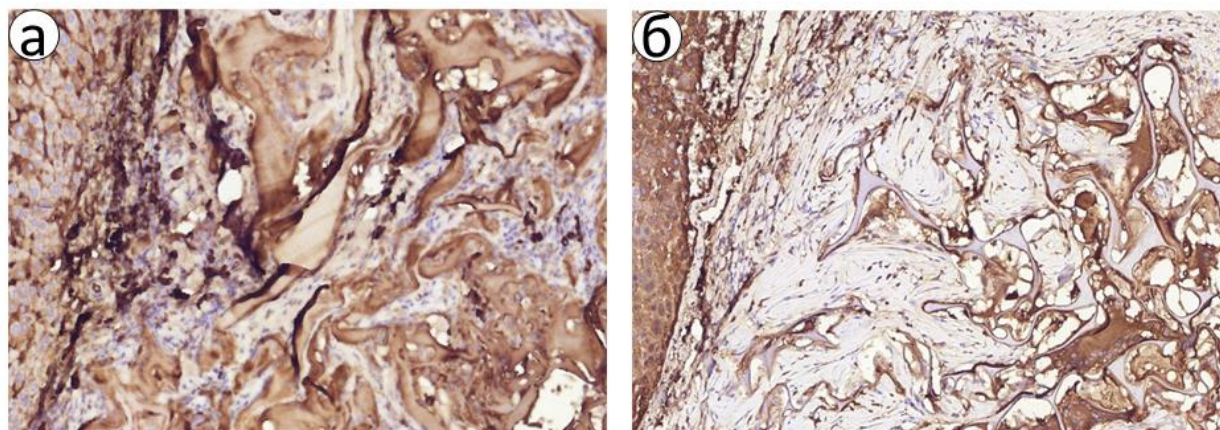


Рисунок 3.58 – Фрагмент печінки щура на 30-ту добу після застосування Хт ацетату. ІГХ дослідження експресії: а – CD68; б – CD163. Збільшення $\times 200$.

Кількість CD8- та FOXP3-позитивних клітин також знизилась на 16,81 % ($p = 0,036$) і 41,07 % ($p = 0,0024$) відповідно (рис. 3.59 а, б).

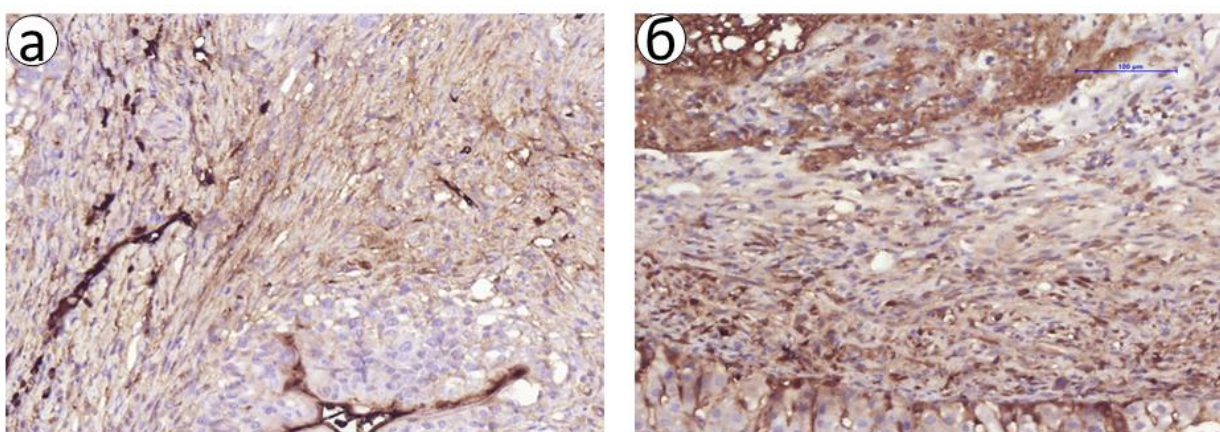


Рисунок 3.59 – Фрагмент печінки щура на 7-му добу після застосування Хт ацетату. ІГХ дослідження експресії: а – CD8; б – FOXP3. Збільшення $\times 400$.

Співвідношення CD8/FOXP3-позитивних клітин – 0,85 (0,05) зберігало перевагу регуляторних Т-лімфоцитів, хоча порівняно з 7-ю добою наявна тенденція до урівноваження. Більшість цитотоксичних Т-лімфоцитів розміщувалися між фрагментами губки. FOXP3 переважно містилися в капсулі з боку паренхіми печінки.

На 60-ту добу дослідження губка Хт ацетату була фрагментованою, неоднорідною, але повністю не деградувала (рис. 3.60). Площа БМ порівняно з 30-ю добою дослідження зменшилася на 25,89 % ($p = 0,011$) і становила 3,29 (0,12) мм². Спостерігалася менша кількість дрібних фрагментів губки, у деяких невеликих ділянка ущільнення БМ.

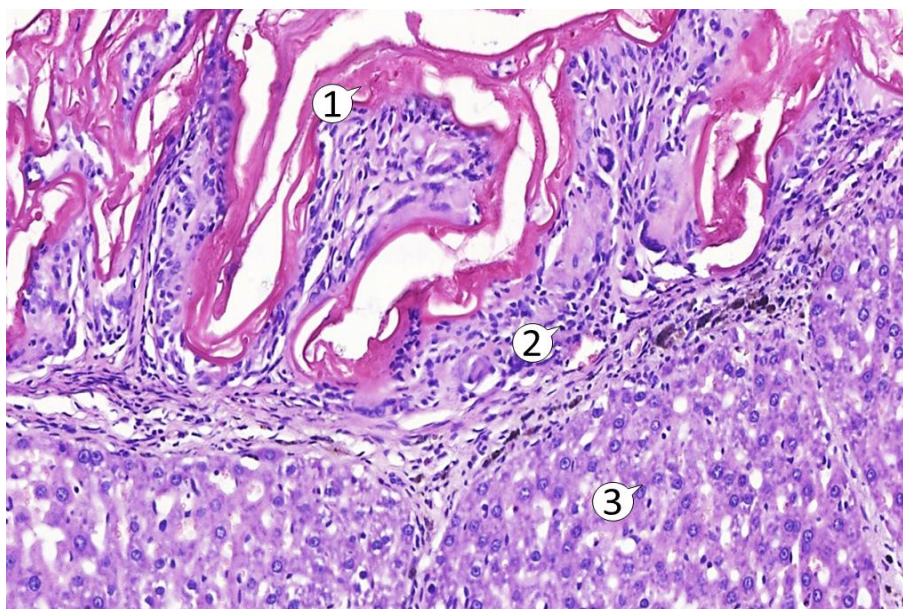


Рисунок 3.60 – Фрагмент паренхіми печінки щура на 60-ту добу після застосування Хт ацетату. Забарвлення гематоксилін-еозином. Позначення: 1 – Хт ацетат; 2 – капсула; 3 – гепатоцити. Збільшення $\times 200$.

Запальна реакція в губці була низькою – 0,96 (0,20) бала. СТ розміщувалася навколо всіх елементів губки, була добре васкуляризованою. Більшість клітин розміщувалися, або безпосередньо на поверхні БМ, або ж вздовж судин. До цього терміну були наявні гігантські клітини сторонніх тіл, кількість яких оцінювали як помірну в 2,05 (0,14) бала. Площа дефекту

скоротилась на 36,32 % ($p = 0,001$) до 2,46 (0,16) мм². Навколо капсули відбувалося ремоделювання печінкової паренхіми з незначним вrostанням СТ між ними. Некротичні чи дистрофічні зміни були відсутні. Запальну реакцію паренхіми оцінювали як низьку в 0,76 (0,07) бала. Кількість двоядерних гепатоцитів зменшилася на 3,69 % (0,044) до 13,56 (3,89) % клітин.

Капсула (рис. 3.61 а, б) навколо губки Хт ацетату зменшилася на 28,38 % і становила 110,15 (3,77) мкм. Вона складалася переважно з компактно упакованих колагенових волокон, які лінійно відмежовувалися від печінкової паренхіми. Їх щільність становила 2,26 (0,10) бала. Між волокнами розміщувалася помірна кількість фібробластоподібних і лімфоїдних клітин та судини. У центрі між фрагментами БМ розміщувалися здебільшого відносно щільні, 2,07 (0,23) бала, ретикулярні волокна. Вони містили густу капілярну сітку та більшу кількість клітин порівняно з периферичними ділянками капсули. Залишалася помірна запальна реакція капсули – 1,12 (0,16) бала.

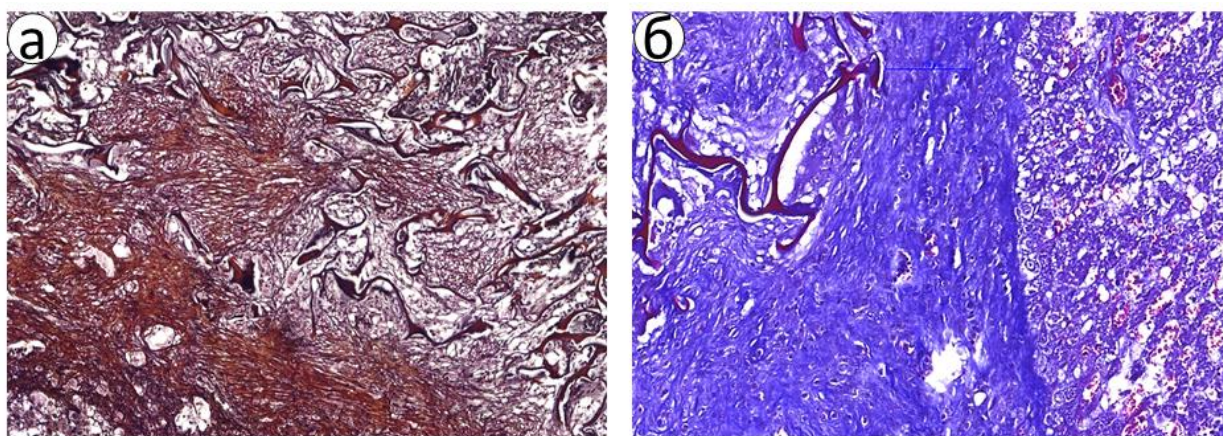


Рисунок 3.61 – Фрагмент капсули навколо губки БМ на 60-ту добу після застосування Хт ацетату: а – забарвлення за Гоморі; б – трихромне забарвлення за Массоном. Збільшення $\times 200$.

Через 60 діб дослідження губка Хт аскорбату містила лише поодинокі тучні клітини (1,07 (0,16) кл/мм²), що на 29,97 % ($p = 0,0073$) менше порівняно з попереднім терміном (рис. 3.62 а). Мастоцити містилися біля фрагментів БМ. Кількість міофібробластів (рис. 3.62 б) зменшилася на 10,95 % і

оцінювалась як низька в 1,25 (0,21) бала. Більшість α -SMA-позитивних клітин розміщувалися між ретикулярними волокнами та фрагментами БМ, а також частково – в товщі капсули.

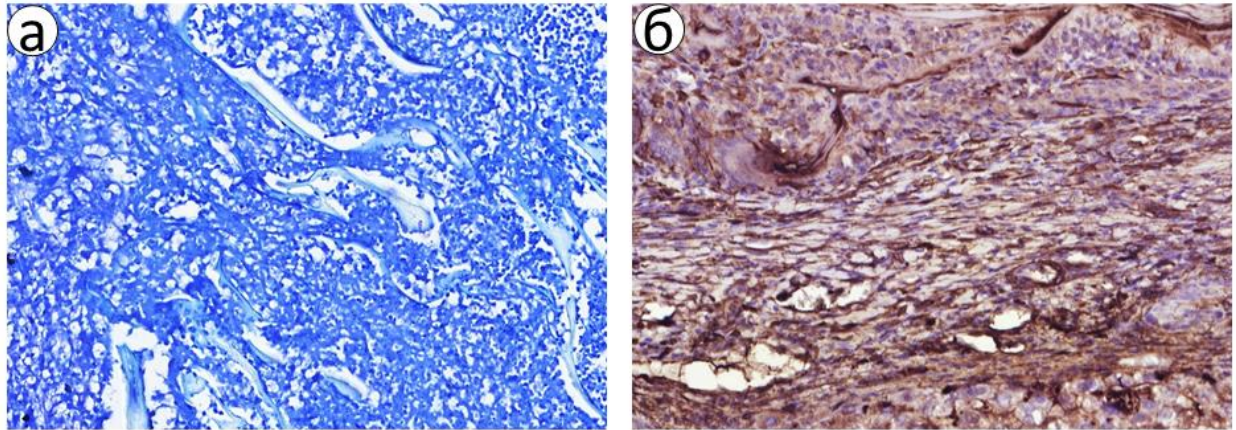


Рисунок 3.62 – Фрагмент капсули навколо БМ на 60-ту добу після застосування Хт ацетату: а – забарвлення толуїдиновим синім; б – ІГХ дослідження експресії до alpha-SMA. Збільшення $\times 200$.

Індекс проліферації Ki-67-позитивних клітин (рис. 3.63) становив 9,91 (1,56) %, що на 34,38 % менше порівняно з 30 добою експерименту ($p = 0,0027$). Ki-67-позитивні клітини містилися переважно в периферичній зоні капсули та прилеглих ділянках паренхіми печінки.

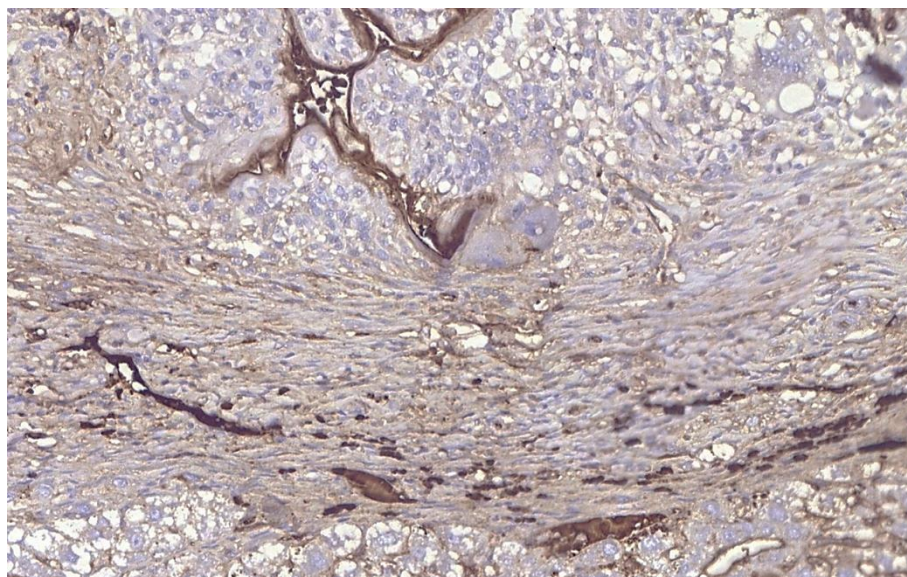


Рисунок 3.63 – Фрагмент печінки щура на 60 добу після застосування Хт ацетату. ІГХ дослідження експресії Ki-67. Збільшення $\times 400$.

Кількість імунних клітин капсули наприкінці експерименту зберегла тенденцію до зниження, хоч і підтримувалася незначна запальна реакція (рис. 3.64 а, б). Так, CD68-позитивних клітин було 85,30 (3,45) кл/мм², що на 29,90 % ($p = 0,0062$) менше ніж на 30-ту добу. Більшість макрофагів M1-типу знаходились на поверхні Хт губки. Кількість CD163 зменшилась на 13,62 % ($p = 0,015$), що становило 82,45 (4,29) кл/мм². Співвідношення M1/M2-типу макрофагів становило 1,04 (0,03), що вказувало на незначну прозапальну перевагу макрофагів M1-типу.

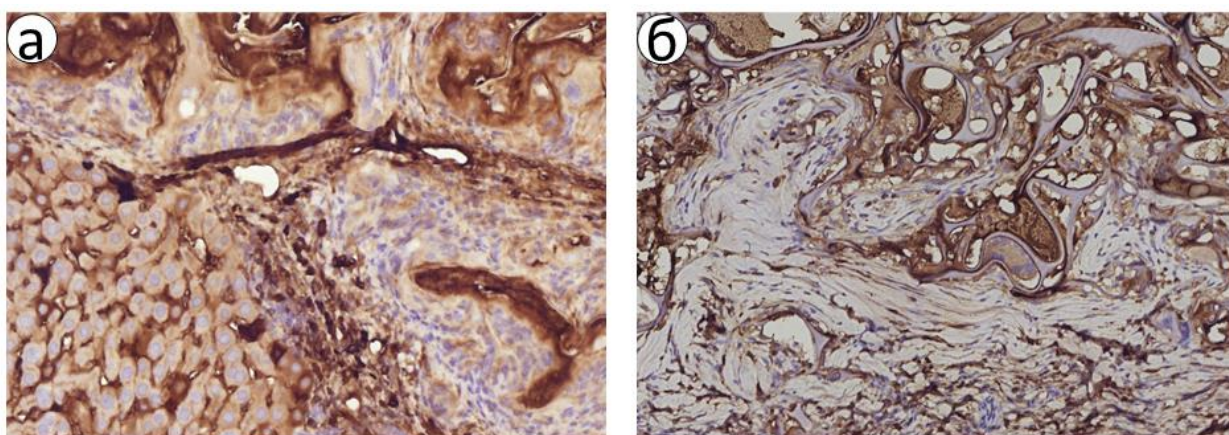


Рисунок 3.64 – Фрагмент печінки щура на 60 добу після застосування Хт ацетату. ІГХ дослідження експресії: а – CD68; б – CD163. Збільшення $\times 400$.

Цитотоксичні Т-лімфоцити (рис. 3.65 а) також продемонстрували достовірне зниження до 68,33 (2,29) кл/мм², що на 14,23 % ($p = 0,036$) менше за показник попереднього терміну. Регуляторні Т-лімфоцити (рис. 3.65 б) були в кількості 65,24 (2,34) кл/мм², що статистично значуще менше порівняно з 30-ю добою на 10,03 % ($p = 0,028$). У співвідношені CD8/FOXP3 на відміну від попередніх термінів з'явилася мінімальна перевага 1,05 (0,09) прозапальних цитотоксичних Т-лімфоцитів. Даний ефект можна пов'язати з тим, що відносно значна кількість фрагментів Хт губки на 60-ту добу дослідження залишалась в дефекті паренхіми печінки і не зазнала повної деградації. Проте загальне зменшення імунних клітин обох груп вказує на зменшення активності запального процесу довкола гемостатичного матеріалу.

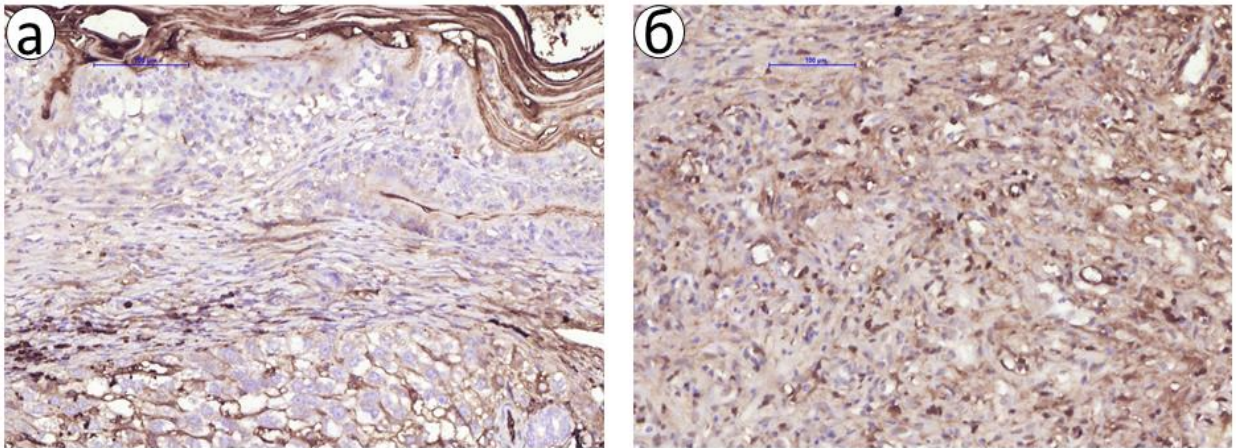


Рисунок 3.65 – Фрагмент печінки щура на 60 добу після застосування Хт ацетату. ІГХ дослідження експресії: а – CD8; б – FOXP3. Збільшення $\times 400$.

Таким чином, за 60 діб експерименту губка Хт ацетату втратила свою структуру, фрагментувалась на дрібні елементи, що були оточені сполучнотканинною капсулою, проте повністю не деградувала і залишилася наявною в дефекті паренхіми печінки щура. У БМ та капсулі постійно підтримувалася помірна запальна реакція. На периферії капсули відбувалося відновлення паренхіми печінки з незначними фіброзними включеннями.

3.3.5 Морфологічна характеристика закриття ран печінки після використання Хт Асп/Глу = 1/1

Хт Асп/Глу = 1/1 на 7-му добу дослідження переважно на периферії був частково фрагментований (рис. 3.66 а, б), а у центральній частині зберігав свою структуру. Навколо Хт аерогелю спостерігалася виражена запальна реакція. В ексудаті визначалась велика кількість поліморфноядерних нейтрофілів, лімфоцитів та макрофагів, що розміщувалися навколо фрагментів гемостатичного матеріалу. Щільність лейкоцитів, що контактували з Хт аерогелем та запальну реакцію в ньому оцінювали як високі, що становили 2,83 (0,18) і 2,48 (0,20) бала відповідно. У зв'язку з набряком та запальною інфільтрацією дефект паренхіми печінки значно перевищував операційну травму, площа якого складала 11,51 (0,45) мм^2 .

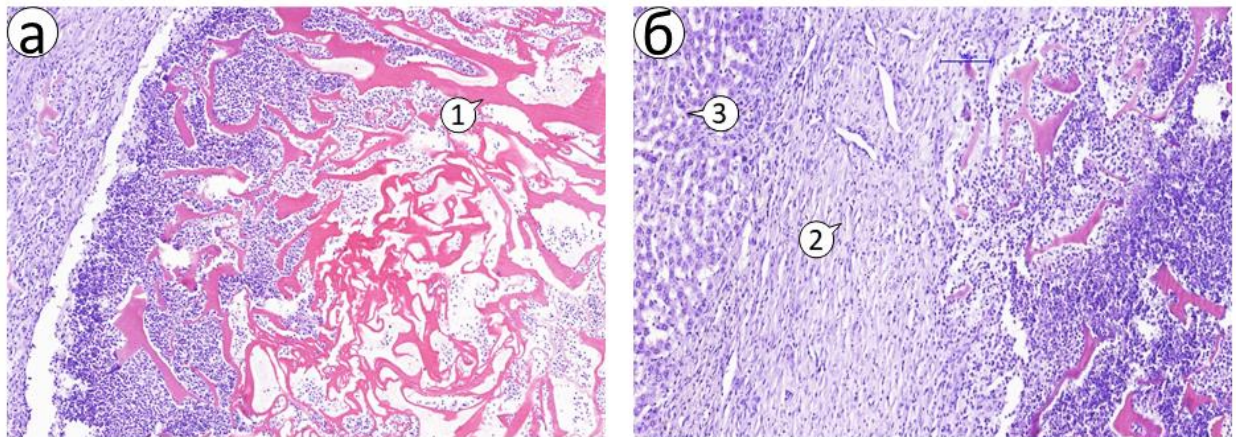


Рисунок 3.66 – Фрагмент паренхіми печінки щура на 7-му добу після застосування Хт Асп/Глу = 1/1. Забарвлення гематоксилін-еозином. Позначення: 1 – Хт аерогель; 2 – капсула; 3 – печінкова паренхіма. Збільшення: а – $\times 100$; б – $\times 200$.

Площа БМ становила $9,07 (0,36) \text{ мм}^2$. Вростання СТ в Хт Асп/Глу = 1/1 на цьому етапі було незначним – $1,04 (0,06)$ бала, проте практично всі фрагменти оточені запальним інфільтратом. У печінковій паренхімі, що оточувала капсулу БМ, спостерігались інтерстиційний набряк, розширення печінкових балок, дистрофічні зміни, некроз гепатоцитів. Запальну реакцію паренхіми оцінювали як помірну – $1,48 (0,13)$ бала, що підтверджувалася наявністю макрофагів на лімфоцитів довкола некротичних ділянок. Кількість двоядерних гепатоцитів становила $12,32 (4,21) \%$.

Навколо Хт аерогелю була наявна капсула (рис. 3.67 а, б), товщиною $441,5 (36,27) \text{ мкм}$. Вона складалася як з ретикулярних, так і колагенових волокон, які перепліталися між собою. Щільність ретикулярних волокон була дещо вищою – $1,75 (0,25)$ бала порівняно з $0,83 (0,11)$ бала в колагенових волокнах. Капсула циркулярно охоплювала Хт Асп/глу = 1/1 із запальним ексудатом і щільно контактувала з печінковою паренхімою. Вона мала досить виражену судинну сітку та велику кількість клітин, що дифузно розміщувалися. Запальна реакція капсули була сильною – $2,75 (0,15)$ бала і поширювалася на всю її товщу.

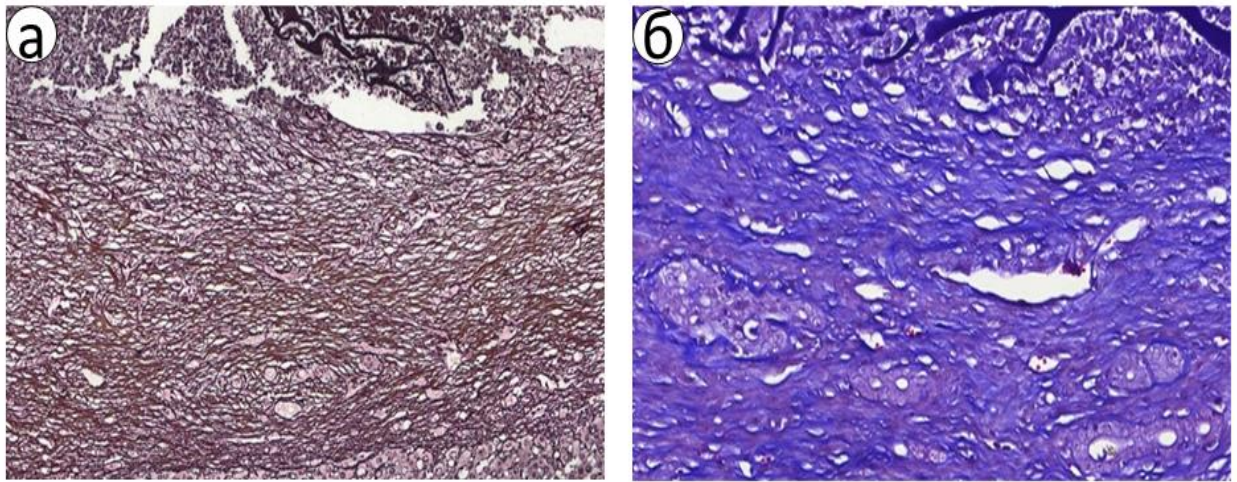


Рисунок 3.67 – Фрагмент капсули навколо губки БМ на 7-му добу після застосування Хт Асп/Глу = 1/1: а – забарвлення за Гоморі; б – трихромне забарвлення за Массоном. Збільшення $\times 200$.

На 7-му добу дослідження в периферичних зонах капсули навколо Хт Асп/Глу = 1/1 містилося $7,51 (3,34)$ кл/мм² тучних клітин (рис. 3.68 а). А також між волокнами дифузно розміщувалася велика кількість ($2,53 (0,11)$ бала) міофібробластів (рис 3.68 б).

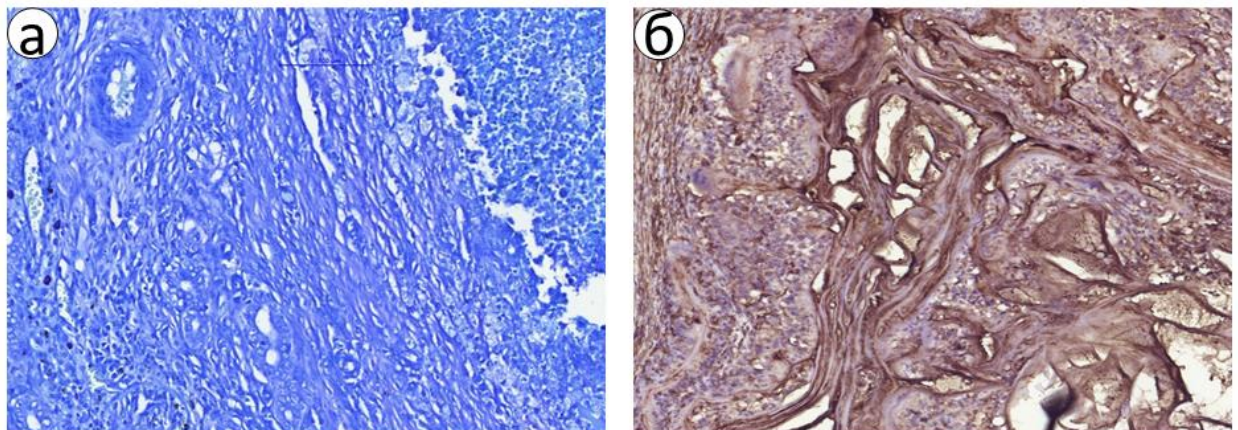


Рисунок 3.68 – Фрагмент капсули навколо БМ на 7-му добу після застосування Хт Асп/Глу = 1/1: а – забарвлення толуїдиновим синім; б – ІГХ дослідження експресії alpha-SMA. Збільшення $\times 200$.

Кількість Кі-67-позитивних клітин (рис. 3.69) становила $121,7 (13,68)$ кл/мм², а індекс проліферації знаходився у межах $17,13 (4,07)$ %.

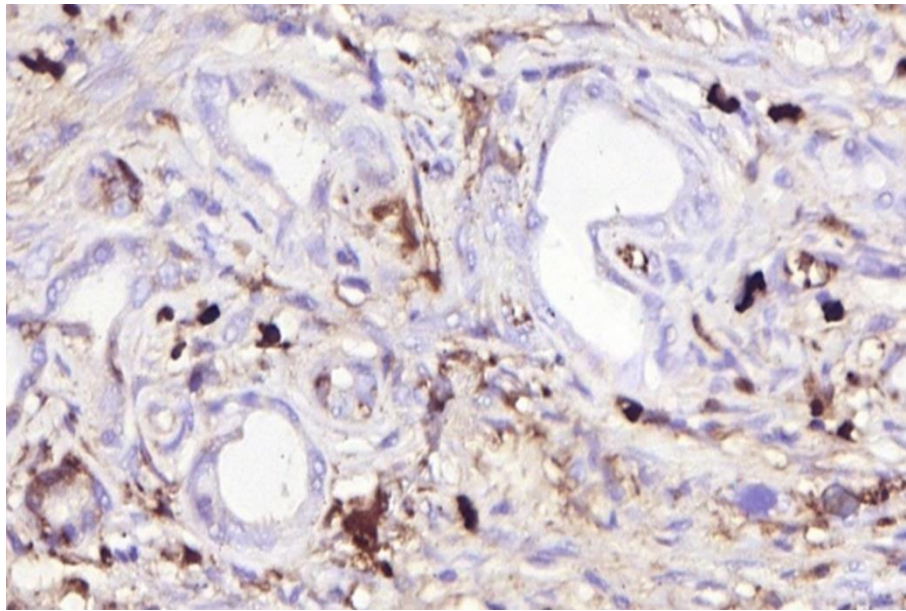


Рисунок 3.69 – Фрагмент печінки щура на 7-му добу після застосування Хт Асп/Глу = 1/1. ІГХ дослідження експресії Ki-67. Збільшення $\times 400$.

Визначення експресії CD68 та CD163 (рис. 3.70 а, б) показало переважання макрофагів M1-типу 216,25 (11,64) кл/мм² над макрофагами M2-типу 79,92 (6,22) кл/мм². Співвідношення CD68/CD163-позитивних клітин становило 2,89 (0,28).

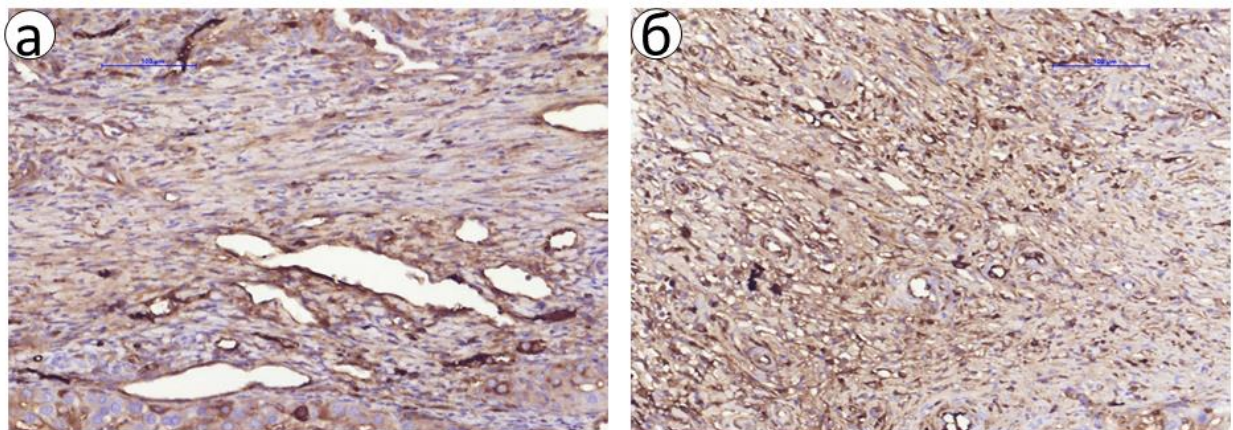


Рисунок 3.70 – Фрагмент капсули навколо БМ на 7-му добу після застосування Хт Асп/Глу = 1/1. ІГХ дослідження експресії: а) – CD68; б) – CD163. Збільшення $\times 200$.

Переважання прозапальних клітин спостерігалось також під час дослідження експресії CD8 та FOXP3 (рис. 3.71 а, б). Так, кількість цитотоксичних Т-лімфоцитів

становила 149,08 (8,18) кл/мм², а регуляторних Т-лімфоцитів 73,25 – (5,52) кл/мм². Співвідношення CD8/FOXP3-позитивних клітин становило 2,09 (0,23).

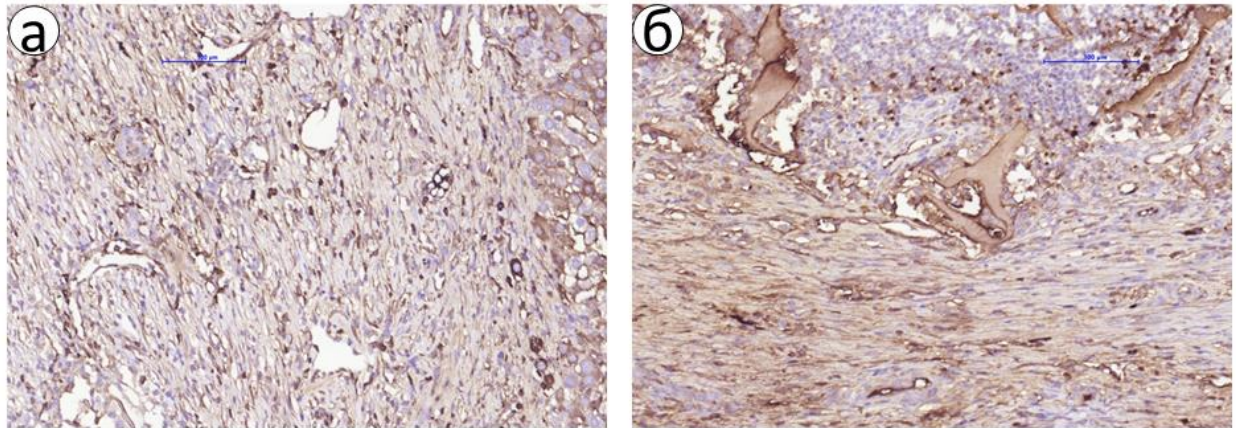


Рисунок 3.71 – Фрагмент капсули довкола БМ на 7-му добу після застосування Хт Асп/Глу = 1/1. ІГХ дослідження експресії: а) – CD8; б) – FOXP3. Збільшення $\times 200$.

Через 30 діб дослідження спостерігали збільшення фрагментації та гетерогенності Хт аерогелю (рис. 3.72). Проте в центральній частині залишалася безклітинна, майже незмінена частина БМ. Навколо елементів Хт Асп/Глу = 1/1 містилася велика кількість клітин, значну перевагу серед яких мали поліморфноядерні нейтрофіли, хоча вираженість запальної реакції в БМ оцінювали як сильну в 1,93 (0,22) бала, вона зменшилася на 22,18 % ($p = 0,037$). Розміри дефекту паренхіми скоротилися на 23,98 % ($p = 0,0083$) і становила 8,75 (0,48) мм². Площа Хт Асп/Глу = 1/1 зменшилася 11,36 % ($p = 0,013$) до 8,04 (0,32) мм². З боку капсули на 13,46 % ($p = 0,041$) збільшилося вrostання СТ. Щільність лейкоцитів навколо БМ становила 2,77 (0,20), що статистично не відрізнялося від 7-ї доби ($p = 0,062$). У паренхімі зберігалися дистрофічні зміни, інтерстиційний набряк, поодинокий апоптоз, проте був відсутній некроз гепатоцитів. Виявляли незначну кількість лімфоцитів та макрофагів. Вираженість запального процесу зменшилася на 16,22 % ($p = 0,025$). Також на 2,93 % ($p = 0,031$) збільшилася кількість двоядерних гепатоцитів.

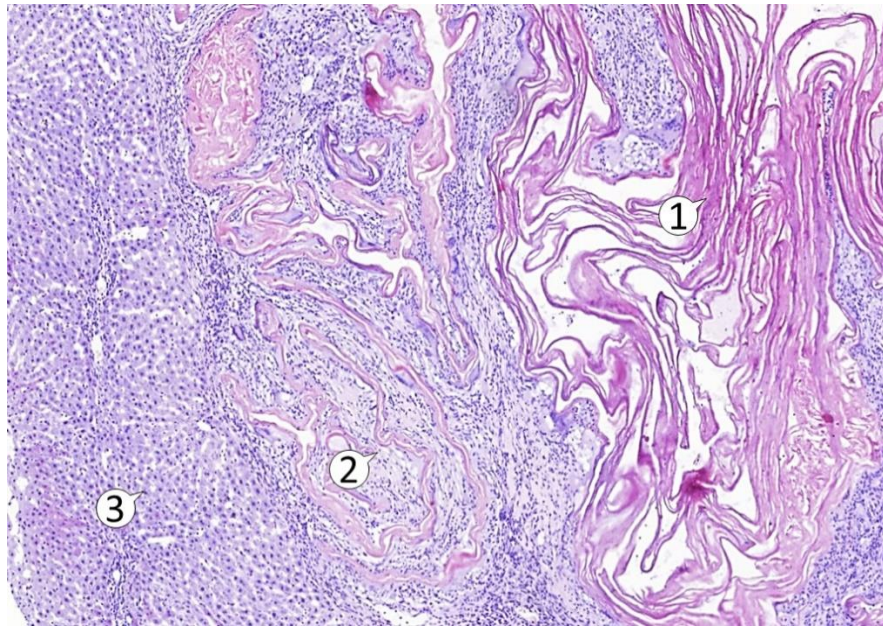


Рисунок 3.72 – Фрагмент паренхіми печінки щура на 30-ту добу після застосування Хт Асп/Глу = 1/1. Забарвлення гематоксилін-еозином. Позначення: 1 – Хт аерогель; 2 – капсула; 3 – печінкова паренхіма. Збільшення $\times 200$.

Товщина капсули навколо Хт аерогелю на 30-ту добу становила 254,82 (14,08) мкм, що на 42,41 % ($p = 0,0029$) менше у порівнянні з 7 добою. Вона складалась з приблизно рівної кількості ущільнених ретикулярних та колагенових волокон (рис. 3.73 а, б).

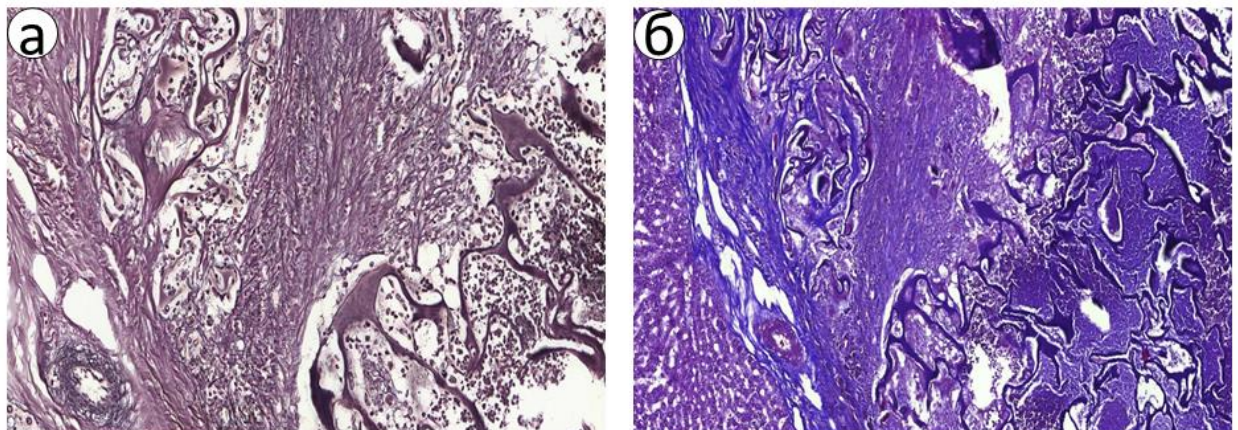


Рисунок 3.73 – Фрагмент капсули навколо губки БМ на 30-ту добу після застосування Хт Асп/Глу = 1/1: а – забарвлення за Гоморі; б – трихромне забарвлення за Массоном. Збільшення $\times 200$.

Між волокнами розміщувалися судини та велика кількість лімфодних і фібробластоподібних клітин. Вираженість запальної реакції в капсулі знизилася на 11,64 % (0,03) до 2,43 (0,17) бала ($p = 0,024$). Особливістю цього терміну було, що на фоні незначного вrostання СТ в Хт аерогель його фрагменти «занурювалися» в структуру товстої капсули, проте сформована судинна сітка добре візуалізувалась на периферії та в товщі капсули, а ближще до гемостатичного матеріалу визначалась лише рідкі тубулярні структури.

Кількість тучних клітин становила 3,16 (0,35) кл/мм², що на 57,93 % ($p = 0,0034$) менше порівняно із 7-ю добою дослідження (рис. 3.74 а). Більшість клітин розміщувались у ділянках капсули, що безпосередньо контактувала з Хт Асп/Глу = 1/1. Кількість міофібробластів оцінювали, як велику в 2,86 (0,23) бала, що на 13,04 % ($p = 0,001$) більше відносно попереднього терміну (рис. 3.74 б). Переважна кількість цих клітин спостерігалась вздовж новосформованих судин.

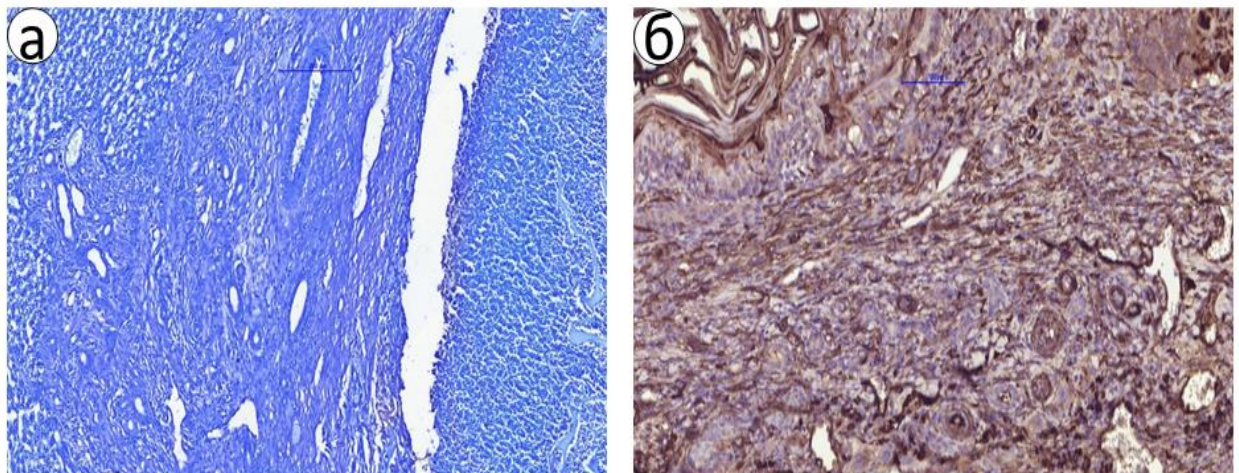


Рисунок 3.74 – Фрагмент капсули навколо БМ на 30-ту добу після застосування Хт Асп/Глу = 1/1: а – забарвлення толуїдиновим синім; б – ІХ дослідження експресії до alpha-SMA. Збільшення $\times 200$.

Визначення експресії Ki-67 продемонструвало зниження кількості Ki-67 позитивних клітини на 20,93 % ($p = 0,0057$). Індекс проліферації становив

13,59 (2,23) %. Проліферуючі клітини розміщувалися переважно в периферичних зонах капсули та прилягаючій до неї паренхімі печінки (рис. 3.75).

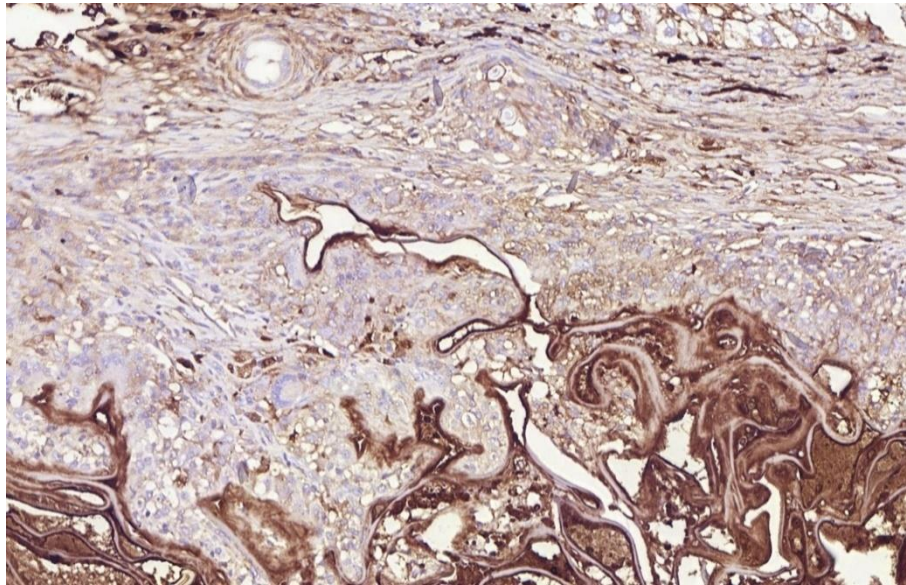


Рисунок 3.75 – Фрагмент печінки щура на 30-ту добу після застосування Хт Асп/Глу = 1/1. ІГХ дослідження експресії Ki-67. Збільшення $\times 400$.

ІГХ дослідження CD68 та CD163 (рис. 3.76 а, б) продемонструвало велику кількість прозапальних макрофагів М1-типу – 162,39 (14,87) кл/мм², що знаходились переважно на поверхні БМ, або між його фрагментами. Порівняно з 7-ю добою дослідження кількість макрофагів М1-типу достовірно знизилась на 24,91 % ($p = 0,0083$).

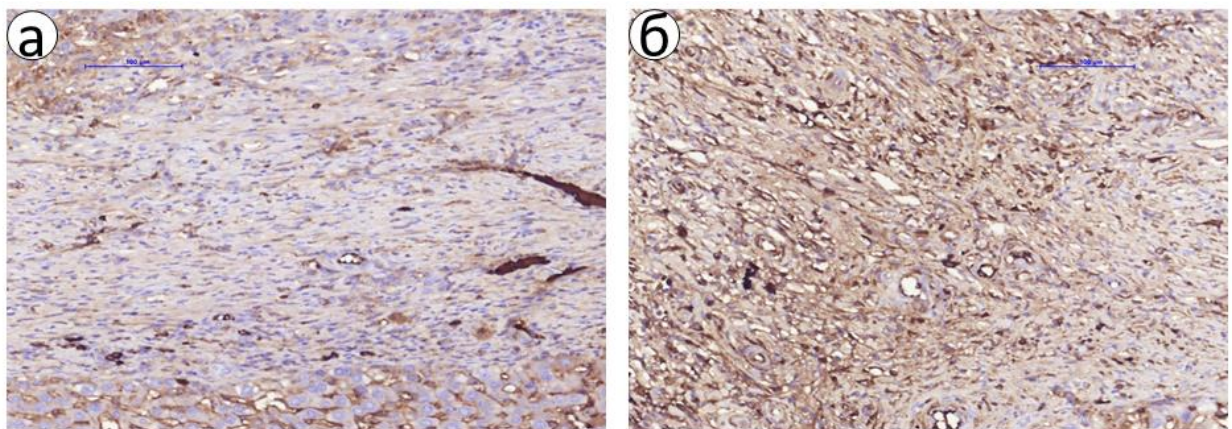


Рисунок 3.76 – Фрагмент печінки щура на 30-ту добу після застосування Хт Асп/Глу = 1/1. ІГХ дослідження експресії: а) – CD68, б) – CD163. Збільшення $\times 200$.

Кількість макрофагів M2-типу збільшилася на 4,55 % ($p = 0,047$) і становила 83,56 (5,72) кл/мм². Співвідношення M1/M2-типу макрофагів демонструвало прозапальну перевагу макрофагів M2-типу, що становило 1,95 (0,02).

Визначення експресії CD8 та FOXP3 (рис. 3.77 а, б) продемонструвало зменшення кількості клітин обох груп Т-лімфоцитів. Так, CD8-позитивних клітин було 110,32 (4,73) кл/мм², що на 26,0 % ($p = 0,0092$) менше порівняно з попереднім терміном. Кількість FOXP3-позитивних клітин зменшилася на 26,8 % ($p = 0,0088$) і становила 53,62 (3,89).

На 60-ту добу дослідження Хт Асп/Глу = 1/1 повністю фрагментувався (рис. 3.78), периферичні ділянки, що більше зазнавали біодеградації, втратили свою структуру, тоді як у центрі дефекту містилися великі за розміром елементи БМ, які практично не відрізнялися від первинного Хт Асп/Глу = 1/1. На 36,05 % ($p = 0,0075$) знизилася щільність лейкоцитів у БМ до 1,75 (0,23) бала, а також на 24,0 % ($p = 0,013$) зменшилася загальна кількість клітин, що перебувала в безпосередньому контакті з Хт аерогелем, яку оцінювали як помірну в 1,42 (0,26) бала.

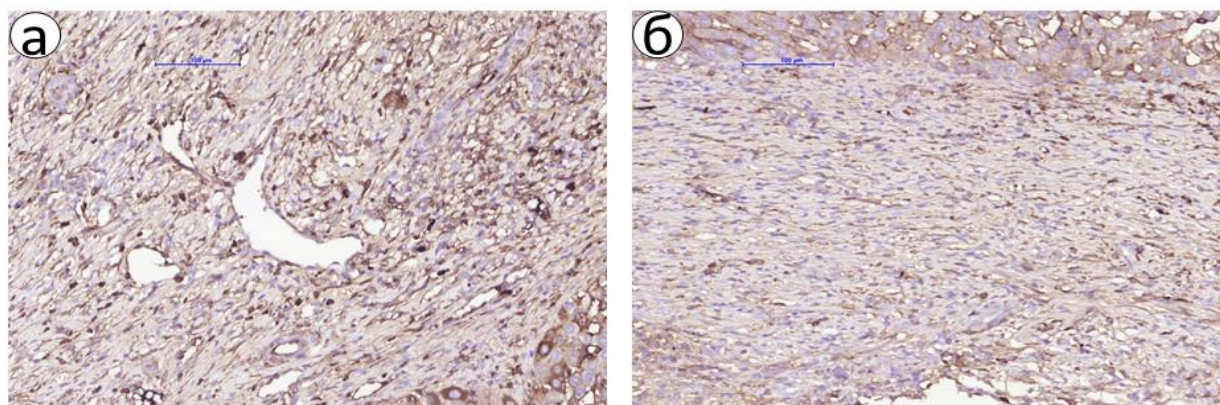


Рисунок 3.77 – Фрагмент печінки щура на 30-ту добу після застосування Хт Асп/Глу = 1/1. ІГХ дослідження експресії: а) – CD8; б) – FOXP3. Збільшення $\times 200$.

Розміри дефекту паренхіми зменшилися на 27,19 % ($p = 0,0054$) порівняно з 30-ю добою експерименту і становила 5,62 (0,36) мм². Площа Хт Асп/Глу = 1/1 зменшилася на 38,92 % ($p = 0,0023$) до 4,51 (0,26) мм². Вростання

СТ збільшилось на 37,7% ($p = 0,0031$), проте центральні фрагменти так і не були оточені СТ. У печінковій паренхімі виявлені помірні дистрофічні та фіброзні зміни.

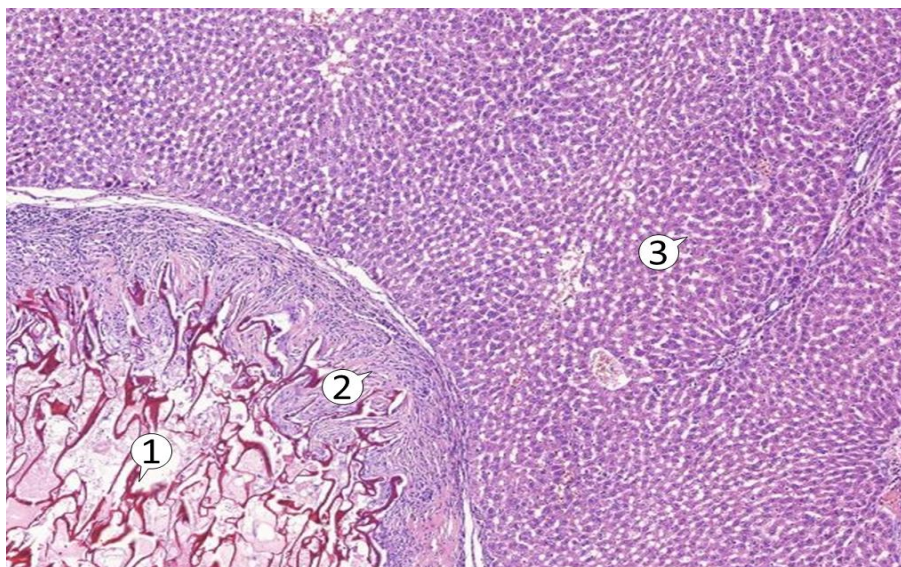


Рисунок 3.78 – Фрагмент паренхіми печінки щура на 60-ту добу після застосування Хт Асп/Глу = 1/1. Забарвлення гематоксилін-еозином. Позначення: 1 – Хт аерогель; 2 – капсула; 3 – печінкова паренхіма. Збільшення $\times 200$.

Вивчення капсули на 60-ту добу дослідження показало її незначне стоншення на 4,87 %, що не мало статистичної значущості ($p = 0,76$) і становило 233,37 (11,69) мкм. Капсула здебільшого складалася із щільного шару колагенових волокон, що розміщувались у центральній та периферичній зонах капсули, а також компактно упакованих ретикулярних волокон, що охоплювали фрагменти Хт аерогелю (рис. 3.79 а, б). Щільність колагенових волокон оцінювали в 2,76 (0,27) бала, як високу, щільність ретикулярних волокон у 1,32 (0,17), як помірну. У капсулі була добре виражена сітка кровоносних судин рвзного діаметру та помірна кількість лімфоїдних та фібробластоподібних клітин. Запальну реакцію капсули оцінювали як помірну в 2,31 (0,13) бали, що на 4,36 % менше порівняно з 30-ю добою і не мало статистичної відмінності ($p = 0,065$).

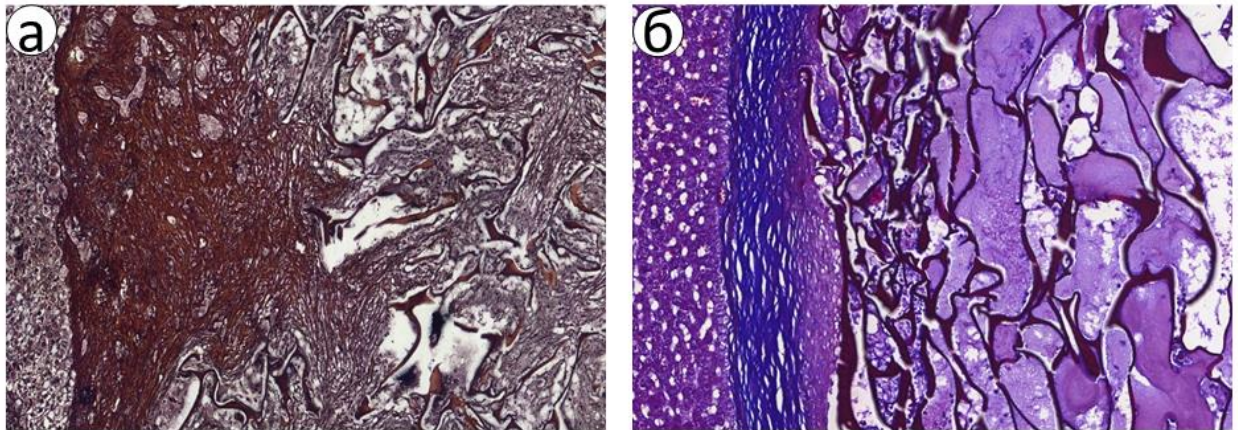


Рисунок 3.79 – Фрагмент капсули навколо губки БМ на 60-ту добу після застосування Хт Асп/Глу = 1/1: а – забарвлення за Гоморі; б – трихромне забарвлення за Массоном. Збільшення $\times 200$.

Кількість тучних клітин (рис. 3.80 а) була незначною 1,52 (0,23) кл/см², що на 14,88 % ($p = 0,013$) менше порівняно з 30-ю добою. Мастоцити розміщувалися переважно поряд з фрагментами Хт Асп/Глу = 1/1. Визначення експресії α -SMA (рис. 3.80 б) продемонструвало помірну кількість – 2,34 (0,21) бала міофібробластів, що на 20,55 % ($p = 0,0077$) менше від попереднього терміну. Міофібробласти розміщувалися переважно вздовж судин у місцях вrostання капсули та між ретикулярними волокнами в ділянках меншої щільності СТ.

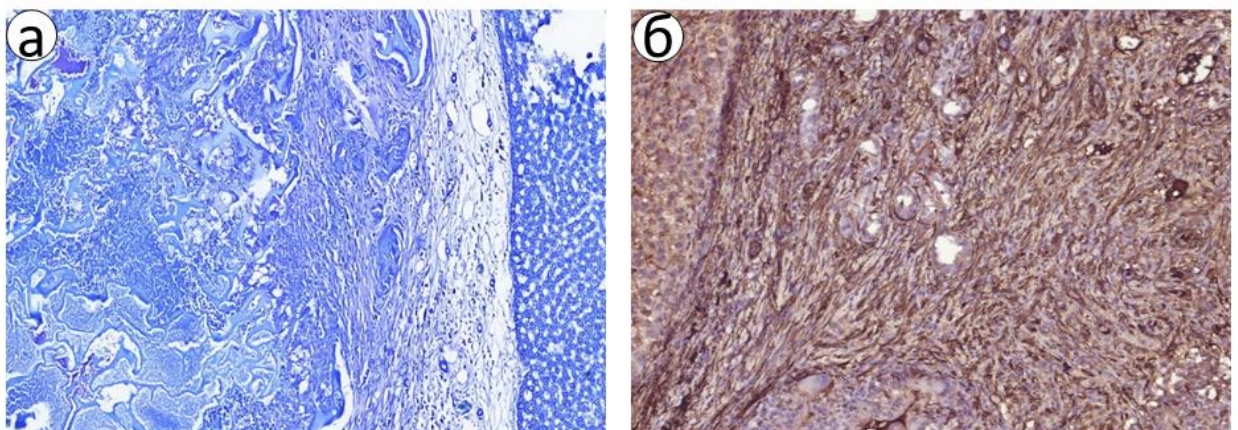


Рисунок 3.80 – Фрагмент капсули навколо БМ на 60-ту добу після застосування Хт Асп/Глу = 1/1: а – забарвлення толуїдиновим синім; б – ІГХ дослідження експресії до α -SMA. Збільшення $\times 200$.

Дослідження експресії Ki-67 (рис. 3.81) продемонструвало зменшення проліферативної активності на 9,89 % ($p = 0,042$). Індекс проліферації становив 11,89 (2,61) %. Ki-67-позитивні клітини розміщувалися переважно на краю печінкової паренхіми, що безпосередньо контактувала з капсулою. У більш глибоких шарах тканини печінки проліферація гепатоцитів не перевищувала фізіологічний рівень.

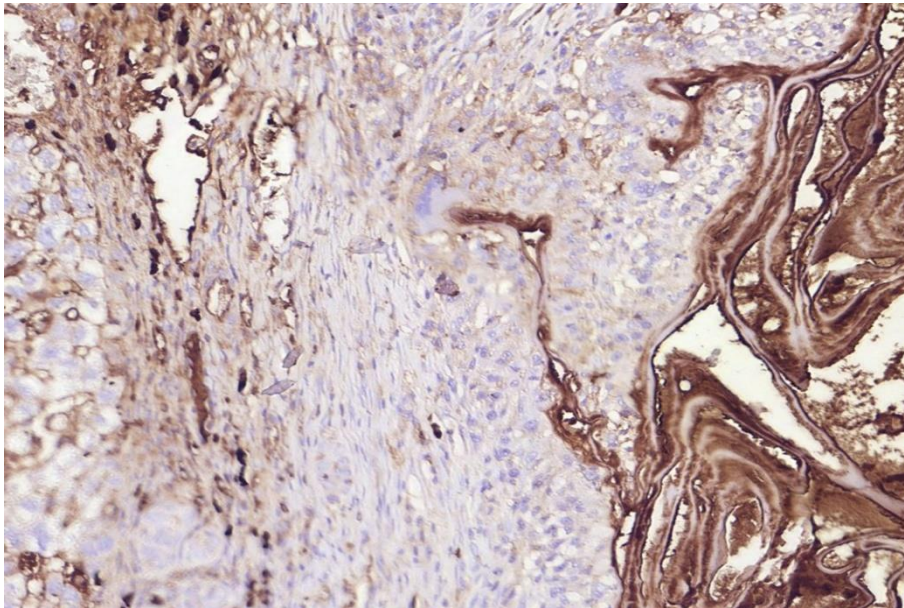


Рисунок 3.81 – Фрагмент печінки щура на 60-ту добу після застосування Хт Асп/Глу = 1/1. ІГХ дослідження експресії Ki-67. Збільшення $\times 400$.

CD68-позитивні клітини (рис. 3.82 а) через 60 діб дослідження становили 158,41 (11,04) кл/мм², що на 1,84 % менше порівняно з 30-ю добою, проте це не мало статистично значущої відмінності ($p = 0,12$). Кількість CD163-позитивних клітин (рис. 3.82 б) становила 104,55 (6,30) кл/мм², що на 26,27 % ($p = 0,009$) збільшилося порівняно з попереднім терміном. Співвідношення M1/M2-типу макрофагів становило 1,52 (0,04). Обидві групи клітин розміщувалися в СТ, що щільно оточувала фрагментовані елементи Хт аерогелю. Суттєве переважання макрофагів M1-типу вказувало на активну запальну відповідь на гемостатичний матеріал, що продовжувала тривати на кінець дослідження.

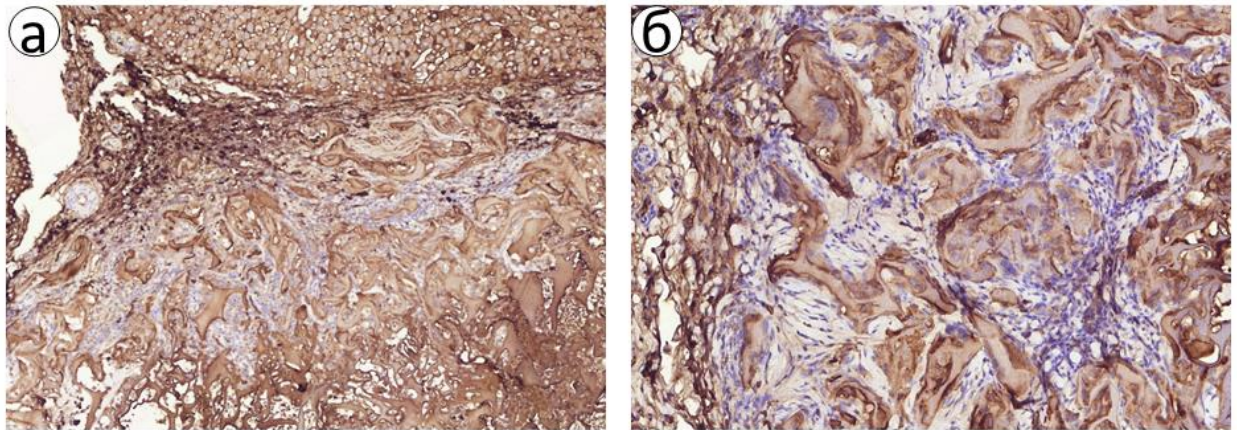


Рисунок 3.82 – Фрагмент печінки щура на 60-ту добу після застосування Хт Асп/Глу = 1/1. ІГХ дослідження експресії: а) – CD68, б) – CD163. Збільшення $\times 200$.

Під час дослідженні експресії CD8 та FOXP3 було виявлено (рис. 3.83 а, б), що кількість цитотоксичних Т-лімфоцитів знизилась на 22,72 % ($p = 0,0051$) у порівнянні з 30-ю добою дослідження і становила 76,45 (3,12) кл/мм². Кількість регуляторних Т-лімфоцитів становила 43,37 (2,41), що на 14,13 % менше ($p = 0,023$). Співвідношення CD8/FOXP3 становило 1,77 (0,14). Більшість клітин, що розміщувалася в тій зоні капсули, безпосередньо контактувала з Хт Асп/Глу = 1/1. Переважання цитотоксичних Т-лімфоцитів також вказувало на те, що гемостатичний матеріал продовжує стимулювати прозапальну імунну відповідь.

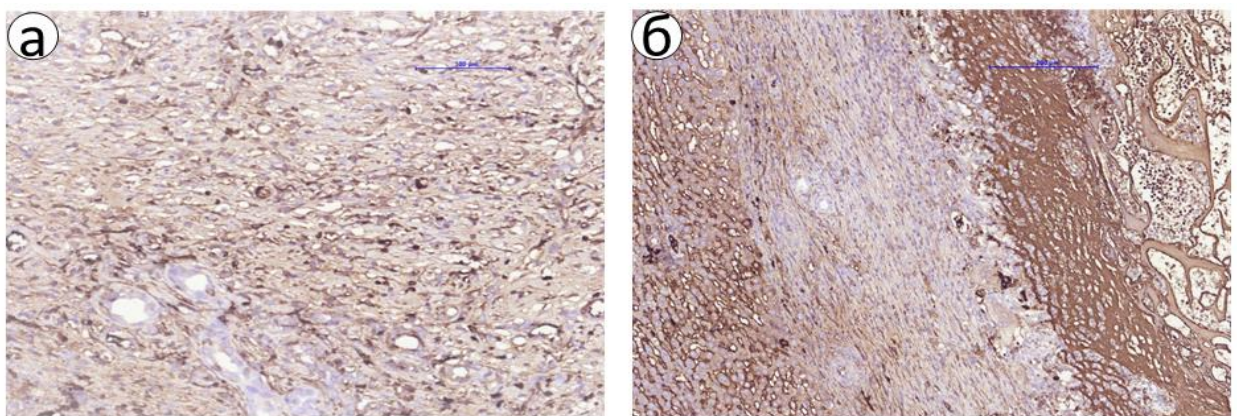


Рисунок 3.83 – Фрагмент печінки щура на 60-ту добу після застосування Хт Асп/Глу = 1/1. ІГХ дослідження експресії а) – CD8; б) – FOXP3. Збільшення $\times 200$.

Хт Асп/Глу = 1/1 за період дослідження менше зазнав біодеградації та резорбції, викликав виражений запальний процес, який тривав до 60-ї доби дослідження. Навколо Хт аерогелю сформувалася щільна, товста капсула, що повністю відмежовує БМ від печінкової паренхіми.

3.3.6 Морфологічна характеристика закриття ран печінки після використання використанням Хт/ПЕО = 1/3

На 7-му добу дослідження Хт мембрана частково втратила свою структуру та однорідність будови (рис. 3.84 а, б). На периферії були наявні ділянки резорбції БМ. У тісному контакті з Хт/ПЕО = 1/3 перебувала помірна кількість макрофагів, нейтрофілів та лімфоцитів, щільність яких оцінювали в 1,59 (0,08) бала.

Вираженість запальної реакції в БМ оцінювали, як помірну – 0,97 (0,15) бала. Між фрагментами поширювалося вrostання СТ – 1,17 (0,29) бали. Розміри дефекту паренхіми становили 4,91 (0,27) мм², тоді як площа Хт мембрани була 2,98 (0,25) мм². Ззовні капсули БМ містилася печінкова паренхіма з помірним інтерстиційним набряком, розширенням печінкових балок та незначною дистрофією гепатоцитів.

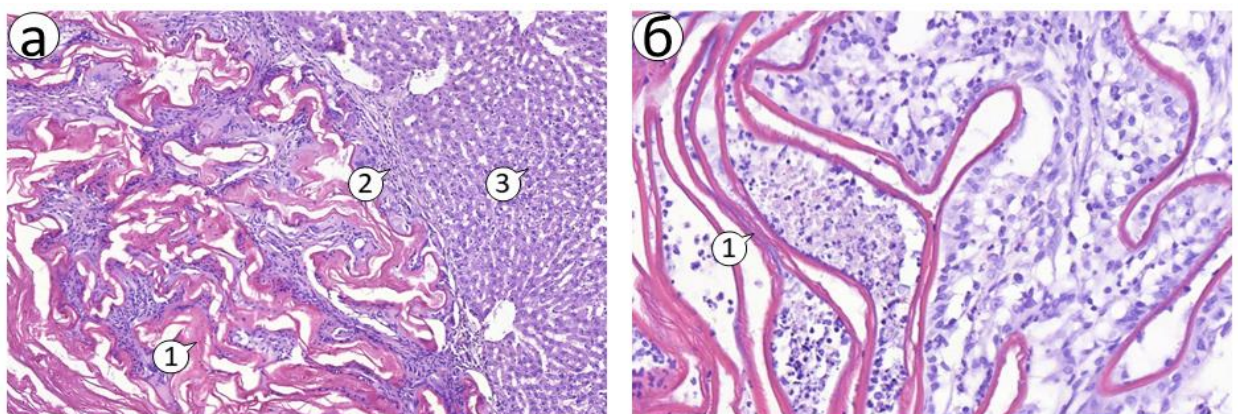


Рисунок 3.84 – Фрагмент паренхіми печінки щура на 7-му добу після застосування Хт/ПЕО = 1/3. Забарвлення гематоксилін-еозином. Позначення: 1 – Хт/ПЕО = 1/3; 2 – капсула; 3 – печінкова паренхіма. Збільшення: а) – $\times 100$; б) – $\times 200$.

Поодинокі ділянки апоптозу гепатоцитів були оточені макрофагами та лімфоцитами. Запальну реакцію печінкової паренхіми оцінювали як помірну в 0,65 (0,13) бала. Поряд з інфільтративними змінами візуалізувалася значна кількість дво- та багатоядерних гепатоцитів, що становили 27,58 (5,83) %. Капсула навколо Хт/ПЕО = 1/3 складалася переважно з ретикулярних волокон, щільність яких мала 1,04 (0,18) бала. На периферії розміщувалась незначна кількість пухко упакованих, різноспрямованих колагенових волокон (рис. 3.85 а, б).

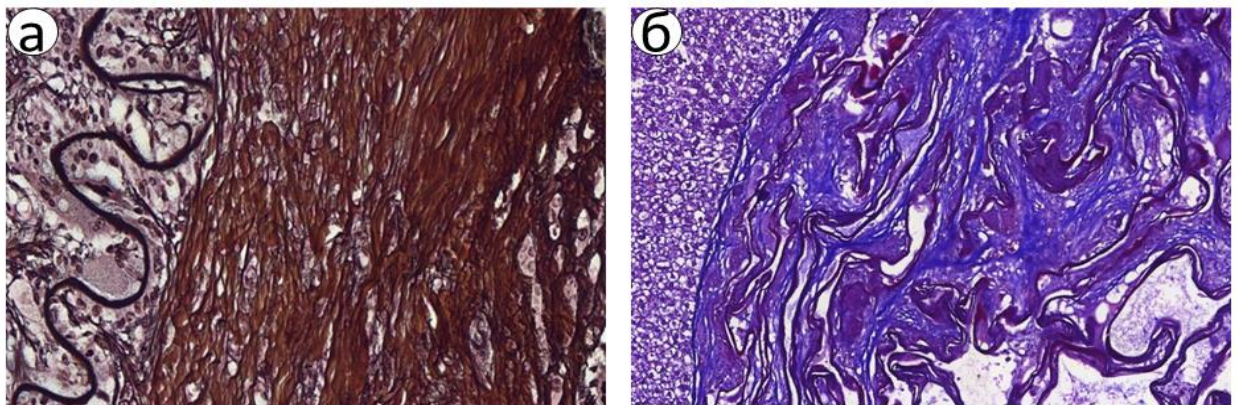


Рисунок 3.85 – Фрагмент капсули навколо губки БМ на 7-му добу після застосування Хт/ПЕО = 1/3: а – забарвлення за Гоморі; б – трихромне забарвлення за Массоном. Збільшення: а) – $\times 400$; б) – $\times 200$.

Між волокнами капсули містилася помірна кількість клітин округлої та веретеноподібної форми. Вираженість запальної реакції в капсулі оцінювали як незначну в 1,03 (0,16) бала. Товщина капсули навколо Хт мембрани значно варіювалася, середнє значення якої становило 179,27 (13,75) мкм. Периферична частина капсули мала більш чіткі контури, що відмежовували її від печінкової паренхіми, внутрішня частина продовжувалась у вростання СТ між фрагментами БМ.

Забарвлення толуїдиновим синім дозволило візуалізувати тучні клітини, кількість яких становила 7,73 (2,89) кл/мм² (рис. 3.86 а). Мастоцити переважно перебували в тісному контакті з Хт/ПЕО = 1/3 (рис 3.86 б). Визначення експресії α -SMA продемонструвало велику кількість міофібробластів, що

оцінювали в 2,64 (0,15) бала. Клітини містилися переважно в капсулі, що оточувала Хт мембрану та частково в прилеглій печінковій паренхімі.

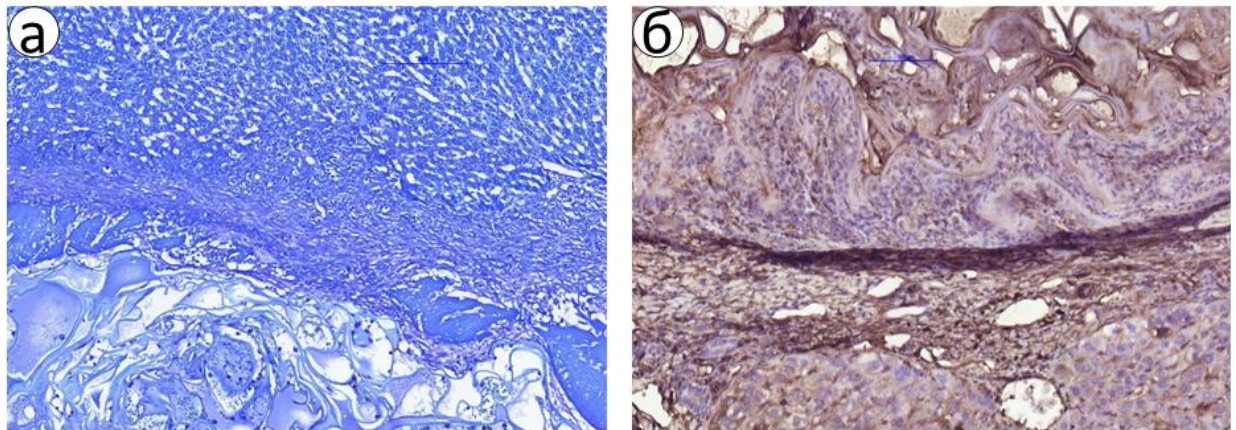


Рисунок 3.86 – Фрагмент капсули навколо БМ на 7-му добу після застосування Хт/ПЕО = 1/3: а – забарвлення толуїдиновим синім; б – ІГХ дослідження експресії до alpha-SMA. Збільшення $\times 200$.

ІГХ дослідження експресії Ki-67 продемонструвало досить значну кількість 201,73 (10,81) кл/мм² клітин, що перебувало на стадії проліферації (рис. 3.87). Ki-67-позитивні клітини містилися переважно в капсулі навколо Хт/ПЕО = 1/3 та в прилеглій печінковій паренхімі. Індекс проліферації становив 28,46 (4,02) %.

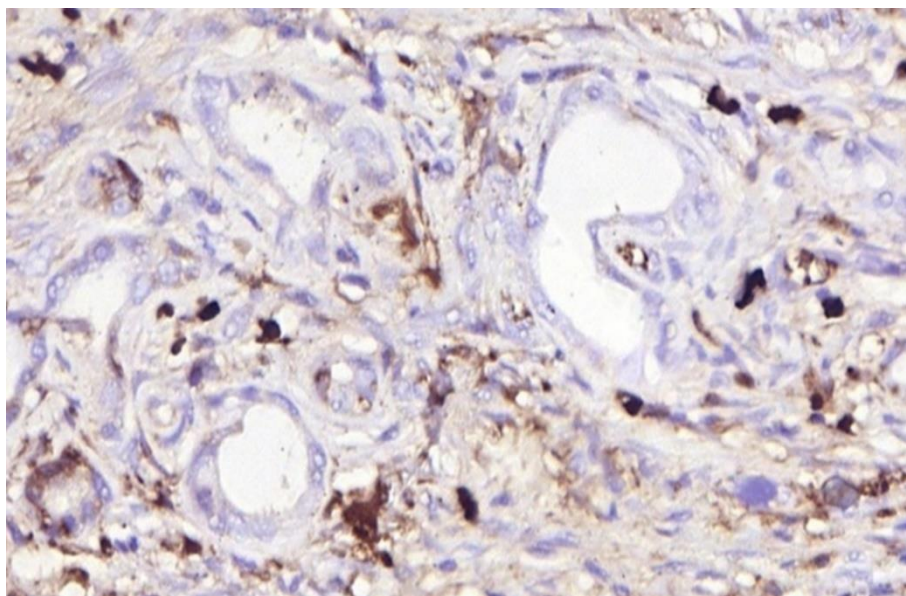


Рисунок 3.87 – Фрагмент печінки щура на 7-му добу після застосування Хт/ПЕО = 1/3. ІГХ дослідження експресії Ki-67. Збільшення $\times 400$.

ІГХ дослідження експресії CD68 виявило 154,55 (9,51) кл/мм² позитивних клітин та 150,64 (8,82) кл/мм² CD163-позитивних клітин (рис. 3.88 а, б). Макрофаги M1-типу знаходились в контактi з Хт мембраною. Макрофаги M2-типу розміщувались переважно в капсулі, а також незначана кількість даних клітин розміщувались у печінковій паренхімі поряд з капсулою. Співвідношення CD68/CD163-позитивних клітин становило 1,05 (0,06).

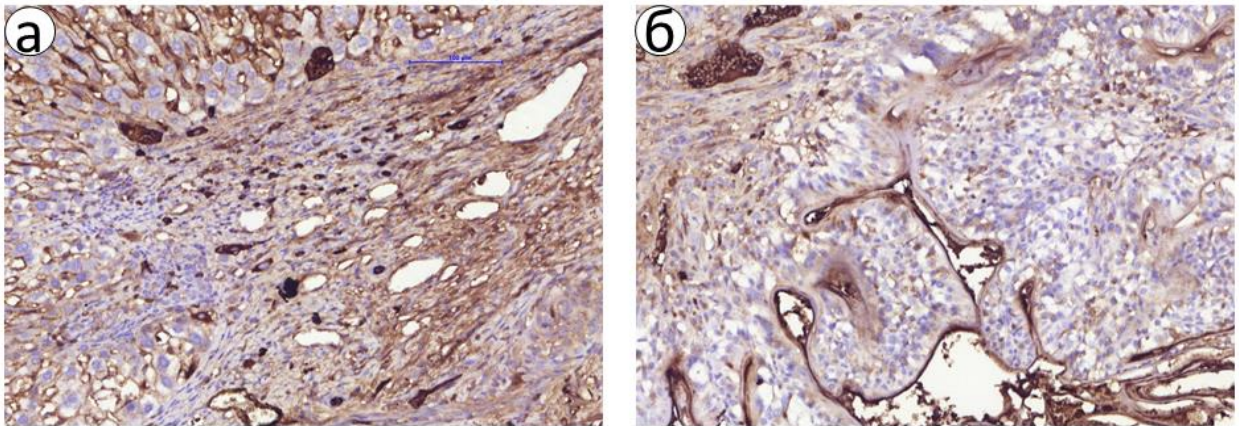


Рисунок 3.88 – Фрагмент капсули навколо БМ на 7-му добу після застосування Хт/ПЕО = 1/3. ІГХ дослідження експресії: а – CD68; б – CD163. Збільшення $\times 200$.

Кількість прозапальних CD8 позитивних клітин становила 130,73 (10,04) кл/мм², тоді як протизапальні FOXP3 позитивні клітини становили 121,82 (9,10) кл/мм² (рис. 3.89 а, б).

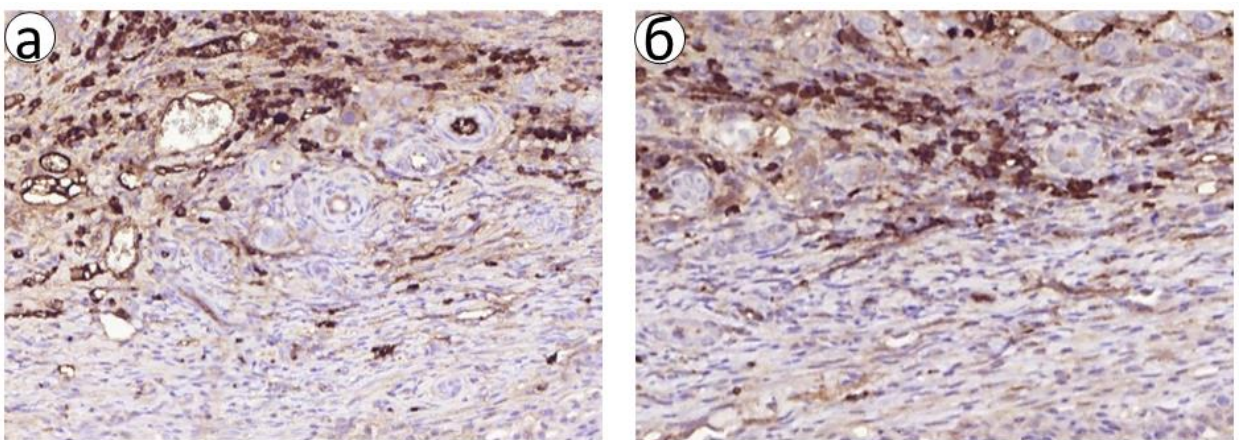


Рисунок 3.89 – Фрагмент капсули навколо БМ на 7-му добу після застосування Хт/ПЕО = 1/3. ІГХ дослідження експресії: а – CD8; б – FOXP3. Збільшення $\times 200$.

Співвідношення CD8/FOXP3 відповідно було 1,13 (0,11). Більшість імунних клітин знаходились в капсулі довкола Хт/ПЕО = 1/3 та прилеглий печінковій паренхімі

Через 30 діб дослідження Хт/ПЕО = 1/3 був майже повністю фрагментований (рис. 3.90). У центрі містилися елементи БМ більших розмірів, тоді як на периферії була велика кількість дрібних фрагментів, що втрачали свою структуру в наслідок поступової резорбції. У тісному контакті з Хт мембраною перебували макрофаги та гігантські клітини сторонніх тіл. Більшість елементів БМ, за винятком окремих центральних ділянок, перебували в оточенні СП з помірною кількістю лімфоцитів нейтрофілів та фібробластоподібних клітин.

Особливістю було те, що практично вся поверхня Хт мембрани, що контактувала з СТ, була вистелена епітеліальними клітинами. Площа дефекту скоротилася на 36,05 % ($p = 0,0011$) і становила 3,14 (0,30) мм². Хт/ПЕО = 1/3 займав площу 2,59 (2,98) мм², що зменшилася на 13,09 % ($p = 0,024$). Щільність клітин в Хт/ПЕО = 1/3 оцінювали в 1,24 (0,11) бала, що на 22,01 % ($p = 0,013$) менше порівняно з 7-ю добою.

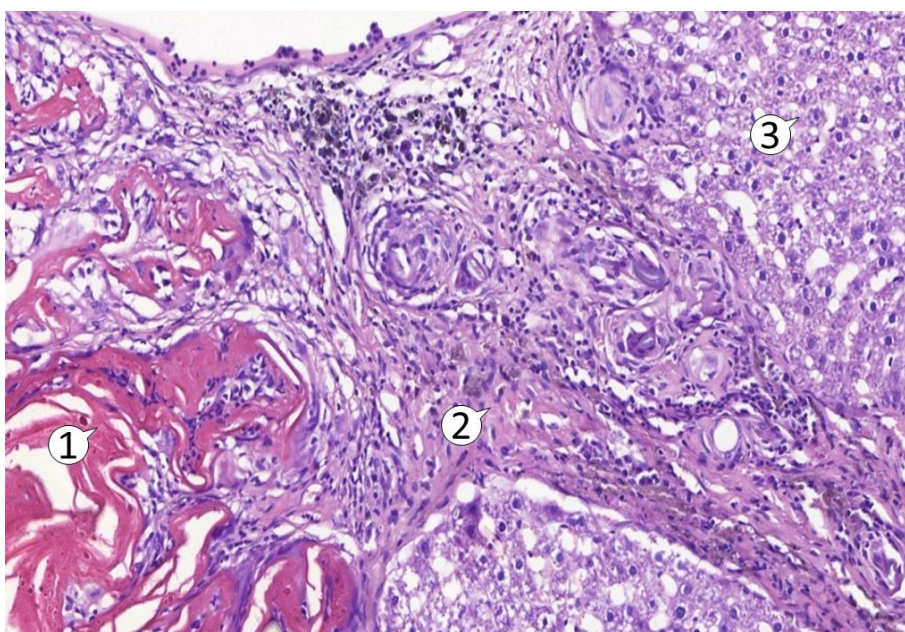


Рисунок 3.90 – Фрагмент паренхіми печінки щура на 30-ту добу після застосування Хт/ПЕО = 1/3. Забарвлення гематоксилін-еозином. Позначення: 1 – Хт/ПЕО = 1/3; 2 – капсула; 3 – печінкова паренхіма. Збільшення $\times 200$.

Вираженість запальної реакції в Хт/ПЕО = 1/3 становила 0,61 (0,17) бала, що на 37,11 % ($p = 0,0021$) менше від попереднього терміну. У печінковій паренхімі практично були відсутні апоптоз та явища запальної інфільтрації, проте залишався незначний набряк та дистрофічні зміни в гепатоцитах. Зберігалася значна кількість двоядерних гепатоцитів 22,24 (4,25) %, що на 19,37 % ($p = 0,0063$) менше порівняно з 7-ю добою. Довкола капсули спостерігалася регенерація паренхіми з утворенням тубулярних структур.

Через 30 діб дослідження товщина капсули становила 95,56 (5,71) мкм, що на 46,69 % ($p = 0,0037$) менше порівняно з 7-ю добою експерименту. У її структурі переважали ретикулярні волокна (рис. 3.91 а), щільність яких зросла на 56,73 % ($p = 0,0029$) до 1,63 (0,20) бала. Проте збільшилася частка колагенових волокон (рис. 3.91 б), які у вигляді пучків розміщувалися в центральній та периферичній зонах капсули, а їх щільність оцінювали в 1,07 (0,15) бала. У капсулі розміщувалася помірна кількість лімфоїдних та фібробластоподібних клітин, а також поодинокі макрофаги та нейтрофіли.

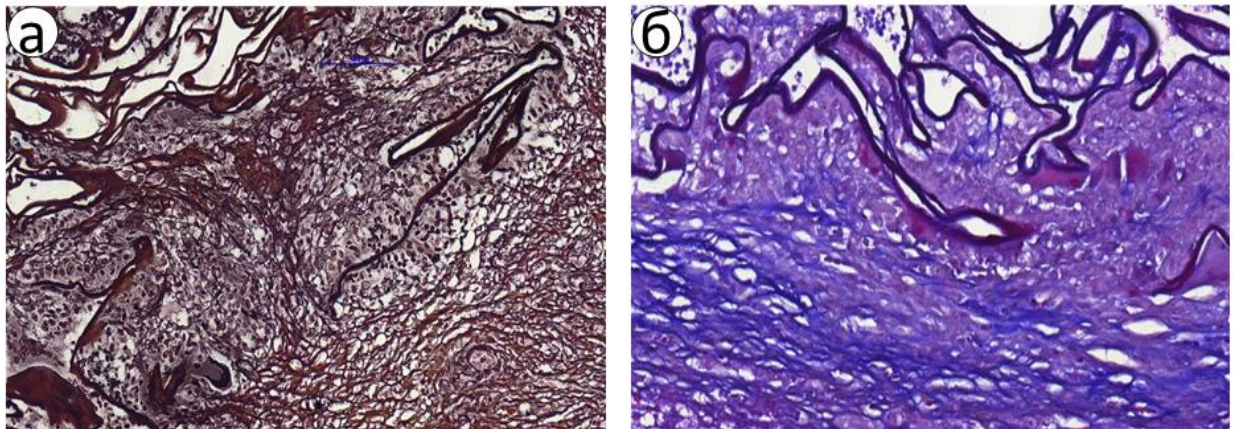


Рисунок 3.91 – Фрагмент капсули навколо губки БМ на 30-ту добу після застосування Хт/ПЕО = 1/3: а – забарвлення за Гоморі; б – трихромне забарвлення за Массону. Збільшення $\times 200$.

Запальна реакція капсули зменшилася на 4,85 % ($p = 0,61$), що не мало статистично значущої відмінності у порівнянні з 7 добою дослідження та становило 0,98 (0,14) бала. З боку печінкової паренхіми спостерігалася значне

вростання у капсулу судин різного діаметра, що формували густу капілярну сітку. Але ближче до гемостатичного матеріалу процеси неангіогенезу були менш виражені. У багатьох ділянках чітка межі між паренхімою печінки та периферичною частиною капсули не візуалізувалась.

Кількість тучних клітин знизилась на 33,38 % ($p = 0,0034$) порівняно з попереднім терміном дослідження і становила 5,15 (0,15) кл/мм², що оцінювали як помірну кількість (рис. 3.92 а). Мастоцити містилися у СТ, що вросла в ХТ мембрану та знаходились безпосередньо на поверхні гемостатичного матеріалу.

Alpha-SMA-позитивних клітин також стало менше порівняно з 7-ю добою дослідження на 32,2 % ($p = 0,0041$). Їх кількість оцінювали як помірну в 1,79 (0,24) бала. Більшість міофібробластів розміщувалися в товщі капсули навколо БМ, а також вздовж судин (рис. 3.92 б). У деяких місцях вони утворювали щільні контакти між собою, а бо вистроювались послідовно у вигляді ланцюга.

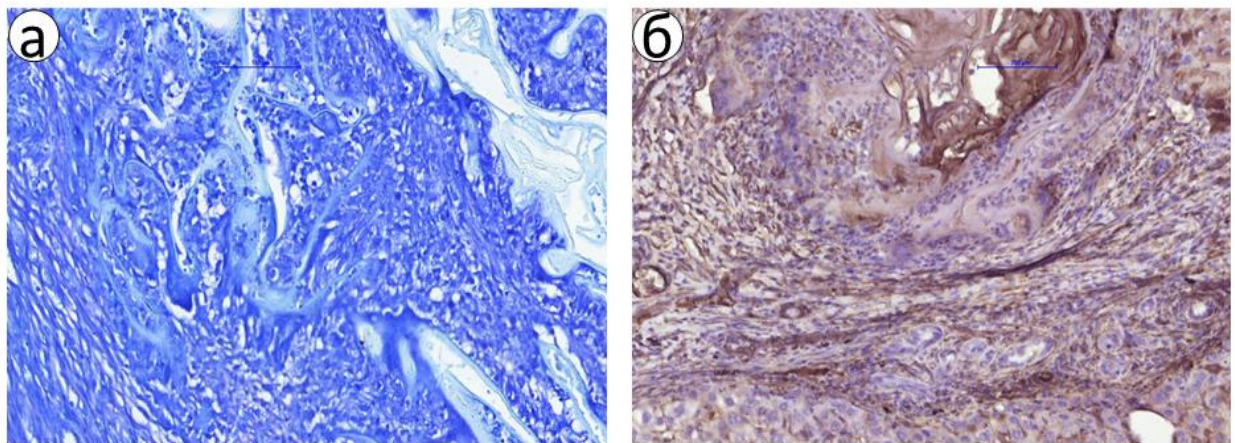


Рисунок 3.92 – Фрагмент капсули навколо БМ на 30-ту добу після застосування ХТ/ПЕО = 1/3: а – забарвлення толуїдиновим синім; б – ІГХ дослідження експресії до alpha-SMA. Збільшення $\times 200$.

Кількість проліферуючих клітин на 30-ту добу експерименту достовірно зменшилася на 27,66 % ($p = 0,0082$) і становила 145,93 (6,28) кл/мм² (рис. 3.93). Індекс проліферації залишався високим – 20,53 (4,50) %. Більшість

Кі-67-позитивних клітин містилася в паренхімі печінки, що знаходилась довкола капсули БМ, а також, частково в капсулі та поодинокі клітини розміщувались між фрагментами гемостатичного матеріалу. Концентрація проліферуючих клітин була більша в ділянках максимальної резорбції БМ.

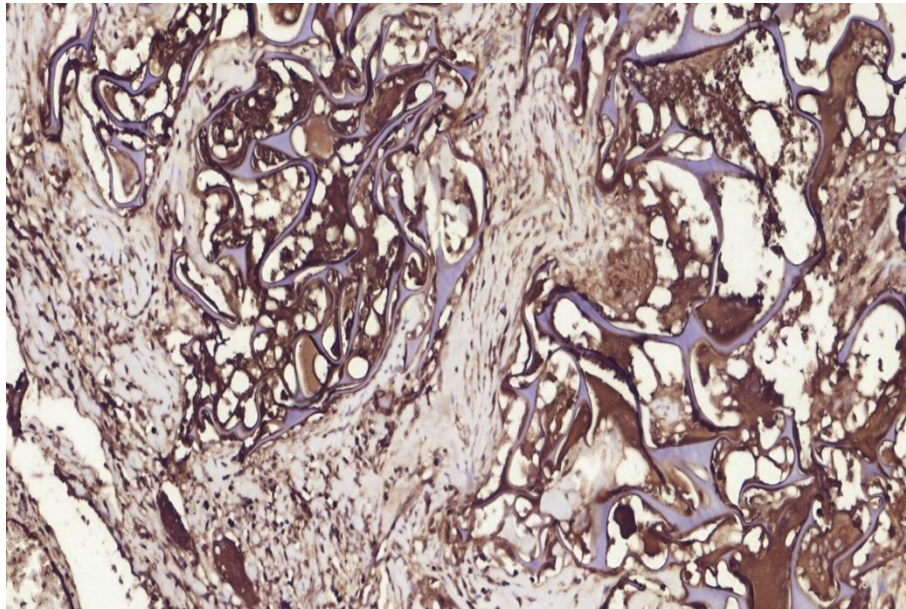


Рисунок 3.93 – Фрагмент печінки щура на 30-ту добу після застосування ХТ/ПЕО = 1/3. ІГХ дослідження експресії Кі-67. Збільшення $\times 400$.

Визначення експресії CD68 продемонструвало істотне зниження кількості макрофагів M1-типу на 29,58 % ($p = 0,0083$) до 108,83 (8,03) кл/мм², у той самий час кількість CD163-позитивних клітин зменшилася на 4,68 % ($p = 0,066$), що не мало статистично значущої відмінності із 7-ю добою дослідження і становило 143,59 (8,34) кл/мм² (рис. 3.94 а, б). Співвідношення CD68/CD163-позитивних клітин мало протизапальний характер і становило 0,76 (0,02), проте загальна кількість макрофагів залишалась значною, що вказувало активну імунну відповідь. Переважна більшість макрофагів M1-типу знаходились на поверхні гемостатичного матеріалу, в безпосередньому контакті з його фрагментами. Макрофаги M2-типу здебільшого розміщувались в капсулі довкола гемостатичного матеріалу та, частково, в прилеглих ділянках паренхіми печінки.

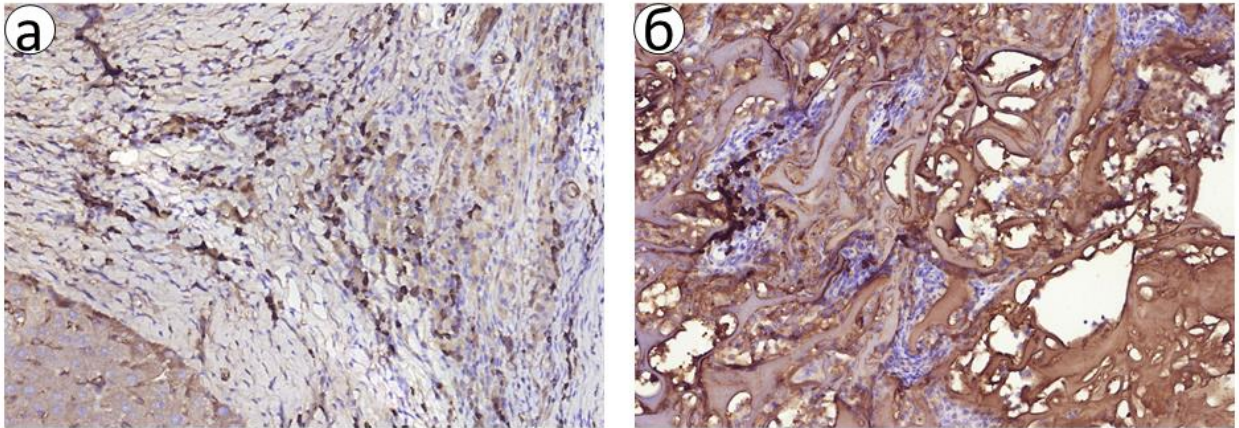


Рисунок 3.94 – Фрагмент капсули навколо БМ на 30-ту добу після застосування Хт/ПЕО = 1/3. ІГХ дослідження експресії: а – CD68; б – CD163. Збільшення $\times 200$.

На 30-ту добу дослідження кількість цитотоксичних Т-лімфоцитів становила 84,71 (3,85) кл/мм², що зменшилася на 35,19 % ($p = 0,0058$) порівняно з 7-ю добою. Вони розміщувалися переважно на поверхні фрагментів Хт мембрани. Кількість регуляторних Т-лімфоцитів зменшилася на 26,68 % ($p = 0,0091$) і становила 89,32 (4,99) кл/мм². Вони містилися здебільшого в капсулі навколо Хт/ПЕО = 1/3. Співвідношення CD8/FOXP3-позитивних клітин становило 0,94 (0,08) (рис. 3.95 а, б). Переважання регуляторних Т-лімфоцитів вказувало на протизапальний клітинний склад.

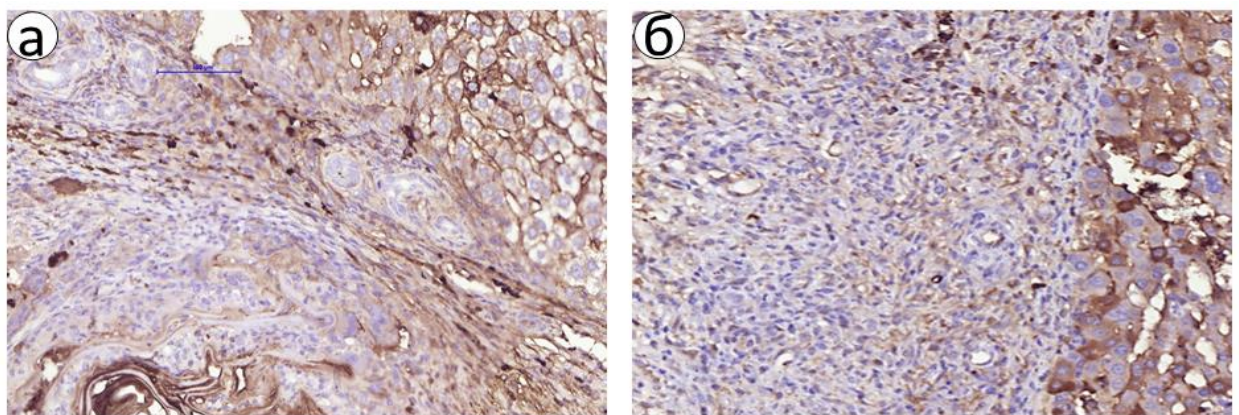


Рисунок 3.95 – Фрагмент капсули навколо БМ на 30-ту добу після застосування Хт/ПЕО = 1/3. ІГХ дослідження експресії: а – CD8; б – FOXP3. Збільшення $\times 200$.

Через 60 діб дослідження вся Хт мембрана була повністю фрагментованою, значно стоншилась, проте повністю не деградувала (рис. 3.96). Кількість елементів та їх розміри були значно меншими порівняно з 30-ю добою дослідження, вони були оточені СТ, а на поверхні БМ містився шар епітеліальних клітин. Дефект паренхіми мав округлу, або щілеподібну форму, розміри якого становили 1,67 (0,24) мм², що порівняно з попереднім терміном скоротились на 29,94 % ($p = 0,0088$). Площа Хт/ПЕО = 1/3 була 1,49 (0,17) мм², що також достовірно менше на 36,91 % ($p = 0,0027$) порівняно з 30-ю добою дослідження. Рештки гемостатично матеріалу разом з оточуючою СТ щільно виповнювали дефект печінки, хоча за рахунок капсули доре відмижовувались від паренхіми. Загальна щільність імунних клітин, що оточували БМ, зменшилася на 44,65 % і її оцінювали в 0,53 (0,07) бала, як низьку. Вираженість запальної реакції Хт мембрани становила 0,34 (0,22), що на 27,89 % ($p = 0,015$) знизилася та оцінювали як низьку. На 60-ту добу дослідження дистрофічні зміни печінкової паренхіми були практично відсутні, проте залишалися розширеними печінкові тракти та явища проліферації гепатоцитів з утворенням судин та жовчних протоків. Кількість двоядерних гепатоцитів знизилась на 14,78 % ($p = 0,36$) й становила 7,46 %.

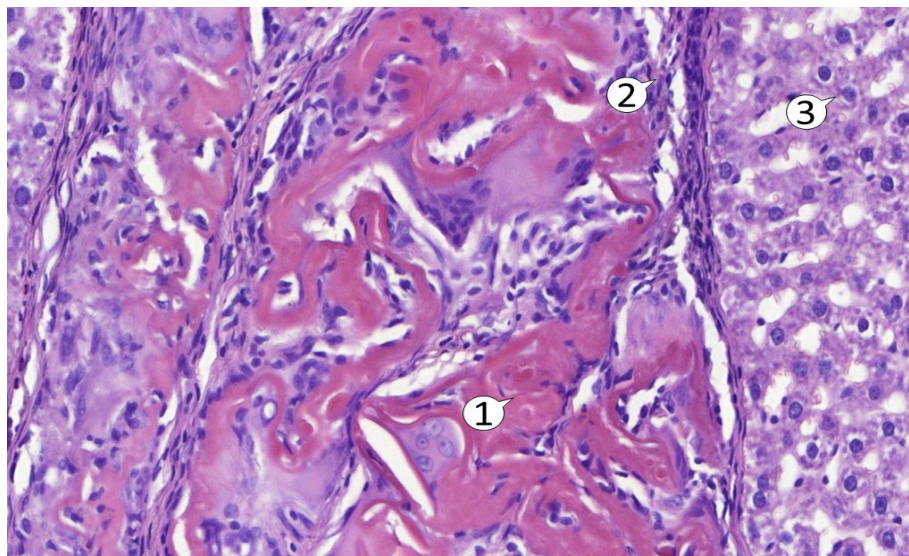


Рисунок 3.96 – Фрагмент паренхіми печінки щура на 60-ту добу після застосування Хт/ПЕО = 1/3. Забарвлення гематоксилін-еозином. Позначення: 1 – Хт/ПЕО = 1/3; 2 – капсула; 3 – печінкова паренхіма. Збільшення $\times 400$.

Через 60 діб експерименту товщина капсули навколо Хт/ПЕО = 1/3 достовірно зменшилась на 18,02 % ($p = 0,026$) і становила 63,17 (3,49) мкм. В найбільшо витончення капсули гемостатичний матеріал прилягав практично до печінкової паренхіми. Ретикулярні волокна знаходились у місцях вrostання капсули, де вони оточували фрагменти БМ, були добре васкуляризовані зі значною кількістю клітин (рис. 3.97 а). Щільність ретикулярних волокон оцінювали, як значну – у 2,46 (0,21) бала. Колагенові волокна містилися переважно периферично у вигляді концентрованих пучків волокон, які циркулярно оточували Хт мембрану (рис. 3.97 б). Щільність колагенових волокон оцінювали, як помірну – у 1,27 (0,14) бала. Вираженість запальної реакції в капсулі оцінювали як низьку в 0,34 (0,11), що на 40,78 % ($p = 0,0014$) менше порівняно з 30-ю добою дослідження. Клітинний склад капсули був представлений переважно фібробластоподібними клітинами та лімфоцитами. У безпосередньому контакті з БМ візуалізувались гігантські клітини сторонніх тіл та макрофаги.

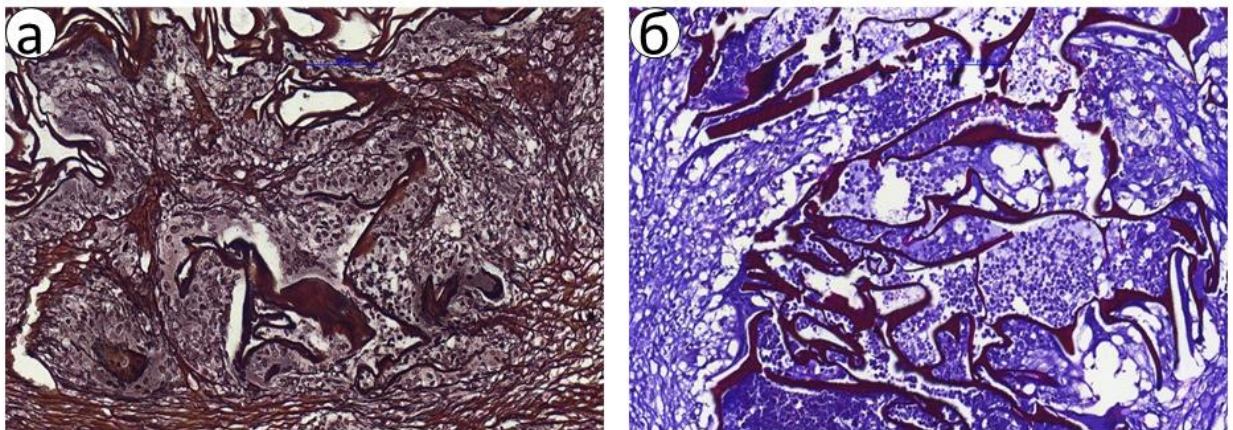


Рисунок 3.97 – Фрагмент капсули навколо губки БМ на 60-ту добу після застосування Хт/ПЕО = 1/3: а – забарвлення за Гоморі; б – трихромне забарвлення за Массоном. Збільшення $\times 200$.

На кінець періоду спостереження тучні клітини знаходились лише в окремих полях зору на поверхні крупних фрагментів Хт мембрани (рис. 3.98 а). Кількість мастоцитів становила 0,95 (0,98) кл/мм², що на

54,33 % ($p = 0,0011$) менше порівняно з 30-ю добою. Визначення експресії α -SMA продемонструвало достовірне зниження міофібробластів на 33,33 % ($p = 0,0045$), а їх загальну кількість оцінювали в 0,91 (0,13) бала (рис. 3.98 б). Вони розміщувались переважно довкола судин.

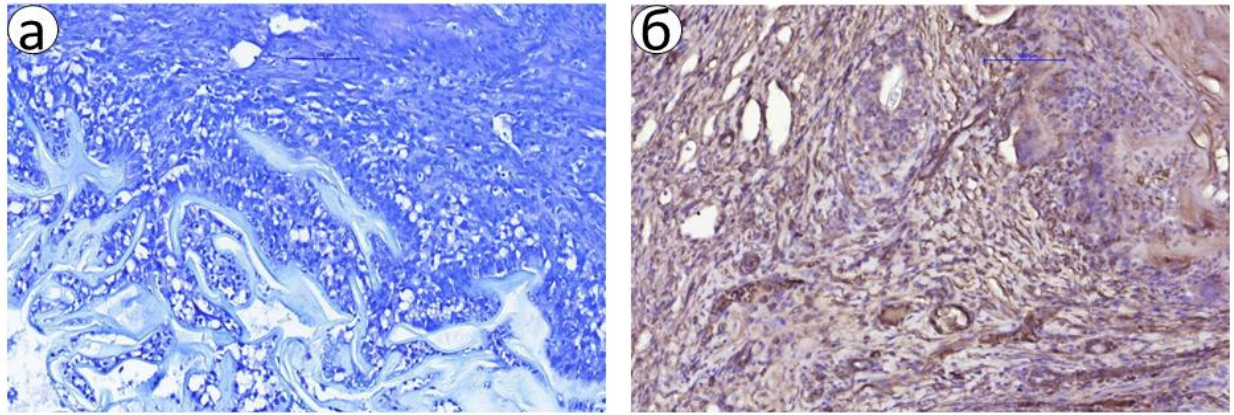


Рисунок 3.98 – Фрагмент капсули навколо БМ на 60-ту добу після застосування ХТ/ПЕО = 1/3: а – забарвлення толуїдиновим синім; б – ІГХ дослідження експресії до alpha-SMA. Збільшення $\times 200$.

Кількість Ki-67-позитивних клітин становила 61,48 (7,03) кл/мм², що порівняно з 30-ю добою дослідження було на 41,87 % ($p = 0,0011$) менше (рис. 3.99). Групи клітин, що активно проліферували, містилися навколо зовнішнього краю капсули. Індекс проліферації був 7,32 (0,93) %.

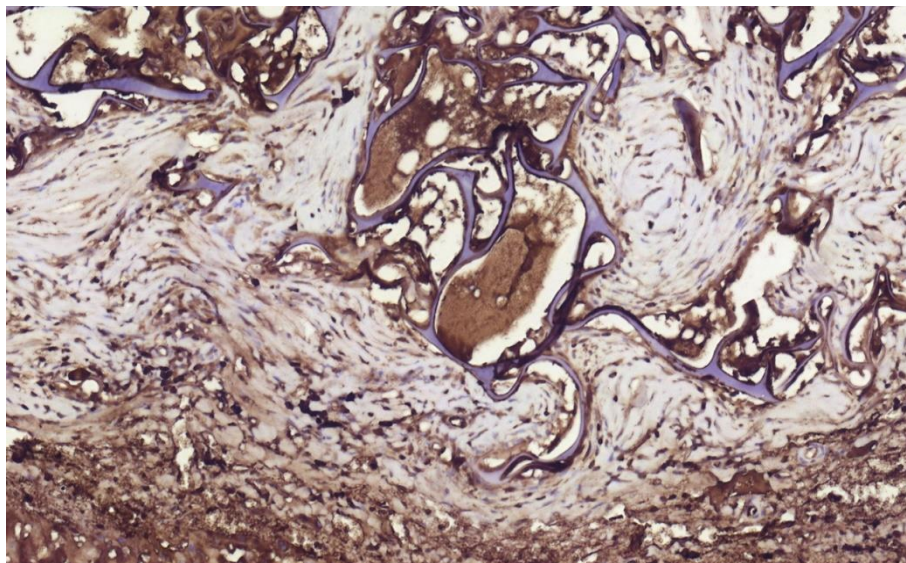


Рисунок 3.99 – Фрагмент печінки щура на 60-ту добу після застосування ХТ/ПЕО = 1/3. ІГХ дослідження експресії Ki-67. Збільшення $\times 400$.

На 60-ту добу дослідження експресії M1- та M2-типів макрофагів показало статистично значуще зниження кількості клітин обох груп порівняно з 30-ю добою (рис. 3.100 а, б). Так, кількість CD68-позитивних клітин становила 74,36 (7,87) кл/мм², що зменшилася на 22,31 % ($p = 0,031$). А кількість CD163-позитивних клітин була 92,20 (8,27) кл/мм², що зменшилася на 34,05 % ($p = 0,0077$). Співвідношення M1/M2-типів макрофагів становило 0,81 (0,13). Макрофаги обох типів розміщувалися переважно в СТ між фрагментами Хт/ПЕО = 1/3.

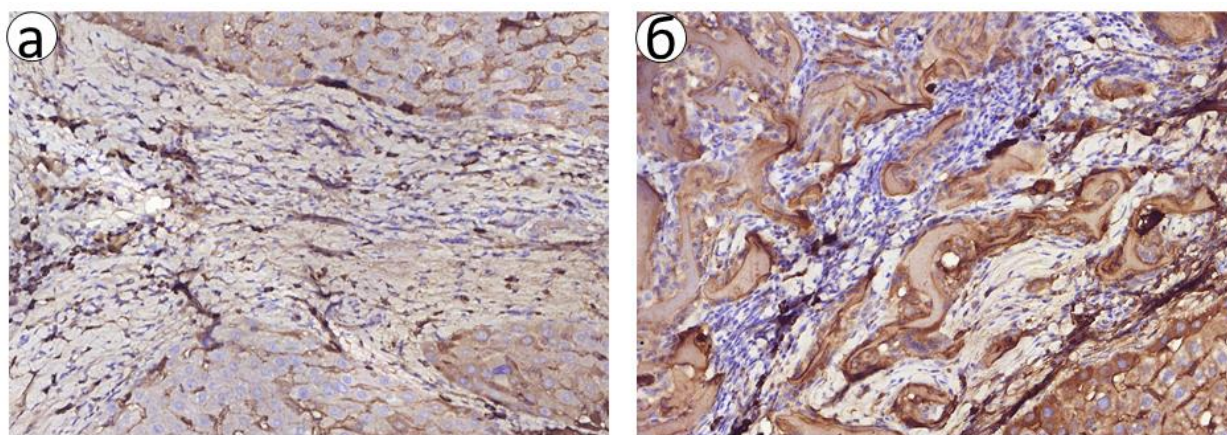


Рисунок 3.100 – Фрагмент капсули навколо БМ на 60-ту добу після застосування Хт/ПЕО = 1/3. ІГХ дослідження експресії: а – CD68; б – CD163. Збільшення $\times 200$.

Кількість CD8-позитивних клітин була 50,42 (4,93) кл/мм², що на 26,24 % ($p = 0,0097$) менше порівняно з 30 добою дослідження. Число FOXP3-позитивних клітин також достовірно зменшилося на 12,71 % ($p = 0,036$) і становило 73,83 (3,75) кл/мм². Співвідношення CD8/FOXP3 становило 0,68 (0,05), що відповідає протизапальному переважанні регуляторних Т-лімфоцитів. Більшість Т-лімфоцитів обох груп знаходилися у тих ділянках СТ, що охоплювала залишкові фрагменти Хт мембрани, що не резорбувалися (рис. 3.101 а, б). Зменшення кількості імунних клітин вказувало на суттєве зменшення активності запальної відповіді довкола нановолоконної мембрани на кінець дослідження.

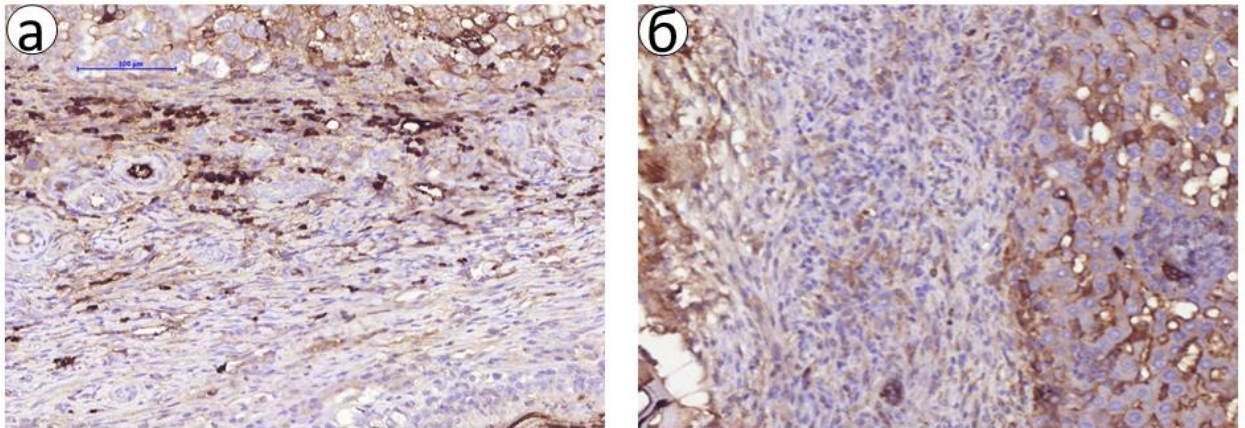


Рисунок 3.101 – Фрагмент капсули навколо БМ на 60-ту добу після застосування Хт/ПЕО = 1/3. ІГХ дослідження експресії: а – CD8; б – FOXP3. Збільшення $\times 200$.

Хт/ПЕО = 1/3 продемонстрував порівняно високу фрагментацію та біодеградацію за 60 діб дослідження. Він викликає помірну запальну реакцію, як у самому БМ, так і капсулі та прилеглій печінковій паренхімі. Клітинний склад запальної інфільтрації сприяє швидкій резорбції Хт мембрани та ремоделюванню пошкодженої паренхіми печінки.

Основні результати цього розділу опубліковані в працях [162]–[164], [249], [250], [254]–[256].

РОЗДІЛ 4

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Операційна летальність у плановій хірургії паренхіматозних органів завдяки розвитку оперативної техніки, медичного обладнання та анестезіологічного забезпечення не перевищує 5 %, а інтраопераційні ускладнення становлять від 4 % до 20 % [165], [166]. Проте 31 % пацієнтів із політравмою мають ушкодження черевної порожнини, серед яких 13 % припадає на селезінку, а 16 % – на печінку [167]. У невідкладній хірургії тяжка травма печінки пов'язана з неконтрольованою кровотечею, що призводить до смерті в 50–54 % випадків у перші 24 години [70]. Надійний гемостаз під час резекції печінки є критичною умовою видужування пацієнта після хірургічного лікування, оскільки обсяг втрати крові під час операції на печінці має пряму кореляцію зі смертністю [168]. Припинення кровотечі печінки є більш складною процедурою порівняно з гемостазом з інших органів, що пов'язано з анатомічними особливостями: тісний взаємозв'язок вен системи ворітної вени та системи нижньої порожнистої вени, а також відсутність м'язових волокон у синусоїдальних капілярах [169]. Для досягнення гемостазу з великих судин стандартним є використання хірургічних кліпс, лігатур, степлерів, тоді як для припинення паренхіматозної кровотечі застосовують біполярну чи ультразвукову коагуляцію та/або місцеві гемостатичні матеріали [170]. Вони можуть бути як природного, так і синтетичного походження, а також мати різну фізичну форму: порошки, губки, гідрогелі, аерогелі, мембрани та ін. [171]. Найбільш перспективними вважаються гемостатичні матеріали на основі полісахаридів, таких як окиснена целюлоза, желатин, альгінат, хітин, хітозан. Вони досить легкі для виробництва, потребують відносно дешевої сировини, зазнають деградації та залежно від фізичної форми ефективні в боротьбі з паренхіматозною кровотечею [172]. У зв'язку з особливостями структури паренхіматозних органів, зокрема печінки, та хірургічної тактики (гемостатичний матеріал переважно назавжди залишається в місці пошкодження органу) більш виправданим є застосування

пористих матеріалів, що полегшуватиме біодеградацію місцевого гемостатика та регенерацію органу [173].

Ми вважаємо, що найкращим місцевим гемостатичним матеріалом найбільш багатообіцяючий є біополімер хітозан. Незважаючи на глибоке вивчення його гемостатичних властивостей, залишаються відкриті питання його оптимальної пористої структури, нетоксичності методів синтезу та розчинників, а також ефективності порівняно з іншими аналогами [174]–[178].

У нашому дослідженні гемостатичні матеріали були синтезовані трьома різними способами: 1) губки – за допомогою ліофільного висушування; 2) аерогелі – синтезувалися за принципами «зеленої хімії» з включенням аспарагінової та глутамінової амінокислот; 3) мембрани – за допомогою електропрядіння. Ці методи найбільш часто використовують для створення пористих біоматеріалів [179]–[181]. Проте також можуть використовувати – екструзію, лиття під тиском, 3D-друкування, електродіаліз чи випаровування, але ці методи не показали значної переваги [182]–[185]. Результати *in vitro* продемонстрували, що серед досліджуваних Хт губок, найкращі властивості мав Хт ацетат, серед Хт аерогелів – зразок Хт Асп/Глу = 1/1. У групі Хт мембран найбільш перспективним був Хт/ПЕО = 1/3. Усі три зразки Хт гемостатиків мали пористу структуру, проте різну фізичну форму.

Аналіз поверхні визначених зразків за допомогою СЕМ продемонстрував, що медіана площі перерізу пор для Хт ацетату 281,25 (61,31 – 1243,42) мкм², для Хт Асп/Глу = 1/1 становила 165,35 (56,87 – 1214,27) мкм², а для Хт/ПЕО = 1/3 відповідно 58,47 (24,03 – 164,52) нм². Між усіма матеріалами була статистично значуща відмінність ($p < 0,001$).

Одержані результати підтверджують дані, що оптимальною з точки зору міграції клітин у товщу скафолду є діаметер пор від 3 мкм до 12 мкм, що полегшує проліферацію та взаємодію клітин між собою [186]–[187]. Цьому показнику найбільш відповідає Хт аерогель, тоді як Хт ацетат має занадто великі пори, Хт мембрана продемонструвала досить малі пори, проте

необхідно зазначити що діаметр пор < 1 мкм покращує взаємодію між клітиною та БМ. Хороша адгезія клітин пришвидшує біодеградацію та резорбцію скафолду [188], [189].

Порівнявши пористість та щільність зразків між собою (рис. 4.1) одержуємо, що Хт аерогель має найбільшу пористість (82,73 (3,45) %), хоча статистично значущу відмінність спостерігають лише порівняно з Хт губкою ($p = 0,0094$). Пористість Хт мембрани також була вищою порівняно з Хт ацетатом ($p = 0,026$).

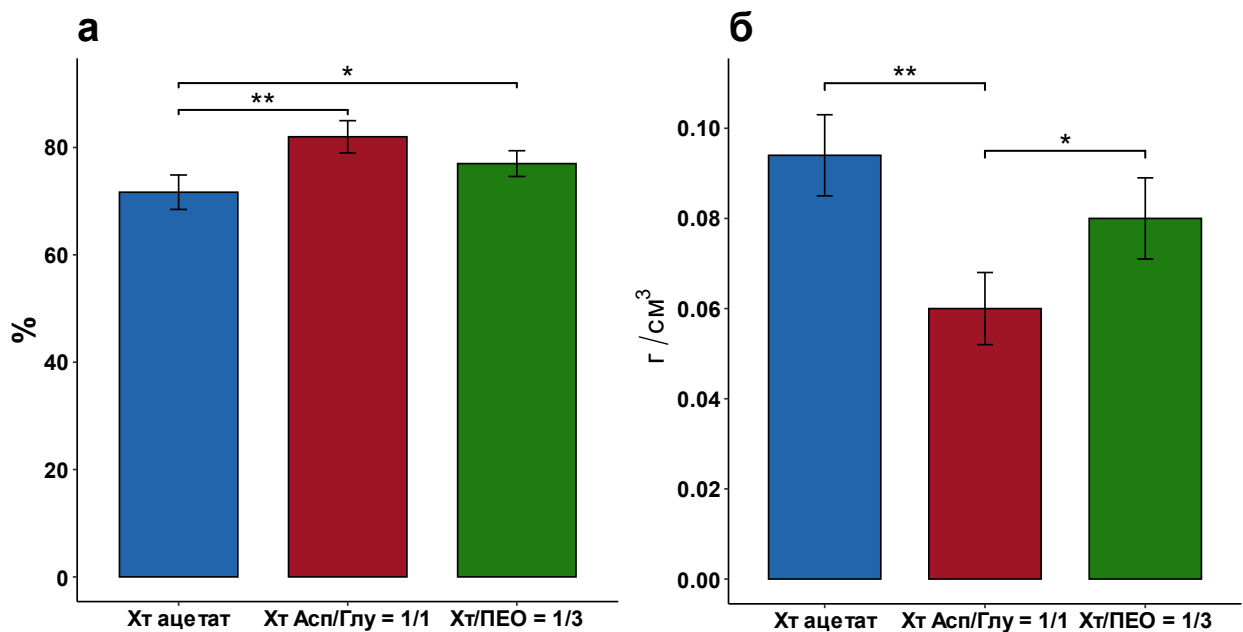


Рисунок 4.1 – Пористість (а) та щільність (б) хітозанових гемостатичних матеріалів різних методів синтезу.

Хт аерогель також продемонстрував найнижчу щільність (0,06 (0,008) г/см³) порівняно з Хт губкою та мембраною, які між собою не мали статистичної відмінності ($p > 0,05$). Низька щільність БМ, з одного боку, полегшує його резорбцію, з іншого – зменшує дифузю поживних речовин у його товщу. Також недостатня щільність може привести до раннього руйнування 3D структури БМ, що в сумі затримає або зупинить проліферацію клітин і відповідно регенерацію органу [190]. Так, згідно з Lončarević та ін., основна модель деградації Хт біополімерів – це поверхнева ерозія, оскільки

гідролітичні ферменти не можуть глибоко проникати в товщу скафолду [191]. А висока щільність БМ частіше призводить до інкапсуляції скафолду, що істотно сповільнює його деградацію [192]. Проте ліофільне висушування гемостатичного матеріалу значно підвищує площу активної поверхні пор, що зазнає дії ферментів, а це зі свого боку прискорює деградацію скафолду [193], [194]. У зв'язку з цим показники пористості, щільності та збереження тривимірної структури БМ важливі, не лише на початку регенерації рани для адгезії клітин, а й для подальшої його рівномірної резорбції.

В експериментальних умовах із використанням розчинів SBF та лізоциму матеріал Хт/ПЕО = 1/3 на 7-му добу дослідження продемонстрував найбільшу (біо)деградацію порівняно з іншими зразками ($p < 0,05$) (рис. 4.2).

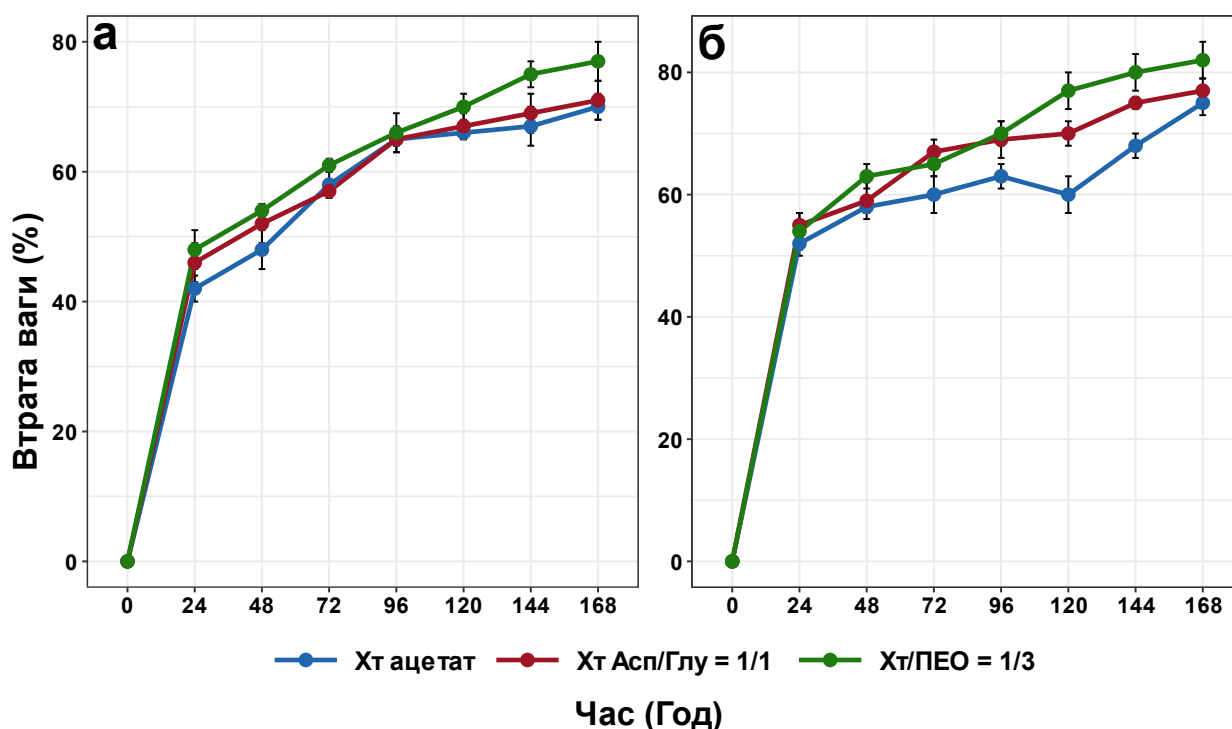


Рисунок 4.2 – Швидкість деградації хітозанових матеріалів у розчині SBF (а) та розчині лізоциму (б) хітозанових гемостатичних матеріалів різних методів синтезу.

Це можна пояснити як деякими вимінностями структури нановолоконних мембран, які пов'язані із синтезом, так і фізичною формою –

відсутністю товстих балок, властивих Хт губкам та аерогелям, що в свою чергу демонструє меншу питому вагу. До того ж на швидкість гідролізу хітозану впливає те, що *in vivo* гідратація тканин, навіть в умовах запалення значно менша порівняно зі штучними умовами водних сольових чи ферментатичних розчинів *in vitro* [195], [196]. Іншим поясненням більшої швидкості деградації зразків, що пропонує Gohi та ін., може бути зміна рН у процесі дослідження, як у кислу так і в лужну сторону [197]. Однак зміни рН з 6,5 до 7,5 упродовж перших 72 год не вплинули на швидкість деградації [198]. Найбільш імовірним обґрунтуванням швидкої деградації нановолоконної мембрани є наявність у її структурі ПЕО, що легко розчиняється у більшості водних розчинів, що узгоджується з літературними даними [199].

Важливою, але необов'язковою особливістю місцевих гемостатичних матеріалів є протимікробний вплив, що буде актуальний, як для профілактики приєднання патогенних мікроорганізмів у місці застосування гемостатичного матеріалу, так і для боротьби з інфекційними збудниками в разі контамінації рани. Для потенціювання антибактеріальної дії Хт, як матрицю, можна поєднувати із різними хімічними речовинами: металами (золото, срібло, мідь), що мають протимікробні властивості, або ж власне антисептичними чи антибактеріальними препаратами [200], [201]. Проте Хт і сам має протимікробні властивості, хоча детальний механізм, як бактерицидної, так і бактреіостатичної дії повністю не вивчений [202], [203].

У нашому дослідженні усі Хт гемостатичні матеріали проявили помірний бактреіостатичний ефект стосовно *S. aureus* та *E. coli*, що тривав у середньому протягом 4 год. (рис. 4.3). Це підтвержує, що власне Хт незалежно від розчинника та форми демонструє протимікробну дію. Нановолоконна мембрана Хт/ПЕО = 1/3 стримувала ріст мікроорганізмів майже до 8 год спостереження. Лише зразок Хт Асп/Глу = 1/1 щодо *E. coli* за 24 год експерименту повністю припинив її ріст, по відношенню до *S. aureus* через 6 год дослідження кількість життєздатних мікроорганізмів стала більше ніж початковий рівень.

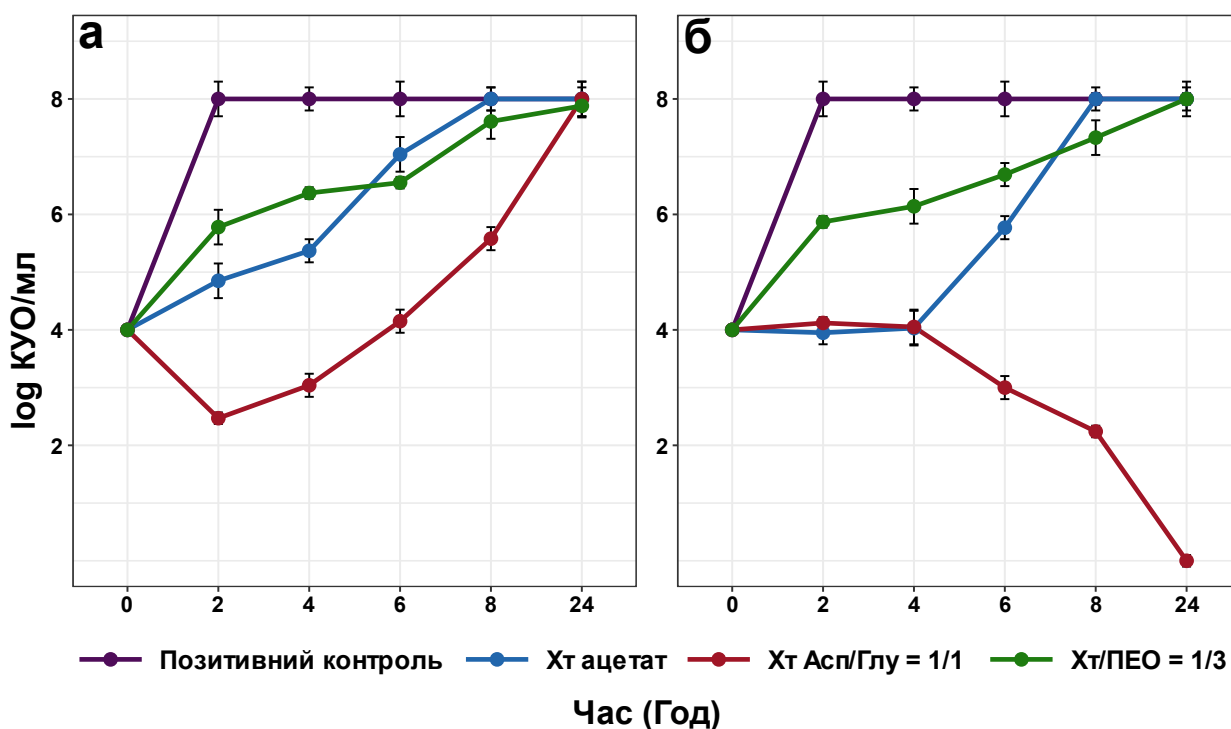


Рисунок 4.3 – Кількість життєздатних мікроорганізмів *S. aureus* (а) та *E. coli* (б) після інкубації з хітозановими матеріалами через різні проміжки часу.

На вираженість антибактеріальних властивостей може впливати багато чинників, що належать як до власне ХТ – молекулярна маса, ступінь деацетилювання, фізична форма та рН, так і інших - вид розчинника, температура, вид мікроорганізму [204]. Протимікробну дію ХТ можна розділити на опосередковану та пряму. Так, у рані ХТ здатний індукувати міграцію поліморфноядерних нейтрофілів, активувати макрофаги та стимулювати розвиток грануляційної тканини, що синергічно дозволяє зменшити вираженість інфекційного процесу в рані [205]. Один з варіантів прямої дії ХТ полягає у взаємодії полікатиону (ХТ аміногруп) з негативно зарядженою клітинною стінкою бактерій, що збільшує мембранну проникність і призводить до її руйнування [206], [207]. Це пояснення підтверджується результатами, які ми одержали оскільки особливості синтезу ХТ аерогелів дозволяє зберегти більше активних аміногруп порівняно з ХТ губкою чи мембраною [207].

Паралельно антибактеріальним властивостям гемостатичні матеріали можуть мати цитотоксичний ефект, коли вони впливають не лише на клітинну стінку не лише бактерій, а й тих клітин, що їх оточують після застосування. Під час дослідження з використання культур клітин жоден із зразків не проявив цитотоксичної дії (рис. 4.4)

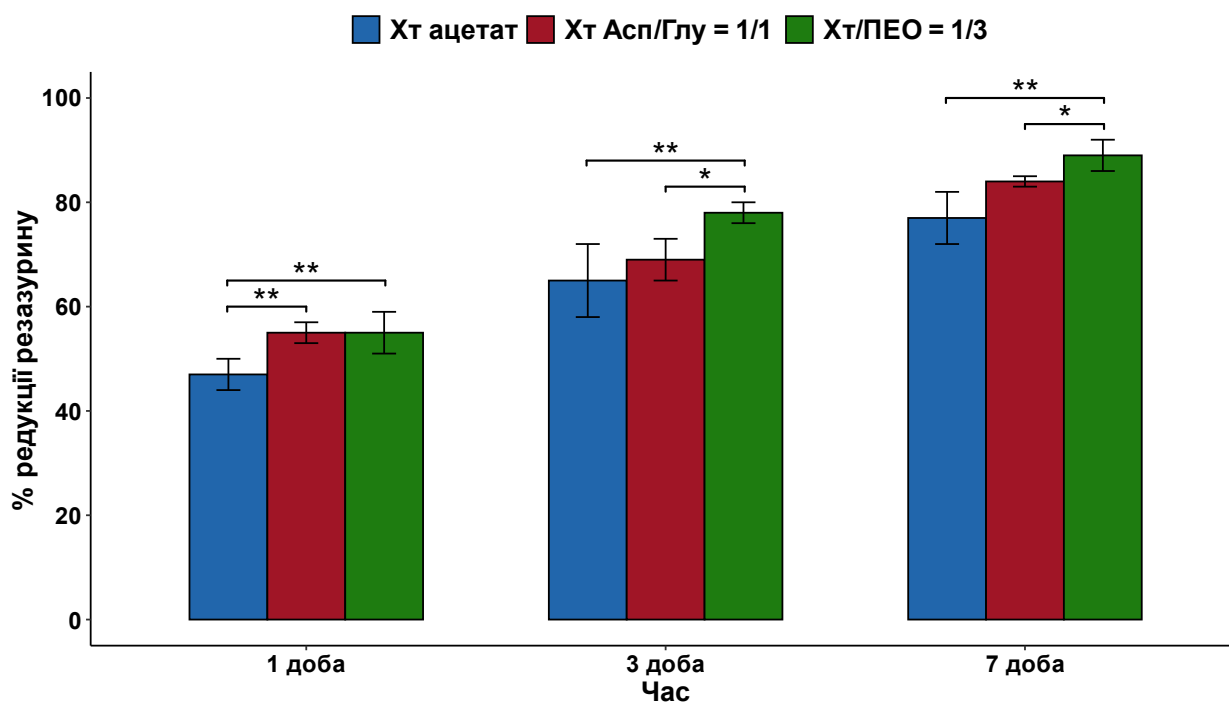


Рисунок 4.4 – Визначення цитотоксичності хітозанових гемостатичних матеріалів різних методів синтезу.

Адгезія клітин була достовірно вищою ($p < 0,001$) для Хт аерогелю та мембрани порівняно з Хт губкою, але між собою зразки не мали статистично значущої відмінності ($p > 0,05$). На 3-тю та 7-му добу Хт Асп/Глу = 1/1 показав вищий відсоток редукції резазурину порівняно з Хт ацетатом, проте різниця була статистично не значуща ($p > 0,05$). Достовірно вищу редукцію резазурину в порівнянні з іншими зразками продемонстрував Хт/ПЕО = 1/3, що свідчило не лише про відсутність токсичного впливу, а й про стимуляцію проліферації клітин на своїй поверхні.

А. Fathi та ін. доводять, що під час взаємодії з клітинами істотною перевагою Хт мембан, що синтезовані за допомогою електропрядіння є те, що

своєю сітчастою структурою вони імітують екстрацелюлярний матрикс, цим самим полегшуючи прикріплення та інтеграцію клітин у 3D-структуру скафолду [208], [209]. Включений до складу ПЕО полегшує гідратацію та дифузію ферментів і поживних речовин, а власне сам Хт стимулює синтез колагену фібробластами [210].

Порівняння сорбційної здатності Хт гемостатичних матеріалів продемонструвало значну перевагу ($p < 0,001$) Хт ацетату порівняно з Хт Асп/Глу = 1/1 та Хт/ПЕО = 1/3, які не мали статистичної відмінності між собою ($p > 0,05$) (рис. 4.5).

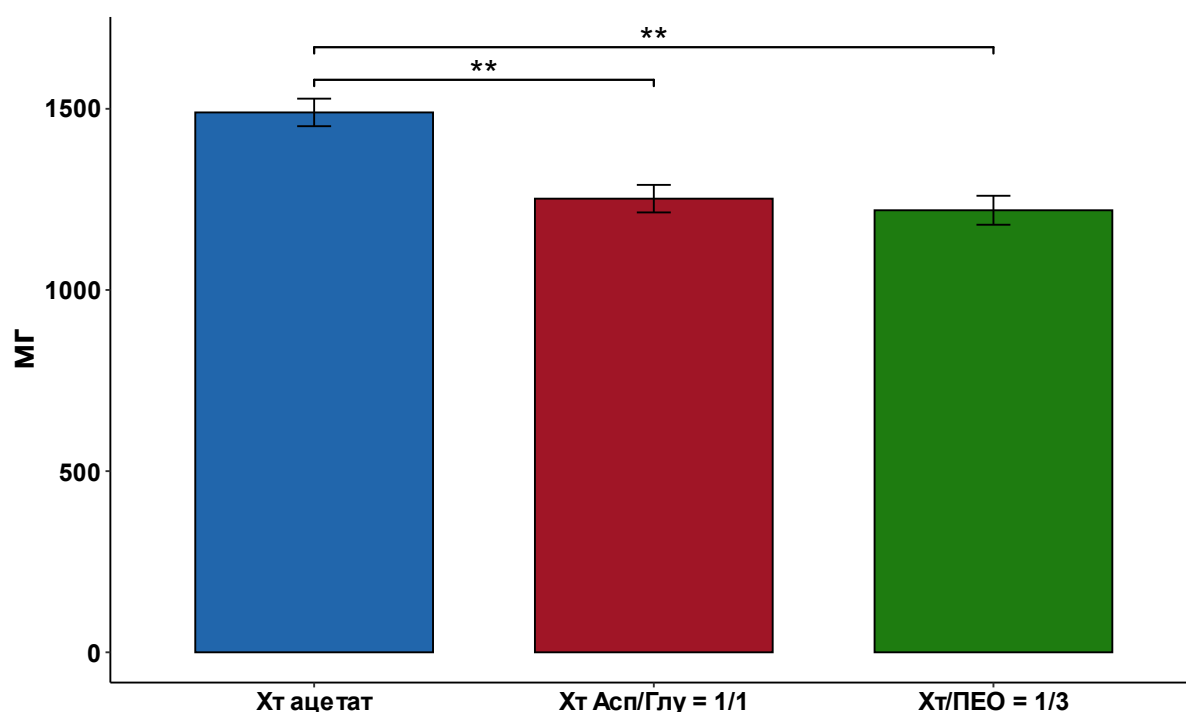


Рисунок 4.5 – Сорбційна здатність хітозанових гемостатичних матеріалів різних методів синтезу в процесі взаємодії з кров'ю.

Hu Shihao та ін. пояснюють хорошу сорбцію БМ відносно високою щільністю хітозанового матеріалу та незначною пористістю [211]. Це твердження узгоджується з нашим результатом, оскільки Хт губка мала достовірну вищу щільність та меншу пористість порівняно з Хт аерогелем та мембраною.

Сорбція плазми крові під час припинення кровотечі – необхідна складова швидкого та надійного гемостазу. Хт, взаємодіючи з тромбоцитами, запускає первинний (судинно-тромбоцитарний) гемостаз за допомогою їх активації, а потім – адгезії та агрегації з утворенням «білого тромбу». Паралельно з цим, сорбція значної частини плазми та концентрації білків пришвидшує та посилює вторинний (коагуляційний) гемостаз. До того ж результатом сорбції є набухання Хт матеріалів, що створює ефект тампонування рани [212], [213].

В *in vivo* дослідженні на лабораторних щурах показали, що всі Хт гемостатичні матеріали ефективно припиняли кровотечу. Час остаточного гемостазу не мав статистично значущої різниці порівняно з Тахокомбом, що був обраний для групи порівняння. Він є класичним представником тромбін-фібриногенових гемостатичних матеріалів, які впродовж тривалого часу довели свою ефективність у клінічному застосуванні та найбільш поширені на медичному ринку [214]. Аналізуючи результати гістологічного дослідження, було виявлено, що Тахокомб продемонстрував хорошу взаємодію з печінковою паренхімою, що супроводжувалася низькою запальною реакцією. Велика товщина капсули в ранні терміни була пов'язана з високою щільністю міофібробластів, М2-типу макрофагів і регуляторних клітин, а також низькою щільністю ретикулярних і колагенових волокон. Більшість досліджень демонструють швидку деградацію тромбін-фібриногенових БМ із слабкою запальною реакцією без утворення сполучнотканинної капсули [215], [216]. Проте De Oliveira та ін. засвідчують, що навколо даних матеріалів формується гігантоклітинне гранулематозне запалення із значним утворенням колагенових волокон [217]. Цю суперечність Х. Wang пояснює тим, що залежно від особливостей та розміру фібринового скафолду, хоч він сприяє адгезії та проліферації клітин на початковому етапі, то в подальшому не вистачає стимуляційних факторів та поживних речовин для підтримання клітинної маси, що призводить до розвитку СТ [218].

Використання губки Хт ацетату продемонструвало помірний запальний ексудат усередині БМ. Проміжки між фрагментами БМ були заповнені лейкоцитами (переважно нейтрофіли) та вростаючою СТ з помірною щільністю ретикулярних волокон. СТ заповнювала до 80 % петель БМ на периферії та близько 20 % в центральній частині гемостатичного матеріалу. Сітка БМ була в безпосередньому контакті з лейкоцитами, макрофагами та фібробластами. Запальний ексудат та вrostання тканини супроводжувалися локальним стоншенням та деградацією БМ. У ділянки БМ, де вrostала СТ, були фрагментовані з чіткими ознаками резорбції. Усередині капсули була помірна запальна інфільтрація з дифузним розподілом нейтрофілів та еозинофілів. Крім того, велику кількість макрофагів М1- та М2-типів виявлено всередині капсули. CD163-позитивні клітини містилися в периваскулярних ділянках і на зовнішньому шарі капсули. Також зовнішня частина капсули мала ознаки репарації, що демонструє велику кількість проліферуючих клітин із численними міофібробластами, судинами та трубчастими структурами.

Незважаючи на протизапальний характер М1-типу макрофагів, E. Dondossola та ін. зазначають, що їх кількість, разом із синтезованим фактором росту ендотелію судин (VEGF), корелюють із неоангіогенезом та щільністю фіброзної капсули [219]. В іншому дослідженні підтверджується фібротичний вплив М1-типу макрофагів, проте за рахунок синтезу ІЛ-6, який стимулює продукування колагену І типу фібробластами [220]. З іншого боку наявність «прозапальних» макрофагів М2-типу за допомогою синтезу ІЛ-4 та ІЛ-13, які сприяють утворенню колагену і сполучнотканинної капсули [221]. Специфічним явищем, що посилює розвиток фіброзної капсули, є пов'язаний з імплантацією БМ перехід від М2 макрофагів до міофібробластів [222]. Значна кількість М2 типу макрофагів та міофібробластів навколо БМ у нашому дослідженні дозволяє запідозрити, що цей перехід мав місце і в нашому дослідженні. Та загалом наведені дані свідчать про те, що і М1-, і М2-типи макрофагів здатні сприяти інкапсуляції БМ [223].

Оцінюючи реакцію адаптивного імунітету, ми виявили переважання FOXP3-позитивних клітин над реакцією CD8-позитивних клітин. Більшість досліджень свідчать про те, що імплантація БМ, зокрема Хт, призводить до підвищення «прозапальних» CD8-позитивних клітин, значна їх кількість посилює процеси фіброзування [224], [225]. FOXP3-позитивні клітини, з одного боку, мають протизапальний вплив, можуть корелювати з M1-макрофагами і врівноважують імунні процеси в рані. З іншого – деякі дослідження доводять, що FOXP3-позитивні клітини можуть також сприяти утворенню сполучнотканинної капсули за допомогою синтезу факторів росту [226], [227]. З урахування того, що в наших результатах переважали ці клітини, ми не можемо виключити наявність фіброзуючого ефекту.

Хт аерогель спричинив більш помітний запальний ексудат навколо БМ. Значна запальна інфільтрація була виявлена також усередині сітки БМ. Більшість просторів між фрагментами аерогелю були заповнені щільно упакованими лейкоцитами (переважно нейтрофіли).

Відомо, що помірною запальною реакцією є необхідним компонентом адекватної імунної відповіді та повної деградації біоматеріалу [228], [229]. Більшість досліджень стверджують, що Хт має лише протизапальну дію, що особливо корисно в лікуванні ран [230], [231]. Давидова та ін. пояснюють це стимуляцією продукції ІЛ-10 та стверджують, що протизапальні властивості не залежать від молекулярної маси Хт [232]. Проте J. Ribeiro доводить, що Хт з низькою молекулярною масою стимулює утворення фактору росту фібробластів, а це сприяє утворенню більшої кількості колагенових волокон [233]. В інших дослідженнях також підтверджується прозапальний ефект Хт, вираженість якого може залежати від структури та об'єму БМ [234].

Гостра запальна реакція в ділянці застосування гемостатичного матеріалу була пов'язана з прямими контактами між Хт Асп/Глу = 1/1 та лейкоцитами. Незважаючи на високу щільність запальних клітин, більшість випадків із високою інфільтрацією демонструють недостатню або низьку резорбцію БМ. Крім того, деякі фрагменти Хт аерогелю були вбудовані в

капсулу. Їх оточували макрофаги та клітини СТ, що призводило до резорбції та фрагментації. Деградація Хт Асп/Глу = 1/1 була значно нижчою, порівняно з іншими групами. Товста набрякла капсула з помірною кількістю клітин продемонструвала високу кількість тонкостінних судин, лейкоцитів і CD68-позитивних клітин. Кількість макрофагів М1-типу була втричі вищою, ніж макрофагів М2-типу. Така сама прозапальна активація була пов'язана з переважанням CD8-позитивних клітин над FOXP3-позитивними клітинами. Запальна інфільтрація була пов'язана з набряком і низькою щільністю колагенових і ретикулярних волокон.

У групі з використанням Хт мембрани виявлено значне вrostання тканин усередину БМ. Більшість просторів на периферії були заповнені ворсинками, які є вrostанням сполучної тканини та епітеліальних клітин. Хт/ПЕО = 1/3 продемонстрував специфічний зв'язок БМ з епітеліальними клітинами, що вистилали фрагменти Хт мембрани. У деяких місцях були незначні скупчення запальних клітин. Така специфічна взаємодія між Хт/ПЕО = 1/3 та клітинами хазяїна була пов'язана з вираженою резорбцією БМ.

Капсула була тонкою, проте включала більш високу щільність клітин порівняно з іншими групами. До того ж врівноважене співвідношення М1/М2-типу макрофагів на 7-му добу дослідження змінилося на значне переважання «протизапальних» макрофагів М2-типу на 60-ту добу експерименту. Цю особливість Wissing та ін. пояснюють хіміко-біологічним оточенням макрофагів [235]. Інші дослідники вважають, що мікроархітектоніка БМ (ізотропність чи анізотропність скафолду, діаметр пор) найбільше впливає на адгезію та проліферацію макрофагів [236], [237]. А. Garg та ін. зазначають про залежність експресії М2 типу макрофагів від діаметра волокна [238]. На противагу цьому існують докази, що Хт здатний стимулювати проліферацію М2-типу макрофагів за допомогою активації р-STAT6 сигнального шляху [239].

Тканини вросли в Хт мембрану покриваючи поверхню БМ. Крім великої кількості aSMA-позитивних клітин, спостерігалася висока щільність ретикулярних і колагенових волокон, а також виявлено високу швидкість проліферуючих клітин, що переважно розміщувалися у зовнішньому шарі капсули. У групі Хт мембрани виявилася значна вираженість Кі67-позитивних клітин навколо трубчастих структур та поширеність епітеліоїдних клітин. Згідно з результатами А. Vijayan та ін. для адекватної проліферації клітин навколо біоматеріалу необхідно додавати фактори росту [240]. Проте наші дані свідчать, що Хт сам здатний стимулювати як проліферацію клітин, так і підвищувати їх синтетичну функцію, що узгоджується з деякими дослідженнями [241]–[243].

Таким чином, порівнюючи ефективність і тканинну реакцію різних БМ ми можемо стверджувати, що Хт мембрани, виготовлені методом електропрядіння, здатні ефективно припиняти кровотечу та стимулювати ріст тканини без утворення СТ.

У нашому дослідженні після оцінювання фізико-хімічних властивостей Хт гемостатичних матеріалів та на основі літературних даних і попередніх досліджень на етапі планування експерименту на лабораторних щурах було визначено три часових проміжки (7-ма, 30-та і 60-та доби), через які тварини будуть виводити із дослідження. Сьома доба продемонструвала надійність гемостазу, ранню реакцію організму на кровоспинний матеріал та наявність / відсутність ранніх післяопераційних ускладнень; 30-та та 60-та доби відобразили тенденцію до скорочення ранового дефекту, регенерації печінки, біодеградації та резорбції БМ. Проте після завершення дослідження в всіх групах тварин залишився наявний дефект паренхіми печінки та фрагменти БМ різного розміру. Аналіз часових рядів залежності площі дефекту від терміну дослідження показав нестационарний характер із низхідним експоненціальним трендом до зменшення площі дефекту в усіх досліджуваних групах. Тому було прийнято рішення застосувати статистичну модель прогнозування для розрахунку передбачуваної дати повної

біодеградації БМ та заживлення дефекту печінки. Але в нашому експерименті ми мали нерівні часові проміжки, тому на першому етапі було вирішено розділити терміни заживлення на періоди, що відповідатимуть семи дням (1 тиж.). Відсутні дані для кожної часової точки одержували використовуючи метод багатоваріантного внесення за допомогою ланцюга рівнянь (Multivariate imputation by chained equations (MICE)) [244]. Цей метод базується на багаторазовому повторенні моделювання даних із використанням методів Монте-Карло (рис. 4.6).

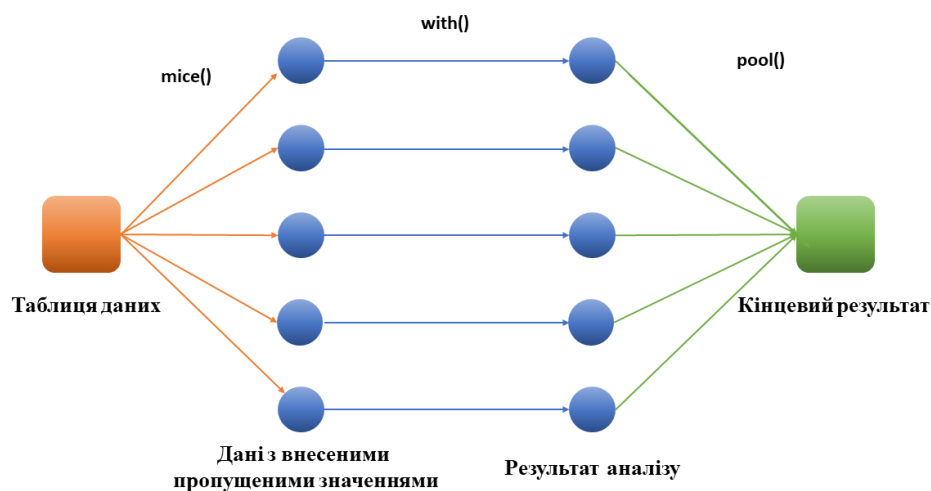


Рисунок 4.6 – Схема багатоваріантного внесення пропущених значень за допомогою ланцюга рівнянь (MICE).

Пропущені значення заміщаються за допомогою вибірок Гіббса (не менше п'яти для кожної змінної), методом відповідності передбаченого середнього (Predictive mean matching) [245]. Одержані рівняння використовують для передбачення найбільш імовірних значень для пропущених даних. Процес повторюється, поки не буде досягнутий критерій відповідності.

Після одержання повного часового ряду заживлення рани печінки з проміжками 7 днів був застосований метод лінійної регресії для виявлення залежності площі дефекту паренхіми печінки від фактору часу (табл. 4.1).

Таблиця 4.1

Результати лінійного регресійного аналізу залежності площі дефекту від часу

	F-статистика	R ²	Скоректований R ²	p
Тахокомб	11,51	0,622	0,568	0,012
Хт ацетат	14,24	0,671	0,623	0,0069
Хт Асп/Глу = 1/1	13,88	0,522	0,485	0,0452
Хт/ПЕО = 1/3	19,07	0,732	0,693	0.0032

Одержані дані свідчать, що для всіх гемостатичних матеріалів наявна лінійна залежність площі дефекту печінкової паренхіми від часу дослідження. Лінійна модель для Хт Асп/Глу = 1/1 хоча і мала статистично значущий коефіцієнт регресії ($p = 0,0452$), проте точність апроксимації слабка ($R^2 < 0,6$) і модель може потребувати коригування.

Підтвердивши лінійну залежність змінних, був застосований метод Холта–Вінтерса – це трипараметрична модель прогнозування, що належить до методів експоненціального згладжування [246]. Цей метод дозволяє спрогнозувати майбутні значення, базуючись виключно на історії попередніх значень часового ряду, і враховує три параметри: 1) згладжений експоненціальний ряд; 2) тренд; 3) сезонність. У зв'язку з тим, що одержані експериментальні дані не мали сезонності для прогнозування, була вибрана адитивна модель методу Холта–Вінтерса (рівняння 4.1) [247].

$$Y_{i-p} = (L_i + p \cdot T_i) \cdot S_{i-s+p}, \quad 4.1$$

де Y_{i-p} – прогноз за методу Хольта–Вінтерса на p періодів уперед;
 L_i – експоненціально згладжена величина за останній період;
 p – порядковий номер періоду, на який виконується прогноз;
 T_i – тренд за останній період;
 S_{i-s+p} – коефіцієнт сезонності за цей період в останньому сезоні.

Провівши розрахунки, одержали прогностичні терміни загоєння для кожного зразка гемостатичного матеріалу при рівних умов дослідження. Так, для Тахокомбу орієнтовний термін повної деградації та загоювання рани становив 11,5 тижня (рис. 4.7). Для ХТ ацетату прогноз становив 13,5 тижня (рис. 4.8). Найдовша передбачувана деградація БМ була для ХТ Асп/Глу = 1/1, що становила 14 тижнів (рис. 4.9). Зразок нановолоконної мембрани ХТ/ПЕО = 1/3 згідно з прогностичною моделлю повинен деградувати за найкоротший термін 10,5 тижня (рис. 4.10). Проте статистично значуща відмінність була виявлена лише в ХТ Асп/Глу = 1/1 порівняно з Тахокомбом ($p = 0,022$) та ХТ/ПЕО = 1/3 ($p = 0,018$), а також губка ХТ ацетату порівняно з Тахокомбом ($p = 0,041$) та ХТ/ПЕО = 1/3 ($p = 0,037$). Між собою Тахокомбом та ХТ/ПЕО = 1/3, так само, як і ХТ ацетат і ХТ Асп/Глу = 1/1 не мали статистично значущої відмінності ($p > 0,05$).

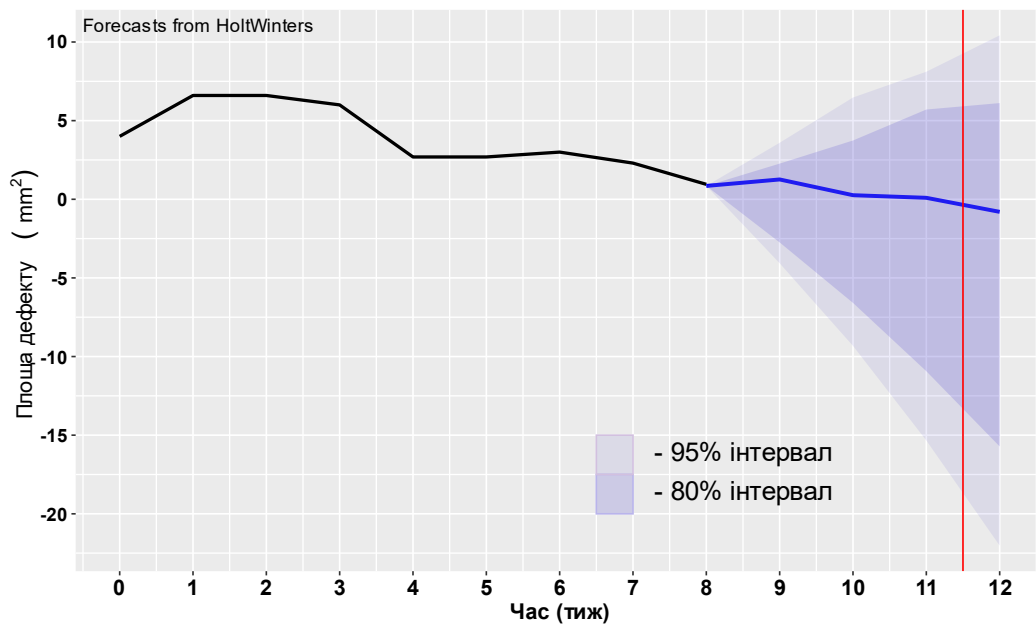


Рисунок 4.7 – Прогнозування повного загоєння дефекту печінки з використанням Тахокомбу за методом Холта–Вінтерса. Позначення: чорна лінія – часовий ряд, на основі одержаних даних, синя лінія – прогностична модель, червона лінія – орієнтовний термін повного загоєння.

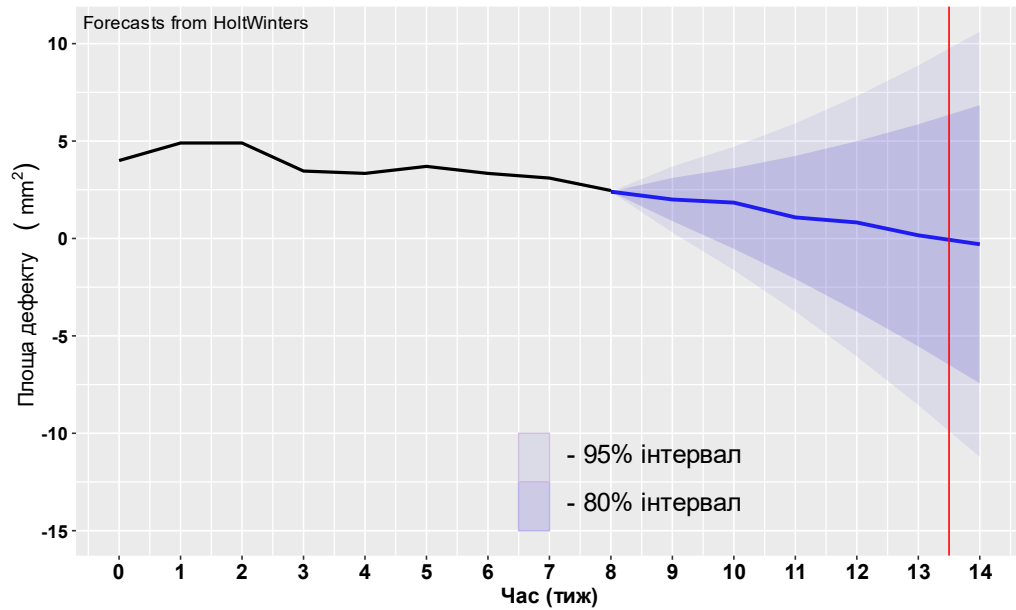


Рисунок 4.8 – Прогнозування повного загоєння дефекту печінки з використанням X_t ацетату за методом Холта–Вінтерса. Позначення: чорна лінія – часовий ряд, на основі одержаних даних, синя лінія – прогностична модель, червона лінія – орієнтовний термін повного загоєння.

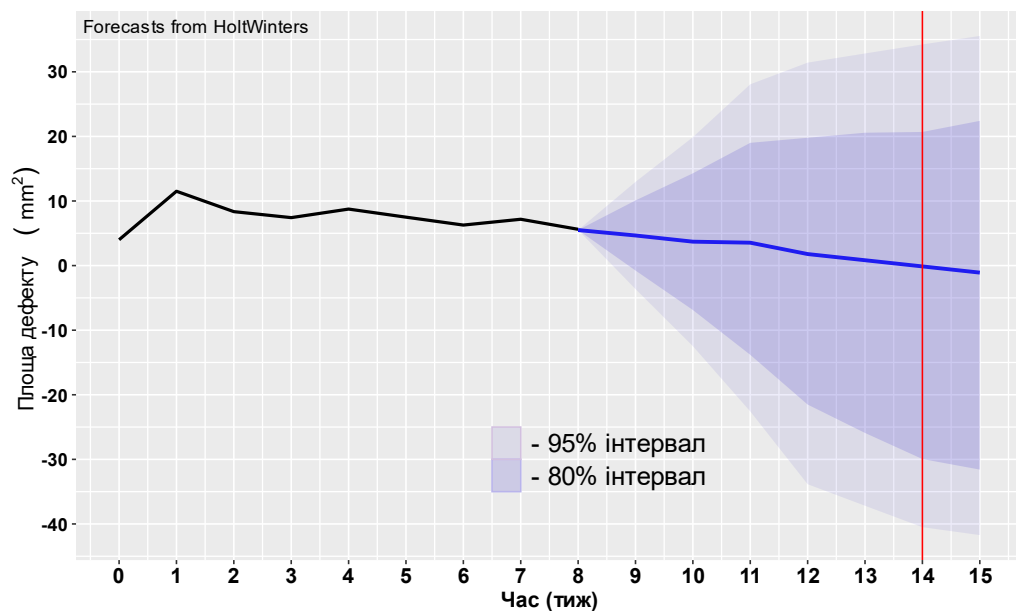


Рисунок 4.9 – Прогнозування повного загоєння дефекту печінки з використанням X_t Асп/Глу = 1/1 за методом Холта–Вінтерса. Позначення: чорна лінія – часовий ряд, на основі одержаних даних, синя лінія – прогностична модель, червона лінія – орієнтовний термін повного загоєння.

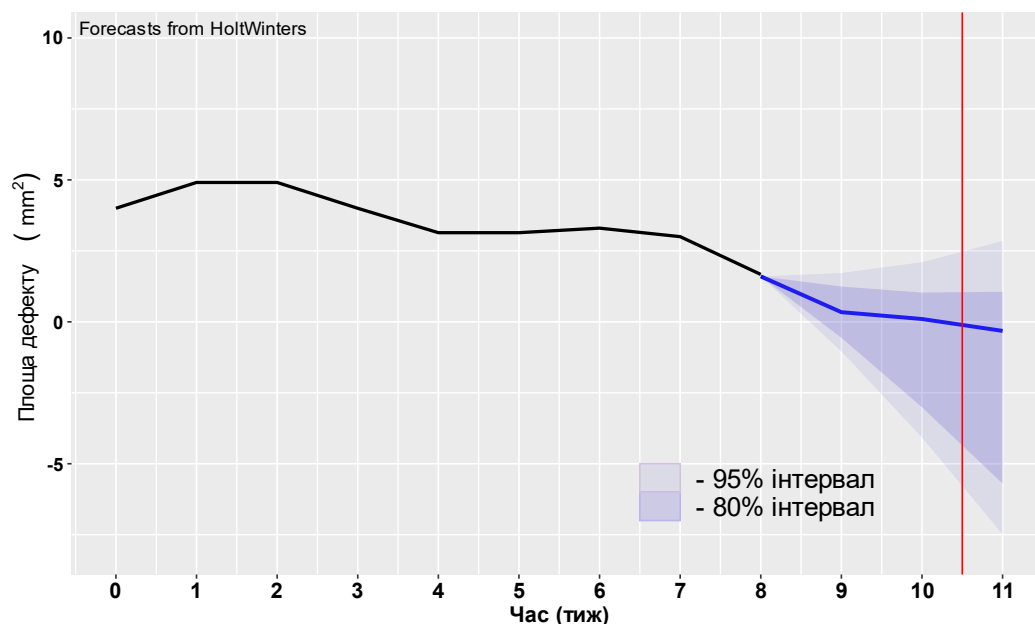


Рисунок 4.10 – Прогнозування повного загоснення дефекту печінки з використанням $X_T/PEO = 1/3$ за методом Холта–Вінтерса. Позначення: чорна лінія – часовий ряд, на основі одержаних даних, синя лінія – прогностична модель, червона лінія – орієнтовний термін повного загоснення.

З одержаних розрахунків можемо припустити, що повна деградація для гемостатичних матеріалів повинна відбутися в різні терміни, що робить недоцільним продовження експерименту на лабораторних тваринах. Усі хітозанові гемостатичні засоби, що були використані в нашому дослідженні, мали пористу, тривимірну структуру, що розрізнялася залежно від виду зразка. Окрім наявних гемостатичних властивостей, дані матеріали можуть бути застосовані як матриця для тканинної інженерії чи доставлення лікарських засобів. Тому важливо знати точний період резорбції, а також мати можливість моделювати швидкість та характер деградації біоматеріалу. Метод електропрядіння дозволяє синтезувати біополімерні, нановолоконні скафолди з необхідними характеристиками залежно від мети та точки застосування.

Основні результати цього розділу опубліковані в працях [163], [248], [251], [252].

ВИСНОВКИ

У дисертації наведені теоретичне узагальнення та нові результати, що вирішують наукове завдання, суть якого полягає у створенні нових матеріалів для місцевого припинення кровотечі та визначення особливості їх структури, біосумісності й реакції паренхіматозних органів після ефективного гемостазу.

1. В дисертації розкриті особливості створення пористих тривимірних матеріалів на основі хітозану з використанням методів ліофільного висушування та хімічного зшивання з використанням амінокислот. У дослідженні створена технологія синтезу нових нановолокнистих тривимірних структур із хітозану, використовуючи метод електропрядіння. Визначення структурних та фізико-хімічних особливостей матеріалів показало перевагу методу електропрядіння, зокрема можливість отримання мембран з високою пористістю та рівномірним розподілом нановолокон. Дослідження нановолоконних хітозанових тривимірних мембран продемонструвало, що додавання ПЕО до розчину Хт підвищувало пористість ($p = 0,027$) та гідрофільність мембрани ($p = 0,025$). Співвідношення $\text{Хт/ПЕО} = 1/3$ дозволило одержати однорідні різноспрямовані волокна з найменшою медіаною діаметра 207,59 (109,11 – 305,74) нм ($p = 0,0023$).

2. Порівняння різних матеріалів із хітозану показало, що аерогелі, незалежно від співвідношення амінокислот були біосумісними з переважанням $\text{Хт Асп/Глу} = 5/1$ ($p = 0,012$), тоді як губки на основі аскорбату та оксалату Хт проявляли токсичний ефект стосовно культури фібробластів ($p = 0,0001$). При цьому нановолокнисті матеріали, крім мембран із чистого хітозану, проявляли високу біосумісність. Мембрани $\text{Хт/ПЕО} = 1/3$ продемонстрували найвищу адгезію та стимуляцію проліферації клітин на своїй поверхні ($p = 0,032$). Серед усіх досліджуваних матеріалів лише $\text{Хт Асп/Глу} = 1/5$ та $\text{Хт Асп/Глу} = 1/1$ проявили антибактеріальну дію щодо *E. coli* ($p = 0,0001$). Під час *in vitro* взаємодії з кров'ю найбільшу сорбційну здатність проявили ХтГ, з яких Хт ацетат збільшив свою вагу в 37 раз ($p < 0,001$). Усі хітозанові гемостатичні матеріали достовірно знижували рівень тромбоцитів,

збільшували їх ширину розподілу та об'єм, що було найбільш виражено для Хт Асп/Глу = 1/1 ($p = 0,012$) та Хт/ПЕО = 1/3 ($p = 0,019$).

3. Порівнюючи особливості структури, фізико-хімічні властивості, біосумісність та здатність впливати на проліферацію клітин, наявність антибактеріальних властивостей, сорбцію та здатність впливати на структурні особливості формених елементів крові, зокрема активувати тромбоцити, три вида матеріалів – Хт ацетат, Хт Асп/Глу = 1/1 та Хт/ПЕО = 1/3 мають потенціал для застосування в якості гемостатичних матеріалів.

4. Експеримент на моделі травми паренхіми печінки показав 100% ефективність Хт ацетату, Хт Асп/Глу = 1/1 та Хт/ПЕО = 1/3 в зупинці кровотечі. Тривалість припинення кровотечі під час застосування хітозанових матеріалів була довшою відносно групи порівняння (Тахокомб) – від 80,6 (5,71) до 84,55 (4,84) секунд, проте не мала статистично значущої відмінності ($p = 0,083$).

5. Після ефективною зупинки кровотечі усі досліджувані матеріали мали здатність до біодеградації, яка має забезпечити їх елімінацію та ріст власних тканин у місці застосування. Найбільш оптимальну біодеградацію серед гемостатичних матеріалів продемонстрував Хт/ПЕО = 1/3, площа якого на 60-ту добу дослідження становила 1,49 (0,17) мм², що менше від Хт ацетату в 1,54 раза ($p < 0,001$) та в 3,03 раза – від Хт Асп/Глу = 1/1 ($p < 0,001$), що має забезпечити відновлення паренхіми печінки після зупинки кровотечі.

6. Досліджувальні матеріали продемонстрували різну реакцію після зупинки кровотечі. Хт Асп/Глу = 1/1 спричинив виражену запальну реакцію тканини в місці застосування, що призвело до формування товстої сполучнотканинної капсули на 60-ту добу дослідження 233,37 (11,69) мкм, що у 2,12 раза більше від з ацетату Хт ($p < 0,001$) та у 3,69 разів – від Хт/ПЕО = 1/3 ($p < 0,001$). Використання Хт/ПЕО = 1/3 демонструвало протизапальний склад клітин з переважанням М2-типу макрофагів ($p < 0,001$) і Т-регуляторних лімфоцитів ($p < 0,001$). Найбільший індекс проліферації на 7-му добу дослідження продемонстрував Хт ацетат 34,18 (2,23) % ($p < 0,001$), проте до

60-ї доби кількість Ki-67 позитивних клітин поступово зменшувалася для всіх видів гемостатиків.

7. Аналіз результатів структурних, фізико-хімічних та біологічних методів дослідження а також вивчення ефективності застосування нових матеріалів, створених за допомогою різних методів, довів значну перевагу методу електропрядіння для розробки гемостатичних засобів. Використовуючи різні параметри електропрядіння, можливо отримати гемостатичний матеріал на основі хітозану для припинення паренхіматозної кровотечі з розвиненою нановолокнистою пористою структурою з контрольованим часом деградації, з вираженою гідрофільністю та сорбційною здатністю. Цей матеріал здатний забезпечити оптимальний час припинення кровотечі, бути абсолютно не токсичним, стимулювати проліферацію клітин та мати достатню площу активної поверхні для взаємодії з клітинами крові та факторами згортання. Таким чином, одержані дані можна використати для розроблення нових біоматеріалів медичного призначення.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. H. T. Peng, “Hemostatic agents for prehospital hemorrhage control: A narrative review,” *Mil. Med. Res.*, vol. 7, no. 1, pp. 1–18, 2020, doi: 10.1186/s40779-020-00241-z.
2. О. С. Герасименко, “Хірургічне лікування бойових ушкоджень живота у районі проведення антитерористичної операції,” *Одеський медичний журнал*, с. 34–37, 2017.
3. A. Gäble, F. Mück, M. Mühlmann, and S. Wirth, “Acute abdominal trauma,” *Radiologe*, vol. 59, no. 2, pp. 139–145, 2019, doi: 10.1007/s00117-018-0485-2.
4. C. Letoublon *et al.*, “Management of blunt hepatic trauma,” *J. Visc. Surg.*, vol. 153, no. 4, pp. 33–43, 2016, doi: 10.1016/j.jviscsurg.2016.07.005.
5. M. B *et al.*, “Surgical treatment for severe liver injuries: a single-center experience,” *Minerva Chir.*, vol. 75, no. 2, pp. 92–103, Apr. 2020, doi: 10.23736/S0026-4733.20.08193-6.
6. T. Hara *et al.*, “Analysis of early relaparotomy following living donor liver transplantation,” *Liver Transplant.*, vol. 22, no. 11, pp. 1519–1525, 2016, doi: 10.1002/lt.24500.
7. F. Romano *et al.*, “Bleeding in hepatic surgery: Sorting through methods to prevent it,” *HPB Surg.*, vol. 2012, 2012, doi: 10.1155/2012/169351.
8. P. Slezak *et al.*, “Efficacy of Topical Hemostatic Agents: A Comparative Evaluation of Two Gelatin/Thrombin-Based Hemostatic Matrices in a Porcine Kidney Surgical Model,” *J. Investig. Surg.*, vol. 32, no. 7, pp. 646–653, 2019, doi: 10.1080/08941939.2018.1447619.
9. C. Zheng *et al.*, “Research status and development potential of composite hemostatic materials,” *J. Mater. Chem. B*, vol. 8, no. 25, pp. 5395–5410, 2020, doi: 10.1039/d0tb00906g.
10. D. A. Hickman, C. L. Pawlowski, U. D. S. Sekhon, J. Marks, and A. Sen Gupta, “Biomaterials and Advanced Technologies for Hemostatic Management of Bleeding,” *Adv. Mater.*, vol. 30, no. 4, p. 1700859, Jan. 2018, doi:

10.1002/adma.201700859.

11. S. S. Biranje, P. V. Madiwale, and R. V. Adivarekar, “Nanoscale Chitosan-Based Hemostasis Membrane,” *J. Clin. Haematol.*, vol. 1, no. 3, pp. 85–89, 2020, doi: 10.33696/haematology.1.013.

12. Z. Hu *et al.*, “Investigation of the effects of molecular parameters on the hemostatic properties of chitosan,” *Molecules*, vol. 23, no. 12, pp. 1–14, 2018, doi: 10.3390/molecules23123147.

13. J. Li *et al.*, “Porous chitosan microspheres for application as quick in vitro and in vivo hemostat,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 77, pp. 411–419, 2017, doi: 10.1016/j.msec.2017.03.276.

14. S. Ferraris *et al.*, “Topographical and biomechanical guidance of electrospun fibers for biomedical applications,” *Polymers (Basel)*, vol. 12, no. 12, pp. 1–32, 2020, doi: 10.3390/polym12122896.

15. B. P. Antunes, A. F. Moreira, V. M. Gaspar, and I. J. Correia, “Chitosan/arginine-chitosan polymer blends for assembly of nanofibrous membranes for wound regeneration,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 130, pp. 104–112, 2015, doi: 10.1016/j.carbpol.2015.04.072.

16. F. Wang, S. Hu, Q. Jia, and L. Zhang, “Advances in Electrospinning of Natural Biomaterials for Wound Dressing,” *J. Nanomater.*, vol. 2020, 2020, doi: 10.1155/2020/8719859.

17. H. Rodríguez-Tobías, G. Morales, and D. Grande, “Comprehensive review on electrospinning techniques as versatile approaches toward antimicrobial biopolymeric composite fibers,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 101, pp. 306–322, 2019, doi: 10.1016/j.msec.2019.03.099.

18. Z. Liu, S. Ramakrishna, and X. Liu, “Electrospinning and emerging healthcare and medicine possibilities,” *APL Bioeng.*, vol. 4, no. 3, 2020, doi: 10.1063/5.0012309.

19. A. Mohamed Taha, “Non Operative Management of Isolated Blunt Liver Trauma: A Task of High Skilled Surgeons,” *J. Surg.*, vol. 5, no. 6, p. 118, 2017, doi: 10.11648/j.js.20170506.16.

20. К. О. Капшитар та О. В. Капшитар, “Наш досвід хірургічного лікування відкритих та закритих травматичних пошкоджень печінки мирного часу,” *Проблеми військової охорони здоров’я*, №. 48, с. 163–168, 2017, [Електронний ресурс]. Доступно: http://nbuv.gov.ua/UJRN/prvozhd_2017_48_27.
21. G. P. Arredondo, “Hepatic trauma treatment in a general hospital: analysis of 5.5 years,” *Liver Res. Disord. Ther.*, vol. 4, no. 4, pp. 171–174, 2018, doi: 10.15406/jlrtd.2018.04.00122.
22. S. Dilmen *et al.*, “Comparison of warm fluid and cold fluid resuscitation during uncontrolled hemorrhagic shock model in rats,” *Ulus. Travma ve Acil Cerrahi Derg.*, vol. 23, no. 4, pp. 287–293, 2017, doi: 10.5505/tjtes.2016.50487.
23. F. Coccolini *et al.*, “Liver trauma: WSES 2020 guidelines,” *World J. Emerg. Surg.*, vol. 15, no. 1, p. 24, Dec. 2020, doi: 10.1186/s13017-020-00302-7.
24. M. A. F. Ahmed, H. A. Mostafa, and M. M. M. E. Aly, “Different Modalities of Management of Liver Trauma (Operative and Nonoperative),” *Egypt. J. Hosp. Med.*, vol. 75, no. 4, pp. 2684–2689, 2019, doi: 10.21608/ejhm.2019.31584.
25. J. E. Kohler and N. K. Chokshi, “Management of abdominal solid organ injury after blunt trauma,” *Pediatr. Ann.*, vol. 45, no. 7, pp. e241–e246, 2016, doi: 10.3928/00904481-20160518-01.
26. C. S. Green, E. M. Bulger, and S. W. Kwan, “Outcomes and complications of angioembolization for hepatic trauma: A systematic review of the literature,” *J. Trauma Acute Care Surg.*, vol. 80, no. 3, pp. 529–537, 2016, doi: 10.1097/TA.0000000000000942.
27. Н. К. І.Трутяк, І. Гайда, Г. Прохоренко та А. Сельменський, “‘Damage control’ - технологія вибору для зменшення летальності й ускладнень при бойовій хірургічній травмі,” *Праці наукового товариства ім. Т. Шевченка. Медичні науки*, т. 50, №. 2, pp. 55–63, 2017, [Електронний ресурс]. Доступно: http://nbuv.gov.ua/UJRN/pntsh_lik_2017_50_2_7.

28. I. Afifi, S. Abayazeed, A. El-Menyar, H. Abdelrahman, R. Peralta, and H. Al -Thani, “Blunt liver trauma: A descriptive analysis from a level i trauma center,” *BMC Surg.*, vol. 18, no. 1, pp. 1–9, 2018, doi: 10.1186/s12893-018-0369-4.
29. Е. В. Ремезюк, “Закрита травма живота,” *Шпитальна хірургія. Журнал імені Л. Я. Ковальчука*, №. 2, с. 80–83, 2020, doi: 10.11603/2414-4533.2020.2.10770.
30. J. Peysha and P. Ferrada, “Operative and Nonoperative Management of Blunt Liver Injuries,” *Curr. Trauma Reports*, vol. 3, no. 1, pp. 38–42, 2017, doi: 10.1007/s40719-017-0077-z.
31. A. Ivanecz, V. Pivec, B. Ilijevec, S. Rudolf, and S. Potrč, “Laparoscopic anatomical liver resection after complex blunt liver trauma: a case report,” *Surg. Case Reports*, vol. 4, no. 1, 2018, doi: 10.1186/s40792-018-0432-5.
32. D. H. Kim, “Right Hemihepatectomy after Damage control Surgery for High-grade Hepatic Injury with Diaphragm Rupture,” *Trauma Image Proced.*, vol. 3, no. 1, pp. 25–27, 2018, doi: 10.24184/tip.2018.3.1.25.
33. L. Kaptanoglu, N. Kurt, and H. E. Sikar, “Current approach to liver traumas,” *Int. J. Surg.*, vol. 39, pp. 255–259, 2017, doi: 10.1016/j.ijssu.2017.02.015.
34. J. G. Martin, J. Shah, C. Robinson, and S. Dariushnia, “Evaluation and Management of Blunt Solid Organ Trauma,” *Tech. Vasc. Interv. Radiol.*, vol. 20, no. 4, pp. 230–236, 2017, doi: 10.1053/j.tvir.2017.10.001.
35. M. Lang, I. Dahan, V. Ho, and B. Kapoor, “Management of Hepatic Trauma: An Update,” *Dig. Dis. Interv.*, vol. 02, no. 02, pp. 159–171, 2018, doi: 10.1055/s-0038-1656530.
36. A. F. Saleh, E. Al.Sageer, and A. Elheny, “Management of Liver Trauma in Minia University Hospital, Egypt,” *Indian J. Surg.*, vol. 78, no. 6, pp. 442–447, 2016, doi: 10.1007/s12262-015-1393-6.
37. M. C. Prunty, S. Kudav, and J. A. Quick, “Laparoscopic management of penetrating thoracoabdominal trauma,” *J. Laparoendosc. Adv. Surg. Tech.*, vol. 28, no. 6, pp. 736–739, 2018, doi: 10.1089/lap.2017.0482.
38. I. A. Gaski *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*, vol. 3, no. 1, pp. 1–6, 2018, doi: 10.1136/tsaco-2018-000205.

39. H. C. Neupane, K. K. Tamrakar, A. Bhattarai, T. Y. Tamang, B. Bista, and R. Chaulagain, “Management of Traumatic Liver Injury in a Tertiary Care Hospital in Nepal,” *J. Nepal Health Res. Counc.*, vol. 17, no. 4, pp. 537–542, 2020, doi: 10.33314/jnhrc.v17i4.1958.

40. В. В.Петрушенко, В. І. Стойка, Д. І. Гребенюк, С. С. Стукан, “Сучасні підходи до лікування гемангіоми печінки,” *Вісник Вінницького національного медичного університету*, т. 21, №. 1, pp. 104–109, 2017.

41. M. C. Kew, *Liver Cancer*, Second Edi., vol. 4. Elsevier, 2016.

42. K. D. Miller *et al.*, “Cancer treatment and survivorship statistics, 2019,” *CA. Cancer J. Clin.*, vol. 69, no. 5, pp. 363–385, 2019, doi: 10.3322/caac.21565.

43. S. R. Horn *et al.*, “Epidemiology of liver metastases,” *Cancer Epidemiol.*, vol. 67, no. January, p. 101760, 2020, doi: 10.1016/j.canep.2020.101760.

44. M. Dhir and A. R. Sasson, “Surgical management of liver metastases from colorectal cancer,” *J. Oncol. Pract.*, vol. 12, no. 1, pp. 33–39, 2016, doi: 10.1200/JOP.2015.009407.

45. S. Abbas, V. Lam, and M. Hollands, “Ten-Year Survival after Liver Resection for Colorectal Metastases: Systematic Review and Meta-Analysis,” *ISRN Oncol.*, vol. 2011, pp. 1–11, 2011, doi: 10.5402/2011/763245.

46. L. J. Wang, H. W. Wang, K. M. Jin, J. Li, and B. C. Xing, “Comparison of sequential, delayed and simultaneous resection strategies for synchronous colorectal liver metastases,” *BMC Surg.*, vol. 20, no. 1, pp. 1–9, 2020, doi: 10.1186/s12893-020-0681-7.

47. A. Zarrinpar and R. W. Busuttil, “Liver transplantation: Past, present and future,” *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, vol. 10, no. 7, pp. 434–440, 2013, doi: 10.1038/nrgastro.2013.88.

48. K. P. Au and K. S. H. Chok, “Minimally invasive donor hepatectomy,

are we ready for prime time?,” *World J. Gastroenterol.*, vol. 24, no. 25, pp. 2698–2709, 2018, doi: 10.3748/wjg.v24.i25.2698.

49. M. Hartmann, C. Szalai, and F. H. Saner, “Hemostasis in liver transplantation: Pathophysiology, monitoring, and treatment,” *World J. Gastroenterol.*, vol. 22, no. 4, pp. 1541–1550, 2016, doi: 10.3748/wjg.v22.i4.1541.

50. N. Vinayak *et al.*, “Dual graft living donor liver transplantation- A case report,” *BMC Surg.*, vol. 19, no. 1, pp. 1–8, 2019, doi: 10.1186/s12893-019-0606-5.

51. S. H. Kim, S. D. Lee, Y. K. Kim, and S. J. Park, “Pushing the frontiers of living donor right hepatectomy,” *World J. Gastroenterol.*, vol. 20, no. 48, pp. 18061–18069, 2014, doi: 10.3748/wjg.v20.i48.18061.

52. J. D. Perkins, “Techniques to ensure adequate portal flow in the presence of splenorenal shunts,” *Liver Transplant.*, vol. 13, no. 5, pp. 767–768, 2007, doi: 10.1002/lt.

53. J. U. Yoon, G. J. Byeon, J. Y. Park, S. H. Yoon, J. H. Ryu, and H. S. Ri, “Bloodless living donor liver transplantation Risk factors, outcomes, and diagnostic predictors,” *Med. (United States)*, vol. 97, no. 50, pp. 1–5, 2018, doi: 10.1097/MD.00000000000013581.

54. R. L. French and A. D. Gilliam, “Control of haemorrhage and damage control surgery,” *Surg. (United Kingdom)*, vol. 34, no. 11, pp. 568–574, 2016, doi: 10.1016/j.mpsur.2016.08.010.

55. E. Kostallari and V. H. Shah, “Angiocrine signaling in the hepatic sinusoids in health and disease,” *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.*, vol. 311, no. 2, pp. G246–G251, 2016, doi: 10.1152/ajpgi.00118.2016.

56. H. G. Augustin and G. Y. Koh, “Organotypic vasculature: From descriptive heterogeneity to functional pathophysiology,” *Science.*, vol. 357, no. 6353, pp. 1–22, 2017, doi: 10.1126/science.aal2379.

57. R. M. Juza and E. M. Pauli, “Clinical and surgical anatomy of the liver: A review for clinicians,” *Clin. Anat.*, vol. 27, no. 5, pp. 764–769, 2014, doi: 10.1002/ca.22350.

58. M. H. Periyah, A. S. Halim, and A. Z. M. Saad, “Mechanism action of

platelets and crucial blood coagulation pathways in Hemostasis,” *Int. J. Hematol. Stem Cell Res.*, vol. 11, no. 4, pp. 319–327, 2017.

59. S. A. Smith, R. J. Travers, and J. H. Morrissey, “Initiation of clotting cascade,” *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, vol. 50, no. 4, pp. 326–336, 2016, doi: 10.3109/10409238.2015.1050550.How.

60. J. Geddings and N. Mackman, “New players in haemostasis and thrombosis,” *Thromb. Haemost.*, vol. 111, no. 04, pp. 570–574, Nov. 2014, doi: 10.1160/TH13-10-0812.

61. S. Nouri, M. R. Sharif, H. Afzali, A. Sharif, and M. Satkin, “The advantages and disadvantages of methods used to control liver bleeding: A review,” *Trauma Mon.*, vol. 20, no. 4, 2015, doi: 10.5812/traumamon.28088.

62. J. Gagnière *et al.*, “Effects of clamping procedures on central venous pressure during liver resection,” *J. Visc. Surg.*, vol. 153, no. 2, pp. 89–94, 2016, doi: 10.1016/j.jviscsurg.2015.11.001.

63. M. J. Hughes, N. T. Ventham, E. M. Harrison, and S. J. Wigmore, “Central venous pressure and liver resection: A systematic review and meta-analysis,” *Hpb*, vol. 17, no. 10, pp. 863–871, 2015, doi: 10.1111/hpb.12462.

64. I. Pabinger, D. Fries, H. Schöchl, W. Streif, and W. Toller, “Tranexamic acid for treatment and prophylaxis of bleeding and hyperfibrinolysis,” *Wien. Klin. Wochenschr.*, vol. 129, no. 9–10, pp. 303–316, 2017, doi: 10.1007/s00508-017-1194-y.

65. D. R. Spahn *et al.*, “The European guideline on management of major bleeding and coagulopathy following trauma: fifth edition,” *Crit. Care*, vol. 23, no. 1, p. 98, Dec. 2019, doi: 10.1186/s13054-019-2347-3.

66. S. Buci, M. Torba, A. Gjata, I. Kajo, G. Bushi, and K. Kagjini, “The rate of success of the conservative management of liver trauma in a developing country,” *World J. Emerg. Surg.*, vol. 12, no. 1, pp. 1–7, 2017, doi: 10.1186/s13017-017-0135-4.

67. K. P. Blaine and T. Sakai, “Viscoelastic Monitoring to Guide Hemostatic Resuscitation in Liver Transplantation Surgery,” *Semin. Cardiothorac.*

Vasc. Anesth., vol. 22, no. 2, pp. 150–163, 2018, doi: 10.1177/1089253217739121.

68. J. W. Semple, J. Rebetz, and R. Kapur, “Transfusion-associated circulatory overload and transfusion-related acute lung injury,” *Blood*, vol. 133, no. 17, pp. 1840–1853, 2019, doi: 10.1182/blood-2018-10-860809.

69. L. M. Zhang, R. Li, X. C. Zhao, Q. Zhang, and X. L. Luo, “Increased Transfusion of Fresh Frozen Plasma is Associated with Mortality or Worse Functional Outcomes After Severe Traumatic Brain Injury: A Retrospective Study,” *World Neurosurg.*, vol. 104, pp. 381–389, 2017, doi: 10.1016/j.wneu.2017.04.140.

70. K. Doklešćić *et al.*, “Surgical management of AAST grades III-V hepatic trauma by Damage control surgery with perihepatic packing and Definitive hepatic repair-single centre experience,” *World J. Emerg. Surg.*, vol. 10, no. 1, pp. 4–11, 2015, doi: 10.1186/s13017-015-0031-8.

71. L. M. Kodadek, D. T. Efron, and E. R. Haut, “Intrahepatic Balloon Tamponade for Penetrating Liver Injury: Rarely Needed but Highly Effective,” *World J. Surg.*, vol. 43, no. 2, pp. 486–489, 2019, doi: 10.1007/s00268-018-4812-6.

72. J. J. Segura-Sampedro, C. Pineño-Flores, A. Craus-Miguel, R. Morales-Soriano, and F. X. González-Argente, “New hemostatic device for grade IV-V liver injury in porcine model: A proof of concept,” *World J. Emerg. Surg.*, vol. 14, no. 1, pp. 1–9, 2019, doi: 10.1186/s13017-019-0277-7.

73. E. Hornez *et al.*, “Management specificities for abdominal, pelvic and vascular penetrating trauma,” *J. Visc. Surg.*, vol. 154, pp. S43–S55, 2017, doi: 10.1016/j.jviscsurg.2017.10.009.

74. B. C. Lin, J. F. Fang, R. J. Chen, Y. C. Wong, and Y. P. Hsu, “Surgical management and outcome of blunt major liver injuries: Experience of damage control laparotomy with perihepatic packing in one trauma centre,” *Injury*, vol. 45, no. 1, pp. 122–127, 2014, doi: 10.1016/j.injury.2013.08.022.

75. D. Patrono *et al.*, “Peri-hepatic gauze packing for the control of haemorrhage during liver transplantation: A retrospective study,” *Dig. Liver Dis.*, vol. 48, no. 4, pp. 414–422, 2016, doi: 10.1016/j.dld.2015.11.018.

76. B. Malgras *et al.*, “Damage control: Concept and implementation,” *J.*

Visc. Surg., vol. 154, pp. S19–S29, 2017, doi: 10.1016/j.jviscsurg.2017.08.012.

77. G. Eeson and P. J. Karanicolas, “Hemostasis and Hepatic Surgery,” *Surg. Clin. North Am.*, vol. 96, no. 2, pp. 219–228, 2016, doi: 10.1016/j.suc.2015.12.001.

78. М. Э. Писецкая, “Применение методов васкулярной эксклюзии печени при ее резекциях,” *Международный медицинский журнал.*, Т. 20, №. 3, pp. 67–71, 2014.

79. P. Sanjay, I. Ong, A. Bartlett, J. J. Powell, and S. J. Wigmore, “Meta-analysis of intermittent Pringle manoeuvre versus no Pringle manoeuvre in elective liver surgery,” *ANZ J. Surg.*, vol. 83, no. 10, pp. 719–723, 2013, doi: 10.1111/ans.12312.

80. M. Stellingwerff, A. Brandsma, T. Lisman, and R. Porte, “Prohemostatic interventions in liver surgery,” *Semin. Thromb. Hemost.*, vol. 38, no. 3, pp. 244–249, 2012, doi: 10.1055/s-0032-1302440.

81. D. B. Yao and S. D. Wu, “Application of stapling devices in liver surgery: Current status and future prospects,” *World J. Gastroenterol.*, vol. 22, no. 31, pp. 7091–7098, 2016, doi: 10.3748/wjg.v22.i31.7091.

82. J. Fritzmann *et al.*, “Randomized clinical trial of stapler hepatectomy versus LigaSureTM transection in elective hepatic resection,” *Br. J. Surg.*, vol. 105, no. 9, pp. 1119–1127, 2018, doi: 10.1002/bjs.10902.

83. J. T. Huntington, N. A. Royall, and C. R. Schmidt, “Minimizing blood loss during hepatectomy: A literature review,” *J. Surg. Oncol.*, vol. 109, no. 2, pp. 81–88, 2014, doi: 10.1002/jso.23455.

84. J. D. MacDonald, C. A. Bowers, S. S. Chin, and G. Burns, “Comparison of the effects of surgical dissection devices on the rabbit liver,” *Surg. Today*, vol. 44, no. 6, pp. 1116–1122, 2014, doi: 10.1007/s00595-013-0712-4.

85. Y. jun Zhao, D. chen Zhou, F. bao Liu, H. chuan Zhao, G. bin Wang, and X. ping Geng, “BiClamp[®] vessel-sealing device for open hepatic resection of malignant and benign liver tumours: A single-institution experience,” *BMC Cancer*, vol. 17, no. 1, pp. 1–6, 2017, doi: 10.1186/s12885-017-3513-0.

86. J. C. Lamattina, M. Hosseini, S. A. Fayek, B. Philosophe, and R. N. Barth, "Efficiency of the ligasure vessel sealing system for recipient hepatectomy in liver transplantation," *Transplant. Proc.*, vol. 45, no. 5, pp. 1931–1933, 2013, doi: 10.1016/j.transproceed.2012.11.022.
87. G. Liao, S. Wen, X. Xie, and Q. Wu, "Harmonic scalpel versus monopolar electrocauterization in cholecystectomy," *J. Soc. Laparoendosc. Surg.*, vol. 20, no. 3, 2016, doi: 10.4293/JSLS.2016.00037.
88. M. El Shobary *et al.*, "Spray Diathermy Versus Harmonic Scalpel Technique for Hepatic Parenchymal Transection of Living Donor," *J. Gastrointest. Surg.*, vol. 21, no. 2, pp. 321–329, 2017, doi: 10.1007/s11605-016-3312-y.
89. K. Sasaki, M. Matsuda, M. Hashimoto, and G. Watanabe, "Liver resection for hepatocellular carcinoma using a microwave tissue coagulator: Experience of 1118 cases," *World J. Gastroenterol.*, vol. 21, no. 36, pp. 10400–10408, 2015, doi: 10.3748/wjg.v21.i36.10400.
90. X. Dong, Z. Sun, T. Wu, W. Guo, S. Yan, and S. Zheng, "915-MHz microwave-assisted laparoscopic hepatectomy: a new technique for liver resection," *Surg. Endosc.*, vol. 33, no. 2, pp. 395–400, 2019, doi: 10.1007/s00464-017-5945-7.
91. В. В. Петрушенко *та ін.*, "Клініко-морфологічне обґрунтування переваг лапароскопічних втручань з використанням аргано-плазмової коагуляції в лікуванні гемангіоми печінки," *Клінічна хірургія*, т. 2, с. 54–56, 2017.
92. T. R. Glowka, J. Standop, P. Paschenda, M. Czaplik, J. C. Kalff, and R. H. Tolba, "Argon and helium plasma coagulation of porcine liver tissue," *J. Int. Med. Res.*, vol. 45, no. 5, pp. 1505–1517, 2017, doi: 10.1177/0300060517706576.
93. T. Ma *et al.*, "Effects of Different 980-nm Diode Laser Parameters in Hepatectomy," *Lasers Surg. Med.*, vol. 51, no. 8, pp. 720–726, 2019, doi: 10.1002/lsm.23101.
94. H. Cheng *et al.*, "Procedure costs associated with the use of harmonic devices compared to conventional techniques in various surgeries: A systematic review and meta-analysis," *Clin. Outcomes Res.*, vol. 10, pp. 399–412, 2018, doi:

10.2147/CEOR.S164747.

95. T. R. C. G. Coutinho *et al.*, “Comparison between electrocautery and fibrin selant after hepatectomy in rats,” *Rev. Col. Bras. Cir.*, vol. 41, no. 3, pp. 198–202, 2014, doi: 10.1590/S0100-69912014000300011.

96. C. Simillis, T. Li, J. Vaughan, B. La, D. Br, and G. Ks, “Methods to decrease blood loss during liver resection: a network meta-analysis summary of findings for the main comparison,” no. 4, 2014, doi: 10.1002/14651858.CD010683.pub3. www.cochranelibrary.com.

97. A. L. Harkins, S. Duri, L. C. Kloth, and C. D. Tran, “Chitosan-cellulose composite for wound dressing material. Part 2. Antimicrobial activity, blood absorption ability, and biocompatibility,” *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.*, vol. 102, no. 6, pp. 1199–1206, Aug. 2014, doi: 10.1002/jbm.b.33103.

98. H. Huang *et al.*, “Degradable and Bioadhesive Alginate-Based Composites: An Effective Hemostatic Agent,” *ACS Biomater. Sci. Eng.*, vol. 5, no. 10, pp. 5498–5505, 2019, doi: 10.1021/acsbomaterials.9b01120.

99. Y. Liang *et al.*, “Adhesive Hemostatic Conducting Injectable Composite Hydrogels with Sustained Drug Release and Photothermal Antibacterial Activity to Promote Full-Thickness Skin Regeneration During Wound Healing,” *Small*, vol. 15, no. 12, pp. 1–17, 2019, doi: 10.1002/smll.201900046.

100. Y. Zhong, H. Hu, N. Min, Y. Wei, X. Li, and X. Li, “Application and outlook of topical hemostatic materials: a narrative review,” *Ann. Transl. Med.*, vol. 9, no. 7, pp. 577–577, 2021, doi: 10.21037/atm-20-7160.

101. А. В. Лукашенко та М. О. Віноградова, “Порівняння гемостатичних засобів, що використовуються в хірургії,” *Clin. Oncol.*, vol. 39, pp. 100–108, 2021, doi: 10.32471/clinicaloncology.2663-466x.39-3.27638.

102. G. Chen, Y. Yu, X. Wu, G. Wang, J. Ren, and Y. Zhao, “Bioinspired Multifunctional Hybrid Hydrogel Promotes Wound Healing,” *Adv. Funct. Mater.*, vol. 28, no. 33, pp. 1–10, 2018, doi: 10.1002/adfm.201801386.

103. J. Zhu, F. Li, X. Wang, J. Yu, and D. Wu, “Hyaluronic Acid and

Polyethylene Glycol Hybrid Hydrogel Encapsulating Nanogel with Hemostasis and Sustainable Antibacterial Property for Wound Healing,” *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 10, no. 16, pp. 13304–13316, 2018, doi: 10.1021/acsami.7b18927.

104. C. Cui *et al.*, “Water-Triggered Hyperbranched Polymer Universal Adhesives: From Strong Underwater Adhesion to Rapid Sealing Hemostasis,” *Adv. Mater.*, vol. 31, no. 49, pp. 1–9, 2019, doi: 10.1002/adma.201905761.

105. E. Borie, E. Rosas, G. Kuramochi, S. Etcheberry, S. Olate, and B. Weber, “Oral Applications of Cyanoacrylate Adhesives: A Literature Review,” *Biomed Res. Int.*, vol. 2019, 2019, doi: 10.1155/2019/8217602.

106. J. J. Sohn, T. M. Gruber, J. L. Zahorsky-Reeves, and G. W. Lawson, “Comparison of 2-Ethyl-Cyanoacrylate and 2-Butyl-Cyanoacrylate for use on the calvaria of CD1 mice,” *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.*, vol. 55, no. 2, pp. 199–203, 2016.

107. A. Wolfe, A. Aten, and JW Schrock, “The Use of 2-Octyl Cyanoacrylate Skin Adhesive for Laceration Repair in the Emergency Department,” *Clin Dermatol Res J*, vol. 2, no. 1, pp. 2–4, 2017.

108. L. Yu, X. Shang, H. Chen, L. Xiao, Y. Zhu, and J. Fan, “A tightly-bonded and flexible mesoporous zeolite-cotton hybrid hemostat,” *Nat. Commun.*, vol. 10, no. 1, pp. 1–9, 2019, doi: 10.1038/s41467-019-09849-9.

109. J. Chen *et al.*, “Synergistic enhancement of hemostatic performance of mesoporous silica by hydrocaffeic acid and chitosan,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 139, pp. 1203–1211, 2019, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.08.091.

110. A. J. Boulton, C. T. Lewis, D. N. Naumann, and M. J. Midwinter, “Prehospital haemostatic dressings for trauma: A systematic review,” *Emerg. Med. J.*, pp. 1–9, 2018, doi: 10.1136/emermed-2018-207523.

111. J. Wang, M. Wang, L. Zhao, L. Liu, X. Wang, and Z. Fan, “Investigating the efficacy and safety of mineral smectite granules on wound healing,” *Exp. Ther. Med.*, vol. 21, no. 2, 2020, doi: 10.3892/etm.2020.9591.

112. G. Wang, N. Liu, and M. Guo, “Use of whey protein as a natural polymer for tissue adhesive: Preliminary formulation and evaluation in vitro,”

Polymers (Basel)., vol. 10, no. 8, 2018, doi: 10.3390/polym10080843.

113. C. Hilger *et al.*, “Anaphylaxis to bovine serum albumin tissue adhesive in a non–meat-allergic patient,” *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.*, vol. 30, no. 5, pp. 369–371, 2020, doi: 10.18176/jiaci.0522.

114. Y. Lim, Y.-J. Ok, S. Hwang, J. Kwak, and S. Yoon, “Marine Collagen as A Promising Biomaterial for,” *Mar. Drugs*, vol. 17, no. 8, p. 467, 2019, [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6723527/>.

115. T. Manon-Jensen, N. G. Kjeld, and M. A. Karsdal, “Collagen-mediated hemostasis,” *J. Thromb. Haemost.*, vol. 14, no. 3, pp. 438–448, 2016, doi: 10.1111/jth.13249.

116. C. Wiegand *et al.*, “A novel native collagen dressing with advantageous properties to promote physiological wound healing,” *J. Wound Care*, vol. 25, no. 12, pp. 713–720, Dec. 2016, doi: 10.12968/jowc.2016.25.12.713.

117. H. Y *et al.*, “A novel gene recombinant collagen hemostatic sponge with excellent biocompatibility and hemostatic effect,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 178, pp. 296–305, May 2021, doi: 10.1016/J.IJBIOMAC.2021.02.162.

118. T. Takagi, H. Tsujimoto, H. Torii, Y. Ozamoto, and A. Hagiwara, “Two-layer sheet of gelatin: A new topical hemostatic agent,” *Asian J. Surg.*, vol. 41, no. 2, pp. 124–130, 2018, doi: 10.1016/j.asjsur.2016.09.007.

119. N. T. Dai *et al.*, “A biodegradable hemostatic gelatin/polycaprolactone composite for surgical hemostasis,” *Ann. Plast. Surg.*, vol. 78, no. 3, pp. S124–S128, 2017, doi: 10.1097/SAP.0000000000001017.

120. P. Slezak, C. Keibl, H. Redl, D. Labahn, and H. Gulle, “An Efficacy Comparison of Two Hemostatic Agents in a Porcine Liver Bleeding Model: Gelatin/Thrombin Flowable Matrix versus Collagen/Thrombin Powder,” *J. Investig. Surg.*, vol. 33, no. 9, pp. 828–838, 2020, doi: 10.1080/08941939.2019.1571130.

121. Y. Jiang, I. H. Yuan, E. K. Dutille, R. Bailey, and M. S. Shaker, “Preventing iatrogenic gelatin anaphylaxis,” *Ann. Allergy, Asthma Immunol.*, vol. 123, no. 4, pp. 366–374, 2019, doi: 10.1016/j.anai.2019.07.017.

122. M. T. De Boer, E. A. Boonstra, T. Lisman, and R. J. Porte, “Role of

fibrin sealants in liver surgery,” *Dig. Surg.*, vol. 29, no. 1, pp. 54–61, 2012, doi: 10.1159/000335735.

123. A. Navarro and A. Brooks, “Use of local pro-coagulant haemostatic agents for intra-cavity control of haemorrhage after trauma,” *Eur. J. Trauma Emerg. Surg.*, vol. 41, no. 5, pp. 493–500, 2015, doi: 10.1007/s00068-014-0441-4.

124. D. Kamamoto *et al.*, “Efficacy of a topical gelatin-thrombin hemostatic matrix, FLOSEAL®, in intracranial tumor resection,” *Surg. Neurol. Int.*, vol. 11, no. 16, pp. 1–7, 2020, doi: 10.25259/SNI_272_2019.

125. K. Mita *et al.*, “Use of a fibrinogen/thrombin-based collagen fleece (TachoComb, TachoSil) with a stapled closure to prevent pancreatic fistula formation following distal pancreatectomy,” *Surg. Innov.*, vol. 22, no. 6, pp. 601–605, 2015, doi: 10.1177/1553350615580649.

126. C. García-Vásquez, S. Gómez García De Las Heras, C. Pastor Idoate, D. De Pablo, and M. J. Fernández-Aceñero, “Histopathological changes associated to an absorbable fibrin patch (Tachosil®) covering in an experimental model of high-risk colonic anastomoses,” *Histol. Histopathol.*, vol. 33, no. 3, pp. 299–306, 2018, doi: 10.14670/HH-11-930.

127. C. I. Wells *et al.*, “Haemostatic Efficacy of Topical Agents During Liver Resection: A Network Meta-Analysis of Randomised Trials,” *World J. Surg.*, vol. 44, no. 10, pp. 3461–3469, 2020, doi: 10.1007/s00268-020-05621-z.

128. J. Kochan, L. Schmidtová, I. Sadloňová, A. Murányi, J. Zigová, and M. Múcková, “Hemostatic effect and distribution of new rhThrombin formulations in rats,” *Interdiscip. Toxicol.*, vol. 7, no. 4, pp. 219–222, 2014, doi: 10.2478/intox-2014-0032.

129. M. A. Carlson, J. Calcaterra, J. M. Johanning, I. I. Pipinos, C. M. Cordes, and W. H. Velander, “A totally recombinant human fibrin sealant,” *J. Surg. Res.*, vol. 187, no. 1, pp. 334–342, 2014, doi: 10.1016/j.jss.2013.09.039.

130. X. Yang *et al.*, “Design and development of polysaccharide hemostatic materials and their hemostatic mechanism,” *Biomater. Sci.*, vol. 5, no. 12, pp. 2357–2368, 2017, doi: 10.1039/c7bm00554g.

131. J. Sun and H. Tan, "Alginate-based biomaterials for regenerative medicine applications," *Materials (Basel)*, vol. 6, no. 4, pp. 1285–1309, 2013, doi:10.3390/ma6041285.
132. M. Gharagozloo *et al.*, "CLINICAL STUDY Immune-mediated cochleovestibular disease," *Bratisl. lek.??rske List.*, vol. 116, no. 5, pp. 296–301, 2015, doi: 10.4149/BLL.
133. J. jing Rong *et al.*, "Alginate-calcium microsphere loaded with thrombin: A new composite biomaterial for hemostatic embolization," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 75, pp. 479–488, 2015, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2014.12.043.
134. M. A. Labelle, P. Ispas-Szabo, and M. A. Mateescu, "Structure-Functions Relationship of Modified Starches for Pharmaceutical and Biomedical Applications," *Starch/Staerke*, vol. 72, no. 7–8, pp. 1–13, 2020, doi: 10.1002/star.202000002.
135. J. Qian, Y. Chen, H. Yang, C. Zhao, X. Zhao, and H. Guo, "Preparation and characterization of crosslinked porous starch hemostatic," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 160, pp. 429–436, 2020, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.05.189.
136. V. Panwar *et al.*, "In-vitro and In-vivo evaluation of biocompatible and biodegradable calcium-modified carboxymethyl starch as a topical hemostat," *Materialia*, vol. 7, no. April, p. 100373, 2019, doi: 10.1016/j.mtla.2019.100373.
137. S. Zhang, J. Li, S. Chen, X. Zhang, J. Ma, and J. He, "Oxidized cellulose-based hemostatic materials," *Carbohydr. Polym.*, vol. 230, p. 115585, 2020, doi: 10.1016/j.carbpol.2019.115585.
138. F. Cheng *et al.*, "Carbon nanotube-modified oxidized regenerated cellulose gauzes for hemostatic applications," *Carbohydr. Polym.*, vol. 183, no. May 2017, pp. 246–253, 2018, doi: 10.1016/j.carbpol.2017.12.035.
139. G. Franceschini, "Internal surgical use of biodegradable carbohydrate polymers. Warning for a conscious and proper use of oxidized regenerated cellulose," *Carbohydr. Polym.*, vol. 216, no. April, pp. 213–216, 2019, doi: 10.1016/j.carbpol.2019.04.036.
140. N. Graupner, H. Fischer, G. Ziegmann, and J. Müssig, "Improvement

and analysis of fibre/matrix adhesion of regenerated cellulose fibre reinforced PP-, MAPP- and PLA-composites by the use of Eucalyptus globulus lignin,” *Compos. Part B Eng.*, vol. 66, pp. 117–125, 2014, doi: 10.1016/j.compositesb.2014.05.002.

141. F. Cheng *et al.*, “Preparation and Characterization of 2,2,6,6-Tetramethylpiperidine-1-oxyl (TEMPO)-Oxidized Cellulose Nanocrystal/Alginate Biodegradable Composite Dressing for Hemostasis Applications,” *ACS Sustain. Chem. Eng.*, vol. 5, no. 5, pp. 3819–3828, 2017, doi: 10.1021/acssuschemeng.6b02849.

142. V. S. Yeul and S. S. Rayalu, “Unprecedented Chitin and Chitosan: A Chemical Overview,” *J. Polym. Environ.*, vol. 21, no. 2, pp. 606–614, 2013, doi: 10.1007/s10924-012-0458-x.

143. S. Islam, M. A. R. Bhuiyan, and M. N. Islam, “Chitin and Chitosan: Structure, Properties and Applications in Biomedical Engineering,” *J. Polym. Environ.*, vol. 25, no. 3, pp. 854–866, 2017, doi: 10.1007/s10924-016-0865-5.

144. Z. Wu, W. Zhou, W. Deng, C. Xu, Y. Cai, and X. Wang, “Antibacterial and Hemostatic Thiol-Modified Chitosan-Immobilized AgNPs Composite Sponges,” *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 12, no. 18, pp. 20307–20320, 2020, doi: 10.1021/acami.0c05430.

145. M. A. Matica, F. L. Aachmann, A. Tøndervik, H. Sletta, and V. Ostafe, “Chitosan as a wound dressing starting material: Antimicrobial properties and mode of action,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 20, no. 23, pp. 1–33, 2019, doi: 10.3390/ijms20235889.

146. S. Alven and B. A. Aderibigbe, “Chitosan and cellulose-based hydrogels for wound management,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 21, no. 24, pp. 1–30, 2020, doi: 10.3390/ijms21249656.

147. H. Liu *et al.*, “A functional chitosan-based hydrogel as a wound dressing and drug delivery system in the treatment of wound healing,” *RSC Adv.*, vol. 8, no. 14, pp. 7533–7549, 2018, doi: 10.1039/c7ra13510f.

148. S. M. Ahsan, M. Thomas, K. K. Reddy, S. G. Sooraparaju, A. Asthana, and I. Bhatnagar, “Chitosan as biomaterial in drug delivery and tissue engineering,”

Int. J. Biol. Macromol., vol. 110, pp. 97–109, 2018, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.08.140.

149. E. P. Rondon *et al.*, “Evidence supporting the safety of pegylated diethylaminoethyl-chitosan polymer as a nanovector for gene therapy applications,” *Int. J. Nanomedicine*, vol. 15, pp. 6183–6200, 2020, doi: 10.2147/IJN.S252397.

150. M. H. Periyah *et al.*, “Glycoprotein IIb/IIIa and P2Y₁₂ Induction by Oligochitosan Accelerates Platelet Aggregation,” *Biomed Res. Int.*, vol. 2014, pp. 6–13, 2014, doi: 10.1155/2014/653149.

151. Y. Huang *et al.*, “Hemostasis mechanism and applications of N-alkylated chitosan sponge,” *Polym. Adv. Technol.*, vol. 28, no. 9, pp. 1107–1114, Sep. 2017, doi: 10.1002/PAT.4003.

152. M. A. Khan and M. Mujahid, “A review on recent advances in chitosan based composite for hemostatic dressings,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 124, pp.138–147, 2019, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.11.045.

153. A. Chaturvedi *et al.*, “Hydrophobically modified chitosan gauze: a novel topical hemostat,” *J. Surg. Res.*, vol. 207, no. August, pp. 45–52, 2017, doi: 10.1016/j.jss.2016.04.052.

154. X. Sun, Z. Tang, M. Pan, Z. Wang, H. Yang, and H. Liu, “Chitosan/kaolin composite porous microspheres with high hemostatic efficacy,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 177, pp. 135–143, 2017, doi: 10.1016/j.carbpol.2017.08.131.

155. E. E. Leonhardt, N. Kang, M. A. Hamad, K. L. Wooley, and M. Elsabahy, “Absorbable hemostatic hydrogels comprising composites of sacrificial templates and honeycomb-like nanofibrous mats of chitosan,” *Nat. Commun.*, vol. 10, no. 1, pp. 1–9, 2019, doi: 10.1038/s41467-019-10290-1.

156. X. Fan *et al.*, “Morphology-controllable cellulose/chitosan sponge for deep wound hemostasis with surfactant and pore-foaming agent,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 118, no. July 2020, 2021, doi: 10.1016/j.msec.2020.111408.

157. S. Varnaitė-Žuravliova, N. Savest, J. Baltušnikaitė-Guzaitienė, A. Abraitienė, and A. Krumme, “Electrospinning of chitosan biopolymer and

polyethylene oxide blends,” *Autex Res. J.*, vol. 20, no. 4, pp. 426–440, 2020, doi: 10.2478/aut-2019-0031.

158. Y. Sun, S. Cheng, W. Lu, Y. Wang, P. Zhang, and Q. Yao, “Electrospun fibers and their application in drug controlled release, biological dressings, tissue repair, and enzyme immobilization,” *RSC Adv.*, vol. 9, no. 44, pp. 25712–25729, 2019, doi: 10.1039/c9ra05012d.

159. C. E. G. Garcia, F. Bossard, and M. Rinaudo, “Electrospun biomaterials from chitosan blends applied as scaffold for tissue regeneration,” *Polymers (Basel)*, vol. 13, no. 7, pp. 1–20, 2021, doi: 10.3390/polym13071037.

160. M. Pogorielov *et al.*, “Development of chitosan hemostatic sponges with different solvents and tranexamic acid,” *Proc. 2018 IEEE 8th Int. Conf. Nanomater. Appl. Prop. N. 2018*, pp. 1–5, 2018, doi: 10.1109/NAP.2018.8914877.

161. F. Coccolini *et al.*, “Peritoneal adhesion index (PAI): Proposal of a score for the ‘ ignored iceberg’ of medicine and surgery,” *World J. Emerg. Surg.*, vol. 8, no. 1, pp. 1–5, 2013, doi: 10.1186/1749-7922-8-6.

162. J. Radwan-Pragłowska *et al.*, “Chitosan-Based Bioactive Hemostatic Agents with Antibacterial Properties—Synthesis and Characterization,” *Molecules*, vol. 24, no. 14, p. 2629, Jul. 2019, doi: 10.3390/molecules24142629.

163. V. Deineka *et al.*, “Hemostatic and tissue regeneration performance of novel electrospun chitosan-based materials,” *Biomedicines*, vol. 9, no. 6, pp. 1–16, 2021, doi: 10.3390/biomedicines9060588.

164. J. Radwan-Pragłowska *et al.*, “Nanostructured Hemostatic Sponges Made from Chitosan: Structural and Biological Evaluation,” *Springer Proc. Phys.*, vol. 244, pp. 95–110, 2020, doi: 10.1007/978-981-15-3996-1_10.

165. R. W. Day *et al.*, “Advances in hepatectomy technique: Toward zero transfusions in the modern era of liver surgery,” *Surg. (United States)*, vol. 159, no. 3, pp. 793–801, 2016, doi: 10.1016/j.surg.2015.10.006.

166. J. Liu, Y. Zhang, H. Zhu, L. Qiu, and C. Guo, “Prediction of perioperative outcome after hepatic resection for pediatric patients,” *BMC Gastroenterol.*, vol. 19, no. 1, pp. 1–7, 2019, doi: 10.1186/s12876-019-1109-7.

167. J. M. L. Williamson, J. R. E. Rees, C. G. Streets, A. D. Strickland, and M. D. Finch-Jones, "Management of liver trauma," *Br. J. Hosp. Med.*, vol. 74, no. 8, pp. 432–438, 2013, doi: 10.12968/hmed.2013.74.8.432.
168. S. Tohme, P. R. Varley, D. P. Landsittel, A. P. Chidi, and A. Tsung, "Preoperative anemia and postoperative outcomes after hepatectomy," *Hpb*, vol. 18, no. 3, pp. 255–261, 2016, doi: 10.1016/j.hpb.2015.09.002.
169. S. Lorente, M. Hautefeuille, and A. Sanchez-Cedillo, "The liver, a functionalized vascular structure," *Sci. Rep.*, vol. 10, no. 1, pp. 1–10, 2020, doi: 10.1038/s41598-020-73208-8.
170. R. Brustia, B. Granger, and O. Scatton, "An update on topical haemostatic agents in liver surgery: systematic review and meta analysis," *J. Hepatobiliary. Pancreat. Sci.*, vol. 23, no. 10, pp. 609–621, 2016, doi: 10.1002/jhbp.389.
171. O. Chiara *et al.*, "A systematic review on the use of topical hemostats in trauma and emergency surgery," *BMC Surg.*, vol. 18, no. 1, pp. 1–20, 2018, doi: 10.1186/s12893-018-0398-z.
172. Y. Chen *et al.*, "Polysaccharide Based Hemostatic Strategy for Ultrarapid Hemostasis," *Macromol. Biosci.*, vol. 20, no. 4, pp. 1–14, 2020, doi: 10.1002/mabi.201900370.
173. V. A. Paternò, A. Bisin, and A. Addis, "Comparison of the efficacy of five standard topical hemostats: A study in porcine liver and spleen models of surgical bleeding," *BMC Surg.*, vol. 20, no. 1, pp. 1–10, 2020, doi: 10.1186/s12893-020-00874-w.
174. N. R. Kunio, G. M. Riha, K. M. Watson, J. A. Differding, M. A. Schreiber, and J. M. Watters, "Chitosan based advanced hemostatic dressing is associated with decreased blood loss in a swine uncontrolled hemorrhage model," *Am. J. Surg.*, vol. 205, no. 5, pp. 505–510, 2013, doi: 10.1016/j.amjsurg.2013.01.014.
175. S. Pourshahrestani *et al.*, "Potency and Cytotoxicity of a Novel Gallium-Containing Mesoporous Bioactive Glass/Chitosan Composite Scaffold as

Hemostatic Agents,” *ACS Appl Mater Interfaces.*, vol. 9, no. 37, pp. 31381–31392, 2017, doi: 10.1021/acsami.7b07769.

176. M. H. Lee, D. R. Lee, J. W. Chon, and D. J. Chung, “Hemostatic Patches Based on Crosslinked Chitosan Films Applied in Interventional Procedures,” *Polymers (Basel).*, vol. 13, no. 15, p. 2402, 2021, doi: 10.3390/polym13152402.

177. I. Koumentakou *et al.*, “Chitosan dressings containing inorganic additives and levofloxacin as potential wound care products with enhanced hemostatic properties,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 162, pp. 693–703, 2020, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.06.187.

178. Z. Hu, D. Y. Zhang, S. T. Lu, P. W. Li, and S. D. Li, “Chitosan-based composite materials for prospective hemostatic applications,” *Mar. Drugs*, vol. 16, no. 8, pp. 1–25, 2018, doi: 10.3390/md16080273.

179. R. Shukla, P. Mishra, R. R. Ujjwal, and P. Kesharwani, “Electrospun nanofibers for wound healing,” *Theory Appl. Nonparenteral Nanomedicines*, vol. 2, no. June, pp. 289–318, 2021, doi: 10.1016/b978-0-12-820466-5.00013-2.

180. S. Zhao, W. J. Malfait, N. Guerrero-Alburquerque, M. M. Koebel, and G. Nyström, “Biopolymer Aerogels and Foams: Chemistry, Properties, and Applications,” *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 57, no. 26, pp. 7580–7608, 2018, doi: 10.1002/anie.201709014.

181. Y. F. Zhao *et al.*, “Synthetic poly(vinyl alcohol)-chitosan as a new type of highly efficient hemostatic sponge with blood-triggered swelling and high biocompatibility,” *J. Mater. Chem. B*, vol. 7, no. 11, pp. 1855–1866, 2019, doi: 10.1039/C8TB03181A.

182. M. Ulbricht, “Design and synthesis of organic polymers for molecular separation membranes,” *Curr. Opin. Chem. Eng.*, vol. 28, pp. 60–65, 2020, doi: 10.1016/j.coche.2020.02.002.

183. N. Hernández, R. C. Williams, and E. W. Cochran, “The battle for the ‘green’ polymer. Different approaches for biopolymer synthesis: Bioadvantaged vs. bioreplacement,” *Org. Biomol. Chem.*, vol. 12, no. 18, pp. 2834–2849, 2014, doi:

10.1039/c3ob42339e.

184. W. Prasong, P. Muanchan, A. Ishigami, S. Thumsorn, T. Kurose, and H. Ito, “Properties of 3D Printable Poly(lactic acid)/Poly(butylene adipate-co-terephthalate) Blends and Nano Talc Composites,” *J. Nanomater.*, vol. 2020, 2020, doi: 10.1155/2020/8040517.

185. A. M. Díez-Pascual, “Synthesis and applications of biopolymer composites,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 20, no. 9, 2019, doi: 10.3390/ijms20092321.

186. I. Bružauskaitė, D. Bironaitė, E. Bagdonas, and E. Bernotienė, “Scaffolds and cells for tissue regeneration: different scaffold pore sizes—different cell effects,” *Cytotechnology*, vol. 68, no. 3, pp. 355–369, 2016, doi: 10.1007/s10616-015-9895-4.

187. Q. L. Loh and C. Choong, “Three-dimensional scaffolds for tissue engineering applications: Role of porosity and pore size,” *Tissue Eng. - Part B Rev.*, vol. 19, no. 6, pp. 485–502, 2013, doi: 10.1089/ten.teb.2012.0437.

188. J. K. Hong *et al.*, “Thickness-controllable electrospun fibers promote tubular structure formation by endothelial progenitor cells,” *Int. J. Nanomedicine*, vol. 10, pp. 1189–1200, 2015, doi: 10.2147/IJN.S73096.

189. J. M. Ameer, P. R. Anil Kumar, and N. Kasoju, “Strategies to tune electrospun scaffold porosity for effective cell response in tissue engineering,” *J. Funct. Biomater.*, vol. 10, no. 3, pp. 1–21, 2019, doi: 10.3390/jfb10030030.

190. G. Lutzweiler, A. N. Halili, and N. E. Vrana, “The overview of porous, bioactive scaffolds as instructive biomaterials for tissue regeneration and their clinical translation,” *Pharmaceutics*, vol. 12, no. 7, pp. 1–29, 2020, doi: 10.3390/pharmaceutics12070602.

191. A. Lončarević, M. Ivanković, and A. Rogina, “Lysozyme-Induced Degradation of Chitosan: The Characterisation of Degraded Chitosan Scaffolds,” *J. Tissue Repair Regen.*, vol. 1, no. 1, pp. 12–22, 2017, doi: 10.14302/issn.2640-6403.jtrr-17-1840.

192. X. Huang *et al.*, “Using absorbable chitosan hemostatic sponges as a promising surgical dressing,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 75, pp. 322–329, 2015,

doi: 10.1016/j.ijbiomac.2015.01.049.

193. Z. Lu, Y. Zhou, and B. Liu, "Preparation of chitosan microcarriers by high voltage electrostatic field and freeze drying," *J. Biosci. Bioeng.*, vol. 128, no. 4, pp. 504–509, 2019, doi: 10.1016/j.jbiosc.2019.03.020.

194. L. Yang *et al.*, "Influence of lyophilization factors and gelatin concentration on pore structures of atelocollagen/gelatin sponge biomaterial," *Dent. Mater. J.*, vol. 36, no. 4, pp. 429–437, 2017, doi: 10.4012/dmj.2016-242.

195. T. Martins, C. D. F. Moreira, E. S. Costa-Júnior, and M. M. Pereira, "In vitro degradation of chitosan composite foams for biomedical applications and effect of bioactive glass as a crosslinker," *Biomed. Glas.*, vol. 4, no. 1, pp. 45–56, 2018, doi: 10.1515/bglass-2018-0005.

196. Z. Zhang and H. Cui, "Biodegradability and biocompatibility study of poly(chitosan-g-lactic acid) scaffolds," *Molecules*, vol. 17, no. 3, pp. 3243–3258, 2012, doi: 10.3390/molecules17033243.

197. B. F. C. A. Gohi, H. Y. Zeng, A. D. Pan, J. Han, and J. Yuan, "pH dependence of chitosan enzymolysis," *Polymers (Basel)*, vol. 9, no. 5, 2017, doi: 10.3390/polym9050174.

198. M. Bil, I. Hipś, P. Mrówka, and W. Świążkowski, "Studies on enzymatic degradation of multifunctional composite consisting of chitosan microspheres and shape memory polyurethane matrix," *Polym. Degrad. Stab.*, vol. 182, 2020, doi: 10.1016/j.polymdegradstab.2020.109392.

199. T. T. Yuan, P. M. Jenkins, A. M. Digeorge Foushee, A. R. Jockheck-Clark, and J. M. Stahl, "Electrospun Chitosan/Polyethylene Oxide Nanofibrous Scaffolds with Potential Antibacterial Wound Dressing Applications," *J. Nanomater.*, vol. 2016, 2016, doi: 10.1155/2016/6231040.

200. A. Bal-Öztürk, B. Özkahraman, Z. Özbaş, G. Yaşayan, E. Tamahkar, and E. Alarçin, "Advancements and future directions in the antibacterial wound dressings – A review," *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.*, vol. 109, no. 5, pp. 703–716, 2021, doi: 10.1002/jbm.b.34736.

201. T. K. Giri, A. Thakur, A. Alexander, Ajazuddin, H. Badwaik, and

D. K. Tripathi, “Modified chitosan hydrogels as drug delivery and tissue engineering systems: Present status and applications,” *Acta Pharm. Sin. B*, vol. 2, no. 5, pp. 439–449, 2012, doi: 10.1016/j.apsb.2012.07.004.

202. J. Song *et al.*, “Antibacterial effects of electrospun chitosan/poly(ethyleneoxide) nanofibrous membranes loaded with chlorhexidine and silver,” *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.*, vol. 12, no. 5, pp. 1357–1364, 2016, doi: 10.1016/j.nano.2016.02.005.

203. X. Huang, Y. Pang, Y. Liu, Y. Zhou, Z. Wang, and Q. Hu, “Green synthesis of silver nanoparticles with high antimicrobial activity and low cytotoxicity using catechol-conjugated chitosan,” *RSC Adv.*, vol. 6, no. 69, pp. 64357–64363, 2016, doi: 10.1039/c6ra09035d.

204. K. Divya, S. Vijayan, T. K. George, and M. S. Jisha, “Antimicrobial properties of chitosan nanoparticles: Mode of action and factors affecting activity,” *Fibers Polym.*, vol. 18, no. 2, pp. 221–230, 2017, doi: 10.1007/s12221-017-6690-1.

205. H. Adeli, M. T. Khorasani, and M. Parvazinia, “Wound dressing based on electrospun PVA/chitosan/starch nanofibrous mats: Fabrication, antibacterial and cytocompatibility evaluation and in vitro healing assay,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 122, pp. 238–254, 2019, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.10.115.

206. M. Hosseinnejad and S. M. Jafari, “Evaluation of different factors affecting antimicrobial properties of chitosan,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 85, pp. 467–475, 2016, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.01.022.

207. I. Kohsari, Z. Shariatinia, and S. M. Pourmortazavi, *Antibacterial electrospun chitosan-polyethylene oxide nanocomposite mats containing bioactive silver nanoparticles*, vol. 140. Elsevier Ltd., 2016.

208. A. Fathi *et al.*, “Fabrication of chitosan-polyvinyl alcohol and silk electrospun fiber seeded with differentiated keratinocyte for skin tissue regeneration in animal wound model,” *J. Biol. Eng.*, vol. 14, no. 1, pp. 1–14, 2020, doi: 10.1186/s13036-020-00249-y.

209. R. Shen *et al.*, “The use of chitosan/PLA nano-fibers by emulsion eletrospinning for periodontal tissue engineering,” *Artif. Cells, Nanomedicine*

Biotechnol., vol. 46, pp. 419–430, 2018, doi: 10.1080/21691401.2018.1458233.

210. K. Kalantari, A. M. Afifi, H. Jahangirian, and T. J. Webster, “Biomedical applications of chitosan electrospun nanofibers as a green polymer – Review,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 207, no. December 2018, pp. 588–600, 2019, doi: 10.1016/j.carbpol.2018.12.011.

211. S. Hu *et al.*, “Preparation of composite hydroxybutyl chitosan sponge and its role in promoting wound healing,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 184, pp. 154–163, 2018, doi: 10.1016/j.carbpol.2017.12.033.

212. M. V. Pogorielov and V. Z. Sikora, “Chitosan as a Hemostatic Agent: Current State,” *Eur. J. Med. Ser. B*, vol. 2, no. 1, pp. 24–33, 2015, doi: 10.13187/ejm.s.b.2015.2.24.

213. N. S. M., U. Mony, and R. Jayakumar, “Chitin and Chitosan as Hemostatic Agents,” *Encycl. Polym. Sci. Technol.*, pp. 1–12, 2016, doi: 10.1002/0471440264.pst647.

214. K. A. Simo, E. M. Hanna, D. K. Imagawa, and D. A. Iannitti, “Hemostatic Agents in Hepatobiliary and Pancreas Surgery: A Review of the Literature and Critical Evaluation of a Novel Carrier-Bound Fibrin Sealant (TachoSil),” *ISRN Surg.*, vol. 2012, pp. 1–12, 2012, doi: 10.5402/2012/729086.

215. W. D. Spotnitz, “Fibrin Sealant: The Only Approved Hemostat, Sealant, and Adhesive—a Laboratory and Clinical Perspective,” *ISRN Surg.*, vol. 2014, pp. 1–28, 2014, doi: 10.1155/2014/203943.

216. L. Tallón Aguilar, F. López Bernal, J. García Martínez, F. Pareja Ciuró, and J. Padillo Ruiz, “Use of fibrin sponge (TachoSil ®) as strengthening of precarious sutures in emergency abdominal surgery,” *Surg. Chronicles*, vol. 18, no. 2, pp. 118–120, 2013.

217. F. M. De Oliveira, M. V. H. De Carvalho, E. Marchi, and C. A. L. Pinto, “O adesivo biológico de colágeno, fibrinogênio e trombina é eficaz no tratamento de lesões hepáticas experimentais,” *Rev. Col. Bras. Cir.*, vol. 43, no. 4, pp. 254–261, 2016, doi: 10.1590/0100-69912016004004.

218. X. Wang, “Overview on Biocompatibilities of Implantable

Biomaterials,” *Adv. Biomater. Sci. Biomed. Appl.*, 2013, doi: 10.5772/53461.

219. E. Dondossola, B. M. Holzapfel, S. Alexander, S. Filippini, D. W. Hutmacher, and P. Friedl, “Examination of the foreign body response to biomaterials by nonlinear intravital microscopy,” *Nat. Biomed. Eng.*, vol. 1, no. 1, pp. 1–10, 2017, doi: 10.1038/s41551-016-0007.

220. J. Z. Kechagia, D. G. Ezra, M. J. Burton, and M. Bailly, “Fibroblasts profiling in scarring trachoma identifies IL-6 as a functional component of a fibroblast-macrophage pro-fibrotic and pro-inflammatory feedback loop,” *Sci. Rep.*, vol. 6, no. February, pp. 1–11, 2016, doi: 10.1038/srep28261.

221. S. J. Van Dyken and R. M. Locksley, “Interleukin-4-and interleukin-13-mediated alternatively activated macrophages: Roles in homeostasis and disease,” *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 31, no. December 2012, pp. 317–343, 2013, doi: 10.1146/annurev-immunol-032712-095906.

222. X. M. Meng *et al.*, “Inflammatory macrophages can transdifferentiate into myofibroblasts during renal fibrosis,” *Cell Death Dis.*, vol. 7, no. 12, pp. e2495–9, 2016, doi: 10.1038/cddis.2016.402.

223. C. E. Witherel, D. Abeyayehu, T. H. Barker, K. L. Spiller, “Macrophage and Fibroblast Interactions in Biomaterial-Mediated Fibrosis,” *Adv. Healthcare Mater.*, vol. 8, no. 1801451, 2019, doi: 10.1002/adhm.201801451.Macrophage.

224. P. Cravedi *et al.*, “Regenerative immunology: the immunological reaction to biomaterials,” *Transpl. Int.*, vol. 30, no. 12, pp. 1199–1208, 2017, doi: 10.1111/tri.13068.

225. M. I. Oliveira, S. G. Santos, M. J. Oliveira, A. L. Torres, and M. A. Barbosa, “Chitosan drives anti-inflammatory macrophage polarisation and pro-inflammatory dendritic cell stimulation,” *Eur. Cells Mater.*, vol. 24, pp. 136–153, 2012, doi: 10.22203/eCM.v024a10.

226. L. Lu, J. Barbi, and F. Pan, “The regulation of immune tolerance by FOXP3,” *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 17, no. 11, pp. 703–717, 2017, doi: 10.1038/nri.2017.75.

227. A. Dievernich, P. Achenbach, L. Davies, and U. Klinge,

“Characterization of innate and adaptive immune cells involved in the foreign body reaction to polypropylene meshes in the human abdomen,” *Hernia*, no. 0123456789, 2021, doi: 10.1007/s10029-021-02396-7.

228. Y. Zhao *et al.*, “Chitosan degradation products facilitate peripheral nerve regeneration by improving macrophage-constructed microenvironments,” *Biomaterials*, vol. 134, pp. 64–77, 2017, doi: 10.1016/j.biomaterials.2017.02.026.

229. S. Kim, “Competitive Biological Activities of Chitosan and Its Derivatives: Antimicrobial, Antioxidant, Anticancer, and Anti-Inflammatory Activities,” *Int. J. Polym. Sci.*, vol. 2018, 2018, doi: 10.1155/2018/1708172.

230. S. Satitsri and C. Muanprasat, “Chitin and Chitosan Derivatives as Biomaterial Resources for Biological and Biomedical Applications,” *Molecules*, vol. 25, no. 24, 2020, doi: 10.3390/molecules25245961.

231. F. Liu, H. Y. Li, Z. Wang, H. N. Zhang, Y. Z. Wang, and H. Xu, “Carboxymethyl chitosan reduces inflammation and promotes osteogenesis in a rabbit knee replacement model,” *BMC Musculoskelet. Disord.*, vol. 21, no. 1, pp. 1–10, 2020, doi: 10.1186/s12891-020-03803-3.

232. V. N. Davydova, A. A. Kalitnik, P. A. Markov, A. V. Volod’ko, S. V. Popov, and I. M. Ermak, “Cytokine-inducing and anti-inflammatory activity of chitosan and its low-molecular derivative,” *Appl. Biochem. Microbiol.*, vol. 52, no. 5, pp. 476–482, 2016, doi: 10.1134/S0003683816050070.

233. J. C. V. Ribeiro, T. C. M. Forte, S. J. S. Tavares, F. K. Andrade, R. S. Vieira, and V. Lima, “The effects of the molecular weight of chitosan on the tissue inflammatory response,” *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, 2021, doi: 10.1002/JBM.A.37250.

234. D. Fong and C. D. Hoemann, “Chitosan immunomodulatory properties: Perspectives on the impact of structural properties and dosage,” *Futur. Sci. OA*, vol. 4, no. 1, 2018, doi: 10.4155/fsoa-2017-0064.

235. T. B. Wissing *et al.*, “Macrophage-driven biomaterial degradation depends on scaffold microarchitecture,” *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 7, no. APR, 2019, doi: 10.3389/fbioe.2019.00087.

236. Z. Wang *et al.*, “The effect of thick fibers and large pores of electrospun poly(ϵ -caprolactone) vascular grafts on macrophage polarization and arterial regeneration,” *Biomaterials*, vol. 35, no. 22, pp. 5700–5710, 2014, doi: 10.1016/j.biomaterials.2014.03.078.
237. F. Y. McWhorter, T. Wang, P. Nguyen, T. Chung, and W. F. Liu, “Modulation of macrophage phenotype by cell shape,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 110, no. 43, pp. 17253–17258, 2013, doi: 10.1073/pnas.1308887110.
238. K. Garg, N. A. Pullen, C. A. Oskeritzian, J. J. Ryan, and G. L. Bowlin, “Macrophage functional polarization (M1/M2) in response to varying fiber and pore dimensions of electrospun scaffolds,” *Biomaterials*, vol. 34, no. 18, pp. 4439–4451, 2013, doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.02.065.
239. Y. Deng *et al.*, “Injectable in situ cross-linking chitosan-hyaluronic acid based hydrogels for abdominal tissue regeneration,” *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, pp. 1–13, 2017, doi: 10.1038/s41598-017-02962-z.
240. A. Vijayan, A. Sabareeswaran, and G. S. V. Kumar, “PEG grafted chitosan scaffold for dual growth factor delivery for enhanced wound healing,” *Sci.Rep.*, vol. 9, no. 1, pp. 1–12, 2019, doi: 10.1038/s41598-019-55214-7.
241. A. Deng, Y. Yang, S. Du, and S. Yang, “Electrospinning of: In situ crosslinked recombinant human collagen peptide/chitosan nanofibers for wound healing,” *Biomater. Sci.*, vol. 6, no. 8, pp. 2197–2208, 2018, doi: 10.1039/c8bm00492g.
242. Y. Hao *et al.*, “Bio-multifunctional alginate/chitosan/fucoidan sponges with enhanced angiogenesis and hair follicle regeneration for promoting full-thickness wound healing,” *Mater. Des.*, vol. 193, p. 108863, 2020, doi: 10.1016/j.matdes.2020.108863.
243. M. M. Islam, M. Shahruzzaman, S. Biswas, M. Nurus Sakib, and T. U. Rashid, “Chitosan based bioactive materials in tissue engineering applications-A review,” *Bioact. Mater.*, vol. 5, no. 1, pp. 164–183, 2020, doi: 10.1016/j.bioactmat.2020.01.012.
244. Z. Zhang, “Multiple imputation with multivariate imputation by

chained equation (MICE) package,” *Ann. Transl. Med.*, vol. 4, no. 2, 2016, doi: 10.3978/j.issn.2305-5839.2015.12.63.

245. P. Hayati Rezvan, K. J. Lee, and J. A. Simpson, “The rise of multiple imputation: A review of the reporting and implementation of the method in medical research Data collection, quality, and reporting,” *BMC Med. Res. Methodol.*, vol. 15, no. 1, pp. 1–14, 2015, doi: 10.1186/s12874-015-0022-1.

246. N. Nurhamidah, N. Nusyirwan, and A. Faisol, “Forecasting Seasonal Time Series Data Using the Holt-Winters Exponential Smoothing Method of Additive Models,” *J. Mat. Integr.*, vol. 16, no. 2, p. 151, 2020, doi: 10.24198/jmi.v16.n2.29293.151-157.

247. O. Trull, J. C. García-Díaz, and A. Troncoso, “Initialization methods for multiple seasonal holt-winters forecasting models,” *Mathematics*, vol. 8, no. 2, pp. 1–16, 2020, doi: 10.3390/math8020268.

248. V. Deineka *et al.*, “Hemostatic performance and biocompatibility of chitosan-based agents in experimental parenchymal bleeding,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 120, 2021, doi: 10.1016/j.msec.2020.111740.

249. S. B. Qasim, S. Husain, Y. Huang, M. Pogorielov, V. Deineka, M. Lyndin, A. Rawlinson and I. U. Rehman, "In-vitro and in-vivo degradation studies of freeze gelled porous chitosan composite scaffolds for tissue engineering applications," *Polymer Degradation and Stability*. № 136. P. 31–38, 2017. doi: 10.1016/j.polymdegradstab.2016.11.018.

250. M. Pogorielov, O. Kalinkevich, V. Deineka *et al.*, "Haemostatic chitosan coated gauze: In vitro interaction with human blood and in-vivo effectiveness," *Biomaterials Research*. № 19 (1). P. 22, 2015. doi: 10.1186/s40824-015-0044-0/.

251. J. Radwan-Pragłowska, Ł. Janus, M. Piątkowski, A. Sierakowska, V. Deineka *et al.*, "Novel hemostatic agents for biomedical applications," *Book of Abstracts International conference “Nanomaterials for biosensors and biomedical applications”*. Jurmala, Latvia, 2–4 July, P. 31, 2019.

252. V. Deineka, J. Radwan-Pragłowska, I. Liubchak, "Influence of

different solvent to hemostatic activity of chitosan sponge," Book of Abstracts International conference "Nanomaterials for biosensors and biomedical applications". Jurmala, Latvia, 2–4 July, P. 54, 2019.

253. V. Deineka, I. Liubchak, O. Kalinkevich, "Cytotoxicity of chitosan based hemostatic materials," Topical issues of theoretical and clinical medicine: abstract book of International scientific and practical conference of students, postgraduates and young scientists, Sumy, October 17–19, P. 116, 2018.

254. V. Deineka, I. Liubchak, "New hemostatic sponge – in vitro study," 8th International Student Medical Congress, Košice, June 22–24, Abstract book. P. 22, 2016.

254. В. М. Дейнека, М. В. Погорелов, "Визначення гемостатичних властивостей губки на основі хітозану in vitro," Теорія та практика сучасної морфології: матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю, м. Дніпро, 5–7 жовтня С. 48, 2016.

255. M. Pogorielov, O. Kalinkevich, V. Deineka, V. Garbuzova, A. Kalinkevich, A. Garchenko, "Effect of chitosan molecular weight, percentage in solution and method of production to human blood cells," Морфологічні дослідження – виклики сучасності. Збірник тез доповідей науково-практичної конференції, м. Суми, 23–24 квітня, С. 58–59, 2015.

256. М. В. Погорелов, В. М. Дейнека, В. Ю. Гарбузова, О. В. Солодовник, О. В. Калінкевич, О. В. Калінкевич, С. М. Данильченко, "Спосіб зупинки кровотечі із судин різного типу: патент на корисну модель" № 105516 Україна, МПК А61L 15/28 (2006.01); заявл. 07.09.2015; опубл. 25.03.2016, Бюл. № 6.

257. М. В. Погорелов, В. М. Дейнека, В. Ю. Гарбузова, О. В. Солодовник, О. В. Калінкевич, О. В. Калінкевич, С. М. Данильченко, "Спосіб отримання місцевого гемостатичного матеріалу для зупинки кровотечі з паренхіматозних органів: патент на корисну модель" № 129196 Україна, МПК (2018.01) А61В 7/00; заявл. 16.04.2018; опубл. 25.10.2018, Бюл. № 20.

ДОДАТКИ

Додаток А

Наукові праці, опубліковані за темою дисертації

1. Deineka V., Sulaieva O., Pernakov M., Korniienko V., Husak Y., Yanovska A., Yusupova A., Tkachenko Y., Kalinkevich O., Zlatska A., Pogorielov M. Hemostatic and Tissue Regeneration Performance of Novel Electrospun Chitosan-Based Materials. *Biomedicines*. (Scopus) 2021. № 9, P. 588. DOI: 10.3390/biomedicines9060588.
2. Deineka V., Sulaieva O., Pernakov N., Radwan-Pragłowska J., Janus L., Korniienko V., Husak Y., Yanovska A., Liubchak I., Yusupova A., Piątkowski M., Zlatska A. Hemostatic Performance and Biocompatibility of Chitosan-Based Agents in Experimental Parenchymal Bleeding. *Materials Science and Engineering C*. (Scopus) 2021. № 120. 111740. DOI: 10.1016/j.msec.2020.111740.
3. Radwan-Pragłowska J., Korniienko V., Husak Y., Deineka V., Janus Ł., Matysek D., Holubnycha V., Oleshko O., Piątkowski M., Pogorielov M. Nanostructured hemostatic sponges made from chitosan: Structural and biological evaluation. *Paper presented at the Springer Proceedings in Physics*. (Scopus) 2020. № 244. P. 95–110. DOI: 10.1007/978-981-15-3996-1_10.
4. Radwan-Pragłowska J., Piątkowski M., Deineka V., Janus Ł., Korniienko V., Husak E., Holubnycha V., Liubchak I., Zhurba V., Sierakowska A., Pogorielov M., Bogdał D. Chitosan-Based Bioactive Hemostatic Agents with Antibacterial properties – synthesis and Characterization. *Molecules*. (Scopus) 2020. № 24. (14). 2629. DOI: 10.3390/molecules24142629.
5. Pogorielov M., Deineka V., Oleshko O., Liubchak I., Dedkova K., Vasyliiev R., Zubov D., Kalinkevich A., Kalinkevich O. Development of chitosan hemostatic sponges with different solvents and tranexamic acid. *Paper presented at the Proceedings of the 2018 IEEE 8th International Conference on Nanomaterials: Applications and Properties NAP*. (Scopus) 2018. № 8914877. DOI: 10.1109/NAP.2018.8914877.

6. Qasim S. B., Husain S., Huang, Y., Pogorielov M., Deineka V., Lyndin M., Rawlinson A., Rehman I. U. In-vitro and in-vivo degradation studies of freeze gelled porous chitosan composite scaffolds for tissue engineering applications. *Polymer Degradation and Stability. (Scopus)* 2017. № 136. P. 31–38. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2016.11.018.
7. Pogorielov M., Kalinkevich O., Deineka V., Garbuzova V., Solodovnik A., Kalinkevich A., Kalinichenko T., Gapchenko A., Sklyar A., Danilchenko S. Haemostatic chitosan coated gauze: In vitro interaction with human blood and in-vivo effectiveness. *Biomaterials Research. (Scopus)* 2015. № 19 (1). P. 22. DOI: 10.1186/s40824-015-0044-0/.
8. Radwan-Pragłowska J., Janus Ł., Piątkowski M., Sierakowska A., Deineka V., Korniienko V., Husak E., Holubnycha V., Liubchak I., Zhurba V., Pogorielov M. Novel hemostatic agents for biomedical applications. *Book of Abstracts International conference “Nanomaterials for biosensors and biomedical applications”*. Jurmala, Latvia, 2–4 July, 2019. P. 31.
9. Deineka V., Radwan-Pragłowska J., Liubchak I. Influence of different solvent to hemostatic activity of chitosan sponge. *Book of Abstracts International conference “Nanomaterials for biosensors and biomedical applications”*. Jurmala, Latvia, 2–4 July, 2019. P. 54.
10. Deineka V., Liubchak I., Kalinkevich O. Cytotoxicity of chitosan-based hemostatic materials. *Topical issues of theoretical and clinical medicine: abstract book of International scientific and practical conference of students, postgraduates and young scientists*, Sumy, October 17–19, 2018. P. 116.
11. Deineka V., Liubchak I. New hemostatic sponge – in vitro study. *8th International Student Medical Congress*, Košice, June 22–24, 2016. Abstract book. P. 22.
12. Дейнека В. М., Погорєлов М. В. Визначення гемостатичних властивостей губки на основі хітозану in vitro. *Теорія та практика сучасної морфології: матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю*, м. Дніпро, 5–7 жовтня 2016. С. 48.

13. Pogorielov M., Kalinkevich O., Deineka V., Garbuzova V., Kalinkevich A., Gapchenko A. Effect of chitosan molecular weight, percentage in solution and method of production to human blood cells. *Морфологічні дослідження – виклики сучасності. Збірник тез доповідей науково-практичної конференції*, м. Суми, 23–24 квітня 2015, С. 58–59.

14. Погорєлов М. В., Дейнека В. М., Гарбузова В. Ю., Солодовник О. В., Калінкевич О. В., Калінкевич О. В., Данильченко С. М. Спосіб зупинки кровотечі із судин різного типу: патент на корисну модель № 105516 Україна, МПК А61L 15/28 (2006.01); заявл. 07.09.2015; опубл. 25.03.2016, Бюл. № 6.

15. Погорєлов М. В., Дейнека В. М., Гарбузова В. Ю., Солодовник О. В., Калінкевич О. В., Калінкевич О. В., Данильченко С. М. Спосіб отримання місцевого гемостатичного матеріалу для зупинки кровотечі з паренхіматозних органів: патент на корисну модель № 129196 Україна, МПК (2018.01) А61В 7/00; заявл. 16.04.2018; опубл. 25.10.2018, Бюл. № 20.

Апробація результатів дисертації

1. Науково-практична конференція «Морфологічні дослідження, виклики сучасності» (Суми, 2016).
2. 8-ий Міжнародний студентський медичний конгрес «8th International Student Medical Congress in Košice» (Кошице, Словаччина, 2016).
3. Науково-практична конференція з міжнародною участю «Теорія та практика сучасної морфології» (Дніпро, 2016).
4. Міжнародна науково-практична конференція студентів, аспірантів та молодих вчених «Topical issues of theoretical and clinical medicine» (Суми, 2018);
5. Міжнародна конференція «Nanomaterials: Applications & Properties» (Затока, 2018);
6. Міжнародна конференція «Nanomaterials for biosensors and biomedical application» (Юрмала, Латвія, 2019).

Копії актів впровадження

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Директор ТОВ «СІ ЕС ДІ ХЕЛС
КЕА»

Дудін О.Є.

« 02 » листопада 2021 року



АКТ ПРО ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції для впровадження (метод профілактики, лікування, пристрій, форма організаційної праці, тощо).** Спосіб отримання місцевого гемостатичного матеріалу для зупинки кровотечі з паренхіматозних органів.
2. **Установа-розробник:** Медичний інститут Сумського державного університету.
3. **Ким запропоновано:** Дейнека Володимир Миколайович, аспірант кафедри морфології.
4. **Джерело інформації (методичні рекомендації, інформаційний лист, звіт про НДР, дисертації, монографії, матеріали з'їздів, наукових конференцій, семінарів та ін.).** Погорелов М.В., Дейнека В.М., Гарбузова В.Ю., Солодовник О.В., Калінкевич О.В., Калінкевич О.В., Данильченко С.М. «Спосіб отримання місцевого гемостатичного матеріалу для зупинки кровотечі з паренхіматозних органів» Патент на корисну модель №. 129196 Україна, МПК (2018.01) А61В 7/00 заявл. 16.04.2018; опубл. 25.10.2018, Бюл. № 20.
5. **Впроваджено.** В навчальний процес та наукову роботу кафедри.
6. **Термін впровадження:** вересень – жовтень 2021 р.
7. **Ефективність впровадження.** Введено у навчальний процес у вигляді лекцій та практичних занять.
8. **Місце впровадження:** ТОВ «СІ ЕС ДІ ХЕЛС КЕА»
9. **Зауваження, пропозиції:** немає.

Відповідальний за впровадження:

Директор з наукової роботи
Д.мед.н., професор

A handwritten signature in blue ink, appearing to be "O. M. Sulasva".

Сулаєва О.М.

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з

науково-педагогічної роботи ХНМУ

проф. В.Д. Марковський

«_____» листопада 2021 року



АКТ ПРО ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції для впровадження (метод профілактики, лікування, пристрій, форма організаційної праці, тощо).** Спосіб отримання місцевого гемостатичного матеріалу для зупинки кровотечі з паренхіматозних органів.
2. **Установа-розробник:** Медичний інститут Сумського державного університету.
3. **Ким запропоновано:** Дейнека Володимир Миколайович, аспірант кафедри морфології.
4. **Джерело інформації (методичні рекомендації, інформаційний лист, звіт про НДР, дисертації, монографії, матеріали з'їздів, наукових конференцій, семінарів та ін.).** Погорелов М.В., Дейнека В.М., Гарбузова В.Ю., Солодовник О.В., Калінкевич О.В., Калінкевич О.В., Данильченко С.М. «Спосіб отримання місцевого гемостатичного матеріалу для зупинки кровотечі з паренхіматозних органів» Патент на корисну модель №. 129196 Україна, МПК (2018.01) А61В 7/00 заявл. 16.04.2018; опубл. 25.10.2018, Бюл. № 20.
5. **Впроваджено.** В навчальний процес та наукову роботу кафедри біологічної хімії.
6. **Термін впровадження:** вересень – листопад 2021 р.
7. **Ефективність впровадження.** Введено у навчальний процес у вигляді лекцій та практичних занять.
8. **Місце впровадження:** Харківський національний медичний університет
9. **Зауваження, пропозиції:** немає.

Відповідальний за впровадження:

Зав. кафедри біологічної хімії
д.мед.н., проф.

О.А. Наконечна

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Директор ПП Ексіма

Міщенко О.М.

«10» вересня 2021 року



АКТ ПРО ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції для впровадження (метод профілактики, лікування, пристрій, форма організаційної праці, тощо).** Спосіб зупинки кровотечі паренхіматозної кровотечі із судини різного типу
2. **Установа-розробник:** Медичний інститут Сумського державного університету.
3. **Ким запропоновано:** Дейнека Володимир Миколайович, аспірант кафедри морфології.
4. **Джерело інформації (методичні рекомендації, інформаційний лист, звіт про НДР, дисертації, монографії, матеріали з'їздів, наукових конференцій, семінарів та ін.).** Погорелов М.В., Дейнека В.М., Гарбузова В.Ю., Солодовник О.В., Калінкевич О.В., Калінкевич О.В., Данильченко С.М. «Спосіб зупинки кровотечі із судин різного типу» Патент на корисну модель №. 105516 Україна, МПК А61L 15/28 (2006.01) заявл. 07.09.2015; опубл. 25.03.2016, Бюл. № 6.
5. **Впроваджено.** В лікувальний процес.
6. **Термін впровадження:** вересень – жовтень 2021 р.
7. **Ефективність впровадження.** Введено у лікувальний процес у вигляді кровоспинних спонжів.
8. **Місце впровадження:** Стоматологічна клініка Ексіма (м. Запоріжжя)
9. **Зауваження, пропозиції:** немає.

Відповідальний за впровадження:

Головний лікар

Уланов О.М.

ЗАТВЕРДЖУЮ

Перший проректор
з науково-педагогічної роботи
Полтавського державного
медичного університету
професор Р. М. Дворник



2021 р.

АКТ ПРО ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції:** (метод профілактики, діагностики, лікування, пристрій, форма організаційної роботи та ін.) Гемостатичний матеріал для зупинки паренхіматозної кровотечі.
2. **Установа-розробник:** Сумський державний університет МОН України, кафедра морфології (40018, м. Суми, вул. Санаторна, 31), Дейнека Володимир Миколайович, аспірант кафедри морфології.
3. **Джерело інформації:** Deineka, V., Sulaieva O., Pernakov M., Korniienko V., Husak Y., Yanovska A., Yusupova A., Tkachenko Y., Kalinkevich O., Zlatska A., Pogorielov M. "Hemostatic and Tissue Regeneration Performance of Novel Electrospun Chitosan-Based Materials." *Biomedicines* 2021, 9, 588. doi:10.3390/biomedicines9060588.
4. **Де і коли введено:** кафедра патологічної анатомії з секційним курсом Полтавського державного медичного університету, вересень-жовтень 2021 року.
5. **Результати застосування методу.** Отримані результати щодо особливостей розвитку, перебігу та наслідків паренхіматозних кровотеч введено в навчальний процес зі здобувачами вищої освіти I-III освітніх рівнів, лікарями інтернами (в лекційний курс, практичні заняття) та науково-дослідну роботу кафедри.
6. **Ефективність впровадження за критеріями, висловленими в джерелі інформації (п.3).** Використання результатів роботи в навчальному процесі та науково-дослідній роботі дозволяє поглибити й підвищити знання студентів, лікарів-інтернів, аспірантів щодо особливостей розвитку, перебігу та наслідків паренхіматозних кровотеч.
7. **Зауваження та пропозиції:** не поступило.

Пропозиція обговорена та затверджена на кафедральному засіданні (протокол № 6 від 04 листопада 2021 року).

Відповідальний за впровадження:
завідувач кафедри
патологічної анатомії з секційним курсом
Полтавського державного медичного університету
д. мед. н., професор

І.І. Старченко

«ЗАТВЕРДЖУЮ»



Проректор з наукової роботи
Запорізького державного
медичного університету
проф. Туманський В.О.
_____ 20__ року

АКТ ПРО ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції для впровадження (метод профілактики, лікування, пристрій, форма організаційної праці, тощо).** Спосіб зупинки паренхіматозної кровотечі із судини різного типу
2. **Установа-розробник:** Медичний інститут Сумського державного університету.
3. **Ким запропоновано:** Дейнека Володимир Миколайович, аспірант кафедри морфології.
4. **Джерело інформації (методичні рекомендації, інформаційний лист, звіт про НДР, дисертації, монографії, матеріали з'їздів, наукових конференцій, семінарів та ін.).** Погорелов М.В., Дейнека В.М., Гарбузова В.Ю., Солодовник О.В., Калінкевич О.В., Калінкевич О.В., Данильченко С.М. «Спосіб зупинки кровотечі із судин різного типу» Патент на корисну модель №. 105516 Україна, МПК А61L 15/28 (2006.01) заявл. 07.09.2015; опубл. 25.03.2016, Бюл. № 6.
5. **Впроваджено.** В наукову роботу кафедри та навчальний процес.
6. **Термін впровадження:** вересень – жовтень 2021 р.
7. **Ефективність впровадження.** Введено у наукову роботу для подальших досліджень та у навчальний процес у вигляді лекцій та практичних занять.
8. **Місце впровадження:** Кафедра стоматології післядипломної освіти Запорізького державного медичного університету.
9. **Зауваження, пропозиції:** немає.

Відповідальний за впровадження:

Зав. кафедри
д.мед.н. доц. Міщенко О.М.



“ЗАТВЕРДЖУЮ”

Директор з науково-педагогічної роботи
Національного фармацевтичного
університету

_____ І.М. Владимирова

_____ 2021 року

АКТ ПРО ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції для впровадження (метод профілактики, лікування, пристрій, форма організаційної праці, тощо).** Спосіб зупинки кровотечі паренхіматозної кровотечі із судини різного типу
2. **Установа-розробник:** Медичний інститут Сумського державного університету.
3. **Ким запропоновано:** Дейнека Володимир Миколайович, аспірант кафедри морфології.
4. **Джерело інформації (методичні рекомендації, інформаційний лист, звіт про НДР, дисертації, монографії, матеріали з'їздів, наукових конференцій, семінарів та ін.).** Погорелов М.В., Дейнека В.М., Гарбузова В.Ю., Солодовник О.В., Калінкевич О.В., Калінкевич О.В., Данильченко С.М. «Спосіб зупинки кровотечі із судин різного типу» Патент на корисну модель №. 105516 Україна, МПК А61L 15/28 (2006.01) заявл. 07.09.2015; опубл. 25.03.2016, Бюл. № 6.
5. **Базова установа, яка проводить впровадження:** кафедра нормальної та патологічної фізіології Національного фармацевтичного університету.
6. **Форма впровадження:** в навчальний процес – у матеріали лекцій і семінарських занять.
7. **Терміни впровадження:** 2021-2022 навч. рр.
8. **Зауваження та пропозиції:** Немає.
9. **Затверджено на засіданні кафедри** 12.10.2021 р., протокол № 3.

Відповідальний за впровадження:

завідувач кафедри патологічної
фізіології Національного фармацевтичного
університету, д. мед. н., проф.

Н. М. Кононенко