

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ТЕХНОЛОГІЙ ТА ДИЗАЙНУ

Факультет хімічних та біофармацевтичних технологій
Кафедра біотехнології, шкіри та хутра

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

на тему:

«Розроблення схеми стерилізації біополімерної основи для препаратів
комбінованої дії в лікуванні раневих поверхонь»

Рівень вищої освіти другий (магістерський)

Спеціальність 162 Біотехнології та біоінженерія

Освітня програма Біотехнологія високомолекулярних сполук

Виконала: студентка групи МгБТ-22

Маслак В.І.

Науковий керівник: к.б.н., доц. Юнгін О.С.

Рецензент: к.т.н., доц. Охмат О.А.

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ТЕХНОЛОГІЙ ТА ДИЗАЙНУ

Факультет	<u>хімічних та біофармацевтичних технологій</u>
Кафедра	<u>біотехнології, шкіри та хутра</u>
Рівень вищої освіти	<u>другий (магістерський)</u>
Спеціальність	<u>162 Біотехнології та біоінженерія</u>
Освітня програма	<u>Біотехнологія високомолекулярних сполук</u>

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри БШХ

«__» _____ 2023 р.

ЗАВДАННЯ
НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ СТУДЕНТУ
Маслак Валерії Ігорівні

1. Тема кваліфікаційної роботи: **Розроблення схеми стерилізації біополімерної основи для препаратів комбінованої дії в лікуванні раневих поверхонь**
Науковий керівник роботи Юнгін Ольга Сергіївна, к.б.н., доц.
затверджені наказом КНУТД від «__» _____ 2023 року № ____
2. Вихідні дані до кваліфікаційної роботи: завдання на кваліфікаційну роботу; наукова література щодо колагену як біополімерної основи, технологічна схема стерилізації; матеріали науково-дослідної та переддипломної практик.
3. Зміст кваліфікаційної роботи: вступ, огляд літератури, об'єкт, мета та методи дослідження, експериментальна частина, висновки, список використаних джерел, додатки.
4. Дата видачі завдання _____

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ з/п	Назва етапу кваліфікаційної роботи (проєкту)	Орієнтовний терміни виконання	Примітка про виконання
1	Вступ	12.04.2023	
2	Розділ 1. Огляд літератури	12.04.2023	
3	Розділ 2. Об'єкт, мета та методи дослідження	06.09.2023	
4	Розділ 3. Експериментальна частина	06.09.2023	
5	Висновки	19.10.2023	
6	Оформлення (чистовий варіант)		
7	Подача кваліфікаційної роботи (проєкту) науковому керівнику для відгуку (за 14 днів до захисту)		
8	Подача кваліфікаційної роботи (проєкту) для рецензування (за 12 днів до захисту)		
9	Перевірка кваліфікаційної роботи (проєкту) на наявність ознак плагіату (за 10 днів до захисту)		
10	Подання кваліфікаційної роботи (проєкту) на підпис завідувачу кафедри (за 7 днів до захисту)		

З завданням ознайомлений:

Студентка _____ Валерія МАСЛАК

Науковий керівник роботи _____ Ольга ЮНГІН

АНОТАЦІЯ

Маслак В.І. Розроблення схеми стерилізації біополімерної основи для препаратів комбінованої дії в лікуванні раневих поверхонь – Рукопис.

Кваліфікаційна робота за спеціальністю 162 – Біотехнології та біоінженерія.
– Київський національний університет технологій та дизайну, Київ, 2023 рік.

Кваліфікаційну роботу присвячено розробці найкращої схеми стерилізації колагену, в якості біополімерної основи для створення препаратів комбінованої дії при лікуванні раневих поверхонь. Робота охоплює ретельний аналіз різних методів стерилізації з метою визначення оптимальної технології.

У роботі представлено схему оптимальної стерилізації, а також обґрунтування вибору цієї схеми. Крім того, досліджено антибактеріальну активність колагенової основи, що допомагає забезпечити її відмінну ефективність у лікуванні раневих дефектів.

Кваліфікаційна робота також включає методику отримання гелевого колагену, який є ключовим компонентом препаратів, а також створення схеми стерилізації, що дозволяє зберегти всі корисні властивості цього матеріалу.

Ключові слова: колаген, біополімерна основа, діаліз, стерилізація, хлороформ, антибактеріальна дія, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus.

ABSTRACT

Maslak V.I. Development of a biopolymer base sterilization scheme for combined preparations in the treatment of wound surfaces. – Manuscript.

Qualification thesis work in specialty 162 – Biotechnology and bioengineering. – Kyiv National University of Technologies and Design, Kyiv, 2023.

The qualification thesis is dedicated to the development of the optimal sterilization scheme for collagen as a biopolymeric base for creating combination therapy preparations in wound surface treatment. The work encompasses a thorough analysis of various sterilization methods with the aim of determining the optimal technology.

In the thesis, an optimal sterilization scheme is presented, along with a rationale for its selection. Additionally, the antibacterial activity of the collagen base is investigated, which helps ensure its outstanding effectiveness in the treatment of wound defects.

The thesis also includes a methodology for obtaining gelatin collagen, a key component of the preparations, as well as the creation of a sterilization scheme that preserves all the beneficial properties of this material.

Keywords: collagen, biopolymeric base, dialysis, sterilization, chloroform, antibacterial action, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus.

ЗМІСТ

ВСТУП	7
РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	12
1.1 Біополімери та їх застосування	12
1.2 Загальні відомості про колаген.....	17
1.2.1 Роль колагену в ранозагоювальному процесі	21
1.2.2 Форми колагену для лікування раневих поверхонь	24
1.2.3 Отримання колагену з колагенвмісних відходів	31
1.3 Стерилізація як етап виробництва медичних матеріалів	35
1.3.1 Види стерилізації біополімерів, їх переваги та недоліки	39
1.4 Мікроорганізми-контамінанти препаратів на колагеновій основі	46
Висновки до розділу 1	52
РОЗДІЛ 2 ОБ'ЄКТ, МЕТА ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	53
2.1 Характеристика об'єкта дослідження.....	53
2.2 Характеристика біологічного агента.....	53
2.3 Методи проведення дослідження	53
2.3.1 Колоїдний діаліз	54
2.3.2 Механічна фільтрація.....	54
2.3.3 Стерилізація хлороформом	54
2.4 Дослідження антибактеріальної активності.....	55
2.4.1 Аналіз метаболічної активності та прикріплення клітин за допомогою МТТ-тесту	55
2.5 Характеристика колагенової основи з антимікробної складовою розробленого препарату для лікування ран	56
2.6 Статистичний аналіз	57
Висновки до розділу 2	57
РОЗДІЛ 3 ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА	58
3.1 Обґрунтування способу підбору методу стерилізації	58
3.2 Отримання колагеновихгелів за допомогою методу діалізу.....	58

3.3 Стерилізація гелевого колагену за допомогою механічної фільтрації	Ошибка!
Закладка не определена.	58
3.4 Стерилізація гелевого колагену за допомогою хлороформу	Ошибка!
Закладка не определена.	59
3.5 Контроль стерильності колагену на стадії отримання	Ошибка!
Закладка не определена.	59
3.6 Аналіз антибактеріальної активності стерильного колагену за допомогою фотометрії.....	Ошибка!
Закладка не определена.	63
Висновки до розділу 3	64
ВИСНОВКИ	65
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	66
ДОДАТКИ	

ВСТУП

Колагени є найпоширенішими білками в організмі ссавців (30% від загальної маси білка). З моменту відкриття колагену II типу, Міллером і Матукасом (1969) було знайдено 26 нових типів колагену, і їх відкриття було прискорено завдяки молекулярній біології та клонуванню генів. Було опубліковано кілька оглядів, присвячених колагенам, що дають нові уявлення про їх структуру і біологічну роль [1].

Колагенові білки є основною складовою частиною всіх позаклітинних матриксів. Традиційно колагену приписувалася структурна роль. Однак за останні 10 років стало очевидним, що колаген містить великий гетерогенний клас молекул. Одні з них мають структурні властивості, класично приписувані «колагену», але інші мають ще й додаткові.

Хребетні тварини містять щонайменше 15 різних типів колагену. Вони знаходяться в унікальних тканинспецифічних структурах, виникають під час розвитку у визначених часових і просторових схемах і мають різні функціональні властивості. Також показано, що колагени прямо або опосередковано беруть участь у прикріпленні та диференціюванні клітин, є хемотаксичними агентами, антигенами в імунопатологічних процесах, а також дефектним компонентом при певних патологічних станах. Таким чином, окрім структурної ролі, колагени потенційно мають численні функції розвитку та фізіологічні функції, багато з яких залишаються не з'ясованими [2].

Оскільки колаген можна отримувати у великих кількостях, його широко вивчали як природний матеріал у галузі тканинної інженерії та медицині. Це структурний білок, і його основна функція полягає у забезпеченні механічної цілісності різних тканин та органів, таких як сухожилля, кістки тощо. У кровоносних судинах, структура яких є дуже своєрідною та складною з механічної точки зору, колаген відіграє фундаментальну роль. Таким чином, колаген значною мірою досліджується як можливий кандидат для дизайну каркаса, здатного імітувати природну структуру судин [3].

Матеріали на основі колагену застосовуються в медицині вже багато років.

Вони мають ряд переваг, таких як біосумісність, нетоксичність, неантигенність та біодеградабельність. Колагенові ешафоти містять гелеві матриці, мембрани, губчасті матеріали та інші форми, які створюють суто з колагену. Такі ешафоти або каркаси виступають як природні субстрати для адгезії, проліферації та диференціації клітин. Вони також мають здатність відновлюватися *in vitro* в мікрофібрилярну структуру, що імітує природну позаклітинного матриксу (ПКМ, ЕСМ). Тому природно, що ці матеріали розглядаються як ідеальна матриця для тканинної інженерії [4].

Колаген I типу є найпоширенішим типом колагену, що експресується практично у всіх сполучних тканинах. Це основний білок кісток, шкіри, сухожиль, зв'язок, склери, рогівки та кровоносних судин. Колаген I типу становить приблизно 95% від всього колагену, що міститься в кістках, і близько 80% всіх білків, присутніх в кістках [6]. Колаген є цінним біомедичним продуктом, і можливості його отримання з альтернативних джерел є важливим біотехнологічним завданням. Таким чином, наша головна задача віднайти найкращий варіант схеми стерилізації кислотних екстрактів колагену, за якої розвиток мікроорганізмів у гелі стане повністю неможливим.

Актуальність теми визначається рядом важливих факторів у сферах медицини, біотехнології та біоматеріалів. Колаген, як біополімерна основа для препаратів комбінованої дії в лікуванні раневих поверхонь, виробництво якого базується на перероблюванні шкіряної сировини, відіграє критичну роль у багатьох біомедичних сферах включаючи регенеративну медицину, хірургію, косметологію та фармацію. Однак забезпечення стерильності біополімерних основ залишається актуальною проблемою через ризик інфекційних ускладнень при їхньому використанні та контамінації сировини.

Наукова новизна даного дослідження полягає у розробці схеми стерилізації колагену, отриманого з відходів шкіряного виробництва заводу Чинбар. На сьогодні, існує значна кількість різних варіантів стерилізації колагену, однак переважна більшість впливає на структуру колагену, що призводить до часткової зміни його властивостей. В цій роботі було підібрано оптимальний метод, який

забезпечує стерильність та має мінімальний вплив на структуру колагену, що є ключовим для функціональності препаратів на основі цього білка. Також було досліджено властивості простерилізованого колагену, його здатність до взаємодії з клітинами мікроорганізмів, що дасть можливість надалі проводити дослідження щодо використання майбутнього препарату на його основі з біомедичною метою.

Метою роботи є розроблення схеми стерилізації колагену I типу з відходів шкіряного виробництва (золена та знезолена голина).

Для досягнення мети необхідно було вирішити такі **завдання**:

- провести аналіз сучасних методів стерилізації колагену I типу ;
- підбір методу стерилізації колагенової основи для створення препарату для лікування раневих поверхонь;
- оцінка методу стерилізації на виживаність умовно-патогенних модельних мікроорганізмів за умови культивування на стерильній біополімерній основі;
- вивчення можливостей застосування отриманої біополімерної основи в біомедицині;
- описати результати та сформулювати висновки.

Об'єкт дослідження роботи – спосіб отримання стерильного колагену I типу.

Предмет дослідження – схема стерилізації колагену I типу як біополімерної основи для препаратів комбінованої дії, що використовуються для лікування раневих поверхонь.

Методи дослідження, що використані в роботі: спостереження, аналіз, узагальнення, біологічні методи, спектрофотометричні, мікробіологічні, статистичні методи.

Практичне значення отриманих результатів полягає у розробці схеми стерилізації колагену I типу, отриманих з відходів шкіряного виробництва, для подальшого використання з біомедичною метою.

Апробацію наукових результатів здійснено на наукових конференціях: Міжнародна наукова-практична конференція «Topical issues of modern science,

society and education» (8-10 серпня 2021, Харків); XXII Міжнародна конференція студентів, аспірантів та молодих вчених «СУЧАСНІ ПРОБЛЕМИ ХІМІЇ» (19-21 травня 2021, Київ); 87 Міжнародна наукова конференція молодих учених, аспірантів і студентів «Наукові здобутки молоді – вирішенню проблем харчування людства у XXI столітті» (15-16 квітня 2021 р. , м. Київ); 65th International Conference for students of Physics and Natural Sciences Open Readings 2022 (March 15-18, 2022, Vilnius, Lithuania).

Публікації. Результати досліджень опубліковано у фаховому виданні, що входить до Переліку вадань категорії «Б». Біографія опублікованих робіт:

1. **Maslak V.I.**, Kalinichenko O.O., Okhmat O.A., Iungin O.S. Antibiofilm effect of collagen-based material developed for wound dressing. *Вісник проблем біології і медицини*. Випуск 3 (170), 2023. С. 226-229. <https://doi.org/10.29254/2077-4214-2023-3-170-226-229>
2. Ластовецька Л.О., **Маслак В.І.**, Калініченко О.О., Поточилова В. В., Руднева К. Л., Юнгін О.С. Вплив азитроміцину на біоплівки *S. aureus* на прикладі госпітальних ізолятів, виділених з вмісту гнійних ран. *Вісник проблем біології і медицини*. 4 (162) 2021. С.247-250. [10.29254/2077-4214-2021-4-162-247-250](https://doi.org/10.29254/2077-4214-2021-4-162-247-250)
3. Ластовецька Л. О., Калініченко О. О., **Маслак В. І.**, Кудіна С. В., Юнгін О. С. Вплив антибіотиків азитроміцину та хлорамфініколу на формування біоплівок збудників опортуністичних інфекцій // Topical issues of modern science, society and education (August 8-10 2021, Kharkiv). Proceedings of the 1st International scientific and practical conference. SPC —Sci-conf.com.ua. Kharkiv, Ukraine. 2021. – P.193-194.
4. **Маслак В.І.**, Шидловська О.А. Антибактеріальна дія азитроміцину в складі колагенового носія. XXII Міжнародна конференція студентів, аспірантів та молодих вчених «СУЧАСНІ ПРОБЛЕМИ ХІМІЇ» (Київ, 19-21 травня 2021 року). Київ: Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Хімічний факультет, 2021. – С. 70.
5. Ластовецька Л., **Маслак В.**, Стужук А. Екстрагування колагену біомедичного призначення з відходів шкіряного виробництва: матеріали 87 Міжнародної наукової конференції молодих учених, аспірантів і студентів «Наукові здобутки

молоді – вирішенню проблем харчування людства у XXI столітті» (15-16 квітня 2021 р. , м. Київ). Київ: НУХТ. 2021, Ч.1. С. 407.

6. Liudmyla Lastovetska, **Valeriia Maslak**, Olga Iungin. Combined antibiotic therapy carried in collagen matrix for opportunistic pathogens treatment. 65th International Conference for students of Physics and Natural Sciences open Readings 2022, March 15-18, Vilnius, Luthuania. P.345

Структура і обсяг магістерської роботи. Основна частина дипломної магістерської науково-дослідницької роботи викладена на 65 сторінках, і включає три основні розділи та висновки. В роботі представлено список використаних джерел, що налічує 87 найменувань публікацій вітчизняних та зарубіжних дослідників.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Біополімери та їх застосування

Останнім часом зростаючий дослідницький інтерес до сталого навколишнього середовища замінив синтетичні полімери природними біополімерами. Біополімери є складними макромолекулами, складеними з мономерних одиниць, які зв'язані ковалентними зв'язками, утворюючи великі ланцюги. Вони можуть бути поділені на два основних класи: природні та синтетичні:

Природні біополімери отримуються з живих організмів і містить полісахариди, білки, полінуклеотиди, поліефіри. Ці природні матеріали відіграють важливу роль у природних процесах і є ключовими компонентами живих систем.

Полісахариди складаються з мономерних одиниць, які називаються сахарами або вуглеводами та зв'язані глікозидними зв'язками. Найпоширенішими у використанні є: целюлоза, вона має високу міцність і використовується в паперовому виробництві, текстильній промисловості; хітин використовується у медицині та виробництві хірургічних ниток; альгірати вилучають з водоростей і використовуються у фармацевтиці, харчовій промисловості та косметичці як загусник і стабілізатор; гіалуронан є складовою частиною сполучної тканини та має важливість у харчових добавках та косметичних засобах для зволоження шкіри.

Білки є надзвичайно важливим класом біополімерів, що відіграють ключову роль у живих організмах. Вони складаються з послідовності амінокислот і володіють великою різноманітністю функцій. Найчастіше використовуються: інсулін, для лікування діабету, а саме для регулювання рівня цукру в крові; ферменти (наприклад, лізозим та амілаза), застосовуються в харчовій промисловості для покращення харчових продуктів і виробництва алкоголю; колаген для виробництва біоплівки для загоєння ран, а також в харчовій промисловості для виробництва желатину, в косметології; фібриноген, застосовується в медицині для коагуляції крові та у харчовій промисловості для виробництва соусів та густих продуктів; ліпази в медицині для лікування

захворювань жовчного міхура та в харчовій промисловості для розщеплення жирів.

Біополієфіри являють собою цікаву групу полімерів, які виробляються деякими мікроорганізмами та рослинами. Ці матеріали володіють властивостями, що роблять їх привабливими альтернативами пластмасам, але при цьому не завдають шкоди навколишньому середовищу.

Основною особливістю біополієфірів є наявність у їхніх молекулярних ланцюгах функціональних груп. Важливо зазначити, що більшість біополієфірів є водонепроникними, що дозволяє їм знайти застосування в різних галузях.

До найвідоміших природних полієфірів належать полімолочна кислота (PLA), полігідроксіалканоати (PHA) та полікапролактон (PCL). Ці матеріали використовуються для виробництва екологічно стійких продуктів у різних галузях, включаючи пакування, медицину та інженерію [79].

Синтетичні біополімери, навпаки, створюються шляхом синтезу макромолекул із біомолекулярних компонентів. Ці матеріали можуть бути класифіковані за способом їх отримання, включаючи реакції полімеризації, додавання та конденсації.

Біокомпозитні матеріали є результатом поєднання двох або більше біоматеріалів, які разом мають унікальні властивості, відмінні від характеристик окремих компонентів. Це відкриває широкі можливості для створення нових матеріалів з покращеними характеристиками.

Біорозкладність та інші властивості біополімерів сильно залежать від їх структури. Властивості полімеру можна розділити на три основні класи: внутрішні, які властиві самому полімеру; властивості обробки, які стосуються поведінки матеріалу під час формування; властивості готового продукту визначаються комбінацією внутрішніх характеристик та технологічних властивостей матеріалу.

Біополімери здобувають велику популярність в медичній сфері, де вони знаходять застосування в різних галузях, таких як системи доставки ліків, створення хірургічних імплантів, продуктів для загоєння ран і тканинної регенерації. Їхні плівкоутворюючі та бар'єрні властивості роблять їх ідеальними для використання у сфері харчових контейнерів, ґрунтоутримуючих плівок,

сільськогосподарських покривів, мішків для відходів та в якості пакувальних матеріалів загалом.

Застосування біополімерів розповсюджується й на інші сфери, включаючи автомобілебудування, управління небезпечними відходами, виробництво паперу та розробку нових будівельних матеріалів. Важливою особливістю біополімерів є їхні пористі властивості, які розширюють область можливих застосувань. Пористі матеріали, виготовлені з біополімерів, відзначені біосумісністю та здатністю до біологічного розкладання, викликають особливий інтерес в медичній, косметичній, фармацевтичній та інших галузях.

Зокрема, вони знаходять застосування у створенні тривимірних каркасів для тканинної інженерії, у розробці екологічно чистого «зеленого» пакування, як матриці для доставки лікарських засобів, а також у виробництві екологічно безпечних ізоляційних матеріалів. Це лише кілька із безлічі застосувань, де біополімери виявляють свою важливу роль і сприяють створенню екологічно стійких та інноваційних продуктів.

Таким чином, біополімери є різноманітними та важливими класами матеріалів, які використовуються в різних сферах, включаючи біотехнології та промисловість, завдяки їхнім унікальним властивостям та можливостям.

Біополімери, які піддаються природному розкладанню, мають широкий спектр застосувань у сфері медицини. Основні області, в яких вони використовуються, включають системи доставки ліків, засоби для заживлення ран і хірургічні імпланти. Зараз велика увага приділяється розвитку біополімерних систем доставки лікарських засобів, особливо у сфері контрольованої доставки. Незаперечно важливим аспектом є можливість регулювання доставки ліків всередину організму за допомогою біорозкладних капсул. Ці біорозкладні полімери дозволяють створювати нові форми медикаментів, причому великою перевагою є їхня здатність ефективно проникати через слизову оболонку, що робить їх ідеальними для точної доставки ліків у внутрішні середовища організму.

З численних визначень що до біоматеріалів, особливий інтерес представляють ті, що застосовуються в регенеративній медицині трьома авторами.

У 1987 році Вільямс визначив біоматеріал як «речовину або комбінацію речовин, за винятком лікарських засобів, які мають природне або синтетичне походження і можуть бути використані протягом певного періоду часу, щоб збільшити або замінити будь-яку тканину, орган або функцію всередині організму».

Пізніше, у 1992 році, Блек визначив цей термін як «матеріал природного походження або вироблений людиною, який використовується для заміни, або щоб управляти функціями тканин людського тіла». Згодом біоматеріал був визначений як «матеріал, призначений для ремонту або відновлення функцій біологічної дефектної системи».

У тканинній інженерії біоматеріали, що використовуються для регенерації клітин, у поєднанні з клітинами та факторами росту, називаються скаффолдами.

Скаффолд — це полімерна матриця, що розкладається і біологічно поглинається, основна функція якої полягає в тому, щоб слугувати якірною платформою для адгезії клітин, що забезпечує їхній ріст. Інші функції полягають у транспортуванні, зберіганні та вивільненні факторів росту, а також у стимулюванні специфічних клітинних реакцій (що сприяють структурній та механічній цілісності окремої ділянки). Крім того, скаффолди повинні мати специфічні властивості й відповідати певним умовам:

1. Біосумісність: Це найважливіша властивість для цих 3D-структур (матриць) для використання в якості скаффолдів. Біосумісність належить здатності матеріалу успішно взаємодіяти з навколишнім середовищем (в цьому випадку - тканиною), що його оточує, не завдаючи йому шкоди. Однак, оскільки практично неможливо знайти матеріал, який буде повністю інертним, щоб вважатися біосумісним, він повинен залишатися в прийнятних межах сумісності. Крім того, з точки зору біологічного розкладання, похідні продукти повинні бути нетоксичними.
2. Біорозкладність: Ці матриці повинні біологічно розкладатися та абсорбуватися, але швидкість деградації повинна бути подібною до швидкості регенерації та розростання утвореної тканини.
3. Пористість: Матриці повинні мати пористі простори, щоб забезпечити

місце для клітин, а також активні фактори, що сприяють біопровідності сформованої тканини. Залежно від типу клітин, що захищаються, ідеальний розмір пор коливається від 40 до 150 або від 200 до 400 мкм.

4. Механічна стійкість: Матриці повинні мати відповідну механічну стійкість, щоб виконувати роль опорних конструкцій протягом періоду, необхідного для росту тканин. Крім того, риштування повинні належати до групи в'язкопружних матеріалів.

На додаток до цих властивостей, є й інші, які є корисними для використання 3D-матриць як скафолдів: висока питома поверхня (щоб забезпечити високу щільність клітин) і слабка антигенність (не викликає відторгнення, тобто імунної відповіді в тканинах).

Ці характеристики впливають на клітинну активність, оскільки, як уже згадувалося, задовільні властивості сприяють гарному росту клітин всередині скафолду. Незалежно від застосування, необхідно вибрати відповідну сировину з оптимальною внутрішньою структурою (всередині скафолду), яка позитивно впливає на активність і ріст клітин. Таким чином, скафолди можуть бути природними або синтетичними, але вони повинні зберігати свої специфічні властивості протягом усього часу роботи. Цікаво, що синтетичні полімери в цей час є найбільш поширеними, оскільки з ними кінцеві властивості скафолдів можна легко вибрати та контролювати; однак, більшість синтетичних полімерів мають недолік — вони є токсичними або, скоріше, не біосумісними. З цієї причини найпривабливішими варіантами є ті, що базуються на білках і полісахаридах, таких як колаген, фібрин, еластин, альгінат і хітозан.

Кожен з них може мати багато структур, подібних до біологічних, але колаген представлений як найкраще рішення, оскільки він вирішує всі можливі проблеми з біосумісністю [60].

Вчені сьогодні активно досліджують способи використання колагену в тканинній інженерії. Наприклад, в Кембридзькому центрі медичних матеріалів досліджується особливе розташування колагену для використання в якості біоактивної вставки. Структура, відома як «колагеновий ешафот», являє собою 3D-

пористу мережу колагену, через яку клітини можуть проникати і виконувати свої регенеративні функції, а отже, при використанні на рану, колаген дозволяє свіжій тканині гомогенно відкладатися вздовж пошкодженої тканини. Як тільки регенерація відбулася, колагеновий ешафот здатний деградувати, щоб залишити тільки відновлену тканину [5].

У 2009 році була надрукована 3D конструкція шкіри людини, що містила колаген I разом з фібробластами та кератиноцитами, і стала першою успішною спробою створення шкірного імплантату. Далі були інші дослідження, випробування їх *in situ* на свинячій моделі. Дослідження показали, що такі шкірні імплантати, значно посилюють повторну епітелізацію рани порівняно з контрольними методами лікування. Колагенові біоніки зараз є найпопулярнішим матеріалом для 3D-інженерії, через їх біосумісність та низьку імуногенність. Колаген I є найбільш поширеним типом, та використовується в лабораторному біопринтингу шкіри, кісток, хрящів, серцево-судинних тканин, печінки, регенерації нервів та рогівки з обмеженим тестуванням, проведеним *in vitro* і *in vivo* (моделі дрібних тварин) [20, 21]. Ключовою проблемою є необхідність специфічного рН і температури для ініціювання матричного гелеутворення, яке може бути токсичним для клітин. Додаткові проблеми включають точну деталізацію тканин, та нездатність підтримувати такі функції, як терморегуляцію [22,23].

1.2 Загальні відомості про колаген

Незважаючи на те, що колаген є однією з найкраще вивчених молекул, залишається багато питань щодо його фізіології, про що свідчить велика кількість погано вивчених розладів, пов'язаних з виробленням і деградацією колагену, включаючи генетичні захворювання, такі як недосконалий остеогенез (хвороби крихких кісток) та метафізарна анадисплазія, а також запальні розлади, такі як артрит і пародонтит. З точки зору своєї тимчасової та просторово контрольованої самозбірки, колаген є захоплюючою молекулою, яка проходить багато точних, але не до кінця зрозумілих переходів від початкового продукту трансляції до кінцевого зрілого волокна. Крім того, кісткова тканина безперервно ремоделюється, що

наголошує на важливості регульованої деградації колагену, а також інших компонентів позаклітинного матриксу [80].

В організмі людини колаген становить третину всього білка, три чверті сухої маси шкіри і є найбільш поширеним компонентом позаклітинного матриксу. Двадцять вісім різних типів колагену, що складаються з щонайменше 46 різних поліпептидних ланцюгів, були ідентифіковані у хребетних, а багато інших білків містять колагенові домени. Примітно, що неушкоджений колаген був виявлений в м'яких тканинах скам'янілих кісток 68-мільйонної скам'янілості *Tyrannosaurus rex*, ймовірно на сьогодні це найстаріший виявлений білок [7].

Фібрилярні колагени є найбільш поширеними колагенами у хребетних тварин, де вони відіграють структурну роль, сприяючи молекулярній архітектурі, формі та механічним властивостям тканин, таким як міцність на розрив у шкірі та стійкість до розтягування у зв'язках. Деякі колагени, які колись називали «другорядними», мають вирішальне значення для цілісності тканин, попри те, що вони присутні в дуже малих кількостях. Колаген IX типу становить 1% колагену в суглобовому хрящі дорослої людини, а колаген VII, який має вирішальне значення для цілісності шкіри, становить лише близько 0,001% від загальної кількості колагену в шкірі.

Надлишок колагену відкладається в позаклітинному матриксі під час фіброзу, а фібрилогенез є новою мішенню для обмеження фіброзу шляхом блокування телопептид-опосередкованих взаємодій молекул колагену. Колагени більше не обмежуються потрійною спіраллю, стрічковими фібрилами або структурною та каркасною роллю. Як стверджує Хайнс, для позаклітинного матриксу, колагени не є «просто красивими фібрилами», вони взаємодіють з клітинами через кілька рецепторів, і їх роль в регуляції клітинного росту, диференціації та міграції через зв'язування їх рецепторів добре задокументована [1].

Колаген I типу широко зустрічається у всьому природному світі. Він є основним компонентом позаклітинного матриксу в більшості сполучних тканин. У ньому проявляється характерна ієрархічна структура. Первинна структура

пептидних ланцюгів складається з повторюваної послідовності $(\text{Gly-X-Y})_n$. Кожне третє місце займає гліцин, X зазвичай пролін і Y - гідроксипролін. Три ланцюги α переплітаються та утворюють потрійну спіраль, яка може бути організована в фібрили, а потім у волокна. Структури стабілізуються міжмолекулярними водневими й ковалентними зв'язками, а також іонними, гідрофобними та електростатичними взаємодіями між бічними залишками амінокислот [4].

Колаген I типу є гетеротримерною молекулою. У більшості випадків він складається з двох ланцюгів $\alpha 1$ і одного ланцюга $\alpha 2$, хоча гомотример $\alpha 1$ існує як другорядна форма. Кожен ланцюг складається з більш ніж 1000 амінокислот, а довжина молекули колагену I типу становить ~ 300 нм, ширина - близько 1-5 нм. Він має три домени: N-кінцевий не потрійний спіральний домен (N-телопептид), центральний потрійний спіральний домен та C-кінцевий не потрійний спіральний домен (C-телопептид), з яких центральний домен є найбільшим, складаючи приблизно 95% від загальної молекули. Потрійний спіральний домен можливий лише завдяки присутності гліцину (G)-X-Y повторів, де X часто є проліном, а Y - гідроксипроліном. Гліцин у кожній третій позиції необхідний для правильного формування структури.

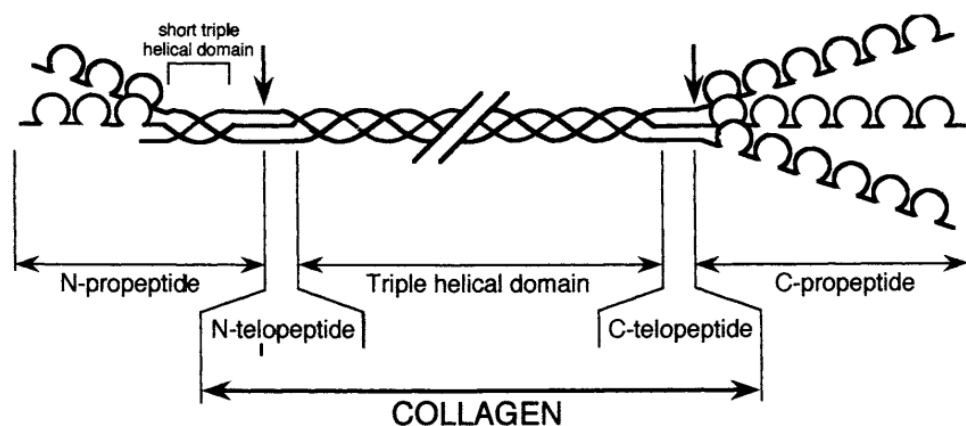


Рис. 1.2 Схематичне зображення молекули колагену I типу [5]

Колаген I типу переважно модифікується на посттрансляційному рівні. Деякі з цих посттрансляційних модифікацій (ПТМ) генеруються під час синтезу колагенових фібрил і є важливими для механічної компетентності цих фібрил [80].

Інші процеси ПТМ, такі як ізомеризація, рацемізація, ферментативна глікація (ферментативне розщеплення), виникають як функція біологічних змін, а кінцеві продукти виявляються дуже важливими як біомаркери різних аспектів захворювань. ПТМ, що накопичуються під час синтезу колагенових фібрил, широко вивчені. Залишки проліну в третьому положенні G-X-Y повторів гідроксильовані в більшості ланцюгів, тоді як в деяких випадках залишки проліну в другому положенні також гідроксильовані, і ці гідроксилювання виявилися важливими для стабільності спіралі [81, 82].

Критичним фактором у синтезі біомеханічно компетентної колагенової фібрили I типу є гідроксилювання залишків лізину, яких у ланцюзі $\alpha 1$ налічується 38, а в ланцюзі $\alpha 2$ - 31. Ступінь гідроксилювання цих залишків сильно залежить від тканини і коливається від 15% до 90%, причому рівень відображає як функцію тканини, так і в деяких випадках патологічні зміни. Після секреції потрійних спіралей N- і C-кінцеві пептиди та пропептиди видаляються шляхом ферментативного розщеплення за участю матриксних металопротеїназ (ММП) [83]. Після розщеплення лізини та гідроксилізини в деяких позиціях, включаючи C-кінцеву, зшиваються між окремими спіралями, що призводить до утворення розгалужених ковалентних внутрішньо- та міжмолекулярних зшивок, які мають вирішальне значення для механічної компетентності колагенових фібрил [84].

На додаток до цих ПТМ, деякі з гідроксилізинів у колагені I типу глікозилюються, хоча точний ступінь глікозилювання дуже варіабельний, на який впливають численні аспекти, такі як тип тканини та патології.

Деякі типи колагену експресуються повсюдно, тоді як інші мають більш обмежене поширення. Кожен з них має певну функцію, або набір функцій, і відбувається широка взаємодія з іншими компонентами сполучної тканини. Ці взаємодії в поєднанні зі складною природою біосинтезу колагену призводять до надзвичайно чутливої до мутацій біологічної системи. Клінічні фенотипи, що виникають в результаті мутацій колагену, різноманітні за своїми проявами і ступенем тяжкості. Оскільки тип I є найбільш поширеним і широко вираженим колагеном, він є і найкраще вивченим, про його мутації відомо найбільше.

Були описані процеси ПТМ, що виникають спонтанно внаслідок старіння, хвороби або обох цих факторів, і охоплюють рацемізацію або ізомеризацію залишків аспартату та аспарагінових залишків, а також неферментативне глікування, що призводить до утворення просунутих кінцевих продуктів глікування (AGEs). У колагені I типу описано накопичення AGEs в залежності від віку, підвищеного рівня глюкози в крові або обох факторів. Найбільш вивченим з цих AGEs є пентозидин. Пентозидин утворюється шляхом конденсації глюкози та доступних аміногруп аргініну, або лізину, що призводить до утворення дуже стабільного зшивання між колагеновими ланцюгами [85]. Додавання зшивок AGE до колагенових волокон змінює їх механічні властивості. Дослідження показали підвищену жорсткість тканин, що містять AGE-модифіковані колагенові волокна I типу, тим самим ілюструючи негативний характер [86].

У кістковому обміні вивчено природні ПТМ, що виникають внаслідок ізомеризації або рацемізації залишків аспартату або аспарагіну з α - у β -форми. Зокрема, було показано, що β -форма аспартату, розташована в C-телопептиді, чітко відображає кістковий обмін. Молекули, що пригнічують кістковий обмін, призводять до накопичення цієї ПТМ, тоді як патології, що прискорюють кістковий обмін, знижують рівень β -форми і підвищують рівень α -форми. Подальші дослідження показують, що накопичення β -форми призводить до більш жорсткої структури колагену і, отже, вносить жорсткість у кістку. Припускають, що ця жорсткість негативно впливає на механічні властивості кісткового матриксу [87].

Таким чином, колаген I типу містить численні ПТМ, більшість з яких є важливими для функціональності фібрил. Однак старіння та деякі патології можуть призводити до появи ПТМ, які є шкідливими для колагену і потенційно можуть слугувати біомаркерами захворювань.

1.2.1 Роль колагену в ранозагоювальному процесі

Шкіра, найбільший орган людського тіла, який захищає від зараження мікробами, особливо під час травм.

Колаген, що лежить в основі судинних ендотеліальних клітин, зазвичай

залишається недоторканим від впливу крові. Але після травми кров потрапляє безпосередньо поруч із субендотеліальними структурами, які містять значну кількість колагену. Ця особливість розміщення колагену робить його ідеальним активатором гемостазу в умовах травми. Колаген відіграє ключову роль у провокуванні реакції тромбоцитів після травматичних подразників. Під впливом кровотоку тромбоцити швидко прилягають до колагену, активуються, розпочинають розповсюдження і сприяють утворенню згортання крові. Цей важливий процес забезпечує ефективний гемостаз та запобігає надмірним втратам крові після ушкоджень тканин та судин.

Таким чином, колаген виконує важливу роль у забезпеченні тромбоцитарного гемостазу після травми та є важливим фактором в збереженні цілості судинної системи.

Ранозагоювальний механізм обов'язковий для відновлення втраченої тканини і підтримки гомеостазу тканин. Утворення нової тканини — це складний процес, який поділяється на чотири етапи: запалення, ангіогенез (утворення кровоносних судин), грануляційне утворення тканин, повторна епітелізація та реконструкція ЕСМ [9].

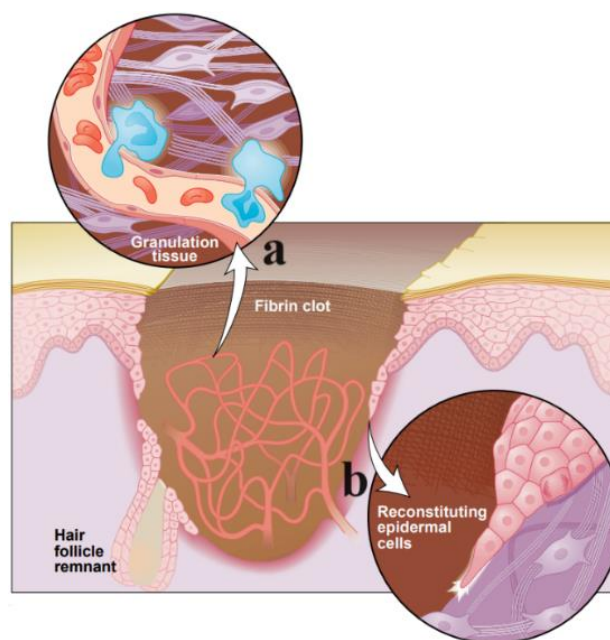


Рис. 1.2.1 Ілюстрація ключових елементів у загоєнні ран. Стрілочкою (а) показано фібриновий згусток, інфільтрований запальними клітинами,

фібробласти та щільним капілярним сплетінням нової грануляційної тканини, який тимчасово закриває відкриту рану; стрілочкою (b) показаний передній край мігруючого кератиноцита клітини, що може проникати за межі зрізаної базальної пластинки, а також через тимчасовий матрикс і здорову дерму [9].

У рані, під час процесу загоєння, колагени синтезуються клітинами, такими як фібробласти, та модифікуються у складні морфології. Тип, кількість і організація колагену змінюється в рані та визначає міцність розтягнення загоєної шкіри. Колаген III типу першим синтезується на ранніх стадіях загоєння ран та замінюється колагеном I типу, який є домінуючим в шкірі. Початкове випадкове осадження колагену під час формування грануляційної тканини додатково посилюється ковалентним зшиванням, індукованим ферментом лізілоксидазою. Саме цей процес складає колаген у складні структури, які здатні переорієнтуватись для відновлення міцності розтягнення. Реконструкція колагену триває протягом декількох місяців після закриття рани, і міцність розтягнення відновленої тканини збільшується приблизно до 80–85% нормальної тканини, якщо всі процеси протікають без будь-яких проблем [10].

Ключові етапи процесу загоєння ран, такі як гемостаз, запалення та ангіогенез, реагують на позаклітинний матрикс (ЕСМ), колаген та його сполуки. У відповідь на травму колаген індукує активацію та агрегацію тромбоцитів, що призводить до відкладення фібринового згустку у місці ушкодження. На запальній стадії загоєння ран активація імунних клітин призводить до секреції прозапальних цитокінів, які впливають на міграцію фіброblastів, епітеліальних та ендотеліальних клітин. Фібробласти сприяють відкладенню колагену. Одночасно деградація колагену вивільняє фрагменти, що сприяють проліферації фіброblastів та синтезу факторів росту, які призводять до ангіогенезу та реепітелізації. Нарешті, реконструкція ЕСМ (баланс синтезу нової матриці та дегративної діяльності матриці металопротеїнази) визначає придбання міцності розтягування [11,12]. Колаген, що застосовується як допоміжна терапія при загоєнні ран, може потенційно сприяти загоєнню, діючи як: приманка для бурхливих MMP (матричні

металопептидази або матриксини) та інших ферментів у рані, тим самим зменшуючи запалення та повертаючи прогрес у репаративну стадію; субстрат, що сприяє міграції ключових клітинних компонентів загоєння ран; або промотор протизапального середовища для усунення травм під час загоєння.

1.2.2 Форми колагену для лікування раневих поверхонь

Існує безліч препаратів колагену у вигляді аморфних гелів, листових або порошкових форм у поєднанні із додатковими допоміжними речовинами (наприклад альгірати для підсилення роботи колагену; срібло як антимікробний агент). Тверді частинки або порошкоподібний колаген мають мінімальне ковалентне зшивання і активні при введенні в якості сигнальних молекул, а губкова версія колагену була протестована як безклітинний матрикс, та сприяла утворенню нових тканин [13,14].

Колагенові пов'язки для ран містять основу, змішану з природними та синтетичними полімерами, такими як гіалуронова кислота, еластин та фіброїн шовку, альгінат, хітозан та ін. До них також додають добавки, такі як інсулін, антибіотики або наночастинки золота та тестують в основному в дослідженнях *in vitro* або на невеликих моделях ран. Хоча повідомляється про позитивні результати, проте надійна оцінка конкретної роботоспроможності цих пов'язок має бути більше досліджена у масштабних, стандартизованих клінічних дослідженнях. Оскільки отримані результати досліджень, були обмежені невеликими розмірами ран та змішаною хронічною рановою етіологією [15].

Людський колаген, отриманий за допомогою рослинних систем синтезу (рекомбінантний людський колаген, розроблений, наприклад, у тютюні) має подібні властивості рихтування із людським колагеном дикого типу [16]. Дослідження у 2013 році такого колагену при хронічних виразках різної етіології продемонструвало, що продукт безпечний для використання і сприяє швидкому загоєнню рани [17]. Відкриття колагеноподібних білків, Sc11 і Sc12 з *Streptococcus pyogenes* призвело до створення необхідних конструкцій в рекомбінантній системі кишкової палички, щоб встановити великомасштабні методи виробництва.

Колагени, отримані з бактерій, служать чудовим біосинтетичним підходом, де колагеном не тваринного походження, без специфічної біоактивності, можна маніпулювати для бажаних взаємодій [18].

Також колаген можна виділяти із морських організмів, таких як медузи, кальмари, губки та шкіра риб. Морське джерело колагену є корисним, оскільки велика кількість матеріалу, який зазвичай вважається «відходами» в рибопереробній промисловості, може бути перероблений у колаген, він має високу біорозкладаність і біосумісність та низьку імуногенність. Наразі продовжуються дослідження його використання, оскільки проведені на моделях тварин експерименти дали доволі гарні результати, та підкреслили потенціал для загоєння ран [19].

Наноколаген — відносно новий матеріал, який виготовляється з колагену, зменшеного до розміру наночастинки. Цей нанорозмір забезпечує більш високе співвідношення площі поверхні до об'єму. Наночастинки колагену були протестовані для застосування в якості терапевтичних систем доставки ліків і це є їх ключовою перевагою, оскільки цей матеріал є стабільним та сумісним з тканинами у мікросередовищі ран [24]. В одній дослідницькій роботі вивчалися зразки, армовані наноколагеновими волокнами (NCFR), які дозволяють рівномірно розподіляти та організовувати волокна. Ліофілізований колаген, зокрема, здатний створювати стійкі до руйнування зразки NCFR з еластичними властивостями, що робить його корисним для тканинної інженерії. Щільність і величезний розмір наноколагенових волокон збільшують міжфазну площу матриці зразків NCFR, дозволяючи їм витримувати навантаження на розтяг 500 мН з роздільною здатністю навантаження 50 нН. Однією з технік, яка використовується для створення наноколагену, є електроспінінг. Це процес, за допомогою якого електростатичне поле використовується для формування нановолокон із полімерних розчинів. Це широко використовуваний метод, завдяки його доступності та універсальності у виробництві каркасів для тканинної інженерії, створюючи нанофібрилярні матриці, що нагадують нативний ЕСМ. Отриманий каркас має високе співвідношення площі поверхні до об'єму та високу пористість,

що є ідеальними каркасами для росту клітин та механічної підтримки.

Альтернативою шкірним замінникам можуть бути пов'язки з порошкоподібним колагеном або порошком нанокولاгену. Колагенові пов'язки корисні для загоєння ран на шкірі, оскільки вони, перш за все, є основним позаклітинним матриксом і мають низьку швидкість біодеградації, що робить їх ідеальними для прискорення загоєння ран шляхом збільшення прикріплення клітин і міграції до місця рани. Колаген у порошкоподібній формі також має свої індивідуальні переваги для загоєння ран шкіри, оскільки частинки порошку можуть краще прикріплювати та покривати тріщини ран, таким чином, створюючи активний центр для зв'язування фібронектину та росту фібробластів.

Окрім колагенових порошоків, колагенові нановолокна також можуть сприяти загоєнню ран на шкірі. Оскільки колаген є надзвичайно податливим білком, його можна виробляти в різні форми, однією з яких є нановолокна. Одним із методів, за допомогою якого можна виготовити колагенові нановолокна, є електропрядіння. Електропрядіння може призвести до вирівнювання волокон в одну структуру або створити випадкові, обидва мають різне призначення в тканинній інженерії. Електропрядені колагенові волокна вважаються кращими порівняно з іншими полімерними нановолокнами завдяки тому, що колаген присутній в основному в позаклітинному матриксі. Структура колагенових нановолокон також дуже нагадує природну структуру нативних тканин, з низькою імуногенністю та хорошою біосумісністю. Кілька досліджень показали, що використання колагенових нановолокон індукує проліферацію та диференціювання кератиноцитів і збільшує епітелізацію, а також відкладення колагену та грануляцію, що є важливими факторами для сприяння загоєнню ран шкіри [71].

Колагенові піни являють собою біомедичний матеріал, що широко використовується у сфері медицини для обробки та загоєння різних видів ран. У процесі виробництва колагенових пін до колагену додаються інші речовини з метою створити піну, яка має стабільну структуру та може зберігати вологу. Основні компоненти, які використовуються, включають розсіювачі для рівномірного розподілу колагену, стабілізатори, що допомагають зберегти

структуру піни, та вологозберігаючі речовини, які сприяють створенню вологого середовища рані для покращення процесів загоєння.

Після створення колагенової піни, вона пакується в індивідуальні пакування та піддається стерилізації з метою запобігання можливим інфекціям при використанні на рані пацієнта.

Застосування колагенових пін розповсюджене у лікуванні різних видів ран, включаючи хронічні виразки, діабетичні виразки на ногах, венозні виразки та рани після хірургічних втручань. Ці піни сприяють процесам зцілення рани, надаючи підтримку для росту клітин та створюючи ідеальне вологе середовище.

Гідролізований колаген – нативний колаген що денатурований і гідролізований кислотою, лугом або термічною обробкою для отримання низькомолекулярних пептидів, з унікальними фізико-хімічними та біологічними властивостями в порівнянні з нативною формою. Після денатурації потрібна спіральна структура нативного колагену змінюється на випадкову форму спіралі внаслідок дисоціації водневих зв'язків, коли колаген зазнає гідролізу. Ця обробка може розірвати зв'язки в поліпептидному ланцюзі для отримання великої кількості пептидів. Молекулярна маса пептидів колагену, отриманих в результаті гідролізу, дуже низька (3-6 кДа) в порівнянні з молекулярною масою його попередника нативного колагену (285-300 кДа). Ферментативний гідроліз впливає не тільки на розмір пептидів, але і на фізико-хімічні та біологічні властивості. Гідролізований колаген діє в дермі у двох різних формах: при першій дії вільні амінокислоти забезпечують будівельні блоки для формування колагенових і еластинових волокон. При другій дії колагенові олігопептиди діють як ліганди, зв'язуючись з рецепторами на мембрані фібробластів і стимулюючи вироблення нового колагену, еластину і гіалуронової кислоти.

У порівнянні з нативним колагеном, гідролізований має головну перевагу — він має більш високу розчинність, крім того, його екстракція проста і не вимагає багатоетапної процедури. Однак такий колаген не може утворювати каркаси сам по собі через низьку молекулярну масу пептидів, але його можна змішувати з іншими біополімерами, такими як целюлоза та хітозан.

Плівки, приготовані із суміші целюлози та гідролізованого колагену, продемонстрували хорошу прозорість, поглинання ультрафіолетового випромінювання та чудову підтримку адгезії та проліферації клітин. Висока біосумісність диктує, що плівки матимуть перспективне застосування в галузі біоматеріалів. Розробка такого біоматеріалу може бути корисною для лікування захворювань кісток і суглобів через низьку молекулярну масу та амінокислотний склад. Він є більш біодоступним і індукує кращу остеоінтеграцію, сприяючи синтезу колагену.

Альтернативними біоматеріалами з гідролізованим колагеном є губки хітозану. Вони отримані за методом золь-гель переходу, що демонструє пористу морфологію, покращену біостабільність, хорошу водопоглинаючу здатність, чудову біосумісність та антимікробну активність [72].

Гідрогелі мають антибактеріальну активність проти кишкової палички та золотистого стафілокока, сприяють проліферації клітин і міграції, та загоєнню опіків [25].

Колагенові гелі, це перспективні матриці для доставлення ліків і тканинної інженерії. Вони в'язко-еластичні, тобто напівтверді в стані спокою, але можуть бути текучими під напругою (наприклад, видавлювання зі шприца). Крім того, вони демонструють хорошу сумісність клітин та тканин, і, таким чином, не повинні заважати нормальному функціонуванню на ділянці і системно.

Що стосується доставлення ліків, можна легко уявити собі застосування, при якому колаген плюс активна речовина вводяться в ділянку тканини, що цікавить, а потім агент вивільняється контрольованим чином. Найбільш легкодоступними формами таких ін'єкційних колагенових гелів є ін'єкційні суспензії колагенових волокон і нефібрилярні, в'язкі розчини у водних середовищах. Низькомолекулярні препарати і терапевтичні білки можна змішувати з фібрилярними суспензіями або в'язкими розчинами. Колагенові гелі також використовуються як каркаси в тканинній інженерії, а також як матриці доставки клітин і генів у генній терапії [73].

М'які біоматеріали, насичені живими клітинами, називаються біочорнилами.

Основою колагенових біочорнил є колагеновий гідрогель, фізичні властивості якого відображають його придатність до друку. Зараз існує два основних методи створення тканинно-інженерних конструкцій – біодрук *in vitro* і біодрук *in situ*. У разі біодруку *in vitro* друк дизайну здійснюється в лабораторних умовах. Після друку конструкцію або імплантують лабораторній тварині, або культивують протягом певного періоду для вивчення клітинної поведінки. У разі біодруку *in situ* друк проводиться безпосередньо на дефектній ділянці лабораторної тварини.

У дослідженні [75], використовувався лазерний біопринтер для створення біологічної конструкції на поверхні опорного каркаса, який був виготовлений із децелюляризованого дермального матриксу (Matriderm). Процес 3D-друку включав два етапи. Спочатку було надруковано 20 шарів фібробластів (конкретно, мишачих NIH 3T3 клітин), а потім було надруковано 20 шарів кератиноцитів (людських HaCaT клітин), які були вбудовані у гідрогель колагену (з концентрацією 3 мг/мл). В результаті цього процесу була створена двошарова біологічна конструкція, яка мімікувала структуру шкіри, включаючи дерму та епідерміс. Через 10 днів культивування клітин всередині цієї конструкції було виявлено наявність конексину 43 в епідермісі. Конексин 43 є білком, який грає важливу роль у створенні щільних з'єднань між клітинами, що є важливим для функціонування епідермісу шкіри.

Отже, це дослідження показало успішну можливість створення шкірної структури за допомогою 3D-друку клітин у гідрогель колагену на опорному каркасі децелюляризованого дермального матриксу.

Дослідження 2019 року [76] продемонструвало потенціал використання висококонцентрованого гідрогелю колагену I типу для біодруку серцевих клапанів. Крім колагену, біочорнило містило щурячі МСК. За допомогою цього біочорнила вченим вдалося надрукувати колагенові диски товщиною 1 мм і діаметром 28 мм на суспензії FRESH. Після видалення суспензії надруковані структури підшкірно імплантували щурам. Імплантовані зразки екстрагували через 2, 4, 8 та 12 місяців з подальшим вивченням їх механічних властивостей, оцінкою клітинної інфільтрації та визначенням рівнів експресії специфічних інфляційних маркерів. Профіль

кривих вказував на те, що каркаси перейшли через фази резорбції (розчинення, певна частина матеріалу починає руйнуватись), синтезу (організм починає створювати новий матеріал для заміни того, що було втрачено на попередньому етапі, починається вироблення нових клітин), стабілізації (система намагається досягти рівноваги і підтримати стабільність внутрішньої структури або каркасу), та в кінцевому етапі ремоделювання (система вирівнює і оптимізує структуру або каркас, щоб вона відповідала поточним потребам організму).

Також не менш цікавими є колагенові губки, які створюються шляхом ліофілізації розчинів колагену і являють собою пористі тривимірні структури. Перед процесом ліофілізації, розмір і структуру пор можна корегувати, змінюючи концентрацію рН розчину, температуру або швидкість заморожування. Пориста природа колагенових губок забезпечує кращу проліферацію клітин, ніж колагенові гелі. Спосіб формування клітинно-губчастих структур включає нанесення суміші клітинно-колагенового гелю на поверхню колагенової губки типу I. Експериментальні дані свідчать, що ці структури поліпшують біомеханічні властивості та прискорюють процеси загоєння при відновленні сухожилля в рамках дослідження на моделі сухожилля надколінка кролика.

Використання цих конструкцій в ремонтних операціях відзначається покращенням процедури завдяки їхній значно більшій жорсткості і вмісту колагену, який перевищує колишні гелеві каркаси в 10 разів. Ці конструкції дозволяють суттєво покращити процес відновлення сухожилля надколінка кролика під час навантажень в умовах живої моделі порівняно з використанням лише гель-губчастого композиту. Результати цього дослідження особливо обнадійливі, оскільки вперше було досягнуто відновлення жорсткості сухожилля надколінка, що відповідає нормальним показникам при пікових навантаженнях *in vivo* [74].

Стандартними джерелами колагену за походженням, як правило є: бичачий, кінський, пташиний або свинячий. Існують суттєві недоліки, пов'язані з використанням колагенових препаратів на основі тварин, включаючи розвиток алергічних реакцій, передачу пріонних захворювань (наприклад, губчастоподібної енцефалопатії великої рогатої худоби) та мікробне забруднення. Крім того, в

деяких громадах існують релігійні обмеження, пов'язані з використанням тканини, отриманої з великої рогатої худоби та свиней. Оскільки були розглянуті альтернативні природні та інженерні джерела колагену, наразі ми маємо можливості заміни у виробництві різного роду лікувальних форм. Проте як зазначалося, колаген з морських продуктів видобувається саме з відходів рибопереробної промисловості, тим самим значно зменшуючи відсоток забруднення навколишнього середовища. У світі існує чимала кількість підприємств що займаються виготовленням натуральних шкір, та зрозуміло що вони також мають великий відсоток відходів, які немає можливості повторно або додатково використовувати. Такі недублені зразки як міздря та голина є колагеновмісними, і це дає змогу у великих масштабах перероблювати такого роду відходи та добувати колаген, який після можна буде використовувати головним чином в медицині.

1.2.3 Отримання колагену з колагеновмісних відходів

Шкури тварин здебільшого є побічним продуктом м'ясного виробництва, у шкіряному виробництві головними відходами є обрізки та фрагменти що залишаються в ході підготовки вихідного матеріалу. Вони також поділяються за стадіями приготування, як попередньо дублені та ні, що має значення у процесі утилізації. Після хімічних обробок вивозити залишки виробництва на побутові звалища категорично заборонено, оскільки це створює антропогенне забруднення навколишнього середовища. Проте масштабне накопичення таких відходів на складах підприємств призводить до утворення вогнища інфекцій, що згодом стає джерелом для різного роду шкідників та є порушенням санітарно-гігієнічних умов. Тому необхідно щоб такі матеріали своєчасно утилізувались, або ж їх відправляли на вторинне перероблення, оскільки вони насичені колагеном та жирами, і можуть бути основою для важливих видів продукції.

Існують істотні відмінності в шкурах різних тварин, найголовніше у складі та структурі. Наприклад, шкури овець мають високий вміст жиру, тоді як у великої рогатої худоби та кіз — менший вміст жиру. Можуть бути відмінності в складі

колагену, зокрема в кількості гідроксипроліну. Розташування колагенових фібрил також помітно варіюється серед видів, так, наприклад велика рогата худоба та кози мають більш рівне розташування, на відміну від свиней та овець. Ці відмінності впливають на процес екстракції [26].

Процес екстракції колагену залежить від вихідного матеріалу, зазвичай це: міздря після зоління, голинна обрізь після зоління та знезолювання.

Необхідно видалити всю неколагенну речовину та відновити колаген як кінцевий продукт. Процес відновлення, як правило, включає попередню обробку тканини, екстракцію колагену і подальше очищення. Для відновлення шкіри використовують миття шляхом замочування в холодній воді протягом декількох днів, замінюючи воду кожні кілька годин. Далі шкіру розрізають на більш керовані невеликі шматочки. Попередня обробка призначена для розриву ковалентних міжмолекулярних зшивок між молекулами колагену. У природних умовах ці зшивання полегшують структурно-механічні функції колагену в тканинах і органах. Ці зшивання руйнуються дуже повільно навіть в окропі, тому для їх розриву використовуються різні м'які хімічні обробки. Розведені кислоти і луги зазвичай використовуються для часткового гідролізу колагену, вони розщеплюють зшивання, залишаючи при цьому колагенові ланцюги недоторканими. Деякі ферменти також можуть бути використані для етапу попередньої обробки.

Для попередньої обробки кислотою вимиті і подрібнені шматочки шкіри занурюють в розведену кислоту при контрольованій температурі. Кислота пронизує шкіру, змушуючи її набухати від двох до трьох разів більше початкового об'єму і гідролізує зшивання. Попередня обробка кислотою підходить для відносно тендітних структур, які мають менший ступінь переплетення волокон.

Колаген найчастіше витягується зі шкіри шляхом гідролізу за участю кислот або лугів. Як неорганічні, так і органічні кислоти можуть ефективно розщеплювати зв'язки в колагені, щоб забезпечити екстракцію фібрил. У кислих умовах молекули колагену мають позитивні зміни, а виникаюча електростатична сила відштовхування між ними полегшує молекулярне розділення [27]. Зазвичай використовуються органічні кислоти, такі як оцтова, хлороцтова, лимонна і

молочна кислоти, вони більш ефективні для розщеплення та призводять до високого виходу екстракції. Як тільки колаген стає солюбілізованим, його осаджують з розчину найчастіше солями [28].

Екстракт колагену зазвичай містить нейтральні солі і неколагенові білки, тому з нього можна очистити колаген для отримання колагенових фракцій з різною молекулярною масою. Процеси очищення використовують кілька етапів, які можуть включати фільтрацію і центрифугування. Білок-мішень, або небажані білки, можуть випадати в осад з розчину шляхом «засолювання» (додавання до екстракту високої концентрації солі). На засолювання колагену або інших білків у екстракті впливають кілька факторів, включаючи температуру, рН, іонну міцність, використовувану сіль та специфіку залучених білків. Як правило, колаген менш розчинний, ніж забруднюючі білки, і може бути осаджений шляхом засолювання. Осад колагену збирається центрифугуванням. Відновлений осад можна розчинити і піддати другому раунду засолювання. Ця процедура може повторюватися двічі і більше для подальшого очищення [29].

В осадженому колагені міститься велика кількість солі, її видаляють шляхом діалізу. Осаджений колаген поміщають в діалізний мішок і діалізують проти кислого розчину або деіонізованої води. Можуть бути використані різні схеми діалізу, оскільки методи очищення необхідно налаштувати для відновлення колагену певного діапазону молекулярної маси.

Кількість екстрагованого колагену піддається дослідженню на вміст білка та азоту, для перевірки ефективності екстрагування. Для цього використовують спектрофотометрію, біуретовий метод, метод Бредфорд та К'ельдаля. За результатами всіх експериментів найбільшу кількість колагену показали зразки знезоленої голини [28].

Для ідентифікації типу колагену проводиться гель-електрофорез за стандартною методикою. Після, на фінальному етапі підготовки зразків, необхідно відмити розчини колагену від оцтової кислоти, а також методом діалізу проти визначених буферів отримати гелі. Після відмивання різними буферами (NaOH, NaCl 10 %-ий водний розчин, деіонізована вода) було визначено, що саме вода є

найкращим гелеутворювачем [28].

Відомо, що відповідний рН розчину колагену сприяє створенню іонних взаємодій між білковими ланцюгами. Колаген розчиняється при кислому рН, тому впорядковані структури не можуть бути сформовані, оскільки сили взаємодій не працюють на міжспіральній відстані [30]. Отже, нейтралізація колагенового розчину — ще один спосіб виготовлення гелів. Переважна більшість дослідників використовують для досягнення цієї мети різні реагенти, наприклад, гідроксид натрію, карбонат натрію, хлорид натрію, бікарбонат натрію, фосфат натрію. У відповідних умовах процес нейтралізації супроводжується агрегацією і вирівнюванням молекул колагену в фібрили [31].

На попередніх етапах, в рамках досліджень, що проводились на кафедрі біотехнології, шкіри та хутра Київського національного університету технологій та дизайну в рамках наукового проєкту «Розробка комплексного препарату комбінованої дії на основі похідних колагену для лікування раневих поверхонь» 2020-202, номер державної реєстрації 0120U101290 було отримано колагенові гідрогелі для біомедичного застосування, на основі яких був сформований препарат для лікування раневих поверхонь, що містив антимікробну та регенеративну композиції [78].

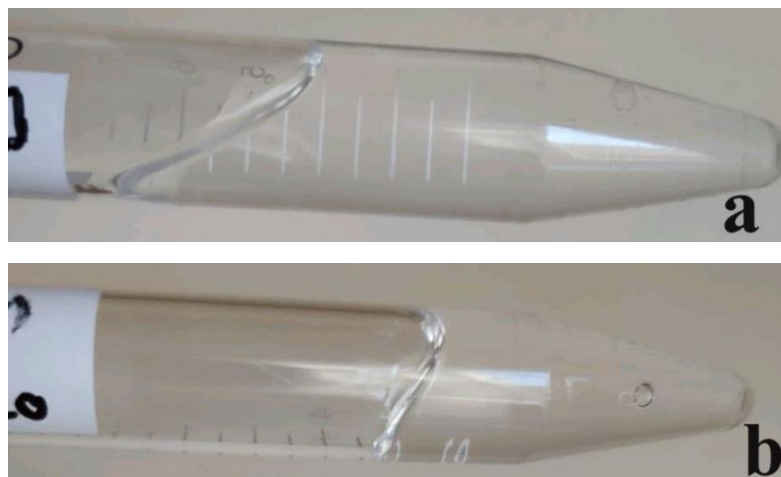


Рис. 1.2.2. Фотографії колагенового гелю. Варіант (а) Гель з зеленої голини; (b) гель зі знезеленої голини [77].

В продовження цього дослідження необхідно було розробити схему стерилізації колагенових гелей як основи препарату для лікування раневих поверхонь.

1.3. Стерилізація як етап виробництва медичних матеріалів

Медичний виріб, що є стерильним, характеризується відсутністю живих мікроорганізмів в його структурі. Навіть медичні вироби, виготовлені відповідно до встановлених стандартів якості в умовах виробництва, зазвичай містять деяку кількість мікроорганізмів до процедури стерилізації. Вони класифікуються як нестерильні. Основною метою стерилізації є інактивація мікробіологічних забруднень та перетворення нестерильних медичних виробів у стерильні, придатні для безпечного використання. Медична стерилізація є набагато ширшою сферою, коли говорять на цю тему, часто використовуються три терміни, і це: стерилізація, дезінфекція та асептика.

Стерильність і асептика належать до різних станів. Стерильність вказує на знищення (загибель) всіх життєздатних форм життя та їх проростаючих елементів, таких як яйця, спори та ендоспори. Стерильність абсолютна, не існує такого поняття, як частково стерильний об'єкт. Асептика, як правило, означає, що лише певні типи форм життя були видалені, виключені або нейтралізовані (стали нежиттєздатними), тоді як присутність інших організмів може допускатися або навіть заохочуватися.

Низький, середній і високий рівні дезінфекції можуть бути отримані в залежності від ефективності стерилізанту, тривалості процесу і здатності запобігати відкладенню нових патогенів на виробі після обробки.

Для будь-якого біоматеріалу дуже важливо витримати ефективну стерилізацію, щоб отримати схвалення регуляторних організацій і безпечно приступити до клінічних випробувань. Забезпечення стерильності мінімізує частоту інфекцій, пов'язаних з медичними виробами, що досі залишається серйозною проблемою в охороні здоров'я. Існує стандартна система приготування біологічних медичних препаратів, що мають відповідати високій

стерильності:

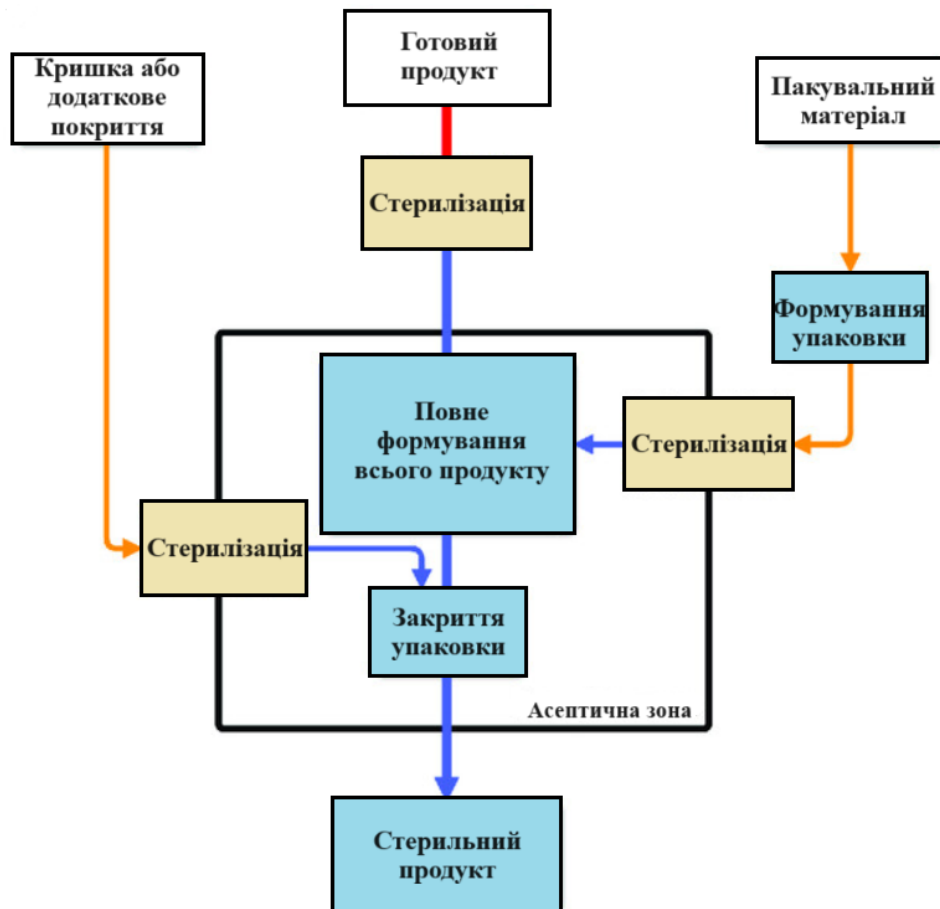


Рис. 1.3 Схема приготування стерильного медичного препарату

При правильному використанні дезінфекція та стерилізація можуть гарантувати безпечне використання інвазивних та неінвазивних медичних виробів. Спосіб дезінфекції та стерилізації залежить від призначення медичного виробу: критичні предмети (контактна стерильна тканина, ушкоджена шкіра) перед використанням повинні бути простерилізовані; напівкритичні предмети (контактні слизові оболонки або неушкоджена шкіра) повинні бути продезінфіковані на високому рівні; некритичні предмети (контактна неушкоджена шкіра) повинні пройти дезінфекцію низького рівня [66].

Термінальні методи стерилізації можуть спричиняти негативний або позитивний вплив на деякі властивості матеріалу (наприклад, розмір, колір, хімічна структура, механічна цілісність та біологічна сумісність). Через складність залучених факторів (наприклад, властивостей матеріалу, стабільності препарату,

умов і параметрів стерилізації) важливо відзначити фактичну неможливість передбачити результат методів стерилізації, щоб визначити набір універсальних правил. Кожна система вимагає тестування в кожному конкретному випадку для вибору найбільш підходящого, ефективного методу, який дозволяє зберегти основні властивості без змін.

Стерилізацію також не слід плутати з очищенням, яке визначається як видалення сторонніх матеріалів, воно зменшує біонавантаження (живі організми) перед стерилізацією, а також для усунення забруднювачів, що походять від виробничих процесів, таких як ріжучі або полірувальні рідини та частинки, агенти для видалення цвілі, допоміжні засоби для обробки полімерів, забруднення повітрям тощо. Це може негативно вплинути на біосумісність пристрою та подальшу обробку, наприклад, на адгезію покриття або зчеплення між двома поверхнями.

В останні кілька десятиліть спостерігається різке зростання розвитку полімерних біоматеріалів. Серед цих біоматеріалів широко використовуються полімерні гідрогелі для інженерних застосувань м'яких тканин завдяки їх гідрофільності, біосумісності та механічним властивостям, що налаштовуються, подібним до властивостей тканинних компонентів тіла. Ці біоматеріали, що мають потенціал для регенерації тканин і органів людського тіла, повинні пройти стерилізацію перед застосуванням. Стерилізація гідрогелів є набагато складнішим завданням через властивості їх м'якої природи, архітектури 3D-мережі та вмісту води.

Термінальна стерилізація композитних біоматеріалів має вирішальне значення для їх використання в ранозагоювальних та тканинно-інженерних пристроях. Для використання гідрогелю в клінічних умовах необхідна термінальна стерилізація, щоб гарантувати безпечність для пацієнта.

Вперше гідрогель як можливий біоматеріал з'явився в 1960 році завдяки піонерській роботі Віхтерле та Ліма, які досліджували полі-2-гідроксиетилметакрилат як синтетичний біосумісний матеріал з потенційним застосуванням в якості контактної лінзи. Відтоді гідрогелі викликають великий

інтерес і знайшли надзвичайно широке застосування, наприклад, у тканинній інженерії, лікуванні ран, виробництві офтальмологічних лінз, сенсорів, покриттів та імплантатів.

Найбільш характерною особливістю цих матеріалів є наявність гідрофільних функціональних груп, прикріплених до полімерної основи, які дозволяють їм поглинати та утримувати значну кількість води. Іншим важливим аспектом є наявність поперечних зв'язків між мережевими ланцюгами, які забезпечують стійкість до розчинення.

Поглиблення знань і посилення контролю над хімією матеріалів та біологічними реакціями дозволило розробити універсальні біоматеріали, які дозволяють досягти прогресу в охороні здоров'я. Однак, попри їхні корисні властивості та видатний потенціал, про що свідчить велика кількість опублікованих робіт, присвячених гідрогелям для біомедичних застосувань, для успішного клінічного застосування все ще існує низка невирішених проблем, які необхідно подолати. Окрім ефективності та біосумісності, мікробіологічна безпека або стерильність є важливою вимогою для будь-якого біоматеріалу, призначеного для тісного контакту з людським тілом. Ефективна стерилізація має вирішальне значення для мінімізації випадків інфекцій, пов'язаних з медичними виробами, які є основною проблемою.

У біомедичній промисловості гідрогелі широко застосовують через відому чутливість цього типу матеріалів до звичайних стерилізуючих агентів, таких як тепло і випромінювання. Присутність води в структурі гідрогелю може сприяти руйнуванню хімічних зв'язків і діяти як промоутер можливих змін у властивостях матеріалу, що впливає на його безпечну роботу. Результат процедур стерилізації є ще більш важливим для комбінованих медичних виробів, таких як системи доставлення ліків, в яких необхідно приділяти увагу цілісності матеріалу і таким факторам, як деградація/стабільність лікарських засобів і зміна профілю вивільнення.

Існує кілька добре відомих методів кінцевої стерилізації біоматеріалів і виробів медичного призначення, які можна згрупувати відповідно до природи

стерилізуючого агента: фізичні, хімічні та фізико-хімічні. Можна розробити процеси стерилізації на основі різних підходів.

1.3.1 Види стерилізації біополімерів, їх переваги та недоліки

Актуальними концепціями сучасного лікування ран є зосередження на їх вологому середовищі. Сьогодні різноманітність видів препаратів для загоєння, представлена на ринку у великих кількостях. Туди входять піни та гелі, плівки, а також різноманітні матеріали, такі як альгірати, поліуретан, гіалуронова кислота чи колаген.

Наприклад, одним з найпопулярніших продуктів є колагенова піна, гнучкий, пористий пінопласт з високою капілярною активністю, основа якого колаген I типу бичачого походження. Було встановлено, що препарат має антиоксидантну активність спорідненість з еластазою, тому здатен зв'язуватись з нею та знижувати її активність *in vitro* [32].

Колаген може поглинати велику кількість рідини та утворювати м'який гель, який зберігає вологим навколишнє середовище рани, та забезпечує гемостатичні властивості. Такі препарати необхідно виробляти та зберігати в асептичних умовах, для запобігання зараженням та появи патогенних мікроорганізмів. Однак навіть при дотриманні асептики, немає повної гарантії що пристрої які використовуються для роботи з колагеном, зазнали повної стерилізації та все ще можуть становити загрозу забруднення.

В ідеалі процедури стерилізації звільняють біоматеріали на основі колагену від усіх життєздатних мікроорганізмів, не викликаючи змін у хімічному складі білків, механічних властивостях та поведінці при деградації. Однак усі методи, що використовуються в цей час, за своєю природою пошкоджують і змінюють колаген таким чином, що це може вплинути на швидкість його абсорбції *in vivo*, механічну міцність або ефективність у поєднанні з лікарськими препаратами. Як альтернатива можлива дорога складна асептична обробка, а препарати розчинного колагену можуть піддаватися стерильній фільтрації.

Вологе тепло не можна використовувати, оскільки автоклавування

призводить до термічної денатурації гідратованого білка. Вищі температури можна застосовувати після ретельного видалення вологи. Однак сухе тепло викликає часткову денатурацію та зшивання одночасно, воно використовується для дегідротермічного зшивання колагену. Таким чином, хоча стерилізація сухим жаром може надати матеріалу прийнятну міцність розтягування або інші фізичні властивості, проте деградація *in vivo* може суттєво змінитись. Денатуровані частини колагену можуть бути сприйнятливішими до неспецифічних протеаз, а абсорбція може прискорюватися зі швидкою втратою міцності розтягування [36].

Загальні методи стерилізації включають вплив високих температур (автоклавування), опромінення (фізична стерилізація: γ - або β -випромінювання) або обробка хімічними речовинами (етанол, етиленоксид). Метою всіх процесів стерилізації є дезактивувати будь-які мікробні забруднення, які можуть бути присутніми в пристроях. Зазвичай це досягається денатурацією білків мікроорганізмів, порушенням їх ферментних систем та руйнуванням основи нуклеїнових кислот. Таким чином, всі ці процедури викликають зміни в біомолекулах та мають серйозний вплив на їх продуктивність. Тому перш ніж вибрати метод стерилізації, вплив на властивості та продуктивність матеріалу, все має бути чітко прописано.

Хімічна стерилізація газами, такими як оксид етилену (EtO), є ще одним варіантом для полімерів, чутливих до тепла та вологи. EtO є безбарвним зрідженим газом, який використовується як стерилізуючий і фунгіцидний засіб у галузі товарів для здоров'я та медицини. Через свою високу токсичність він забезпечує швидку та надійну інактивацію мікробів внаслідок руйнування ферментних систем та основ ДНК. Однак залишки газу в медичному виробі можуть поставити під загрозу його біосумісність.

Тому дуже важливо, щоб продукт зазнавав адекватної дегазації або аерації після стерилізації для зниження концентрації залишкового газу до прийнятного рівня. Оскільки надлишок призводить до збільшення рН і зниження стабільності спіралі, а також зниження активності колагену. Таким чином, обов'язково, щоб вибір конкретного методу стерилізації проводився після ретельного вивчення

можливого впливу методу на матеріал [35].

Для термочутливих продуктів, іонізуюча радіація є альтернативним методом стерилізації. Опромінення з радіонуклідами кобальту-60, цезію-137 або β -частинками (електрони з генератора електронного променя) в дозах 5–50 кГр гарантують стерильність продукту. Однак навіть при мінімальних дозах радіації було виявлено, що опромінення викликає деградацію через розрив ланцюга та зшивання [33]. Полімери сильно відрізняються за своєю взаємодією з іонізуючим випромінюванням, і часто важко передбачити специфічні властивості полімеру в результаті опромінення. Хоча радіаційні реакції в основному дають майже однаковий результат, але існують відмінності між способами дії та різницею часу. Кожна реакція різна через природу джерела радіації. γ -промені мають високопроникаючі з низькою потужністю дози (кГр/год), тоді як β -частинки діють з меншою проникаючою здатністю, але мають значно вищу дозу (кГр/с) [33].

Відомо, що γ -опромінення викликає розриви ланцюга в колагені, що призводить до утворення фракції матеріалу з нижчою молекулярною масою. Ця фрагментація може компенсуватися утворенням нових зшивок поблизу сайтів розщеплення [34]. Однак, ці молекулярні зміни призводять до зниження механічної міцності колагену. Проте це один з найкращих методів, яким користуються багато лабораторій за кордоном.

Попри те, що, наприклад той самий EtO є ефективним стерилізуючим агентом, але досі існують деякі занепокоєння щодо безпечності продуктів його реакції, зокрема етилену та хлоргідрину. Нещодавно оксиду етилену був класифікований як мутаген і канцероген. Це, в свою чергу, призвело до більш суворого регулювання використання цього типу стерилізації. З цих причин був розглянутий альтернативний метод стерилізації: занурення в рідкий розчин надцтової кислоти (РАА), обробка гуанідинами, а також механічна стерилізація методом фільтрації. РАА - це стандартний стерилізуючий засіб, який дуже ефективний проти бактерій, вірусів і спор. Він був дозволений Управлінням з контролю за якістю харчових продуктів і медикаментів, і останнім часом використовується для стерилізації все більшої кількості тканин, таких як кістки,

серцеві клапани, а також медичних біополімерів. Визначною перевагою цієї речовини є низька токсичність, оскільки залишки після стерилізації РАА є природними нешкідливими сполуками, а саме киснем, вуглекислим газом і водою. Відповідно, занепокоєння щодо залишкових реакцій у пацієнтів, а також потенційної небезпеки для персоналу, так і для навколишнього середовища зменшуються. Нещодавно встановили умови, необхідні для стерилізації людської шкіри за допомогою РАА, і оцінили її вплив на біосумісність. Тому цей варіант стерилізації також може бути адаптований для колагену, отриманого з відходів шкіряного виробництва, за рекомендаціями американських лабораторій [45].

Одним з перспективних стерилантів є полігексаметиленгуанідин (ПГМГ), який містить гуанідинову групу, що здатна інактивувати молекули ДНК. Полігексаметиленгуанідин — органічна сполука з катіонним зарядом, що має антимікробну активність широкого спектра дії проти грампозитивних та грамнегативних бактерій та грибів. У порівнянні з іншими дезінфікуючими засобами, такими як диглюконат хлоргексидину, представляє більш високу антимікробну активність проти патогенів ESKAPE (*Enterococcus faecium*, золотистий стафілокок, *Klebsiella pneumoniae*, *Actinobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* і *Enterobacter* виду), які є клінічно важливими мікроорганізмами, стійкими до антибіотиків. ПГМГ показав спорицидну ефективність за низької концентрації проти спор грампозитивних бактерій (концентрації 0,52% за 90 секунд і 0,36% за три хвилини) [52]. Тому він використовується як один з основних компонентів дезінфікуючих засобів, широко рекомендованих для лікарняного та побутового використання, а також у харчовій та лікарській промисловості, завдяки своїм якостям, оскільки немає кольору та запаху.

У високих концентраціях ПГМГ може мати токсичну дію, наприклад, викликати фіброз легенів, при використанні в дезінфікуючих засобах зволожувачів [53]. Інші дослідження показали, що ПГМГ мав нижчий цитотоксичний ефект проти клітин людини, ніж зазвичай використовувані антимікробні агенти, такі як хлоргексидин та четвертинні сполуки амонію. Тому ПГМГ в невисоких

концентраціях можна використати як буфер для відмивання розчину колагену для забезпечення стерилізації.

Метод фільтрації — один варіант стерилізації колагену, заснований на використанні шприцевих фільтрів. Це прекрасний варіант для польових та лабораторних умов, враховуючи їх простоту використання і доступність. Більшість мікрофільтрів виготовлені з синтетичних органічних полімерів, які можуть взаємодіяти з органічними хімічними речовинами.

Мікрофільтрація — це стандартний процес стерилізації в наукових дослідженнях, медичних і промислових застосуваннях. Фільтри з розміром пор $0,1-0,45$ мкм можуть утримувати бактерії, що підтверджується кількісною оцінкою ефективності фільтрації за допомогою покриття. Уявлення про бактерії, які проходять через мембранні фільтри з мікропорами, привернули значну увагу в 1930-х роках [39]. У всіх статтях під «бактеріями, що фільтруються» мається на увазі ті, які можуть проходити через фільтри з розміром пор $0,45$ мкм і більше.

Мембранна фільтрація через пори розміром $0,22$ мкм постійно розглядається та найчастіше використовується як процедура стерильної фільтрації. Однак деякі дослідження показали що водні бактерії, здатні проходити через фільтри з таким розміром пор, тому це знову викликало загальний інтерес до цієї області [40]. Крім того, на сьогодні, немає інформації про бактерії, які проходять через фільтри з розміром пор $0,1$ мкм. Існує публікація про «нанобактерії», в якій начебто такі дрібні частинки проходили через подібний фільтр, однак ніяких експериментальних даних щодо такої фільтрації не наводилося, тому це створило поле для дискусій [41].

Проблема використання таких фільтрів для стерилізації колагену полягає в тому, що під час цього процесу витрачається велика кількість білку. Наприклад при фільтрації фібриногену, зафіксована масова втрата матеріалу, а також зміна розподілу молекулярної маси. Проте для лабораторних досліджень невеликих партій гідролізованого колагену, цей метод можна використовувати.

Діаліз — лабораторний процес, що широко використовується для видалення солі або зниження концентрації солі в розчині. Напівпроникна мембрана

використовується для вмісту цільового білка. Цільовий білок у розчині заливають у діалізну трубку або мішок, закривають чи закріплюють за допомогою спеціальних затискачів, та поміщають у великий контейнер з водою. Сіль у діалізній трубці переміщається від високої концентрації до низької за допомогою пасивної дифузії. Кінцева концентрація солі в білковому розчині є середньозваженим значенням її концентрації, виходячи з обсягів вихідного білкового розчину і води. Безперервний діаліз називається діалізацією, розчин білка розбавляють великою кількістю води, а потім пропускають через пристрій ультрафільтрації для видалення як солей, так і води. Як діалізацію, так і діаліз можна повторити, додаючи відповідно до цільового розчину великої кількості води [42]. Діаліз по суті є дифузійно-контрольованим процесом, повному видаленню діалізованих речовин з мішка буде протидіяти збільшення концентрації цих речовин у зовнішньому середовищі. Основним ефектом перемішування є розсіювання розчиненої речовини по всьому дифузату, що зменшує ефективну концентрацію розчиненої речовини на мембрані і знижує ступінь зворотного потоку.

Під час діалізу, оскільки відбувається обмін між двома речовинами і вода вимиває частини солі проходячи і крізь розчин білку, до буфера можна додати додаткові розчини, які здатні прикріпитись до колагену. Саме тому діаліз є одним з найкращих варіантів стерилізації. Найчастіше для нього використовують хлороформ, в багатьох лабораторіях він вважається найкращим.

Хлороформ був вперше виготовлений у 1831 році, його відкрили незалежно один від одного троє людей у різних країнах. Нова речовина швидко прижилася у медичному застосуванні, особливо для лікування респіраторних захворювань [54].

У дослідженнях 2011 року виявляли антибактеріальну, антиоксидантну та цитотоксичну активність хлороформу з екстрактів *Amaranthus spinosus*. За результатами, було виявлено що екстракт хлороформу показав зону інгібування від 11,5 мм до 14 мм, що вказує на наявність хорошої антибактеріальної активності на посівах граммпозитивних та грамнегативних патогенних бактерій [55].

Ще у 1900-х деякі автори висунули припущення, що можна ідентифікувати

певні віруси шляхом визначення їх чутливості до ефіру або дезоксихолату натрію. Така чутливість вважається груповою ознакою, і має велику користь для початкової класифікації нових неідентифікованих збудників. З ефіром було нелегко працювати, оскільки виникала необхідність розробляти різні варіації цього процесу, змінювати концентрацію, температуру та час впливу. До того ж залишки ефіру було необхідно видаляти шляхом випаровування. Дезоксихолат натрію також мав свої недоліки, пов'язані з тим, що його необхідно було готувати та стерилізувати. В результаті був запропонований хлороформ, як більш ефективна заміна ефіру, оскільки він має більшу полярність як розчинник ліпідів. Він мав додаткові переваги у важкості, тому легко піддавався седиментації. Також було виявлено, що ті агенти, які чутливі до ефіру, також мали чутливість до хлороформу, зі стійкістю аналогічно.

Було виявлено, що десяти хвилинного струшування рідини, що містить хлороформ-вірус, було достатньо, щоб знищити чутливі, але не стійкі агенти. Одразу після струшування рідину зазвичай центрифугували при 400 об/хв протягом 5 хвилин. Потім на дні з'являвся хлороформ, над ним був непрозорий міжфазний шар, покритий прозорим суспензійним середовищем. Останній видаляли і використовували або для інокуляції яйця, тканини, або для гемаглютинації. Відокремлення також можна досягти, дозволивши хлороформу осісти в пробірках, що стоять у штативі. Усі перевірені штами грипу виявилися неінфекційними після того, як нерозбавлену інфіковану лантоїсну рідину збовтували з хлороформом, та супернатант інокулювали у 10 денні яйцеклітини.

Після вдалої стерилізації та отримання умовно придатного для подальших розробок гідролізованого колагену, нам необхідно перевірити його на чистоту. Для цього готують стандартне поживне середовище, розливають у віали по три повторності, після цього додають аліквоту готового білку та поміщають в термостат на необхідний період. Для подвійного контролю стерильності, нам необхідне стерильне середовище зі зразками колагену та середовище без інокуляту. Якщо після посіву у середовищі не з'являється контамінація, значить наш препарат можна вважати чистим. Такий оброблений вірус залишався придатним для

використання в тесті гальмування гемаглютинації. Віруси гемадсорбції також виявилися інактивованими під впливом хлороформу [56].

Також у 2006 році була опублікована стаття, в якій описувалась доцільність використання колагену як основи міконазолу (протигрибкового препарату). Змішуючи ці дві речовини, розчин наносили на смоляні диски та висушували, щоб отримати тонку мембрану, на якій ріст *Candida albicans* майже повністю пригнічувався. Було порівняно протигрибковий ефект цього розчину колагену та гелю міконазолу з гліцерином, в результаті перший варіант мав сильніший протигрибковий ефект. Такий препарат стає вигіднішим ніж комерційно доступний звичайний гель міконазолу [58].

В такому випадку чи буде доцільним створити свіжоприготований розчин з таблетованої форми міконазолу та додати в готовий колагеновий препарат.

1.4 Мікроорганізми-контамінанти препаратів на колагеновій основі

Лікарські засоби займають важливе місце в житті людини з початку часів, це продукти, які повинні бути стерильними мікробіологічно, та дотримуватись належної якості з точки зору здоров'я споживача. Було встановлено, що ці продукти можуть бути заражені мікроорганізмами, які знаходяться у виробничому середовищі або в сировині, особливо воді, і що зараження може відбутися після виробництва через нездорові умови зберігання або під час споживчого використання.

В результаті забруднення лікарських продуктів мікроорганізмами можуть виникнути небажані зміни запаху, кольору, в'язкості та ефективності продукту, пошкоджена шкіра може інфікуватися, ендотоксини та метаболіти, що виробляються мікроорганізмами, можуть викликати потертості, подразнення та алергію на шкірі, і це лише найлегші варіанти негативних симптомів. Такі продукти є придатним середовищем для розвитку мікроорганізмів завдяки матеріалам, що входять до їх складу.

Найпоширенішими контамінантами гідрогелів, як біополімерної основи для препаратів комбінованої дії в лікуванні раневих поверхонь, є бактерії *Pseudomonas*

aeruginosa, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, а також гриби *Aspergillus* та *Penicillium spp.* [58]. Ці мікроорганізми можуть бути присутніми в навколишньому середовищі, на поверхні обладнання або на шкірі працівників. Щоб запобігти біологічному забрудненню медичних виробів, важливо дотримуватися належних гігієнічних практик та використовувати відповідні методи стерилізації.

Pseudomonas aeruginosa є повсюдно поширеним опортуністичним патогеном, який населяє ґрунт і воду, а також середовища, пов'язані з тваринами, людиною та рослинами. Як і інші види бактерій, що зустрічаються в навколишньому середовищі, *P. aeruginosa* колонізує широкий спектр поверхонь у формі біоплівки, що робить клітини непроникними для антибактеріальних агентів, включаючи антисептичні миючі засоби, дезінфікуючі засоби та клінічно значущі антибіотики. Бактерія має мало потреб у харчуванні і може адаптуватися до умов, які не переносяться іншими організмами.

Це грамнегативна паличкоподібна аспорогенна багато-джгутикова бактерія. Вона має перламутровий відтінок та запах винограду чи коржика. *P. aeruginosa* добре зростає при температурі від 25 °С до 37 °С, а її здатність рости при 42 °С допомагає відрізнити її від багатьох інших видів *Pseudomonas*. Вона викликає серйозні інфекції у пацієнтів з ослабленим імунітетом, хворих на рак та пацієнтів, які страждають на тяжкі опіки та муковісцидоз.

Більшість штамів *P. aeruginosa* продукують один або кілька пігментів, у тому числі піоціанін (синьо-зелений), піовердин (жовто-зелений та флуоресцентний) та піорубін (червоно-коричневий).

P. aeruginosa кодує численні фактори вірулентності, які дозволяють викликати різні інфекції людини. Ці бактерії розвинули складну регуляторну мережу для контролю тимчасової та просторової експресії вибраних факторів вірулентності для досягнення максимальної вигоди для виживання бактерій.

Адгезія синьогнійної палички до тканин господаря є важливим раннім етапом інфекції та патогенезу. Незалежно від біотичних або абіотичних поверхонь, *P. aeruginosa* використовує цю властивість для колонізації, розмноження,

подолання сил зсуву навколишнього середовища та отримання поживних речовин. Як правило, щоб прикріпитися до поверхні, патоген використовує специфічні компоненти клітинної поверхні або придатків. Існує принаймні три різні фактори адгезії: фімбрії типу IV, що опосередковують адгезію до епітеліальних клітин-господарів; джгутики, що зв'язуються з муцином на епітеліальних клітинах; та основний ліпоплісахарид, що опосередковує адгезію до регулятора трансмембранної провідності муковісцидозу епітеліальних клітин [57].

Оскільки основним середовищем проживання *P. aeruginosa* є ґрунт і вода, у поєднанні з *Bacillus* spp., *Streptomyces* spp. і цвіллю, вона розвинула стійкість до різноманітних природних антибіотиків. Більш того, *P. aeruginosa* може запозичувати плазмідні, що містять гени резистентності, і здатна переносити ці гени шляхом трансдукції і кон'югації. Таким чином, *P. aeruginosa* за своєю суттю стійка до багатьох антибіотиків, що використовуються в клінічній практиці. В останні роки поява мультирезистентної *P. aeruginosa* була серйозною проблемою громадської охорони здоров'я у всьому світі [62].

Staphylococcus epidermidis - грампозитивний, нерухомий і факультативний анаероб, а також поширена мікробіота шкіри та слизових оболонок. Його велика популяція і повсюдна поширеність роблять його одним з найпоширеніших організмів, що виділяються в клінічних лабораторіях. Він є одним з провідних збудників NBIs (Нозокоміальні інфекції кровотоку), особливо у госпіталізованих пацієнтів з низьким рівнем нейтрофілів та імунокомпрометованою системою, які живуть з внутрішньосудинними пристроями та/або імплантатами. Його поширеність зараз приблизно еквівалентна поширеності *S. aureus* через складні фактори вірулентності, такі як формування біоплівки, резистентних до антибіотиків та зв'язування фібриногену. Відповідно, більшість штамів часто стійкі до декількох антибіотиків.

До групи людей, які мають високу схильність до *S. epidermidis*-асоційованих інфекцій, належать пацієнти, що використовують внутрішньовенні ліки, катетери, серцеві клапани, шунти, та інші штучні пристрої. У найгіршому випадку ці інфекції стають небезпечними для життя, якщо вони потрапляють у кров носія [63].

Staphylococcus aureus - грампозитивна бактерія, є всюдисущим патогеном людини. З моменту свого відкриття в 1880-х роках він був визнаний основним опортуністичним патогеном у людей, відповідальним за різні захворювання, починаючи від незначних шкірних інфекцій до важкої бактеріємії та некрозу. До ери антибіотиків смертність пацієнтів, інфікованих *S. aureus*, перевищувала 80% [64]. Природне місце існування золотистого стафілокока у людини — шкіра і носогорло. Він може викликати широкий спектр інфекцій, що вражають шкіру та м'які тканини, ендovasкулярні осередки та внутрішні органи. Стафілокок продовжує залишатися важливим патогеном у суспільстві та у лікарнях, викликаючи високу захворюваність та смертність. Основними місцями ураження у пацієнтів лікарень є хірургічні рани та постійні медичні пристрої. В останньому випадку бактерії можуть колонізувати імплантований пристрій, викликаючи локальне пошкодження.

Захворювання, спричинене *S. aureus*, як правило, обумовленні двома типами детермінант вірулентності: білками, асоційованими з клітинною поверхнею, та позаклітинними білковими токсинами. Стафілокок експресує безліч білків, асоційованих з клітинною поверхнею, і позаклітинних білків, що беруть участь у патогенезі. Він може експресувати декілька локалізованих на поверхні білків, які зв'язуються з компонентами позаклітинного матриксу, а також компонентами згустків крові та пошкоджених тканин, вони діють як адгезини, сприяючи прикріпленню та колонізації бактерій. Патоген може виражати кілька факторів, що борються із захистом господаря, експресуючи цитолітичні токсини, що ушкоджують мембрани клітин-господарів, та суперантигени, що викликають симптоми токсичного шоку [58].

Escherichia coli є невід'ємною частиною мікрофлори шлунково-кишкового тракту ссавців і птахів, але певні штами були пов'язані з діарейними захворюваннями як у людей, так і у тварин. Як правило, це нешкідливий коменсал, але він може придбати суміш всеосяжних мобільних генетичних елементів, що кодують фактори вірулентності, в кінцевому підсумку ставши патогеном людини, здатним викликати широкий спектр захворювань.

Сальмонели, шигели, клебсієли та ієрсинії – це ще кілька прикладів патогенних форм, які належать до того ж сімейства. Кишкова паличка — рухливий факультативний грамнегативний анаероб. Крім того, вона має джгутики та здатна ферментувати лактозу і глюкозу. Протягом декількох годин або днів після народження ці бактерії колонізують шлунково-кишковий тракт більшості теплокровних тварин. У нормальних умовах виникає симбіотичний зв'язок, оскільки кишкова флора є джерелом вітаміну К (менахінони) та вітамінів В-комплексу. Однак такі фактори, як інфекція або хіміотерапія, можуть порушити баланс середовища існування та сприяти зростанню більш вірулентних видів або зробити коменсал дисфункціональним. Бактерія має кілька факторів вірулентності та токсинів, які сприяють її патогенності. До них належать органа токсичність: головним чином нефротоксичність, шлунково-кишкова токсичність та гепатотоксичність.

За останні кілька десятиліть кишкова паличка продемонструвала гарну здатність збирати гени резистентності шляхом горизонтального перенесення генів, хоча вона сприйнятлива до більшості клінічно значущих антимікробних препаратів, та все одно залишається серйозною проблемою в медицині, та найбільше у ветеринарній практиці [67].

Мікроскопічні гриби є більш еволюційно розвиненими формами мікроорганізмів, які заведено розділяти на дві морфологічні форми: дріжджі та міцеліальні.

Дріжджі являють собою одноклітинні гриби, які розмножуються брунькуванням або поділом. Грибкове забруднення у фармацевтичній продукції становить потенційну небезпеку з двох причин: це може призвести до псування продукту, метаболічна універсальність грибів така, що будь-який рецептурний інгредієнт від простих цукрів до складних ароматичних молекул може піддатися хімічній модифікації в присутності відповідного організму; забруднення продукту становить небезпеку для здоров'я пацієнта, хоча ступінь небезпеки буде варіюватися від продукту до продукту і від пацієнта до пацієнта, залежно від типів і кількості присутніх організмів, шляху введення та стійкості пацієнта до інфекції.

Здатність грибів синтезувати відповідні ферменти, визначає деградативну силу псування продуктів. Фармацевтичні препарати, косметика, та інші продукти знаходяться під загрозою, оскільки гриби універсальні, вони прекрасно адаптуються до умов та здатні синтезувати свої ферменти майже у будь-якому середовищі. Як наслідок, субстрати з низькою молекулярною вагою, такі як амінокислоти, органічні кислоти та гліцерин, розщеплюються первинними катаболічними шляхами. Ферменти для цих шляхів є конститутивними в широкому спектрі грибів. Грибкові забруднення, такі як *Aspergillus* і *Penicillium spp.*, є найбільш поширеним джерелом ферментів протеїнази і пептидази, що викликають розпад таких сполук, як гелатин.

Було підраховано, що близько половини грибів, що знаходяться в навколишньому середовищі, можуть викликати мікоз у людей. З фармацевтичними продуктами двома основними небезпеками є повітря, через вдихання спор (наприклад, через інгалятори), шкіру, через втирання кремів і мазей (багато грибів живуть завдяки кератину, білка, що входить до складу шкіри, волосся і нігтів) [50].

Рід *Penicillium* - один з найпоширеніших грибів, що зустрічається в усьому світі в різноманітних середовищах існування, від ґрунту до рослинності, повітря, приміщень та різних харчових продуктів.

Загалом, види *Penicillium* є строго аеробними, невивагливими до поживних речовин і здатні рости на широкому спектрі фізико-хімічних середовищ, але деякі з них є вузькоспеціалізованими, як плодові патогени (*P. expansum* на яблуках, *P. digitatum* і *P. italicum* на цитрусових), на середовищах з низьким вмістом води (*P. brevicompactum*, *P. chrysogenum*, *P. implicatum*), а також при низькій кількості кисню (*P. roqueforti*). Це швидкозростаючі гриби, що продукують велику кількість екзогенних сухостійних спор, які легко поширюються повітрям. Більшість харчових видів *Penicillium* є психротолерантними, деякі навряд чи здатні рости при 37 °С, але вони переважно мезофільні з оптимальною температурою росту близько 25 °С. *P. chrysogenum* галотолерантний вид, колонії мають оксамитову текстуру і дуже добре ростуть при 30 °С, а також виробляють Рокфортин С, який являє собою мікотоксин з нейротоксичними (паралітичними) властивостями [68]. *Chrysogena* це

єдина група видів, що належать до підроду *Penicillium* і здатні рости при 37 °С [69].

Види *Aspergillus* - це нитчасті гриби, які зазвичай зустрічаються в ґрунті, гниючій рослинності. У людини *Aspergillus fumigatus* є найбільш поширеним і небезпечним для життя грибковим патогеном, що передається повітряним шляхом. Вдихання спор (конідій) у легені може спричинити численні захворювання, які залежать від імунологічного статусу хазяїна у людини. До таких захворювань належать інвазивний легеневий аспергільоз, аспергіллома та різні форми захворювань гіперчутливості, такі як сильна алергічна реакція.

A. fumigatus може бути виділений з широкого діапазону умов навколишнього середовища при оптимальній температурі 37 °С (діапазон 12–65 °С), що сприяє зростанню гриба в будь-якій органічній речовині. Фізичні характеристики конідій дозволяють досягати та прилипати до епітелію ефективніше, ніж інші види грибів зі спорами, що переносяться повітрям подібного розміру. Кондії мають кулястий або субкулястий розмір (2–3,5 мкм), та містять у своїй стінці меланін разом з сильно негативно зарядженими залишками сілової кислоти, що сприяє захисту *A. fumigatus* від реакцій клітини-хазяїна [70].

Висновок до розділу 1.

Дослідження та застосування колагенових матеріалів в промисловості та медицині має великий потенціал для створення нових, ефективних продуктів для лікування ран та інших медичних застосувань. Важливим аспектом виробництва медичних матеріалів на основі колагену є їхня стерилізація, що забезпечує високий рівень безпеки та стерильності. Робота над оптимізацією процесу стерилізації, вибір методів стерилізації, а також вивчення переваг і недоліків кожного з них є важливим завданням.

Подолання проблеми мікроорганізмів-контамінантів в медичних препаратах на колагеновій основі є ключовим аспектом забезпечення якості та безпеки цих продуктів. Використання екстрагованого колагену з колагенвмісних відходів може бути стійким кроком у напрямку створення сталих та екологічно чистих матеріалів.

РОЗДІЛ 2. ОБ'ЄКТ, МЕТА ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Характеристика об'єкта дослідження

Сировиною для отримання колагену I типу було обрано золену та знезолену голинну обрізь, з відходів виробництва ПрАТ “Чинбар” (м.Київ). Після екстрагування колагену кислотним гідролізом, були виконані додаткові фізико-хімічні дослідження, після чого колаген було надано для стерилізації.

Препарат для лікування раневих поверхонь, для колагенової основи якого необхідно розробити схему стерилізації, являє собою гель.

Гель це дисперсна система, в якій компоненти (білки, полісахариди, пектини) розташовані в неправильних рамках, роблячи систему розмірно стійкою. Залежно від вмісту розчинника всередині розрізняють ліогелі (гідрогелі, желатинові) і ксерогелі (рогоподібні, агар-агарові). Речовина в частинках гелю являє собою стаціонарну фазу, зовнішня речовина — рухому фазу [53].

Медичні гелі мають нейтральний рН та не містять агресивних речовин, що можуть впливати на результати досліджень. Як правило, повинні відповідати вимогам санітарно-епідеміологічних норм та правил. Для стерильних медичних гелів, які використовуються для ін'єкцій або контакту з внутрішніми органами або зовнішніми пошкодженнями, допустима кількість мікроорганізмів має бути, близько до нуля.

2.2 Характеристика біологічного агента

Два модельні бактеріальні штами *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (PA) та *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (SA) були використані в роботі для дослідження антимікробних властивостей отриманої колагенової основи препарату. Бактеріальні штами культивували за 37°C на середовищі Nutrient Broth, HiMedia Ltd.

2.3 Методи проведення дослідження

За основу для стерилізації колагену I типу, як біополімерної основи для препаратів комбінованої дії в лікуванні раневих поверхонь було використано метод

стерилізації з хлороформом та метод механічної фільтрації. А також, під час роботи були задіяні класичні хіміко-фізичні та біологічні методи дослідження, їх характеристика наведена нижче.

2.3.1 Колоїдний діаліз

Розчин колагену, після кислотної екстракції оцтовою кислотою герметично закривали у мембранному мішку, який потім поміщали в ємність з розчинником. Співвідношення розчину колагену та розчину, проти якого проводять діаліз, 1:100. Діаліз проводили за постійної зміни води, при кімнатній температурі.

2.3.2 Механічна фільтрація

Фільтрація через мікробні шприцеві фільтри — процес очищення рідини або розчину від мікробіологічних забруднень, таких як бактерії, віруси та інші мікроорганізми, за допомогою спеціальних фільтрів з певним розміром пор. Цей процес забезпечує стерильність рідини, що проходить через фільтр.

2.3.3 Стерилізація хлороформом

Хлороформ (трихлорметан) - хімічний розчинник, який використовується для стерилізації біологічних матеріалів. Він володіє антисептичними та дезінфікуючими властивостями та може знищувати мікроорганізми та бактерії. Метод стерилізації проти хлороформу дозволяє забезпечити стерильність колагенового матеріалу, зберігаючи його структуру та функціональність для подальшого використання в медицині та наукових дослідженнях. Роботу проводили за протоколом [44], в який було внесено деякі зміни.

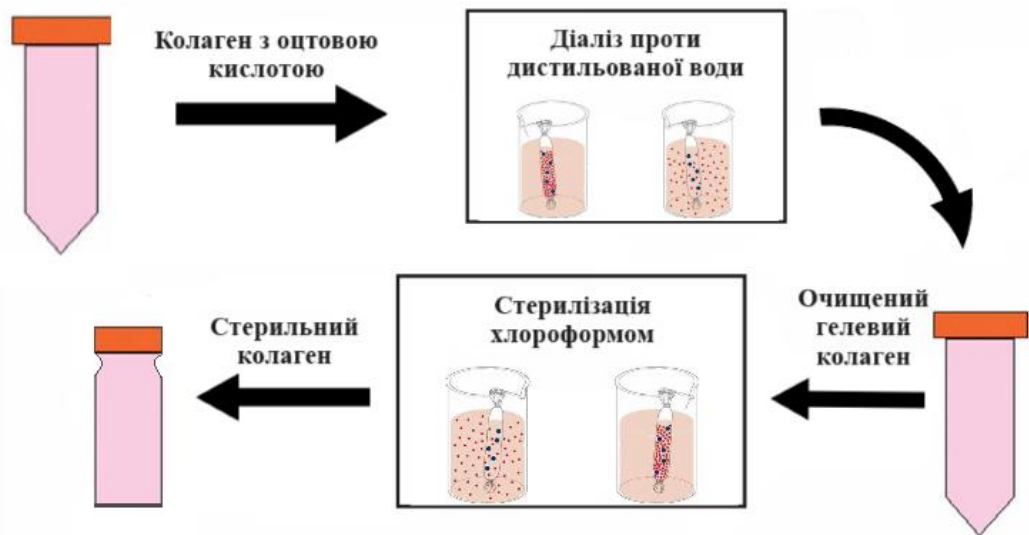


Рис. 2.3.3. Схема стерилізації колагену

2.4 Дослідження антибактеріальної активності

Суспензії добових тест-культур доводили до щільності, що відповідає 0,5 за стандартом мутності МакФарланда (McFarland test). Стерильну колагенову основу разом з антимікробною складовою вносили в 96-лунковий мікротитрувальний планшет. Далі інокулювали підготовленими суспензіями та інкубували протягом доби у термостаті при $+37^{\circ}\text{C}$. Після чого спеткрофотометрично вимірювали приріст біомаси за довжини хвилі 600 нм.

2.4.2 Аналіз метаболічної активності та прикріплення клітин за допомогою МТТ-тесту

З лунок відбирали надосад, промивали 96-лунковий мікротитрувальний планшет занурюючи два рази у дистильовану воду, висушували при кімнатній температурі. Для проведення МТТ-тесту в кожен лунку додавали 100 мкл реагенту МТТ (0,05%), інкубували плату в термостаті, при $+37^{\circ}\text{C}$, протягом 2 годин. В епіндорфи, після відбирали 100 мкл рідини та центрифугували 10 хвилин, при 12000 обертах. В лунки плати паралельно вносили по 50 мкл ДМСО, і так само після в епіндорфи, попередньо відібравши надосад, та проводили піпетування, щоб розчинити осад. На завершення ДМСО з епіндорфів переносили на плату, у

відповідні лунки та виміряли результати на планшетному рідері, при довжині хвилі 570 нм.

2.5 Характеристика колагенової основи з антимікробною складовою розробленого препарату для лікування ран

Колагенова основа препарату для лікування ран відзначається природністю та біосумісністю. Вона має гелеву структуру, яка створює бар'єр для захисту рани та сприяє її загоєнню. Колаген розкладається в організмі, не залишаючи шкідливих залишків.

Азитроміцин (AZM) являє собою синтетичний макролідний антибіотик другого покоління широкого спектра дії, що використовується з початку 1980-х років для лікування в широкому спектрі бактеріальних та мікобактеріальних інфекцій дихальних шляхів, а також для різного типу інфекцій шкіри. Тому він включений до списку основних лікарських засобів ВООЗ та виробляється у великих масштабах по всьому світу. Його антибактеріальна активність обумовлена його здатністю зв'язуватися із субодиницею рибосоми 50S, інгібуючи синтез білка. Він також володіє набором противірусних та протизапальних властивостей і зараз досліджується як потенційний кандидат на лікування вірусів, у тому числі SARS-CoV-2, що викликає хворобу коронавірус-19 (COVID-19) [48].

Хлорамфенікол (левоміцетин) - антибіотик широкого спектра дії, який діє головним чином як бактеріостатичний засіб. Він був виділений в 1947 році зі *Streptomyces venezuelae*. Незабаром після цього була з'ясована його структура, і він став першим антибіотиком, який був синтезований хімічним шляхом. Його молекула має одну із найпростіших структур із всіх відомих антибіотиків, при цьому залишаючи за ним звання одного із рідкісних природних сполук, оскільки в складі хлорамфеніколу містяться нітрогрупи [49].

Застосування цих двох антибіотиків у комбінації з колагеновим гелем має значущий потенціал для боротьби з гнійними процесами в ранах. Ця комбінація не тільки сприяє швидкому загоєнню, але й допомагає забезпечити захист від патогенних мікроорганізмів. Важливо відзначити, що азитроміцин та

хлорамфенікол є допоміжними компонентами, і закордонні лабораторії рекомендують додавати їх безпосередньо в стерильний колагеновий гель, оскільки вони не мають стерилізуючої дії [78].

2.6 Статистичний аналіз

Всі результати в роботі представлені у вигляді фотографій, а також графіків з медіанами, довірчими інтервалами з середнім і стандартним відхиленням. Для обробки результатів було використано програмне забезпечення Microsoft Office Excel Professional Plus.

Висновок до розділу 2.

Основними етапами для створення колагену, як біополімерної основи для препаратів комбінованої дії в лікуванні раневих поверхонь, є отримання чистого гелевого колагену та його стерилізація. Відповідно до цього, підібрані відповідні методи та умови. У цьому розділі представлена схема отримання готового колагену як біополімерної основи.

РОЗДІЛ 3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

3.1 Обґрунтування способу підбору методу стерилізації

Використання діалізу для очистки колагену від залишків оцтової кислоти є ефективним методом видалення речовини невеликої молекулярної маси, такої як оцтова кислота. Діаліз забезпечує можливість розділення колагену від невеликих молекул і води, що дозволяє отримати більш чистий колагеновий зразок перед його стерилізацією.

У порівнянні з іонізуючим випромінюванням, яке найчастіше використовується для стерилізації колагенових зразків, хлороформ є доступним та відносно легким у використанні хімічним розчинником, який може бути застосований без значних технічних вимог, в той час, як, радіаційна стерилізація вимагає спеціалізованого обладнання та професійного контролю. І що важливо, вплив хлороформу на структуру колагену менше виражений та легше контролюється порівняно з радіаційною стерилізацією, яка є більш агресивною для біологічних матеріалів.

3.2 Отримання колагенових гелів за допомогою методу діалізу

7 мл колагену в оцтовій кислоті, поміщали в діалізний мембранний мішок, його запечатували з обох боків спеціальними скобами та занурювали у 1000 мл дистильованої води, при кімнатній температурі. Діаліз проходив майже тиждень, зі зміною розчинника кожного дня. Оскільки навіть за оптимальних умов швидкість діалізу була лише вдвічі вищою, ніж за відсутності перемішування [65]. Було вирішено, що перемішування не призводить до збільшення швидкості діалізу, а основним прискорювачем є зміна розчинника кожні 8-12 годин, в результаті чого отримували колагенові гелі різної сили. За такого режиму тривалість діалізу складала 30-36 годин.

3.3 Стерилізація гелевого колагену за допомогою механічної фільтрації

Стерилізацію колагенового гелю проводили за допомогою стерильних фільтрів марки Thermo Scientific, Target2™ PTFE з розміром пор 0,45 та 0,22 μm .

Фільтрацію проводили послідовно через фільтри обох типів. Проте, в результаті механічної стерилізації колагену білкові молекули затримувались на мембрані фільтрів. І, як наслідок, відбувалися великі втрати білка та гелевої структури основи препарату. Таким чином, застосування методу фільтрації для стерилізації колагенової основи препарату було недоцільним.

3.4 Стерилізація гелевого колагену за допомогою хлороформу

Розчин хлороформу (4%) вносили в 500 мл дистильованої води (20 мл хлороформу в 500 мл води) у 1000 мл мірному стакані, який попередньо встановлювали на магнітну мішалку марки FAITHFUL, модель SH-2. Це забезпечувало рівномірний розподіл активної речовини у розчиннику. Стерилізацію проводили за низької температури $+4^{\circ}\text{C}$ протягом 2 годин, режим перемішування 120 об/хв. Стерилізований таким способом колаген зберігали за низьких температур ($+4^{\circ}\text{C}$) протягом щонайменше 7 діб.

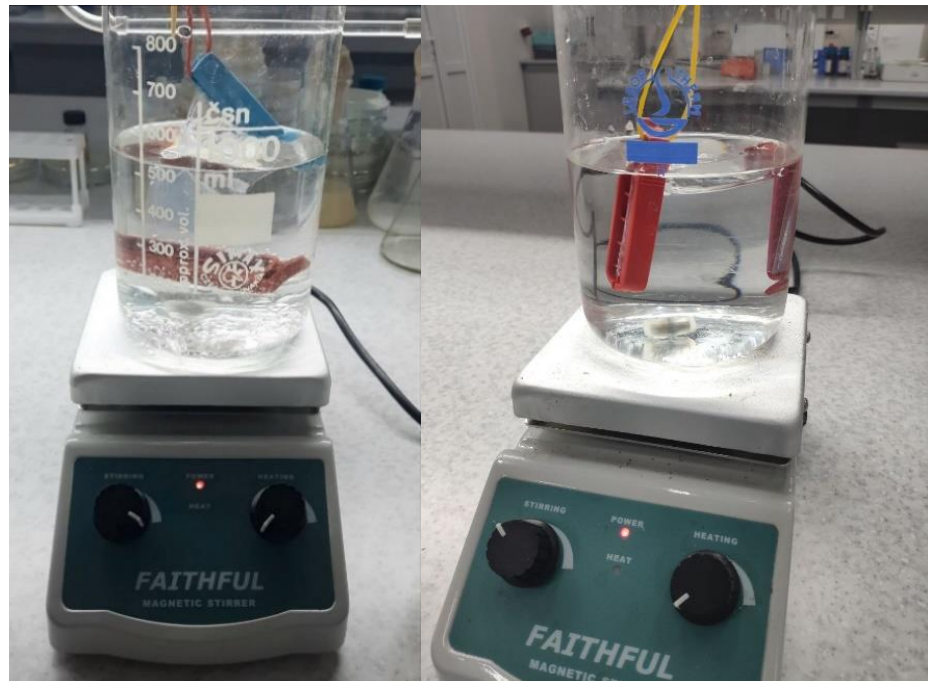


Рис. 3.4. Фотографії процесу проведення стерилізації колагену

3.5 Контроль стерильності колагену на стадії отримання

Після застосування протоколу стерилізації колагену хлороформним методом, перевіряли мікробну чистоту отриманого продукту. Для цього готували стандартне

рідке поживне середовище (NA), розливали по 5 мл у віали щонайменше у трикратній повторюваності, після цього додавали 200 мкл готового простерелізованого білку та поміщали в термостат на 24 години, при +37°C. Після закінчення терміну культивування середовище, інокульоване зразками колагену не змінювало оптичну густина. Таким чином всі отримані зразки колагену після стерилізації хлороформним методом залишалися стерильними.

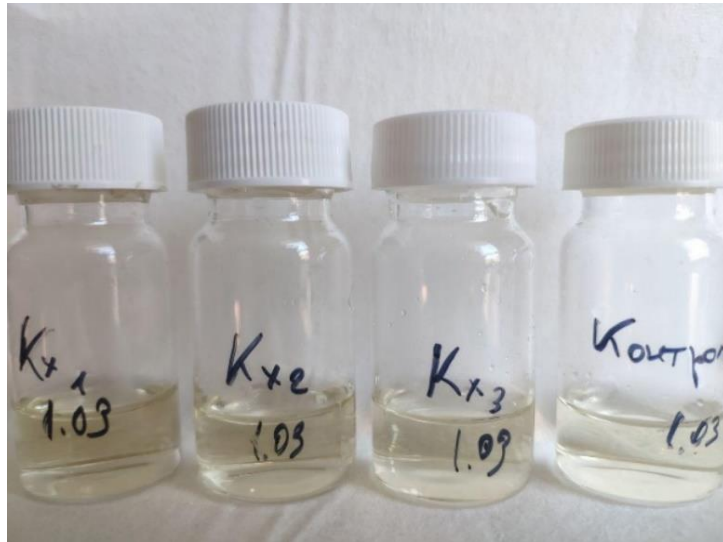


Рис. 3.5. Фотографія результату контролю стерильності гідролізованого колагену

Для підтвердження відсутності повільноростучих форм мікроорганізмів або їх спор та збереження стерильності зразків колагену протягом тривалого терміну інокульоване середовище витримували в термостаті протягом 6 місяців. Зміни оптичної густини не відзначали, що свідчило про збереження стерильності зразка колагену.

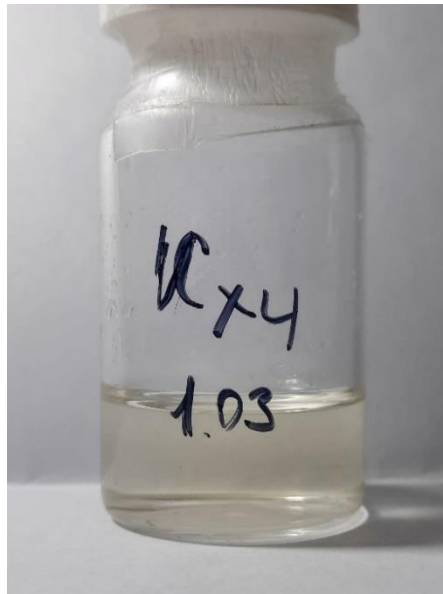


Рис 3.5.1. Фотографія додаткового зразка контролю стерильності

Таким чином, застосований протокол методу стерилізації із хлороформом може бути успішно використаний для стерилізації колагенової основи препарату для лікування раневих поверхонь забезпечуючи не лише стерильність зразків, а й збереження гелевої структури.

3.6 Аналіз антибактеріальної активності стерильного колагену за допомогою фотометрії

Використання хлороформу для стерилізації колагенової основи може надавати зразкам додаткових антимікробних властивостей. Беручи до уваги, що антимікробною складовою препарату для лікування раневих поверхонь є комбінація антибіотиків азитроміцину та хлорамфеніколу, необхідно було перевірити антимікробну активність простерилізованих зразків колагену та простерилізованих зразків колагену з імобілізованою антимікробною складовою препарату. Антибактеріальну активність стерильного колагену визначали як за приростом біомаси тест-культур та метаболічною активністю клітин, так і за здатністю формувати біоплівку. Оскільки саме мікробні біоплівки найбільше перешкоджають загоєнню раневих поверхонь та ускладнюють їх лікування. Було встановлено що стерильний колаген не тільки проявляє антибактеріальні

властивості, а й посилює дію антимікробної складової препарату.

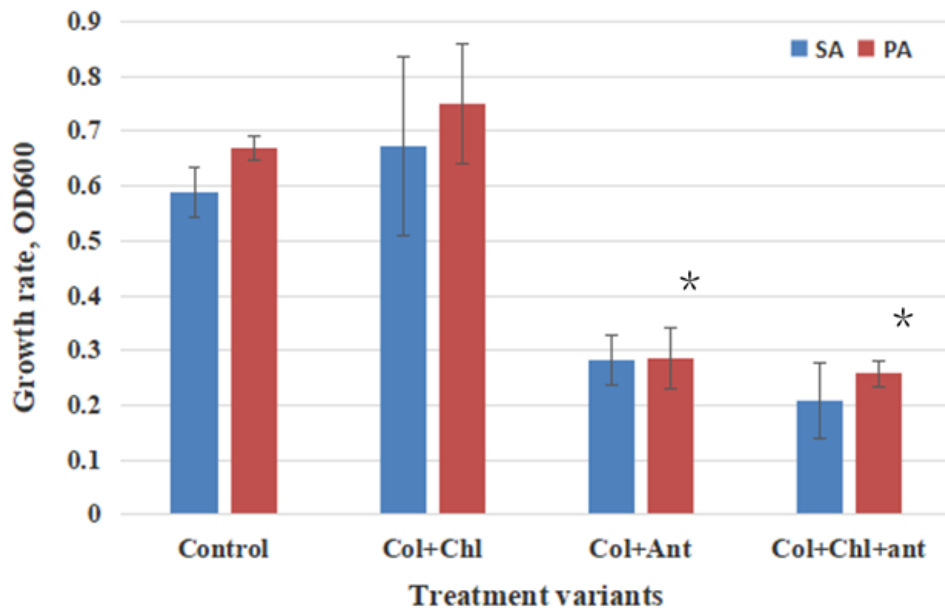


Рис. 3.6. Швидкість росту бактерій у різних варіантах обробки. Дані представлені як Середнє \pm Стандартне відхилення. Варіанти зі статистично значущою відмінністю порівняно з контролем позначені (*) [76].

Так, хоча у порівнянні з контролем та антимікробною складовою простерилізований колаген не знижував достовірно чисельність мікробної популяції (Рис. 3.5), він мав значний вплив на здатність бактерій адгезуватися до поверхні та утворювати біоплівку (Рис. 3.5.1). Рівень адгезії клітин знижувався майже в 10 разів, що співпадало з ефектом від антимікробної складової препарату.

За результатами було встановлено, що стерильна колагенова основа з антимікробною складовою демонструє активну антибактеріальну дію, значно знижує відсоток живих клітин бактерій, а також їх здатність формувати біоплівку.

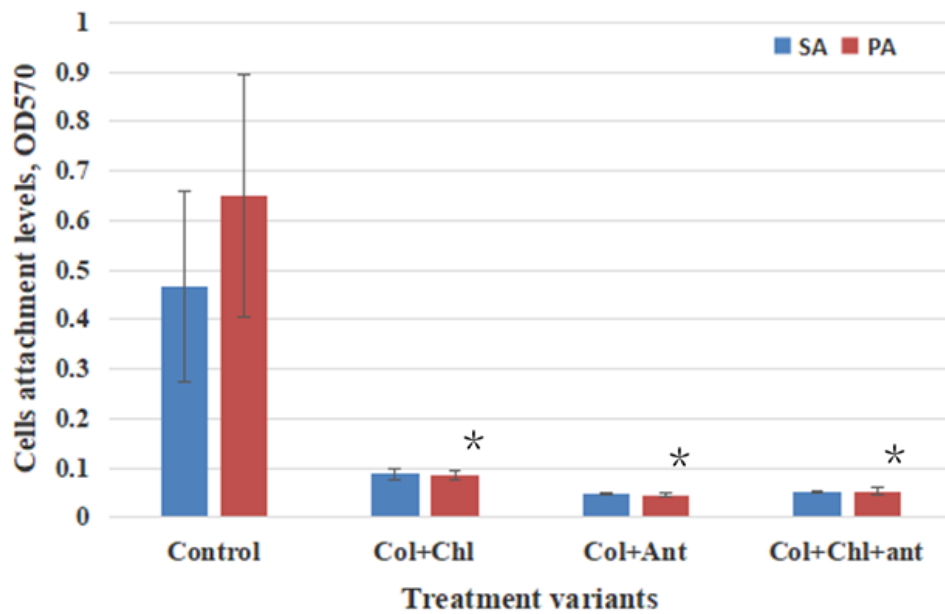


Рис. 3.6.1. Рівень прикріплення клітин у різних варіантах обробки. Дані представлені як Середнє \pm Стандартне відхилення. Варіанти зі статистично значущою відмінністю порівняно з контролем позначені (*) [76].

Виходячи з отриманих результатів, можна припустити, що стерилізація хлороформом може мати не тільки антибактеріальний, а й антибіоплівковий ефект.

Висновок до розділу 3.

Отримання та обробка гелевого колагену для використання в лікуванні ран є складним процесом, що містить кілька критичних кроків. Перш за все, діаліз був використаний для очищення колагену від непотрібних домішок, що дозволило отримати більш чистий продукт. Далі, стерилізація з використанням хлороформу забезпечила стерильність гелевого колагену, що критично важливо для запобігання інфекціям та іншим проблемам при лікуванні ран.

На завершальних етапах, проводився контроль стерильності продукту та аналіз його антибактеріальної активності за допомогою фотометрії. Ці кроки дозволили переконатися у якості та ефективності гелевого колагену для лікування ран. Отриманий гелевий колаген виявився перспективним компонентом для лікування ран завдяки своїм стерильним властивостям та здатності до боротьби з бактеріальними інфекціями. Його характеристики та властивості можуть бути використані для подальших досліджень та розробки продуктів для лікування ран.

ВИСНОВКИ

1. Біополімери, і зокрема колаген, широко використовують з біомедичною метою. Колаген, будучи основною білковою складовою тканин організму, відзначається своєю унікальною здатністю сприяти регенерації і загоєнню тканин. Цей біополімер здатен біорозкладатись та є біосумісним з тканинами організму людини, що робить його ідеальним матеріалом для медичних застосувань. Колаген сприяє стимулюванню росту клітин і формуванню нової тканини, що є критичними процесами в процедурі загоювання. Ця унікальна властивість робить його перспективним матеріалом для використання в лікуванні ран, опіків, травм та в реконструктивній хірургії. Завдяки своїм структурним та функціональним характеристикам, колаген відкриває безліч можливостей для розвитку нових медичних продуктів та методів лікування, що робить його вельми цінним біополімером у сфері медицини.

2. Розроблено схему холодної стерилізації колагену, отриманого з відходів шкіряного виробництва, для використання як основи препарату для лікування раневих поверхонь.

3. Розроблена схема стерилізації забезпечує зниження формування біоплівки представників умовно-патогенної мікрофлори.

4. Зазначені результати сприяють розкриттю перспектив використання колагенових гелів як основи препаратів для лікування раневих поверхонь та вдосконаленню методів їх терапії.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Ricard-Blum, S. The Collagen Family. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011, 3(1):a004978.
2. T. F. Linsenmayer. *Cell Biology of Extracellular Matrix. Collagen.* Springer US. 1991, 7-44 pp.
3. Rajan Navneeta, Habermehl Jason, Cote Marie-France, Doillon, Charles J, Mantovani Diego. Preparation of ready-to-use, storable and reconstituted type I collagen from rat tail tendon for tissue engineering applications. 2007, 1(6), 2753–2758.
4. Joanna Skopinska-Wisniewska, Kamil Olszewski. Dialysis as a method of obtaining neutral collagen gels. *Materials Science and Engineering: C* Volume 40, 1 July 2014, Pages 65-70.
5. Mewburn Ellis. *Collagen scaffolds: the future of tissue engineering.* Mewburn Ellis, August 23, 2018.
6. Matthew D. Shoulders and Ronald T. Raines. Collagen structure and stability. *Annu Rev Biochem.* 2009;78:929-58.
7. G.H. Miller, S.J. Clarke. Amino-acid dating. *Encyclopedia of Quaternary Science.* 2007, Pages 41-52
8. Paul Martin. *Wound Healing-Aiming for Perfect Skin Regeneration.* 4 Apr 1997. Vol 276, Issue 5309. pp. 75-81.
9. Schultz, G., Chin, G., Moldawer, L., Diegelmann, R. *Principles of Wound Healing;* University of Adelaide Press: Adelaide, Australia, 2011; Volume 23.
10. J. M. Reinke, H. Sorg. Wound repair and regeneration. *Eur Surg Res.* 2012;49(1):35-43.
11. Penelope Kallis, Adam Friedman. Collagen Powder in Wound Healing. *J Drugs Dermatol.* 2018 Apr 1;17(4):403-408.
12. V. Constantin. Tissue Engineering - Collagen Sponge Dressing for Chronic Wounds. *International Conference on Advanced Materials and Systems (ICAMS).* Vol.2018, No. 7.

13. Ibrahim Amirrah, Mohd Farhanulhakim, Mohd Razip Wee. Antibacterial-Integrated Collagen Wound Dressing for Diabetes-Related Foot Ulcers: An Evidence-Based Review of Clinical Studies. *Polymers (Basel)*. 2020 Sep 22;12(9):2168.
14. Oded Shoseyov, Yehudit Posen, Frida Grynspan. Human collagen produced in plants: more than just another molecule. *Bioengineered*. 2014 Jan-Feb;5(1):49-52.
15. Shani Shilo, Sigal Roth. Cutaneous Wound Healing After Treatment with Plant-Derived Human Recombinant Collagen Flowable Gel. *Tissue Engineering Part A* Vol. 19, No. 13-14. 2013.
16. Bo An, David Kaplan, Barbara Brodsky. Engineered recombinant bacterial collagen as an alternative collagen-based biomaterial for tissue engineering. *Front Chem*. 2014 Jun 23;2:40.
17. Matheus Almeida Cruz, Tiago Akira Araujo. Collagen from Marine Sources and Skin Wound Healing in Animal Experimental Studies: a Systematic Review. *Marine Biotechnology* volume 23, 2021, 1–11.
18. C. F. Marques, G. S. Diogo. Collagen-based bioinks for hard tissue engineering applications: a comprehensive review. *J Mater Sci Mater Med*. 2019 Mar 6;30(3):32.
19. Egor Osidak, Vadim Kozhukhov. Collagen as Bioink for Bioprinting: A Comprehensive Review. *Int J Bioprint*. 2020; 6(3): 270.
20. Amtoj Kaur, Swati Midha. Functional Skin Grafts: Where Biomaterials Meet Stem Cells. *Hindawi. Stem Cells International* Volume 2019, 20.
21. Vivian Lee, Gurtej Singh. Design and fabrication of human skin by three-dimensional bioprinting. *Tissue Eng Part C Methods*. 2014 Jun;20(6):473-84.
22. Samantha Lo, Mh Busra Fauzi. Current Update of Collagen Nanomaterials-Fabrication, Characterisation and Its Applications. *Pharmaceutics* 2021, 13(3), 316.
23. Arely León-López, Alejandro Morales-Peñaloza. Hydrolyzed Collagen — Sources Sources and Applications. *Molecules* 2019, 24(22), 4031.

24. Katie H. Sizeland, Melissa M. Basil-Jones. Collagen Orientation and Leather Strength for Selected Mammals. *J. Agric. Food Chem.* 2013, 61, 4, 887–892.
25. Gaurav Kumar Pal, P.V. Suresh. Sustainable valorisation of seafood by-products: Recovery of collagen and development of collagen-based novel functional food ingredients. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. Volume 37, Part B, October 2016, Pages 201-215.
26. Л.А.Майстренко, О.С.Юнгін. Екстрагування колагену з недублених відходів шкіряного виробництва. *Вісник Хмельницького національного університету*, No5, 2020, 289.
27. Lin, H., Fan, Y. Bovine. Type I collagen: Preparation, characterization, and application in tissue regeneration. In *Type I Collagen: Molecular Structure, Applications in Tissue Engineering and Role in Human Disorders*; Rivera, G., Ed.; Nova Science Publishers. 2015; pp. 1–71
28. Giuseppe Zanaboni, Antonio Rossi. Stability and networks of hydrogen bonds of the collagen triple helical structure: influence of pH and chaotropic nature of three anions. *Matrix Biology*. Volume 19, Issue 6, November 2000, Pages 511-520.
29. Inwoo Bae, Kiyoshi Osatomi. Characteristics of a self-assembled fibrillar gel prepared from red stingray collagen. *Fisheries Science* volume 75, 2009, 765–770.
30. Ute Schönfelder, Martin Abel. Influence of selected wound dressings on PMN elastase in chronic wound fluid and their antioxidative potential in vitro. *Biomaterials*. 2005 Nov;26(33):6664-73.
31. K. S. Weadock, E. J. Miller, E. L. Keuffel. Effect of physical crosslinking methods on collagen-fiber durability in proteolytic solutions. *J Biomed Mater Res.* 1996 Oct;32(2):221-6.
32. L. H. Olde Damink, P. J. Dijkstra, M. J. Van Luyn. Influence of ethylene oxide gas treatment on the in vitro degradation behavior of dermal sheep collagen. *J Biomed Mater Res.* 1995 Feb;29(2):149-55.
33. James Bushell, Mike Claybourn. An EPR and ENDOR study of gamma- and beta-radiation sterilization in poly (lactide-co-glycolide) polymers and microspheres. *J Control Release.* 2005 Dec 10;110(1):49-57.

34. W.E. Skiens. Sterilizing radiation effects on selected polymers. *Radiation Physics and Chemistry*. Volume 15, Issue 1, 1980, Pages 47-57.
35. J. M. Sherman, C. E. Safford. The Occurrence of Filterable Forms of Bacteria in Nature. *Science*. 1931 Apr 24;73(1895):448-9.
36. E. O. Kajander. Nanobacteria: an alternative mechanism for pathogenic intra- and extracellular calcification and stone formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Jul 7;95(14):8274-9.
37. Harcum, S. *Biologically Inspired Textiles || Purification of protein solutions*. 2008, 26–43.
38. M. H. Davison. Chloroform. *BJA: British Journal of Anaesthesia*. 1965, 37(9), 655–660.
39. Ishrat Jahan Bulbul, Laizuman Nahar. Antibacterial, cytotoxic and antioxidant activity of chloroform, n-hexane and ethyl acetate extracts of plant *Amaranthus spinosus*. *International Journal of PharmTech Research* 3(3):1675-1680. 2011.
40. Feldman, H. A., Wang, S. S. Sensitivity of Various Viruses to Chloroform. *Experimental Biology and Medicine*. 1961, 106(4), 736–738.
41. Sébastien Meghezi, Dawit Seifu. *Engineering 3D Cellularized Collagen Gels for Vascular Tissue Regeneration*. *JoVE Journal*. 2015
42. Rajan, Habermeh. Preparation of ready-to-use, storable and reconstituted type I collagen from rat tail tendon for tissue engineering applications. 2007, 1(6), 2753–2758.
43. Qizhi Huang, Rebecca A. Dawson, David E. Pegg, Use of peracetic acid to sterilize human donor skin for production of acellular dermal matrices for clinical use. 2004, 12(3), 276–287.
44. Mathias K. Oulé, Kelsi Quinn. Akwaton, polyhexamethylene-guanidine hydrochloride-based sporicidal disinfectant: a novel tool to fight bacterial spores and nosocomial infections. Volume 61, Issue 10. 2012.
45. Kwangsik Park. An analysis of a humidifier disinfectant case from a toxicological perspective. *Environ Health Toxicol* 2016; 31: e2016013.

46. Madeleine, Hinks. Azithromycin in viral infections. *Reviews in Medical Virology*, 2020.
47. O. Pongs. Chloramphenicol. *Mechanism of Action of Antibacterial Agents*. 26–42, 1979.
48. K. Yoshida. Feasibility of using collagen as the base of the antifungal drug, miconazole. 2006, 33(5), 363–367.
49. Langrock, Czihal, Hoffmann. Amino acid analysis by hydrophilic interaction chromatography coupled on-line to electrospray ionization mass spectrometry. *Amino Acids*. 2006 May;30(3):291-7.
50. Gallagher, Wiley. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques || SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)*. 2008
51. A. Gressner. *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*. Springer Reference Medizin. Springer, Berlin, Heidelberg, 2018.
52. Basil A. Pruitt Jr., Albert T. McManus. Opportunistic infections in severely burned patients. 1948, 76(3-part-P1), 0–154.
53. Wiener-Kronish. Therapies against Virulence Products of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, 2011, 32(2), 228–235.
54. Stephanie DeLeon, Allie Clinton. Synergistic Interactions of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* in an *In Vitro* Wound Model. *ASM Journals Infection and Immunity*. Vol. 82, No. 11. 2014
55. Wu Weihui. *Molecular Medical Microbiology || Pseudomonas aeruginosa*. , 2015, 753–767.
56. J. Foster. *Molecular Medical Microbiology Volume 2 || Staphylococcus aureus*. 2002, 839–888.
57. Liu, Y., Peterson, D. A., Kimura, H., and Schubert, D. Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *J. Neurochem*. 1997, 69, 581–593.

58. Perez-Puyana. *Materials for Biomedical Engineering* || Collagen as a potential biopolymer for the production of porous matrices (scaffolds) with application in tissue engineering. 2019, 217–244.
59. Galante, Terezinha. Sterilization of hydrogels for biomedical applications: A review. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 2017.
60. Neves, P.R. *Encyclopedia of Food Microbiology* // PSEUDOMONAS / *Pseudomonas aeruginosa*. 2014, 253–260.
61. Olajide, Jimmy Lolu. *Antibiotic Materials in Healthcare* || Nosocomial Bacterial Infection of Orthopedic Implants and Antibiotic Hydroxyapatite/Silver-Coated Halloysite Nanotube With Improved Structural Integrity as Potential Prophylaxis. 2020, 171–220.
62. Abdelbary. *Genetics and Evolution of Infectious Diseases* || The Evolution and Dynamics of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. 2017, 553–572.
63. McPhie. [Methods in Enzymology] Enzyme purification and related techniques Volume 22 || [4] Dialysis. , 1971, 23–32.
64. Harrington(2020). *Biomaterials Science* || Sterilization and Disinfection of Biomaterials for Medical Devices. 2020, 1431–1446.e1
65. Dina Jnani, Sidhartha D. Ray. *Escherichia coli*. Reference Module in Biomedical Sciences. 2022.
66. Frisvad, Thrane, Samson. Important mycotoxins and the fungi which produce them. In: Pitt J, Samson RA, Thrane U (eds) *Advances in food mycology*. Springer, New York, 2006, pp 3–31.
67. Wagener, Davis, Diener. Penitrem A and roquefortine production by *Penicillium commune*. *Appl Environ Microbiol*, 1980, 39:882–887
68. Mousavi, Hedayati. *Aspergillus* species in indoor environments and their possible occupational and public health hazards. *Curr Med Mycol*. 2016 Mar; 2(1): 36–42
69. Samantha Lo, Mh Busra Fauzi. Current Update of Collagen Nanomaterials - Fabrication, Characterisation and Its Applications: A Review. *Pharmaceutics*. 2021 Mar; 13(3): 316.

70. Arely León-López, Alejandro Morales-Peñaloza. Hydrolyzed Collagen - Sources and Applications. *Molecules* 2019, 24(22), 4031
71. Donald G Wallace; Joel Rosenblatt (2003). Collagen gel systems for sustained delivery and tissue engineering., 55(12), 1631–1649.
72. Miller, K. *Comprehensive Biomaterials || Materials in Tendon and Ligament Repair*. 2011, 257–279.
73. Koch L., Deiwick A., Schlie S. Skin tissue generation by laser cell printing. *Biotechnol Bioeng.* 2012, 109:855–63.
74. Maxson EL, Young MD, Noble C, et al. *In vivo* remodeling of a 3D-bioprinted tissue engineered heart valve scaffold. *Bioprinting*. 2019;16:e00059.
75. Maslak V.I., Kalinichenko O.O., Okhmat O.A., Iungin O.S. Antibiofilm effect of collagen-based material developed for wound dressing. *Вісник проблем біології і медицини*. Випуск 2 (169), 2023.
76. Ластовецька Л., Маслак В., Стужук А. Екстрагування колагену біомедичного призначення з відходів шкіряного виробництва: матеріали 87 Міжнародної наукової конференції молодих учених, аспірантів і студентів «Наукові здобутки молоді – вирішенню проблем харчування людства у ХХІ столітті» (15-16 квітня 2021 р. , м. Київ). Київ: НУХТ. 2021, Ч.1. С. 407.
77. Liudmyla Lastovetska, Valeriia Maslak, Olga Iungin. Combined antibiotic therapy carried in collagen matrix for opportunistic pathogens treatment. 65 th International conference for students of Physics and Natural Sciences Open Readings 2022: Abstract book, March 15-18 2022, Vilnius: Vilnius University, 2022. P.345.
78. María Flórez, Patricia Cazón. Selected Biopolymers' Processing and Their Applications: A Review. *Polymers (Basel)*, 2023 Jan 26;15(3):641.
79. Iris Boraschi-Diaz. Collagen Type I as a Ligand for Receptor-Mediated Signaling. 2017, *Frontiers in Physics* 5:12.
80. Yamauchi M, Sricholpech M. Lysine post-translational modifications of collagen. *Essays Biochem* 2012;52:113–33.
81. Shoulders MD, Raines RT. Collagen structure and stability. *Annu Rev Biochem* 2009;78: 929–58.

82. Kivirikko KI, Myllylä R. Posttranslational enzymes in the biosynthesis of collagen: intracellular enzymes. *Methods Enzymol* 1982;82(Pt A):2
83. Hulmes DJS. Collagen diversity, synthesis and assembly. Springer; 2008. p. 15-47.
84. Yamauchi M, Shiiba M. Lysine hydroxylation and cross-linking of collagen. *Methods Mol Biol* 2008;446:95-108.
85. Sell DR, Monnier VM. Structure elucidation of a senescence cross-link from human extracellular matrix. Implication of pentoses in the aging process. *J Biol Chem* 1989;264:21597
86. Wang X, Shen X, Li X, Agrawal CM. Age-related changes in the collagen network and toughness of bone. *Bone* 2002;31:1-7.
87. Leeming DJ, Henriksen K, Byrjalsen I, Qvist P, Madsen SH, Garnero P, et al. Is bone quality associated with collagen age? *Osteoporos Int* September 2009;20(9):1461-70.

ДОДАТОК А

КЛІНІЧНА ТА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА МЕДИЦИНА / CLINICAL AND EXPERIMENTAL MEDICINE

DOI 10.29254/2077-4214-2023-3-170-226-229

UDC 571.69+675, 616-001.4/.6

Maslak V. I., Kalinichenko O. O., Okhmat O. A., Kotlyar M. M., Iungin O. S.

ANTIBIOFILM EFFECT OF COLLAGEN-BASED MATERIAL DEVELOPED FOR WOUND DRESSING

Kyiv National University of Technologies and Design (Kyiv, Ukraine)

olgaungin@gmail.com

The ongoing war in Ukraine and the urgent need to equip military personnel with advanced medical supplies has spurred the exploration of innovative next-generation materials for treating wounds. These materials must possess potent antibacterial properties and are likely to be built upon a biopolymeric base. The surplus collagen-rich waste generated by the leather industry offers an opportunity for collagen extraction and repurposing. Collagen, a biopolymer with widespread applications in cosmetics and medicine, plays a crucial role in wound healing products. It acts not only as a protective barrier against external contaminants but also stimulates fibroblast production and acts as a carrier for antimicrobial agents. The aim of our study was to test antimicrobial effectiveness against opportunistic bacteria of collagen-based material obtained from leather industry waste developed for wound dressing. We adapted a sterilization procedure based on a chloroform protocol. Utilizing chloroform sterilization for collagen preparation demonstrated successful reduction in cell attachment for the studied bacterial strains, suggesting a potential anti-fouling approach for preparing wound dressing materials. This innovative collagen-based wound dressing, boasting antimicrobial and antibiofilm properties, holds promise for future clinical studies and potential utilization in wound treatment.

Key words: collagen dressing, wounds, biofilms, antimicrobials.

Connection of the publication with planned research works.

This research was performed in the frame of young scientists project «Development of a complex preparation of combined action based on collagen derivatives for the treatment of wound surfaces». State registration number 0120U101290.

Introduction.

The war in Ukraine and the necessity to provide military personnel with advanced first-aid materials create prerequisites for the development of novel next-generation materials for wound treatment. These materials should possess antibacterial and have a biopolymeric basis.

During injury, the first and crucial barrier against infection development is the dressing material that comes into contact with the wound surface within the first 5 seconds. The widespread occurrence of antibiotic-resistant pathogenic microorganism strains in field hospitals complicates the treatment of wounded individuals and may lead to sepsis, further spread of infection, and, consequently, limb amputation or the need for additional surgeries. All of these factors adversely affect the health and combat readiness of the Ukrainian military as a whole. Therefore, the necessity to equip military personnel with advanced first-aid materials during armed conflicts in Ukraine drives the development of innovative next-generation wound treatment materials with antibacterial effect.

For more than 50 years [1], collagen-based products have been widely used in medicine for manufacturing various devices, including wound dressings, tissue growth matrices, and more. The extensive use of collagen can be attributed to several unique biological characteristics that lack synthetic counterparts. These characteristics include high tensile strength, semi-permeable membrane properties, low antigenicity (low likelihood of causing an immune response), hemostatic (blood clotting) properties, and a positive influence on wound healing speed [2]. Currently, numerous collagen-based products are commercially and clinically available. These products have been

extracted from various sources, including animal tissues, human and animal cells grown *in vitro*, obtained through recombinant expression, or direct peptide synthesis. Each of these collagen products has its own advantages and disadvantages. The most economically viable method is collagen extraction from animal tissues [3].

In wound healing products, collagen serves not only as a barrier to separate the wound surface from the unfavorable external environment but also plays several other vital roles. It significantly enhances fibroblast production and increases their permeability due to its hydrophilic properties. Additionally, collagen increases the absorption and bioavailability of fibronectin and helps retain leukocytes, macrophages, and epithelial cells [4]. Moreover, collagen can act as a carrier for antimicrobial compounds, preventing bacterial infection at the wound site, and adsorbing wound exudate [5].

The original and natural form of bacterial existence in wounds is biofilms defined as structured consortium attached on a living or inert surface formed by microbial cells and stacked to each other by the self-produced extracellular polymeric matrix [6]. Experimental evidences of biofilms *in vitro* and *in vivo* demonstrated clearly that biofilm bacterial cells are significantly more resistant to antibiotics and host immune defence than their planktonic counterparts [7]. That is why referring to development materials for wound dressing it is important to test antimicrobial part as antibiofilm as well. The most commonly tested agents for wounds treatment among 44 commercially available topical agents were silver, iodine and polyhexamethylene biguanide (PHMB) [8].

The aim of our study.

To test antimicrobial effectiveness against opportunistic bacteria of collagen-based material obtained from leather industry waste developed for wound dressing. Novelty of research is described as study of antibacterial effect of newly developed collagen-based dressing for wound treatment.

Object and research methods.

КЛІНІЧНА ТА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА МЕДИЦИНА / CLINICAL AND EXPERIMENTAL MEDICINE

Collagen was extracted from leather industry waste (delimed pelt) as described previously [9]. The basic chloroform protocol with adaptations [10] was applied for sterilization purposes.

Two model hospital opportunistic microorganisms, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (PA) and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (SA), were used to study the effect of antimicrobial part of collagen-based material. Bacterial strains were cultivated aerobically at 37°C with shaking in Luria-Bertani (LB) medium to obtain the inoculum and transferred into 96-well plates covered with collagen-based product (100 µl per well).

Biofilm formation was tested as previously described [11]. The antimicrobial part was represented by the combination of azithromycin (AZM) and chloramphenicol (CAP) in concentrations 32+16 µg/ml. The effectiveness of mentioned concentrations in cells metabolic activity inhibition was previously shown [12].

Statistical analysis. All the experiments were performed in three replicates and are presented as the mean ± standard deviation (SD). One-way ANOVA and Tukey HSD/Tukey Kramer were used to calculate the data variance, and P<0.05 represents a significant difference. Normality assumption was checked based on the Shapiro-Wilk Test ($\alpha=0.05$).

Research results and their discussion.

Bacterial infections in wounds often delay the healing process, and may seriously threaten human life [12]. The effectiveness of antimicrobials in wound dressing material is an important part of successful use of that kind of material [13]. In our study we formulated a dressing for wound treatment based on collagen extracted from leather industry waste and antimicrobial part with a combined action of two antibiotics. Sterilization with chloroform was one of the steps to prepare collagen to be used as a base for wound dressing. That is why we tested extracted collagen (control) as well as collagen sterilized with chloroform besides collagen with antimicrobial part itself to check the effect of chloroform residues on biofilms development (fig. 1-2).

Antimicrobial part of developed dressing drastically inhibited the growth rate of both studied opportunistic strains. The presence of chosen antimicrobials reduced growth rate more than twice. However, chloroform use had no effect on bacteria population development according to the growth rate. There was no statistically proved difference between extracted collagen washed in distilled water and chloroform-sterilized collagen. Besides, there was no cumulative or additive effect between chloroform and chosen antimicrobials.

However, surprisingly, taking about biofilm formation and cells attachment there was a great difference between extracted and chloroform-sterilized collagen (fig 2).

Thus, both Gram-positive and negative cells attachment were 10 times reduced when the surface was represented by chloroform-sterilized collagen. The presence of antimicrobial part reduced the attachment level in the same range. Based on the results it seems that chloroform sterilization may have antibiofilm or antifouling effect as well. It would be interesting to examine collagen samples sterilized

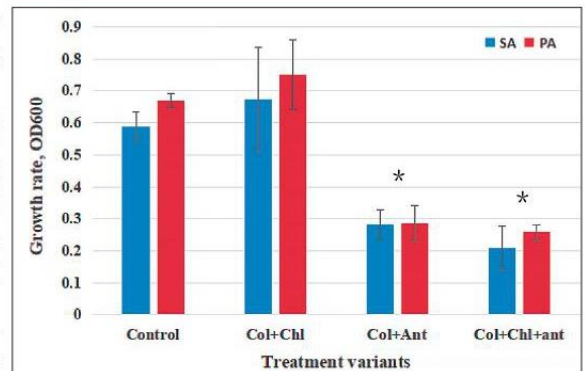


Figure 1 – Bacterial growth rate in different treatment variants. Data are shown as Mean ± SD. Variants with statistically significant difference compare to control are marked with (*).

with different ways of cold sterilization – electron-beam [14] and ethylene oxide [15] which frequently used for collagen with clinical application.

The interaction of collagen with antibiotics is of significant importance in the treatment of wounds and infections. Collagen, used as a component in wound healing products, can interact with antibiotics at various levels: prolongation of antibiotic action [16], reduction of antibiotic toxicity [17] etc. Collagen can retain antibiotics on the wound surface or release them slowly, extending their action in the tissues. This can be particularly beneficial in the treatment of deep or prolonged wounds, where maintaining a high level of antibiotics over an extended period is necessary. Collagen, as a component of wound healing materials, contributes to optimal tissue regeneration and may provide enhanced infection control, leading to faster recovery.

Conclusions.

Developed wound dressing collagen-based material successfully inhibited biofilm development of Gram-positive and negative infection agents. The use of chloroform sterilization for collagen preparation reduced cell attachment level and could be considered as anti-fouling approach.

Prospects for further research.

Developed collagen-based wound dressing with antimicrobial effect could be used for wound treatment in further clinical studies.

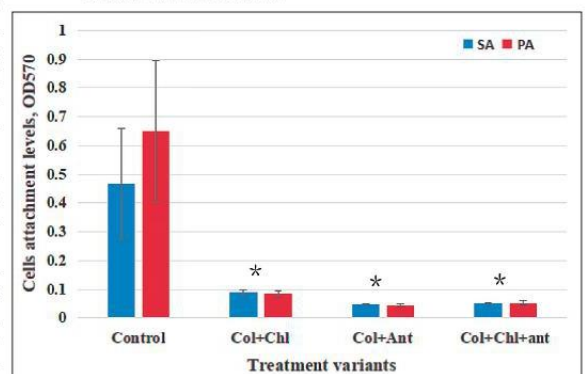


Figure 2 – Cells attachment level in different treatment variants. Data are shown as Mean ± SD. Variants with statistically significant difference compare to control are marked with (*).

References

1. Elango J, Hou C, Bao B, Wang S, Maté Sánchez de Val JE, Wenhui W. The Molecular Interaction of Collagen with Cell Receptors for Biological Function. *Polymers*. 2022;14(5):876.
2. Zhang J, Elango J, Wang S, Hou C, Miao M, Li J, et al. Characterization of Immunogenicity Associated with the Biocompatibility of Type I Collagen from Tilapia Fish Skin. *Polymers*. 2022;14(11):2300.
3. de Melo Oliveira V, Assis CRD, Costa BDAM, de Araújo Neri RC, Monte FTD, da Costa Vasconcelos HMS, et al. Physical, biochemical, densitometric and spectroscopic techniques for characterization collagen from alternative sources: A review based on the sustainable valorization of aquatic by-products. *Journal of Molecular Structure*. 2021;1224:129023.
4. Harsha L, Brundha MP. Role of collagen in wound healing. *Drug Invention Today*. 2020;13(1):55-57.
5. Bustamante-Torres M, Arcenales-Vera B, Estrella-Núñez J, Yáñez-Vega H, Bucio E. Antimicrobial activity of composites-based on biopolymers. *Macromol*. 2022;2(3):258-283.
6. Wu H, Moser C, Wang HZ, Heiby N, Song ZJ. Strategies for combating bacterial biofilm infections. *International journal of oral science*. 2015;7(1):1-7.
7. Römmling U, Balsalobre C. Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies. *Journal of internal medicine*. 2012;272(6):541-561.
8. Schwarzer S, James GA, Goeres D, Bjarnsholt T, Vickery K, Percival SL, et al. The efficacy of topical agents used in wounds for managing chronic biofilm infections: A systematic review. *Journal of Infection*. 2020;80(3):261-270.
9. Maistrenko L, Iungin O, Pikus P, Pokholenko I, Gorbatiuk O, Moshynets O, et al. Collagen Obtained from Leather Production Waste Provides Suitable Gels for Biomedical Applications. *Polymers*. 2022;14(21):4749.
10. Kemp PD. Tissue engineering and cell-populated collagen matrices. *Extracellular Matrix Protocols*. 2000;287-293.
11. Moshynets OV, Baranovskyi TP, Iungin OS, Kysil NP, Metelytsia LO, Pokholenko I, et al. eDNA inactivation and biofilm inhibition by the PolymericBicide polyhexamethylene guanidine hydrochloride (PHMG-Cl). *International journal of molecular sciences*. 2022;23(2):731.
12. Lastovetska L, Maslak V, Iungin O. Combined antibiotic therapy carried in collagen matrix for opportunistic pathogens treatment. Abstracts of 65th International Conference for students of Physics and Natural Sciences open Readings; 2022 March 15-18; Vilnius, Lithuania; 2022. p. 345.
13. Xu C, Akakuru OU, Ma X, Zheng J, Wu A. Nanoparticle-based wound dressing: recent progress in the detection and therapy of bacterial infections. *Bioconjugate Chemistry*. 2020;31(7):1708-1723.
14. Simpson FC, Islam MM, Buznyk O, Edin E, Groleau M, Kozak-Ljunggren M, et al. Electron-Beam Irradiated Recombinant Human Collagen-Phosphorylcholine Corneal Implants Retain Pro-Regeneration Capacity. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2022;10:883977.
15. Grandis RAD, Miotto LN, Genaro LE, Migliatti Polli L, Plepis AMDG, Rodrigues FT, et al. In Vitro evaluation of acellular collagen matrices derived from porcine pericardium: Influence of the sterilization method on its biological properties. *Materials*. 2021;14(21):6255.
16. Ionescu OLF, Mocanu AG, Neacsu IA, Ciocilteu MV, Rău G, Neamtu J. Biocompatibility Studies on a Collagen-Hydroxyapatite Biomaterial. *Current Health Sciences Journal*. 2022;48(2):217.
17. Ryan EJ, Ryan AJ, González-Vázquez A, Philippart A, Ciraldo FE, Hobbs C, et al. Collagen scaffolds functionalised with copper-eluting bioactive glass reduce infection and enhance osteogenesis and angiogenesis both in vitro and in vivo. *Biomaterials*. 2019;197:405-416.

АНТИБІОПЛІВКОВИЙ ЕФЕКТ МАТЕРІАЛУ, РОЗРОБЛЕНОГО НА ОСНОВІ КОЛАГЕНУ, ДЛЯ ЛІКУВАННЯ РАНЕВИХ ПОВЕРХОНЬ

Маслак В. І., Калініченко О. О., Охмат О. А., Котляр М. М., Юнгін О. С.

Резюме. Війна в Україні та необхідність забезпечення військового персоналу передовими матеріалами для першої допомоги створюють передумови для розробки матеріалів нового покоління для лікування ран. Ці матеріали повинні мати антибактеріальні властивості та біополімерну основу. Шкіряна промисловість виробляє величезні кількості відходів, які можуть бути використані для екстракції колагену – біополімеру, що широко викорисовується в косметології та медицині. У продуктах для загоєння ран, колаген виконує функцію не тільки бар'єру, що відокремлює поверхню рани від небажаного зовнішнього середовища, але й значно сприяє виробленню фібробластів та може діяти як носій антимікробних сполук. Метою нашого дослідження було визначення антимікробної ефективності колагенового матеріалу, отриманого з відходів шкіряної промисловості, розробленого для перев'язування ран. Колаген, вилучений з відходів шкіряної промисловості, був використаний як основа для розробки матеріалу для перев'язування ран. Процедура стерилізації була адаптована протоколу стерилізації хлороформом. Поєднання двох антибіотиків – азитроміцину (AZM) та хлорамфеніколу (CAP) – було протестовано як антимікробну частину матеріалу для перев'язування ран та виявлено її дію щодо попередження росту та утворення біоплівки збудників опортуністичних інфекцій *S. aureus* ATCC 25923 та *P. aeruginosa* PA01. Розроблений колагеновий матеріал для перев'язування ран успішно інгібував утворення біоплівки у Грам-позитивних і Грам-негативних штамів. Використання хлороформу для стерилізації колагену знизило рівень прикріплення клітин обох досліджуваних штамів і може розглядатися як метод боротьби з обростанням поверхні. Розроблений колагеновий матеріал для перев'язування ран з антимікробним ефектом може бути використаний для лікування ран у подальших клінічних дослідженнях.

Ключові слова: колагеновий матеріал, рани, біоплівки, антимікробні речовини.

ANTIBIOFILM EFFECT OF COLLAGEN-BASED MATERIAL DEVELOPED FOR WOUND DRESSING

Maslak V. I., Kalinichenko O. O., Okhmat O. A., Kotlyar M. M., Iungin O. S.

Abstract. The war in Ukraine and the necessity to provide military personnel with advanced first-aid materials create prerequisites for the development of novel next-generation materials for wound treatment. These materials should possess antibacterial effect and likely have a biopolymeric basis. Leather industry produces tremendous amounts of collagen-containing waste that could be recycled for collagen obtaining. Collagen is a biopolymeric substance widely used in cosmetology and for medical purposes as well. In wound healing products, collagen serves not only as a barrier to separate the wound surface from the unfavourable external environment but also significantly enhances fibroblast production, as well as acts as a carrier for antimicrobial compounds. The aim of our study was to test antimicrobial effectiveness against opportunistic bacteria of collagen-based material obtained from leather industry waste developed for wound dressing. Collagen extracted from leather industry waste was used as a base for wound dressing material development. Sterilization procedure was adapted from described chloroform proto-

КЛІНІЧНА ТА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА МЕДИЦИНА / CLINICAL AND EXPERIMENTAL MEDICINE

col. The combination of two antibiotics – azithromycin (AZM) and chloramphenicol (CAP) was tested as antimicrobial part of dressing material for preventing growth and biofilm formation of opportunistic bacteria *S. aureus* ATCC 25923 and *Paeruginosa* PA01. Developed wound dressing collagen-based material successfully inhibited biofilm development of both Gram-positive and Gram-negative infection agents. The use of chloroform sterilization for collagen preparation successfully reduced cell attachment level of both studied strains and could be considered as anti-fouling approach for wound dressing material preparation. Developed collagen-based wound dressing with antimicrobial and antibiofilm effects could be used for wound treatment in further clinical studies.

Key words: collagen dressing, wounds, biofilms, antimicrobials.

ORCID and contributionship:

Maslak V. I.: [0009-0001-3516-2283](https://orcid.org/0009-0001-3516-2283)^{BC}
 Kalinichenko O. O.: [0009-0008-4188-9914](https://orcid.org/0009-0008-4188-9914)^{BC}
 Okhmat O. A.: [0000-0003-0927-8706](https://orcid.org/0000-0003-0927-8706)^{AED}
 Kotlyar M. M.: [0009-0008-0217-7578](https://orcid.org/0009-0008-0217-7578)^{BC}
 Iungin O. S.: [0000-0001-8876-6075](https://orcid.org/0000-0001-8876-6075)^{AED}

Conflict of interests:

There is no conflict of interest referring to this research.

Corresponding author

Iungin Olga Serhiyivna
 Kyiv National University of Technologies and Design
 Ukraine, 01011, Kyiv, 2 Mala Shiyanovska str.
 Tel.: 0939822644
 E-mail: olgaungin@gmail.com

A – Work concept and design, B – Data collection and analysis, C – Responsibility for statistical analysis, D – Writing the article, E – Critical review, F – Final approval of the article

Received 20.03.2023
Accepted 28.08.2023

ДОДАТОК Б

COMBINED ANTIBIOTIC THERAPY CARRIED IN COLLAGEN MATRIX FOR OPPORTUNISTIC PATHOGENS TREATMENT

Liudmyla Lastovetska¹, Valeria Maslak¹, Olga Iungin^{1,2*}

¹Department of Biotechnology, Leather and Fur, KNUTD, Ukraine

²Biofilm study group, Institute of Molecular Biology and Genetics, Ukraine
olgaungin@gmail.com

The optimal deployment of antibiotics is a key treatment for wounds complicated with opportunistic infections. The most common infectious agents in such cases are *Staphylococcus*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Enterococcus* species. The pathogenesis of many orthopedic infections is associated with biofilms which are more resistant to antimicrobials compare to planktonic cells [1]. Collagen is a fibrillar protein used in drug delivery systems to treat burns and wounds, in gel compositions in combination with antibiotics and other antimicrobials [2].

The aim of the study was to determine the effectiveness of antibiotics chloramphenicol (CAP) and azithromycin (AZM) in collagen matrix against opportunistic pathogens. The effect of phenolic antibiotic chloramphenicol (CAP) and macrolide antibiotic azithromycin (AZM) on both gram-negative (*Pseudomonas*, *Klebsiella* sp.) and gram-positive (*Staphylococcus* sp.) species. was studied.

Methods. Collagen was extracted from leather production wastes as described [3], washed in deionized water and filtered with 0.22 µm syringe filter. The 96-well microtiter plate assay was used. The overnight cultures (NB, HiMedia Ltd.) of laboratory strains *P.aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *S. aureus* were inoculated (1:10 ratio) in plates contained collagen matrices with CAP ethanol solution (1-30 µg/ml) and AZM water solution (1-30 µg/ml). And 70% ethanol was used as positive control. The strains were cultivated 24 hours at 37°C. The OD₆₀₀ was measured and the crystal violet assay was applied.

Results. 30 µg/ml of AZM completely inhibited planktonic cultures of *S. aureus* laboratory strains and hospital isolates (non methicillin-resistant). The synergistic effect of joint antibiotics use was observed in biofilm inhibition. Thus, CAP in combination with AZM successfully reduced bacterial cells surface attachment and biofilm formation. The most effective combination of AZM+CAP in equal concentrations (30+30 µg/ml) was chosen for further development of wound topical.

[1] Ciofu, O., Rojo- Molinero, E., Macià, M. D., & Oliver, A. *Antibiotic treatment of biofilm infections*. *Apms*, 125(4), 304-319 (2017).

[2] Zhu, S., Yuan, Q., Yin, T., You, J., Gu, Z., Xiong, S., Hu, Y. *Self-assembly of collagen-based biomaterials: preparation, characterizations and biomedical applications*. *Journal of Materials Chemistry B*, 6 (18), 2650-2676 (2018).

[3] Maistrenko, L., Iungin, O., Savchuk, O., Okhmat, O. *Collagen matrices from leather industry wastes for biomedical application*, ICAMS Proceedings of the International Conference on Advanced Materials and Systems, 195-200 (2020).