

**ПЕРСПЕКТИВНІ МАТЕРІАЛИ
ТА ІННОВАЦІЙНІ ТЕХНОЛОГІЇ:
БІОТЕХНОЛОГІЯ, ПРИКЛАДНА
ХІМІЯ ТА ЕКОЛОГІЯ**

Колективна монографія

Київ
«Світ Успіху»
2020

УДК 60+54+675.6.01](02)

П27

*Рекомендовано до видання
Вченою радою Київського національного університету
технологій та дизайну МОН України
Протокол № 7 від 29.05.2020 р.*

Рецензенти:

Чумак Віталій Лукич — доктор хімічних наук, професор, завідувач кафедри хімії і хімічної технології Національного авіаційного університету.

Кузьмінський Євген Васильович — доктор хімічних наук, професор, завідувач кафедри екобіотехнології та біоенергетики Національного технічного університету України «Київський політехнічний інститут імені Ігора Сікорського».

П27 Перспективні матеріали та інноваційні технології: біотехнологія, прикладна хімія та екологія : колективна монографія / за заг. ред. О. Р. Мокроусової. Київ : Світ Успіху, 2020. 492 с.

ISBN 978-617-7324-38-5

Колективна монографія відображає результати актуальних наукових досліджень, розроблень, апробацій та практичного застосування у галузі біотехнології, хімічної технології шкіри та хутра, екології та товарознавства шкіряно-хутрової продукції.

Розглянуто питання розроблення та створення нових речовин та матеріалів для хімічних і біотехнологій, удосконалення процесів перероблення сировини біогенного походження, започаткування принципів раціонального природокористування та ресурсозбереження у технологіях виробництва шкіри та хутра, екологічних аспектів виробництва різнофункціональних матеріалів, удосконалення методів очищення промислових стоків, розширення асортименту та підвищення якості натуральних і синтетичних шкір.

Колективна монографія рекомендується для студентів, аспірантів, дослідників, науковців та експертів, що спеціалізуються у галузі біотехнології, хімічної технології та екології.

ISBN 978-617-7324-38-5

© КНУТД, 2020

© Світ Успіху, 2020

*Recommended for publication
by the Academic Council of Kyiv National University
of Technologies and Design of Ministry
of Education and Science of Ukraine
Protocol № 7 dated May 29 2020.*

Reviewers:

Chumak Vitaly Lukich — Doctor of Chemistry, Professor, Head of the Department of Chemistry and Chemical Technology of National Aviation University

Kuzminskiy Yevgeniy Vasylyovych — Doctor of Chemistry, Professor, Head of the Department of Ecobiotechnology and Bioenergy of National Technical University of Ukraine «Igor Sikorsky Kyiv Polytechnic Institute»

Advanced materials and innovative technologies: Biotechnology, Applied Chemistry and Ecology : collective monograph / edited by Olena Mokrousova. Kyiv : Svit Uspichu, 2020. 492 p.

ISBN 978-617-7324-38-5

The collective monograph summarizes the results of current scientific research, development, testing and application in the fields of biotechnology, chemical technology of leather and fur, ecology and commodity science of leather and fur products. It is discussed the issues of development of new substances and materials for chemical and biotechnologies as well as improvement of biogenic raw materials processing along with the principles of rational environmental management and resource conservation in leather and fur technologies. Moreover, the ecological aspects of production of various functional materials, improvement of industrial wastewater treatment methods, expansion range and increasing the quality of natural and synthetic leathers were also considered.

Collective monograph is recommended for undergraduates and graduated students, researchers, scientists and experts in biotechnology, chemical technology and ecology.

ЗМІСТ

ВСТУП.....	8
РОЗДІЛ 1. БІОТЕХНОЛОГІЯ.....	21
1.1 Розробка біотехнологічних продуктів на основі відходів колагенвмісної сировини.....	22
Ціла О. О., Ракша Н. Г., Галенова Т. І., Вовк Т. Б., Савчук О. М., Мокроусова О. Р., Остапченко Л. І.	
1.2 Alkaline and enzymatic keratin hydrolysates obtained from sheep wool.....	37
Mariana Daniela Berechet, Carmen Gaidau, Maria Stanca, Demetra Simion, Cosmin Alexe, Dana Gurau, Maria Râpă, Marius Becheritu	
1.3 The influence of surfactants in the context of novel biotechnologies, for elastin membrane preparation	54
Demetra Simion, Carmen Gaidau, Gabriela Paun, Daniela Berechet, Olga Niculescu, Maria Stanca	
1.4 К вопросу о возможности использования краевой обрезки лап северного оленя для получения белкового гидролизата...63	
Шалбуев Дм. В., Раднаева В. Д., Советкин Н. В.	
1.5 Отримання продуцента рекомбінантного фактора росту ендотелію судин.....	74
Окунев О. В., Горбатюк О. Б., Похолоenko Я. О., Іродов Д. М., Кордюм В. А.	
1.6 Біоактивні пептиди молозива як складові компоненти потенційного поліфункціонального парафармацевтика	80
Лич І. В., Моцар А., Волошина І. М.	
1.7 Регуляція клітинного циклу GC-1 spg I GC-2 spd	105
Шемедюк Н. П.	

1.8 Тіосульфонати: шляхи їх синтезу та перспективи застосування.....	116
Монька Н. Я., Василюк С. В., Баранович Д. Б., Стадницька Н. Є., Паращин Ж. Д., Хоміцька Г. М., Шиян Г. Б., Комаровська-Порохнявець О. З., Гавриляк В. В., Швед О. В., Мартирисян І. А., Бочарова О. В., Новіков В. П., Лубенець В. І.	
1.9 Біотехнологія калусної біомаси як метод збереження біорізноманіття лікарських рослин.....	137
Петріна Р. О., Загородня Д. С., Ільків Б.-В. В., Суберляк С. А., Князева К. С., Гавриляк В. В.	
1.10 Нанокосметика: плюси та мінуси	146
Гавриляк В. В., Федорова О. В., Петріна Р. О.	
1.11 Бактериоцини, синтезируемые <i>Lactobacillus</i>	158
Волошина І. Н., Красинько В. О., Бойко Т. О., Льч І. В., Шкотова Л. В.	
1.12 Основні ресурси хітину і хітозану грибного походження...178	
Нікітіна О. О., Нікіфорова Д. О.	
1.13 Біолюмінесцентне тестування та особливості тест-систем на основі люмінесцентних бактерій	188
Кондратюк О. О., Сидоренко Д. В., Грецький І. О.	
1.14 Сучасні біотехнологічні методи отримання колагену...198	
Шидловська О. А.	
1.15 Особливості виділення колагену біомедичного призначення зі шкір ссавців	212
Майстренко Л. А.	
1.16 Особливості функціонування колагену в процесі загоєння ран	224
Юнгін О. С.	
1.17 Біотехнологічні аспекти розробки вірусних вакцинних препаратів	232
Жолобак Н. М.	

РОЗДІЛ 2. ПРИКЛАДНА ХІМІЯ	243
2.1 Articles made of sheep fur with therapeutic properties	244
Olga Niculescu, Carmen Gaidau, Demetra Simion, Mariana Daniela Berechet, Dana Gurau	
2.2 Бесхромовое дубление в присутствии солей цинка	254
Чурсин В. И.	
2.3 О возможности укрепления кожной ткани пушно-мехового сырья соединениями олигомерного характера	264
Островская А. В., Латфуллин И. И., Шагивалиева Р. Р., Щелокова В. С.	
2.4 Исследование влияния анионного ПАВ на подготовительные процессы обработки шкур кролика	275
Лутфуллина Г. Г., Петрова С. А., Хайрутдинова Р. И.	
2.5 Обработка меха высокочастотной плазмой пониженного давления	282
Баллыев С. Б., Шарифуллин Ф. С., Вознесенский Э. Ф.	
2.6 Оценка смачивающей способности композиций ПАВ	289
Лутфуллина Г. Г., Хайрутдинова Р. И., Петрова С. А.	
2.7 Исследование влияния плазменной модификации на гигиенические свойства кожи из шкур камбалы	296
Шорохов А. А., Тихонова В. П., Рахматуллина Г. Р., Туканова С. Х., Осетрова И. А.	
2.8 Підвищення ефективності рідинного оздоблення велюру шляхом застосування модифікованих дисперсій монтмориленіту	305
Охмат О. А., Бондарева А. О., Мокроусова О. Р.	
2.9 Застосування модифікованих дисперсій монтмориленіту у хромзбережному дубленні шкір	314
Жалдак М. П., Мокроусова О. Р.	

2.10 Екологічно орієнтована технологія виготовлення гідрофобізованого хутрового велюру	334
Данилкович А. Г., Романюк О. О., Ліщук В. І.	
2.11 Вплив старіння на властивості шкір, виготовлених із використанням полімерних матеріалів на основі ненасичених карбонових кислот під час рідинного оздоблення	352
Майстренко Л. А., Андреева О. А., Мережко Н. В.	
РОЗДІЛ 3. ЕКОЛОГІЯ ТА ТОВАРОЗНАВСТВО ШКІРИ І ХУТРА ..	371
3.1 Технологія очищення стічних вод фармацевтичних підприємств від антибіотиків.....	372
Саблій Л. А., Жукова В. С.	
3.2 Біологічне очищення висококонцентрованих стічних вод шкіряного виробництва	384
Ребрикова П. А., Мокроусова О. Р.	
3.3 Вдосконалення методів очищення стічних вод від іонів хрому	393
Сакалова Г. В., Василінич Т. М., Петрук Г. Д.	
3.4 Товарознавча експертиза півпальто з хутряного велюру, що перебувало в експлуатації.....	407
Омельченко Н. В., Браїлко А. С., Лисенко Н. В.	
3.5 Модифіковані волокнисто-сітчасті матеріали типу «шкіркартон» на основі колагену та целюлози.....	422
Фордзюн Ю. І., Андреева О. А.	
3.6 Дослідження пластичності та формостійкості шкір, виготовлених за різних умов рідинного оздоблення.....	432
Первая Н. В., Андреева О. А.	
3.7 Стан ринку дитячого взуття та натуральних шкір для його виготовлення.....	441
Жалдак М. П., Мокроусова О. Р.	
3.8 Екошкіра: фейки та реальність	459
Касьян Е. Є.	

1.1 РОЗРОБКА БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ПРОДУКТІВ НА ОСНОВІ ВІДХОДІВ КОЛАГЕНВМІСНОЇ СИРОВИНИ

Ціла О. О.¹, Ракша Н. Г.¹, Галенова Т. І.¹, Вовк Т. Б.¹,
Савчук О. М.¹, Мокроусова О. Р.², Остапченко Л. І.¹

¹ Навчально-науковий центр «Інститут біології та медицини»
Київського національного університету імені Тараса Шевченка, Україна

² Київський національний університет технологій та дизайну, Україна
olena.tsila14@gmail.com, nkudina@ukr.net,
galenovatanya@gmail.com, sanwoolf01@gmail.com,
olexiy.savchuk@ukr.net, decanat_bf@univ.kiev.ua

Найбільш оптимальною сировиною для отримання біотехнологічних продуктів на основі колагену є відходи шкіряної промисловості. Мінімальна концентрація колагену, що викликає агрегацію тромбоцитів на рівні 70–80 %, становить 0,045 мг/мл для зразків колагену зі шкіри та 0,293 мг/мл для колагену, одержаного з хвостів щурів. Обидва зразки колагену зберігали здатність до полімеризації у першому і другому розчиненні та утворювали міцні колагенові гелі. Колаген, одержаний із луски риб, не виявляв агрегуючої активності, а здатність до полімеризації була виявлена лише у зразках після першого розчинення. Зберігання зразків колагену впродовж 20 діб при +4 °С не впливало на їх здатність викликати агрегацію тромбоцитів.

Ключові слова: колагенвмісна сировина, агрегуюча здатність, колагенові гелі

Колаген є основним компонентом сполучної тканини і одним із найпоширеніших білків, що набув широкого використання у медицині, біотехнології, косметичній та харчовій промисловості. Стабільний попит на цей біотехнологічний продукт спонукає до оптимізації методологічних підходів щодо його одержання та створення препаратів на основі колагену чи його фрагментів. Колаген можна отримувати з різних джерел, проте необхідно враховувати, що властивості колагену можуть помітно відрізнятися залежно від джерела сировини. На сьогодні основним джерелом фібрилярного колагену типу I є шкіра

тварин. Традиційно колаген виділяли зі шкіри великої рогатої худоби та свиней. До цих джерел останнім часом додалися морські організми, переважно риби. Цей тип колагену має певні комерційні та технологічні переваги. Окрім того відомо, що в деяких країнах продукти на основі сировини тваринного походження заборонені або важкодоступні, тому морський колаген є важливою альтернативою [1].

Колагени є найбільш поширеними білками в позаклітинному матриксі та забезпечують механічну міцність судинної стінки. Після пошкодження судини колагени зв'язуються з рецепторами тромбоцитів, активують подальшу адгезію тромбоцитів і їх агрегацію, а також ініціюють шлях коагуляції. Через свою здатність індукувати агрегацію тромбоцитів, колаген став необхідним складником тест-систем для діагностики патологій системи гемостазу, зокрема її тромбоцитарного компоненту [2, 3]. Тест на агрегацію тромбоцитів дозволяє діагностувати тромбоцитопатії (наприклад, хвороба Віллебранда, тромбастенія Гланцмана, синдром Бернарда-Сульє), виявляти ризики кровотеч, тромбофілії, проводити моніторинг антиагрегантної терапії та підбір оптимальних доз антиагрегантів.

Колаген у вигляді волокон і губок давно застосовують як гемостатичний агент. Використання колагену як гемостатика можливе завдяки властивості тромбоцитів зв'язуватися з колагеном, що ініціює процес згортання крові. Колагенові матриці можуть поглинати у декілька разів більше рідини ніж їх власна вага і є ефективними для підтримки тканин. Важливо, що колаген і колагенові пептиди є частиною природного механізму загоєння рани, що є істотною перевагою над матеріалами, які використовуються в інших комерційно доступних продуктах (марля, гідроколоїди, альгінати та ін.) [4]. Також колагенова матриця може стати каркасом для росту нової тканини, так як первинна структура колагену надає сайти для приєднання фібробластів [5]. Ці переваги набувають усе більшого значення у медицині, оскільки гемостатичні агенти на основі колагену використовують із все більшою складністю у процедурах,

пов'язаних із відновленням селезінки, лапароскопією, гінекологією та оральною хірургією [6, 7].

Колаген має слабку імуногенність, частково за рахунок його філогенетично консервативної амінокислотної послідовності і спіральної структури. Значна кількість імунологічних досліджень була проведена на матеріалах клінічного використання, таких як ін'єкційні колагени та імплантовані колагенові губки. У результаті було підтверджено, що до колагену типу I утворюється невелика кількість антитіл або вони взагалі не утворюються.

Колаген має високу міцність на розрив, низьку розтяжність, волоконну орієнтацію, низьку антигенність [8] і сприяє клітинній адгезії, проліферації і диференціюванню. Завдяки цим властивостям колаген став одним із найбільш використовуваних біоматеріалів. Фібрилярний колаген типу I, екстрагований у вигляді водного розчину або гелю, можуть використовувати в різних формах, таких як медичні пристрої, штучні імпланти, матриці для регенерації тканин, системи доставки ліків та наноматеріали, що відіграють важливу роль у сучасній медичній практиці. Позитивні ефекти колагену на регенерацію тканин та його взаємодія з клітинами є основною причиною інтересу до його використання для місцевої терапії уражених тканин або утворення нової тканини, наприклад шкіри, кісток або нервів. Колаген у чистому вигляді розглядають як препарат/активний інгредієнт, що використовують у різних формах як гемостатичний і перев'язувальний матеріал при лікуванні різних видів травм. Регенеративно-індуктивні якості визначають використання колагену як замітника шкіри. Позитивні ефекти колагену на регенерацію тканин та його взаємодія з клітинами є основною причиною інтересу до його використання для місцевої терапії уражених тканин або утворення нових тканин, наприклад шкіри, кісток або нервів, з використанням матриці на основі колагену. Однак колаген не може вилікувати інфіковані тканини самостійно, оскільки існує велика кількість бактерій, які можуть використовувати його як субстрат [9]. Колагенові гелі та філаменти застосовують для стимулювання регенерації периферичних нервових волокон. Колагеновий гель

можна використовувати для заповнення внутрішнього простору венозного трансплантата, щоб запобігти його руйнуванню і підвищити ефективність відновлення нервових волокон. У заповнених колагеном венних трансплантатах кількість і діаметр мієлінізованих аксонів значно збільшується порівняно з трансплантатами без колагенового гелю [10].

Останні тенденції розвитку наномедицини зосереджені на білкових субодинацях, здатних до самоорганізації. У цьому контексті, колаген, основний компонент позаклітинного матриксу, є перспективним матеріалом для розробок засобів доставки ліків, а також терапевтичного застосування, оскільки він здатний утворювати гідрогелі без використання хімічного зшивання, є багатофункціональним та біодеградуючим [11]. Мікрочастинки колагену можуть бути використані як носії для ліпофільних лікарських засобів, наприклад ретинолу, третіноїну або тетракаїну і лідокаїну у вільній формі. Іншою особливістю колагенових мікрочастинок є їх термічна стабільність, тому вони легко піддаються стерилізації [12].

Отже, враховуючи значний медичний та діагностичний потенціал колагену як біотехнологічного продукту, оптимізація методик його отримання та зниження вартості виготовлення препаратів на його основі є актуальним напрямом сучасних біотехнологічних досліджень.

Метою дослідження було дослідити властивості колагенів, одержаних із відходів шкіряної промисловості, луски риб та хвостів щурів, як потенційно перспективних матеріалів для створення біотехнологічних продуктів.

Для досягнення мети були сформульовані наступні завдання:

1. Оцінити здатність колагенів, одержаних із різних джерел, індукувати агрегацію тромбоцитів *in vitro*.

2. Перевірити стабільність одержаних зразків колагену за різних умов.

3. Підібрати оптимальні умови для утворення колагенових гелів із відповідними механічними властивостями.

4. Порівняти агрегуючу та гелеутворюючу здатність колагенів, одержаних із різних джерел.

5. Обґрунтувати економічну доцільність одержання колагену.

Матеріали та методи. Для одержання колагену вихідну сировину (відходи шкіряної промисловості, луска риб та хвості щурів) ретельно промивали у холодній воді, після чого заливали 20 % розчином NaCl і залишали на добу для осадження неколагенових білків. Розчин солі зливали, а сировину декілька разів промивали дистильованою водою. Для екстракції колагену використовували 0,5 М оцтову кислоту з додаванням 5 мМ ЕДТА, яку змішували з сировиною у співвідношенні 1:10 (маса/об'єм). Через 24 години розчин фільтрували для очищення від нерозчинних часток та висолювали шляхом додавання NaCl до кінцевої концентрації 0,9 М. Білки відділяли фільтруванням. Отриманий осад розчиняли в 0,5 М оцтовій кислоті та повторно осаджували 0,9 М NaCl. Отриманий на цьому етапі осад розчиняли у мінімальному об'ємі 0,1 М оцтової кислоти та ліофілізували.

Для використання в експериментах ліофілізований колаген розчиняли в 0,01 М оцтовій кислоті у співвідношенні 20 мг ліофілізату на 1 мл і залишали на 24 години. Нерозчинний залишок відділяли шляхом центрифугування та повторно розчиняли в тому самому об'ємі оцтової кислоти.

Чистоту одержаного колагену перевіряли методом одновимірного диск-електрофорезу у 6 % поліакриламідному гелі за присутності додецилсульфат натрію.

Дослідження агрегації тромбоцитів. Плазму крові отримували згідно з методикою [13]. Плазму, збагачену тромбоцитами (ПЗТ), одержували центрифугуванням стабілізованої крові при 150 g упродовж 10 хв. Плазму крові, «бідну» на тромбоцити (ПБТ), отримували шляхом подальшого центрифугування ПЗТ при 2500 g упродовж 20 хв.

Тест на агрегацію тромбоцитів проводили на фотооптичному агрегометрі АТ-02 (Медтех, РФ). Перед дослідженням визначали кількість тромбоцитів у ПЗТ і за необхідності розводили її за допомогою ПБТ до концентрації 250×10^3 тромбоцитів/мкл. Як контроль вимірювали ступінь агрегації при внесенні до ПЗТ

індуктора АДФ у кінцевій концентрації 5×10^{-6} М. У кювету агрегометра вносили 360 мкл ПЗТ і зразок колагену в об'ємі 20 мкл та стежили за процесом агрегації, оцінюючи ступінь агрегації (максимальний рівень світлопропускання ПЗТ після внесення зразка).

Приготування колагенових гелів. Колагенові гелі готували згідно з методикою [14] з деякими модифікаціями. До розчину колагену додавали 10-кратний розчин трис-сольового буферу, рН 7,4 так, щоб буферний розчин становив 1/10 частину від загального об'єму, і ретельно перемішували. Далі рН розчину доводили до 7,0–8,0 0,5 М NaOH. Суміш інкубували в термостаті при 37 °С упродовж 30 хв. Для знаходження мінімальної концентрації колагену, при якій відбувається гелеутворення, окрім вихідних розчинів тестували розчини колагену у двох-, трьох- та п'ятикратному розведенні.

Результати дослідження. Агрегуючу здатність колагену перевіряли у зразках, одержаних із трьох джерел: відходів шкіряної промисловості («Шкіра»), луски риб («Луска») та хвостів щурів («Хвости») відповідно до модифікованої нами методики [15]. Концентрація колагену у вихідному розчині становила 0,687 мг/мл, 0,880 мг/мл та 0,646 мг/мл відповідно для зразків колагену зі шкіри, хвостів щурів та луски риб (табл. 1).

Використання вихідних зразків колагену викликало 70 % агрегації тромбоцитів у випадку зразків колагену зі шкіри і 75 % — при використанні колагену із хвостів щурів. Колаген, одержаний із луски риб, не виявляв агрегуючої здатності.

Таблиця 1 — Концентрація колагену у досліджуваних зразках

Зразки	Концентрація у вихідному розчині, мг/мл	Мінімальна концентрація, що викликає агрегацію тромбоцитів, мг/мл
«Шкіра»	0,687	0,045
«Хвости»	0,880	0,293
«Луска»	0,646	Немає

Колаген, виділений зі шкіри, виявився більш ефективним і обумовлював агрегацію тромбоцитів на рівні 70 % навіть при розведенні у 15 разів (рис. 1).

Для визначення мінімальної концентрації колагену, здатної викликати агрегацію, вихідні розчини послідовно розводили до концентрації, за якої ще реєструвався вплив на процес агрегації тромбоцитів. Колаген із хвостів щурів було розведено вдвічі, втричі та у п'ять разів, при цьому за розведення вдвічі та втричі ступінь агрегації тромбоцитів становив 70 % (табл. 2).

Отже, було встановлено, що мінімальна концентрація колагену, що викликає агрегацію тромбоцитів, становить 0,293 мг/мл для колагену, одержаного з хвостів щурів, та 0,045 мг/мл для зразків колагену зі шкіри.

На наступному етапі розведені зразки колагену, що виявляли агрегуючу активність, було розфасовано на аліквоти об'ємом 1 мл та ліофілізовано. Частину ліофілізатів розчиняли в 1 мл оцтової кислоти, іншу — в 1 мл дистильованої води, після чого проводили повторний тест на агрегацію. Зразок колагену зі шкіри, розчинений в оцтовій кислоті, та колаген із хвостів в обох розчинниках зберегли здатність викликати

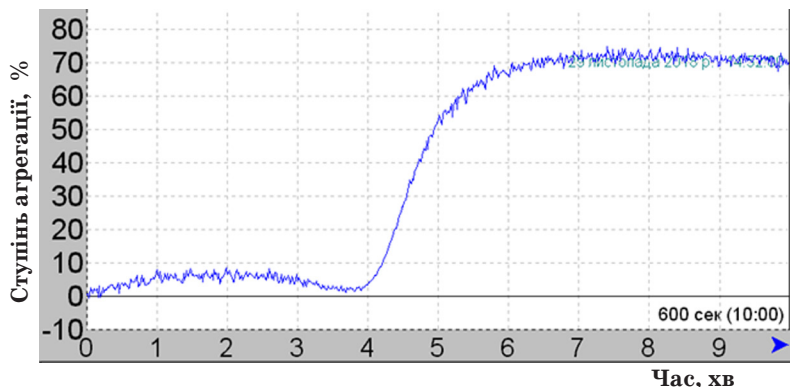


Рисунок 1 — Агрегатограма, що відображає вплив колагену, одержаного з відходів шкіряної промисловості (розведення у 15 разів), на агрегацію тромбоцитів

агрегацію тромбоцитів, у той час як розчинення колагену зі шкіри у дистильованій воді призвело до втрати агрегуючої здатності (табл. 3).

Експеримент повторили після зберігання зразків колагену у холодильнику впродовж 20 днів. Як бачимо з таблиці 3, зберігання зразків за вище описаних умов не вплинуло на здатність колагену викликати агрегацію тромбоцитів. Агрегуюча активність зберігалась також при розведенні колагену з хвостів удвічі дистильованою водою.

Чистоту зразків колагену, що викликають агрегацію тромбоцитів, було перевірено методом електрофорезу у 6 % поліакриламідному гелі. На рис. 2 наведено типову електрофореграму на прикладі колагену з хвостів щурів.

Відповідно до результатів електрофоретичного аналізу, колаген не містить сторонніх домішок та неколагенових білків. Присутність фрагментів з молекулярною масою близько 117 та 107 кДа, що за молекулярною масою відповідають $\alpha 1$ - та $\alpha 2$ -ланцюгам колагену I типу, дозволяє говорити про належність одержаного колагену саме до цього типу.

Таблиця 2 — Вплив зразків колагену у різних розведеннях на агрегацію тромбоцитів

Зразки	Наявність агрегації	Ступінь агрегації
«Луска»	–	0 %
«Хвости»	+	75 %
«Хвости» розведення у 2 р.	+	70 %
«Хвости» розведення у 3 р.	+	70 %
«Хвости» розведення у 5 р.	–	0 %
«Шкіра»	+	70 %
«Шкіра» розведення у 5 р.	+	73 %
«Шкіра» розведення у 10 р.	+	52 %
«Шкіра» розведення у 15 р.	+	70 %
«Шкіра» розведення у 20 р.	–	0 %

Таблиця 3 — Вплив зразків колагену на агрегацію тромбоцитів

Зразки	Наявність агрегації	Ступінь агрегації
<i>Зразки колагену після ліофілізації та розчинення у відповідних розчинниках</i>		
«Шкіра» у CH_3COOH	+	50 %
«Шкіра» у дистильованій воді	–	0 %
«Хвости» у CH_3COOH	+	68 %
«Хвости» у дистильованій воді	+	70 %
<i>Зразки колагену після зберігання упродовж 20 днів за +4 °С</i>		
«Шкіра» у CH_3COOH	+	48 %
«Шкіра» у дистильованій воді	–	0 %
«Хвости» у CH_3COOH	+	75 %
«Хвости» у дистильованій воді	+	77 %
«Хвости» у дистильованій воді (розведення у 2 р.)	+	82 %

Оптимізація умов утворення колагенових гелів. Для визначення оптимального протоколу утворення колагенових гелів було досліджено залежність процесу полімеризації колагену від концентрації білка, рН розчину та об'єму середовища полімеризації.

Передусім було визначено, що для формування гелю необхідно довести рН розчину до нейтрального або слабо лужного (рН 7–8). При розчиненні зразків колагену в 0,01 М оцтової кислоти у співвідношенні 20 мг ліофілізату на 1 мл кислоти частина колагену не розчинялась. Тому після відділення нерозчинної фракції шляхом центрифугування до неї додавали аналогічний об'єм оцтової кислоти. Так було отримано дві серії розчинів колагену (перше та друге розчинення), кожен з яких перевіряли на здатність до утворення гелю в об'ємі 1 мл.

Здатність до полімеризації була виявлена для зразків колагену, одержаних із відходів шкіряної промисловості та колагену

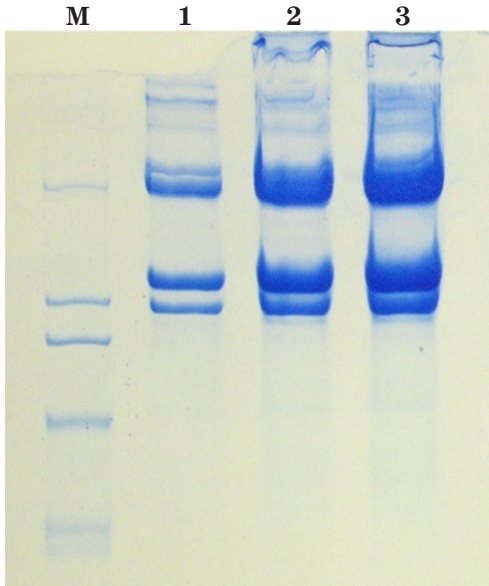


Рисунок 2 — Електрофореграма зразків колагену після ліофілізації та розчинення у дистильованій воді: М — маркери молекулярних мас (кДа); 1–3 — зразки колагену з хвостів щурів

з хвостів щурів, як у першому, так і у другому розчиненні; для колагену з луски риб ця здатність була виявлена лише у зразках після першого розчинення (табл. 4). Надалі методом послідовних розведень визначали мінімальну концентрацію білка, що необхідна для гелеутворення. Було перевірено розведення зразків колагену удвічі, утричі та у 5 разів, однак дієвим виявилось розведення удвічі для колагену зі шкіри та хвостів щурів; при розведенні колагену з луски риби утворення колагенового гелю не відбувалося.

На наступному етапі перевіряли здатність зразків колагену у мінімальній концентрації до полімеризації у більшому об'ємі (10 мл). Знову-таки, механічно міцний гель утворився з колагену, одержаного з відходів шкіряної промисловості та хвостів щурів, у той час як колаген із луски риб утворював нестійкий гель (рис. 3).

Таблиця 4 — Концентрація колагену у різних зразках при першому та другому розчиненні

Колаген	Концентрація, мг/мл	Мінімальна концентрація, необхідна для утворення гелю, мг/мл
<i>Перше розчинення</i>		
«Шкіра»	0,615	0,307
«Хвости»	0,615	0,307
«Луска»	0,179	Немає
<i>Друге розчинення</i>		
«Шкіра»	0,287	0,287
«Хвости»	0,822	0,411
«Луска»	0,080	Немає

Також було перевірено механічні властивості колагенових гелів (рис. 4). Для цього у розчин перед полімеризацією поміщували магніт, а після закінчення періоду інкубації спостерігали за здатністю гелю утримувати його. Встановлено, що шар гелю товщиною близько 2,5 см був здатний утримувати магніт.

Обґрунтування економічної доцільності процесу одержання колагену. Для встановлення економічної доцільності процесу

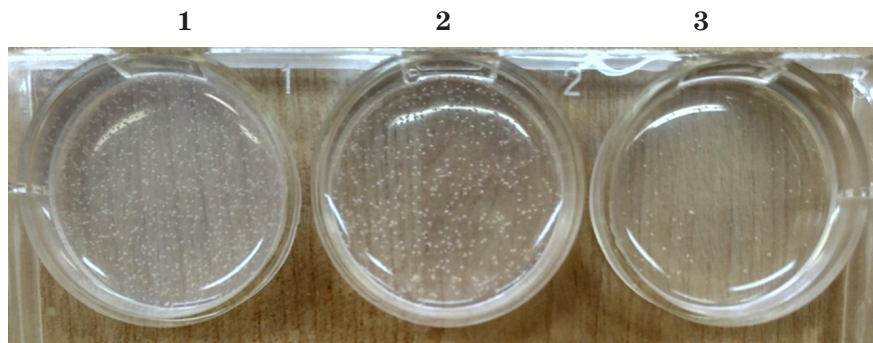


Рисунок 3 — Колагенові гелі, що утворились при полімеризації зразків колагену: 1 — колаген з відходів шкіряної промисловості; 2 — колаген з хвостів щурів; 3 — колаген з луски риб

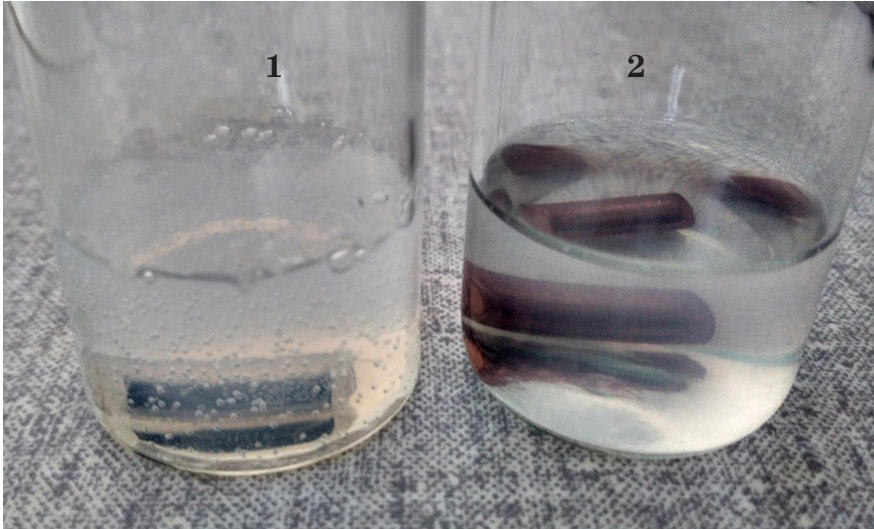


Рисунок 4 — Перевірка механічних властивостей колагенових гелів: 1 — колаген з відходів шкіряної промисловості; 2 — колаген із хвостів щурів

було проведено виділення колагену з вихідної сировини (відходи шкіряної промисловості) масою 0,5 кг та 1 кг. Отримані характеристики наведено у табл. 5.

Далі перевіряли здатність отриманого розчину колагену впливати на агрегацію тромбоцитів. Оскільки колаген після виділення знаходився у 0,1 М оцтовій кислоті, що може впливати на процес агрегації тромбоцитів, проводили діаліз для переведення його у 0,01 М оцтову кислоту.

Таблиця 5 — Кількість колагену, отриманого з вихідної сировини

Маса вихідної сировини, кг	Об'єм розчину колагену, мл	Концентрація колагену, мг/мл
0,5	265	8
1	580	6

Колаген, одержаний з 0,5 кг та 1 кг сировини, показав ступінь агрегації близько 50 % (рис. 5 і рис. 6), це нижче за попередні показники, оскільки концентрація колагену в розчині є меншою.

Отже, приблизна собівартість одного флакону продукту становить 8,92 грн (8615,12/966). Для порівняння, вартість

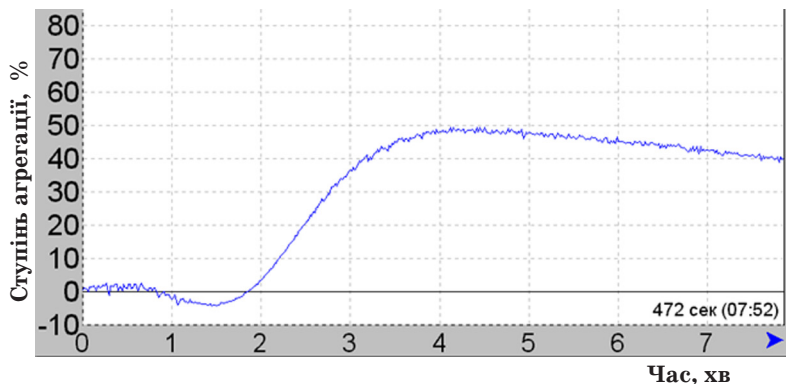


Рисунок 5 — Агрегатограма, що відображає вплив колагену, одержаного з 0,5 кг відходів шкіряної промисловості, на агрегацію тромбоцитів

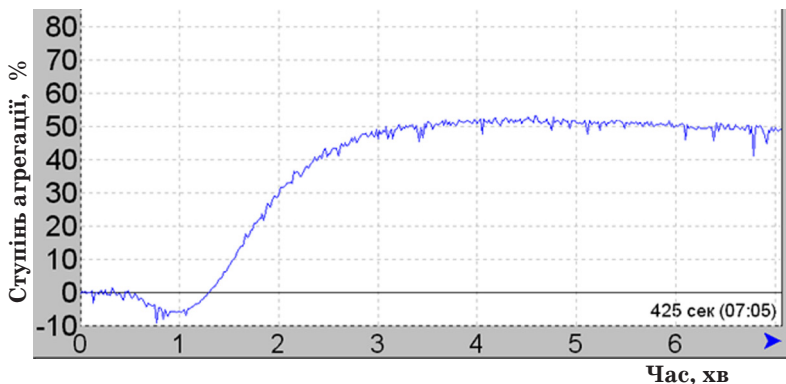


Рисунок 6 — Агрегатограма, що відображає вплив колагену, одержаного з 1 кг відходів шкіряної промисловості, на агрегацію тромбоцитів

флакону колагену, який використовують для дослідження агрегації тромбоцитів виробника «Ренам» (РФ) становить 154 грн. Очевидно, що до вартості отриманого нами продукту в процесі серійного виробництва і комерційної реалізації будуть додані інші групи витрат, однак значна різниця у ціні з препаратом іншого виробника гарантує конкурентоспроможність такого товару на ринку біотехнологічних продуктів.

Висновки. З огляду на те, що екстрагований колаген індукує процес агрегації тромбоцитів в умовах *in vitro*, він може використовуватись як компонент тест-систем для діагностики різних патологій системи гемостазу. Його перевагами є збереження активності після ліофілізації та тривалого зберігання у розчиненому стані, а також невелика концентрація білка, що викликає агрегацію.

За нейтрального/слабо лужного рН колагени з відходів шкіряної промисловості та хвостів щурів у визначеній мінімальній концентрації утворюють міцні гелі.

Після порівняння агрегуючої здатності колагенів з трьох досліджуваних джерел можна зробити висновок, що відходи шкіряної промисловості є найбільш оптимальним матеріалом для отримання біотехнологічних продуктів, оскільки вони доступні у великих кількостях, а цей тип колагену спричиняє високий ступінь агрегації (70–80 %) за найменшої концентрації серед усіх зразків. Крім того, він здатний утворювати гель зі сприятливими механічними властивостями для формування препаратів із гемостатичним ефектом у різноманітних лікарських формах.

Отже, зважаючи на відносну простоту виготовлення, доступність сировини та економічні показники процесу, матеріали, отримані за розробленою методологією, мають потенціал стати конкурентоспроможними товарами на ринку біотехнологічних продуктів. Оскільки як сировину для виділення колагену ми використовували відходи промисловості, одержані продукти матимуть меншу собівартість та сприятимуть ефективній утилізації відходів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Cherim, M., Mustafa, A., Cadar, E., Lupașcu, N., Paris, S. and Sirbu, R. (2016). Collagen Sources and Areas of Use. *European Journal of Interdisciplinary Studies*, 4(1), p. 122.
2. Manon-Jensen, T., Kjeld, N. and Karsdal, M. (2016). Collagen-mediated hemostasis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 14(3), pp. 438–448.
3. Fardale, R., Sixma, J., Barnes, M. and De Groot, P. (2004). The role of collagen in thrombosis and hemostasis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2(4), pp.561–573.
4. Wiseman, D., Pharm, M., Rovee, D. and Alvarez, O. (1992). Wound dressings: design and use. In: *Wound healing*. Cohen, I., Diegelmann, R., Lindblad, W., eds. Philadelphia: WB Saunders Company, pp. 562–580.
5. Dedhar, S. (1987). A cell surface receptor complex for collagen type I recognizes the Arg- Gly-Asp sequence. *The Journal of Cell Biology*, 104(3), pp. 585–593.
6. Dodla, M., and Bellamkonda, R. (2008). *Peripheral Nerve Regeneration. Principles of Regenerative Medicine*, pp. 1270–1285.
7. Mancuso, S. (1992). The use of lyophilized collagen in gynaecology. *International Journal of Tissue Reactions*, 14(1), pp. 35–37.
8. Goissis, G., Piccirili, L., Goes, J., De Guzzi Plepis, A. and Das-Gupta, D. (1998). Anionic Collagen: Polymer Composites with Improved Dielectric and Rheological Properties. *Artificial Organs*, 22(3), pp. 203–209.
9. Loyau, S., Dumont, B., Ollivier, V., Boulaftali, Y., Feldman, L., Ajzenberg, N. and Jandrot-Perrus, M. (2012). Platelet Glycoprotein VI Dimerization, an Active Process Inducing Receptor Competence, Is an Indicator of Platelet Reactivity. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 32(3), pp. 778–785.
10. Nimni, M. and Olsen, B. (1988). *Collagen*. Boca Raton, Fla.: CRC Press.
11. DeFrates, K., Markiewicz, T., Gallo, P., Rack, A., Weyhmler, A., Jarmusik, B., and Hu, X. (2018). Protein Polymer-Based Nanoparticles: Fabrication and Medical Applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(6), p. 1717.
12. Rössler, B., Kreuter, J., and Scherer, D. (1995). Collagen microparticles: Preparation and properties. *Journal of Microencapsulation*, 12(1), pp. 49–57.
13. Меньшиков В. (ред.) *Лабораторные методы исследования в клинике: справочник*. М.: Медицина, 1987.
14. Bell, E., Ivarsson, B., and Merrill, C. (1979). Production of a tissue-like structure by contraction of collagen lattices by human fibroblasts of different proliferative potential in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(3), pp. 1274–1278.
15. Savchuk, O., Raksha, N., Mokrousova, O., and Ostapchenko, L. (2017). Extraction and Characterization of Collagen Obtained from Collagen-Containing Wastes of the Leather Industry. *Solid State Phenomena*, 267, pp. 44–48.