

ГІДРОГЕЛІ НА ОСНОВІ ХІТОЗАНУ З ДОДАВАННЯМ N-СТЕАРОЇЛЕТАНОЛАМІНУ ДЛЯ ПРИСКОРЕННЯ ЗАГОЄННЯ ГОСТРИХ РАН ШКІРИ: ЦИТОЛОГІЧНЕ ТА ГІСТОЛОГІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ

Н. МАНЬКО ¹, І. ІВАСЕЧКО ¹, Р. АНТОНІЮК ², М. ЛУЦИК ¹, Г. КОСЯКОВА ³,
Н. ГУЛА ³, С. КОРНІЙ ⁴, О. КЛЮЧІВСЬКА ¹, Ю. КОЗАК ¹, Т. ДУМИЧ ², Р. СТОЙКА ^{1*}

¹ Інститут біології клітини НАН України, Львів, Україна,

² Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, Львів, Україна

³ Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ, Україна

⁴ Фізико-механічний інститут імені Карпенка НАН України, Львів, Україна

E-mail: stoika.rostyslav@gmail.com

Автор для кореспонденції – Стойка Р., e-mail: stoika.rostyslav@gmail.com

Лікування ран залишається серйозною клінічною проблемою, що вимагає розробки сучасних біоматеріалів для покращення процесу регенерації пошкоджених тканин. Це дослідження мало на меті оцінити ранозагоюючий потенціал нових гідрогелевих плівок на основі хітозану, гіалуронової кислоти та канабіміметика N-стеароїлетаноламіном (HSE). Морфологічні дослідження поверхні гідрогелів проводили за допомогою сканувальної електронної мікроскопії, біосумісність і здатність до біодеградації створених зразків оцінювали in vitro, використовуючи мишачі фібробласти лінії BALB-3T3, за допомогою МТТ-тесту та фарбування клітин нейтральним червоним. Прискорення загоєння модельних ексцизійних ран шкіри лабораторних мишей лінії C57/Black оцінювали гістологічно та оцінюючи темпи зменшення площі рани. Використані у дослідженні гідрогелі продемонстрували високу біосумісність, посилили міграцію фібробластів у зону шкребка (зразок гідрогелю без HSE), та індукували лізосомну активність, що може вказувати на біодоступність досліджуваних зразків. Обидва гідрогелі прискорювали загоєння ран у мишей, при цьому в гістологічних зрізах спостерігалася швидша епітелізація та ремоделювання раневих тканин. Зразок гідрогелю із канабіміметиком HSE проявив свою дію на пізніх етапах ранозагоєння, в той час як гель без HSE проявив активність на всіх фазах ранозагоєння.

Ключові слова: хітозан, гідрогелі, N-стеароїл етаноламін, ранева пов'язка, загоєння ран.

Вступ. Повторна кровотеча є частим ускладненням під час загоєння рани, що перешкоджає відновленню тканин і сприяє розвитку бактеріальної інфекції. Щоб цього уникнути,

замість звичайних раневих пов'язок, якими просто закривають пошкоджену поверхню, розроблені багатофункціональні ранозагоювальні гідрогелі. Структура 3D полімерних гідрогелів нагадує позаклітинний матрикс, мережа якого важлива для підтримки росту, проліферації та диференціювання клітин. Станом на літо 2024 р. було опубліковано понад 170 статей з темою «гідрогелі на основі хітозану для загоєння ран», і ця кількість має чітку тенденцію до щорічного зростання (дані PubMed). До платформи хітозану, який сам по собі має гемостатичну дію, часто додють лікувальні функціональні складові. Зокрема такі: 1) гіалуронова кислота та хондроїтинсульфат, які є компонентами позаклітинного матриксу, здатного сприяти регенерації тканин, відкладенню колагену та ангиогенезу; (Yuan et al, 2023; Gıaç et al, 2020; Prasathkumar et al, 2021) 2) альгінат та інші речовини, що використовуються для виготовлення губкоподібних структур з підвищеною здатністю до набухання та більшою зручністю у нанесенні; (Kirwale et al, 2023; Momin et al, 2016; Dai et al, 2009; Murakami et al, 2010) 3) ефірні олії, що мають антиоксидантну, протизапальну або протимікробну дію; олії також можуть служити середовищем для розчинення біоактивних нерозчинних у воді компонентів, таких як моно- і сесквітерпеноїди, ненасичені жирні (омега) кислоти, карвакрол і тимол, медопродукти, куркумін, танін, кверцетин та ін (Pérez-Recalde et al, 2018; Costa et al, 2018). В ідеалі всі ці функції повинні «співпрацювати» під час загоєння рани, а

саме на першій фазі, після згортання крові, вони пригнічують запальні процеси. окислювальний стрес і мікробну інфекцію, у другій фазі, сприяють повторній епітелізації, ангіогенезу та стимулюють розвиток грануляційної тканини, тоді як у третій фазі вони посилюють відкладення колагену та ріст фібробластів і кератиноцитів сполучної тканини, присутніх в області рани. Слід підкреслити, що ранозагоювальні препарати на основі хітозану, які знаходяться на стадії до- та клінічних випробувань, повинні мати максимальну біосумісність (нетоксичність) та здатність до біодеградації (Shivakumar et al, 2021). Гідрогелі на основі хітозану демонструють хороші ранозагоювальні властивості завдяки своїм кровоспинним (Fan et al, 2023), адгезивним, регенерувальним (Du et al, 2020), антимікробним (Ardeane et al, 2021), антиоксидантним (El-Hack et al, 2020) і рН чутливим (Singh et al, 2022) властивостям. Однак поєднання кількох функцій за допомогою простого компонування окремих функціональних елементів є непростим завданням. Раніше повідомлялося, що гемостатичні ефекти хітозану сильно залежать від його молекулярної маси та ступеня деацетилювання (DD), причому найбільші чіткі ефекти демонструє хітозан >300 кД з >85 % DD (Lootsik et al, 2016; Lootsik et al, 2020). У той час як найбільший антибактеріальний ефект демонструє фракція 100–120 кД хітозану (Lootsik et al, 2015; Lootsik et al, 2022). Завдяки наявності в своїй структурі численних аміногруп хітозан здатний нековалентно (іонно) зв'язувати різні аніонні речовини, які можуть бути важливими для загоєння ран (Manko et al, 2024). В іншому дослідженні було виявлено, що канабіміметик N-стеароїл-етаноламін (HCE) ефективно стимулює загоєння опікових ран і демонструє протизапальну дію (Kosiakova et al, 2022; Berdyshev et al, 2015). У цьому дослідженні створені нами багатофункціональні гідрогелі на основі хітозану, доповнені гіалуроновою кислотою та HCE були застосовані для загоєння гострих шкірних ран у лабораторних мишей лінії C57/Black. Інші характеристики (біосумісність, здатність до біодеградації, посилення клітинної міграції, індукція лізосомальної активності) створених засобів вивчали на експе-

риментальних моделях з використанням мишачих фібробластів, культивованих *in vitro*.

Методи. Реактиви. Хітозан з креветок (Chitopharm L) фірми «Chitinor AS» (Норвегія), гіалуронат (YUNATIS, Китай). HCE був отриманий, як описано в патенті (Gula et al, 2008).

Приготування багатофункціональних гідрогелів на основі хітозану. Розчин гіалуронової кислоти (натрієвої солі) рівномірно наливали в чашку Петрі. Наступним етапом наносили розчин хітозану, і полімеризували обидва біополімери до стабільної плівки протягом 1 год. Для включення HCE, його попередньо розчиняли в етанолі (98 %), змішували з гіалуронатом, решту етанолу видаляли нагріванням до 37 °C впродовж 1 год. Гелеві плівки зберігали у водному розчині при 4 °C.

Морфологічні дослідження (SEM). Усі мікроскопічні зображення отримані за допомогою сканувального електронного мікроскопа Zeiss EVO 40-XVP (Німеччина). Перед проведенням досліджень зразки гідрогелю висушували та нарізали на частинки розміром 1 × 1 см. Для візуалізації зразки покривали золотом (5 нм) за допомогою JEOL JFC-1600.

Культитивування клітин лінії Balb-3T3. Лінія Balb-3T3 ембріональних мишачих фібробластів була отримана від проф. Вальтера Бергера (Інститут дослідження раку, Віденський медичний університет, Австрія). Клітини культивували в середовищі Ігла, модифіковане Дульбекко (DMEM) з високим вмістом глюкози (Мерк, Берлінгтон, Массачусетс, США) з додаванням 10 % інактивованої фетальної бичачої сироватки (FBS, Мерк, Берлінгтон, Массачусетс, США) у зволоженій атмосфері, що містить 5 % CO₂, при 37 °C.

Дослідження біосумісності гідрогелів *in vitro*. МТТ-тест (3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-2,5-дифенілтетразолію бромід («Sigma-Aldrich», США) використовували для вимірювання цитотоксичного ефекту нових гідрогелів на клітини фібробластів миші BALB-3T3. Зразки стерилізували за допомогою УФ. Після цього їх (по 150 мг кожного) інкубували у середовищі з DMEM (2 мл) впродовж 72 год при 37 °C у зволоженій атмосфері для отримання гелевих екстрактів. Клітини висівали в 96-лункові планшети в концентрації 5 × 10³ клітин/лунку в

100 мкл DMEM. Наступного дня в лунки додавали різні кількості гідрогелевого екстракту (25, 50, 75 і 100 %), лунки без зразків були використані як контроль.

Після 24 год інкубації в кожену лунку додавали 100 мкл реагенту МТТ та інкубували при 37 °С впродовж 4 год у зволоженій атмосфері. Середовище зливали та додавали 100 мкл ДМСО («Sigma-Aldrich», США), щоб зупинити реакцію та забезпечити утворення кристалів формазану. Абсорбцію міряли за допомогою пристрою для зчитування планшетів (Absorbance Reader BioTek ELx800 (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA)) при довжині хвилі 490 нм. (Kuznietsova et al, 2021).

Оцінка міграційної активності клітин. Для оцінки здатності до міграції і проліферативної активності мишачих фібробластів BALB-3T3, оброблених різними зразками гідрогелю, використовували модель ушкодження клітинного моношару у вигляді шкребка. Клітини висівали у лунки щільністю 15×10^4 клітин/лунку та інкубували при 37 °С до утворення моношару. Стерильною піпеткою робили шкребок на поверхні моношару та обережно промивали фосфатно-сольовим буфером, щоб видалити клітини з області подряпини. Після цього зразки гідрогелів наносили поверх клітин. Міграцію клітин між ділянками подряпин фотографували через 0, 1, 3 і 6 днів за допомогою інвертованого мікроскопа Olympus IX73 («Olympus», Японія). Кількісну оцінку міграції клітин визначали за допомогою ImageJ (Ningrum et al, 2023).

Фарбування лізосом нейтральним червоним. Для спостереження активності лізосом під мікроскопом, клітини BALB-3T3 висівали в 6-лункові планшети (3×10^5 клітин/лунку) та інкубували впродовж ночі. Потім зразки гідрогелів наносили на клітини та інкубували впродовж 24 год. Після цього розчин барвника нейтрального червоного (0,8 мМ) додавали до клітин та інкубували протягом 0,5 год. Клітини двічі промивали фосфатно-сольовим буфером і спостерігали під інвертованим мікроскопом (Carl Zeiss, Oberkochen, Німеччина) (Kittilukana et al, 2024).

Оцінка загоєння ран in vivo. Тварини. 24 самці мишей лінії C57/Black, середньою масою 25 г були використані для дослідження загоєння ран. Тварин утримували в чистих кліт-

ках, при стандартній кімнатній температурі 22 ± 3 °С. Вони мали вільний доступ до питної води та їжі.

Рани. Модельні ексцизійні рани робили у мишей за раніше описаним методом (Šitum et al, 2007) з деякими модифікаціями. Тварин анестезували ін'єкцією телазолу (1 мг/25 г). Після цього волосся на спині збривали, шкіру очищали 70%-вим етанолом. Далі робили 1 кругову відкриту ексцизійну рану (діаметром ≈ 6 мм) на спині миші, вирізаючи фрагмент шкіри. Потім рани промивали фізіологічним розчином.

Дизайн дослідження. Тварин випадковим чином розподіляли на 3 групи (8 мишей на групу). Група 1 була контрольною, рани цих тварин залишалися без лікування. Поверхню рани дослідних груп II і III покривали гідрогелем Хітозан-гіалуронат (II), а групи III – Хітозан-гіалуронат-НСЕ. Гелі накладали на рани одnorазово і спостерігали впродовж 12 днів.

Оцінка швидкості загоєння ран. Швидкість загоєння ран оцінювали кількісно за допомогою програмного забезпечення image J 1.52. Площу рани рахували за масштабованими знімками ран на 3, 6, 9, 12 добу. Відсоток загоєння розраховували за допомогою наступного рівняння:

Відсоток загоєння (%) = $\frac{\text{площа рани в день } 0 - \text{площа рани в день } n}{\text{площа рани в день } 0} \times 100$, де n = номер дня (3, 6, 9 або 12) спостереження за закриттям рани (Abou El-Ezz et al, 2022).

Гістологічне дослідження. Зразки тканин шкіри, видалені з ділянки рани на 3, 6, 9 і 12 добу, витримували в 10%-вому нейтральному забуференому формаліні. Для візуалізації тканин з використанням світлової мікроскопії, зразки фарбували гематоксиліном. Для оцінки процесу регенерації використовували мікроскопічні критерії загоєння ран, серед яких повторна епітелізація, утворення грануляційної тканини, ремоделінг та закриття країв рани.

Статистичний аналіз. Усі значення на графіках виражено як середнє значення $\pm$ SD. Статистичну значущість цих результатів оцінювали за допомогою одностороннього дисперсійного аналізу (ANOVA), GraphPad Prism версії 8 (GraphPad Software, Inc., Сан-Дієго, Каліфорнія, США). Відмінності вважали дос-

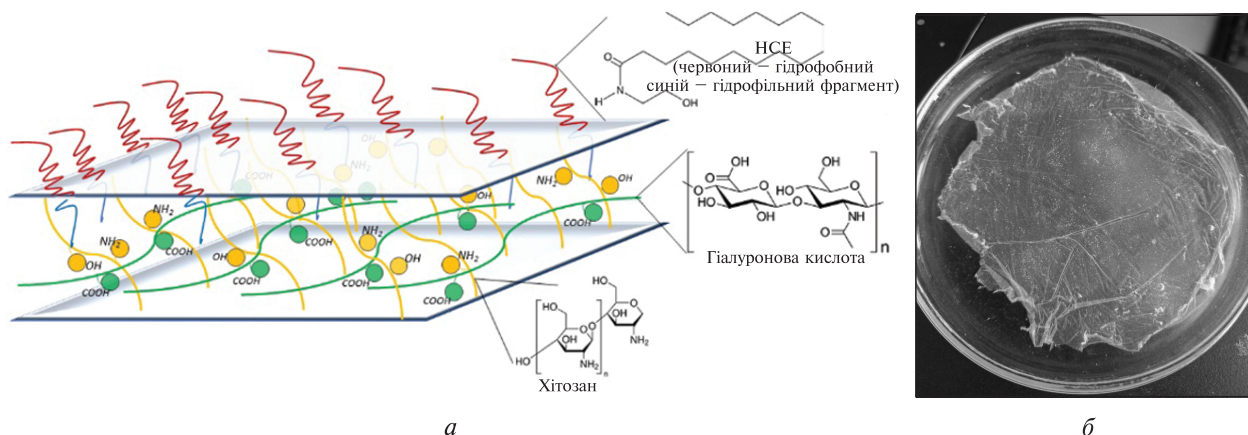


Рис. 1. *а* – схематичне зображення нового синтезованого гідрогелю на основі хітозан-гіалуронової кислоти з додаванням НСЕ. *б* – репрезентативне фото нового синтезованого гідрогелю на основі хітозану та гіалуронової кислоти

товірними при значенні $p < 0,05$, $** p < 0,01$ та $*** p < 0,001$.

Результати. *Приготування гідрогелів на основі хітозану (короткий опис).* Співвідношення компонентів гідрогелів Хітозан-гіалуронат та Хітозан-гіалуронат-НСЕ становило 1 : 1 та 1 : 1 : 0,5 відповідно (схема – рис. 1, *а*, фото зразка – 1, *б*). Ці гідрогелі, сформовані без використання спеціальних хімічних зшивок, прості у приготуванні, яке передбачає нашарування компонентів гелю – холодного (5°C) розчину гіалуронату, який повністю та рівномірно покриває хітозан (20°C), попередньо розчинений у гліколевій кислоті. Утворення гелю відбувалося при кімнатній температурі впродовж 1 год. Отримані зразки легко піддаються стерилізації за допомогою УФ (1 год). Процедура утворення даних гелів дозволяє уникнути складних хімічних реакцій і необхідності точного контролю параметрів хімічних реакцій. Процес утворення гідрогелю є швидким, оскільки він не передбачає додаткових етапів, необхідних для включення зшиваючого агента, і наступних етапів промивання та/або нейтралізації, які використовують у виробництві гідрогелів із хімічними зшивками. Тому простота, швидкість та зручність є великою перевагою цього способу приготування.

Характеристика гідрогелів на основі хітозану за допомогою СЕМ. Морфологію поверхні розроблених нами гідрогелевих плівок на основі хітозану було охарактеризовано за допо-

могою СЕМ. Помічено, що поверхня зразка Хітозан-гіалуронат мала невелику «шорсткість» (рис. 2, *а*). Така поверхня, можливо, сприяє адгезивним властивостям отриманого матеріалу. Поверхня гідрогелевої плівки, що містить НСЕ (рис. 2, *б*) була вкрита кристалічними структурами.

Оцінка біосумісності in vitro гідрогелів створених на основі хітозану. Біосумісність розроблених гідрогелів оцінювали вивчаючи їх вплив на життєздатність фібробластів миші BALB-3T3 за допомогою МТТ-тесту. Тривалість інкубації клітин із гідрогелевими екстрактами, приготованими як зазначено у методиці, становила 24 год (рис. 3). Отримані результати не показали істотного токсичного впливу обох досліджуваних екстрактів гелів на життєздатність фібробластів. У концентраціях від 25 до 75 % екстрактів гелю Хітозан-гіалуронат-НСЕ та Хітозан-гіалуронат життєздатність клітин підтримувалася на рівні контролю (100 %), або, як у випадку зразка Хітозан-гіалуронат-НСЕ перевищувала її. Ці результати вказують на те, що гідрогелі не чинять несприятливого впливу на фібробласти. Навіть у найвищій (100 %) концентрації екстракту, життєздатність клітин була знижена лише до 85 % порівняно із контролем.

Потенціал прискорення регенерації поверхні рани гідрогелями досліджували *in vitro* за допомогою тесту на закриття «подряпини» у моношаровій культурі клітин. На рис. 4 про-

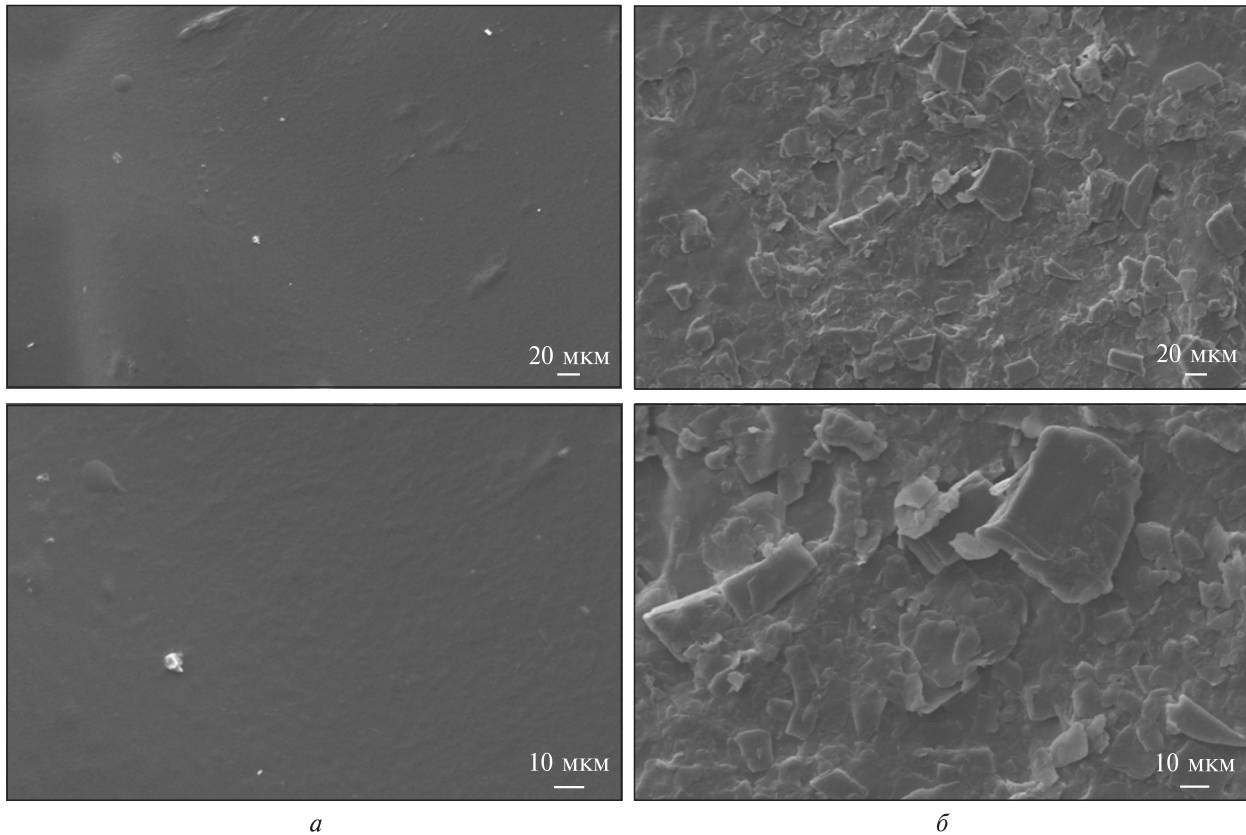


Рис. 2. Морфологія поверхні гідрогелів: *а* – гідрогель Хітозан – гіалуронат, *б* – гідрогель Хітозан – гіалуронат – НСЕ (200×, 500× – збільшення)

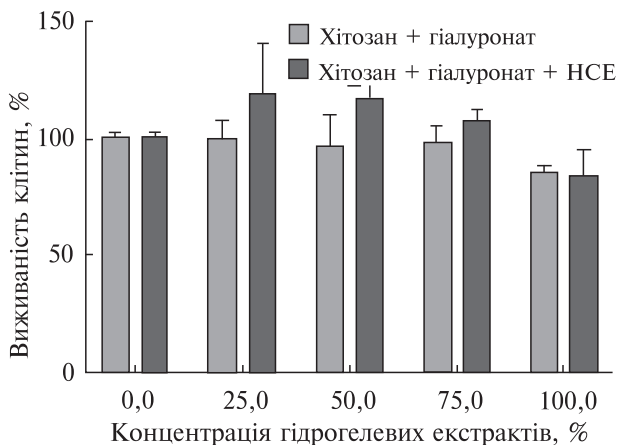


Рис. 3. Співвідношення живих мишачих фібробластів BALB-3Т3, інкубованих впродовж 24 год за присутності екстрактів із досліджуваних гідрогелів на основі хітозану, гіалуронової кислоти та НСЕ (результати трьох незалежних експериментів (N = 3), кожен з яких проводили в трьох повторях (n = 3))

демонстровано міграцію клітин у зону шкребка через 0 та 3 дні. Помітно, що у присутності зразка Хітозан-гіалуронат більше клітин мігрувало в порожню область у моношаровій культурі, ніж за присутності зразка Хітозан-гіалуронат-НСЕ. Виявлена різниця може бути викликана поверхнево-активною дією НСЕ, яка впливає на поведінку клітин, оброблених цим каннабіміметиком.

Результати фарбування клітин нейтральним червоним показали більше накопичення барвника в лізосомах клітин, інкубованих із зразками гідрогелю Хітозан-гіалуронат і Хітозан-гіалуронат-НСЕ (рис. 5, *а, б, в, г*), порівняно з контрольними клітинами без впливу гідрогелю (рис. 5, *д, е*). Інтенсивне фарбування лізосом у клітинах свідчить про активний лізосомальний процес, який, ймовірно, включає інтерналізацію та деградацію гідрогелевих матеріалів клітинами. У клітинах конт-

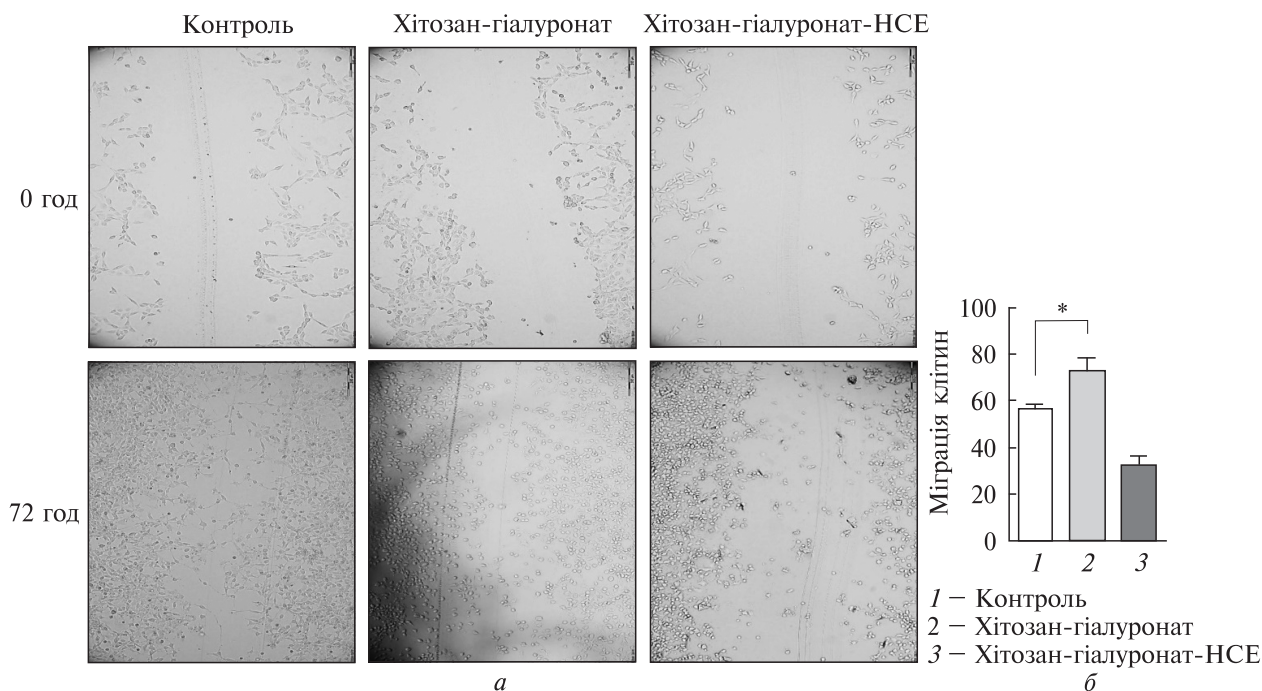


Рис. 4. Регенерувальний вплив нових гідрогелів, оцінений за допомогою тесту міграції клітин *in vitro* з використанням лінії BALB-3T3 фібробластів миші. Репрезентативне мікроскопічне зображення (а) та чисельність клітин у зоні подряпини після 72 год інкубації клітин із зразками гідрогелю (б). Результати трьох незалежних експериментів, * $p < 0,05$, масштаб – 200 мкм

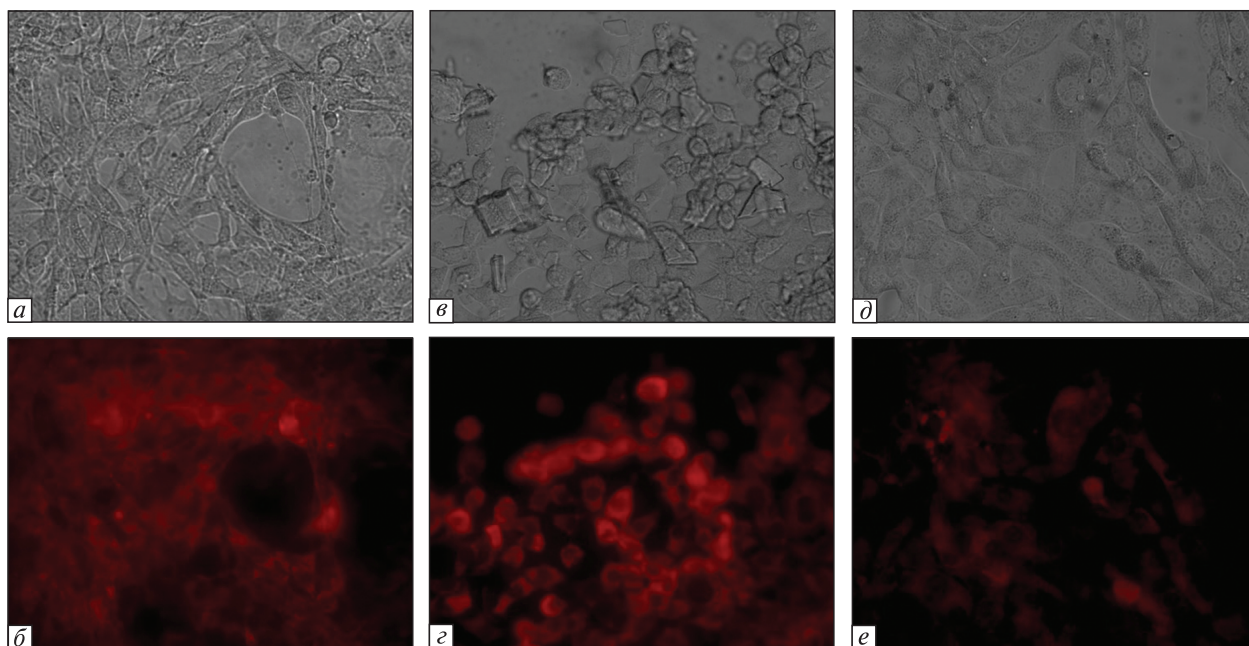


Рис. 5. Активація лізосом у клітинах BALB-3T3 хітозан-гіалуронатом (а, б); Хітозан-гіалуронат-НСЕ (в, г); Контрольні (необроблені) клітини (д, е), 24 год інкубації

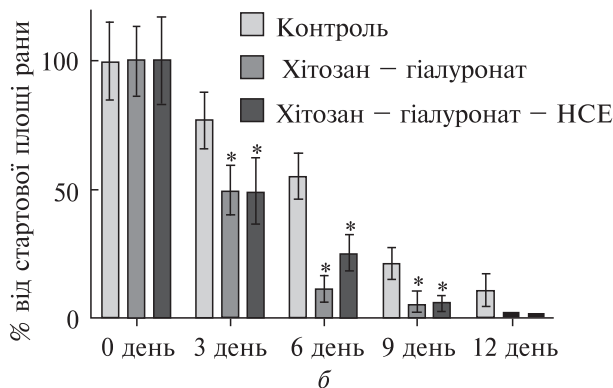


Рис. 6. Демонстрація впливу гідроге-лів на загоєння ран порівняно з конт-ролем (необроблена рана). *а* – зовнішній вигляд ран з дня 0 (день індукції рани) до 12 дня; *б* – кількісно визна-чена площа рани. Дані представлені як середнє значення $\pm$ стандартне відхилення 4 ран. * $p < 0,05$ порівняно з контролем, $N=3$

ролю (без дослідних зразків) інтенсивність фарбування лізосом була значно нижчою.

Вплив гідроге-лів на регенерацію модельних ран у лабораторних мишей. Репрезентативні фото-графії області рани мишей усіх груп на 3, 6, 9 і 12 дні представлені на рис. 6, *а*. Кількісний аналіз площі рани показав, що регенерація пошкодженої ділянки була помітно швидшою у групі мишей з Хітозан-гіалуронатом порів-

няно з контрольною та Хітозан-гіалуронат-НСЕ групами впродовж усього періоду дослід-ження (рис. 6, *б*). Детальніше, на 6 день пло-ща рани була значно меншою в групі Хітозан-гіалуронату порівняно з двома іншими груп-ми. На 9-й і 12-й дні групи Хітозан-гіалуронат і Хітозан-гіалуронат-НСЕ показали подібну, значно меншу площу рани, порівняно із конт-рольними мишами.

Гістологічне дослідження. Проведено гістологічний аналіз раневих ділянок під час впливу нових гідрогелів за допомогою фарбування гематоксиліном відновлених тканин на 3, 6, 9

та 12 добу після створення модельної рани. На 3-й день після операції в тканині мишей, яка була покрита зразком з Хітозан-гіалуронатом, реепітелізація виявилася більш вираженою

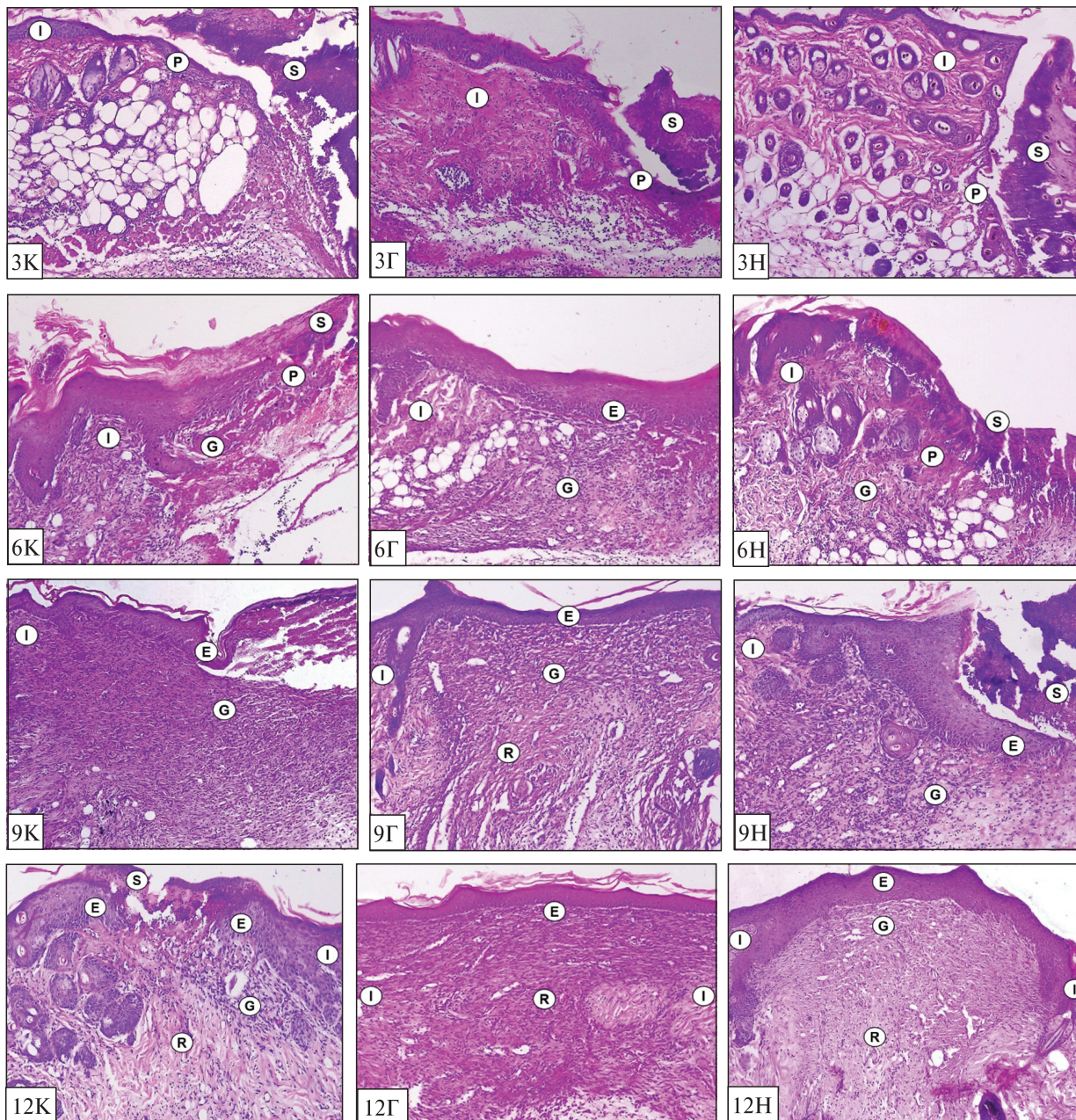


Рис. 7. Гістологічне дослідження (фарбування гематоксиліном) загоєної тканини шкіри чорних мишей (C57/Black). Мікроскопічні зображення шкіри, контрольна група, (C); хітозан-гіалуронат (F); Хітозан-гіалурона-НСЕ (N). S – струп, I – неушкоджена шкіра, P – проліферація епітеліальних клітин, G – грануляційна тканина, E – епітелізація, R – ремоделювання. 3, 6, 9 та 12 – доба видалення зразків тканин шкіри з ділянки рани

(рис. 7, 3F) порівняно з контролем (рис. 7, С3). Гідрогель хітозан-гіалуронат-НСЕ частково відновив епітелізацію при основі рани (рис. 7, N3). В усіх групах спостерігали помірний набряк, клітинний інфільтрат біля основи рани. На першому етапі в обидвох гелях виявлено більшу прогресію загоєння ран, порівняно з контролем.

На 6 день у контрольній групі спостерігалися неповне закриття рани шляхом епітелізації, акантозна (потовщена) структура епітелію та гіперцелюлярна грануляційна тканина під епітелізованою ділянкою (рис. 7, 6C). Під дією зразка Хітозан-гіалуронат (рис. 7, 6F) епітелій майже повністю перекривав дефект, а під епітелізованими ділянками спостерігали грануляційну тканину. Це свідчить про те, що загоєння рани проходить за нормальними стадіями. Дія Хітозан-гіалуронат-НСЕ (рис. 7, 6N) показала обмежену повторну епітелізацію (не по всій площі рани) з утворенням багатошарового епітелію.

На 9-й день спостерігали завершену реепітелізацію та ремоделювання сполучної тканини зі звуженням країв рани при застосуванні Хітозан-гіалуронат-НСЕ (рис. 7, 9N) та Хітозан-гіалуронат (рис. 7, 9F). Проте під дією Хітозан-гіалуронатного гелю структура епітелію наближалася до структури інтактної шкіри. Крім того, епітелізація була близькою до завершення, структура епітеліальної пластинки наближалася до структури епідермісу, виявлено різко скорочені відстані між краями рани, у глибших шарах сполучна тканина дозріває, позаклітинний матрикс грубоволокнистий. Спостерігали невідповідне розташування фібробластів, субепітеліальні ділянки грануляційної тканини демонстрували помірну клітинність.

На 12 добу в контрольній групі спостерігали товстий епітеліальний шар з розривами, під якими була грануляційна тканина та ділянки ремоделювання сполучної тканини (рис. 7, 12B). Повну реепітелізацію з добре сформованим багатошаровим епітелієм спостерігали за дії зразків Хітозан-гіалуронат-НСЕ та Хітозан-гіалуронат (рис. 7, 12 F, N).

Обговорення. Порушення анатомії та фізіології шкіри зазвичай призводить до утворення рани. Неліковані рани можуть викликати ма-

сові руйнування тканин і ініціювати розвиток інфекційного процесу. Хітозан — природний полісахарид, один із найперспективніших біополімерів для використання в біології та медицині, особливо для лікування ран. У цьому дослідженні ми оцінили ранозагоювальний потенціал нових гідрогелів на основі хітозану та гіалуронової кислоти, синтезованих без використання хімічних крос-лінкерів. Можна припустити, що «хімічно зшиті» гідрогелі хітозану повинні бути більш стабільними порівняно з «фізично зшитими» гідрогелями хітозану (Fandi et al, 2024). Однак не можна виключити потенційну цитотоксичність хімічно зшитих гідрогелів. Беручи до уваги відсутність хімічних крос-лінкерів, можна припустити фізичні механізми зшивання в утворенні гідрогелів. Це електростатичні взаємодії, взаємодії водневих зв'язків, сили Ван-дер-Ваальса та іонні взаємодії (Y. Ou et al, 2021; Hong et al, 2023). У кислих мікросередовищах хітозан має позитивний заряд через протонування його аміногруп ($-NH_3^+$), тоді як гіалуронова кислота має негативний заряд через наявність карбоксилатних груп ($COOH$) у його залишках глюкуронової кислоти. Таким чином, при змішуванні в мікросередовищі з кислим або нейтральним рН хітозан і гіалуронова кислота можуть утворювати стабільні іонні комплекси через електростатичну взаємодію між двома біополімерами. Крім того, водневі та Ван-дер-Ваальсові зв'язки утворюються між численними гідроксильними ($-OH$) і амініними групами (NH_2) хітозану та карбоксильними групами ($COOH$) гіалуронової кислоти. Тоді як гідроксильні та амініні групи хітозану діють як донори водню, гідроксильні групи та карбоксильні групи гіалуронової кислоти діють як акцептори водню. Хоча сили Ван-дер-Ваальса, спричинені електричними взаємодіями між тісно розташованими хімічними групами, є слабшими порівняно з водневими зв'язками, ці сили можуть сприяти загальній стабільності комплексу хітозан-гіалуронова кислота. Слід зазначити, що каннабіміметик НСЕ має амфіфільні властивості, бо містить як гідрофобну, так і з гідрофільну частини. Його гідрофільна частина може взаємодіяти з компонентами водного мікрооточення хітозану та гіалуронової

кислоти, а гідрофобна частина може розташовуватися на зовнішній поверхні гелю. У попередніх дослідженнях повідомлялося, що НСЕ має специфічну (протизапальну) біологічну активність *in vivo* (Hudz et al, 2022; Kosiakova et al, 2024). Таким чином, включення НСЕ до складу гідрогелю може бути доцільним, оскільки ця сполука потенційно може активуватися та проявляти свої ефекти після введення *in vivo*.

Характеристики морфології поверхні гелевої плівки дають змогу зрозуміти потенційні механізми, що лежать в основі адгезії до поверхні рани та впливу на її загоєння. Невелика «шорсткість» поверхні гідрогелю на основі хітозану може дозволити плівці щільно прилягати до пошкодженої ділянки тканини, служачи основою для росту та проліферації епітеліальних клітин. Оскільки гідрогелевий матеріал піддається біологічному розкладанню, а гіалуронова кислота є природним компонентом позаклітинного матриксу, цей каркас може з часом бути замінений регенерувальними структурами тканини господаря. Крім того, аналіз лізосомальної активності з барвником нейтральним червоним показав, що ці зразки здатності до біологічного розкладання через їх інтерналізацію та лізосомну обробку клітинами. Нейтральний червоний – амфіфільний і слабкатионний барвник, який вільно проникає через клітинну мембрану і накопичується в лізосомах за рахунок захоплення протонів. Цей барвник служить корисним індикатором цілісності та активності лізосом (Barral et al, 2022). Такі гідрогелі можуть бути піддані розкладанню природними ензимами, такими як лізоцим і гіалуронідаза, не створюючи надлишку біомедичних відходів. Інтерналізація та лізосомальна обробка гідрогелів клітинами вказує на їх здатність взаємодіяти з біоматеріалом з його подальшим розщепленням на біосумісні компоненти. Ці дослідження служать важливою передумовою для подальшої оцінки гідрогелів як раневих накладок або основ для тканинної інженерії.

Згідно з ДСТУ ISO 10993–5:2009 (Biological evaluation of medical devices, 2018), зниження життєздатності клітин більш ніж на 30 % вважають цитотоксичним ефектом. У нашому дослідженні було продемонстровано, що гідро-

гелі володіють високим ступенем біосумісності (понад 85 % фібробластів залишаються живими під час інкубації з екстрактом гелю). Відсутність цитотоксичності свідчить про те, що розроблені гідрогелеві матеріали є безпечними при контакті з тканинами господаря і не демонструють шкідливого впливу на ключові типи клітин, які беруть участь у процесах загоєння ран.

Результати тесту з подряпиною на моношарі клітин, який вимірює міграцію, та ріст клітин для регенерації дермальної структури (Alavarse et al, 2017), показали посилену міграцію клітин у зону шкребка за присутності гідрогелю хітозан-гіалуронат без НСЕ. Виявлена різниця порівняно із зразком що містить НСЕ може бути викликана поверхнево-активною дією останнього.

Процес реепітелізації був більш вираженим у зразку Хітозан-гіалуронатного гелю з повною та рівномірною реепітелізацією, ефективним ремоделюванням сполучної тканини та звуженням країв рани. Це свідчить про те, що Хітозан-гіалуронатний гель є ефективним каркасом для сприяння загоєнню ран. Навпаки, гель Хітозан-гіалуронат-НСЕ продемонстрував дещо сповільнене прогресування загоєння ран на початкових стадіях, але подібний ефект на пізніх стадіях (день 9 і 12) з гелем Хітозан-гіалуронат. Це свідчить про те, що включення НСЕ до складу гідрогелю могло сприятливо впливати на процес загоєння ран саме на пізніх стадіях. Ці дані узгоджуються з результатами попередніх досліджень, які показали, що канабіміметики можуть стимулювати ангіогенез, що призводить до покращення васкуляризації та відновлення тканин (Maiak et al, 2023). Покращена васкуляризація може сприяти доставці поживних речовин, кисню та факторів росту до місця рани, прискорюючи відновлення та регенерацію тканин.

Наше дослідження має деякі потенційні обмеження. Ми спостерігали вплив гідрогелів протягом короткого періоду (12 днів), чого може бути недостатньо для оцінки довгострокових ефектів гідрогелів, доповнених НСЕ. Дослідження не повністю охарактеризувало його вплив на процес загоєння ран, тому необхідна подальша робота, щоб зрозуміти механізми його дії. Обмежене розуміння взає-

модії між НСЕ і Хітозан-гіалуроновою кислотою, що може бути критичним для розуміння його впливу на загоєння ран. Однак це дослідження показує, що включення НСЕ до складу гідрогелю може бути хорошою стратегією для сприяння загоєння ран, особливо на пізніх стадіях процесу.

Висновки. Гідрогелі на основі Хітозан-гіалуронової кислоти синтезовано без використання хімічних крос-лінкерів. Їх тривимірну морфологію досліджували за допомогою сканувальної електронної мікроскопії, яка показує однорідну, але не ідеально гладку поверхню гелю Хітозан-гіалуронат з легкою «шорсткістю», що може забезпечити адгезійність цього матеріалу. Створені гідрогелі були нетоксичними для мишачих фібробластів *in vitro*. Вони посилювали міграцію фібробластів у зону подряпини і індукували лізосомну активність в оброблених клітинах, що свідчить про здатність гідрогелів до біологічного розкладання. В експериментах із загоєнням гострих шкірних ран *in vivo* гідрогелі на основі хітозану та гіалуронової кислоти продемонстрували регенерувальну дію на тканини, що підтверджено результатами гістологічних досліджень на лабораторних мишах. Створені гідрогелі володіють високою адгезивною здатністю до шкіри мишей, тому додаткова фіксація гелевих плівок на тілі тварини не була потрібна. Можна розглянути можливість додаткової біофункціоналізації цих гідрогелів шляхом їх навантаження різними біологічно активними компонентами, такими як антибіотики, антиоксиданти, протизапальні засоби або цитокіни.

Автори висловлюють подяку науковцям Центру колективного користування науковим приладдям «Центр електронної мікроскопії та рентгенівського мікроаналізу» (Фізико-механічний інститут ім. Карпенка НАН України) та Центру колективного користування клітинної біології та біоенергетики, Львівський національний університет І. Франка).

Дотримання етичних стандартів. Усі експерименти з хребетними тваринами проводили відповідно до міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин під контролем Комітету з біоетики Ін-

ти-туту клітинної біології НАН України (Протокол № 1/2024 від 13.02.24).

Конфлікт інтересів. Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

Фінансування. Робота виконана в рамках гранту 2022.01/0207 «Протизапальний та ранозагоювальний засіб, що містить композицію каннабіміметика N-стеароїлетаноламіну з гідрогелем на основі хітозану», виданого Національним фондом досліджень України. Частково це дослідження було підтримано Фондом Сімонса, грант №1030281.

CHITOSAN-BASED HYDROGELS SUPPLEMENTED WITH N-STEAROYLETHANOLAMINE FOR ACCELERATION OF HEALING OF ACUTE CUTANEOUS WOUNDS: CYTOLOGICAL AND HISTOLOGICAL EVALUATING

N. Manko, I. Ivasechko, R. Antonyuk, M. Lutsyk, G. Kosiakova, N. Gula, S. Korniy, O. Klyuchivska, J. Kozak, T. Dumich, R. Stoyka

Institute of Cell Biology the National Academy of Sciences of Ukraine, Lviv, Ukraine
Danylo Halytsky Lviv National Medical University, Lviv, Ukraine

O.V. Palladin Institute of Biochemistry the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine
Karpenko Physico-Mechanical Institute of the NAS of Ukraine, Lviv, Ukraine

E-mail: stoika.rostyslav@gmail.com

Wound management remains a significant clinical challenge, necessitating the development of advanced biomaterial solutions. This study aimed to evaluate the wound healing potential of novel chitosan-hyaluronic acid-based hydrogel supplemented with N-stea-roylethanolamine (NSE). Two hydrogel systems were developed: one with and one without the anti-inflammatory cannabimimetic NSE. Morphology was studied using scanning electron microscopy, biocompatibility and biodegradability were tested using murine fibroblasts by MTT assay and Neutral red staining. Wound healing was evaluated in C57 black laboratory mice using histological analysis with hematoxylin staining. The hydrogels demonstrated high biocompatibility, enhanced fibroblast migration, and induced lysosomal activity, indicating biodegradability. Both hydrogel systems accelerated wound healing in mice, with faster epithelialization and remodeling of wound tissues observed in histological sections. Acceleration of wound healing was found at the use of both types of the created gel films – with and without the NSE, that was

confirmed by faster epithelialization and remodeling of wound tissues observed in the histological sections.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Abou El-Ezz D, Abdel-Rahman L, Al-Farhan B, Mostafa D, Ayad E, Basha M (2022) Enhanced In Vivo Wound Healing Efficacy of a Novel Hydrogel Loaded with Copper (II) Schiff Base Quinoline Complex (CuSQ) Solid Lipid Nanoparticles. *Pharmaceuticals* 15(8):978. <https://doi.org/10.3390/ph15080978>
- Alavarse A, de Oliveira Silva F, Colque J, da Silva V, Prieto T, Venancio E, Bonvent J (2017) Biopolymeric Electrospun Nanofibers for Wound Dressings in Diabetic Patients. *Materials Science and Engineering* 77:271–81. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12100983>
- Ardean C, Davidescu C, Nemeş N, Negrea A, Ciopec M, Duteanu N, Negrea P, Duda-Seiman D, Musta V (2021) Factors Influencing the Antibacterial Activity of Chitosan and Chitosan Modified by Functionalization. *Inter J Mol Sci* 22(14):7449. <https://doi.org/10.3390/ijms22147449>
- Barral D, Staiano L, Guimas Almeida C, Cutler D, Eden E, Futter C, Galione C, Marques A, Medina A, Napolitano D, Settembre G, Vieira C, Aerts O, Atakpa-Adaji J, Bruno P, Capuozzo G, De Leonibus A, Di Malta E, Escrevente C, Esposito C, Seabra A (2022) Current methods to analyze lysosome morphology, positioning, motility and function. *Traffic* 23(5):238–69. <https://doi.org/10.1111/tra.12839>
- Berdyshev A, Kosiakova H, Onopchenko O, Panchuk R, Stoika S, Hula N (2015) *N*-stearoylethanolamine suppresses the pro-inflammatory cytokines production by inhibition of NF-kappaB translocation. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators* 121:91–6. <https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2015.05.001>
- Biological evaluation of medical devices – Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity, <https://nhiso.com/wp-content/uploads/2018/05/ISO-10993-5-2009.pdf>
- Costa M, Durço A, Rabelo T, Barreto de SS R (2018) Effects of Carvacrol, Thymol and essential oils containing such monoterpenes on wound healing: a systematic review. *A Guimarras, J Pharm Pharmacol* 71(2):141–155. <https://doi.org/10.1111/jphp.13054>
- Dai M, Zheng X, Xu X, Kong X, Li X, Guo G (2009) Chitosan-Alginate Sponge: Preparation and Application in Curcumin Delivery for Dermal Wound Healing in Rat. *J Biomed Biotechnol* 1–8. <https://doi.org/10.1155/2009/595126>
- Du X, Liu Y, Yan H, Rafique M, Li S, Shan X, Wu L, Qiao M, Kong D, Wang L (2020) Anti-Infective and Pro-Coagulant Chitosan-Based Hydrogel Tissue Adhesive for Sutureless Wound Closure. *Biomacromolecules* 21(3):1243–53. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.9b01707>
- El-Hack M, El-Saadony M, Shafi M, Zabermawi N, Arif M, Batiha G, Khafaga A, Abd El-Hakim Y, Al-Sagheer A (2020) Antimicrobial and antioxidant properties of chitosan and its derivatives and their applications: A review. *Inter J Biolog Macromol* 164: 2726–2744. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.08.153>
- Fan P, Zeng Y, Dionisio Zaldivar S, Агъеро L, Wang S (2023) Chitosan-Based Hemostatic Hydrogels: The Concept, Mechanism, Application, and Prospect. *The Concept, Mechanism, Application, and Prospects. Molecules* 28(3):1473–3. <https://doi.org/10.3390/molecules28031473>
- Fandi Hong, Peng Qiu, Yufan Wang, Peirou Ren, Jiaxin Liu, Jun Zhao, Dongxia Gou (2024) Chitosan-based hydrogels: From preparation to applications, a review. *Food Chemistry: X* 21:101095. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2023.101095>
- Graça M, Miguel S, Cabral C, Correia I (2020) Hyaluronic acid-Based wound dressings: A review. *Carbohydrate Polymers* 241:116364. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116364>
- Gula N, Marhitych V, Goridko T, Artamonov M, Zhukov A, Klimashevskiy V. Pat 81861 UA. MPK (2007.01) 215/00 S07S, S07S 229/02, 2008.
- Hong F, Qiu P, Wang Y, Ren P, Liu J, Zhao J, Gou D (2023) Chitosan-based hydrogels: From preparation to applications, a review. *Food Chemistry* 21: 101095. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2023.101095>
- Hudz I, Chernyshenko V, Kasatkina L, Urvant L, Klimashevskiy V, Tkachenko O, Kosiakova H, Hula N, Platonova T (2022) *N*-Stearoylethanolamine Inhibits Integrin-Mediated Activation, Aggregation, and Adhesion of Human Platelets *J Pharmacol Experim Therapeut* 383(1):2–10. <https://doi.org/10.1124/jpet.122.001084>
- Kirwale S, Sharma S, Roy A (2023) Chitosan, chondroitin sulfate, and hyaluronic acid based in-situ forming scaffold for efficient cell grafting. *Int J Biol Macromol* 225: 938–951. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.11.157>
- Kuznietsova H, Byelinska I, Dziubenko N, Lynchak O, Milokhov D, Khilya, O, Finiuk N, Klyuchivska O, Stoika R, Rybalchenko V (2021). Suppression of systemic inflammation and signs of acute and chronic cholangitis by multi-kinase inhibitor 1-(4-Cl-benzyl)-3-chloro-4-(CF3-phenylamino)-1H-pyrrole-2,5-dione. *Mol Cell Biochem* 476(8):3021–3035. <https://doi.org/10.1007/s11010-021-04144-y>
- Kittilukkana A, Sanit J, Pilapong C (2024) Reproposing Neutral Red as a Colorimetric Probe for Quantitative Assessment of Lysosomal Clearance in Neuroblastoma Cell Line. *Chemistry Select* 9(1):e202303856. <https://doi.org/10.1002/slct.202303856>

- Kosiakova H, Berdyshev A, Dosenko V, Drevytska T, Herasymenko O, Hula N (2022) The involvement of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) in anti-inflammatory activity of N-stearoylethanolamine. *Heliyon* 8(11):e11336–6. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e11336>
- Kosiakova H, Berdyshev A, Horid'ko T, Meged O, Klimashevsky V, Matsokha R, Asmolkova O, Kvitnitskaya-Ryzhova V, Luhovskyi T, Klymenko S, Hula N (2024) N-Stearoylethanolamine Exerts Cardioprotective Effects in Old Rats. *Curr Aging Sci* 17(2):144–55. <https://doi.org/10.2174/011874609827532321226073348>
- Lootsik M, Manko N, Gromyko O, Tistechok S, Lutsyk M, Stoika R (2020) Honeybee chitosan-melanin complex: isolation and investigation of antimicrobial activity. *Ukrain Biochem J* 92(6):143–153. <https://doi.org/10.15407/ubj92.06.143>
- Lootsik M, Bilyy R, Lutsyk M, Stoika R (2016) Patent of Ukraine for the invention No. 112716
- Lootsik M, Bilyy R, Lutsyk M, Stoika S (2015) Preparation of chitosan with high blood clotting activity and its hemostatic potential assessment. *Biotechnol Acta* 8(6):32–40. <https://doi.org/10.15407/biotech8.06.032>
- Lootsik M, Manko N, Bilyy R, Lootsik (Jr.) M, Stoika R (2022) Analysis of chitosan molecular weight profile by electrophoresis in a porosity step gradient polyacrylamide gel *Ukr Biochem J* 94(2):76–84. <https://doi.org/10.15407/ubj94.02.076>
- Maia J, Fonseca B, Teixeira N, Correia-da-Silva G (2023) Unveiling the angiogenic effects of cannabinoids: Enhancers or inhibitors? *Biochem Pharmacol* 215:115686. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2023.115686>
- Momin M, Kurhade S, Khanekar P, Mhatre S (2016) Novel biodegradable hydrogel sponge containing curcumin and honey for wound healing. *J Wound Care* 25(6):364–372. <https://doi.org/10.12968/jowc.2016.25.6.364>
- Murakami K, Ishihara M, Aoki H, Nakamura S, Nakamura S, Yanagibayashi S, Takikawa M, Kishimoto S, Yokoe H, Kiyosawa T, Sato Y (2010) Enhanced healing of mitomycin C-treated healing-impaired wounds in rats with hydrosheets composed of chitin/chitosan, fucoidan, and alginate as wound dressings. *Wound Repair and Regeneration: official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* 18(5):478–485. <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2010.00606.x>
- Manko N, Lootsik M, Antonyuk V, Ivasechko I, Skorohyd N, Kosiakova H, Mehed O, Horidko I, Hula N, Klyuchivska O, Panchuk R, Pokhodylo N, Barabash O, Dumych T, Stoika R (2024) Multifunctional chitosan-based hydrogels: characterization and evaluation of biocompatibility and biodegradability in vitro. *Ukr Biochem J* 96(1):80–95. <https://doi.org/10.15407/ubj96.01.080>
- Ningrum D, Hanif W, Mardhian D, Asri A (2023) In Vitro Biocompatibility of Hydrogel Polyvinyl Alcohol/Moringa oleifera Leaf Extract/Graphene Oxide for Wound Dressing. *Polymers* 15(2):468. <https://doi.org/10.3390/polym15020468>
- Pérez-Recalde M, Ruiz Arias I, Hermida E (2018) Could essential oils enhance biopolymers performance for wound healing? A systematic review. *Phytomedicine* 38:57–65. <https://doi.org/j.phymed.2017.09.024>
- Prasathkumar M, Sadhasivam S (2021) Chitosan/Hyaluronic acid/Alginate and an assorted polymer loaded with honey, plant, and marine compounds for progressive wound healing—Know-how. *Int J Biol Macromol* 186:656–85. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.07.067>
- Shivakumar P, Gupta M, Jayakumar R, Gowda D (2021) Prospection of chitosan and its derivatives in wound healing: proof of patent analysis (2010–2020). *Inter J Biolog Macromol* 184:701–712. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.06.086>
- Singh N, Aery S, Juneja S, Kumari L, Lone MS, Dar AA, Pawar SV, Mehta SK, Dan A (2022) Chitosan hydrogels with embedded thermo-and pH-responsive microgels as a potential carrier for controlled release of drugs. *ACS Appl Bio Mater* 5:3487–99. <https://doi.org/10.1021/acsabm.2c00401>
- Šitum K, Bokulić A, Ivetić-Tkalčević V, Parnham M, Čužić S, Đurić K (2007) Comparison of systemic inflammatory and hematology parameters in normal C57Bl/6 and genetically diabetic db/db mice during local wound repair. *Biochem Med* 17:85–93. <https://doi.org/10.11613/BM.2007.009>
- Y. Ou, M. Tian (2021) Advances in multifunctional chitosan-based self-healing hydrogels for biomedical applications. *J Materials Chem B* 9(38). <https://doi.org/10.1039/d1tb01363g>
- Yuan N, Shao K, Huang S, Chen C (2023) Chitosan, alginate, hyaluronic acid and other novel multifunctional hydrogel dressings for wound healing: A review. *Int J Biol Macromol* 240:124321. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.124321>

Надійшла в редакцію 27.10.2024
Після доопрацювання 7.11.2024
Прийнята до друку 18.01.2025