

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ ТА НАУКИ УКРАЇНИ
ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
імені В.Н. КАРАЗІНА
Біологічний факультет
кафедра молекулярної біології та біотехнології

**ДИЗАЙН СМАРТ-ГІДРОГЕЛЕВОЇ СИСТЕМИ З
НАНОЦЕЛЮЛОЗИ ТА АНТОЦΙΑНІВ ДЛЯ ЗАЖИВЛЕННЯ РАН**

Допущено до захисту
«__»_____2024 р.
Завідуючий
кафедрою _____

Оцінка «_____»
Голова ЕК

«__»_____2024 р.

Кваліфікаційна робота бакалавра
студентки кафедри молекулярної
біології та біотехнології
Мельник Ганни Борисівни

Наукові керівники:
Козировська Н.О
к.б.н. завідувач лабораторії
мікробної екології ІМБГ НАН
України
Ковальова М.К.
к.б.н. доцент кафедри молекулярної
біології та біотехнології ХНУ
імені В.Н. Каразіна

Харків 2024

АННОТАЦІЯ

Об'єктом дослідження даної роботи є пов'язки гідрогелеві nanoцелюлозні стерильні, як перев'язувальний матеріал для надання першої медичної допомоги і моніторингу загоєння ран. Предмет дослідження – сенсорні системи на основі бактерійної целюлози і рН-чутливих індикаторів.

Методи дослідження: мікробіологічні, біохімічні, біотехнологічні, фізичні.

В рамках роботи розроблено сенсорні системи - смарт-покриття для ран та опіків. Ці покриття містять індикатори рН, які дозволяють контролювати умови загоєння рани пацієнта. Смарт-покриття виготовлені з бактеріальної целюлози та натуральних барвників (антоціанінів ягід бузини, *Sambucus nigra L.*). Новостворені композитні наноматеріали змінюють колір у штучних умовах, що імітують інфіковану рану. Ця зміна кольору зумовлена змінами рН, які відбуваються при інфікуванні. Колориметрично зафіксувати зміну можливо за допомогою камери й 3 мобільного додатку Spotxel Reader 2.5.1. (SICASYS Software GmbH, Німеччина), встановленого на смартфоні.

Запропоновано новий метод виготовлення та прототип антимікробного гідрогелю на основі плівки з бактеріальної целюлози та антимікробного агенту - ундаценової кислоти. Цей гідрогель призначений для покриття ран та сприяє їх загоєнню. Досліджено можливий терапевтичний ефект антоціанів на заживлення рани.

Роботу виконано на базі лабораторії мікробної екології Інституту молекулярної біології та генетики НАН України.

Ключові слова: *гідрогель, бактерійна целюлоза, антоціани, ундаценова кислота, рана*

ABSTRACT

This study **investigates** sterile hydrogel nanocellulose dressings as a wound dressing material for first aid and wound healing monitoring. The focus is on sensor systems based on bacterial cellulose and pH-sensitive indicators.

Methods: Microbiological, biochemical, biotechnological, and physical methods were employed to develop sensor systems - smart dressings for wounds and burns. These dressings contain pH indicators that allow for monitoring the wound healing conditions of a patient. The smart dressings are fabricated from bacterial cellulose and natural dyes (anthocyanins from elderberries, *Sambucus nigra* L.). The newly developed composite nanomaterials change color under artificial conditions that mimic an infected wound. This color change is caused by pH changes that occur during infection. The color change can be colorimetrically recorded using a smartphone camera and the Spotxel Reader 2.5.1 mobile application (SICASYS Software GmbH, Germany) installed on the smartphone.

A novel method for preparing and prototyping an antimicrobial hydrogel based on bacterial cellulose film and the antimicrobial agent undecenoic acid is proposed. This hydrogel is intended for wound dressing and promotes wound healing. The potential therapeutic effect of anthocyanins on wound healing was investigated.

The work was conducted at the Laboratory of Microbial Ecology of the Institute of Molecular Biology and Genetics of the National Academy of Sciences of Ukraine.

Keywords: *hydrogel, bacterial cellulose, anthocyanins, undecenoic acid, wound*

ЗМІСТ

АННОТАЦІЯ	2
ABSTRACT	3
ЗМІСТ	4
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ. ОДИНИЦЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ	6
ВСТУП	7
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ	9
1.1 Роль і методи визначення бактерійної інфекції у ранах	9
1.2 Смарт («розумні») гідрогелі як інноваційні ранові пов'язки, індикація рН чутливими сенсорами	11
1.3 Смартфони для обробки зображень і моніторингу ранозагоєння	13
1.4. Колориметричне визначення зміни рН у ранах	14
1.5 Гідрогелеві целюлозні покриття для моніторингу ранозагоєння	16
1.6	20
1.7 Смарт гідрогелі на основі бактерійної целюлози та антоціанів	21
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	23
2.1 Об'єкти дослідження	23
2.2 Приготування поживного середовища для культивування маточної культури	23
2.2.1 Культивування маточної культури комбучі	24
2.2.2 Приготування поживного середовища для виробництва целюлозної плівки (культивування культури комбучі)	24
2.3 Отримання целюлозної плівки	25
2.4 Очищення бактерійної плівки лугом	25
2.5 Вибір і культивування інших мікробних культур	26
2.6 Вибір рослинного матеріалу	27
2.7 Характеристика антоціанів	28
2.8 Умови стерилізації гідрогелевих плівок та стабільності кольору після стерилізації:	29
2.9 Визначення зміни кольору плівок інструментальне	30

2.10	Визначення зміни кольору галохромних плівок на газонах бактерій візуальне	30
2.11	Визначення зміни кольору галохромних плівок візуальне на моделі рани	30
2.12	Інфрачервона спектроскопія Фур'є	30
2.13	Прив'язка зміни кольору плівки, насиченої витяжкою бузини, до концентрації клітин тестової культури	31
2.14	Антимікробна активність	31
2.15	Визначення стабільності кольору після стерилізації	32
2.16	Розробка сенсорної системи на основі смартфона	32
2.17	Цитотоксичність. МТТ-test	33
2.18	Scratch-test (тест-подряпина)	34
2.19	Статистична обробка даних	35
	РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ	36
3.1.	Створення гідрогелевої плівки	36
3.2.	Витяжки ягід бузини чорної у буферних розчинах	38
3.3.	Сенсорна система на основі плівок бактерійної целюлози та природних антоціанів бузини чорної (<i>Sambucus nigra</i> L.)	39
3.4.	Антимікробна активність	45
3.5.	Стабільність рН-індикаторів у галохромних плівках БЦ	46
3.6.	Зміна кольору плівок БЦ/АНЦ на моделі рани	48
3.7.	Характеристика антоціанів	49
3.8	Інфрачервона спектроскопія з перетворенням Фур'є БЦ-плівок, наповнених екстрактом ягід бузини, SEM мікроскопія	51
3.9.	Scratch-test	53
3.10.	Цитотоксичність. МТТ-test	54
	ВИСНОВКИ	57
	СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	58

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ. ОДИНИЦЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ

- АНЦ – антоціани;
- БЦ – бактерійна целюлоза;
- БАР – біологічно активні речовини;
- ДМСО – димексилсульфоксид;
- ІЧ – інфра-червона спектроскопія;
- КУО – колонієутворюючі одиниці;
- МСК – мезенхімальні стовбурові клітини;
- ПФМ – первинні фібробласти мишей.

ВСТУП

Бактерії, як джерело целюлози представляють собою цікавий біотехнологічний об'єкт для досліджень. Увага цієї наукової роботи спрямована на біологічні плівки, що утворює бактерія *Komagataeibacter xylinus* в зооглійному симбіозі з дріжджами, також відомому як «комбуча», або «чайний гриб». Наноцелюлоза, вироблена даною бактерією може слугувати матрицею для різних сполук. В тому числі, як і гідрогелева плівка для загоєння ран, що є носієм біологічно активних речовин, таких як антоціани.

Sambucus nigra, або бузина чорна містить похідні фенолів, такі як флавоноїди у великій кількості. У даній було проведено аналіз спиртового екстракту ягід рослини на наявність антоціанів. Антоціани – є рН чутливими сполуками і завдяки цьому можуть слугувати ідентифікаторами бактерій.

Введення у целюлозні гідрогелі чутливих до зміни рН сенсорів поєднує лікувальні властивості гідрогелевих ранових покриттів з діагностичними. Такі гідрогелі забезпечують відновлення тканин в оптимальних умовах помірно-вологого середовища, яке прискорює епітелізацію і знижує ризик утворення грубих рубців. Пов'язки на їх основі добре прилягають до ран зі складним рельєфом, вони атравматичні і видаляються безболісно. Бактерійна целюлоза продукується різними видами бактерій, що призводить до утворення унікальної за ієрархією будови гідратованої плівки. Це дозволяє вводити в неї різноманітні системи із збереженням високої механічної міцності на розрив. Застосування БЦ як галохромного матеріалу шляхом введення у неї рН-чутливих барвників робить лише перші кроки.

Крім того, розробка гідрогелевої плівки дуального спрямування є привабливою. В даній роботі скомпоновано спиртовий екстракт антоціанів з ундаценовою кислотою, що є антимікробним агентом. Це дозволить не

лише ідентифкувати наявність бактерійного ураження, а й одразу розпочати лікування.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Роль і методи визначення бактерійної інфекції у ранах

Бактерійна інфекція є найпоширенішою та неминучою проблемою при загоєнні ран, і вона може викликати запальні реакції навколо рани та уповільнити загоєння. Крім того, важкі інфекції можуть призвести до небезпечних для життя ускладнень, таких як сепсис, шок, органна недостатність тощо. Бактерії в ранах можуть бути планктонними (тобто рухливі, неприкріплені, одиночні) або сидячі (тобто нерухомі, прикріплені, сплячі) всередині біоплівки. Багато хронічних ран містять біоплівки, принаймні на частині ложа рани. Біоплівка містить бактерії, вбудовані в біополімери, які прилипають до ложа рани. Матриця біоплівки прикриває бактерії від імунного захисту пацієнта. Однак біоплівка може стимулювати хронічну запальну реакцію, яка може сприяти уповільненому загоєнню [1]. Інфекція рани може характеризуватися за класичними ознаками та симптомами, які виникають в результаті імунної відповіді на бактерії, такими як біль, жар, набряк, почервоніння та гнійний ексудат. Однак при хронічних ранах оцінка інфекції може бути особливо складною, тому що класичних ознак може не бути, а наявність супутніх захворювань може пригнічувати імунну відповідь [2]. Традиційно бактерійне навантаження $\geq 1 \times 10^5$ КУО на грам тканини

рани використовували як поріг для діагностики ранової інфекції [3]. Однак, у незагойних ранах цей поріг може бути іншим, оскільки відносини між бактерійним навантаженням та інфекцією не буває лінійним [4]. Бактерійне навантаження нижче порогу може затримати загоєння, зокрема у пацієнтів з порушеннями імунного захисту, особливо коли вірулентні бактерії залучені. Крім того, зразки, отримані з використанням мазків з ран можуть бути нерепрезентативними для всієї рани і не враховувати бактерії під рановою поверхнею, а глибокотканинна біопсія хоча і може створити більш репрезентативну вибірку бактеріального профілю на всю товщину рани, проте, це дорого і може викликати ускладнення.

На сьогодні, пряме визначення кількості мікроорганізмів у рані, тобто, культивування мікроорганізмів і підрахунок колоній, залишаються найбільш традиційним підходом для виявлення патогенних бактерій у ранах [5], які використовуються в клінічній практиці. Однак метод потребує тривалого експериментального часу (>72 год) для культивування мікроорганізмів [6]. Крім підрахунку колоній і культивування, імунологічний аналіз (ELISA) та полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) також використовуються для виявлення та ідентифікації патогенних бактерій [7, 8, 9]. На додаток до ELISA та ПЛР, методи виявлення патогенів включають інструментальні підходи, такі як проточна цитометрія та газова хроматографія [10, 11], а також методи на основі спектроскопії, такі як інфрачервона спектроскопія з перетворенням Фур'є (FTIR) і раманівська спектроскопія [12]. Методи спектрального зображення використовують для

виявлення та моніторингу бактерійних біоплівки, які є організованими угрупованнями бактерій, вбудованими у захисну матрицю позаклітинних полімерних речовин (екзополісахариди; білки, позаклітинна ДНК). Спектральне зображення, також відоме як гіперспектральне зображення, є потужним методом, який надає як спектральну, так і просторову інформацію про присутність бактерій [13; 14], і це робить спектральне зображення перспективним вибором для аналізу гетерогенних зразків.

Незважаючи на точність, надійність і чутливість до рівня однієї клітини [15], ці методи є дорогими та трудомісткими (від годин до днів), потребують централізованих лабораторій, навченого персоналу, попередньої обробки зразків і багатоетапної обробки. Щоб подолати ці проблеми, ВООЗ окреслила набір критеріїв, відомих як ASSURED (гарантовані), для ідеального діагностичного тесту в умовах обмежених ресурсів: він має бути доступним, чутливим, конкретним, зручним для користувача, швидким, без обладнання та доступним [16]. З появою цифрових технологій і телемедицини критерії були переглянуті, щоб включити дві додаткові характеристики: підключення в режимі реального часу та легкість збору зразків, що призвело до нового критерію - REASSURED [17]. Крім того, діагностика на місці (*in situ*) повинна мати можливість аналізувати невеликі об'єми, бути портативною та одноразовою (через ймовірний небезпечний характер зразка), з мінімальною підготовкою зразка. Важливо, що методи повинні ефективно працювати в різних умовах навколишнього середовища, не вимагаючи джерела живлення, і працювати у відповідному (клінічному та практичному) діапазоні концентрацій. Прикладом такої діагностики є сенсори мікрофлори на основі паперових платформ [18; 19], наноплазмонічні пристрої для швидкого виявлення прокальцитоніну та С-реактивного білка [20], електричні [21] та оптичні пристрої [22], сенсори температури, а також колориметричні [23], потенціометричні [24] та флуориметричні [25] сенсори рН. Найсучасніші з

них описано в огляді Youseff et al. [26]. Раннє виявлення та діагностика ранових інфекцій такими засобами може забезпечити більш ефективне лікування та знизити ризики розвитку незагойних ран. Який би метод відбору проб не використовувався, мікробіологічне дослідження - додаткові витрати, і результати можуть бути доступними клініцистам лише протягом кількох або більше днів. Дискусія про найкращу технологію мікробіологічного дослідження хронічної рани триває.

1.2 Смарт («розумні») гідрогелі як інноваційні ранові пов'язки, індикація рН чутливими сенсорами

Показник рН пов'язують з активністю іонів водню в розчині і, відповідно, значеннями від 0 до 14. рН внутрішнього середовища тіла людини підтримується в нейтральному діапазоні, тоді як рН шкіри природно коливається від 4 до 6 [27]. Пошкодження шкіри можуть змінити її природний рН; кожна фаза загоєння рани має різне його значення, але загалом механізми відновлення рани відбуваються в кислому середовищі. Хронічні рани, однак, як правило, мають нейтральний і основний рН у діапазоні 7,15–8,90 [28] і навіть можуть досягти рН 10 у випадку бактерійних інфекцій [29, 30].

Для моніторингу рН пропонується багато методів у процесі загоєння ран, наприклад, колориметрія, електрохімічні та електромеханічні методи. Для визначення рН ранових рідин і, відповідно, контамінування ран, раніше пропонувалися електрохімічні методи [31], прикладами яких є потенціометричне вимірювання рН-залежного струму за допомогою електродів підчас окислення ендогенних біомаркерів ранового процесу. Згодом розроблено бездротові електрохімічні платформи, які дозволяють потенціометричне та амперометричне вимірювання рН у різних системах [32]. Оптичні хімічні сенсори, які визначають рН через зміну абсорбції або

флуоресценцію індикаторного барвника, прості у виробництві у великих обсягах і не вимагають окремого електрода для порівняння. Тому такий різновид сенсорів є привабливим для визначення рН рани, а також для візуалізації стану та картографування інфекції у рані. У найпростішому випадку оптичне зчитування кольору індикаторного барвника здійснюється неозброєним оком. Однак на практиці цей простий підхід обмежує рівень кількісного визначення маркерів рани. У порівнянні з електрохімічними системами, колориметричні сенсорні не потребують електричних схем і джерел живлення, а також не вимагають електропровідності, яка може бути джерелом цитотоксичності.

Розробка пов'язок на основі сенсорів, які можна було б легко контролювати та не витратити багато на їхнє виробництво, усе ще є актуальними. На сьогодні відомі перетворювачі з гнучким контуром, барвники на основі оптичних датчиків, барвники, чутливі до рН, чутливі до рН електроди та карбонові точки, які використовуються для виготовлення рН-чутливих перев'язувальних матеріалів [33; 34]. Нові дослідження зосереджено на оптимізації чутливості та часу відгуку рН-сенсорів. Останні досягнення у створенні рН-чутливих сенсорів на основі полімерів продемонстровано на практиці їхню придатність для загоєння ран [35]. Серед них - розумні сенсорні, з'єднані з вдосконаленими перев'язувальними пов'язками, які потерпілі постійно носять на ранах, які важко загоюються [36]. Дійсно, натільні сенсорні вже успішно застосовуються для безперервного моніторингу рівня глюкози та виявлення інфекції. Так, гідрогелеве покриття, запатентоване як GelDerm, виявляє бактерійну інфекцію на основі зміни рН рани за допомогою ряду колориметричних датчиків у вигляді іонообмінних кульок, вмонтованих в альгінатний матрикс [37]. Незважаючи на такі повідомлення, інформації про використання і ефективність натільних сенсорів усе ще бракує.

1.3 Смартфони для обробки зображень і моніторингу ранозагоєння

На відміну від традиційних методів оцінки рани, які використовують прямий контакт з раною за допомогою вимірювального інструменту, наприклад лінійки, або візуальний огляд рани на наявність ексудатів тощо, технологія на основі смартфона може бути безконтактною у своїй найпростішій формі, де можна використовувати цифровий аналіз зображень [38]. Смартфони та планшети поєднують високу роздільну здатність камери з потужними обчислювальними можливостями, і таким чином, вони широко пропонуються для використання як інструменти для мобільної діагностики. Тим не менш, точне визначення справжнього кольору навіть при високій якості споживчих товарів є нетривіальним і вимагає складної обробки зображень, а також та/або джерела світла.

Високоякісні пристрої візуалізації доступні на смартфонах нового покоління, можуть значно підвищити точність і надійність вимірювань ран без необхідності будь-яких спеціальних навчань або додаткового обладнання. Розумні технології здатні точно детектувати, повідомляти зібрану інформацію та реагувати на неї. Першим необхідним кроком у цьому є надійні сенсори, які забезпечують збір даних ключових параметрів стану рани (наприклад, рН, температура, рівень оксигенації), і таким чином, можуть скоротити час прийняття рішення щодо лікування рани без необхідності частих відвідувань клініки та зміни ранового покриття. Нарешті, такі досягнення дозволитимуть скорочення часу госпіталізації та зниження витрат на охорону здоров'я.

1.4. Колориметричне визначення зміни рН у ранах

Для колориметричного виявлення зміни рН, чутливі барвники вбудовують в матеріал носія, щоб візуально виявляти зміни рН або використовувати обробку зображень без необхідності застосування

вбудованої електроніки. У більшості колориметричних індикаторів на основі полімерів, які називають галохромними (тобто, такими, що змінюють колір при зміні рН), розроблених у попередні роки, синтетичні реагенти, такі як метиловий червоний і бромтимоловий синій, конго червоний, бромфеноловий синій, хлорфеноловий червоний, бромтимол синій, бромкрезоловий зелений і феноловий червоний та інші, слугували рН індикаторами. Однак їхнє використання є сумнівним для застосування в пов'язках для оцінки ран через можливість спричинення шкідливих ефектів для людини та проблем утилізації.

Основним недоліком галохромових сенсорів є можливість вимивання барвника в рану, необхідність обробки зображення для досягнення високої точності та чутливого виявлення, а також діапазон виявлення інфекції. Тамайол та ін. [39] використали гідрогелеві волокна, у які інкорпорували мезопористі поліефірні кульки з інкапсульованим яскраво-жовтим барвником, щоб захистити барвник від вимивання в рану. Лю та ін. [40] альгінатний гідрогель зміцнений ковалентно зшитю сіткою поліакриламідом та модифікований шляхом ковалентної кон'югації з полімерами рН-чутливого барвника фенолового червоного. Однак, на додаток до складного синтезу, колориметрична відповідь показала поганий контраст із тканинами рани, що ускладнювало зчитування кольору. Щоб покращити контраст, Гамеріт та ін. [41] розробили метод іммобілізації рН-чутливого барвника бромкрезолового пурпурового на матеріалах, таких як фільтрувальний папір і бавовна. Зазначений барвник змінює колір із жовтого на синій зі збільшенням рН, тобто, перехід кольору, який можна чітко побачити в ранових пов'язках. Однак кон'югація барвника з целюлозою вимагала нагрівання матеріалів до 120°C, що не сумісно з сучасними гідрогелевими пов'язками для ран.

Відстеження рН рани в режимі реального часу легко досягти шляхом включення нетоксичних синтетичних барвників, наприклад, фенолового

червоного (виявляє очевидний колір від жовтого при рН 6 до червоного при рН 8) у цвіттеріонному полікарбоксибетаїновому гідрогелі [42] або бромтимол синього [43]. Ключовим обмеженням барвників є їхня нездатність ковалентно зв'язуватися з комерційними пов'язками для ран через наявність реакційноздатних вінілсульфонільних груп. Тому целюлозний полімер з відкритими функціональними групами є перспективним матриксом для введення рН-чутливих індикаторів [44].

1.5 Гідрогелеві целюлозні покриття для моніторингу ранозагоєння

Гідрогелеві покриття для лікування ранових поверхонь з індикаторами зміни рН є кандидатами для онлайн діагностики *in situ*, оскільки вони відповідають критеріям REASSURED. Завдяки безпроблемному виробництву бактерійної целюлози та, що найважливіше, низькій вартості, сенсори на основі рН індикаторів та гідрогелю целюлози перспективно використовувати в клінічній, харчовій та екологічній діагностиці мікрофлори. Бактерійна целюлоза — це високогідратований матеріал, що складається зі складного тривимірного розташування наноцелюлозних фібрил, які утворюють щільну сітку, що імітує структуру позаклітинної матриці. Нанорозмірна пористість запобігає проникненню бактерій, але забезпечує дифузю рідин, газів і макромолекул. Велика водоутримувальна здатність і хороші механічні властивості БЦ полегшують обробку та сприяють створенню вологого мікросередовища рани, що сприяє загоєнню. Завдяки високій чистоті, чудовій механічній міцності, високому водопоглинанню та високопористій структурі бактерійна целюлоза застосовується для біомедичного призначення [45].

Висока конформабельність забезпечує тісний контакт між тканиною рани та пов'язкою, що полегшує біль і зупиняє кровотечу, а також може потенційно дозволити чутливе виявлення біомаркерів під час інтеграції сенсорних елементів у БЦ. Проте, чиста форма бактерійної целюлози майже не використовується як біомедичний матеріал через деякі властиві їй недоліки. Щоб розширити застосування в доставці ліків, широко використовуються модифікації нативної бактерійної целюлози для покращення її властивостей. Зазвичай модифікацію БЦ можна проводити фізичними, хімічними та біологічними методами [21].

Гідрогелі, виготовлені на основі БЦ для покриття ран успішно перебувають на ринку більше 20 років. Комерційний продукт Biofill (Бразилія), який насправді є частково висушеною БЦ-плівкою, є більш ефективним, ніж традиційні пов'язки (бавовняна марля, марля з мазями), накладені на рану (прискорює процес загоєння, знеболює тощо) [46]. Інший лікувальний засіб на основі чистої БЦ, Xcell (Xylos Corporation, Langhorne, PA, USA), рекомендують для лікування хронічних ран і виразок. Антимікробний варіант БЦ "XCell антимікробний перев'язувальний матеріал" успішно продають в США з 2003. Відома також модифікована БЦ, представлена композитами з хітозаном [47,48] або з наночастинками срібла [49], які мають бактеріостатичну активність до грамнегативних та грампозитивних бактерій і бактерицидну активність відносно грамнегативних бактерій. Проте, механізм впливу срібла на клітини викликає стурбованість, оскільки його дія відбувається на рівні ДНК, а хітозан хоча і є безпечним природним компонентом композиту з БЦ, однак, його вартість є високою. Біотехкомпанія BOWIL/Biotech (Польща) виробляє біоцелюлозу, імпрегновану дезінфектантом ПГМБ (CelMat® Wound P). В Україні гідрогелеві покриття на основі наноцелюлози розроблено в Інституті молекулярної біології і генетики НАН України [50]. Разом з партнерами нами розроблено композит БЦ з графеновими квантовим точками, які надають БЦ антимікробної активності [51].

Бактерійна інфекція є проблемою при загоєнні ран, і вона може викликати запальні реакції навколо рани та уповільнити загоєння. Таким чином, інгібування бактерійної інфекції є необхідною умовою у дизайні галохромних пов'язок для запобігання ускладнень у загоєнні ран. Додавання наночастинок також може підвищити антибактерійну здатність, особливо металевих і неметалевих наночастинок, таких як квантові точки срібла, міді, оксиду цинку, кремнію та оксиду графену [52, 53]. Гобаши та ін. [52] додали антибіотики до гідрогелю та наночастинок ZnS одночасно.

Згідно з їхніми результатами, мінімальна інгібуюча концентрація зменшилась після додавання ZnS, що ефективно підвищило здатність інгібувати інфекцію. У порівнянні з антибактерійним ефектом металевих наночастинок, неметалеві наночастинок можна використовувати як рН-чутливі носії антибактерійних препаратів. Пан та ін. [23] розробили наночастинок діоксиду кремнію, які досягли цілеспрямованого вивільнення хлоргексидину на лужних ранах, і підтвердили їх антибактерійну здатність як до грамнегативних, так і до -позитивних бактеріальних патогенів. На основі цієї стратегії було виготовлено рН-чутливу гідрогелеву ранову пов'язку.

Останнім часом багато дослідників зосередилися на використанні природних антибактерійних сполук для заміни частого використання токсичних речовин або антибіотиків. Крім того, ряд природних антимікробних сполук також мають антиоксидантні властивості, які поглинають вільні радикали. Серед них такі як мед, ресвератрол, куркумін, танінова кислота тощо, які мають синергетичну дію на загоєння ран [54, 55, 56, 57]. Нещодавно вчені зосередилися на використанні природних і біосумісних чутливих до рН барвників, таких як антоціани [58; 59].

1.6 Антоціани – антиоксиданти, індикаторна дія, протиракова активність

Антоціани (АНЦ) - це розчинні у воді та спирті нетоксичні флавоноїди, які у великій кількості містяться у рослинах. За будовою вони є заміщеними глікозидами та ацилглікозидами солей 2-фенілбензопірилієвих (антоціанідинів). Залежно від джерела, навколишнього середовища, техніки культивування та стадії зрілості вміст антоціану коливається від 0,1% до 1,0% від сухої маси рослини [60]. Основна структура антоціанідинів складається зі структурного каркасу С6-

C3-C6, який називається катіоном флавілію [61], і, залежно від кількості та положення приєднаних груп гідроксилу та/або метилового ефіру, вони бувають різних типів. Хоча на сьогодні ідентифіковано понад 30 антоціанідинів, 90% антоціанів, що зустрічаються в природі, базуються лише на шести структурах (30% базуються на ціанідіні, 22% на дельфінідіні, 18% на пеларгонідіні і решта 20% на основі пеонідин, мальвідін і петунідин) [62]. Залежно від гідроксилування та метилування флавоноїдного скелета колір цих компонентів коливається від оранжево-червоного (пеларгонідин) до синьо-фіолетового (дельфінідин). Включення антоціанів часто викликає різні зміни властивостей плівок, включаючи бар'єр, стабільність, механічні властивості, антиоксидантні, антибактерійні тощо. У багатьох роботах доведено, що антоціани здатні подовжувати термін зберігання та контролювати свіжість і якість їжі у розумній упаковці.

Розумна упаковка визначається як «система упаковки, яка здатна виконувати інтелектуальні функції (такі як виявлення, зондування, запис, відстеження, зв'язок і застосування наукової логіки), щоб полегшити прийняття рішень щодо продовження терміну зберігання, підвищення безпеки, покращувати якість, надавати інформацію та попереджати про можливі проблеми» [63]. Розумна упаковка контролює стан якості/безпеки харчового продукту та може завчасно попередити споживача або виробника про неналежну якість або псування харчових продуктів. Якщо раніше інтелектуальне пакування включало вартісні часово-температурні індикатори, газові детектори, індикатори свіжості та/або дозрівання [64], то сучасні індикатори чутливості до кольору можуть відображати зміни в якості їжі в режимі реального часу на основі змін значення рН, що призводить до зміни кольору рН-сенсора. Як і у випадку з розумними плівками для індикації інфекції у ранах, дослідники використовують рН-чутливі матеріали для приготування інтелектуальних плівок, які слугують упаковками, що відображають свіжість харчових продуктів.

На сьогодні розробка активної упаковки, що містить антоціани, займає важливе місце в галузі харчової інженерії, [65, 66, 67, 68, 69]. Антоціани не тільки мають індикативну здатність оцінювати рН, але також мають широкий спектр додаткових властивостей, таких як антиоксидантні та антимікробні, що сприяє збереженню харчів [70, 71]. Колориметричні плівки та гідрогелі розроблено на основі целюлозних матеріалів як індикатори свіжості харчових продуктів [72, 73]. Окрім того, досліджувалася взаємодія антоціанів з різними метаболітами харчових продуктів, які утворюються при зберіганні [74]. Проте, межа чутливості галохромних сенсорів до контамінуючої мікрофлори не досліджувалася. Окрім того, введення антоціанів у деякі матриці погіршували їхню механічну та термічну складові, тому потрібно було шукати рішення і вводити додаткові інгредієнти [75]

Антоціани ягід бузини являють собою фенольні сполуки (41,8% від їх складу). Існування фенольних компонентів, які мають значний антиоксидантний ефект і, отже, можуть видаляти вільні радикали та боротися з окисним стресом, фактором, що сприяє погіршенню стану організму людини та виникненню ряду захворювань, головним чином відповідає за терапевтичні властивості екстракту бузини. Завдяки широкому спектру поліфенолів, що містяться, антоціанів, флавонолів, фенольних кислот і проантоціанідинів, екстракти ягід та квіток бузини довели свою корисну дію, демонструючи захист серцево-судинної системи, протидіабетичні властивості, здатність протидіяти ожирінню та метаболічній дисфункції, протівірусну та антибактерійну активність, антиоксидантну здатність, протипухлинний потенціал, антидепресивну дію, а останнім часом і пребіотичний ефект [70].

Антоціани бузини складаються переважно з ціанідин-самбубіозидів та ціанідин-глюкозидів (90,1% від ідентифікованих антоціанів) [70]. Ціанідини мають сильну антиоксидантну дію та активність поглинання радикалів, і

завдяки цим властивостям ціанідини знижують ймовірність раку. Окрім антоціанів, екстракт *S. nigra* може позитивно впливати на здоров'я клітин шкіри через вміст інших біологічно активних поліфенольних сполук, таких як галова та хлорогенова кислоти, катехін, кверцетин [76]. Показано, що галова кислота прискорює загоєння ран, захищаючи клітини шкіри від окислювального стресу [77]. Кверцетин також сприяє загоєнню ран через протизапальні, протимікробні, противірусні, протипухлинні, протигрибкові ефекти та ін ефекти [78]. Катехіни, у свою чергу, характеризуються антиоксидантними, протипухлинними та противірусними властивостями [79]. Хлорогенова кислота є потужним антиоксидантом і, як було показано, має антивікові та фотозахисні властивості [80]. Усі разом поліфеноли сприяють ранозагоєнню, що робить екстракт бузини перспективним у виготовленні ранових покриттів, а також діагностичних і лікувальних пов'язок. Антимікробна активність екстрактів ягід та квіток бузини додає цінності цим продуктам [81, 81], і це було підтверджено експериментами з гідрогелями, виготовленими на основі карбомеру і наповнених екстрактами *S. nigra*, які показали антимікробну [83] та антиоксидантну дію [84].

1.7 Смарт гідрогелі на основі бактерійної целюлози та антоціанів

Як природний полімер, БЦ може надавати потрібні властивості для сенсорів, які постійно носять пацієнти, та інтелектуальної електроніки. Відомі розробки гідрогелевої целюлозної ранової пов'язки з екстрактом бузини, наприклад, для лікування пародонтозу, використання якої призвело до успішного подолання хронічної хвороби [85]. Але більше розробок присвячено дизайну плівок для визначення якості харчових продуктів при зберіганні. Так, індикатор рН свіжості риби був нещодавно отриманий успішним завантаженням суміші антоціану та куркуміну у матрицю бактерійної целюлози [86]. Дещо раніше було розроблено колориметричний рН-індикатор на основі нановолокон БЦ та екстракту капусти

червонокочанної (*Brassica oleraceae*), який містить антоціани [87]. Дослідження тривають, і вони спонукають дослідників розробляти екологічні пакування на заміну пластиковим із застосуванням натуральних продуктів.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Об'єкти дослідження

Bacillus subtilis В-901, *Escherichia coli* В-906, *Staphylococcus aureus* В-904, *Candida albicans* УКМ-1918 отримано з Української колекції мікроорганізмів. *Pseudomonas aeruginosa* 10145 отримано з міжнародної колекції АТСС. Бактерійну культуру *Serratia marcescens* ІМБГ291 виділено з гнилизни цибулі ріпчастої (колекція ІМБГ). *Komagataeibacter oboediens* ІМБГ180 виділено з культури комбучі (колекція ІМБГ). Комбучу екотипу ІМБГ-1 використано з колекції ІМБГ.

Вагітні миші лінії ICR, з масою тіла 19-23 г, утримувались у віварії Інститута молекулярної біології та генетики. Приміщення, в яких вони знаходились, мали контрольовану температуру 22–23 °С. Цикл світла (08:00-20:00) й темноти по 12 годин. Тваринам надавали воду очищену та гранульований сухий корм (вволю, без обмежень). Експериментальні процедури проводили відповідно до стандартних етичних норм (European Community Guidelines on the Care and Use of Laboratory Animals 86/609/ЕЕС).

2.2 Приготування поживного середовища для культивування маточної культури

Під час культивування маточної культури комбучі в лабораторних умовах використовують поживне середовище HS (Hestrin-Schramm) наступного складу (г) (табл.2.1):

Склад поживного середовища HS для культивування маточної культури комбучі

Глюкоза	8
Пептон сухий ферментативний	2
Екстракт дріжджовий	2
Фосфат натрію двоосновний	1
Лимонна кислота	0,46
Вода дистильована	До 400 мл
pH 6.0	соляна кислота (1 М), HCl

2.2.1 Культивування маточної культури комбучі

Маточна культура комбучі культивується у рідкому середовищі HS в лабораторних умовах у скляному лабораторному посуді (колбах об'ємом 0,5 л) під ватяною пробкою за температури 28°C з наступним пересівом в напівстерильних умовах у чайне середовище (заварений зелений листовий чай) для адаптації перед завантаженням до виробничого ферментеру. Тривалість культивування складає 5 діб або до утворення білої однорідної плівки товщиною не менше 4 мм, що визначається візуально.

2.2.2 Приготування поживного середовища для виробництва целюлозної плівки (культивування культури комбучі)

Целюлозна плівка отримується під час культивування культури комбучі на чайному середовищі. Чайне середовище складається з наступних компонентів (табл. 2.2):

Склад чайного середовище для виробництва целюлозної плівки комбучею

Чай листовий зелений (допускається чорний)	0,50%
Цукор	7,00%
Вода з-під крану	Довести до потрібного об'єму

2.3 Отримання целюлозної плівки

У виробничий ферментер задається чайне середовище і культуральна рідина адаптованої маточної культури комбучі 5% від об'єму середовища, завантаженого до ферментеру. Температура культивування 28°C. Під час досягнення плівкою однорідної поверхні і товщини 4 мм, вона виймається і надходить на очищення від мікроорганізмів за допомогою лугу. Культуральна рідина зливається у контейнер.

2.4 Очищення бактерійної плівки лугом

Для очищення плівку БЦ вміщують в 0,5% розчин NaOH на 24 години при температурі 28°C і періодично перемішують. Після промивання в дистильованій воді плівку вміщують в 0,5% розчин соляної кислоти на 24 год, після чого промивають дистильованою водою до отримання реакції промивних вод рН 6-7.

2.5 Вибір і культивування інших мікробних культур

Escherichia coli В-906 було вибрано як представника грамнегативних бактерій для антимікробного тестування утворених плівок. В-906 культивується 18 год при 37°C у середовищі LB [105] такого складу (%): натрій хлористий – 10, триптон – 5, дріжджовий екстракт - 5.

Вибір бактерій *B. subtilis* В-904 обумовлений, по-перше, їх фізіологічною роллю в асоціації мікроорганізмів рани, у т.ч., в біоплівці, а саме тим, що вони створюють оптимальні умови для росту інших, анаеробних, бактерій. Бацили відновлюють O₂ і виділяють редокс-метаболіти. По-друге, як тест-культура на антимікробну активність, ця бактерія є представником грампозитивних бактерій. Культивується бактерія у повноцінному середовищі LB за температури 28°C.

Іншим представником грампозитивних патогенних бактерій обрано *S. aureus* В-904, як тест-культуру на визначення антимікробної активності галохромних і біоцидних плівок. Бактерію культивують у LB за 28°C.

Бактерію *K. oboediens* ІМВГ180 обрано як джерело внутрішньо-локалізованих протеаз. Для культивування *K. oboediens* ІМВГ180 дві петлі культури з агарового середовища перенести у пробірку з середовищем такого складу: D-маннітол – 2,5%, пептон – 0,3 %, дріжджовий екстракт – 0,5%, рН 5,0 (для агарового середовища – 2,5% агару) і вирощувати за 28°C при обертах 160 об/хв. 1-2 доби (до утворення кульок целюлози). Перенести 1-2 кульки і 10% інокулюму у колбу з 50 мл рідкого середовища, вирощувати, як зазначено вище, без струшування.

Вибір бактерії *P. aeruginosa* обумовлений її здатністю інфікувати рани [106], а також як приклад неферментуючої бактерії. Бактерія культивується у білково-вмісних середовищах типу LB за температури 28°C.

Дріжджовий штам *S. albicans* обрано як представника мікроскопічних патогенних грибів. Культивують дріжджі у середовищі LB за 28°C.

Бактерійну культуру *Serratia marcescens* ІМБГ291 обрано як джерело модельних екзогенних протеаз. Культивують сератію у білко-вмісному середовищі LB за 37 °С.

2.6 Вибір рослинного матеріалу

У цьому дослідженні використовувалися ягоди чорної бузини (*Sambucus nigra* L.) зі спонтанної флори України, Київ. Бузина містить ціаногенні глікозиди - поліфеноли у відносно високій концентрації, відомі своєю активністю поглинання вільних радикалів [107]. Висока антиоксидантна активність плодів і квіток бузини пов'язана з їх лікувальними властивостями [85]. Антимікробні властивості ягід бузини описано в Przybylska-Balcerek та ін. [85]. Бузину здавна використовували в народній медицині завдяки її оздоровчим властивостям.

Отримання настоїв ягід бузини

Ягоди бузини були зібрані у вересні 2023 року і заморожені при -20°C. Інфузійним методом отримано екстракт ягід бузини. Ягоди промивали водою, зважували 40,0 г, додавали в 100-мл стакан з попередньо нагрітою дистильованою водою (90°C) і витримували за такої температури протягом 10 хв. Отриманий розчин червоного кольору мав рН 4. Після фільтрації екстракт зберігали при 4°C у стерильній пляшці до подальшого використання. Настоянки ягід 20, 40 та 60% готували в етиловому спирті (40°) з витримкою 3 год. Сік вичавлювали з розтертих ягід, пропускали через сито і фільтрували через папір. З решток тканин ягід готували водну або спиртову витяжки, як описано вище.

2.7 Характеристика антоціанів

Бузиновий екстракт (40% етанолу) було розведено в 10 разів, використовуючи лінійку фосфат-цитратних буферів рН 4 – рН 12. Абсорбційні спектри розведених зразків було виміряно, використовуючи спектрофотометр (UV-VIS) NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, USA) у діапазоні від 280 до 800 нм.

Для оцінки вмісту антоціанів у зразку, було взято дві аліквоти, об'ємом 50 μL . Одна з цих аліквот була розведена were 150 μL 0.025М калій-хлоридним буфером (рН 1.0); інша, аналогічно, 0,4М натрій ацетатним буфером (рН 4.5). Після цього, розведення еквилюбувались п'ятнадцять хвилин. Порядок розведення 4, було обрано відповідно до лінійного діапазону спектрофотометру ($A < 1,5$). Абсорпційні піки було зафіксовано до довжині хвилі 520 нм. До того ж, показники на довжині хвилі 700 нм зчитувались, щоб коригувати появу осаду, що може вплинути на результат.

Щоб порахувати фінальну абсорбцію розведеного зразку (A), було використано наступне рівняння:

$$A = (A_{520} - A_{700})_{pH\ 1.0} - (A_{520} - A_{700})_{pH\ 4.5}; \text{ де}$$

A_{520} – абсорбція зразку на довжині хвилі 520 нм;

A_{700} – абсорбція зразку на довжині хвилі 700 нм.

Мономерна концентрація антоціанового пігменту (МКАП), для бузинових екстрактів, ціанідін-3-О-глюкозид є домінантним, визначалась за допомогою рівняння:

$$\text{МКАП} \left(\frac{mg}{L} \right) = \frac{A \times MW \times DF \times 1000}{\varepsilon \times l}$$

де, A – абсорбція зразку, MW – молекулярна маса ціанідін-3-О-глюкозиду $\text{cyanidin-3-O-glucoside}$, DF – фактор розведення, ε – коефіцієнт екстинції ціанідін-3-О-глюкозиду, $l = 0,1$ см – довжина шляху спектрофотометра. Далі, щоб визначити вміст даного антоціану в свіжому

соці, результат було домножено на 3,5. Статистичні розрахунки проводились за формулами наведеними нижче:

- $\Delta A_{abs} = \Delta A_{520(pH 1.0)} + \Delta A_{700(pH 1.0)} + \Delta A_{520(pH 4.5)} + \Delta A_{700(pH 4.5)}$;
- $\Delta A_{rel} = \frac{\Delta A_{520(pH 1.0)} + \Delta A_{700(pH 1.0)} + \Delta A_{520(pH 4.5)} + \Delta A_{700(pH 4.5)}}{A}$;
- $\Delta MAPC_{rel} = \Delta A_{rel}$;
- $\Delta MAPC_{abs}(\frac{mg}{L}) = \Delta MAPC_{rel} \times MAPC$.

Щоб визначити потенціал гідрогелевих плівок до иввільнення антоціанів, гідрогелі були нарізані у формі квадратів см. Ці зразки були насичені екстрактом бузини (8 мл на зразок, фактор розведення 2) протягом ночі. Абсорбційні піки були зняті з екстракту до і після насичення плівок. Концентрація ціанідин-3-О-глюкозиду була визначена знову за формулою: $MAPC = (A \times MW \times 1000) / (\epsilon \times l)$; в даному випадку, фактор розведення можна проігнорувати, оскільки він не є релевантним до результатів.

Вивільнення екстракту було досліджено шляхом поміщення наисчених гідрогелевих плівок у чашу Петрі з 8 мл стерильної дистильованої води на 3 години за кімнатної температури. Спектри зчитувались щогодини, концентрація була визначена за тією ж формулою.

2.8 Умови стерилізації гідрогелевих плівок та стабільності кольору після стерилізації:

а) автоклавування: 0,5 ат, 20 хв;

б) опромінення ультрафіолетом: лампою 24 см, що генерує $\lambda=325$ нм, 10-30 хв.

БЦ/Д4 гідрогелі повинні бути стійкі до стерилізації радіаційним методом, поглинута доза іонізуючого опромінення 15-25 кГр, згідно з ДСТУ ISO 11137 [109].

2.9 Визначення зміни кольору плівок інструментальне

Смартфон фіксували на відстані 10 см від досліджуваних зразків за допомогою штатива з кільцевою світлодіодною лампою діаметром 26 см та потужністю 16 Вт. Цифрові зображення досліджуваних полімерних плівок фіксували кожні 10 хвилин протягом 3 годин. Інтенсивність забарвлення полімерних плівок та появу іншого кольору визначали за допомогою комерційно-доступного мобільного застосунку Spotxel Reader 2.5.1. (SICASYS Software GmbH, Німеччина).

2.10 Визначення зміни кольору галохромних плівок на газонах бактерій візуальне

На підготовлений газон ферментуючої або неферментуючої культури бактерії викладають насичені рН-індикатором плівки і спостерігають динаміку зміни кольору. Зміни кольору фіксують фотоз'йомкою.

2.11 Визначення зміни кольору галохромних плівок візуальне на моделі рани

Комерційне яловиче м'ясо витримували у термостаті (37°C) до появи характерного запаху несвіжості. На поверхню викладали підготовлені плівки і спостерігали за зміною кольору плівки.

2.12 Інфрачервона спектроскопія Фур'є

Метод заснований на мікроскопічній взаємодії інфрачервоного світла з хімічною речовиною за допомогою процесу поглинання світла в ІЧ-діапазоні і дозволяє умовно збільшити товщину досліджувальних матеріалів завдяки багаторазовому відбиттю променю від поверхні призми. Зразок висушеної плівки вміщувався на призму КРС-5 і прикривався іншою

призмою. Аналіз ІЧ-поглинання проводили за допомогою спектрометра Bruker-113vFTIR при кімнатній температурі у діапазоні 500–4000/см зі спектральною роздільною здатністю 1,0/см. Точність положення лінії становила ± 1 /см.

2.13 Прив'язка зміни кольору плівки, насиченої витяжкою бузини, до концентрації клітин тестової культури

Тестовою культурою слугувала бактерія *P. aeruginosa*. Нічну рідку культуру розводили серійно, осаджували клітини по 1 мл з розведень культури і осад клітин переносили на заглиблення галохромної плівки БЦ з водною витяжкою ягід бузини. Заглиблення зроблено шляхом натискання плівки денцем стерильної пробірки типу епендорф (2 мл). Паралельно, кожне розведення додатково розводили стерильним фізрозчином і висівали на поживний агар для визначення титру розведення, який представляли як lg КУО/мл. Плівку з визначеними титрами культури витримували за інкубування їх у термостаті (37 °С) 3 год, періодично фіксуючи зміну кольору візуально і камерою.

2.14 Антимікробна активність

Антимікробна активність БЦ гідрогелів, насичених спиртовим екстрактом бузини була протестована на Грампозитивних культурах *B. subtilis* та *S. aureus*, Грамнегативних *E. coli* та *P. aeruginosa*, дріждів *S. Albicans*. Нічна рідка культура вирощувалась у м'ясо-пептонному бульйоні(МБП) на термошейкері, за температури 30°C. Бузиновий екстракт було розведено стерильною дистильованою водою у два рази. Ундаценова кислота (УДК, 98%) – природня жирна кислота, що була отримана від Sigma-Aldrich (США). Її було обрано як антимікробний агент, адже вона не позбуває антоціановий пігмент кольору. Ундаценова кислота була

розведена диметилсульфоскидом (ДМСО, Sigma-Aldrich, США) до 2%-вої концентрації. Крім того, було зроблено розчин бузинового екстракту з ундаценовою кислотою, як дуальну систему. Антоціановий екстракт було розведено ДМСО з 2%-ма ундаценової кислоти. В отримані розчини було поміщено проавтоклавовані (0,5 атм., 112 °С, 30 хв) гідрогелеві плівки, діаметром 5 мм, на ніч. Наступного дня, рідкі культури було посіяно газомом на м'ясо-пептонному агарі. Наповнені гідрогелеві плівки було розміщено на газонах культур. Контролем служила наповнена водою БЦ. Результат перевіряли через 18 годин.

2.15 Визначення стабільності кольору після стерилізації

Проводили у результаті а) автоклавовання, 0.5 ат, 20 хв.; б) опромінення ультрафіолетом під УФ лампою ($\lambda = 325$ нм) 10, 20 та 30 хв. Зміну кольору визначали візуально. Для створення галохромних БЦ-плівок застосовували спиртовий екстракт ягід бузини, розведення 2, 5, 10 разу для замочування очищених стерильних БЦ-плівок протягом 3 год.

2.16 Розробка сенсорної системи на основі смартфона

Як чутливий елемент сенсорної системи на основі смартфона, надалі використовували БЦ-плівки, які перед використанням інкубували у розчинах зазначених рН-індикаторів у 100 мМ фосфатно-цитратному буфері з різними значеннями рН (рН 4,0; рН 5,0; рН 6,0; рН 7,0) з концентрацією 0,2-0,4 мг/мл протягом 1 години. Для того, щоб оцінити здатність БЦ-плівок, які містять зазначені рН індикатори, змінювати колір за умови роботи бактерійних протеаз, полімерні плівки розміщували на чашках Петрі з твердим поживним середовищем LB та бактерійними газонами *B. subtilis* та *P. aeruginosa*. Зміну кольору полімерних плівок реєстрували за допомогою камери смартфона при інкубації плівок на

бактерійних газонах за кімнатної температури як описано у розділі 2.9. Інтенсивність забарвлення полімерних плівок та появу іншого кольору визначали за допомогою комерційно-доступного мобільного застосунку Spotxel Reader 2.5.1. (SICASYS Software GmbH, Німеччина).

2.17 Цитотоксичність. МТТ-test

Життєздатність клітин було визначено спектрофотометрично, використовуючи тетразолевий барвник 3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-2,5-дифеніл-тетразоліум бромід (МТТ). Цей тест ґрунтується на здатності живих клітин з активним метаболізмом перетворювати МТТ у формазаан [<https://www.thermofisher.com/ua/en/home/references/protocols/cell-and-tissue-analysis/protocols/vybrant-mtt-cell-proliferation-assay-protocol.html>]. Кількість життєздатних клітин пропорційна спектру нерозчинного у воді формазаану. Абсорбцію було виміряно на 570 нм після розчинення кристалів формазаану в диметилсульфоксиді (ДМСО) [36]. Дослідженню проводили на двох клітинних лініях: мезенхімальні стовбурові клітини (МСК) та первинні фібробласти мишей (ПФМ). Використовували 96-ти лункові планшетки.

Мезенхімальні стовбурові клітини мишей було ізольовано з пуповини. Клітини пройшли чотири пасажі, після чого були розсіяні. Клітини було перенесено (5000 клітин/лунка) у середовище DMEM-F-12, доповненого 10%-вою FBS (ембріональна бичача сироватка) та антибіотиком, 1% пеніцилін/стрептоміцин (Gibco, США).

Первинні фібробласти було отримано з м'якої тканини 2-денних мишей лінії ICR. Культуру було розсіяно (5000 клітин/лунка), середовище було змінено на DMEM-F-12 з 10%-вою FBS. МТТ для ПФМ було проведено для якісного визначення життєздатності клітин після тесту-подряпини.

Обидві клітинні лінії було інкубовано 24 години за температури 37 °C та 5% CO₂. Після інкубації, клітини було піддано впливу різних доз спиртового екстракту бузини (з антоціанами). Концентрації антоціанів було розраховано відповідно до результатів спектрофотометричного аналізу екстракту. Початкова концентрація 240 μг/мл була розведена покроково у 10 разів до концентрації $2,4 \times 10^{-7}$ μг/мл. Клітини інкубували у середовищі з антоціанами 24 години. Потім, середовище було замінено на свіже, 20 μл профільтрованого МТТ (5 мг/мл), розведеного у фосфатно-буферному розчині (PBS, pH 7.4) додали в кожну лунку. Для успішного проведення реакції, планшетки було поміщено у термостат на 3 години за температури 37 °C. Утворені кристали формазану було розведено у 100 μл ДМСО (Sigma-Aldrich, США). Оптична густина кожної лунки вимірювалась мікропланшетним спектрофотометром (Multiscan TirerTek MMC 340, США). Результати було виражено у відсотках від контролю та зареєстрованим сигналом. Повторність експерименту – три.

2.18 Scratch-test (тест-подряпина)

Проліферація та міграція клітин фібробластів визначалась через мікроскоп. Клітинна культура *in vitro* первинних фібробластів мишей (ПФМ) була використана для тесту-подряпини. Ізольований матеріал було оброблено $\times 10$ розчином пеніцилін/стрептоміцину (Gibco, США) протягом 20 хвилин. Після цього, фібробласти було інкубовано 12 годин у 0,20% трипсині. Мишачі фібробласти вирощували протягом ночі у 2% середовищі ембріональної бичачої сироватки у шестилункових планшетах. Щільність клітин дорівнювала 90,000 клітин/лунка. Клітини досягли 80%-го рівня злиття моношару після 24 годин інкубації за температури 37°C. Середовище було замінено. Ще через 24 години у кожній лунці з моношаром було зроблено подряпину стерильним накінечником. Для того, щоб позбутись плаваючих фібробластів клітини було промито фосфат-буферним

розчином, середовище було замінено знову. Різні дози спиртового екстракту бузини було внесено у кожен лунку, відповідно до розрахунків вмісту ціанідин-3-О-глюкозиду. Початкову концентрацію 24 $\mu\text{г}/\text{мл}$ було розтитровано з кроком у 10 разів до $2,4 \times 10^{-3}$ $\mu\text{г}/\text{мл}$. Використовуючи інвертований мікроскоп (Karl Zeiss, Primovert, збільшення 4x), проводилось спостереження міграції ПФМ до центру щілини. Фото було зроблено на камеру даного мікроскопа, одразу після утворення подряпини, через 24 години і через 48 годин. Отримані фотографії було проаналізовано у програмі ImageJ/Fiji® [вставка на статтю з протоколом]. Результати представлені у вигляді середнього значення площі кожного з варіантів, згідно з часовими точками.

2.19 Статистична обробка даних

Результати наводили як середнє значення \pm стандартне відхилення, де кожне значення є середнім для трьох повторностей реакції або вимірювання. Вірогідність різниці між групами оцінювали за допомогою критерію Ст'юдента при $p < 0,05$.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Створення гідрогелевої плівки

Для дизайну смарт-гідрогелевих пов'язок, мікробну асоціацію комбуча вирощували 7 діб, після чого отримана плівка бактерійної целюлози оцінювалася з точки зору якісних показників, таких як: товщина, міцність та однорідність по всій площі поверхні, відсутність прогалин та інших недоліків. За результатами візуального огляду отримана целюлозна плівка відповідала пред'явленим критеріям якості за товщини 4,0 мм.

Витяжки ягід бузини чорної.

Бузина є розповсюдженою рослиною в Україні, а сік її ягід містить пігменти антоціанового ряду. Водні і спиртові витяжки зі зруйнованих ягід вводили в очищені плівки БЦ і експонували 30 хв та 3 год. Результати аналізу різних варіантів введення витяжок бузини представлено на рис. 3.2.1.1.

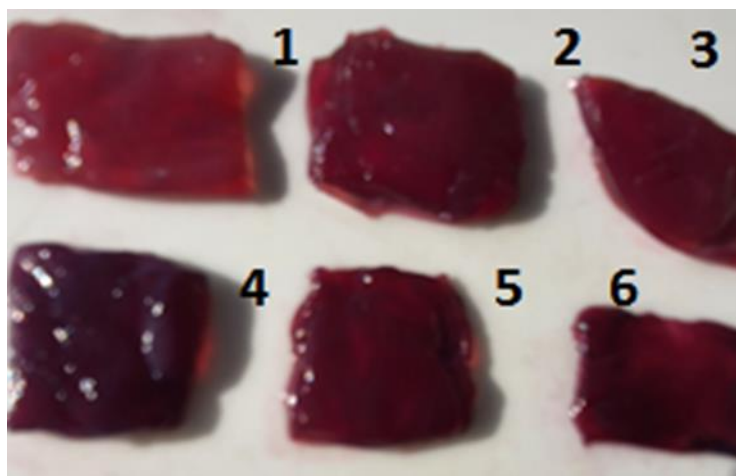


Рис. 3.1.1 Гідрогелі бактерійної целюлози, забарвлені витяжками антоціанів з ягід бузини; 1 – 3: різні концентрації антоціанів з ягід бузини (20, 40 та 60%) у 40 % етиловому спирті; 4 – водний настій подрібнених ягід (40 %); 5 – сік бузини; 6 – водний настій шроту після витискання соку (40%).

Результати аналізу показали, що:

- 1) існує часова залежність входження витяжок бузини у БЦ-гідрогель: краще насичення відбувається через 3 год;
- 2) насичення БЦ, визначене візуально, водними настоянками залежить від концентрації ягід, і вище 40% у гідрогелі насиченість кольору не змінюється (рис. 3.1.2);
- 3) спиртові витяжки швидко вивільняють пігменти з ягід бузини і входять у БЦ-гідрогелі, проте, концентрація >40% не впливає на насичення кольору (рис.3.1.2);
- 4) водний настій гарно забарвлює БЦ, колір забарвленої БЦ залежить від рН води і зберігається після її висушування (рис. 3.1.2 А).
- 5) сік швидко входить у товщу БЦ (30 хв) і рівномірно забарвлює її у червоний колір (кислий рН 4) (рис.3.1.2 Б).

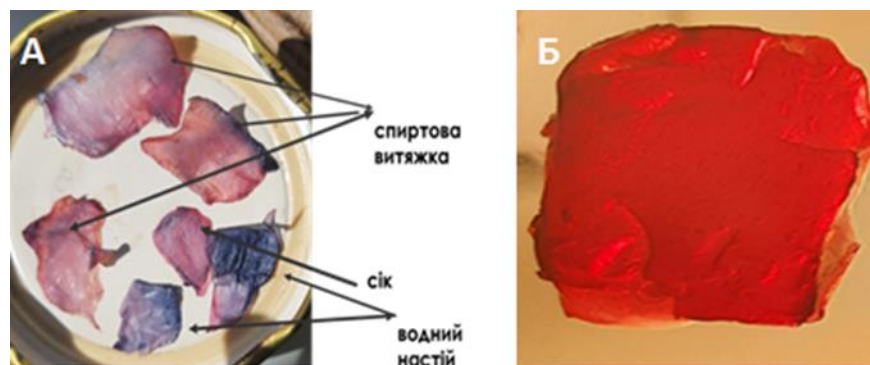


Рис. 3.1.2 – Колір гідрогелевих БЦ-плівок з введеними витяжками пігментів, отриманих з ягід бузини. А – колір сухих БЦ-плівок зберігається і залежить від рН витяжок: кислі витяжки мають червоний колір (спиртові, сік), а водні - лужні (синій). Б - сік та витяжки з тканин ягід бузини швидко входять у товщу БЦ і рівномірно забарвлюють її у червоний колір (кислий рН).

3.2. Витяжки ягід бузини чорної у буферних розчинах

Для створення лінійки рН було використано фосфатні буфери з рН від 4,0 до 12,0 з кроком в 1 (рис. 3.2.1). Буфери використовували для розведення спиртового екстракту бузини у 30 разів.

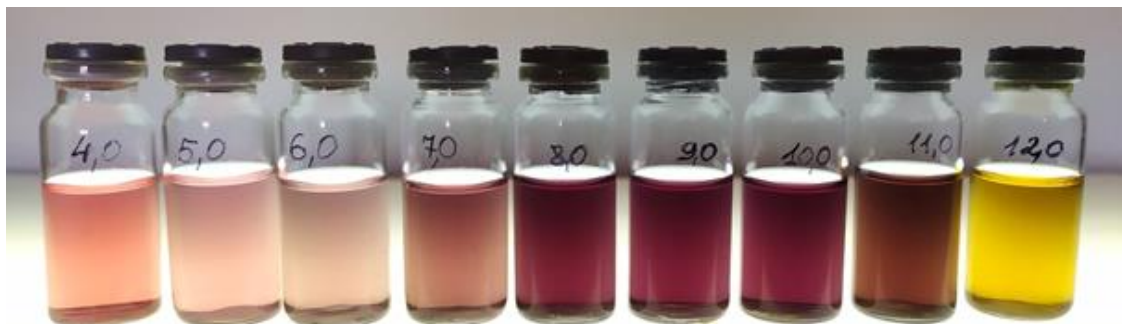


Рис. 3.2.1 Лінійка рН фосфатних буферів з спиртовим екстрактом ягід бузини (розведення у 30 разів) з рН від 4,0 до 12,0.

Витяжки ягід бузини чорної у гідрогелях.

Для насичення очищеної БЦ використовували розведення екстракту бузини у 10 разів. Час насичення гідрогелей у розчинах – 30 хв. Тестові зразки гідрогелю мали однакові розміри діаметром 5 мм. Як контроль взято гідрогель без індикатора (рис. 3.2.2).

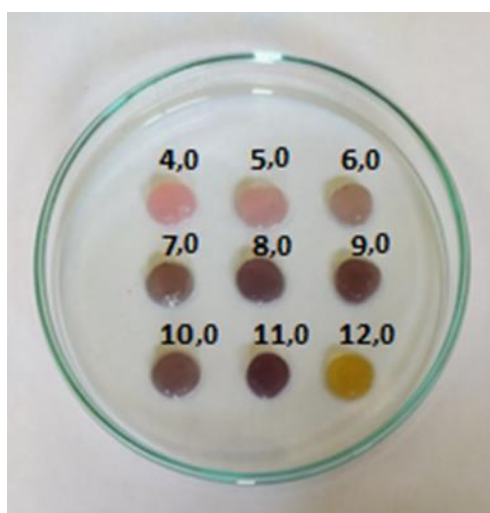


Рис. 3.2.2 Лінійка кольорових гідрогелів бактерійної целюлози, насиченої спиртовим екстрактом ягід бузини чорної, рН від 4,0 до 12,0

3.3. Сенсорна система на основі плівок бактерійної целюлози та природних антоціанів бузини чорної (*Sambucus nigra* L.)

Антоціани бузини чорної (*Sambucus nigra* L.). здатні змінювати колір з рожево-червоного (за рН 4-6) до темно-синього (за рН вище 6). Зважаючи на це, як чутливий елемент сенсорного пристрою на основі смартфона та цього рН-індикатора використовували плівки бактерійної целюлози діаметром 5 мм, що попередньо інкубували у розчині екстракту бузини чорної у 100 мМ фосфатно-цитратному буфері (співвідношення 1:1) з різними значеннями рН: 4,0; 5,0; 6,0 та 7,0 протягом 1 години. Здатність таких сенсорних елементів змінювати колір при контакті з бактеріями *B. subtilis* та *P. aeruginosa* на твердих поверхнях надалі реєстрували за допомогою мобільного застосунку Spotxel Reader 2.5.1.

Показано, що плівки бактерійної целюлози з іммобілізованими у їхній структурі за рН 4,0 та 5,0 у 100 мМ фосфатно-цитратному буфері антоціанами бузини чорної змінюють свій колір з рожево-червоного до темно-синього, залежно від часу контакту з бактерійним газонами *B. subtilis* та *P. aeruginosa*. Ці зміни можна оцінити як візуально (рис. 3.3.1. та рис. 3.3.2), так і кількісно за допомогою мобільного застосунку (рис. 3.3.3 та рис. 3.3.4). Під час інкубації на бактерійних газонах плівки поступово втрачають рожево-червоний колір, спостерігається поява темно-синього забарвлення, інтенсивність якого збільшується протягом всього часу експерименту (3 години). Інтенсивність синього забарвлення зростає з перших хвилин інкубації на газоні як з *B. subtilis* (рис. 3.3.1 та рис. 3.3.3) так і з *P. aeruginosa* (рис. 3.3.4. та рис. 3.3.5.), його можна легко реєструвати за допомогою камери смартфона та мобільного застосунку аналізу цифрових зображень (рис. 3.3.3. та рис. 3.3.5.).

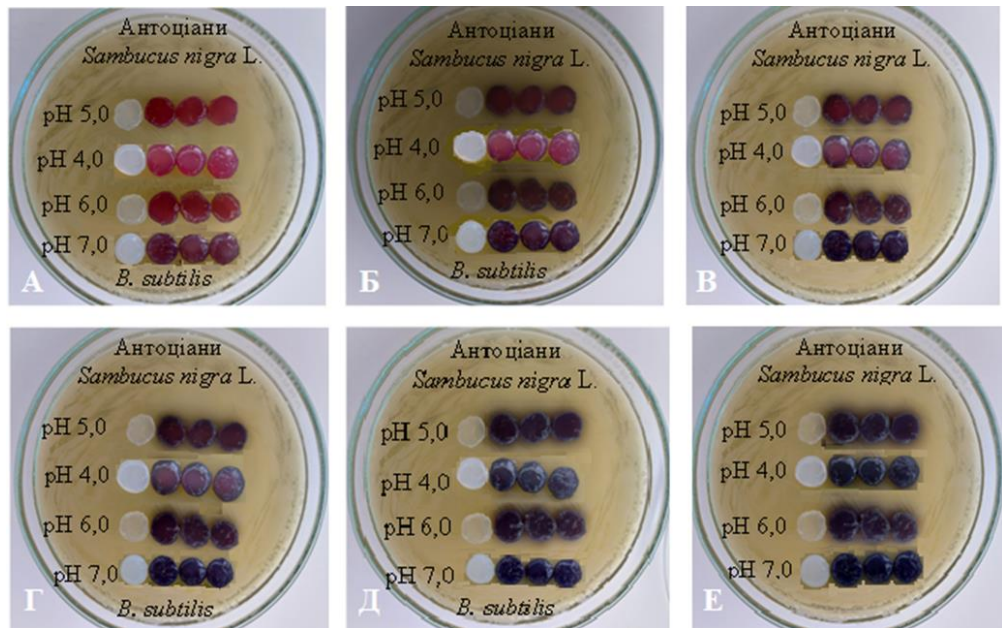


Рис. 3.3.1 Зміни кольору плівок бактерійної целюлози з іммобілізованим у їхній структурі природним рН-індикатором – антоціанами бузини чорної (*Sambucus nigra* L.). залежно від часу інкубації на газоні *B.subtilis* та рН 100 мМ фосфатно-цитратного буфера, використаного при іммобілізації; Час інкубації – 0 хв (а), 20 хв. (б), 40 хв. (в), 60 хв. (г), 120 хв. (д), 180 хв. (е).

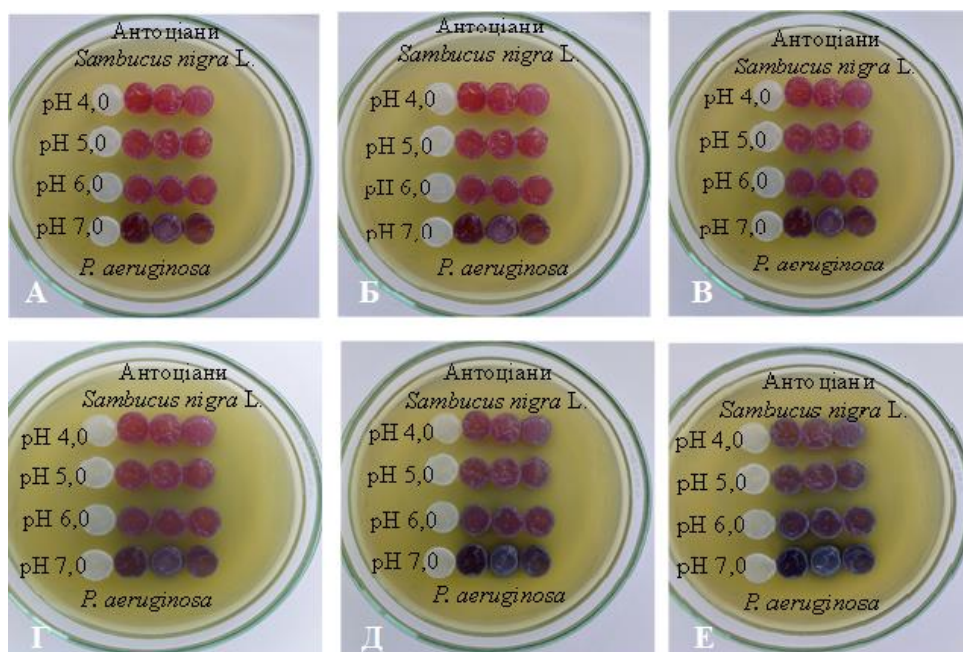
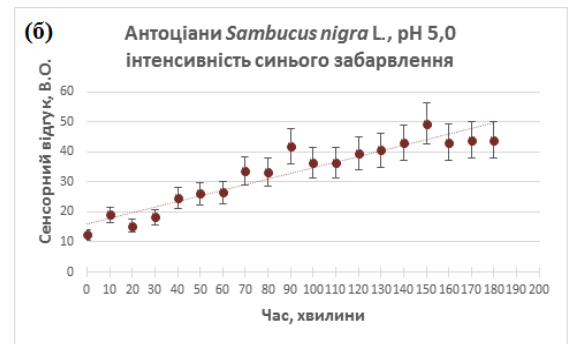
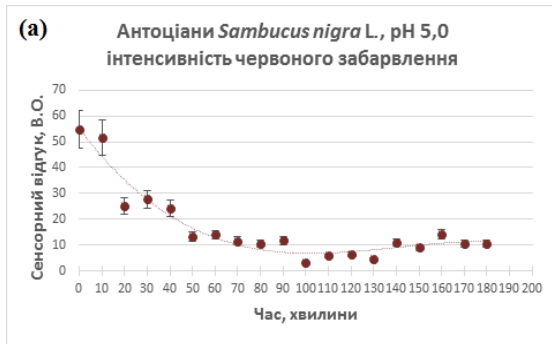


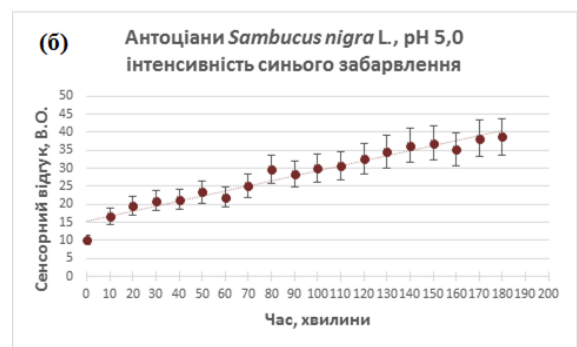
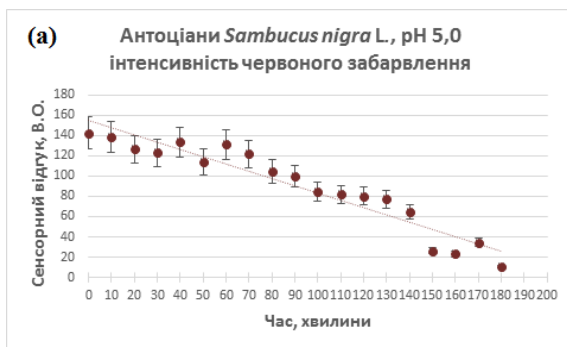
Рис. 3.3.2. Зміни кольору плівок бактерійної целюлози з іммобілізованим у їхній структурі природним рН-індикатором – антоціанами бузини чорної (*Sambucus nigra* L.). залежно від часу інкубації на газоні *P. aeruginosa* та рН 100 мМ фосфатно-цитратного буфера, використаного при іммобілізації; Час інкубації – 0 хв. (а), 20 хв. (б), 40 хв. (в), 60 хв. (г), 120 хв. (д), 180 хв. (е)

Рис. 3.3.3. Залежність величини сенсорних відгуків (інтенсивності червоного (а) та темно-синього (б) забарвлення) біосенсорної системи на основі плівок бактерійної целюлози з іммобілізованим у їхній структурі природним рН-індикатором – антоціанами *Sambucus nigra* L. від часу



інкубації на газоні *B.subtilis*. Індикатор іммобілізований у структурі полімерних плівок у 100 мМ фосфатно-цитратному буфері рН 5,0.

Рис. 3.3.4. Залежність величини сенсорних відгуків (інтенсивності червоного (а) та темно-синього (б) забарвлення) біосенсорної системи на основі плівок бактерійної целюлози з іммобілізованим у їхній структурі природним рН-індикатором - антоціанами *Sambucus nigra* L. від часу

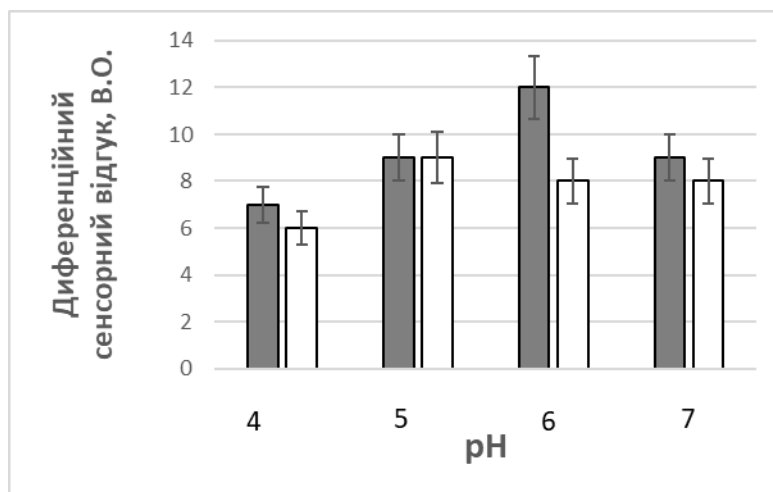


інкубації на газоні *P.aeruginosa*. Індикатор іммобілізований у структурі полімерних плівок у 100 мМ фосфатно-цитратному буфері рН 5,0.

Виражені зміни кольору чутливих елементів сенсорів на основі плівок бактерійної целюлози з іммобілізованими антоціанами *Sambucus nigra* L. з рожево-червоного до темно-синього спостерігали за рН 100 мМ фосфатно-цитратного буферу, застосованого при іммобілізації, що не перевищує 6,0. Менш виражені зміни кольору спостерігали у випадку сенсорних елементів, у яких антоціани бузини чорної (*Sambucus nigra* L.) були іммобілізовані у

100 мМ фосфатно-цитратному буфері 7,0. У цьому випадку можливо було реєструвати зміни інтенсивності синього забарвлення за допомогою камери смартфона та застосунку Spotxel Reader 2.5.1., проте візуально ці зміни були набагато менш помітні порівняно до чутливих елементів сенсорів з антоціанами *Sambucus nigra* L., іммобілізованими за рН 5 та 6. На Рис. 3.22 наведено залежність величини диференційних сенсорних відгуків (інтенсивності темно-синього забарвлення) розробленої нами біосенсорної системи на основі антоціанів *Sambucus nigra* L. від рН 100 мМ фосфатно-цитратного буфера, використаного при іммобілізації. Як видно з рисунку, оптимальними значеннями рН 100 мМ фосфатно-цитратного буферу є рН 5,0 та 6,0. При цьому, для візуального оцінювання появи темно-синього кольору більш зручною є сенсорна система на основі плівок бактерійної целюлози з антоціанами *Sambucus nigra* L., іммобілізованими за у 100 мМ фосфатно-цитратному буфері, рН 5,0.

Рис. 3.3.5. – Залежність величини диференційних сенсорних відгуків (інтенсивності темно-синього забарвлення) біосенсорної системи на основі плівок бактерійної целюлози з іммобілізованим у їхній структурі природним рН-індикатором – антоціанами *Sambucus nigra* L. від рН 100 мМ фосфатно-цитратного буфера, використаного при іммобілізації. Плівки інкубували на



газоні *B.subtilis* (сірі стовпчики) та *P. aeruginosa* (білі стовпчики) протягом 30 хвилин.

Експеримент з розрахунку межі визначення (3σ) створеного сенсора показав, що всі сенсорні сигнали, які за своїм значенням перевищують 3,45 В.О. з імовірністю 99,9% можна віднести до таких, що не є шумовими і пов'язані з роботою бактерійних протеаз.

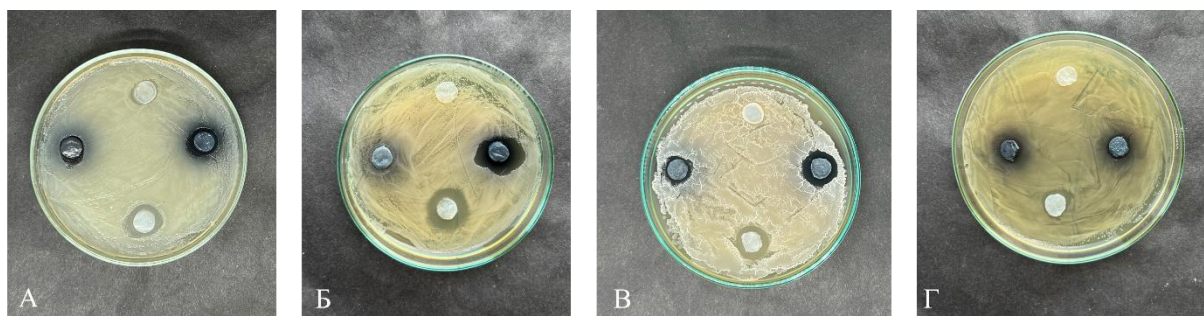
Таким чином, на основі плівок бактерійної целюлози та антоціанів *Sambucus nigra* L. було створено селективні елементи сенсорних пристроїв, здатні змінювати колір з рожево-червоного до темно-синього при інкубації з різними видами бактерій на твердих поверхнях. Було показано, що зміни кольору сенсорних елементів можна успішно реєструвати як візуально, так і за допомогою смартфона з вбудованою комерційно-доступною програмою аналізу цифрових зображень.

3.4. Антимікробна активність

Ундеценова кислота є натуральним продуктом, яку отримують шляхом піролізу рицинової кислоти - продукту касторової олії. Контрольні гідрогелеві плівки з стерильною дистильованою водою не мали антимікробної активності. Так само, як і плівки з екстрактом антоціанів, розведеним у два рази. Щодо плівок, наповнених комбінованим розчином

2%-вої ундаценової кислоти та бузинового екстракту – антимікробна активність була помічена (рис 3.4.1.)

Рис. 3.4.1 – Антимікробна активність БЦ, наповнених екстрактом бузини та 2%-вою УДК. А – *S. aureus*, Б – *C. albicans*, В – *B. subtilis*, Г – *E.coli*.



Експеримент повторювали шість разів. Діаметр гала було розраховано, як середнє значення даних вимірювань (табл. 3.4.1) Найкраще антимікробна активність проявлялась на культурах *B.subtilis*, *S.aureus*, *C. albicans*. Колір дисків змінився з рожево-червоного на сіро-синій, що свідчить про залужування культурального середовища.

Таблиця 3.4.1

Розміри гала антимікробної активності, мм

Вид мікроорганізма	Діаметр гала, мм	
	УДК 2%	АНЦ+УДК 2%
<i>S. aureus</i>	8,7 ± 2	8,9 ± 1,3
<i>C. albicans</i>	12,08 ± 2,7	12,5 ± 0,98
<i>B.Subtilis</i>	7,9 ± 3,16	9,2 ± 0,5
<i>E. Coli</i>	-	-

3.5. Стабільність рН-індикаторів у галохромних плівках БЦ

Після автоклавування (0.5 атм, 20 хв), колір буферної витяжки і плівок змінюється і стає бляклим. Після опромінення галохромних БЦ-плівок ультрафіолетом від 10 до 30 хв колір не змінюється (рис. 3.5.1). Стерильність плівок забезпечується і після перебування 16 год у термостаті (280С) (рис. 3.5.1.).

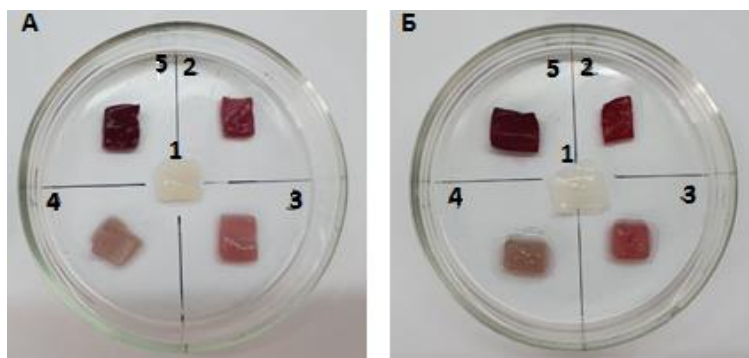


Рис. 3.5.1 – УФ опромінення БЦ плівок протягом 30 хв, насичених екстрактом бузини різного розведення, не призводить до зміни кольору плівок. 1 – очищена БЦ- плівка, стерильна без екстракту; 2 –розведення екстракту бузини в 2 рази; 3 – розведення в 5 разів; 4 - розведення в 10 разів; 5 – нерозведений екстракт.

Перебування неопромінених БЦ-плівок з різними концентраціями витяжки ягід бузини у термостаті (28 0С) виявило інфекцію у цих зразках (рис. 3.5.2. зправа, №5).

Рис. 3.5.2 – Галохромні БЦ-плівки УФ опромінені (зліва) і неопромінені (зправа) після 16 годин перебування у термостаті. 1 – очищена БЦ-плівка, стерильна без екстракту; 2 – розведення екстракту бузини в 2



рази; 3 – розведення в 5 разів; 4 – розведення в 10 разів; 5 – нерозведений спиртовий екстракт

Отже, стерилізування галохромних БЦ-плівок слід проводити ультрафіолетом ($\lambda=345$ нм) протягом 10-30 хв, у залежності від розміру та товщини плівки.

3.6. Зміна кольору плівок БЦ/АНЦ на моделі рани

На несвіжому м'ясі, що імітує інфіковану рану, плівка, утворена шляхом наповнення БЦ-плівки спиртовим екстрактом ягід бузини, змінює колір з червоного (рН 4) до фіолетового (рН 7) через 20 хв і через 12 год втрачає колір (рН 13) (рис.3.6.1).

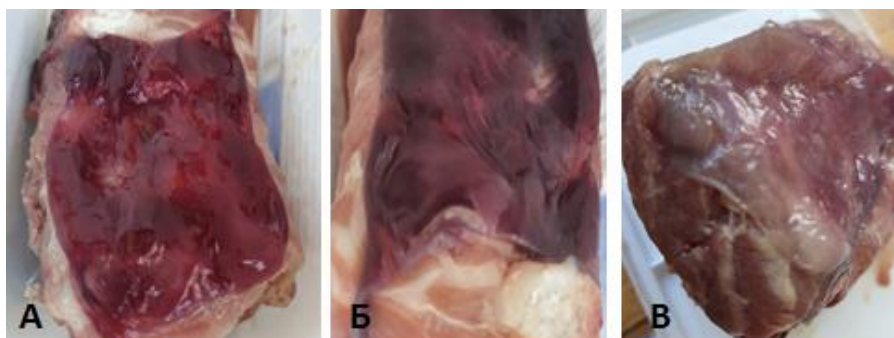


Рис. 3.6.1 - Вигляд плівок бактерійної целюлози, наповненої екстрактом бузини на несвіжому контамінованому мікроорганізмами м'ясі, що імітує рану. А – 0 год; Б – через 20 хв плівка набуває фіолетового кольору завдяки зміні рН у бік лужного; В – через 12 год плівка знебарвлюється.

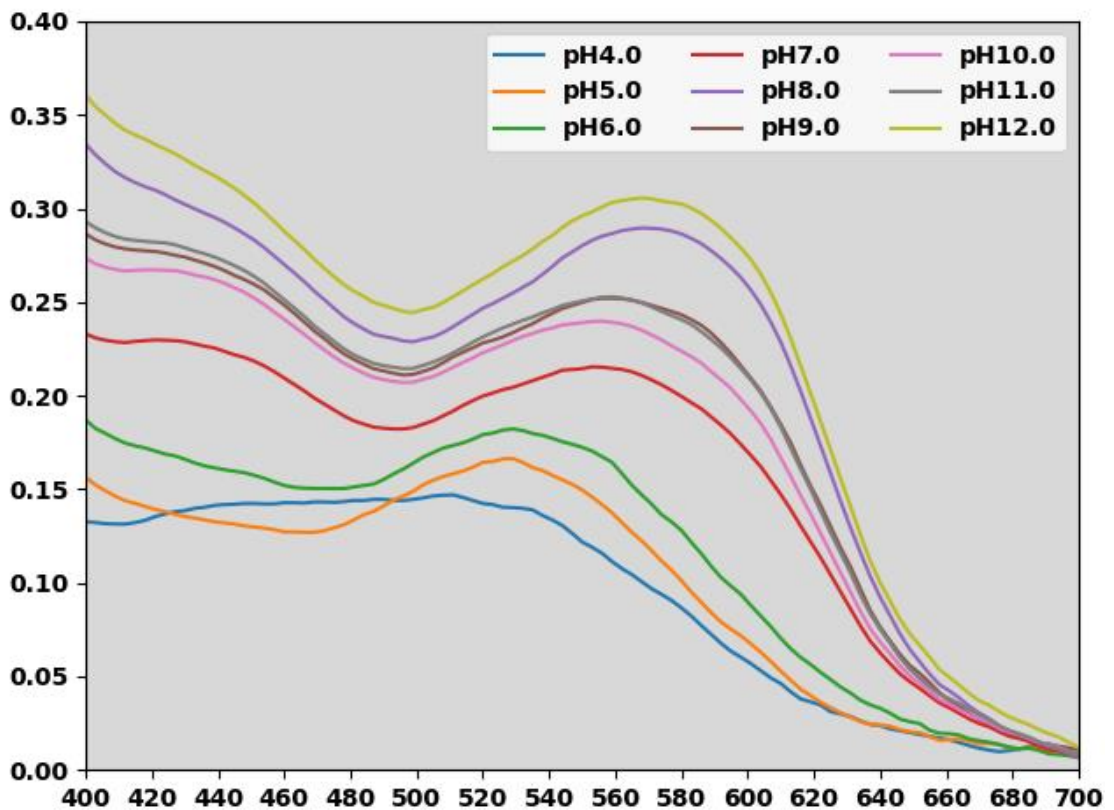
3.7. Характеристика антоціанів

Ми можемо спостерігати здвиг піка абсорбції (рис.3.7.1.), відповідно до рівня рН. Таким чином, при рН.4, антоціани абсорбують світло на довжині хвилі 514 нм. Далі, підвищення рН до 5-6 призводить до утворення піка на довжині хвилі 520-530 нм. Пік абсорбції може змінюватись аж до позиціонування на довжині хвилі 565 нм. Колір екстракту також змінюється

від червоного до відтінків фіолетового (pH 7 – pH 10). Це пов'язано зі структурними модифікаціями молекул.

Рис. 3.7.1 – UV-Vis спектр антоціанів за рівняв pH 4-12 у діапазоні хвилі(λ) 400-700 нм

Концентрація ціанідин-3-О-глюкозиду у зразку спиртового (20%)



екстракта бузини дорівнює $427,29 \pm 8,015$ (мг/л). Знаючи фактор розведення, можна обрахувати концентрацію даного антоціану у свіжому бузиновому соці. Вона буде дорівнювати $be 1,5 \pm 0,49$ г/л

Вбирання екстракту АНЦ плівкою є досить вираженим. Концентрація ціанідин-3-о-глюкозиду в екстракті антоціанів змінилась з $183 \pm 0,01$ мг/л до $135,7 \pm 0,04$ мг/л. Це свідчить про те, що кожна з трьох плівок увібрала в себе близько 48 мг/л ціанідин-3-о-глюкозиду. Отриманні значення є середнім, отриманим з трьох повторностей.

Вивільнення екстракту антоціанів з гідрогелів у воду можна було побачити неозброєним оком вже через 1 годину після поміщення плівок у стерильну дистильовану воду. Розчин набував насиченішого червоного кольору, згідно з часовими точками. Концентрації антоціанів відповідні до часу зняття показників наведені на рис. 3.7.2.

Таким чином, за три години АНЦ/БЦ здатна вивільнити у воду $24 \pm 0,2$ мг/мл антоціанів. Цю цифру можна перевести у 50% від кількості антоціанів набраних плівкою з екстракту. Варто зазначити, що ефективність віддачі антоціанів може змінюватись в залежності від товщини гідрогелю.

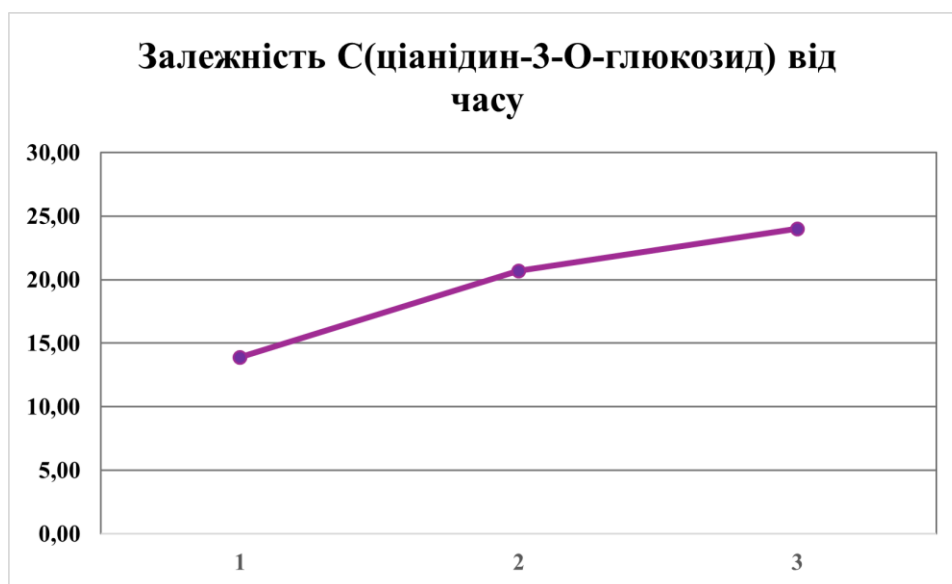


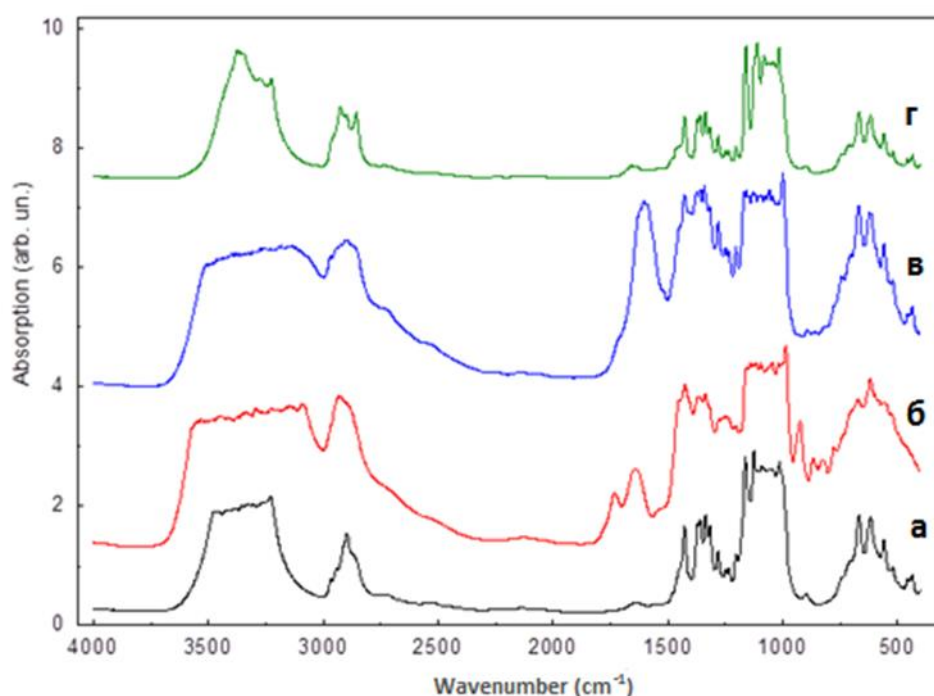
Рис. 3.7.2. Динаміка вивільнення ціанідин-3-О-глюкозиду з гідрогелю

3.8 Інфрачервона спектроскопія з перетворенням Фур'є БЦ-плівок, наповнених екстрактом ягід бузини, SEM мікроскопія

Метод використано для підтвердження присутності антоціанів у БЦ-плівках. Смуга поглинання навколо піків 3436 см^{-1} і 3411 см^{-1} продемонструвала вібрацію О–Н (рис. 3.8.1.). Крім того, пік поглинання з'явився у БЦ з АНЦ бузини при 1390 см^{-1} , що представляє згинальні коливання О–Н (рис. 3.35в). Крім того, характерна довжина хвилі, що дотична до 1070 см^{-1} , представляє вібрацію С–О, характерну для АНЦ. Ці

дані вказують на деякі відмінності між хімічною структурою нативної целюлози та імпрегнованою екстрактом бузини целюлозою.

Рис. 3.8.1. ІЧ-спектри плівки бактерійної целюлози та плівки БЦ з наповнювачами (а – очищена БЦ-плівка; б – неочищена БЦ-плівка; в – БЦ-плівка, насичена спиртовою витяжкою АНЦ; г - БЦ-плівка, насичена 1% димексидом.)



Мікрофотографії електронного мікроскопа (SEM) чистої плівки БЦ демонструють щільно заплутану сітку фібрил з нерегулярним розташуванням порожнин між фібрилами (рис. 3.8.2.). Проте структура фібрил БЦ/АНЦ на рис. 3.8.2б показує змінену морфологію. Зокрема, ширина мікрофібрил збільшилася з 113 ± 28 нм до 172 ± 58 нм. Щільно упакована мережа фібрил БЦ стала менш щільною в матриці БЦ/АНЦ, а пори більш вираженими, ніж у чистої целюлози.

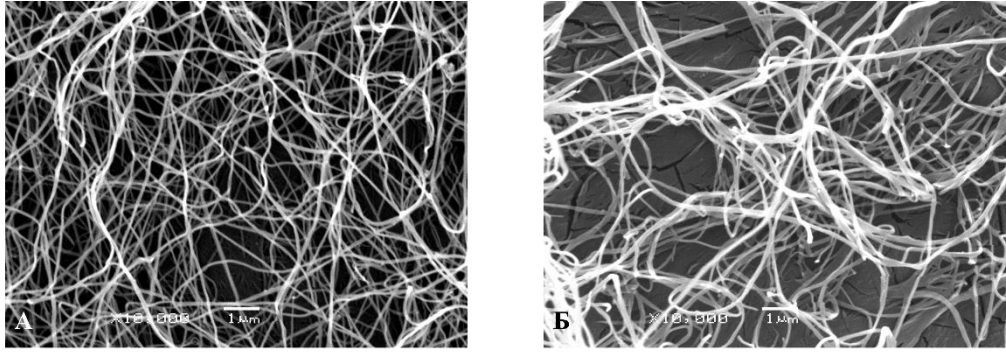


Рис. 3.8.2. Мікрофотографії SEM, А – чистої БЦ, середня ширина мікрофібрил 113 ± 28 нм; Б – наповненої (БЦ/АНЦ), середня ширина 172 ± 58 нм. Шкала: $1 \mu\text{m}$., середні значення значимо відрізняються ($p < 0,05$).

3.9. Scratch-test

Фото ПФМ напряду показує ефект міграції та проліферації даних клітин під впливом антоціанів. Після 24 годин інкубації, можна спостерігати (рис. 3.9.1.; рис.3.9.2.) краще зменшення площі подряпини з дозою 0.24 $\mu\text{g}/\text{ml}$ антоціанів, порівняно з контролем. Це означає, що ПФМ були активовані АНЦ й заповнювали проміжок швидше. Через 48 годин інкубації клітини з дозами антоціанів 2.4 and 0.24 $\mu\text{g}/\text{ml}$ теж виявляли ознаки активації фібробластів. Проте, початкова доза 24 $\mu\text{g}/\text{ml}$ негативно впливала на заживлення подряпини негативно, змінюючи морфологію фібробластів. Ріст клітин, які оброблялись 0,00024 $\mu\text{g}/\text{ml}$ дозою препарату, був на рівні контролю.

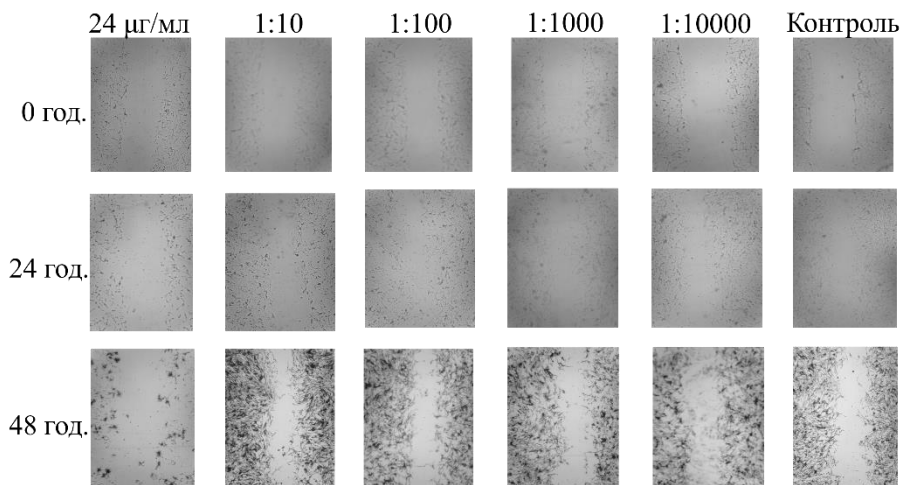


Рис. 3.9.1 – мікроскопічні фото, на яких зображено подряпини на початку експеримнта (0 год.), через 24 години і 48 годин інкубації.

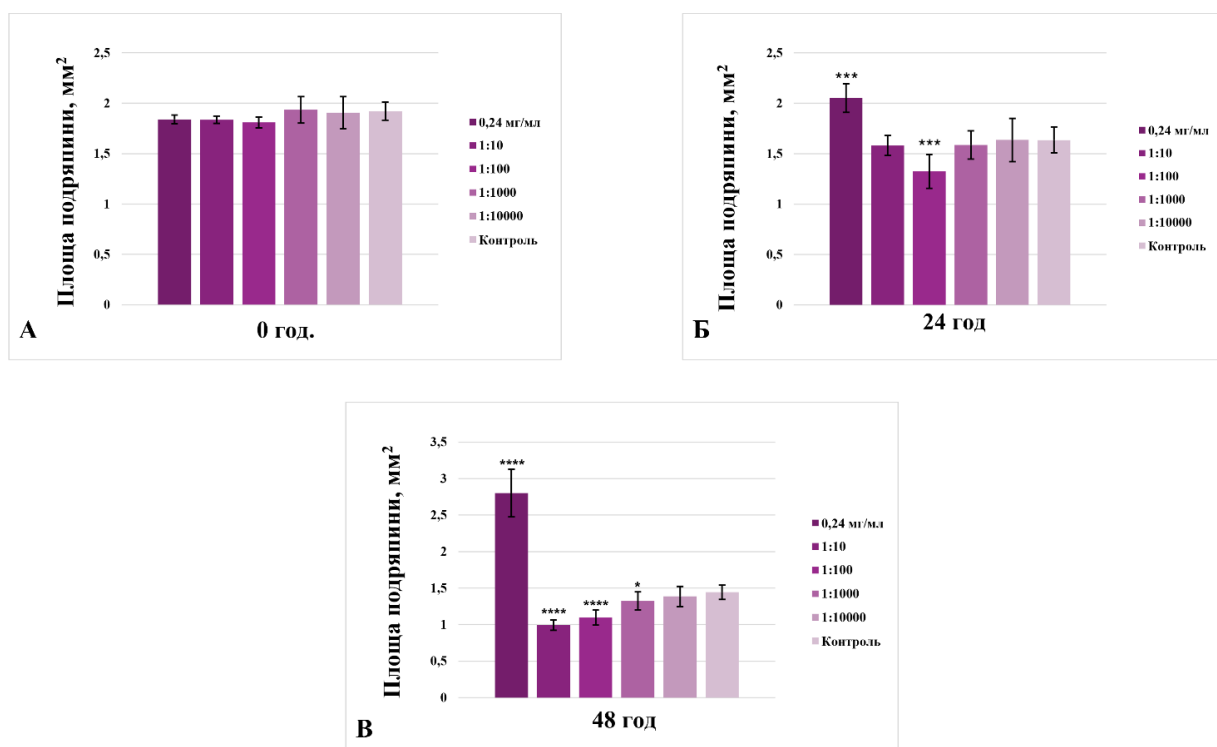


Рис. 3.9.2 – Вплив доз АНЦ, еквівалентних до доз, що вивільняють БЦ плівки, на міграцію та проліферацію ПФМ. Статистично значимі зміни позначені зірками . А – площі подряпин, одразу після їх нанесення, Б – площа подряпин, через 24 години інкубації, В – площа подряпин, через 48 годин інкубації.

3.10. Цитотоксичність. МТТ-test

МТТ-тест, було проведено на клітинних лініях *in vitro* МСК та ПФМ, щоб визначити вплив антоціанів на різні клітинні популяції. МТТ-тест на клітинах МСК показав, що антоціани можуть інгібувати проліферацію МСК (11-15%). Відповідно, це концентрації: 2,4; 24; 240,0 (µг/мл). Тим не менш, цитотоксичності виявлено не було. Розчин з найменшою концентрацією (0.24 µг/мл) не впливав на ріст МСК (рис. 3.11.1). Це пояснюється стійкістю лінії до зовнішніх впливів. Похибки виражені у вигляді стандартного відхилення. Значимі зміни ($p < 0,005$) позначено зірками (рис.3.10.1.).

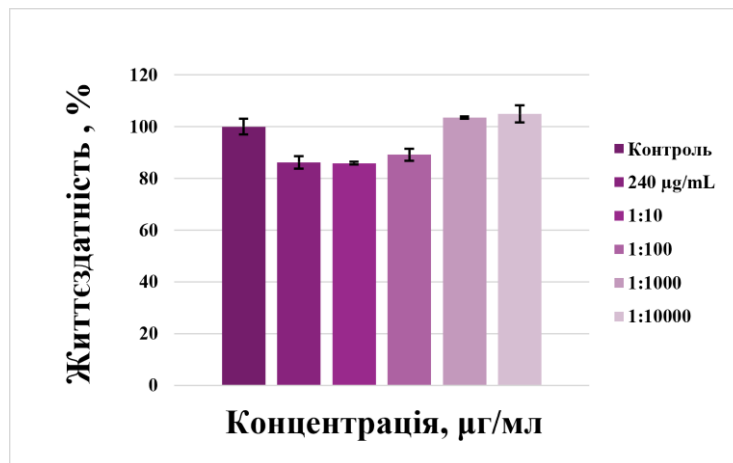


Рис. 3.10.1 – Вплив екстракту антоціанів на життєздатність МСК.

В експерименті з ПФМ, МТТ тест показав зменшення життєздатності фібробластів, що піддалися впливу 24 μг/мл дози антоціанів. Однак, нижчі концентрації привели до збільшення рівня проліферації (рис.3.10.2).

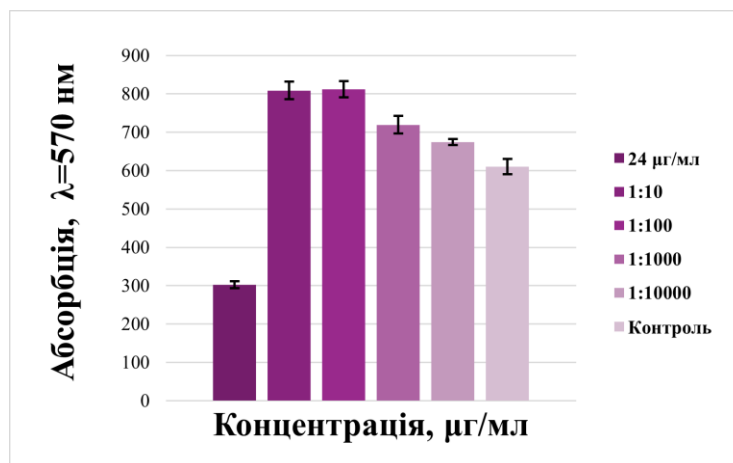


Рис. 3.10.2 – Вплив екстракту антоціанів на життєздатність ПФМ

Таким чином, в роботі запропоновано новий метод виготовлення та прототип антимікробного гідрогелю на основі плівки з бактеріальної целюлози та антимікробного агенту - ундаценової кислоти. Цей гідрогель призначений для покриття ран та сприяє їх загоєнню. Однак, було помічено, що ундаценова кислота має релевантний вплив лише на грампозитивні

бактерії. Це дає привід для подальших досліджень і підбору антимікробного агента. Досліджено можливий терапевтичний ефект антоціанів на заживлення рани. Пов'язки можуть використовуватись у лікарнях для лікування опіків та хронічних ран, стаючи елегантною заміною звичним матеріалам для перев'язки.

ВИСНОВКИ

1. Розроблено прототип нового індикаторного та антимікробного гідрогеля, основою якого, слугує бактерійна целюлоза, індикаторний агент – антоціани, антимікробний агент – ундаценова кислота, яка впливає на грампозитивні бактерії.

2. Досліджено ідентифікаторний потенціал антоціанів *Sambucus nigra* L., які є (в більшій мірі ціанідин-3-О-глюкозид) чутливими до рівня рН, що дає можливість контролювати умови загоєння рани пацієнта, наявність бактерійної інфекції внаслідок зміни рН.

3. Для оцінки кольору галохромних плівок внаслідок зміни рН використовується цифрова камера смартфона. Зображення обробляються за допомогою комерційно доступного мобільного додатку Spotxel Reader 2.5.1. (SICASYS Software GmbH, Німеччина), встановленого на смартфоні.

4. Проведено дослідження терапевтичного ефекту антоціанів на моделі рани *in vitro* (моношар фібробластів). Флавоноїдні сполуки мають дозозалежний ефект. Оптимальні дози потенційно можуть пришвидшують міграцію та проліферацію фібробластів, а високі дози флавоноїдів можуть пригнічувати ріст клітин.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Biofilms in chronic wounds [Electronic resource] / Garth A. James [et al.] // *Wound Repair and Regeneration*. – 2008. – Vol. 16, no. 1. – P. 37–44. – Mode of access: <https://doi.org/10.1111/j.1524-475x.2007.00321.x>
2. Gardner S. E. Wound Bioburden and Infection-Related Complications in Diabetic Foot Ulcers [Electronic resource] / Sue E. Gardner, Rita A. Frantz // *Biological Research For Nursing*. – 2008. – Vol. 10, no. 1. – P. 44–53. – Mode of access: <https://doi.org/10.1177/1099800408319056>.
3. Kallstrom G. Are Quantitative Bacterial Wound Cultures Useful? [Electronic resource] / G. Kallstrom // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2014. – Vol. 52, no. 8. – P. 2753–2756. – Mode of access: <https://doi.org/10.1128/jcm.00522-14>
4. EWMA Document: Antimicrobials and Non-healing Wounds: Evidence, controversies and suggestions [Electronic resource] / F. Gottrup [et al.] // *Journal of Wound Care*. – 2013. – Vol. 22, Sup5. – P. S1–S89. – Mode of access: <https://doi.org/10.12968/jowc.2013.22.sup5.s1>.
5. A review of methods for the detection of pathogenic microorganisms [Electronic resource] / P. Rajapaksha [et al.] // *The Analyst*. – 2019. – Vol. 144, no. 2. – P. 396–411. – Mode of access: <https://doi.org/10.1039/c8an01488d>.
6. Siddiqui A. R. Chronic wound infection: Facts and controversies [Electronic resource] / Abdul R. Siddiqui, Jack M. Bernstein // *Clinics in Dermatology*. – 2010. – Vol. 28, no. 5. – P. 519–526. – Mode of access: <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2010.03.009>.
7. Development of IgY based sandwich ELISA for the detection of staphylococcal enterotoxin G (SEG), an egc toxin [Electronic resource] / Sowmya Nagaraj [et al.] // *International Journal of Food Microbiology*. – 2016. – Vol. 237.

– P. 136–141. – Mode of access:
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.08.009>

8. Three-To-One' multi-functional nanocomposite-based lateral flow immunoassay for label-free and dual-readout detection of pathogenic bacteria [Electronic resource] / Leina Dou [et al.] // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2022. – Vol. 204. – P. 114093. – Mode of access:
<https://doi.org/10.1016/j.bios.2022.114093>.

9. McKILLIP J. L. Real-Time Nucleic Acid–Based Detection Methods for Pathogenic Bacteria in Food [Electronic resource] / John L. Mckillip, Maryanne Drake // *Journal of Food Protection*. – 2004. – Vol. 67, no. 4. – P. 823–832. – Mode of access: <https://doi.org/10.4315/0362-028x-67.4.823>.

10. Saptalena L. G. Gas Chromatography–Differential Mobility Spectrometry and Gas Chromatography–Mass Spectrometry for the detection of coliform bacteria [Electronic resource] / Lena Ganda Saptalena, Andriy Kuklya, Ursula Telgheder // *International Journal of Mass Spectrometry*. – 2015. – Vol. 388. – P. 17–25. – Mode of access: <https://doi.org/10.1016/j.ijms.2015.07.022>

11. Aebisher D. Laser flow cytometry as a tool for the advancement of clinical medicine [Electronic resource] / David Aebisher, Dorota Bartusik, Jacek Tabarkiewicz // *Biomedicine & Pharmacotherapy*. – 2017. – Vol. 85. – P. 434–443. – Mode of access: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.11.048>.

12. Isolation and identification of bacteria by means of Raman spectroscopy [Electronic resource] / Susanne Pahlow [et al.] // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2015. – Vol. 89. – P. 105–120. – Mode of access: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.04.006>.

13. Cheng J.-H., Sun D.-W. Recent applications of spectroscopic and hyperspectral imaging techniques with chemometric analysis for rapid inspection of microbial spoilage in muscle foods. *Comprehensive reviews in food science*

and food safety. 2015. Vol. 14, no. 4. P. 478–490. URL: <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12141>

14. Using staining as reference for spectral imaging: Its application for the development of an analytical method to predict the presence of bacterial biofilms [Electronic resource] / Nazan Altun [et al.] // *Talanta*. – 2023. – P. 124655. – Mode of access: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2023.124655>

15. Bacteria Detection at a Single-Cell Level through a Cyanotype-Based Photochemical Reaction [Electronic resource] / Jiri Dietvorst [et al.] // *Analytical Chemistry*. – 2021. – Vol. 94, no. 2. – P. 787–792. – Mode of access: <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c03326>

16. Requirements for high impact diagnostics in the developing world [Electronic resource] / Mickey Urdea [et al.] // *Nature*. – 2006. – Vol. 444, S1. – P. 73–79. – Mode of access: <https://doi.org/10.1038/nature05448>.

17. REASSURED diagnostics to inform disease control strategies, strengthen health systems and improve patient outcomes [Electronic resource] / Kevin J. Land [et al.] // *Nature Microbiology*. – 2018. – Vol. 4, no. 1. – P. 46–54. – Mode of access: <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0295-3>.

18. Disposable paper-based biosensors for the point-of-care detection of hazardous contaminations—a review / M. M. Bordbar et al. *Biosensors*. 2021. Vol. 11, no. 9. P. 316. URL: <https://doi.org/10.3390/bios11090316>

19. Paper-based sensors for bacteria detection [Electronic resource] / Federico Mazur [et al.] // *Nature Reviews Bioengineering*. – 2023. – Mode of access: <https://doi.org/10.1038/s44222-023-00024-w>.

20. Rapid and Digital Detection of Inflammatory Biomarkers Enabled by a Novel Portable Nanoplasmonic Imager [Electronic resource] / Alexander Belushkin [et al.] // *Small*. – 2019. – Vol. 16, no. 3. – P. 1906108. – Mode of access: <https://doi.org/10.1002/sml.201906108>.

21. Effect of in-situ biochemical modification on the synthesis, structure, and function of xanthan gum based bacterial cellulose generated from Tieguanyin oolong tea residue hydrolysate [Electronic resource] / Yi Wu [et al.] // Food Chemistry. – 2023. – P. 137133. – Mode of access: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.137133>.
22. Thermochromic and Piezocapacitive Flexible Sensor Array by Combining Composite Elastomer Dielectrics and Transparent Ionic Hydrogel Electrodes [Electronic resource] / Hemant Charaya [et al.] // Advanced Materials Technologies. – 2019. – Vol. 4, no. 9. – P. 1900327. – Mode of access: <https://doi.org/10.1002/admt.201900327>.
23. Color-changing smart fibrous materials for naked eye real-time monitoring of wound pH [Electronic resource] / Nan Pan [et al.] // Journal of Materials Chemistry B. – 2019. – Vol. 7, no. 16. – P. 2626–2633. – Mode of access: <https://doi.org/10.1039/c9tb00195f>.
24. A low-cost flexible pH sensor array for wound assessment [Electronic resource] / Rahim Rahimi [et al.] // Sensors and Actuators B: Chemical. – 2016. – Vol. 229. – P. 609–617. – Mode of access: <https://doi.org/10.1016/j.snb.2015.12.082>.
25. Simultaneous detection of pH value and glucose concentrations for wound monitoring applications [Electronic resource] / D. A. Jankowska [et al.] // Biosensors and Bioelectronics. – 2017. – Vol. 87. – P. 312–319. – Mode of access: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.08.072>.
26. Recent advances in biosensors for real time monitoring of pH, temperature, and oxygen in chronic wounds [Electronic resource] / Khaled Youssef [et al.] // Materials Today Bio. – 2023. – P. 100764. – Mode of access: <https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2023.100764>.
27. Natural skin surface pH is on average below 5, which is beneficial for its resident flora [Electronic resource] / H. Lambers [et al.] // International Journal of

Cosmetic Science. – 2006. – Vol. 28, no. 5. – P. 359–370. – Mode of access: <https://doi.org/10.1111/j.1467-2494.2006.00344.x>.

28. The significance of surface pH in chronic wounds. [Electronic resource] / G. Gethin // Wounds U. K. -2007. - 3 (3). - P. 52 -56. – Mode of access: <https://wounds-uk.com/journal-articles/the-significance-of-surface-ph-in-chronic-wounds-1/>

29. Jones E. M. The Effect of pH on the Extracellular Matrix and Biofilms [Electronic resource] / Eleri M. Jones, Christine A. Cochrane, Steven L. Percival // Advances in Wound Care. – 2015. – Vol. 4, no. 7. – P. 431–439. – Mode of access: <https://doi.org/10.1089/wound.2014.0538>.

30. Rippke F. pH and Microbial Infections [Electronic resource] / Frank Rippke, Enzo Berardesca, Teresa M. Weber // pH of the Skin: Issues and Challenges. – [S. 1.], 2018. – P. 87–94. – Mode of access: <https://doi.org/10.1159/000489522>

31. Electrochemical approaches to the development of smart bandages: A mini-review [Electronic resource] / Anna McLister [et al.] // Electrochemistry Communications. – 2014. – Vol. 40. – P. 96–99. – Mode of access: <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2014.01.003>.

32. Biosensors. A quarter of a century of R&D experience [Electronic resource] / A. P. Soldatkin [et al.] // Biopolymers and Cell. – 2013. – Vol. 29, no. 3. – P. 188–206. – Mode of access: <https://doi.org/10.7124/bc.000819>.

33. Preparation and characterization of smart therapeutic pH-sensitive wound dressing from red cabbage extract and chitosan hydrogel [Electronic resource] / Asmaa Ahmed Arafa [et al.] // International Journal of Biological Macromolecules. – 2021. – Vol. 182. – P. 1820–1831. – Mode of access: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.05.167>.

34. Omid M. Wound dressing application of pH-sensitive carbon dots/chitosan hydrogel [Electronic resource] / Meisam Omid, Amir Yadegari, Lobat Tayebi // RSC Advances. – 2017. – Vol. 7, no. 18. – P. 10638–10649. – Mode of access: <https://doi.org/10.1039/c6ra25340g>.
35. pH-responsive scaffolds for tissue regeneration: In vivo performance [Electronic resource] / Mariana Zarur [et al.] // Acta Biomaterialia. – 2023. – Mode of access: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2023.07.025>.
36. Kalasin S. Intelligent Wearable Sensors Interconnected with Advanced Wound Dressing Bandages for Contactless Chronic Skin Monitoring: Artificial Intelligence for Predicting Tissue Regeneration [Electronic resource] / Surachate Kalasin, Pantawan Sangnuang, Werasak Surareungchai // Analytical Chemistry. – 2022. – 94, –P.6842–6852. – Mode of access: <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.2c00782>.
37. Smart Dual-Sensor Wound Dressing for Monitoring Cutaneous Wounds [Electronic resource] / Bahram Mirani [et al.] // Advanced Healthcare Materials. – 2023. – P. 2203233. – Mode of access: <https://doi.org/10.1002/adhm.202203233>.
38. Shamloul N. The Utility of Smartphone Applications and Technology in Wound Healing [Electronic resource] / Norhan Shamloul, Mondana H. Ghias, Amor Khachemoune // The International Journal of Lower Extremity Wounds. – 2019. – Vol. 18, no. 3. – P. 228–235. – Mode of access: <https://doi.org/10.1177/1534734619853916>
39. Flexible pH-Sensing Hydrogel Fibers for Epidermal Applications [Electronic resource] / Ali Tamayol [et al.] // Advanced Healthcare Materials. – 2016. – Vol. 5, no. 6. – P. 711–719. – Mode of access: <https://doi.org/10.1002/adhm.201500553>.
40. A pH-Indicating Colorimetric Tough Hydrogel Patch towards Applications in a Substrate for Smart Wound Dressings [Electronic resource] / Li Liu [et al.] //

Polymers. – 2017. – Vol. 9, no. 11. – P. 558. – Mode of access: <https://doi.org/10.3390/polym9110558>.

41. pH-responsive materials for optical monitoring of wound status [Electronic resource] / Clemens Gamerith [et al.] // Sensors and Actuators B: Chemical. – 2019. – Vol. 301. – P. 126966. – Mode of access: <https://doi.org/10.1016/j.snb.2019.126966>.

42. A Multifunctional Pro-Healing Zwitterionic Hydrogel for Simultaneous Optical Monitoring of pH and Glucose in Diabetic Wound Treatment [Electronic resource] / Yingnan Zhu [et al.] // Advanced Functional Materials. – 2019. – Vol. 30, no. 6. – P. 1905493. – Mode of access: <https://doi.org/10.1002/adfm.201905493>.

43. Nanocellulose composite wound dressings for real-time pH wound monitoring [Electronic resource] / Olof Eskilson [et al.] // Materials Today Bio. – 2023. – P. 100574. – Mode of access: <https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2023.100574>.

44. Smart bandage with wireless connectivity for optical monitoring of pH [Electronic resource] / Petar Kassal [et al.] // Sensors and Actuators B: Chemical. – 2017. – Vol. 246. – P. 455–460. – Mode of access: <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.02.095>.

45. Liang S. Advances in drug delivery applications of modified bacterial cellulose-based materials [Electronic resource] / Shuya Liang // Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. – 2023. – Vol. 11. – Mode of access: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1252706>.

46. Acetobacter cellulose pellicle as a temporary skin substitute [Electronic resource] / J. D. Fontana [et al.] // Applied Biochemistry and Biotechnology. – 1990. – Vol. 24-25, no. 1. – P. 253–264. – Mode of access: <https://doi.org/10.1007/bf02920250>.

47. Photoactive and antioxidant nanochitosan dots/biocellulose hydrogels for wound healing treatment [Electronic resource] / Danica Z. Zmejkoski [et al.] // *Materials Science and Engineering: C*. – 2021. – Vol. 122. – P. 111925. – Mode of access: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.111925>.
48. Bactericidal and antioxidant bacterial cellulose hydrogels doped with chitosan as potential urinary tract infection biomedical agent [Electronic resource] / Danica Z. Zmejkoski [et al.] // *RSC Advances*. – 2021. – Vol. 11, no. 15. – P. 8559–8568. – Mode of access: <https://doi.org/10.1039/d0ra10782d>
49. Antibacterial activity of nanocomposites of silver and bacterial or vegetable cellulosic fibers [Electronic resource] / Ricardo J. B. Pinto [et al.] // *Acta Biomaterialia*. – 2009. – Vol. 5, no. 6. – P. 2279–2289. – Mode of access: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2009.02.003>
50. Promising low cost antimicrobial composite material based on bacterial cellulose and polyhexamethylene guanidine hydrochloride [Electronic resource] / Olha Kukharenko [et al.] // *European Polymer Journal*. – 2014. – Vol. 60. – P. 247–254. – Mode of access: <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2014.09.014>.
51. Antibacterial composite hydrogels of graphene quantum dots and bacterial cellulose accelerate wound healing [Electronic resource] / Danica Z. Zmejkoski [et al.] // *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. – 2022. – Mode of access: <https://doi.org/10.1002/jbm.b.35037>
52. Radiation synthesis of pH-sensitive 2-(dimethylamino)ethyl methacrylate/polyethylene oxide/ZnS nanocomposite hydrogel membrane for wound dressing application [Electronic resource] / Mohamed Mohamady Ghobashy [et al.] // *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. – 2022. – P. 103399. – Mode of access: <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2022.103399>.

53. Smart Methylcellulose Hydrogels for pH-Triggered Delivery of Silver Nanoparticles [Electronic resource] / Lorenzo Bonetti [et al.] // Gels. – 2022. – Vol. 8, no. 5. – P. 298. – Mode of access: <https://doi.org/10.3390/gels8050298>.
54. pH-Responsive PVA/BC-f-GO Dressing Materials for Burn and Chronic Wound Healing with Curcumin Release Kinetics [Electronic resource] / Wafa Shamsan Al-Arjan [et al.] // Polymers. – 2022. – Vol. 14, no. 10. – P. 1949. – Mode of access: <https://doi.org/10.3390/polym14101949>.
55. A cellulose nanofibril-reinforced hydrogel with robust mechanical, self-healing, pH-responsive and antibacterial characteristics for wound dressing applications [Electronic resource] / Guihua Yang [et al.] // Journal of Nanobiotechnology. – 2022. – Vol. 20, no. 1. – Mode of access: <https://doi.org/10.1186/s12951-022-01523-5>.
56. In vitro and in vivo evaluation of tannic acid as an antibacterial agent in broilers infected with Salmonella Typhimurium [Electronic resource] / Janghan Choi [et al.] // Poultry Science. – 2023. – P. 102987. – Mode of access: <https://doi.org/10.1016/j.psj.2023.102987>.
57. Recent Advances of Natural-Polymer-Based Hydrogels for Wound Antibacterial Therapeutics [Electronic resource] / Yue Zhao [et al.] // Polymers. – 2023. – Vol. 15, no. 15. – P. 3305. – Mode of access: <https://doi.org/10.3390/polym15153305>.
58. A colorimetric film based on polyvinyl alcohol/sodium carboxymethyl cellulose incorporated with red cabbage anthocyanin for monitoring pork freshness [Electronic resource] / Danfei Liu [et al.] // Food Packaging and Shelf Life. – 2021. – Vol. 28. – P. 100641. – Mode of access: <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2021.100641>.
59. Self-Adhesive and Antioxidant Poly(vinylpyrrolidone)/Alginate-Based Bilayer Films Loaded with Malva sylvestris Extracts as Potential Skin Dressings

[Electronic resource] / Marco Contardi [et al.] // ACS Applied Bio Materials. – 2022. – Mode of access: <https://doi.org/10.1021/acsabm.2c00254>

60. Kammerer D. R. Anthocyanins [Electronic resource] / D. R. Kammerer // Handbook on Natural Pigments in Food and Beverages. – [S. l.], 2016. – P. 61–80. – Mode of access: <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-100371-8.00003-8>.

61. Ezati P. Fabrication and characterization of alizarin colorimetric indicator based on cellulose-chitosan to monitor the freshness of minced beef [Electronic resource] / Parya Ezati, Hossein Tajik, Mehran Moradi // Sensors and Actuators B: Chemical. – 2019. – Vol. 285. – P. 519–528. – Mode of access: <https://doi.org/10.1016/j.snb.2019.01.089>.

62. Analysis and Antioxidant Capacity of Anthocyanin Pigments. Part II: Chemical Structure, Color, and Intake of Anthocyanins [Electronic resource] / Julia Martín Bueno [et al.] // Critical Reviews in Analytical Chemistry. – 2012. – Vol. 42, no. 2. – P. 126–151. – Mode of access: <https://doi.org/10.1080/10408347.2011.632314>.

63. Active and intelligent packaging in meat industry [Electronic resource] / Zhongxiang Fang [et al.] // Trends in Food Science & Technology. – 2017. – Vol. 61. – P. 60–71. – Mode of access: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.01.002>.

64. Pereira de Abreu D. A. Active and Intelligent Packaging for the Food Industry [Electronic resource] / D. A. Pereira de Abreu, J. M. Cruz, P. Paseiro Losada // Food Reviews International. – 2012. – Vol. 28, no. 2. – P. 146–187. – Mode of access: <https://doi.org/10.1080/87559129.2011.595022>

65. Intelligent Films from Chitosan and Biohybrids Based on Anthocyanins and Laponite®: Physicochemical Properties and Food Packaging Applications [Electronic resource] / Cristiane Capello [et al.] // Journal of Polymers and the Environment. – 2021. – 29. – P.3988-3999. – Mode of access: <https://doi.org/10.1007/s10924-021-02168-5>.

66. Colorimetric Indicators Based on Anthocyanin Polymer Composites: A Review [Electronic resource] / Despoina Kosyvaki [et al.] // *Polymers*. – 2022. – Vol. 14, no. 19. – P. 4129. – Mode of access: <https://doi.org/10.3390/polym14194129>
67. Fabrication and characterization of colorimetric indicator for Salmon freshness monitoring using agar/polyvinyl alcohol gel and anthocyanin from different plant sources [Electronic resource] / Huang Xiaowei [et al.] // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2023. – P. 124198. – Mode of access: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.124198>.
68. Gelatin/carrageenan-based smart packaging film integrated with Cu-metal organic framework for freshness monitoring and shelf-life extension of shrimp [Electronic resource] / Ajahar Khan [et al.] // *Food Hydrocolloids*. – 2023. – Vol. 145. – P. 109180. – Mode of access: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2023.109180>.
69. Khaledian Y. Development and characterization of smart double-layer nanofiber mats based on potato starch-turnip peel anthocyanins and guar gum-cinnamaldehyde [Electronic resource] / Yousef Khaledian, Hamdollah Moshtaghi, Yasser Shahbazi // *Food Chemistry*. – 2023. – P. 137462. – Mode of access: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.137462>
70. Bioactive Potential of Elderberry (*Sambucus nigra* L.): Antioxidant, Antimicrobial Activity, Bioaccessibility and Prebiotic Potential [Electronic resource] / Ioana Mariana Haş [et al.] // *Molecules*. – 2023. – Vol. 28, no. 7. – P. 3099. – Mode of access: <https://doi.org/10.3390/molecules28073099>.
71. Bacterial cellulose-based biomaterials: From fabrication to application [Electronic resource] / Chuntao Chen [et al.] // *Carbohydrate Polymers*. – 2022. – Vol. 278. – P. 118995. – Mode of access: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118995>

72. Cellulosic material-based colorimetric films and hydrogels as food freshness indicators [Electronic resource] / Hamidreza Pirayesh [et al.] // Cellulose. – 2023. – Mode of access: <https://doi.org/10.1007/s10570-023-05057-3>.
73. Singh A. K. State-of-the-Art Insights and Potential Applications of Cellulose-Based Hydrogels in Food Packaging: Advances towards Sustainable Trends [Electronic resource] / Ajit Kumar Singh, Pontree Itkor, Youn Suk Lee // Gels. – 2023. – Vol. 9, no. 6. – P. 433. – Mode of access: <https://doi.org/10.3390/gels9060433>
74. Mastnak T. The use of a novel smartphone testing platform for the development of colorimetric sensor receptors for food spoilage [Electronic resource] / Tinkara Mastnak, Gerhard Mohr, Matjaž Finšgar // Analytical Methods. – 2023. – Mode of access: <https://doi.org/10.1039/d2ay02082c>.
75. Nanocomposites of soluble soybean polysaccharides with grape skin anthocyanins and graphene oxide as an efficient halochromic smart packaging [Electronic resource] / Azade Kafashan [et al.] // Sustainable Materials and Technologies. – 2023. – P. e00755. – Mode of access: <https://doi.org/10.1016/j.susmat.2023.e00755>.
76. Anti-Inflammatory and Protective Effects of Water Extract and Bioferment from Sambucus nigra Fruit in LPS-Induced Human Skin Fibroblasts [Electronic resource] / Magdalena Wójciak [et al.] // International Journal of Molecular Sciences. – 2023. – Vol. 24, no. 12. – P. 10286. – Mode of access: <https://doi.org/10.3390/ijms241210286>.
77. Gallic Acid Promotes Wound Healing in Normal and Hyperglucidic Conditions [Electronic resource] / Dong Yang [et al.] // Molecules. – 2016. – Vol. 21, no. 7. – P. 899. – Mode of access: <https://doi.org/10.3390/molecules21070899>.

78. New insights into quercetin nanoformulations for topical delivery [Electronic resource] / Karan Wadhwa [et al.] // *Phytomedicine Plus*. – 2022. – Vol. 2, no. 2. – P. 100257. – Mode of access: <https://doi.org/10.1016/j.phyplu.2022.100257>.
79. Activity of catechins and their applications [Electronic resource] / Joonseo Bae [et al.] // *Biomedical Dermatology*. – 2020. – Vol. 4, no. 1. – Mode of access: <https://doi.org/10.1186/s41702-020-0057-8>.
80. Rodrigues R. Chlorogenic Acids and Caffeine from Coffee By-Products: A Review on Skincare Applications [Electronic resource] / Raquel Rodrigues, Maria Beatriz Prior Pinto Oliveira, Rita Carneiro Alves // *Cosmetics*. – 2023. – Vol. 10, no. 1. – P. 12. – Mode of access: <https://doi.org/10.3390/cosmetics10010012>.
81. Sambucus Nigra Extracts–Natural Antioxidants and Antimicrobial Compounds [Electronic resource] / Anna Przybylska-Balcerek [et al.] // *Molecules*. – 2021. – Vol. 26, no. 10. – P. 2910. – Mode of access: <https://doi.org/10.3390/molecules26102910>.
82. Antibacterial activity of elder (*Sambucus nigra* L.) flower or berry against hospital pathogens. Potential [Electronic resource] / Hearst, C. [et al.] // *Antibacterial J. Med. Plants Res.* -2020, -4, -1805–1809. [Google Scholar].
83. Development and Evaluation of Hydrogel Wound Dressings Loaded with Herbal Extracts [Electronic resource] / Alexandru Gavan [et al.] // *Processes*. – 2022. – Vol. 10, no. 2. – P. 242. – Mode of access: <https://doi.org/10.3390/pr10020242>
84. Michalak M. Phenolic content, antioxidant activity and pharmaceutical availability of hydrogels with extracts of *Rosmarinus officinalis* L. and *Sambucus nigra* L. [Electronic resource] / Monika Michalak, Katarzyna Paradowska, Agnieszka Zielińska // *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*. – 2021. – Vol. 78, no. 2. – P. 219–226. – Mode of access: <https://doi.org/10.32383/appdr/134000>

85. Paquette D.W, Levine W.Z. Adjunctive Treatment of Periodontal Disease with Self-Adhesive Hydrogel Wound Dressing: Case Series.- *Compend Contin Educ Dent.* - 2015 . -36(6), :e12-4. PMID: 26053922.
86. Polyphenol-loaded bacterial cellulose nanofiber as a green indicator for fish spoilage [Electronic resource] / Fatemeh Mohseni-Shahri [et al.] // *International Journal of Biological Macromolecules.* – 2022. – Mode of access: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.10.203>
87. Development of a colorimetric pH indicator based on bacterial cellulose nanofibers and red cabbage (*Brassica oleraceae*) extract [Electronic resource] / Simin Pourjavaher [et al.] // *Carbohydrate Polymers.* – 2017. – Vol. 156. – P. 193–201. – Mode of access: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.09.027>.