

IN VIVO-ИССЛЕДОВАНИЯ РАНОЗАЖИВЛЯЮЩИХ СВОЙСТВ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ МЕДНЫХ НАНОЧАСТИЦ

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

В работе была проведена оценка скорости заживления ран на белых лабораторных мышах balb/C после нанесения антибактериальных наночастиц меди с поверхностной массовой плотностью ≈ 30 мкг/см² методом лазерно-индуцированного прямого переноса с медной пленки толщиной 100 нм. Для сравнения в качестве контроля использовалась группа мышей с ранами без обработки. В результате было показано, что наночастицы меди обладают ранозаживляющим эффектом, при этом не приносящим вред самим мышам.

Ключевые слова: антибактериальные наночастицы, метод лазерно-индуцированного прямого переноса, раневые инфекции, *in vivo*, площадь ран.

Введение. Несмотря на разностороннее развитие современной медицины, раны остаются одной из главных проблем [1, 2]. Раневой процесс является сложным комплексом ответных реакций организма на повреждение. Существует множество классификаций ран, основанных на разных принципах: по степени микробного загрязнения, по длительности существования раневого процесса, по степени осложнения и т. д. Под влиянием ряда неблагоприятных факторов раневой процесс может осложняться или затягиваться и принимать хроническое течение. Самым часто встречающимся на данный момент и опасным осложнением является инфицирование раны. Известно, что хронизация ран чаще всего связана с формированием бактериальных биопленок в раневом ложе. Бактериальные биопленки являются резервуаром резистентных микроорганизмов, что осложняет процесс антибиотикотерапии. В целом заживление ран – это сложный, динамический процесс, поддерживаемый множеством клеточных событий, которые требуют

тщательной координации для эффективного восстановления поврежденной ткани. Применение антисептиков оправдано благодаря их бактерицидному и бактериостатическому действию. Выбор антисептика необходимо осуществлять с учетом его переносимости в ранах, которая должна быть сравнима с переносимостью физиологического раствора или инертного гидрогеля. Кроме того, в идеале он также должен способствовать заживлению ран. Благодаря более подробному изучению патофизиологии и патогенеза раневого процесса стали возможными поиск, разработка и внедрение новых современных высокоэффективных методик в процесс лечения ран.

К современным методам лечения ран относится применение нанотехнологий, которые предлагают новые подходы к борьбе с инфекциями [3]. Одним из перспективных направлений является применение лекарственных препаратов с наночастицами. Наночастицы могут быть использованы для создания перевязочных материалов и средств обработки ран с антимикробными свойствами, которые могут способствовать предотвращению инфекций и более быстрому заживлению. Среди наиболее популярных антибактериальных материалов являются серебряные, медные и цинковые наночастицы, которые обладают сильным антимикробным действием и могут быть интегрированы в материалы для перевязочного материала [4, 5]. Серебряные наночастицы широко применяются в составе мазей [6–9], которые способствуют усилению репаративного эффекта и ускорения эпителизации раны. Известны работы, в которых наночастицы металлов используются для ускорения заживления ран у крыс и мышей с диабетическими заболеваниями [10, 11]. Медь также привлекает внимание исследователей благодаря своим антимикробным свойствам и способности ускорять процессы заживления [12]. Исследования показывают, что такие наноматериалы не только подавляют рост патогенных микроорганизмов, но и активируют местные механизмы иммунного ответа, что благоприятно сказывается на общем процессе заживления [12, 13]. В работе [14] показано, что гель с наночастицами меди обладает ранозаживляющими свойствами, увеличивая скорость регенерации ран на 30–40% по сравнению с контролем.

Наша исследовательская группа получает наночастицы меди методом лазерной абляции. Это один из физических методов, с помощью которого могут быть получены наночастицы высокой чистоты и при этом не требуется использование блокирующих и стабилизирующих агентов или восстановителей, как при химических методах. Проведенные нами исследования, связанные с изучением антимикробных свойств наночастиц, в том числе и меди [15–17] показали высокое антибактериальное воздействие НЧ меди

на бактерии, находящихся как в виде планктонов, так и в биопленках. Но оставался открытым вопрос о ранозаживляющем воздействии наночастиц меди.

В представленной работе были проведены исследования по оценке заживления асептических кожных ран у мышей самцов породы Balb/C весом 18-20 г с использованием наночастиц меди, наносимых с помощью метода лазерно-индуцированного прямого переноса. Наблюдения проводились в течение нескольких дней с помощью планиметрического метода с последующей цифровой обработкой в программе Image J. Цифровая планиметрия представляет собой фотографирование раны рядом с линейкой для калибровки, с позиционированием объектива камеры перпендикулярно плоскости раны, затем цифровую идентификацию области раны на изображении с помощью ручных или компьютерно-автоматизированных средств [18]. Данный метод является предпочтительным на этапе скрининговых исследований, так как не требует больших временных и финансовых затрат.

Экспериментальная часть. Подготовка медных пленок осуществлялась посредством напыления металла на полимерную подложку (ПЭТ) в атмосфере аргона в магнетронной напылительной установке. Толщина пленки была выбрана на основании предыдущих успешно проведенных экспериментов *in vitro* [17, 19, 20] и составляла 100 нм. Для одновременного получения и нанесения наночастиц меди на поверхность раны использовался метод лазерно-индуцированного прямого переноса, реализуемый на наносекундном лазере NTF MARK (1064 нм, 120 нс, 20 кГц) (рис.1). Излучение фокусировалось на медной пленке F-theta объективом с фокусным расстоянием 160 мм в пятно по уровню энергии $1/e \approx 40$ мкм. Сканирование производилось со скоростью 1500 мм/с (что соответствует ≈ 1 импульсу в точку с учетом перекрытия пятна) и плотностью энергии 8 Дж/см², что выше пороговой плотности, которая составляет 2 Дж/см². Расстояние между металлической пленкой и раной составляло 1 мм.

Для характеристики наночастиц использовался сканирующий электронный микроскоп (СЭМ) TESCAN (Брно, Чехия) с приставкой (энергодисперсионная рентгеновская спектроскопия (ЭДРС), Aztec One, Oxford Instruments) для химического микроанализа при энергии электронов 5 кэВ.

Поверхностная массовая плотность наночастиц определялась гравиметрическим методом (по измерению массы на микровесах AND).

Заживление ран у мышей оценивалось по исследованию размера раны (использование планиметрического метода с последующей оценкой площади раны цифровым методом). Исследовались две группы ран: без лечения и с применением наночастиц меди.

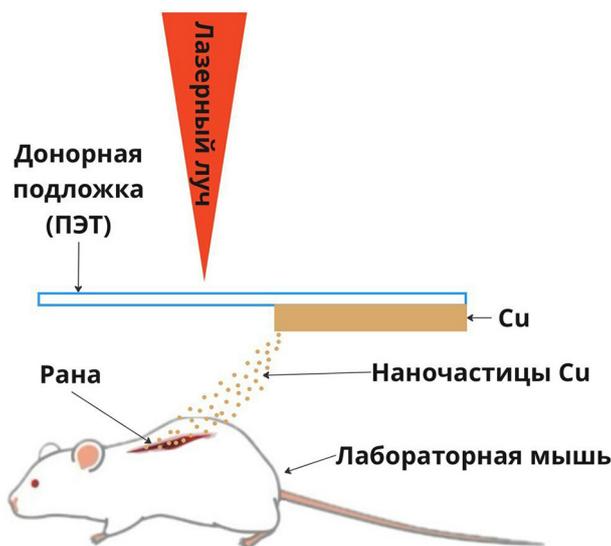


Рис. 1: Схема эксперимента.

Площадь ран оценивалась в динамике в течение четырех дней. Измерения производились в компьютерной программе ImageJ V 1.54k.

Подготовка мышей. Были использованы мыши Balb/C, приобретенные в питомниках «Столбовая». Воду и пищу животные получали ad libitum. В опытах были использованы самцы весом 18–20 г. Количество животных, используемых в исследовании – по 3 головы в группе, что является достаточным для регистрации изучаемых эффектов.

Акклиматизация и отбор животных для исследования. Животные были адаптированы/акклиматизированы в лаборатории в течение 7 дней до начала проведения исследований. Во время этого периода у животных каждый день контролировали клиническое состояние путем визуального осмотра.

Условия окружающей среды. Животные содержались в контролируемых условиях окружающей среды (18–26 °С, относительная влажность воздуха 30–70%). В комнатах для содержания животных поддерживался 12-часовой цикл освещения.

Распределение по группам. В экспериментальные группы отбирали животных без признаков отклонений внешнего вида, случайным образом, так, чтобы индивидуальное значение массы не отклонялось от среднего значения более чем на 10%.

Депиляция. Крем для депиляции для чувствительной кожи «Veet», Франция.

Анестезия. Местное обезболивание проводили спреем или инъекцией лидокаина 10%, обездвиживали животное внутримышечным введением препарата Золетил (10 мкл на мышь).

Раны мышам были нанесены путем отрезания ножницами участка депилированной кожи размером не более 50 мм² на полную глубину в области спины. Для изучения ранозаживляющего воздействия наночастиц меди первой группе на рану аппликационным методом наносили наночастицы. Вторую контрольную группу не обрабатывали наночастицами.

Эвтаназия. Животные подвергались эвтаназии после завершения экспериментов методом цервикальной дислокации. Трупы животных автоклавировали.

Т а б л и ц а 1

Оценка состояния мышей Balb/c на скрининговом этапе исследования токсичности наночастиц меди

Тестируемые параметры, баллы	Группы мышей					
	I Cu NP			II Контроль		
Зуд	6	5	6	5	5	6
Отёк	6	6	5	6	6	6
Груминг	4	4	4	4	4	5
Агрессия	7	5	7	7	7	8
Прием пищи	5	5	5	5	5	5
Прием воды	5	5	5	5	5	5
Активность	5	4	4	5	4	4
Полная эпителизация раны						
Количество дней	10	10	12	13	14	14

Примечание: оценку проводили в шкалах от 0 до 10 баллов, где: в шкалах внешнего проявления поведения 5 баллов соответствует нормальной оценке параметра, от 6–10 баллов – увеличение эффекта, от 4 до 0 – угнетение эффекта, а изменение параметра в 1 балл соответствует изменению параметра в среднем на 10%.

Результаты и их обсуждение. Выбор *in vivo* модели и объем исследования зависят от этапа разработки лекарственной формы. Несмотря на существующую разницу в строении кожи человека и лабораторных животных, именно биологические тест-системы являются приоритетными. На этапе скрининга по этическим и экономическим соображениям целесообразно использовать грызунов (мыши, крысы, морские свинки). После подготовки мыши (нанесение раны и обездвиживание), группе I на рану наносили наночастицы меди следующим способом. Под действием лазерного излучения с длиной

волны 1064 нм и плотностью энергии 8 Дж/см² медная пленка толщиной 100 нм разлеталась в виде наночастиц меди сферической формы с углеродной оболочкой [17] и попадала на поверхность раны (рис. 1). Размер частиц варьируется от 10 до 300 нм [17]. Поверхностная массовая плотность наночастиц, наносимых на поверхность раны при этом составляла ≈ 30 мкг/см². Второй контрольной группе (II) наночастицы не наносили. В каждой группе было по 3 мышки. Наблюдение за животными вели до полной эпителизации раны и появления шерсти (табл. 1).

За время наблюдения ни в одной группе не было зарегистрировано гибели животных. Не наблюдалось значимого изменения внешнего вида и поведения. Также у испытуемой группы с наночастицами меди на ране не наблюдалось отличной от контрольной группы местной реакции в виде значимого отёка и зуда. Полная эпителизация ран у мышек первой группы заняла примерно на 3 дня меньше, чем в контрольной группе.

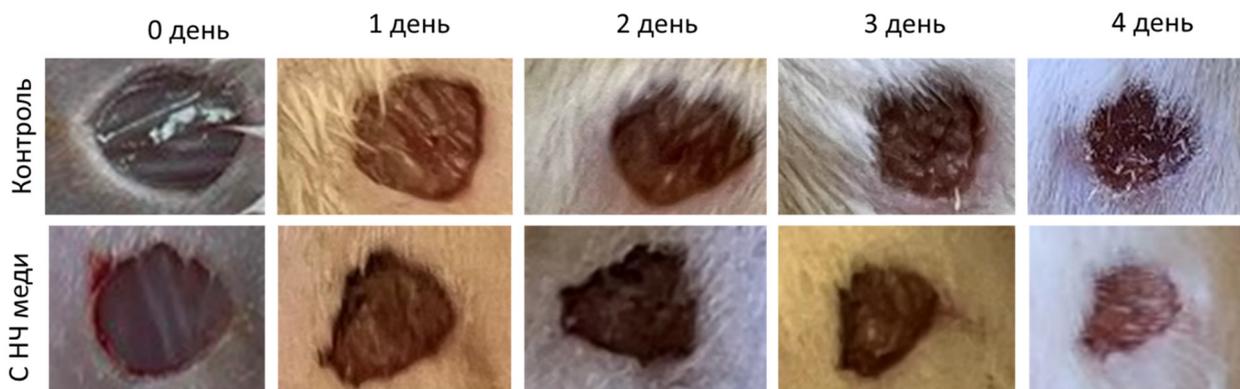


Рис. 2: Фотографии кожных ран с 0 по 4 день без обработки и после обработки наночастицами меди (динамика заживления).

В течение первых 5 дней производилась оценка исследования процесса заживления ран по оценке площади раны с использованием последующей цифровой обработки изображений. На рис. 2 показана динамика заживления ран для мышей из контрольной группы и группы с применением наночастиц.

По фотографиям ран с линейкой вычислялась их средняя площадь в программе Image J на начало лечения и в течение 4 дней после нанесения раны. Исходная площадь ран в среднем составляла 45 мм². Процент уменьшения площади раны P_n вычислялся по формуле (1) [19]:

$$P_n = \left(\frac{S_0 - S}{S_0} \right) \times 100\%, \quad (1)$$

где n – номер дня (1, 2, 3, 4), S_0 – исходная средняя площадь, S – средняя площадь в день измерения.

Скорость заживления C_n оценивалась по формуле (2) [19]:

$$C_n = \left(\frac{P_n - P_{n-1}}{T} \right), \quad (2)$$

где P_n – процент уменьшения площади раны в день измерения, P_{n-1} – процент уменьшения площади раны в предыдущий день. T – количество дней между измерениями.

На рис. 3 представлены зависимости процента уменьшения площади раны P и скорости заживления C в динамике в течение 4 дней наблюдений.

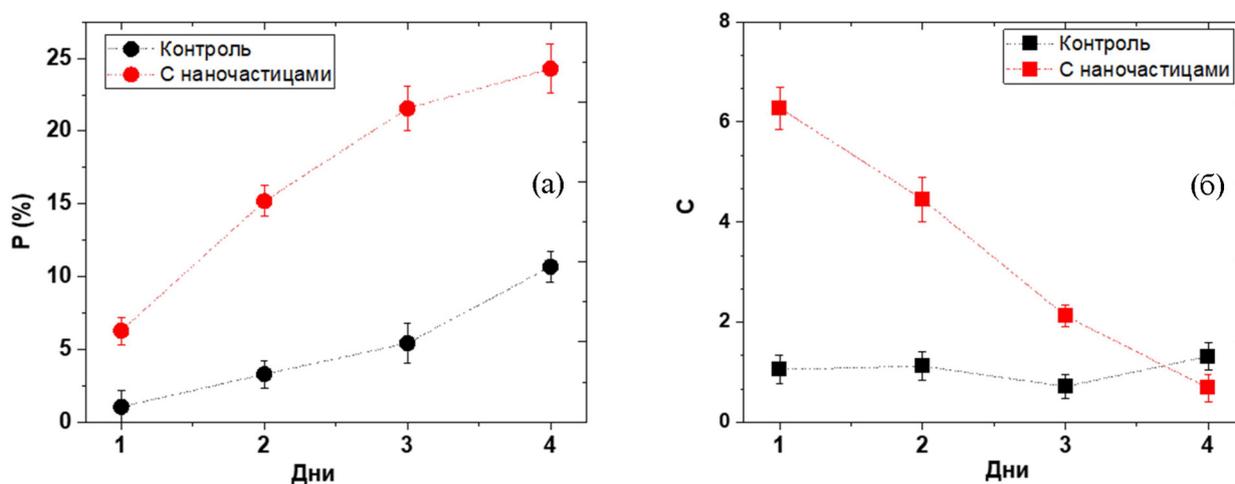


Рис. 3: Зависимости процента уменьшения площади раны (а) и скорости заживления (б) от времени.

В 0-й день эксперимента, сразу после формирования ран у мышей из контрольной и экспериментальной (с наночастицами) группах наблюдалась схожая клиническая картина. В последующие дни происходило уменьшение площади раны у всех животных (рис. 3(а)). На поверхности раны образуется сгусток крови с последующим образованием струпа при высыхании. У мышей из группы с обработкой наночастицами меди скорость заживления в первые дни выше, чем у контрольных, а затем с появлением струпа снижается. Это связано с тем, что при небольших поверхностных ранах, таких как в наших экспериментах, основной процесс заживления раны идет под струпом. При этом площадь раны визуально не уменьшается. Но под струпом происходит быстрое восстановление эпидермиса, и через 3–7 дней струп отторгается с образованием нежного и незаметного рубца.

Наблюдения показали хорошую заживляемость ран с НЧ меди. Никаких отличных раздражений и/или покраснений на месте нанесения наночастиц зафиксировано не было. Полное заживление ран для контрольной группы наблюдалось на 13–14 день, а для группы с НЧ меди на 10–12 день. Ранозаживляющее воздействие в комбинации с выраженными антибактериальными свойствами делают НЧ меди перспективными в лечении инфицированных ран.

Заключение. В результате клинического наблюдения за течением раневого процесса в экспериментах *in vivo* было показано, что наночастицы меди, наносимые на асептические кожные раны белых лабораторных мышей Balb/C методом лазерно-индуцированного прямого переноса, обладают ранозаживляющим действием. Планиметрические данные с дальнейшей цифровой обработкой изображений показали уменьшение процесса ранозаживления в среднем на 3 дня. Анализ уменьшения средней площади ран у экспериментальной группы мышей после нанесения антимикробных наночастиц меди с поверхностной массовой плотностью 30 мкг/см^2 показал положительное влияние на заживление ран, скорость которых превышала скорость заживления в контрольной группе.

Проведенные исследования показывают, что наночастицы меди, полученные лазерно-абляционным методом, могут в перспективе быть использованы для создания перевязочных материалов и средств обработки ран с антимикробными свойствами, которые могут также способствовать более быстрому заживлению ран и предотвращению возникновения инфекций.

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

Это исследование проводилось в соответствии с принципами биомедицинской этики, изложенными в Хельсинкской декларации 1964 г. и последующих поправках к ней, оно также было одобрено комитетом по этике животных Центра биофотоники ИОФ РАН (проект № 1 от 10.10.24).

Л И Т Е Р А Т У Р А

- [1] A. Markiewicz-Gospodarek, M. Koziół, M. Tobiasz, et al., *Int. J. Environ. Res. Public Health* **19**(3), 1338 (2022) DOI: 10.3390/ijerph19031338.
- [2] Е. В. Муромцева, К. И. Сергацкий, В. И. Никольский и др., *Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки*, № 3, 93 (2022). DOI: 10.21685/2072-3032-2022-3-9.

- [3] S. Hamdan, I. Pastar, S. Drakulich, et al., *ACS Cent. Sci.* **3**(3), 163 (2017). DOI: 10.1021/acscentsci.7b00036.
- [4] Z. B. Nqakala, N. R. Sibuyi, A. O. Fadaka, et al., *Int. J. Mol. Sci.* **22**(20), 11272 (2021). DOI: 10.3390/ijms222011272.
- [5] N. K. Rajendran, S. S. D. Kumar, N. N. Houreld, H. Abrahamse, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **44**, 421 (2018). DOI: 10.1016/j.jddst.2018.01.004.
- [6] Z. Pei, Q. Sun, X. Sun, et al., *Biomed. Mater. Eng.* **26**(1), 111 (2015) DOI: 10.3233/BME-151296.
- [7] K. M. Guthrie, A. Agarwal, D. S. Tackes, et al., *Ann. Surg.* **256**(2), 371 (2012). DOI: 10.1097/SLA.0b013e318256ff99.
- [8] K. Jenwitheesuk, P. Surakunprapha, B. Chowchuen, *J. Med. Assoc. Thai.* **96**(4), 177 (2013).
- [9] J. S. Keen, P. P. Desai, C. S. Smith, M. Suk, *Int. Wound J.* **9**(1), 7 (2012). DOI: 10.1111/j.1742-481X.2011.00822.x.
- [10] V. Nagarjuna Reddy, S. Nyamathulla, K. Abdul Kadir Pahirulzaman, et al., *PLoS ONE* **17**(6), e0268505 (2022) DOI: 10.1371/journal.pone.0268505.
- [11] M. Tiwari, K. Narayanan, M. B. Thakar, et al., *IET Nanobiotechnol.* **8**(4), 230 (2014). DOI: 10.1049/iet-nbt.2013.0036.
- [12] S. Alizadeh, B. Seyedalipour, S. Shafieyan, et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **517**(4), 684 (2019) DOI: 10.1016/j.bbrc.2019.07.095.
- [13] C. Sandoval, G. Ríos, N. Sepúlveda, et al., *Pharmaceutics* **14**(9), 1838 (2022). DOI: 10.3390/pharmaceutics14091838.
- [14] O. A. Bogoslovskaya, I. P. Olkhovskaya, M. N. Ovsyannikova, *Nanobiotechnol. Rep.* **17**(2), 211 (2022). DOI: 10.1134/S2635167622020045.
- [15] A. A. Nastulyavichus, S. I. Kudryashov, N. A. Smirnov, et al., *Appl. Surf. Sci.* **469**, 220 (2019). DOI: 10.1016/j.apsusc.2018.10.127.
- [16] A. A. Nastulyavichus, S. I. Kudryashov, N. A. Smirnov, et al., *Laser Phys. Lett.* **15**(10), 105602 (2018). DOI: 10.1088/1612-202X/aadb4c.
- [17] A. A. Nastulyavichus, S. I. Kudryashov, A. A. Rudenko, et al., *Nanomaterials* **10**(11), 2259 (2020). DOI: 10.3390/nano10112259.
- [18] P. Foltynski, P. Ladyzynski, A. Ciechanowska, et al., *PLoS ONE* **10**(8), e0134622 (2015). DOI: 10.1371/journal.pone.0134622.
- [19] Е. И. Трофимец, Я. А. Гуцин, К. Л. Крышень и др., *Фармация* **69**(8), 43 (2020). DOI: 10.29296/25419218-2020-08-06.

- [20] А. А. Настулявичус, Э. Р. Толордава, Е. В. Ултургашева и др., Краткие сообщения по физике ФИАН **52**(2), 63 (2025).

Поступила в редакцию 5 декабря 2024 г.

После доработки 28 декабря 2024 г.

Принята к публикации 3 января 2025 г.