

ОЦЕНКА ЗАЖИВЛЕНИЯ КОМБИНИРОВАННЫХ ИНФЕКЦИОННЫХ РАН, ОБРАБОТАННЫХ НАНОЧАСТИЦАМИ СЕРЕБРА И МЕДИ В ЭКСПЕРИМЕНТАХ *in vivo*

А. А. Настулявичус¹, Э. Р. Толордава¹, Е. В. Ултургашева¹, С. П. Бабина¹,
Е. В. Кузьмин¹, Д. Н. Игнатенко², Д. А. Бурмистрова³, С. И. Кудряшов¹

*В работе проводилось исследование эффективности заживления ран на лабораторных мышах после однократного нанесения наночастиц серебра и меди. Раны были инфицированы смешанной бактериальной культурой *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa*. Для оценки ранозаживления использовался планиметрический метод и микробиологические высевы.*

Ключевые слова: метод лазерно-индуцированного прямого переноса, антибактериальные наночастицы, инфицированные раны, мыши.

Введение. Раневые инфекции являются одной из распространенных проблем у пациентов с ослабленным иммунитетом, хроническими заболеваниями, при хирургических вмешательствах и т. д. Инфекции могут быть вызваны как грамотрицательными, так и грамположительными микроорганизмами. Патогенные микроорганизмы не только замедляют процесс заживления, но и могут вызывать системные инфекции, угрожающие жизни пациента [1]. Чаще всего раневые инфекции вызывают стафилококки (в первую очередь, *Staphylococcus aureus*, а также *S. epidermidis*), стрептококки группы А (*Streptococcus spp.*, *S. pyogenes*), *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter spp.* и *Pseudomonas aeruginosa*. Особую опасность представляют микроорганизмы, проявляющие устойчивость к противомикробным препаратам. Частота формирования резистентности патогенных микроорганизмов к противомикробным препаратам продолжает расти, что является одной из самых острых проблем здравоохранения нашего

¹ ФИАН, 119991 Россия, Москва, Ленинский пр-т, 53; e-mail: nastulyavichusaa@lebedev.ru.

² ИОФ РАН, 119991 Россия, Москва, ул. Вавилова, 38.

³ Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Н. Ф. Гамалеи, 123098 Россия, Москва, ул. Гамалеи, 18.

времени. Поэтому на повестке дня медицинской микробиологии стоит поиск новых методов и стратегий к лечению раневых инфекций. Одним из таких подходов является использование наночастиц металлов, которые благодаря своим уникальным свойствам открывают новые возможности для ускорения процессов заживления [2].

Наночастицы (НЧ) металлов, такие как серебро, золото, цинк и их оксиды, обладают широким спектром биологической активности. Их антимикробные свойства обусловлены способностью разрушать клеточные мембраны бактерий, генерировать активные формы кислорода (АФК) и ингибировать ключевые ферменты патогенов. Например, наночастицы серебра уже широко используются в медицине благодаря их способности подавлять рост бактерий, включая устойчивые к антибиотикам штаммы [3]. Исследования показали, что наночастицы серебра также эффективны и против биопленок (сообществ бактерий, защищенных внеклеточным матриксом), которые являются одной из основных причин хронических инфекций. Наночастицы способны проникать через этот матрикс и уничтожать бактерии внутри биопленок [4].

Кроме того, наночастицы способны модулировать воспалительные процессы, ускоряя переход от воспалительной фазы к фазе пролиферации, что критически важно для успешного заживления ран. Например, наночастицы оксида цинка обладают антиоксидантными свойствами, которые помогают снизить уровень окислительного стресса в ране, способствуя более быстрому заживлению [5]. Это особенно важно при лечении диабетических ран, где окислительный стресс играет ключевую роль в нарушении регенерации тканей [6].

Наночастицы серебра широко используются для доставки антибиотиков и других препаратов непосредственно в очаг воспаления, что особенно важно при лечении хронических ран [7]. Наночастицы могут быть функционализированы для повышения их биосовместимости и целенаправленного действия на определенные типы клеток. Наночастицы золота могут быть модифицированы для доставки противовоспалительных препаратов непосредственно в поврежденные ткани, что значительно повышает их эффективность [8].

Модели раневой инфекции на мышах воспроизводят многочисленные особенности инфицированных человеческих ран, такие как гнойные выделения, некротические остатки и замедленное заживление ран. В проведенной работе локализованная гнойная инфекция кожи у мышей использовалась как *in vivo* модель для оценки совокупного антимикробного и ранозаживляющего действия наночастиц, включая их возможное влияние на воспалительную реакцию, пролиферацию клеток и эпителизацию. В зависимости

от типа раны, особенностей пациента и его окружения в ранах могут доминировать один или несколько микроорганизмов. Ранее наш коллектив провел успешные исследования по лечению неинфицированных ран [9]. В представленной нами работе на моделях *in vivo* сформирована комбинированная раневая инфекция *S. aureus* и *P. aeruginosa*. Для исследований подобраны штаммы микроорганизмов, которые проявляют устойчивость к широкому спектру антибиотиков и способны формировать биопленки.

Целью данной работы является оценка влияния наночастиц серебра и меди, наносимых методом лазерно-индуцированного прямого переноса (ЛИПП) непосредственно на рану, на скорость ранозаживления у лабораторных мышей при первоначальном инфицировании бактериями *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa*.

Экспериментальная часть.

Бактерии и их культивирование. Для исследований *in vivo* были выбраны изоляты из образцов клинического материала из коллекции ФГБУ НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи. Для исследований были выбраны штаммы, которые проявляют устойчивость к нескольким антибиотикам, способны вызывать раневые инфекции и формировать биопленки: *S. aureus* 15 и *P. aeruginosa* 32. В стерильный LB-бульон (Difco, США) засеивали культуру с чашки Петри и выращивали в термостате при 37 °С с интенсивной аэрацией 18 ч. Суточную бульонную культуру бактерий разводили 1:100 в стерильном растворе хлорида натрия 0.9% (Гротекс, Россия) и в соотношении 1/1 соединяли в пробирке.

Лабораторные животные и метод их заражения. Для моделирования раневой инфекции были использованы мыши Balb/c, приобретенные в питомнике “Столбовая”, которые поддерживались в виварии в соответствии с Требованиями по содержанию животных МЗ РФ №775. В опытах были использованы самцы весом 18–20 г. Количество животных, используемых в исследовании – по 3 мыши в группе, что является достаточным для полной регистрации изучаемых эффектов [10]. Животные были адаптированы в лаборатории в течение 7 дней до начала проведения исследований. Во время этого периода у животных каждый день контролировали клиническое состояние путем визуального осмотра.

Модель раневой инфекции. Кожу предварительно готовили, отстригая мех на спине мышей (средняя область), затем остатки волос удаляли кремом для депиляции. Крем удаляли, протирая кожу ватным тампоном, смоченным в теплой воде. Кожу после этого обрабатывали 70% этанолом. Подготовка осуществлялась за несколько часов, максимум за сутки перед экспериментом. Для иммобилизации и кратковременной анестезии внутрибрюшинно вводили 2 мг/20 г Золетил (Virbac, Франция). Для местного обезболи-

вания применяли спрей Лидокаина (Эгис-Ру, Венгрия). Для создания экспериментальной раневой инфекции мышам были нанесены хирургические раны путем отрезания ножницами участка кожи размером 0.5 см^2 на полную глубину. Суспензию из двух микроорганизмов вносили на рану и закрывали стерильной повязкой OPSITE (Smith & Nephew, Великобритания) на 48 часов до развития инфекционного процесса. Начиная с 3 дня после заражения раны, обрабатывали НЧ серебра и меди, соответственно. Контрольную группу животных не лечили – проводили ежедневные перевязки, но рану не обрабатывали исследуемыми НЧ. Эффективность оценивалась по сокращению обсеменённости раневого ложа и количеству дней заживления ран. Забор раневого отделяемого проводили стерильными ватными тампонами каждый день до эпителизации. Тампон с биологическим материалом помещали в 1 мл NaCl 0.9% и интенсивно встряхивали на вортексе 5 мин. Полученную суспензию высевали чашки Петри с агаризованной питательной средой и, спустя 18–24 часа после инкубации в термостате при $37 \text{ }^\circ\text{C}$, проводили подсчет колоний.

Оценка заживления ран производилась по измерениям площади раны и дальнейшим расчетам в программе Image J. Критерием заживления считали отсутствие корки и полное восстановление эпидермиса. Фотомониторинг процесса заживления ран и эффективность предложенного метода оценивалась по статистически достоверному сокращению сроков полной эпителизации раны. По материалам фотомониторинга была проведена оценка заживления ран, которая производилась по измерениям площади раны. Процент уменьшения площади раны P_n вычислялся по формуле (1) [11]:

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

где n – номер дня, S_0 – исходная средняя площадь, S – средняя площадь в день измерения.

Также по материалам фотомониторинга была определена скорость заживления C_n по формуле (2) [10]:

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

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.

Лазерный перенос. Для генерации наночастиц меди (Cu НЧ) и серебра (Ag НЧ) применялся метод лазерно-индуцированного прямого переноса. В качестве донорных подложек использовались тонкие металлические пленки, осажденные на полиэтилентерефталатную (ПЭТ) основу.

Получение пленок осуществляли методом магнетронного распыления в установке Quorum SC7620 Mini Sputter Coater в атмосфере инертного газа аргона. Медные и серебряные мишени высокой чистоты (99.99%) распыляли на полимерную подложку. Толщина напыляемого металлического слоя составляла 100 нм. Непосредственное получение и перенос наночастиц меди и серебра на раневую поверхность проводили с использованием наносекундного лазерного комплекса HTF MARK (ОКБ Булат, Россия) с длиной волны 1064 нм, длительностью импульса 120 нс и частотой следования импульсов 20 кГц. Лазерное излучение фокусировалось на поверхности донорной металлической пленки с помощью F-Theta объектива, имеющего фокусное расстояние 160 мм. Диаметр сфокусированного пятна на уровне $1/e^2$ от максимальной интенсивности составлял приблизительно 40 мкм. Сканирование лазерного луча по поверхности мишени осуществляли со скоростью 1500 мм/с. При заданной частоте повторения импульсов и диаметре пятна такая скорость обеспечивала однородную подачу лазерного импульса на элементарную зону облучения с учетом их частичного перекрытия. Плотность энергии лазерного излучения на поверхности мишени поддерживалась на уровне 8 Дж/см². Данное значение существенно превышает порог абляции для обоих металлов (~ 2 Дж/см²), что гарантировало эффективное испарение материала и формирование наночастиц. Для обработки ран у мышей был разработан специальный фиксатор мышей (рис. 1(б)). Мышь помещалась внутрь данного фиксатора, а металлическая пленка размещалась в верхней части фиксатора над поверхностью раны на расстоянии (зазор) 2 мм. Конструкция фиксатора позволяет менять расстояние между донорной и акцепторной подложками.

При воздействии лазерного импульса происходило быстрое испарение тонкого слоя металла, и образующаяся плазма, содержащая наночастицы, направлялась в сторону акцепторной подложки, осаждаясь на ее поверхности и формируя нанопокрывание (рис. 1(а)).

Для всех экспериментальных групп, подвергавшихся лазерному воздействию, использовались идентичные вышеописанные параметры ЛИПП (плотность энергии, скорость сканирования, зазор и т. д.).

Результаты и их обсуждение. Заживление инфицированной раны – это сложный регенеративный процесс, который включает в себя не только обеззараживание раневого ложа, а также ряд морфологических и функциональных изменений в тканях, при которых кожа восстанавливается после повреждений. В последние годы значительный интерес вызывают методы и средства, способствующие не только санации раны, но и

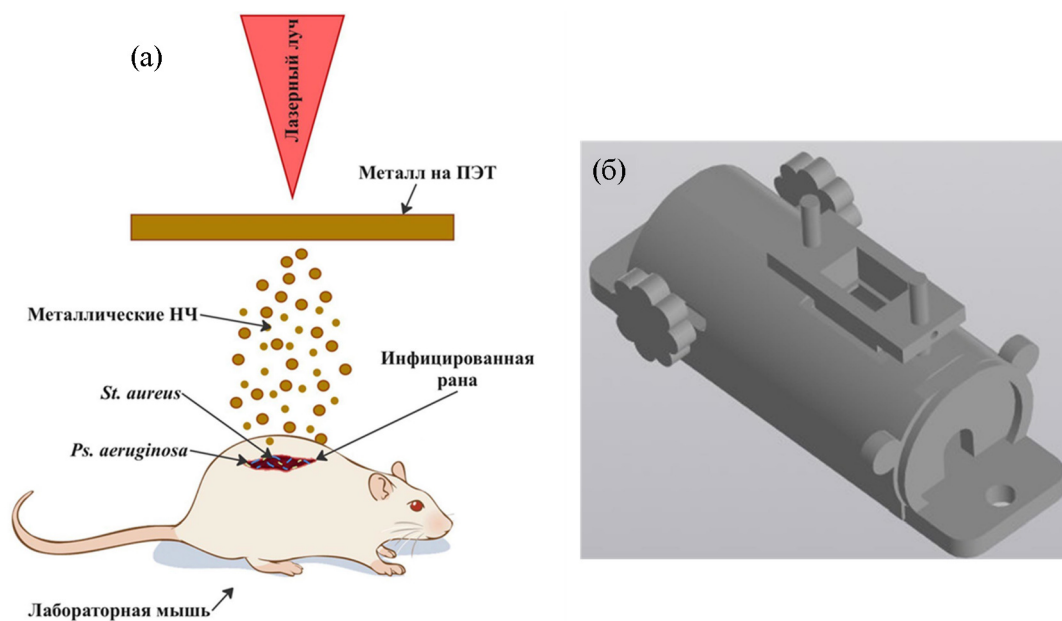


Рис. 1: Схема нанесения наночастиц на рану (а), фиксатор для мышей (б).

ускорению процесса заживления, что обусловлено медицинскими и социальными аспектами. Особенный интерес исследователей вызывают наночастицы металлов. Известно, что наночастицы обладают физико-химическими свойствами, отличающимися как от свойств массивных металлических объектов, так и свойств отдельных атомов. Одним из ключевых преимуществ наночастиц металлов является их способность к контролируемой доставке лекарственных веществ, что позволяет минимизировать побочные эффекты и повысить эффективность лечения. Метод лазерной абляции наночастиц с металлической пленки позволяет синтезировать стабильные наночастицы и не требует использования блокирующих и стабилизирующих агентов или восстановителей. Аппликационный метод нанесения НЧ может быть применен в рамках как монотерапии, так и в комплексе с пероральными препаратами. Наночастицы меди обладают сильными биоцидными характеристиками. Также ранние исследования показали, что НЧ меди ускоряют процесс ранозаживления [9].

В рамках проведенных исследований нами были получены наночастицы меди и серебра сферической формы и с размерами в диапазоне 50–300 нм в результате лазерно-индуцированного прямого переноса пленки оксида меди и серебра толщиной 100 нм [12].

Комбинированные раневые инфекции на *in vivo* моделях были однократно аппликационно обработаны наночастицами серебра и меди с размерами 50–300 нм. Полученные результаты высевок со смывов ран показали значимое сокращение количества микро-

организмов в раневом ложе у животных, обработанных НЧ, со второго дня лечения в сравнении с контрольной группой (табл. 1).

Т а б л и ц а 1

Результаты высевов с ран

		Обсемененность раневого ложа (КОЕ/мл)						
		Дни наблюдения (после лечения)						
		1	2	3	4	5	7	9
Нано-частицы	Ag	$(6 \pm 2) \times 10^3$	$(4 \pm 2) \times 10^2$	72 ± 3	<10	<10	<10	<10
	Cu	$(8 \pm 3) \times 10^2$	349 ± 15	11 ± 1	<10	<10	<10	<10
Контрольная группа		$(6 \pm 3) \times 10^4$	$(2 \pm 1) \times 10^5$	$(5 \pm 1) \times 10^5$	$(7 \pm 3) \times 10^4$	$(3 \pm 1) \times 10^2$	143 ± 13	<10

Данные фотомониторинга процесса заживления ран представлены на рис. 2.

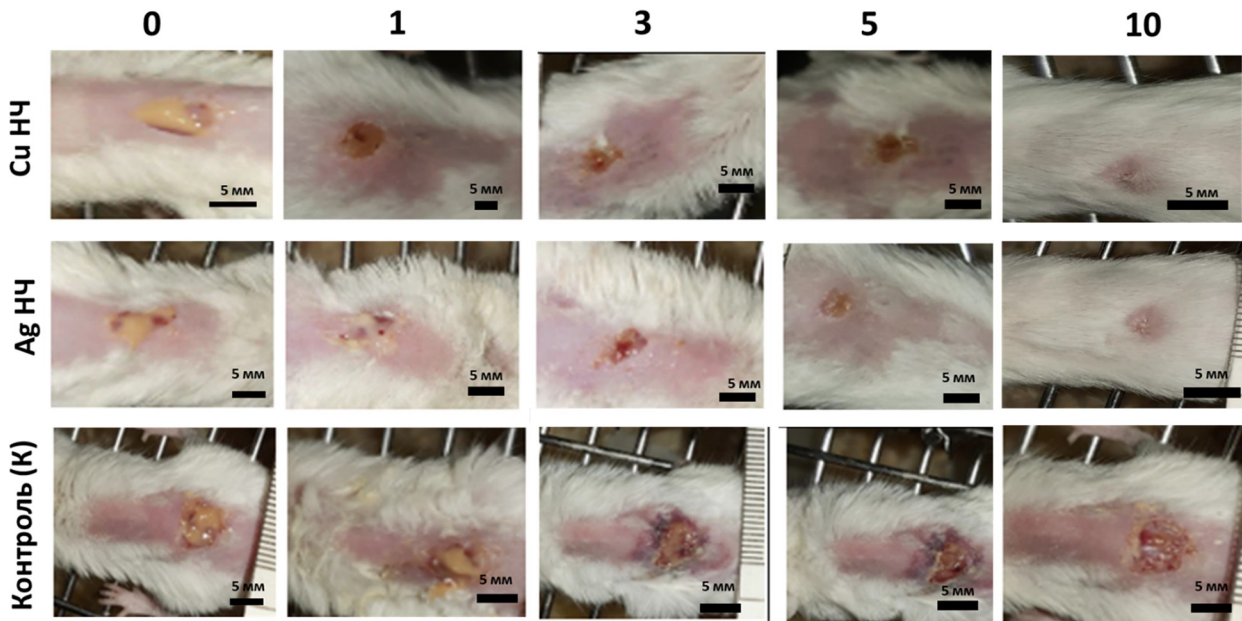


Рис. 2: Фотографии кожных инфицированных ран с 0 по 10 день без обработки и после обработки наночастицами меди и серебра.

В процессе мониторинга было показано, что при обработке инфицированных ран НЧ меди и серебра процесс эпителизации практически полностью заканчивается к 10 дню наблюдения. Раны мышей контрольной группы не только дольше остаются инфицированными, но и процесс эпителизации также более длительный. Продолжительное

течение инфекционного процесса (до 7 дней) сопровождалось локальной гиперемией и отёком тканей вокруг раны, а также общим негативным состоянием животных (снижение аппетита, уменьшение двигательной активности, агрессивное поведение), что в совокупности отрицательно влияло на регенерацию. Более интенсивный рост шерсти в зонах, обработанных НЧ металлов, может свидетельствовать об ускоренном восстановлении кожного покрова и фолликулярного аппарата, что также отражает стимулирующее влияние частиц на регенерацию тканей.

На рис. 3 представлены зависимости процента уменьшения площади раны P и скорости заживления C в динамике в течение 10 дней наблюдений.

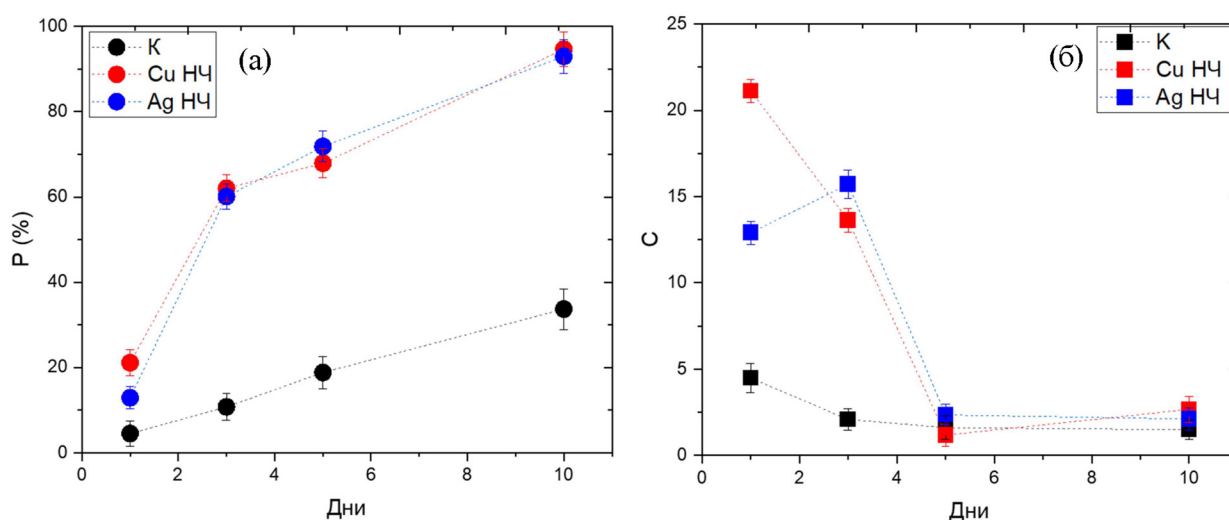


Рис. 3: Зависимости процента уменьшения площади раны (а) и скорости заживления (б) от времени.

Процесс заживления у мышей активно начинается практически с первого дня после аппликационного переноса НЧ и на 10-й день процент уменьшения площади раны составляет более 90%. У контрольной группы, которые не получили лечение, процесс заживления затянутый. К 10-му дню процент уменьшения площади раны составляет около 30%. У мышей из группы с обработкой наночастицами меди и серебра скорость заживления в первые дни выше, чем у контрольных.

Наночастицы серебра и меди способствовали ускоренному заживлению ран. Заживление ран для группы с НЧ меди и серебра наблюдалось на 10 день, а для контрольной группы к этому дню процесс заживления не завершился. Ранозаживляющее воздействие в комбинации с выраженными антибактериальными свойствами делают НЧ меди и серебра перспективными в лечении инфицированных ран. Представленный в работе

метод отличается от традиционных способов применения наночастиц (мази, перевязочные материалы) и позволяет получать (сразу же наносить на рану) наночастицы высокой чистоты без дополнительных реагентов. Уникальность заключается в сочетании прямого воздействия, высокой эффективности и экологической безопасности.

Заключение. В пилотных экспериментах *in vivo* показана способность НЧ ускорять заживление раны инфицированной *S. aureus* и *P. aeruginosa*, а также сокращать количество микроорганизмов в раневом ложе у животных, обработанных НЧ меди и серебра. Предварительные исследования показали, что наночастицы серебра и меди в равной степени оказывают бактерицидную активность против бактерий. Также показано ускорение процесса ранозаживления на 5 дней.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 25-25-00512, <https://rscf.ru/project/25-25-00512/>.

Этическое одобрение: 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] J. Zhu, Y. Li, Y. Chen, et al., *Mater. Today Bio.* **24**, 101553 (2025). DOI: 10.1016/j.mtbio.2025.101553.
- [2] N. Naderi, M. Karimi, A. A. Hatamipour, A. R. Khatami, *Front. Biosci.* **23**, 1038 (2018). DOI: 10.2741/4632.
- [3] S. V. Khairnar, R. W. Jha, A. M. Dandge, et al., *RSC Pharm.* **2**(3), 455 (2025). DOI: 10.1039/D4PM00314D.
- [4] A. R. Sayfutdinova, K. A. Abdiyev, Z. A. Temerdarova, et al., *JCIS Open.* **12**, 100098 (2023). DOI: 10.1016/j.jciso.2023.100098.
- [5] P. Pino, S. Y. Eom, J. H. Lee, T. G. Nam, *Pharmaceutics* **15**(3), 970 (2023). DOI: 10.3390/pharmaceutics15030970.
- [6] Е. В. Силина, Е. Б. Артюшкова, О. С. Иванова и др., *Клиническая патофизиология* **30**(С2), 108 (2024).
- [7] А. С. Аметов, О. Л. Соловьева, *Проблемы эндокринологии* **6**, 52 (2011). DOI: 10.14341/probl201157652-56.

- [8] K. Koushki, M. Jahangiri, A. G. Saedi, M. R. H. Estarki, *Nanomaterials* **15**(15), 1201 (2025). DOI: 10.3390/nano15151201.
- [9] А. А. Настулявичус, Э. Р. Толордава, Е. В. Ултургашева и др., *Краткие сообщения по физике ФИАН* **52**(2), 71 (2025). DOI: 10.3103/S1068335624602462.
- [10] *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств*. Под ред. А. Н. Миронова (М., Гриф и К, 2012).
- [11] Е. И. Трофимец, Я. А. Гуштин, К. Л. Крышень и др., *Фармация* **69**(8), 43 (2020). DOI: 10.29296/25419218-2020-08-06.
- [12] A. Nastulyavichus, E. Tolordava, A. Rudenko, et al., *Nanomater.* **10**, 2259 (2020). DOI: 10.3390/nano10112259.

Поступила в редакцию 1 ноября 2025 г.

После доработки 9 ноября 2025 г.

Принята к публикации 10 ноября 2025 г.