

Експериментальні дослідження

УДК 617.741-004.1-089.843-092.4/9

Регенераційні процеси *in vitro* та *in vivo* під впливом експериментальних зразків синтетичних гідрогелевих імплантатів на основі полівінілформалю

Самченко Ю. М.¹, д-р хім. наук; Малецький А. П.², д-р мед. наук, професор;
Дибкова С. М.¹, канд. біол. наук; Грузіна Т. Г.¹, канд. біол. наук; Рєзніченко Л. С.¹, канд. біол. наук;
Подольська В. І.¹, канд. хім. наук; Керносенко Л. О.¹, канд. хім. наук;
Артьомов О. В.², канд. мед. наук; Полторацька Т. П.¹, головний інженер-дослідник;
Жолобак Н. М.³, канд. біол. наук; Колесніченко В. Г.⁴, науковий співробітник

¹ Інститут біоколоїдної хімії імені Ф. Д. Овчаренка НАН України
Київ (Україна)

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

³ Інститут мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України
Київ, Україна

⁴ Інститут проблем матеріалознавства імені І. М. Францевича НАН України
Київ, Україна

Ключові слова:

ПВФ, гідрогелеві імплантати, орбіта, регенерація, *in vitro*, *in vivo*, біосумісність, імплантація

Актуальність. В останні роки значно збільшилася кількість пацієнтів, які постраждали внаслідок бойових дій. Бойові ураження очей характеризуються значними uszkodженнями тканин ока та очної ямки, множинними осколковими пораненнями (магнітними та нерідко амагнітними), часто у поєднанні з травмами обличчя та інших частин тіла. Враховуючи явну тенденцію росту очного травматизму, виникає необхід-

Мета – вивчити регенераційні процеси *in vitro* та *in vivo* під впливом експериментальних зразків синтетичних гідрогелевих імплантатів на основі полівінілформалю.

Матеріал та методи: СЕМ-аналіз; оцінювання *in vitro* регенераційних процесів методом «загоєння подряпини» (wound-healing method) з використанням культури клітин Vero; дослідження *in vivo* регенераційних процесів у тканинах орбіти і холки лабораторних кролів під впливом експериментальних зразків синтетичних гідрогелевих імплантатів на основі полівінілформалю. Експериментальні дослідження гібридного гідрогелю були проведені на 20 кроликах породи шиншила, масою 2-3 кг, віком 5-6 міс., які під час дослідження знаходилися в однакових умовах перебування.

Результати. За рівнем регенераційних процесів в тесті *in vitro* ефективності заростання подряпини серед досліджених експериментальних зразків гідрогелів (гідрогель ПВФ; гідрогель ПВФ+AuNP (12,06 мкг/г); гідрогель ПВФ, просочений полі-N-ізопропілакриламідом (НІПА)) найбільш ефективним виявився гідрогель ПВФ+AuNP (12,06 мкг/г) (показник закриття «рани» 91%). В дослідженнях *in vivo* локальних ефектів після імплантації гідрогелю ПВФ+AuNP (12,06 мкг/г) в склеральний мішок, тканини орбіти та під шкіру холки дослідних тварин показано помірний набряк ділянки післяопераційного шва та прилеглої кон'юнктиви, який на десятю добу зменшився, а на 17-19 добу був практично відсутній. За результатами гістоморфологічних досліджень особливостей реакції тканин орбіти і холки кролів на гідрогелевий імплантат, показано відсутність його резорбції та гострих запальних процесів оточуючих тканин.

Висновок. Виконаний комплекс досліджень регенераційних процесів *in vitro* та *in vivo* під впливом експериментальних зразків синтетичних гідрогелевих імплантатів на основі полівінілформалю свідчить про високу біосумісність гідрогелю ПВФ+AuNP (12,06 мкг/г) та його перспективність в якості імплантуючого матеріалу.

ність проведення відновлюючих та реконструктивних операцій на орбіті та периорбітальній ділянці.

При проведенні реконструктивних операцій на орбіті та окулоорбітальній ділянці офтальмохірургу в своїй практиці доводиться використовувати імплантуючі матеріали для заміни м'яких і кісткових структур.

© Самченко Ю. М., Малецький А. П., Дибкова С. М., Грузіна Т. Г., Рєзніченко Л. С., Подольська В. І., Керносенко Л. О., Артьомов О. В., Полторацька Т. П., Жолобак Н. М., Колесніченко В. Г., 2025

а при евісцерації та енуклеації очного яблука – формування опорно-рухової кукси (ОРК) для покращення положення протезу у фронтальній площині, його рухомості, що в кінцевому результаті сприяє досягненню більш високого косметичного результату. При застосуванні біологічних тканин (ауто- і гомотканин) недоліком даного матеріалу є схильність до резорбції їх. Враховуючи недоліки імплантуючих матеріалів з ауто- і гомотканинами, в наступні декілька десятиліть інтенсивно розробляються неорганічні і синтетичні матеріали [8]. Однак клінічні дослідження показали, що вони недостатньо біосумісні і не гарантують проростання в них біологічної тканини.

Виходячи з цього, постало питання пошуку синтетичного матеріалу, що відповідає необхідним вимогам для виробництва реконструктивних оперативних втручань на орбіті та інших частинах лицьового скелета. Принципово новими можливостями володіють небіологічні імпланти з пористою просторовою структурою, які здатні до біоінтеграції у навколишні орбітальні тканини. Одним з таких матеріалів може бути полімерний матеріал на основі гібридного гідрогелю.

Завдяки структурній подібності до макромолекулярних компонентів організму полімерні гідрогелі займають особливе місце серед усіх типів матеріалів, які сьогодні використовуються для виготовлення імплантатів [12]. Разом з тим, традиційні гідрогелі часто характеризуються недостатньою механічною міцністю, низькою біосумісністю і відсутністю біологічної активності, зокрема, здатності стимулювати адгезію і ріст еукаріотичних клітин, що обмежує їх застосування у якості імплантаційних матеріалів [10]. Окрім того, дифузія лікарських препаратів із традиційних гідрогелевих матеріалів недостатньо керована, спрямована безпосередньо до органу-мішені і пролонгована. Через це останніми роками дослідники віддають перевагу так званім «розумним» гідрогелям, які відповідають на незначні зміни в оточуючому їх середовищі (насамперед, фізіологічно-прийнятні коливання величини рН чи температури) фазовим переходом зі стрімкою зміною своїх фізико-хімічних параметрів (наприклад, ступеня набухання, пористості, сорбційними та дифузійними властивостями тощо). Використання розумних гідрогелів у системах доставки ліків дозволяє зменшити частоту прийому, підтримувати бажану терапевтичну концентрацію на мінімально ефективному рівні та мінімізувати побічні ефекти препаратів, запобігаючи їх накопиченню в нецільових тканинах [2]. До таких розумних гідрогелів зокрема відносяться полімери на основі рН-чутливої акрилової кислоти [19] та термочутливого НІПА [25]. Зокрема просторово-зшиті гідрогелі на основі НІПА демонструють нелінійну десольватацію вище нижньої критичної температури розчинення (НКТР), рівної 32,8°C і дуже близької до температури людського тіла [13], що зумовлено балансом між гідрофільними (вода – полімер) і гідрофобними (полімер – полімер) взаємодіями. Вказана

температура може прецизійно регулюватися шляхом співполімеризації з іншими мономерами, завдяки чому створюються передумови до адресного керованого вивільнення лікарських препаратів шляхом безконтактного нагрівання, зокрема при лікарській гіпертермії [5].

Новим напрямком досліджень у галузі тканинної інженерії та регенеративної медицини останніми роками стало створення композитних гібридних гідрогелів з інкорпорованими наночастками металів. Такі композитні гідрогелі демонструють нові або покращені механічні, фізичні, хімічні і біологічні властивості, які залежать як від стратегії синтезу композитного матеріалу, так і від типу і способу синтезу наночасток у його складі. Шляхом оптимізації цих параметрів (окремо або синхронно) можна отримувати нанокомпозитні гібридні гідрогелі із заданими характеристиками, зокрема високою біосумісністю і біологічною активністю, або посилювати одну або кілька властивостей гелю [3, 17, 24].

Серед наночасток металів різних типів, перспективних до застосування у складі композитних гідрогелів медичного призначення, окреме місце посідають наночастки золота (AuNP), завдяки своїм унікальним фізичним і біологічним властивостям, що залежать від розміру та форми частинок. Так, AuNP широко застосовуються при розробці підходів до лікування онкологічних захворювань – у фототермічній і фотодинамічній терапії, як субстанція з антиангіогенними властивостями, як вектори у цільовій доставці протипухлинних препаратів тощо [4, 6].

Значної уваги заслуговують протизапальні і антиоксидантні властивості AuNP [18]. Важливою є здатність AuNP стимулювати адгезію клітин на поверхні гідрогелю [26] та здатність стимулювати регенерацію тканин [14]. Крім цього, серед виявлених беззаперечних переваг, які відмічені при додаванні наночасток золота до складу композитних гібридних гідрогелів, слід відмітити біосумісність створених матеріалів та низький рівень подразнюючої дії [24].

Усі зазначені біологічні властивості AuNP обумовлюють їх широке застосування при створенні нанокомпозитних гібридних гідрогелів із заданими характеристиками [7, 9, 15, 27].

Мета дослідження – вивчити в експерименті регенераційні процеси *in vitro* та *in vivo* під впливом експериментальних зразків синтетичних гідрогелевих імплантатів на основі полівінілформалю.

Матеріал та методи

Синтез експериментальних зразків синтетичних гідрогелевих імплантатів на основі полівінілформалю (ПВФ) описано нами раніше [21, 22], а їх зовнішній вигляд представлено на рисунку 1.

Морфологію та структуру синтезованих експериментальних зразків гідрогелевих імплантатів на основі ПВФ досліджували методом скануючої електронної мікроскопії (Tescan Mira 3 LMU з енергодисперсійним

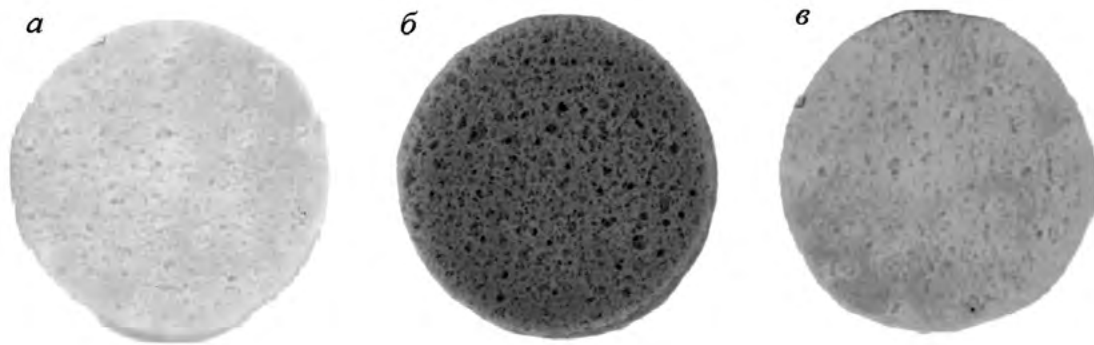


Рис. 1. Зовнішній вигляд експериментальних зразків синтетичних гідрогелевих імплантатів на основі полівінілформалю: а – гідрогель ПВФ (гідрогель на основі полівінілформалю); б – ПВФ+AuNP (гідрогель на основі полівінілформалю з інкорпорованими наночастками золота); в – ПВФ+НІПА (гідрогель на основі полівінілформалю, просочений полі-*N*-ізопропілакриламідом)

спектрометром OxfordX-Max 80 та системою підготування проб PECSGatan 682).

Для оцінки властивостей гідрогелю ПВФ, наповненого НІПА, був використаний термогравіметричний аналіз (ТГА) і диференційна термогравіметрія (ДТГ).

Регенераційні процеси *in vitro* під впливом експериментальних зразків ПВФ гідрогелів оцінювали методом «загоєння подряпини», який є одним із найпоширеніших 2D методів визначення ефективності міграції і проліферації клітин в процесі регенерації [16]. Як тестову використовували перещеплювану моношарову культуру клітин Vero (клітини нирки африканської зеленої мавпи) з колекції культур клітин Інституту мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України. Клітини в концентрації 1×10^5 кл/мл висівали у 6-лункові планшети у поживному середовищі DMEM/F12 з додаванням 10% ембріональної сироватки телят та антибіотику-антимікотику при 37 °C в умовах постійного рівня CO₂ (5%).

Через 24 годин після висівання наносили подряпину у клітинному моношарі за допомогою стерильного наконечника до автоматичних піпеток об'єму 1 мл. Після цього середовище культивування замінювали нативним середовищем у контрольних лунках та зразками кондиціонованих середовищ. Кондиціонування середовища зразками гідрогелів проводили шляхом їх екстрагування середовищем культивування при 37 °C протягом 24 годин згідно [11].

Ефективність заростання подряпини аналізували через 48 годин при забарвленні клітин кристалічним фіолетовим. Ефективність заростання подряпини обчислювали за допомогою програмного забезпечення open source imageJ/Fiji та Wound_healing_size_tool [23]. Відсоток (%) закриття «рани» визначали за формулою: % закриття рани = $((W_{t_0} - W_{\Delta t})/A_{t_0}) \times 100\%$, де W_{t_0} середня ширина подряпини у час t_0 ; $W_{\Delta t}$ - середня ширина подряпини через 48 годин (час Δt).

Оцінку реакції *in vivo* на гідрогелеві імплантати на основі ПВФ здійснювали за результатами аналізу змін клінічних і патоморфологічних показників двадцяти лабораторних кроликів породи шиншила масою

2–3 кг, віком 5–6 місяців з віварію ДУ «Інститут очних хвороб і тканинної терапії ім. В.П. Філатова НАМН України». Експериментальні дослідження проводили з дотриманням етичних норм, передбачених міжнародними принципами Європейської конвенції «Про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментів та в інших наукових цілях» (Страсбург, 1986), і норм біомедичної етики, схвалених Першим національним конгресом України з біоетики (2001 р.), а також Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» № 3447-IV (Київ, 2006). Дослідження схвалено Біоетичним комітетом Інституту очних хвороб і тканинної терапії ім. В. П. Філатова Національної Академії медичних наук України (протокол №1 від 20 травня 2024 року). Хірургічні втручання виконували під загальною анестезією (з розрахунку 1 мл 0,1% розчину тіопенталу натрію внутрішньом'язово на 1 кг маси тіла тварини).

Для вивчення особливостей реакції м'яких тканин дослідних тварин зразки гібридного гідрогелю (гідрогель ПВФ+AuNP (12,06 мкг/г)) розміром 10,0 x 10,0 x 2,5 мм імплантували у склеральний мішок (5 тварин), тканини орбіти (5 тварин) та під шкіру холки (10 тварин).

Дослідним кроликам в склеральний мішок після попередньої проведеної евісцерації ока та під шкіру холки після розрізу шкіри поміщали гібридний гідрогелевий імплантат на основі ПВФ, наповнений 12,06 мкг/г Au. На краї рани накладалися вузлові шви (шовк № 6.0).

Оцінку таких клінічних ознак як набряк тканин орбіти, стан швів, наявність виділень проводили на 2, 5, 10 та 30 добу і потім через кожні п'ять діб за бальною системою:

I. Набряк тканин орбіти (0 балів – набряк відсутній; 1 бал – набряк ділянки післяопераційного шва; 2 бали – набряк ділянки післяопераційного шва і прилеглої кон'юнктиви; 3 бали – виражений хемоз кон'юнктиви і набряк м'яких тканин орбіти).

II. Стан швів (0 балів – немає розходження швів; 1 бал – поодинокі ділянки розходження швів до 1,0 мм;

2 бали – розходження швів довжиною більше 1,0 і менше 5,0 мм; 3 бали – розходження швів на всій ділянці).

III. Виділення з кон'юнктивальної порожнини (0 балів – виділень немає; 1 бал – невелика кількість суковичних виділень у кон'юнктивальній порожнині та на краях повік; 2 бали – незначне серозно-суковичне виділення у кон'юнктивальній порожнині, на краях повік та орбітальній ділянці; 3 бали – виражене серозно-суковичне виділення у кон'юнктивальній порожнині, на краях повік, орбітальній ділянці та за межами орбіти).

Гістоморфологічні дослідження проводили безпосередньо після висічення імплантатів з навколишніми тканинами через 10, 30 діб. Евтаназію тварин здійснювали методом повітряної емболії під загальною анестезією з розрахунку 1 мл 0,1% розчину тіопенталу натрію на 1 кг маси тіла кроля внутрішньом'язово. Фрагменти тканин поміщали у 10% розчин формаліну на одну добу і після стандартної гістологічної провод-

ки заливали парафіном. Гістологічні зрізи тканин фарбували гематоксилін-еозином та аналізували за допомогою мікроскопа прохідного світла Jenamed 2 (Carl Zeiss Jena) при збільшеннях від 100X до 400X.

Всі розрахунки були виконані за допомогою Microsoft Excel (Microsoft), дані представлені як середнє арифметичне $\pm$ помилка середнього ($M \pm m$).

Результати

За результатами електронно-мікроскопічних досліджень (SEM) було встановлено, що матриці ПВФ мають ієрархічну пористу структуру з великими взаємопов'язаними транспортними порами (діаметр Ферета близько 100–200 мкм), що містять значно менші пори (~5–10 мкм) у своїх стінках (рис. 2а). Пори утворюють доволі рівномірну стільникову структуру з товщиною стінок близько 1 мкм. Включення AuNPs при їх концентрації 12,06 мкг/г (тобто при співвідношенні золота та ПВФ 1:100000 не змінило архітекту-

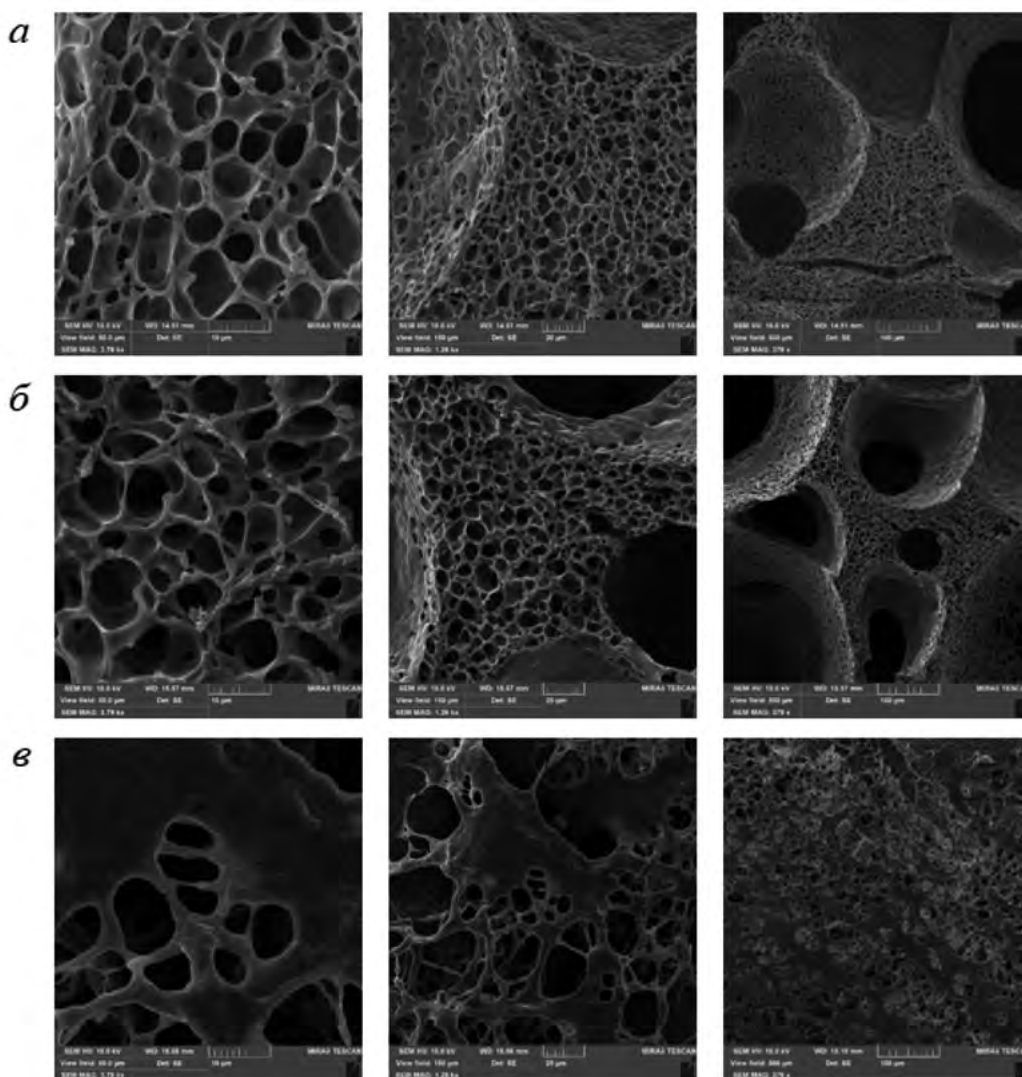


Рис. 2. Сканувально електронно мікроскопічні (SEM) мікрофотографії: а – гідрогель на основі полівінілформалю (ПВФ); б – гідрогель на основі полівінілформалю з інкорпорованими наночастками золота (ПВФ+AuNP, 12,06 мкг/г); в – гідрогель на основі полівінілформалю (ПВФ), просочений полі-N-ізопропілакриламідом (НІПА). Збільшення 3790х; 1290х; 379х

ру PVF матриці (рис. 2б), оскільки розподіл, форма і розмір пор залишилися незмінними. Це вказує на те, що AuNPs можуть бути включені в матриці PVF не впливаючи на їхню пористу структуру. Наповнення матриці ПВФ гідрогелем на основі НІПА призводить до значного звуження присутніх макропор і утовщення до 2–3 мкм порових стінок (рис. 2в). Закорковування транспортних пор при цьому не спостерігалось.

За результатами термогравіметричного аналізу (ТГА) отримано комплексне розуміння поведінки гідрогелю ПВФ, наповненого НІПА за різних термічних умов (рис. 3). Встановлено, що нагрівання в температурному діапазоні від 20 до 150 оС призводить до лише дуже незначної втрати маси (близько 5%), зумовленої випаровуванням об'ємної та сорбованої функціональними групами полімеру води, з подальшим виходом на широке плато, що простягається до 350 оС і свідчить про відсутність процесів деструкції у даному температурному проміжку.

Процеси втрати маси при подальшому зростанні температури пов'язані з виділенням летких компонентів з присутніх функціональних груп у процесі їх

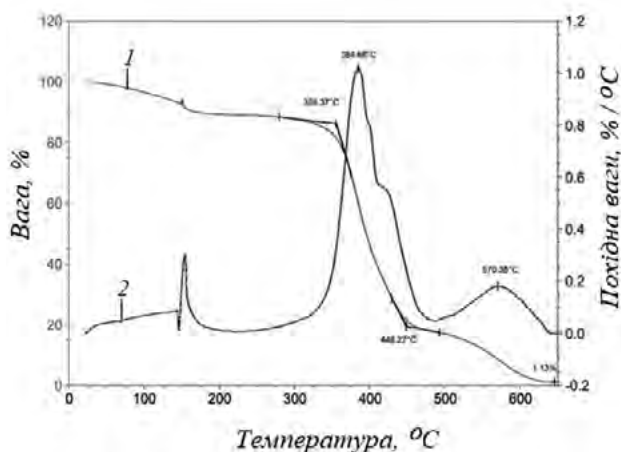


Рис. 3. Графіки термогравіметричного аналізу (1) та диференційної термогравіметрії (2) гідрогелю на основі полівінілформалю, просоченого полі-N-ізопропілакриламідом

термолізу і чітко візуалізуються на кривій ДТГ при максимумі 385 оС. Насамперед, це виділення NH_3 , CO та CO_2 з амідної групи, присутньої у НІПА. Подальше нагрівання до 450 оС призводить до дефрагментації вуглеводневого скелету і, врешті решт, при температурі 530 оС до дегідроксилізації залишкових гідроксильних груп і повної деструкції та згоряння органічних макромолекул.

Отже, синтезовані гідрогелеві матеріали демонструють термічну стабільність у широкому діапазоні температур, що значно перевищує діапазон їх застосування і витримують стерилізацію паровою протягом 15 хвилин за температури 121 °С без суттєвих змін, що є надзвичайно важливим для виробів медичного призначення.

Результати оцінки регенераційних процесів *in vitro* під впливом експериментальних зразків ПВФ гідрогелів наведені в таблиці 1 та на рисунку 4.

Як видно з отриманих даних, найбільш активна регенерація ушкодженого моношару клітин Vero відбувалася під впливом зразка гідрогелю ПВФ+AuNP (12,06 мкг/г). Показник закриття «рани» для цього зразка складав в середньому 91%, що суттєво перевищує рівень регенерації моношару клітин контролю, у випадку якого середнє значення показника закриття «рани» складало 60%.

Візуально, якщо у випадку контролю через 48 годин після ушкодження спостерігали лише ознаки формування зон повного з'єднання подряпини (рис. 4б), порівняно із вихідним розміром подряпини (рис. 4а), то у середовищі, кондиціонованому зразком гідрогелю ПВФ+AuNP (12,06 мкг/г), зони суцільного зімкнення моношару переважали (рис. 4в).

Показник закриття «рани» під впливом гідрогелю ПВФ був меншим (79%), порівняно із зразком ПВФ+AuNP (12,06 мкг/г) (91%), хоча при цьому на 19% перевищував значення контролю (60%). Як показано на рисунку 4г, у зоні подряпини спостерігався гарний ріст клітин із формуванням зон з'єднання ушкодженого моношару.

Таблиця 1. Ефективність регенерації *in vitro* клітин Vero під впливом синтезованих гідрогелів.

Зразок	W_{t_0} (pixel), вихідна ширина подряпини (t_0) $M \pm m$	$W_{\Delta t}$ (pixel), ширина подряпини через 48 годин (час Δt) $M \pm m$	% закриття «рани»
Контроль	868,21±9,10	351,18±48,99	60
Гідрогель ПВФ+AuNP (12,06 мкг/г)	868,21±9,10	74,86±41,05	91
Гідрогель ПВФ	868,21±9,10	183,65±44,23	79
Гідрогель ПВФ, просочений НІПА (без віджимки)	868,21±9,10	212,77± 49,18	76

Примітка: гідрогель ПВФ – гідрогель на основі полівінілформалю, гідрогель ПВФ+AuNP – гідрогель на основі полівінілформалю з інкорпорованими наночастками золота, гідрогель ПВФ, просочений НІПА – гідрогель на основі полівінілформалю, просочений полі-N-ізопропілакриламідом

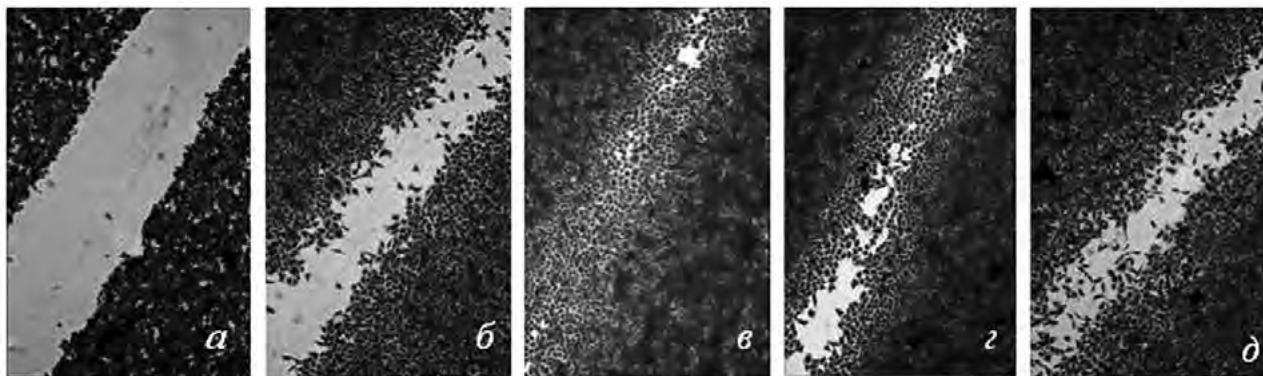


Рис. 4. Ступінь регенерації моношару клітин Vero: а – вихідна ширина подряпини (t_0); б – ефективність заростання подряпини через 48 годин ($t_{\Delta t}$) контролю; в, г, д – ефективність заростання подряпини через 48 годин ($t_{\Delta t}$) в середовищі, кондиціонованому зразками гідрогелю (в – ПВФ+AuNP, 12,06 мкг/г) — гідрогель на основі полівінілформалю з інкорпорованими наночастками золота,; г – ПВФ (гідрогель на основі полівінілформалю); д – ПВФ (гідрогель на основі полівінілформалю), просочений НІПА (полі-*N*-ізопропілакриламідом) без віджимки.

Під впливом зразку гідрогелю ПВФ, просоченого НІПА (без віджимки), через 48 годин після ушкодження спостерігалось формування зон з'єднання ушкодженого моношару клітин із рівнем закриття «рани» 76% (рис. 4д). За рівнем відсотка закриття «рани» ефективність регенерації моношару клітин Vero в середовищі, кондиціонованому зразком гідрогелю ПВФ, просоченого НІПА (без віджимки) майже відповідала ефективності регенерації під впливом гідрогелю ПВФ.

З огляду на ефективність регенераційних процесів *in vitro* під впливом експериментальних зразків ПВФ гідрогелів для подальших досліджень *in vivo* було відібрано зразок гідрогелю ПВФ+AuNP (12,06 мкг/г).

Так, клінічна оцінка реакції м'яких тканин на імплантацію гідрогелю ПВФ+AuNP (12,06 мкг/г) показала, що у перші 5-10 діб після імплантації гідрогелю у тканини орбіти, у всіх тварин спостерігався набряк ділянки післяопераційного шва і прилеглої кон'юнктиви (рис. 5).



Рис. 5. Стан тканин орбіти на 5-ту добу експерименту після імплантації в них гідрогелю на основі полівінілформалю з інкорпорованими наночастками золота (ПВФ+AuNP, 12,06 мкг/г)

На 10-ту добу відмічався незначний набряк кон'юнктиви, краї рани адаптовані, шви на місці.

У перші 5 діб після імплантації гідрогелю в склеральний мішок, у всіх тварин спостерігався набряк кон'юнктиви та тканин орбіти, шви залишалися на місці (рис. 6).

Крім того, на 5-ту і 10-ту добу спостерігалось серозно-сукровичне виділення. При огляді післяопераційної рани шкіри і кон'юнктиви в перші 5-ти діб та наступні дні при імплантації гідрогелю загоєння рани відбувалося первинним натягом.

При імплантації досліджуваного гідрогелю в області холки на 5-ту добу експерименту спостерігався незначний набряк тканин в зоні імплантації (рис. 6а), але на 10-ту добу набряк вже був відсутнім (рис. 7б).

Гістологічні дослідження *in vivo* реакції м'яких тканин на імплантовані матеріали на 10-ту та 30-ту добу експерименту показали, що у тканинах, які оточували імплантати ПВФ+AuNP (12,06 мкг/г), запальні



Рис. 6. Стан тканин орбіти та кон'юнктиви на 5-ту добу експерименту після імплантації в склеральний мішок гідрогелю на основі полівінілформалю з інкорпорованими наночастками золота (ПВФ+AuNP, 12,06 мкг/г)

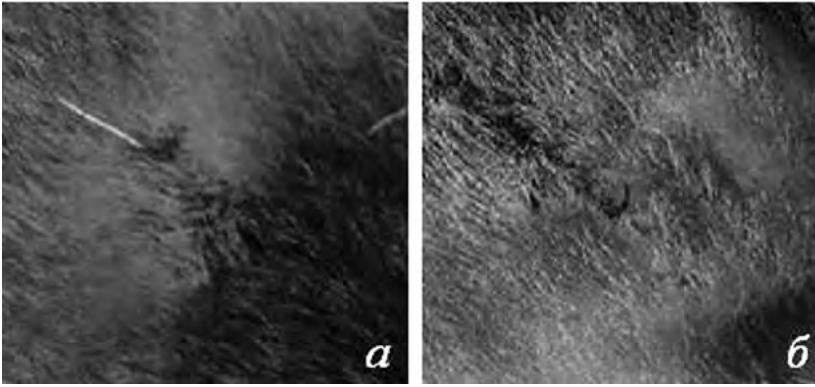


Рис. 7. Стан тканин шкіри холки на 5-ту (а) та 10-ту (б) добу після імплантації

зміни носили слабкий характер і характеризувалися, в основному, дрібними комплексами лімфоцитарної та в окремих випадках – еозинофільної інфільтрації, без вогнищ гнійного запалення (лейкоцитарної інфільтрації). Відзначалася тенденція різного ступеню заміщення імплантату волокнистою сполучною тканиною у проміжку від 10-ї до 30-ї доби, проте процес заміщення імплантату не мав завершення: у всіх випадках на межі імплантата залишалися ділянки макрофагально-гістіоцитарної інфільтрації або початкової фібробластичної проліферації, а також фрагменти самих імплантатів. Такі зони виявлялись як зони інтенсивного фарбування гематоксиліном (базофільні ділянки) або еозинофільні, іноді з вкрапленнями сітчастої структури.

Через 10 днів після імплантації залишки імплантату займали до 30–50% його загальної площі. На решті відзначалися комплекси макрофагально-гістіоцитарної інфільтрації, в яких ближче до периферії відбувалося витіснення гістіоцитів (макрофагів) клітинами фібробластичного типу, що переходять на межі між імплантатом і навколишньою щільною волокнистою тканиною у фіброзну тканину.

Через 30 днів після імплантації фіброзну тканину можна було побачити і у глибоких шарах імплантату.

Тим не менш, до цього терміну заміщення фіброзною тканиною зазвичай не перевищувало 50–70%, оскільки місцями спостерігалися ділянки макрофагально-гістіоцитарної інфільтрації з елементами фібробластичної проліферації. Поступовий розвиток волокнистої сполучної (фіброзної) тканини призводив до витіснення макрофагально-гістіоцитарних клітин з периферії до центру.

В процесі дослідження не спостерігали резорбції імплантатів, натомість ділянка імплантації гідрогелевого матеріалу була представлена макрофагами-гістіоцитами, фібробластами і фіброзною тканиною. Приклади основних патогістологічних патернів, що відображають зміни в імплантаті на 10-ту та 30-ту добу, наведено нижче (рис. 8, 9).

При гістологічному дослідженні імплантатів їх структура проявлялась у вигляді хаотично розподілених ділянок аморфного гематоксилінового та еозинового фарбування, інколи з незначною домішкою волокнистих (нитчастих) елементів, які не фарбуються, що може бути обумовлено наявністю відповідних ацидофільних та базофільних груп у структурі полімеру. Ці елементи до 30-ї доби перебування імплантатів ПВФ+AuNP (12,06 мкг/г) у склеральному мішку, тка-

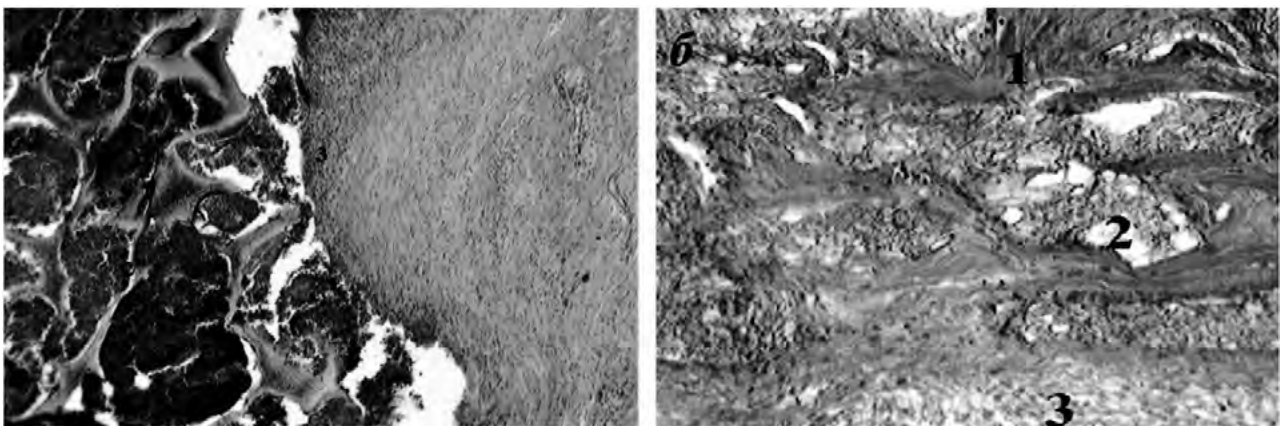


Рис. 8. Гідрогелевий імплантат на основі полівінілформалю з інкорпорованими наночастками золота (ПВФ+AuNP, 12,06 мкг/г), поміщений в тканини орбіти, X100 на 10-ту добу, (а): 1 – залишки імплантату, 2 – скупчення клітин макрофагально-гістіоцитарного типу, 3 – щільна волокниста тканина та на 30-ту добу (б): 1 – фібробластична проліферація, 2 – сітчаста структура, 3 – фібозна тканина

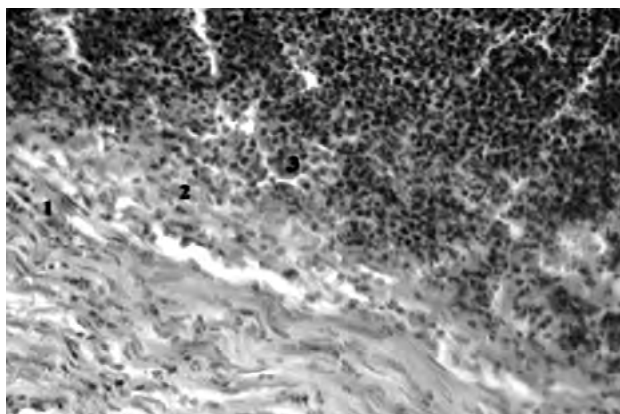


Рис. 9. Гідрогелевий імплантат на основі полівінілформалю з інкорпорованими наночастками золота (ПВФ+AuNP, 12,06 мкг/г), Х200, поміщений в тканини склерального мішку, на 10-ту добу: 1 – фіброзна тканина, 2 – фібробластична проліферація, 3 – макрофагально-гістіоцитарні скупчення

нинах орбіти, ока та під шкірою були присутні фрагментарно, складаючи не більше 5–10% загальної площі гістологічного зрізу імплантату.

Обговорення

Проведений EDX аналіз засвідчив, що на відміну від ПВФ та його нанокмполімеру з наночастками золота, основними елементами, присутніми в яких є вуглець та кисень, у гідрогелі ПВФ, просоченому НПА, міститься також азот, причому доволі однорідно розподілений (середній вміст азоту 11,61 % мас, середньоквадратичне відхилення 0,51), що свідчить про гомогенність отриманого гібридного гідрогелю на основі ПВФ та НПА. Ієрархічна пориста структура матриць ПВФ потенційно здатна забезпечити ідеальне середовище для росту клітин і транспорту поживних речовин, що сприяє зростанню ефективності нанокмполімеру ПВФ при застосуванні в тканинній інженерії і у пластичній та реконструктивній хірургії. Однак, розуміння термічної поведінки імплантантів на основі ПВФ є не менш важливим. Ключові властивості, такі як фазові переходи, термічна стабільність і температура розкладання, безпосередньо впливають на довговічність і придатність гібридних гідрогелів на основі PVF для тканинної інженерії та застосування у медицині.

Одним із сучасних підходів до оцінки регенераційних процесів *in vitro* є тест на «загоєння подряпини». Цей метод імітує міграцію клітин під час загоєння ран *in vivo* [20]. Метод є простим, недорогим і не потребує високоспеціалізованих культур сукаріотичних клітин.

В даній роботі в дослідженнях *in vitro* методом «загоєння подряпини» було проаналізовано вплив синтезованих ПВФ гідрогелів на ефективність регенерації клітин лінії Vero. За ефективністю регенерації моношару клітин під впливом досліджених зразків їх можна розташувати наступним чином: гідрогель ПВФ+AuNP (12,06 мкг/г), гідрогель ПВФ, гідрогель ПВФ, просочений НПА (без віджимки). Підвищений регенера-

торний потенціал гідрогелю ПВФ+AuNP (12,06 мкг/г) порівняно з гідрогелем ПВФ імовірно обумовлений впливом наночасток золота у його складі, що підтверджується даними літератури щодо регенераційного потенціалу AuNP [24].

Експериментальні дослідження регенераційних процесів *in vivo* показали, що у перші п'ять днів після імплантації гідрогелю ПВФ+AuNP (12,06 мкг/г) в склеральний мішок, тканини орбіти, та під шкіру холки лабораторних кроликів, у всіх тварин спостерігався набряк ділянки післяопераційного шва і прилеглої кон'юнктиви, а також незначне серозно-сукровичне виділення із кон'юнктивальної порожнини. Після п'яти днів відбувалося зменшення набряку та виділень з кон'юнктивальної порожнини, і на 8-му–10-ту добу вони зовсім минали.

Згідно з даними гістоморфологічних досліджень, імплантат ПВФ+AuNP (12,06 мкг/г) має хорошу біосумісність і не викликає негативних запальних реакцій у вигляді гострого запального процесу. Виявлені запальні реакції в тканинах, що оточують імплантат, були представлені переважно слабкою розсіяною лімфоцитарною інфільтрацією поблизу імплантантів, тоді як у віддалених ділянках по відношенню до імплантантів вони були відсутні. Найчастіше запальна реакція мала місце на 10-ту добу з тенденцією до зниження на 30-ту добу.

Перебування імплантату ПВФ+AuNP (12,06 мкг/г) у склеральному мішку, тканинах орбіти та під шкірою призводило до поступового заміщення їх волокнистою сполучною тканиною. При цьому було показано відсутність в оточуючих тканинах макрофагальної реакції, у тому числі гігантських багатоядерних клітин (т. зв. клітин розсмоктування), що свідчить проти резорбції імплантату.

Заключення. Таким чином, за рівнем регенераційних процесів в тесті *in vitro* ефективності заростання подряпини серед досліджених експериментальних зразків гідрогелів найбільш ефективним виявився гідрогель ПВФ+AuNP (12,06 мкг/г) (показник закриття «рани» 91%).

В дослідженнях *in vivo* локальних ефектів після імплантації гідрогелю ПВФ+AuNP (12,06 мкг/г) в склеральний мішок, тканини орбіти та під шкіру холки дослідних тварин показано помірний набряк ділянки післяопераційного шва та прилеглої кон'юнктиви, який швидко минає. За результатами гістоморфологічних досліджень особливостями реакції тканин орбіти і холки кролів на гідрогелевий імплантат є відсутність його резорбції та гострих запальних процесів оточуючих тканин.

Виконаний комплекс досліджень регенераційних процесів *in vitro* та *in vivo* під впливом експериментальних зразків синтетичних гідрогелевих імплантантів на основі полівінілформалю свідчить про високу біосумісність гідрогелю ПВФ+AuNP (12,06 мкг/г) та його перспективність в якості імплантаційного матеріалу.

Література

- Бігун НМ, Малецький АП. Результати реконструктивних операцій на орбіті та окуло орбітальної ділянки за допомогою розроблених імплантів (полімерно-композиційний і сітчатий поліуретан). Матеріали науч.-практ. конф. «Лютневі зустрічі з офтальмології» 3-4 лютого 2021 р. 5-7
- Bordbar-Khiabani A, Gasik M. Smart hydrogels for advanced drug delivery systems. *Int J Mol Sci.* 2022 Mar 27;23(7):3665. doi: 10.3390/ijms23073665.
- Clasky AJ, Watchorn JD, Chen PZ, Gu FX. From prevention to diagnosis and treatment: Biomedical applications of metal nanoparticle-hydrogel composites. *Acta Biomater.* 2021 Mar 1;122:1-25. doi: 10.1016/j.actbio.2020.12.030.
- Chugh H, Sood D, Chandra I, Tomar V, Dhawan G, Chandra R. Role of gold and silver nanoparticles in cancer nano-medicine. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 2018;46(sup1):1210-1220. doi: 10.1080/21691401.2018.1449118.
- Crezee J, Franken NAP, Oei AL. Hyperthermia-based anti-cancer treatments. *Cancers (Basel).* 2021 Mar 12;13(6):1240. doi: 10.3390/cancers13061240.
- Darweesh RS, Ayoub NM, Nazzal S. Gold nanoparticles and angiogenesis: molecular mechanisms and biomedical applications. *Int J Nanomedicine.* 2019 Sep 19;14:7643-7663. doi: 10.2147/IJN.S223941.
- Grant SA, Zhu J, Gootee J, Snider CL, Bellrichard M, Grant DA. Gold Nanoparticle-Collagen Gels for Soft Tissue Augmentation. *Tissue Eng Part A.* 2018 Jul;24(13-14):1091-1098. doi: 10.1089/ten.TEA.2017.0385.
- Habib LA, Yoon MK. Patient specific implants in orbital reconstruction: A pilot study. *Am J Ophthalmol Case Rep.* 2021 Oct 19;24:101222. doi: 10.1016/j.ajoc.2021.101222.
- Heo DN, Ko WK, Bae MS, Lee JB, Lee DW, Byun W, et al. Enhanced bone regeneration with a gold nanoparticle-hydrogel complex. *J Mater Chem B.* 2014; 2, 1584-1593. doi: 10.1039/c3tb21246g.
- Ho TC, Chang CC, Chan HP, Chung TW, Shu CW, Chuang KP, et al. Hydrogels: Properties and applications in biomedicine. *Molecules.* 2022 May 2;27(9):2902. doi: 10.3390/molecules27092902.
- ISO 10993-12, ISO 10993-12:2012 Biological evaluation of medical devices — Part 12: Sample preparation and reference materials, 2014 (2014).
- Jafari M, Paknejad Z, Rad MR, Motamedian SR, Eghbal MJ, Nadjmi N, et al. Polymeric scaffolds in tissue engineering: a literature review. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2017 Feb;105(2):431-459. doi: 10.1002/jbm.b.33547.
- Kim B, Lee JS. Thermally reversible shape transformation of nano-patterned PNIPAAm hydrogel. *Polym Bull.* 2021;78: 3353-3361. doi:10.1007/s00289-020-03276-3.
- Li H, Pan S, Xia P, Chang Y, Fu C, Kong W, et al. Advances in the application of gold nanoparticles in bone tissue engineering. *J Biol Eng.* 2020 May 6;14:14. doi: 10.1186/s13036-020-00236-3.
- Lee D, Heo DN, Nah HR, Lee SJ, Ko WK, Lee JS, et al. Injectable hydrogel composite containing modified gold nanoparticles: implication in bone tissue regeneration. *Int J Nanomedicine.* 2018 Nov 1;13:7019-7031. doi: 10.2147/IJN.S185715.
- Liang CC, Park AY, Guan JL. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc.* 2007;2(2):329-33. doi: 10.1038/nprot.2007.30.
- Memic A, Alhadrami HA, Hussain MA, Aldahri M, Al Nowaiser F, Al-Hazmi F, et al. Hydrogels 2.0: improved properties with nanomaterial composites for biomedical applications. *Biomed Mater.* 2015 Dec 23;11(1):014104. doi: 10.1088/1748-6041/11/1/014104.
- Pinho RA, Haupenthal DPS, Fauser PE, Thirupathi A, Silveira PCL. Gold nanoparticle-based therapy for muscle inflammation and oxidative stress. *J Inflamm Res.* 2022 May 31;15:3219-3234. doi: 10.2147/JIR.S327292.
- Ratemi E. 5-pH-responsive polymers for drug delivery applications. In: Makhoulf ASH, Abu-Thabit NY, editors. Woodhead publishing series in biomaterials, stimuli responsive polymeric nanocarriers for drug delivery applications, V.1. Woodhead Publishing; 2018. p.121-141. doi: 10.1016/B978-0-08-101997-9.00005-9.
- Rodriguez LG, Wu X, Guan JL. Wound-healing assay. *Methods Mol Biol.* 2005;294:23-9. doi: 10.1385/1-59259-860-9:023.
- Samchenko YuM, Dybkova SM, Maletskyi AP, Kernenenko LO, Artiomo OV, Gruzina TG, et al. In vitro and in vivo study of the biocompatibility and adjacent soft tissue response to synthetic polyvinylformal hydrogel implant. *Oftalmol Zh.* 2024; 110:45-51. doi: 10.31288/oftalmolzh202434551.
- Samchenko YuM, Dybkova SM, Reznichenko LS, Kernenenko LO, Gruzina TG, Poltoratska TP, et al. Synthesis and study on antimicrobial properties of hydrogel materials for maxillo-facial Surgery. *Him Fiz Tehnol Poverhni.* 2024;15:110-118. doi:10.15407/hftp15.01.110.
- Suarez-Arnedo A, Torres Figueroa F, Clavijo C, Arbeláez P, Cruz JC, Muñoz-Camargo C. An image J plugin for the high throughput image analysis of in vitro scratch wound healing assays. *PLoS One.* 2020 Jul 28;15(7):e0232565. doi: 10.1371/journal.pone.0232565.
- Tan HL, Teow SY, Pushpamalar J. Application of metal nanoparticle-hydrogel composites in tissue regeneration. *Bioengineering.* 2019; 6(1):17. doi: 10.3390/bioengineering6010017.
- Xian S, Webber MJ. Temperature-responsive supramolecular hydrogels. *J Mater Chem B.* 2020;8: 9197-9211. doi: 10.1039/d0tb01814g.
- Yesildag C, Zhang Z, Ren F, Vicente GD, Lensen MC. Nano- and micro-patterning of gold nanoparticles on PEG-based hydrogels for controlling cell adhesion. In: Seehra MS, Bristow AD, editors. Noble and precious metals - properties, nanoscale effects and applications. 2018. doi: 10.5772/intechopen.71548.
- Wu Y, Wang H, Gao F, Xu Z, Dai F, Liu W. An injectable supramolecular polymer nanocomposite hydrogel for prevention of breast cancer recurrence with theranostic and mammo-plastic functions. *Adv Funct Mater.* 2018;28(21):1801000. doi: 10.1002/adfm.201801000.

Відомості про авторів та розкриття інформації

Авторський внесок Самченко Ю.М. – концепція та дизайн дослідження, збирання літературних даних та аналіз, підготовка й написання рукопису; Малецький А.П. – концепція та дизайн дослідження; Дибкова С.М. – концепція та дизайн дослідження, оцінювання регенераційного потенціалу зразків гідрогелів *in vitro* та *in vivo*; Грузина Т.Г. – оцінювання регенераційного потенціалу зразків гідрогелів *in vitro* та *in vivo*; Резнічен-

ко Л.С., Подольська В.І. – оцінювання регенераційного потенціалу зразків гідрогелів *in vitro*; Л.О.Керносенко, Полторацька Т.П. – синтез і характеристика гідрогелів; Артьомов О.В. – гістологічні дослідження; Жолобак Н.М. – культивування клітин Vero, оцінювання регенераційного потенціалу зразків гідрогелів *in vitro*; Колесніченко В.Г. – дослідження термостійкості гідрогелів та інтерпретація термограм. Усі автори узгодили результати та схвалили остаточний варіант рукопису.

Відмови від відповідальності: погляди, висловлені в поданій статті, є власними, та не є офіційною позицією установи.

Джерела підтримки. Дослідження виконано в рамках конкурсу «Наука для безпеки і сталого розвитку України» Національного фонду досліджень України за проектом № 2021.01/0178.

Декларація про конфлікт інтересів. Усі автори не мають жодного реального чи потенційного конфлікту інтересів (фінансові, персональні, професійні й інші інтереси), які могли б вплинути на думку стосовно предмету чи матеріалів, описаних та обговорених в даному рукопису.

Заява про доступність даних. Всі дані, отримані або проаналізовані під час цього дослідження, включені в цю опубліковану статтю.

Список скорочень. ПВС – полівініловий спирт, ПВФ – полівінілформаль, НІПА – полі-N-ізопропілакриламід, AuNP – наночастки золота, СЕМ – сканувальна електронна мікроскопія, НКТР – нижня критична температура розчинення, ДСК – диференціальна скануюча калориметрія, ТГА – термогравіметричний аналіз, ДТГ – диференційна термогравіметрія, гідрогель ПВФ – гідрогель на основі полівінілформалю, гідрогель ПВФ+AuNP – гідрогель на основі полівінілформалю з інкорпорованими наночастками золота, гідрогель ПВФ, просочений НІПА – гідрогель на основі полівінілформалю, просочений полі-N-ізопропілакриламідом МкАТ – моноклональні антитіла; БТ – брахітерапія.

Надійшла 07.02.2025