

BIOFILM-FORMATION ABILITY OF *S. AUREUS* ON COLLAGEN MATRICES

O. Iungin, L. Maistrenko, P. Rebrykova, I. Duka
Kyiv National University of Technologies and Design

Key words:

Collagen
Biofilms
S. aureus
Leather industry wastes
Matrices
Wound healing

Article history:

Received 02.09.2020
Received in revised form
17.09.2020
Accepted 30.09.2020

Corresponding author:

O. Iungin
E-mail:
olgaungin@gmail.com

ABSTRACT

Nowadays stimulation of wound healing in surgery, combustiology, dermatology remains an urgent problem. Despite the constant improvement of wound treatment methods, the frequency of infectious complications in surgery reaches 30%, and in combustiology — 40%. Bacterial biofilms are a critical component of chronic wounds which are difficult to treat with traditional therapies. *Staphylococcus aureus* is one of the four most prevalent bacterial species identified in case of chronic wounds. Collagen is a promising basis for drugs for wound healing as well as an ideal matrix in the study of infectious processes of the skin and connective tissues.

The aim of the work was to evaluate the biofilm-formation ability of opportunistic infections pathogens on collagen matrices obtained from leather industry waste (limed pelt, delimed pelt and fleshings of cattle hides).

Collagen samples were obtained by acid extraction followed by washing with 0.9% NaCl to obtain pH of 5.5. Laboratory strains and hospital isolates of *S. aureus* were used as test cultures. The strains were isolated from the wound surfaces of patients of the Kyiv Regional Clinical Hospital. The bacterium was identified as *Staphylococcus aureus* using VITEK 2 compact 15 (France). Culture growth and biofilm-formation ability were determined according to standard protocols. The obtained data were analyzed in the Excel software package, $p < 0.05$. The biofilm-formation ability varied depending on the collagen sample and the strain, however, the studied collagen samples proved to be effective matrices for biofilm formation. Collagen samples obtained from leather industry waste (limed pelt, delimed pelt and fleshings after two extractions) can be used as matrices for the growth and biofilm formation of *S. aureus* strains and modeling of microbial processes in the wound healing studies.

ЗДАТНІСТЬ ШТАМІВ *S. AUREUS* ФОРМУВАТИ БІОПЛІВКИ НА КОЛАГЕНОВИХ МАТРИЦЯХ

О. С. Юнгін, Л. А. Майстренко, П. А. Ребрикова, І. В. Дука
Київський національний університет технологій та дизайну

На сьогодні стимуляція загоєння ран у хірургії, комбустіології, дерматології залишається актуальною проблемою. Незважаючи на постійне удосконалення методів лікування ран, частота інфекційних ускладнень у хірургії досягає 30%, а в комбустіології — 40%. Бактеріальні біоплівки є критичним компонентом хронічних ран, які важко піддаються традиційній терапії. Золотистий стафілокок — один із чотирьох найбільш поширених видів бактерій, виявлених при хронічних ранах. Колаген є перспективною основою препаратів для загоєння ран, а також ідеальним матриксом при дослідженні інфекційних процесів шкіри та сполучних тканин.

У статті оцінено здатність формувати біоплівки штамами *S. aureus* на колагенових матрицях, отриманих з відходів виробництва натуральної шкіри (голінна обрізь після зоління та після знезолювання, міздря із сировини великої рогатої худоби).

Колаген отримували методом кислотної екстракції з подальшим відмиванням 0,9% NaCl до отримання рН 5.5. Як тест-культури використовували лабораторні штами та шпитальні ізоляти *S. aureus*. Штами було ізольовано з раневих поверхонь пацієнтів Київської обласної клінічної лікарні. Бактерії ідентифіковано як *Staphylococcus aureus* за допомогою VITEK 2 compact 15 (Франція). Ріст культур і біоплівкоутворення визначали за стандартними протоколами. Отримані дані проаналізовано в пакеті програм Excel, $p < 0,05$. Здатність формувати біоплівку варіювала залежно від зразка колагену та штаму мікроорганізму, однак досліджувані зразки колагену виявилися ефективними матрицями для формування біоплівок культурами бактерій. Зразки колагену, отримані з відходів виробництва натуральної шкіри (голінна обрізь після зоління та після знезолювання після двох екстракцій), можуть бути використані як матриці для росту і формування біоплівок штамами золотистого стафілококу та моделювання мікробних процесів при дослідженні лікування раневих поверхонь.

Ключові слова: колаген, біоплівки, стафілокок, відходи виробництва шкіри, матриці, загоєння ран.

Постановка проблеми. За даними ВООЗ, у структурі смертності населення третє місце займають травми, опіки та інші каліцтва. На сьогодні стимуляція загоєння ран у хірургії, комбустіології, дерматології залишається актуальною проблемою. Незважаючи на постійне вдосконалення методів лікування ран, частота інфекційних ускладнень у хірургії досягає 30%, а в комбустіології — 40%. В умовах гібридної війни на сході України ця проблема набула драматичних масштабів – осколкові поранення становлять 86,93% усіх поранень верхніх кінцівок [1].

Аналіз останніх досліджень і публікацій. Золотистий стафілокок — один із чотирьох найбільш поширених видів бактерій, виявлених у хронічних ранах.

Серед перев'язувальних матеріалів для ран представлені численні варіанти носіїв, імпрегованих різними антимікробними засобами. Найпоширенішою основою для таких препаратів є різні модифікації целюлози (бинти, марлі, метилцелюлоза), природні (колаген, хітин) та штучні полімерні плівки (полівінілпіролідон). Так, наприклад, перспективним є варіанти з плівкою з наночасток срібла, які мають антибактеріальний ефект [2]. Серед антимікробних речовин, якими просочують згадані матеріали, найбільш поширеними є антибіотики, антисептики та протигрибкові препарати. Конкурентами гідрогелевим та волокнистим пов'язкам стали антимікробні перев'язувальні матеріали з використанням фіксуєної полімерної композиції полісахаридної природи. Для створення композиції використовують окремі полісахаридні полімери або їх суміші [3]. На сьогодні набувають широкого використання пов'язки на основі колагену у вигляді губок, плівок і порошків для ран або опіків, а також хірургічних швів [4]. Колаген у фармацевтичній і біомедичній галузях застосовують як мікрочастинки, ін'єкційні дисперсії, щитки в офтальмології, систему доставки ліків, замітник шкіри, судин та зв'язок людини. Це пояснюється такими його характеристиками, як слабка антигенність, здатність до приєднання клітин, біорозкладаність і біосумісність. Колаген типу I вважається золотим стандартом для тканинної інженерії завдяки високій біосумісності. Від джерела походження та методів отримання залежить тип і якість колагену, а також перспективи його застосування. Колаген може бути отриманий із великої рогатої худоби, свиней, риб або птахів та очищений в подальшому для біомедичного застосування. Відходи виробництва шкіри є дешевим джерелом отримання колагену та його похідних. У шкурах ссавців 90—95% припадає на колаген I типу, який є найбільш бажаним при створенні ранозагоюючих покриттів. Молекула такого колагену зберігає практично незмінну молекулярну структуру білка, яка складається з трьох поліпептидних ланцюгів у потрійній спіралі з молекулярною масою близько 300 kD. Крім того, такий колаген має низьку імуногенність. Попередні дослідження показали можливість отримання чистого колагену типу I із відходів шкіряного виробництва з високим рівнем виходу [5].

У контексті розробки нових препаратів для лікування раневих поверхонь важливим аспектом є отримання дешевого колагену як базового носія для антимікробних речовин та інших компонентів препарату. Одним із перспективних джерел дешевого колагену є відходи виробництва натуральної шкіри.

Мета статті: оцінити здатність формувати біоплівки штамами *S. aureus* на колагенових матрицях, отриманих з відходів виробництва натуральної шкіри.

Матеріали і методи. Для отримання колагену використовували різні типи відходів виробництва натуральної шкіри: голину обрізь після зоління, голину обрізь після знезолювання та міздрю. Колаген екстрагували тричі з кожного виду відходів за методикою [6] зі змінами. Отримані зразки колагену після екстракцій відмивали дистильованою водою до досягнення рН 5.5. Як тест-культури використовували *Staphylococcus aureus* — лабораторний штам ATCC 25923 та шпитальні ізоляти 190 та 1377. Штами було ізольовано з раневих поверхонь пацієнтів Київської обласної клінічної лікарні. Бактерії було ідентифіковано як *Staphylococcus aureus* за допомогою VITEK 2 compact 15 (Франція). Підготовлені нічні культури мікроорганізмів наносили на зразки отриманого колагену і культивували в мікролуночних плашках при 37°C, приріст біомаси та біоплівкоутворення

визначали за загальноприйнятим протоколом з кристалічним фіолетовим [7]. Використовували подвійний контроль — інокульоване середовище без колагену (негативний) та з колагеном I типу «Геліос-11» (ТОВ «Томіг», Україна), фракція волокно (позитивний). Контроль стерильності подвійний — неінокульоване середовище та зразки колагену в стерильному середовищі.

Усі досліди проводили в трьох повтореннях, кількість паралельних визначень в експерименті становила 3. Відмінності середніх показників вважали достовірними на рівні значимості $p < 0,05$.

Результати і обговорення. У результаті проведених досліджень з'ясовано, що біомаси культур у переважній більшості досліджуваних варіантів відповідають контролю. Пригнічення вдвічі росту клітин на досліджуваних зразках колагену спостерігали лише в лабораторного штаму *S. aureus* (табл. 1).

З огляду на невелику кількість колагену, виділеного з міздри, та попередніх досліджень росту мікроорганізмів на таких зразках (формування слабких біоплівок) було вирішено зосередити увагу на зразках колагену з голинної обрізі після зоління та після знезолювання першої та другої екстракцій.

Таблиця 1. Приріст біомаси досліджуваних культур у зразках з колагеном

Зразок, екстракція*	Значення приросту біомаси (OD ₆₀₀) тест-культур		
	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	Шпитальний ізолят 190	Шпитальний ізолят 1377
1.1	0,557±0,04	0,300±0,02	0,366±0,01
1.2	0,562±0,01	0,223±0,05	0,351±0,01
2.1	0,638±0,04	0,229±0,02	0,331±0,01
2.2	0,655±0,01	0,185±0,01	0,340±0,01
Контроль (+)	1,008±0,3	0,260±0,01	0,362±0,01
Контроль (-)	1,01±0,22	0,347±0,01	0,503±0,01

Примітка: * — зразки колагену, отримані з голинної обрізі після зоління (1) та після знезолювання (2), після першої (1.1, 2.1) та другої (1.2, 2.2) екстракцій.

Здатність утворювати біоплівки всіх досліджуваних культур була вища при культивуванні на досліджуваних зразках колагену порівняно з позитивним контролем (табл. 2).

Таблиця 2. Показники біоплівкоутворення досліджуваних культур при рості на колагенових матрицях

Зразок, екстракція	Показники біоплівкоутворення (OD ₅₇₀) тест-культур		
	<i>S. aureus</i> ATCC	Шпитальний ізолят 190	Шпитальний ізолят 1377
1.1	1,125±0,01	1,967±0,17	0,406±0,04
1.2	0,933±0,16	1,992±0,34	0,335±0,11
2.1	1,441±0,15	0,929±0,11	0,413±0,04
2.2	0,674±0,07	1,754±0,02	0,209±0,03
Контроль (+)	0,558±0,07	1,013±0,15	0,347±0,05
Контроль (-)	0,783±0,23	0,473±0,14	0,224±0,01

Імовірно, це може бути пов'язано з тим, що досліджувані зразки колагену, виділені з відходів виробництва натуральної шкіри, зберігають молекулярні містки

та йони, які виступають атрактантами для клітин [8]. Здатність формувати біоплівку варіювала залежно від зразка колагену та штаму стафілококу. Досліджувані зразки колагену виявилися ефективними матрицями для формування біоплівок. Так, здатність формувати біоплівку в досліджуваних штамів стафілококу була вдвічі вищою на зразках колагену з двох екстракцій голинної обрізі після зоління та знезолювання. Така варіативність показників може бути також пов'язана не лише з реакцією на поверхню, а й зі ступенем адгезивності штаму [9].

Згідно з [10] здатність до формування біоплівок на колагенових матрицях розподіляли таким чином (табл. 3).

Таблиця 3. Здатність до формування біоплівок *S. aureus* на колагенових матрицях*

Зразок, екстракція	<i>S. aureus</i> ATCC	Шпитальний ізолят 190	Шпитальний ізолят 1377
1.1	+++	+++	+
1.2	++	+++	+
2.1	+++	+++	++
2.2	++	+++	–
Контроль (+)	++	+++	+
Контроль (–)	++	+	+

Примітка: * — «+++» — сильна біоплівка, «++» — середня, «+» — слабка, «–» — біоплівка не сформувалася.

Ефективність формування біоплівки є штамоспецифічною ознакою. Так, лабораторний штам і шпитальний ізолят 190 формували сильну біоплівку на тих зразках колагену, де шпитальний ізолят 1377 — слабку.

Висновки

Зразки колагену, отримані з відходів виробництва натуральної шкіри (голинна обрізь після зоління та після знезолювання), можуть бути використані як матриці для росту і формування біоплівок штамми золотистого стафілококу та моделювання мікробних процесів при дослідженні раневих уражень.

Література

1. Страфун С. С., Борзих Н. О., Лакша А. А. Аналіз структури та лікування поранених з вогнепальними травмами верхніх кінцівок в умовах сучасних бойових дій. *Військова медицина України*. 2016. № 3. С. 97—105.
2. Bilous S. B., et al. The studies on the pharmaceutical development of dosage forms with silver and gold nanoparticles for use in dentistry and surgery. *Вісник фармації*. 2018. № 4. С. 28—36.
3. Кутько І. І. Перспективи розвитку біомедицини на основі NBIC-технологій в країнах світу і Україні. *Новости медицины и фармации*. 2016(3): 16—19.
4. Parenteau-Bareil R., Gauvin R., Berthod F. Collagen-Based Biomaterials for Tissue Engineering Applications. *Materials*. 2010. № 3. С. 1863—1887.
5. Wang X., Mengdi H. O. U., Liu X., Liang C., Ouyang Y. U. E., Zheng M. & Qiang T. 2019. U.S. Patent Application No. 16/290. 859.
6. Savchuk O., Raksha N., Ostapchenko L., Mokrousova O., Andreyeva O. Extraction and Characterization of Collagen Obtained from Collagen-Containing Wastes of the Leather Industry. *Solid State Phenomena*. 2017. № 267. P. 172—176.

7. O'Toole G. A. Microtiter dish biofilm formation assay. *Journal of Visualized Experiments*. 2011. № 47. P. e2437.
8. Lastowka, Andrew, Gennaro J. Maffia, Eleanor M. Brown. A comparison of chemical, physical and enzymatic cross-linking of bovine type i collagen fibrils. *Journal of American Leather Chemists' Association*. 2005. № 100. P. 196—202.
9. Helbig, Ralf et al. The impact of structure dimensions on initial bacterial adhesion. *Biomaterials science*. 2016. № 4(7). P. 1074—1078.
10. Xu Zhenbo et al. Crystal violet and XTT assays on *Staphylococcus aureus* biofilm quantification. *Current microbiology*. 2016. № 73(4). P. 474—482.