УДК 615.281

ИССЛЕДОВАНИЕ РЕЖИМОВ ЛАЗЕРНОГО ПЕРЕНОСА ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ НАНЕСЕНИЯ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА

А. А. Настулявичус, Э. Р. Толордава, Е. В. Ултургашева, С. Н. Шелыгина, С. П. Бабина, И. Н. Сараева, С. И. Кудряшов

> В работе исследовался антибактериальный эффект наночастиц серебра, наносимых методом лазерноиндуцированного прямого переноса на инфицированную свиную кожу в зависимости от режима сканирования и толщины металлической донорной пленки. Найдены оптимальные режимы нанесения наночастиц, минимальная ингибирующая концентрация против грамположительных бактерий Staphylococcus aureus составила $\approx 3 \ Mkr/cm^2$.

Ключевые слова: антибактериальные наночастицы, *ex vivo* модель, метод прямого переноса.

Веедение. Рост устойчивости патогенных бактерий к антимикробным препаратам является серьезной проблемой для медицины, ветеринарии и пищевой промышленности [1–3]. Для определения антибактериальной эффективности обычно используют два понятия: агент считается "бактериостатическим", если он задерживает рост бактерий, поддерживая начальную фазу роста в течение длительного периода времени. Также антибактериальное средство может быть "бактерицидным", если оно подавляет рост бактерий [4]. Механизм действия таких агентов различается. В случае бактерицидных агентов, они подавляют синтез клеточной стенки бактерий, а это, в свою очередь, приводит к вымыванию бактериального содержимого и, в конечном итоге, приводит к гибели бактерий. Это необратимый процесс. Механизм действия бактериостатических агентов основан на подавлении синтеза белка, репликации ДНК и других метаболических активностей. Данный процесс обратим, так как когда препарат выводится из организма или его действие ослабевает, бактерии возобновляют свой рост и нормализуют свою

ФИАН, 119991 Россия, Москва, Ленинский пр-т, 53; e-mail: e.ulturgasheva@lebedev.ru.

активность [5]. Однако в случае антибиотиков у микроорганизмов развивается устойчивость. Это естественный биологический ответ на использование антимикробных препаратов, способствующий отбору, выживанию и размножению бактерий. Кроме того, антибактериальная эффективность различается в зависимости от типа бактерий, подвергшихся воздействию этих агентов. Грамположительные и грамотрицательные бактерии могут по-разному реагировать на один и тот же антимикробный агент. Например, грамположительные бактерии имеют более толстый слой пептидогликанов, тогда как грамотрицательные бактерии содержат тонкий слой пептидогликана и внешнюю мембрану [4]. Борьбу с патогенными микроорганизмами ещё более осложняет их способность образовывать сообщества – биопленки, от которых крайне тяжело избавиться традиционными методами. Биопленка не только защищает бактерии от воздействия антимикробных агентов, она также является резервуаром резистентных штаммов.

На сегодняшний день наноматериалы показали себя перспективным инструментом для борьбы с мультирезистентными микроорганизмами [6]. Антибактериальные свойства серебра известны достаточно давно [7]. Наночастицы серебра обладают сильным антибактериальным эффектом против широкого спектра патогенов, включая как грамположительные, так и грамотрицательные бактерии [8–11]. Механизмы воздействия наночастиц на микроорганизмы до конца не изучены [12]. В основном считается, что инактивация достигается за счет синергетического воздействия таких механизмов, как генерация активных форм кислорода, повреждение стенок и мембран бактериальных клеток и вмешательство во внутриклеточные процессы, такие как репликация ДНК и синтез белка [13–16].

Антибактериальные свойства серебряных наночастиц открывают возможности для их применения в перевязочных материалах, покрытиях и дезинфицирующих средствах.

Разработанный ранее метод нанесения антибактериальных наночастиц с высокой дозой [17] показал перспективность, в том числе и в экспериментах *ex vivo* [18]. В данной работе исследуется влияние плотности энергии лазерного излучения и скорости сканирования (экспозиции) при абляции серебряной плёнки на результаты микробиологических высевов с инфицированных фрагментов кожи после обработки наночастицами серебра.

Экспериментальная часть

Бактерии и условия роста. Материалом для исследований служил микроорганизм IV группы патогенности, входящий в группу "ESKAPE": *Staphylococcus aureus*. Бактериальная культура получена из рабочей коллекции лаборатории генной инженерии патогенных микроорганизмов ФГБУ НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи.

Бактериальную культуру выращивали на жидкой и твердой среде Luria-Bertani (LB), используя стандартные сухие питательные среды, выпускаемые фирмой Дифко (США).

Сбор и хранение свиной кожи. Для экспериментов ex vivo была приобретена реберная часть свиной туши со шкуркой. Кожу отделяли, очищали теплой водой и дезинфицировали 70%-ым этанолом. С помощью стерильного 8-миллиметрового пункционного биопсионного медицинского инструмента вырезали фрагменты диаметром 8 мм и переносили в стерильную посуду.

Моделирование инфекции на поверхности кожи. Образцы кожи диаметром 8 мм помещали в стерильную лабораторную посуду и в центр фрагмента наносили по 20 мкл 1 × 10⁸ KOE/мл бактерий. Образцы оставляли при комнатной температуре до полного высыхания и далее обрабатывали наночастицами металлов. На контрольные образцы наночастицы не наносили.

Анализ количества жизнеспособных бактерий. Для количественного определения жизнеспособных бактерий фрагменты кожи, обработанные наночастицами, и контрольные образцы переносили в стерильные пробирки с 2 мл NaCl 0.9% и 10 мин активно встряхивали на лабораторном вортексе. Далее, методом серийных разведений и высева на чашки Петри определяли количество бактерий в смывах. Для расчета количества колониеобразующих единиц (КОЕ/мл), чашки Петри с агаризированной питательной средой были разделены на 6 секторов без разведения и с разведением от 10 до 10⁵. Далее, в соответствующий сектор вносили по 30 мкл разведённой культуры. Чашки Петри инкубировали при температуре 37 °C в течение 18 ч, а затем подсчитывали выросшие колонии и определяли КОЕ/мл.

Нанесение наночастиц серебра. Нанесение наночастиц серебра на фрагменты свиной кожи (рис. 2(а)) с бактериальной культурой осуществлялось методом лазерноиндуцированного прямого переноса [17, 18]. Использовались серебряные пленки с толщинами 10–500 нм, полученные методом магнетронного напыления в атмосфере аргона на подложках из полиэтилена (ПЭТ, 500 мкм). Нанесение осуществлялось с помощью наносекундного лазера НТГ МАRК (1064 нм, 120 нс, 20 кГц). Излучение фокусировалось на серебряной пленке *F*-theta объективом с фокусным расстоянием 160 мм в пятно с диаметром ≈40 мкм по уровню энергии 1/e. Сканирование пленки производилось со скоростями 500–3000 мм/с и плотностями энергии 8-24 Дж/см². Расстояние между металлической пленкой и фрагментом свиной кожи составляло 1 мм. Экспериментальная схема представлена на рис. 1.



Рис. 1: Схема эксперимента.

Стоит отметить, что для большинства режимов пленка не сносится полностью, то есть часть металлического донорного слоя остается неиспользованной. Тем не менее, при переносе наночастиц серебра с пленки малой толщины плотности энергии достаточно для того, чтобы вместе с наночастицами серебра переносить и часть донорной подложки, т. е. с включением углерода, который используется для повышения антимикробной эффективности наночастиц на основе металлов в качестве систем доставки [4].

Характеризация образцов. Для характеризации наночастиц использовался сканирующий электронный микроскоп (СЭМ) TESCAN (Брно, Чехия), оснащенный приставкой для энергодисперсионного рентгеновского анализа химического состава при энергии электронов 5 кэВ. Поверхностная массовая плотность наночастиц определялась гравиметрическим методом (по измерению массы на микровесах AND). Визуализация образцов производилась на оптическом микроскопе Altami (с увеличением объектива 20^{\times}).

Результаты и их обсуждение. Наночастицы серебра, полученные в результате лазерного переноса на стекло металлической пленки толщиной 100 нм, осажденной на полимерной подложке, были визуализированы на сканирующем электронном микроскопе (рис. 2(в)). Перенесенная пленка состоит из отдельных наночастиц с размерами 80–250 нм и их скоплений [18]. При переносе наночастиц серебра на фрагменты свиной кожи наблюдается сплошность нанесения по всей обработанной поверхности (частицы разного размера покрывают всю поверхность свиной кожи без разрыва) (рис. 2(б)).



Рис. 2: Визуализация на оптическом микроскопе свиной кожи без частиц (a), с частицами серебра (б), СЭМ-визуализация частиц серебра (в).

Количество перенесенного вещества в зависимости от параметров лазерного излучения (плотность энергии), скорости сканирования и толщины донорной пленки оценивалось посредством метода энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии при энергии электронов 5 кэВ для обработанной частицами серебра области размером 4×4 мм² (см. рис. 3). Измерения проводились по 3 раза на каждый режим переноса частиц на свиную кожу.

Преимущественно наблюдается увеличение содержания серебра с увеличением толщины пленки. В зависимости от режима с увеличением плотности энергии лазерного излучения концентрация серебра растет, чем толще пленка, тем сильнее рост. В целом, для пленки толщиной 500 нм характерно содержание серебра до 52 ат.%, для пленки 10 нм максимальное значение составляет 5.5 ат.%. При переносе пленки толщиной 10 нм поверхностная массовая плотность в зависимости от режима варьируется от 0.2 до 5 мкг/см², для 100 нм: 6–80 мкг/см², 500 нм: 95–265 мкг/см².

В целях изучения их антибактериального эффекта при тех же параметрах, что было описано выше, производилось нанесение наночастиц серебра на инфицированные фрагменты свиной кожи. Исследовалось влияние толщины металлической пленки (10, 100, 500 нм), влияющей на наносимую поверхностную массовую плотность наночастиц, плотности энергии и экспозиции (скорость сканирования варьировалось от 500 до 3000 мм/с, что соответствует 0.8–5 импульсов в точку) на антибактериальные свойства наночастиц серебра, доставляемых на образцы методом лазерного переноса.

Полученные результаты микробиологического исследования представлены на рис. 4. Инфицирование *ex vivo* модели кожи в перерасчете на KOE/мл составило $3 \pm 1 \times 10^6$ KOE/мл.



Рис. 3: Зависимость процентного содержания серебра в образовавшейся плёнке от плотности энергии лазерного излучения для разных толщин пленок (10 – 500 нм) и скорости сканирования: 500 мм/с (а), 1000 мм/с (б), 1500 мм/с (в), 2000 мм/с (г), 3000 мм/с (д).



Рис. 4: Результаты обработки высевов бактерий Staphylococcus aureus на свиной коже в зависимости от плотности энергии аблирующего излучения при разных скоростях сканирования.

Для пленки 10 нм наибольшая эффективность наблюдается для режимов с плотностями энергии выше 16 Дж/см² и скоростей не более 2000 мм/с (поверхностная массовая плотность 1–4 мкг/см²). Оптимальный режим был выбран исходя из результатов высевов и наблюдается при использовании пленки толщиной 100 нм с плотностью энергии выше 8 Дж/см² и скоростью сканирования до 2000 мм/с. Пленка толщиной 500 нм оказалась неэффективной. Снижение изначальной концентрации бактерий наблюдается на 1–4 порядка в зависимости от режима нанесения, но полной гибели нет. Также следует отметить, что с увеличением толщины пленки увеличивается средний размер частиц. При этом для лазерного переноса с пленки толщиной 500 нм можно наблюдать отдельные фрагменты пленки размерами до 5 мкм. Наибольшая эффективность наблюдается для режимов со скоростями сканирования 500–1500 мм/с для всех толщин пленок.

Заключение. В работе проведено исследование влияния плотности энергии лазерного излучения, скорости сканирования и толщины металлической пленки при нанесении наночастиц серебра методом лазерно-индуцированного прямого переноса на инфицированную свиную кожу на антибактериальную активность наночастиц. Исследования показали, что наночастицы серебра проявляют высокие антимикробные свойства и вызывают практически полную гибель бактерий для некоторых режимов. Наибольшая эффективность наблюдается для режимов со скоростями сканирования 500–1500 мм/с для всех толщин пленок. Концентрация наночастиц, наносимая на образец, не превышает 76 мкг/см². Минимальная ингибирующая концентрация при этом составляет ≈ 3 мкг/см².

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-15-2023-603).

ЛИТЕРАТУРА

- [1] E. P. Abraham, E. Chain, Nature **146**, 837 (1940). DOI: 10.1038/146837a0.
- [2] U. Theuretzbacher, Journal of global antimicrobial resistance $\mathbf{1}(2)$, 63 (2013). DOI: 10.1016/j.jgar.2013.03.010.
- [3] J. A. Salmon, L. G. Garland, B. D. Hoyle, et al., In: Jucker, E. (eds) Progress in Drug Research/Fortschritte der Arzneimittelforschung/Progres des recherchespharmaceutiques 37, 91 (1991). DOI: 10.1007/978-3-0348-7139-6_2.
- [4] M. G. Correa, F. B. Martinez, C. P. Vidal, et al., Beilsein journal of nanotechnology 11(1), 1450 (2020). DOI:10.3762/bjnano.11.129.

- [5] P. S. Ocampo, V. Lázár, B. Papp, et al., Antimicrobial agents and chemotherapy 58(8), 4573 (2014). DOI: 10.1128/aac.02463-14.
- [6] M. J. Hajipour, K. M. Fromm, A. A. Ashkarran, et al., Trends in biotechnology 30(10), 499 (2012). DOI: 10.1016/j.tibtech.2012.06.004.
- [7] H. J. Klasen, Burns 26(2), 131 (2000). DOI:10.1016/S0305-4179(99)00116-3.
- [8] S. Tang, J. Zheng, Advanced healthcare materials 7(13), 1701503 (2018).
 DOI:10.1002/adhm.201701503.
- [9] R. Sinha, R. Karan, A. Sinha, S. K. Khare, Bioresource technology 102(2), 1516 (2011).
 DOI: 10.1016/j.biortech.2010.07.117.
- [10] J. P. Ruparelia, A. K. Chatterjee, S. P. Duttagupta, S. Mukherji, Acta biomaterialia 4(3), 707 (2008). DOI: 10.1016/j.actbio.2007.11.006.
- [11] G. M. Shayo, E. Elimbinzi, G. N. Shao, Heliyon 10(17), e36539 (2024). DOI: 10.1016/j.heliyon.2024.e36539.
- [12] M. Rai, A. Yadav, A. Gade, Biotechnology advances 27(1), 76 (2009). DOI: 10.1016/j.biotechadv.2008.09.002.
- [13] O. Choi, Z. Hu, Environmental science & technology 42(12), 4583 (2008). DOI: 10.1021/es703238h.
- [14] H. Xu, F. Qu, H. Xu, et al., Biometals 25, 45 (2012). DOI: 10.1007/s10534-011-9482-x.
- [15] R. Foldbjerg, P. Olesen, M. Hougaard, et al., Toxicology Letters **190**(2), 156 (2009).
 DOI: 10.1016/j.toxlet.2009.07.009.
- [16] S. Pal, Y. K. Tak, J. M. Song, Applied and environmental microbiology 73(6), 1712 (2007). DOI: 10.1128/AEM.02218-06.
- [17] A. A. Nastulyavichus, S. I. Kudryashov, A. A. Rudenko, et al., Nanomaterials 10(11), 2259 (2020). DOI: 10.3390/nano10112259.
- [18] Э. Р. Толордава, А. А. Настулявичус, Е. В. Ултургашева и др., Молекулярная генетика, микробиология и вирусология 42(3), 5 (2024). DOI: 10.17116/molgen20244203137.

Поступила в редакцию 5 декабря 2024 г.

После доработки 29 декабря 2024 г.

Принята к публикации 3 января 2025 г.