

**КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА**

ННЦ «Інститут біології та медицини»

Кафедра біохімії

Завідувач кафедри проф. Олексій САВЧУК

Протокол №____ засідання кафедри

від “____” _____ 2026 р.

**ВПЛИВ НАНОЧАСТИНОК CeO_2 ТА ПРОБІОТИЧНИХ БАКТЕРІЙ
Lactobacillus casei НА ЗАГОЄННЯ РАН**

Кваліфікаційна робота бакалавра

денної форми навчання

за спеціальністю

162 «Біотехнології та біоінженерія»

Гришиної Орини Віталіївни

Науковий керівник від кафедри

д-р філософії Нікітіна Н.С.

Робота виконана в Інституті мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного
НАН України під керівництвом д-ра біол. наук., ст. наук. співроб. Лазаренко
Людмили Миколаївни

Оцінка захисту роботи

Київ – 2026

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АМП – антимікробні пептиди

МПА – м'ясо-пептонний агар

AgNPs – наночастинки срібла

CAP – холодна атмосферна плазма (від англ. *Cold Atmospheric Plasma*)

MRS – середовище де Мена, Рогози та Шарпа

MRSA – метицилін-резистентний золотистий стафілокок

ЗМІСТ

ВСТУП.....	5
РОЗДІЛ 1. Сучасні підходи до терапії ран: від хімічних агентів до біотехнологій	7
1.1. Особливості загоєння ран шкіри та проблема резистентності мікроорганізмів до антибіотиків.....	7
1.2. Характеристика наночастинок CeO_2 як перспективного засобу ранозагоювальної терапії.....	9
1.3. Використання пробіотичних лактобактерій у боротьбі з рановою інфекцією	11
1.4. Сучасний стан досліджень ефективності методів лікування ран без антибіотиків	13
1.5. Доклінічні дослідження ранозагоювальних препаратів.....	16
РОЗДІЛ 2. Матеріали та методи досліджень.....	19
2.1. Об'єкти дослідження	19
2.2. Моделювання інфекційної рани шкіри та схема експерименту.....	20
2.3. Гістологічний аналіз тканин	21
2.4. Дослідження мікробіоти ранової поверхні.....	23
2.5. Статистичне оброблення результатів.....	24
РОЗДІЛ 3. Результати досліджень та обговорення	25
3.1. Загально-клінічне обстеження тварин	25
3.2. Порівняльна характеристика ефективності наночастинок CeO_2 та пробіотичних лактобактерій у динаміці загоєння ран шкіри	27
3.3. Гістологічні особливості тканин шкіри за умов застосування наночастинок CeO_2 та пробіотичних лактобактерій	30
3.4. Антимікробна активність досліджуваних засобів щодо збудників ранової інфекції	36
3.5. Обговорення результатів	40

ВИСНОВКИ	42
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	44

ВСТУП

Створення та використання матеріалів на рівні атомів і молекул називають нанотехнологією. Завдяки своїй біологічній активності та біосумісності, наноматеріали на сьогодні почали частіше застосовуватися для діагностики та лікування різноманітних патологій. Найбільшу увагу дослідників для загоєння ран привертає використання наночастинок металів, оскільки вони здатні прискорювати регенерацію тканин. Однак, при лікуванні інфекційних ран, сучасна медицина часто стикається з антибіотикорезистентністю [1].

Шкіра виконує життєво важливу захисну функцію, і будь-яке порушення її цілісності (рана) несе загрозу для організму. Саме тому швидке та ефективне загоєння інфікованих ран є критично важливим завданням сучасної медицини. Сучасні методи лікування інфікованих ран потребують розроблення нових підходів, що є заміною класичним антибіотикам. З одного боку, перспективним є використання наночастинок CeO_2 , що володіють унікальними фізико-хімічними властивостями, особливо здатністю до антиоксидантної та протизапальної активності [2]. З іншого боку, не менш перспективними є пробіотичні бактерії роду *Lactobacillus*, які виступають природними антагоністами збудників інфекції. Та хоча обидва ці агенти окремо вивчаються досить активно, порівняльна їх ефективність на одній експериментальній моделі була досліджена недостатньо, що й робить дану роботу актуальною.

Мета роботи: провести порівняльну оцінку ефективності наночастинок діоксиду церію (CeO_2) та пробіотичних лактобактерій у лікуванні інфікованих ран шкіри в експерименті на мишах.

Для досягнення цієї мети було сформовано наступні завдання:

1. Змодельовати інфіковані рани шкіри у мишей для проведення експерименту.

2. Дослідити вплив наночастинок CeO_2 та пробіотичних лактобактерій *L. casei* на зменшення розміру рани та відновлення структури шкіри.

3. Визначити здатність наночастинок CeO_2 та пробіотичних лактобактерій *L. casei* пригнічувати розвиток збудників інфекції в рані.

4. Оцінити стан імунної системи тварин під час лікування цими засобами.

5. З'ясувати переваги та можливі недоліки нанотехнологічного та біотехнологічного методів загоєння ран.

Наукова новизна. У роботі вперше проведено пряме порівняння дії наночастинок CeO_2 та пробіотичного штаму *Lactobacillus casei* на рановий процес. Це дозволило виявити відмінності у впливі цих засобів на регенерацію та знешкодження інфекції.

Практичне значення роботи. Отримані дані доповнюють існуючі відомості про ранозагоювальні властивості наноматеріалів та доводять, що наночастинок CeO_2 і пробіотики є перспективними засобами для місцевого лікування інфікованих ран. Результати досліджень можуть стати основою для розробки нових ранозагоювальних препаратів, що не містять антибіотики.

РОЗДІЛ 1

СУЧАСНІ ПІДХОДИ ДО ТЕРАПІЇ РАН: ВІД ХІМІЧНИХ АГЕНТІВ ДО БІОТЕХНОЛОГІЙ

1.1. Особливості загоєння ран шкіри та проблема резистентності мікроорганізмів до антибіотиків

Шкіра – найбільший орган тіла, що виконує безліч необхідних для життя функцій: захисну, терморегуляційну, рецепторну, видільну, синтезує вітамін D та бере участь в обміні речовин [3].

Для повноцінного функціонування шкіри необхідно, щоб вона залишалася неушкодженою. Будь-яке механічне чи хімічне порушення цілісності шкіри або слизових оболонок, що супроводжується характерними ознаками болю чи кровотечі, називається раною. Організм починає миттєво реагувати, активуючи процес регенерації, що спрямований на відновлення тканин. Процес загоєння гострої рани поділяють на чотири послідовні фази: гемостаз, запалення, проліферація та ремоделювання. Однак, варто зазначити, що деякі дослідники [4] описують фазу проліферації детальніше, розділяючи процеси формування грануляційної тканини та відновлення епідермісу як окремі етапи. Процес загоєння гострої рани поділяють на такі чотири послідовні фази як гемостаз, запалення, проліферація та ремоделювання [5]. Фібробласти водночас із формуванням судин створюють грануляційну тканину та матрикс, тим самим переводячи рану у фазу росту. Регенерація епідермісу відбувається завдяки стовбуровим клітинам, які при пошкодженні набувають високої пластичності та відновлюють епідермальний бар'єр [6]. Останнім етапом в процесі загоєння ран є ремоделювання, що відновлює захисну функцію та міцність шкіри. Відомо, що під час пренатального загоєння відбувається повне відновлення тканини, у дорослих цей процес

призводить до утворення фіброзного рубця, який слугує бар'єром, що закриває рану. Якщо нормальний перебіг цих етапів буде порушений, це може призвести до низки проблем, таких як надмірне рубцювання або формування хронічних ран, до яких особливо схильні люди похилого віку, пацієнти з діабетом та судинними захворюваннями, що є значною проблемою сучасної медицини [7].

Суттєвою перешкодою для загоєння та ускладнення перебігу хронічних ран є інфікування. Відкрита ранова поверхня, накопичення некротизованих тканин та наявність ексудату створюють сприятливе середовище для росту та розмноження патогенних мікроорганізмів. При цьому, найбільшою проблемою є утворення біоплівки бактеріями. Згідно з даними систематичного огляду та метааналізу, наявність біоплівок у хронічних ранах становить 78,2 %, що значно перевищує показники для гострих ран [8].

Властивості бактерій у біоплівках суттєво відрізняються від планктонних форм, що зумовлює їхню високу антибіотикорезистентність. У глибоких шарах перехід клітин у стан спокою робить їх менш уразливими до препаратів, що діють на стадії поділу, призводячи до рецидивів інфекції. Стійкість мікроорганізмів у складі біоплівок може бути в 100–1000 разів вищою, ніж у вільному стані [1]. Найбільшу загрозу серед збудників ранової інфекції становить група з шести нозокоміальних патогенів під аббревіатурою ESKAPE: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, та *Enterobacter* spp. [9]. Через постійне використання антибіотиків виникли нові штами бактерій, що мають стійкість до багатьох ліків одночасно. Через це навіть найефективніші ліки перестають діяти. У клінічній практиці особливу увагу приділяють взаємодії *Staphylococcus aureus* та *Pseudomonas aeruginosa*. Саме ці два патогени найбільше висівають з інфікованих ран та вони часто зустрічаються разом, утворюючи змішані біоплівки [10]. *Staphylococcus aureus* зазвичай

локалізується на поверхні рани, а *Pseudomonas aeruginosa* проникає у глибокі шари тканин, через що знищити її надзвичайно важко.

Найпоширеніше лікування за участі антибіотиків працює все гірше, оскільки стійкі штами поширюються дуже швидко. Тому виникла потреба в пошуку альтернативних методів терапії, що не залежать від класичних антибіотиків. На сьогодні особливу увагу приділяють наноматеріалам через їхні унікальні фізико-хімічні властивості та пробіотикам, що здатні витіснити шкідливі бактерії природним шляхом.

1.2. Характеристика наночастинок CeO_2 як перспективного засобу ранозагоювальної терапії

Нові можливості для регенеративної медицини відкрив розвиток нанотехнологій. Велику роль відіграє створення так званих «нанозимів» – наноматеріалів, які здатні імітувати дію природних ферментів організму. Відомим представником цього класу є наночастинки CeO_2 , завдяки своїм специфічним фізико-хімічним властивостям [11].

Церій – це рідкісноземельний метал, перший елемент у ряду лантаноїдів періодичної системи. Його унікальність полягає в особливому розташуванні електронів, де його 4f-орбіталі прикриті зовнішніми оболонками 5p і 4d, що і забезпечує йому високу каталітичну активність [11]. На відміну від більшості інших рідкоземельних металів, церій може існувати у тривалентному (Ce^{3+}) та чотиривалентному (Ce^{4+}) ступенях окиснення, що зумовлює наявність його оксиду в об'ємному стані як у формі CeO_2 , так і у вигляді Ce_2O_3 . Однак на нанорівні, зі зменшенням діаметра частинок, їхня поверхня збагачується іонами Ce^{3+} , що призводить до втрати атомів кисню.

Хоча активні форми кисню виконують сигнальну роль, оксидативний стрес спричиняє їх надлишок. Наночастинки CeO_2 імітують активність ключових

ферментів, таких як супероксиддисмутаза (СОД), каталази, пероксидази, оксидази, фосфатази, знешкоджуючи небезпечні сполуки [2]. Механізм залежить від валентності церію. Іони Ce^{3+} імітують СОД [2], а окислений стан краще виконує каталазну функцію. Унікальність наноцерію полягає у здатності послідовно перетворювати радикали на перекис водню та в подальшому розкладати його до безпечних води та кисню, діючи як потужний антиоксидант.

Спосіб синтезу є ключовим у визначенні фізико-хімічних характеристик наночастинок та їхньої подальшої біологічної дії [12]. При використанні *in vivo* критично важливо врахувати утворення так званої «білкової корони» на поверхні частинок, оскільки це суттєво впливає на їхню поведінку та розподіл у тканинах. Аби організм краще сприймав матеріал, поверхню наночастинок модифікують спеціальним покриттям, зокрема поліакриловою кислотою, поліетиленгліколем, декстраном, циклодекстрином та іншими подібними сполуками. Великої популярності набувають методи «зеленого» синтезу [13], які дозволяють відмовитися від токсичних реагентів завдяки використанню природних стабілізаторів, зокрема рослинних екстрактів та грибів, забезпечуючи отримання однакових дрібних частинок.

Крім того, Наночастинки CeO_2 мають виражену протизапальну дію. У дослідженнях на моделі перитоніту у щурів [14], введення наночастинок CeO_2 значно покращувало виживання тварин, сприяло нормалізації температури тіла та знижувало системну запальну відповідь. Водночас рівень цитокінів знизився та оксидативний стрес в печінці зменшився, що свідчить про потенціал наноцерію в лікуванні важких інфекцій.

Гібридні нанокомпозитні каркаси викликають значний науковий інтерес [15]. Застосування CeO_2 у цій галузі є перспективним для регенерації кісткової, серцевої, нервової тканин та шкіри. Наноцерій завдяки анти- та прооксидантним властивостям активує сигнальні шляхи, що стимулюють диференціацію стовбурових клітин та ангіогенез. Зокрема, розроблено

мембрани з полі(3-гідроксибутират-ко-3-гідроксивалерату) з додаванням CeO_2 [16], які покращують адгезію та проліферацію клітин [16]. Дослідження *in vitro* та *in vivo* підтвердили здатність таких мембран посилювати ангіогенез та ефективно загоювати рани при діабеті.

1.3. Використання пробіотичних лактобактерій у боротьбі з рановою інфекцією

На сьогодні бактерії стають дедалі стійкішими до антибіотиків, тому вчені змушені шукати природні методи боротьби з інфекціями, зокрема *Staphylococcus aureus*. Одним із таких методів є використання пробіотиків, зокрема роду *Lactobacillus*. Вони вже відомі своєю позитивною дією на шлунково-кишковий тракт, однак останніми роками ці мікроорганізми розглядаються як потужний засіб для місцевого лікування інфікованих ран. Це стає можливим завдяки тому, що лактобактерії здатні виробляти власні антимікробні речовини та допомагати імунній системі швидше долати запалення [17].

Через зростання кількості мультирезистентних штамів патогенів, що становить пряму загрозу здоров'ю людини, пошук безпечних альтернативних методів лікування став пріоритетним завданням. Пробіотичні бактерії, особливо роду *Lactobacillus* та їхні вторинні метаболіти, є найбільш перспективними для контролю та запобігання інфекціям. Зокрема, штам *Lactobacillus casei* демонструє виражені антимікробні та антиадгезивні властивості щодо таких небезпечних збудників, як *Pseudomonas aeruginosa* та *Staphylococcus aureus*.

Ефективність *L. casei* визначається набором сполук, які бактерія виробляє та виділяє у процесі свого життя. Завдяки сучасному методу високоефективної рідинної хроматографії вдалося точно встановити, які саме речовини в

супернатанти борються з інфекцією. Аналіз показав, що там міститься значна кількість молочної, оцтової, лимонної та бурштинової кислот [18]. Саме цей набір, де головну роль відіграє молочна кислота, забезпечує високу активність штаму проти шкідливих бактерій. Механізм їхньої дії простий, але ефективний. Вони різко підвищують кислотність у рані, через що білки патогенів руйнуються, а їхні оболонки деформуються, де в результаті вміст клітин збудника просто витікає назовні, і вони гинуть.

Окрім прямої антибактеріальної дії, *L. casei* має потужний антиадгезивний ефект. Доведено, що специфічні поверхневі білки лактобактерій здатні блокувати прикріплення патогенів до тканин господаря через механізм конкуренції за рецептори. Ще однією важливою особливістю пробіотиків є їхня здатність до коагрегації з патогенними бактеріями [18]. Такий бар'єр стає перешкодою для патогенів, не даючи їм шансу закріпитися та почати заселення ушкодженої зони. Оскільки саме блокування цього першого контакту бактерій із тканинами є вирішальним для того, щоб зупинити інфекцію ще на початку, такий механізм вважається одним із ключових у сучасному лікуванні ран.

Клінічні та експериментальні дослідження підтверджують позитивний вплив місцевого застосування супернатанту *L. casei* на динаміку регенерації. Макроскопічна та мікроскопічна оцінка зони ушкодження показала значне прискорення загоєння повновідшарових ран, особливо на 21-шу та 28-му добу після травми [19]. Патоморфологічні знахідки вказують на те, що *L. casei* не лише пригнічує інфекцію, а й активно стимулює формування грануляційної тканини та процеси ре-епітелізації.

Варто відзначити роль нормальної мікробіоти шкіри у підтримці гомеостазу. Наприклад, коменсальні штами *Staphylococcus epidermidis* виділяють специфічну протеазу Esp, яка здатна руйнувати матрикс біоплівки золотистого стафілокока та розщеплювати білки рецепторів господаря, необхідні для його прикріплення [20]. Проте використання поширених

антисептичних засобів та мила часто чинить токсичний вплив на кератиноцити і фібробласти, порушуючи цей природний захисний бар'єр. У цьому контексті застосування *L. casei* є безпечнішим підходом, оскільки він діє селективно, не пошкоджуючи здорові клітини.

Ще однією цінною властивістю *L. casei* є його здатність полегшувати біль під час загоєння. Дослідження підтверджують [19], що застосування пробіотиків допомагає знизити інтенсивність больових відчуттів, наприклад, при переломах ребер або післяпологових ранах, що пояснюють їхньою антиоксидантною дією та вмінням коригувати запальні реакції організму. У результаті, завдяки такому поєднанню, де органічні кислоти нищать інфекцію, поверхневі білки не дають патогенам закріпитися, а метаболіти стимулюють відновлення тканин, штам *Lactobacillus casei* стає потужним фундаментом для розробки новітніх біотехнологічних препаратів проти інфікованих ран.

1.4. Сучасний стан досліджень ефективності методів лікування ран без антибіотиків

Через значне зростання кількості полірезистентних штамів бактерій у ранах, звичайні антибіотики втрачають свою ефективність, тож сучасна медицина змушена шукати нові стратегії лікування. Сьогодні увага вчених зосереджена на альтернативних методах, наприклад біологічних з використанням бактеріофагів, фізичних та використанні новітніх матеріалів. Головна мета цих підходів не просто знищення вірусу, а й прискорення загоєння тканин не викликаючи при цьому резистентності у бактерій.

Фаготерапія знову актуальна через антибіотикорезистентність. Регуляторні вимоги дозволяють лише очищені літичні фаги з підтвердженою активністю [21]. Для прогнозу резистентності та підбору терапії критичним є визначення рецепторів господаря. Цикл інфікування забезпечує дію вірусу;

помірні фаги не використовують через ризик переносу генів вірулентності. Висока специфічність забезпечує точкову дію на патоген, проте потребує точної діагностики. Метод не викликає анафілаксії та базується на імунофаговій синергії, хоча можливе вироблення антитіл. Бактеріальна стійкість формується через зміну рецепторів, системи рестрикції чи CRISPR-Cas. Попри вузький спектр і брак випробувань, фаготерапія перспективна проти мультирезистентних штамів завдяки збереженню мікробіоти, безпеці, антибіоплівковій дії та низькій вартості виробництва, попри вузький спектр і брак випробувань.

Ще одним перспективним напрямком є застосування антимікробних пептидів [22], які виступають факторами вродженого імунітету. Взаємодію АМП із мембраною описують трьома основними моделями, а саме тороїдальною порою через вертикальне вбудовування пептидів, бочкоподібними клепками шляхом формування іонних каналів та килимовою моделлю, що передбачає деструкцію мембрани після її щільного покриття [22]. Вибірковість дії пояснюється притяганням катіонних молекул до аніонних ліпідів бактерій, тоді як клітини ссавців захищені холестеролом. АМП також здатні до пенетрації для інгібування синтезу білка, зупинки реплікації ДНК або руйнування нуклеїнових кислот [22]. Сучасні пептиди додатково деградують сигнальні молекули та матрикс біоплівки, що робить їх ефективними проти хронічних інфекцій.

Дослідження підтверджують високу антибактеріальну дію меду Манука та чилійського меду Ульмо проти широкого спектра патогенів [23], зокрема *E. coli*, *P. aeruginosa* та метицилін-резистентного *S. aureus*. Дженкінс показав, що мед Манука знижує експресію універсального стресового білка UspA у MRSA, послаблюючи його захисні механізми [24]. Крім того, доведено активність меду проти резистентних ентерококів та *Helicobacter pylori* та навіть вірусів, дію яких він пригнічує [23]. Мед має здатність руйнувати біоплівки завдяки глибокій дифузії активних компонентів [25]. Хоча ключову

роль відіграє метилглюксаль, натуральний мед ефективніший за штучні аналоги, це доводить наявність інших активних речовин, окрім осмотичного тиску. Клінічні дані підтверджують перевагу меду над гідрогелевими пов'язками в ерадикації *MRSA* при лікуванні діабетичних та венозних виразок. Імуномодуюча дія меду заключається в тому, що *in vitro* він стимулює виділення прозапальних цитокінів, тоді як *in vivo* чинить виражений протизапальний ефект, зменшуючи набряк і продукцію супероксиду.

Срібні частинки (AgNPs) є дуже ефективними в лікуванні, завдяки своїм антимікробним властивостям проти широкого спектра бактерій, вірусів та грибів. На відміну від антибіотиків, які впливають на обмежену кількість збудників, AgNPs здатні вражати близько 650 видів патогенів, не стимулюючи при цьому розвиток резистентності [26]. Ключові фактори ефективності AgNPs полягають у позитивному поверхневому заряді та малому розмірі, приблизно 1–10 нм, що не лише покращує взаємодію з мембранами завдяки високому співвідношенню площі поверхні до об'єму, а й забезпечує синергію з антибіотиками, чим дозволяє знизити їхні терапевтичні дози та токсичність. Механізм антибактеріальної дії AgNPs розпочинається з реакції катіонів срібла з пептидогліканами клітинної стінки та зв'язування з мембранними білками, порушуючи проникність мембрани і призводячи до витоку клітинного вмісту [27]. Під час цього процесу блокується дихальний ланцюг та відбувається постійне вивільнення іонів срібла, що викликає окислювальний стрес. Після проникнення всередину, наночастинки взаємодіють з ДНК, ліпідами та білками, в той же час інгібують процеси транскрипції та синтезу, а додаткова генерація активних форм кисню остаточно руйнує клітинні структури, спричиняючи загибель бактерії. Однак, незважаючи на високу ефективність срібла, воно є потенційно токсичним для здорових тканин та існує ризик його накопичення в організмі [28]. Тож більш безпечною і перспективною альтернативою є наночастинки SeO_2 , що здатні

діяти вибірково, знищуючи бактерії та одночасно захищаючи здорові клітини від оксидативного стресу.

Холодна атмосферна плазма або CAP є інноваційним напрямком плазмової медицини, де використовується іонізований газ при температурі тіла для терапевтичного впливу [29]. CAP на відміну від термічної хірургічної плами діє через іонізацію газів під високою напругою, генеруючи заряджені частинки та активні форми кисню й азоту, що є основними біоефекторами. Антимікробна дія CAP зумовлена здатністю озону, оксиду азоту, перекису водню викликати летальний оксидативний стрес, руйнуючи мембрани та ДНК бактерій [29]. Метод ефективний проти біоплівки та мультирезистентних штамів, випадків розвитку стійкості до нього не зафіксовано [29]. Покращення мікроциркуляції та активація транскрипційного фактора Nrf2 сприяє загоєнню ран, що стимулює ангиогенез та проліферацію. CAP також модулює імунну відповідь і прискорює гемостаз через активацію тромбоцитів.

1.5. Доклінічні дослідження ранозагоювальних препаратів

Розробка нових методів лікування різних видів ран, зокрема з використанням наночастинок CeO_2 та пробіотичних лактобактерій, вимагає ретельної перевірки їхньої безпечності та ефективності перед впровадженням в клінічну практику. Доклінічне дослідження є критично важливим для розуміння механізмів дії нових агентів, їхньої фармакокінетики та потенційної токсичності.

Методи *in vitro* не здатні повноцінно відтворити складність ранового процесу, оскільки загоєння рани – це багатофакторний каскад реакцій, що включає гемостаз, запалення, проліферацію клітин, ангиогенез та ремоделювання матриксу. Ці процеси залежать від складної взаємодії між різними типами клітин, позаклітинним матриксом, нервовою та кровоносною

системами, а також імунною відповіддю організму, тому використання лабораторних тваринних моделей залишається єдиним варіантом у дослідженнях регенеративної медицини. Головна мета доклінічних випробувань на тваринах довести, що досліджуваний засіб не лише прискорює загоєння рани, але й ефективно знищує інфекцію, не викликаючи при цьому токсичних ефектів чи надмірної запальної реакції. Правильний вибір моделі та методів оцінки дозволяє подальше використання препарату в клінічних цілях [30].

Дослідження *in vivo* базуються на принципах 3R, тобто заміни, зменшення та удосконалення методів. Через економічність та генетичну пластичність найчастіше використовують мишей та щурів, хоча свині анатомічно ближчі до людини. Нанесення хірургічних ран на спині миші запобігає їх розчісуванню [30], а модель двох ран на одній тварині дозволяє тестувати препарат із внутрішнім контролем, нівелюючи індивідуальну варіабельність. Головною відмінністю загоєння є стягування країв у гризунів завдяки підшкірному м'язу *ranniculus carnosus*, на відміну від грануляції у людей [31]. Для імітації людської фізіології у сучасних дослідженнях використовують техніку фіксації країв. Також враховують стать, оскільки шкіра самців на 40 % міцніша, у самиць товстіший епідерміс, та цикл росту волосся, активна фаза якого прискорює регенерацію. Моделювання рекомендується проводити у фазі спокою або на безшерстих лініях [31].

Однією з найпоширеніших є модель ексцизійних ран, що передбачає хірургічне видалення всіх шарів шкіри та відтворює відкриті рани, де відсутня частина шкіри [32]. Вона дозволяє комплексно досліджувати процеси запалення, формування грануляційної тканини та ре-епітелізації шляхом вимірювання динаміки закриття рани. Натомість моделі інцизійних ран імітують звичайні хірургічні розрізи [33]. Цей метод найкраще підходить для перевірки фізичної міцності рубця, але менш ефективний для спостереження за відновленням поверхні шкіри, оскільки рана є дуже вузькою, проте такі

моделі необхідні для тестування матеріалів для швів. Також виділяють моделі опікових ран, які створюють за допомогою високої температури, прикладаючи розпечену металеву пластину [34]. Це дозволяє перевірити, як діють ліки на некротичних тканинах, що дуже важливо для розробки препаратів проти небезпечних інфекцій.

Найважливішим показником загоєння рани є зменшення її розміру, для цього використовують методи планіметрії. Вимірювання уражень відбувається за допомогою сертифікованої лінійки або лазерного випромінювача, після чого розраховується площа поверхні рани шляхом множення її найбільшої довжини на ширину [35]. Однак макроскопічна оцінка у гризунів може давати похибки через процес стягування тканин. Тому критично важливою є гістологічна оцінка із застосуванням стандартизованих бальних систем, що охоплюють усі фази регенерації [36]. Найважливішими гістологічними параметрами є товщина грануляційної тканини та точна ідентифікація новоутвореного епітелію, щоб підтвердити ре-епітелізацію, а не простого стягування країв. Окрему увагу приділяють мікробіологічному аналізу [37], адже у хронічних ранах часто накопичуються різні бактерії, які утворюють біоплівки. Ці плівки створюють захисний бар'єр, який не пропускає ліки і перешкоджає загоєнню. Тому якісний препарат повинен не просто знищувати бактерії, а й руйнувати саму біоплівку. Імунологічні дослідження допомагають зрозуміти роль імунних клітин, зокрема макрофагів [38]. Ці клітини спочатку викликають запалення, щоб очистити рану, а виконують функцію відновлення. Якщо відновлення не відбувається, рана не гоїться і запалення стає хронічним. Тому сучасні ліки розробляють так, щоб вони допомагали клітинам вчасно змінити свою функцію.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Об'єкти дослідження

Експериментальна частина роботи виконувалася на лабораторних мишах – самицях лінії BALB/c. На момент початку досліджень вік тварин становив 6–7 тижнів, а маса тіла коливалася в межах 16–18 г. Тварин утримували у віварії Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України за стандартних умов температури повітря (21–23 °C), відносної вологості (30–35 %), за умови штучного світлового режиму (12 год світла та 12 год темряви). Раціон піддослідних особин був збалансованим та складався з комбікорму марки К–12–4 за умови вільного доступу до води.

Загальна кількість залучених до дослідження мишей становила 10 особин, по 5 тварин на кожну дослідну групу. Під час даного експерименту використовувалися моделі внутрішнього контролю, де на кожній миші створювали дві симетричні ексцизійні рани, одна піддавалася терапевтичному впливу, а інша слугувала контролем без лікування. Такий підхід дозволив мінімізувати вплив індивідуальної варіабельності організмів на результати дослідження.

Робота проводилася з чітким дотриманням етичних норм та вимог Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№3447–IV від 21.02.2006 р.) [39], а також принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для наукових цілей.

Об'єктами дослідження виступали інфекційний агент у формі штаму *Staphylococcus aureus* В 918 ATCC 6538 із колекції фармакопейних штамів ІМВ НАН України, нанопрепарат нанокристалічного діоксиду церію, а також пробіотичний штам *Lactobacillus casei* ІМВ В-7280.

2.2. Моделювання інфекційної рани шкіри та схема експерименту

Для проведення досліджень тварин було розміщено в індивідуальних чистих клітках, щоб мінімізувати пошкодження рани. Оперативне втручання проведено за умов загальної анестезії, де кожну мишу витримано у герметичній камері з парами хлороформу протягом 1–2 хвилин. Ступінь знеболювання контролювалася шляхом пощипування задньої кінцівки.

Підготовка ділянки на шкірі, де проводилися маніпуляції, включала ретельну депіляцію ділянки спини між лопатками за допомогою електричної машинки для стрижки та леза бритви ростральним рухом під кутом 20 °. Після видалення шерсті, шкіру було оброблено 70 % розчином ізопропілового спирту. Моделювання ексцизійних ран було виконано механічним шляхом, а саме затиснуто шкірний покрив у зоні між лопатками вздовж серединної лінії спини та обережно відтягнуто складку від тіла тварини. Після цього мишу було покладено на бік на горизонтальну площину, вкриту чистим паперовим рушником та розташовано на ній сформовану складку шкіри. Пристрій для біопсії шкіри з діаметром 6 мм (Bard, США) було притиснуто до складки вертикальним погойдуючим рухом, що дозволяло отримати на кожній тварині по дві ідентичні симетричні рани. Для запобігання інфікуванню та механічному пошкодженню на ранові поверхні наклеєно спеціально підготовлені захисні елементи, вирізані з медичного пластиру [40].

Створення моделі інфекційного процесу відбувалося шляхом нанесення на ранову поверхню 50 мкл суспензії добової культури *Staphylococcus aureus* В 918 АТСС 6538. Перед використанням патогенний штам культивувано на МПА при 37 °С протягом 24 годин. Бактеріальну масу було змито 0,15 М розчином NaCl, відцентрифуговано (5 хв при 3500 об/хв) та доведено концентрацію клітин до стандарту каламутності 1×10^9 кл/мл [41]. Таким чином, кінцева доза інфікування становила приблизно 5×10^7 КУО на одну рану.

Експеримент передбачав використання моделі внутрішнього контролю, де ліва рана кожної миші була контрольною, а права піддавалася лікуванню досліджуваними агентами. Тварини були розподілені на 2 групи по 5 мишей в кожній:

1. Група CeO_2 : обробка правої рани лікувальною маззю «Церера» на основі наночастинок CeO_2 .
2. Група *L. casei*: нанесення штаму *Lactobacillus casei* IMB B-7280 у концентрації 10^9 КУО/мл, культивованого на середовищі MRS із 0,5 % вмістом триптофану.

Протягом 10–14 днів здійснювали клінічне обстеження тварин та моніторинг динаміки регенерації шляхом цифрової планіметрії.

2.3. Гістологічний аналіз тканин

Для детального вивчення структурних змін у тканинах шкіри та визначення регенеративного потенціалу наночастинок CeO_2 і пробіотичних штамів лактобактерій було проведено гістологічне дослідження. Для гістологічного та мікробіологічного досліджень забір матеріалу здійснювали шляхом евтаназії частини тварин під повною анестезією хлороформом у контрольні терміни, а саме на 3-тю, 4-ту, 7-му та 10-ту добу. Для моніторингу загальної динаміки загоєння ран іншу частину тварин залишали в експерименті та спостерігали протягом 10–14 днів.

Для аналізу скальпелем (Medicare, Україна) вирізано ділянки шкіри, що включали безпосередньо зону рани та неушкоджені тканини, що оточували її. Згідно з моделлю внутрішнього контролю, з кожної миші зібрано два зразки, а саме з рани, що піддавалася лікуванню препаратом CeO_2 або суспензією штаму *L. casei* IMB B-7280 та контрольної рани, інфікованої *S. aureus* без подальшої обробки. Отримані фрагменти тканин фіксовано у 10 %

нейтральному забуференому формаліні, що готувався шляхом розведення концентрованого формальдегіду у фосфатному буферному розчині. Фіксація тривала протягом 24–48 год при температурі 20 °C із забезпеченням повного занурення зразків у розчин. Далі зразки промито дистильованою водою для видалення залишків формаліну. Тканини зневоднено у послідовності спиртів: 70 %, 80 %, 90 %, 100 % етанол (експозиція кожного ступеня тривала близько 1 год). Наступним кроком тканини витримано у ксилолі для надання їм прозорості, після чого залито розплавленим парафіном при температурі близько 60 °C для формування парафінових блоків [42].

Парафінові блоки охолоджено до твердого стану. Використано мікромом, зрізи товщиною 4–6 мкм виготовлялися з кожного зразка та переносилися на предметні скельця, попередньо оброблені полі-L-лізином для кращої фіксації тканини. Зрізи було занурено у ксилол для депарафінізації (двічі по 5 хв), потім піддано зразки регідратації через низку спиртів назад до води (100 %, 90 %, 70 %, дистильована вода) та пофарбовано гематоксиліном та еозином для оглядового вивчення загальної морфологічної картини. Для покращення візуалізації структур використано 0,1 % розчин амонію.

Мікроскопічне дослідження готових препаратів проведено за допомогою світлового мікроскопа при збільшенні у 40 та 100 разів. Оцінювали ступінь епітелізації, формування грануляційної тканини, щільність колагенових волокон та вираженість лейкоцитарної інфільтрації в дослідних групах порівняно з інтактним та інфікованим контролем. Напівкількісну оцінку патологоанатомічних змін у тканинах, а саме вираженість некрозу, інтенсивність запальної інфільтрації та наявність крововиливів, проводили за стандартною 4-бальною шкалою, де: 0 балів – відсутність патологічних змін; 1 бал – слабо виражені зміни; 2 бали – помірно виражені зміни; 3 бали – сильно виражені патологічні зміни з глибоким некрозом тканин.

2.4. Дослідження мікробіоти ранової поверхні

Мікробіологічний аналіз ранового вмісту проведено для об'єктивної оцінки антимікробної активності наночастинок CeO_2 та вивчення здатності пробіотичних штамів до колонізації зони ушкодження. Забір біологічного матеріалу здійснено дотриманням правил асептики та антисептики на 7-му добу лікування.

Методика взяття матеріалу передбачала попередню обробку неушкодженої шкіри навколо рани. Згідно з протоколом, за 48–72 години до забору мазка було припинено місцеве нанесення препаратів. Зразок із поверхні рани зібрано стерильним ватним тампоном, попередньо змоченим у 0,15 М розчині NaCl зигзагоподібними рухами. Після забору тампон вміщувано у пробірку з 1 мл стерильного ізотонічного розчину. Отримані суспензії зберігалися при температурі 4 °C не більше 2 годин до моменту висіву [43].

Щоб визначити кількість та вид бактерій, зразки послідовно розводилися, після чого 100 мкл отриманої суміші було висіяно на тверді поживні середовища. Визначення кількісних показників *S. aureus* B 918 ATCC 6538 здійснено на поверхні поживного середовища BAIRD–PARKER–Agar («Merck», Germany). тоді як для моніторингу присутності пробіотичного штаму *L. casei* IMB B-7280 було використано середовище MRS. З метою інтенсифікації росту лактобактерій та активізації їхнього метаболізму до складу середовища MRS у відповідних серіях досліду додано 0,5 % триптофану.

Посіви було інкубовано у термостаті при температурі 37 °C протягом 24 – 48 годин. Після завершення терміну культивування проведено візуальний огляд чашок Петрі та підрахунок колоній. Результати оцінено за кількістю колонієутворювальних одиниць (КУО) у перерахунку на 1 мл вихідної суспензії, що дозволяло визначити ступінь мікробного навантаження

на рану та ефективність знищення патогена під впливом досліджуваних засобів терапії [44].

2.5. Статистичне оброблення результатів

Аналіз та систематизацію кількісних показників, отриманих під час експериментальних досліджень, проводили з використанням методів варіаційної статистики. Математичну обробку даних здійснювали за допомогою спеціалізованого програмного забезпечення Epi Info (версія 8.0), а також пакету прикладних програм Microsoft Excel (версії 2007 та 2010).

Одержані цифрові результати представляли у формі середнього арифметичного значення (M) та стандартної похибки середнього (m).

Для оцінки вірогідності розбіжностей між дослідними групами використовували непараметричні методи статистичного аналізу. Зокрема, для порівняння незалежних вибірок застосовували U-критерій Манна-Уїтні, а для оцінки розбіжностей між контрольними та дослідними ранами на одній тварині критерій Вілкоксона. Статистично значущими вважали результати при рівні ймовірності помилки менше 5 % ($p \leq 0,05$).

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Загально-клінічне обстеження тварин

Окрім планіметричного дослідження ран шкіри мишей не менш важливим є загально-клінічне дослідження. Оскільки від того, як затягується рана, напряду залежить те, на скільки активна тварина, чи має апетит і чи немає ознак загального отруєння організму. Протягом 8 днів експерименту відбувалася перевірка поведінкової активності, догляду за шерстю, харчової поведінки, а також реакції на дотики чи звук.

На 1-шу добу після моделювання інфікованих *Staphylococcus aureus* ексцизійних ран діаметром 6 мм, у тварин усіх експериментальних груп спостерігалася типова реакція на хірургічне втручання та введення патогену. Тварини проявляли знижену рухову активність, тривалий час перебували в стані спокою, а їхній догляд за волосяним покривом був мінімальним. Імовірно така пригніченість тварин була наслідком залишкового ефекту загальної анестезії та розвитку початкової стадії запальної відповіді. При візуальному огляді було виявлено наявність невеликої кількості серозного ексудату. Однак, при загальній слабкості у мишей не було погіршення апетиту та відмови від води, що свідчить про збереження життєвих функцій організму та відсутність гострого шокowego стану.

На 2-гу добу експерименту стан мишей почав нормалізовуватися. Тварини, рани яких оброблялися наночастинками CeO_2 та штамом *L. casei* ІМВ В-7280, були більш допитливими та активніше пересувалися кліткою порівняно з першою добою. Хоча в цей період в ранах був наявний гнійний ексудат та набряк, що є характерним для стафілококової інфекції, загальна поведінка мишей свідчила про адаптацію організму. Бажання пити та апетит

залишалися стабільними, що є важливим показником відсутності розповсюдження інфекції на весь організм.

Значні позитивні результати були зафіксовані на 3-тю добу спостереження. В групі CeO_2 відбувся активний процес епітелізації та візуальне зменшення розміру рани. У серії з *L. casei* помічено очищення ранової поверхні. Важливо зазначити, що для стандартизації умов нанесення досліджуваних засобів та проведення подальшого точного планіметричного аналізу в обох дослідних групах використовувалися спеціальні маркувальні еталони, що дозволяють чітко локалізувати дію лактобактерій в зоні інфікування. Тварини добре переносили наявність маркерів, не намагалися їх зняти, що дозволило зберегти цілісність експериментальної моделі. Наявність пробіотичного штаму сприяла формуванню захисної біоплівки, яка механічно та біохімічно перешкоджала розмноженню патогенів.

На 4-ту добу експерименту загальний фізичний стан мишей в обох дослідних групах суттєво покращився. Тварини активно реагували на появу персоналу, виявляли звичні поведінкові реакції та активно доглядали за шерстю. Тканини навколо ран мишей, оброблених наночастинками CeO_2 в правій ділянці спини, були м'якими, помірно зволженими та без ознак грубого рубцювання. У групі з *L. casei* спостерігалось активне формування грануляційної тканини.

Протягом 5–7 діб спостереження було помічено активне загоєння. У дослідних ранах відбувалося інтенсивне зближення країв. На відміну від контрольних ран на тих самих тваринах, які часто залишалися вологими з ознаками залишкової інфекції, ранові поверхні під дією CeO_2 та *L. casei* швидше вкривалися тонким здоровим епітелієм.

На 8-му добу загальний фізичний стан тварин в усіх групах був стабільним. Миші мали гарний апетит, шерсть була чистою та щільною, що підтверджувало відсутність токсичного впливу досліджуваних препаратів. Екцизійні інфіковані рани, оброблені CeO_2 , вже були без видимих ознак

запалення та набряків. В групі з *L. casei* рани так само мали здоровий вигляд і були майже повністю епітелізовані.

3.2. Порівняльна характеристика ефективності наночастинок CeO_2 та пробіотичних лактобактерій у динаміці загоєння ран шкіри

Для об'єктивної оцінки ефективності лікування було проведено планіметричний аналіз, де проводилося вимірювання діаметра ран. Оскільки експеримент передбачав використання моделі внутрішнього контролю, порівняння проводилося між контрольною (лівою) та дослідною (правою) ранами на кожній тварині.

Результати динаміки загоєння наведено в таблиці 3.1.

Таблиця 3.1

Динаміка зміни діаметра інфікованих ран шкіри мишей, мм
($M \pm m$, $n=5$)

Група досліду	1 доба	2 доба	3 доба	4 доба	8 доба
Контрольна рана (група CeO_2)	$6,0 \pm 0,1$	$6,0 \pm 0,2$	$5,0 \pm 0,3$	$4,0 \pm 0,2$	$2,0 \pm 0,3$
Дослідна рана (група CeO_2)	$6,0 \pm 0,1$	$5,0 \pm 0,2^*$	$4,0 \pm 0,1^*$	$3,0 \pm 0,2^*$	$1,0 \pm 0,1^*$
Контрольна рана (<i>L. casei</i>)	$6,0 \pm 0,1$	$6,0 \pm 0,1$	$5,1 \pm 0,2$	$4,1 \pm 0,3$	$2,2 \pm 0,2$
Дослідна рана (<i>L. casei</i>)	$6,0 \pm 0,1$	$5,6 \pm 0,2$	$4,4 \pm 0,2^*$	$3,3 \pm 0,1^*$	$1,2 \pm 0,1^*$

* – $p \leq 0,05$ порівняно з відповідною контрольною раною на тій самій тварині

У контрольних ранах з лівої сторони протягом перших двох діб діаметр залишався стабільним на рівні 6,0 мм. Це свідчить про активну фазу запалення, спричинену інфікуванням *S. aureus*, та виражений набряк тканин, який заважає процесу епітелізації. Поступове зменшення розмірів у контролі розпочалося лише з 3-ї доби, досягнувши значень 2,0–2,2 мм наприкінці спостереження.

У групі мишей, де рани обробляли CeO_2 було зафіксовано найшвидший лікувальний результат. Вже на 2-гу добу діаметр рани достовірно зменшився до $5,0 \pm 0,2$ мм ($p \leq 0,05$). Такий ефект пов'язаний з антиоксидантними властивостями наночастинок CeO_2 , які здатні швидко нейтралізувати активні форми кисню в зоні запалення, прискорюючи перехід до фази проліферації.

Динаміка загоєння в групі мишей, де рани обробляли *L. casei* мала свої особливості. На 2-гу добу спостерігалось лише незначне зменшення діаметра до $5,6 \pm 0,2$ мм, що пояснюється періодом адаптації та колонізації пробіотичних бактерій на рановій поверхні. Однак починаючи з 3-ї доби, швидкість регенерації значно зросла, діаметр рани зменшився до $4,4 \pm 0,2$ мм ($p < 0,05$), що майже відповідало показникам групи з CeO_2 . Це підтверджує антимікробний потенціал лактобактерій, які за рахунок синтезу бактеріоцинів та органічних кислот успішно пригнічують ріст золотистого стафілокока.

На 8-му добу в обох групах було досягнуто високих результатів. Діаметри ран становили 1,0 мм для CeO_2 та 1,2 мм для *L. casei*. Це свідчить про те, що обидва досліджувані засоби забезпечують майже повне загоєння ран в термін, що вдвічі менший за природний перебіг процесу.

Обидва біотехнологічні препарати продемонстрували високу ефективність у лікуванні інфікованих ран. Наночастинки CeO_2 виявилися більш ефективними на ранніх етапах, вони сприяли зниженню гострого запалення, тоді як пробіотичний штам *L. casei* забезпечив стабільну динаміку загоєння на етапах активного відновлення епітелію.

Візуальна картина перебігу ранового процесу, яка підтверджує наведені вище планіметричні дані, представлена на рисунку 3.1.



Рис. 3.1. Динаміка регенерації інфікованих ран шкіри за умов застосування наночастинок CeO_2 та пробіотичного штаму *L. casei* IMB B-7280

Для представлення швидкості регенераційних процесів та порівняння ефективності застосованих засобів, отримані дані щодо динаміки загоєння ран відображені на рисунку 3.2.

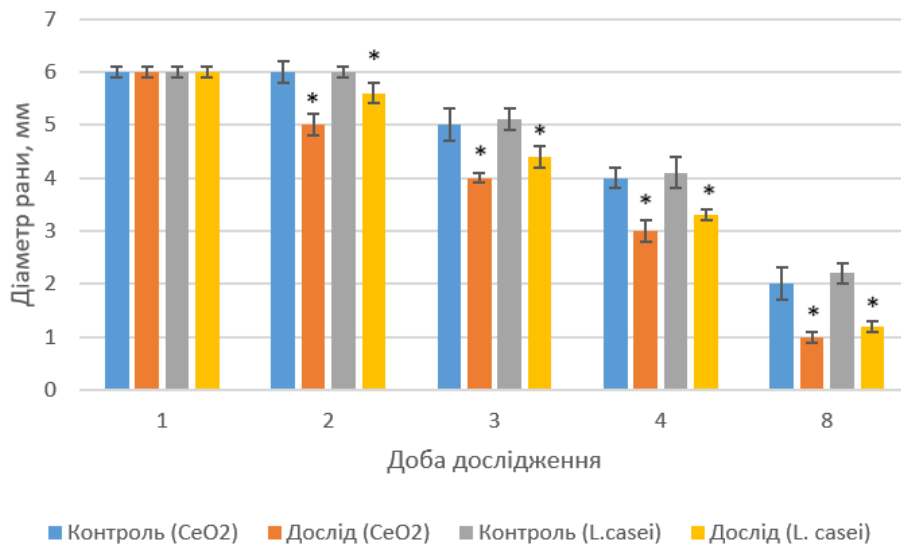


Рис. 3.2. Динаміка зменшення діаметра інфікованих ран шкіри мишей під впливом наночастинок CeO_2 та пробіотичного штаму *L. casei* IMB B-7280

* – $p \leq 0,05$ порівняно з відповідною контрольною раною

Проведене планіметричне дослідження підтвердило високу регенераторну активність обох досліджуваних препаратів за умов експериментального інфікування ран стафілококом. Застосування наночастинок CeO_2 призвело до зменшення діаметра ран уже на другу добу експерименту, що може бути зумовлено їхніми вираженими

антиоксидантними властивостями та здатністю пригнічувати гостре запалення на початкових етапах. Водночас пробіотичний штам *L. casei* IMB B-7280 найбільше вплинув на динаміку загоєння, починаючи з третьої доби дослідження, що вказує на успішну колонізацію поверхні рани лактобактеріями та їхню здатність до тривалого пригнічення патогенної мікрофлори.

До восьмої доби спостереження в обох дослідних групах було зафіксовано практично повне закриття дефектів порівняно з контрольними групами, що підтверджує перспективність використання наноматеріалів та пробіотиків як ефективних самостійних засобів для терапії інфікованих ушкоджень шкіри.

3.3. Гістологічні особливості тканин шкіри за умов застосування наночастинок CeO_2 та пробіотичних лактобактерій

Відбір зразків для гістологічного аналізу було здійснено в різні терміни, орієнтуючись на ключові стадії перебігу ранового процесу. Щоб оцінити ефективність наночастинок CeO_2 на етапі гострого запалення, тканини досліджували на 4-ту добу експерименту, в той же час вплив пробіотика *L. casei* вивчали в динаміці на 3-тю, 7-му та 10-ту добу. Це дозволило оцінити весь процес, а саме від початкової бактеріальної колонізації рани до етапу активної регенерації. Щоб оцінити глибину некрозу, наявність крововиливів та інтенсивність запальної інфільтрації у конкретні показники, було застосовано стандартну напівкількісну 4-бальну шкалу з оцінками від 0 до 3.

Під час вивчення мікропрепаратів шкіри від тварин контрольної групи на 4-ту добу експерименту було виявлено ознаки типової гострої виразки з глибоким руйнуванням тканин (рис. 3.3 А). В зоні ураження визначено куполоподібне утворення, розміри якого складали приблизно $0,7 \times 0,3 \times 0,1$ см,

це є прямим підтвердженням активного перебігу некрозу. На цих ділянках був повністю відсутній епідермальний шар. Поверхня виразки була вистелена фібриновими масами, просоченими великою кількістю нейтрофілів, серед яких чітко візуалізувалися колонії бактерій. Наявність щільного дифузного лімфогістоплазмоцитарного інфільтрату свідчить про те, що на ділянці дерми навколо рани було інтенсивне запалення. В той же час відбувалася проліферація фібробластів, це означає, що організм уже розпочав власні ендогенні процеси регенерації у відповідь на інфекційне пошкодження. Отже, ступінь патологоанатомічних змін у контролі був оцінений найвищим показником у 3 бали через сильно виражені зміни.

На 4-ту добу мікроскопічне дослідження все ще фіксувало ознаки гострої виразки та напруженої імунної реакції в ранах, що оброблялися наночастинками CeO_2 . Але на відміну від контролю, в даному зразку було видно покращення (рис. 3.3 Б). Зокрема, як макро-, так і мікроскопічно розміри некротичної ділянки зменшилися до $0,4 \times 0,4 \times 0,1$ см. Загальний рівень запалення був нижчим, однак в зонах з відсутнім епідермальним шаром зберігалися фібринові плівки з домішками нейтрофілів та скупченнями бактерій. У дермальному шарі за наявної лімфогістоплазмоцитарної інфільтрації тривало відкладення фібрину та підтримувалася активна проліферація фібробластів. Через помірні зміни, загальну інтенсивність патологічних відхилень у цій групі знижено до 2 балів.

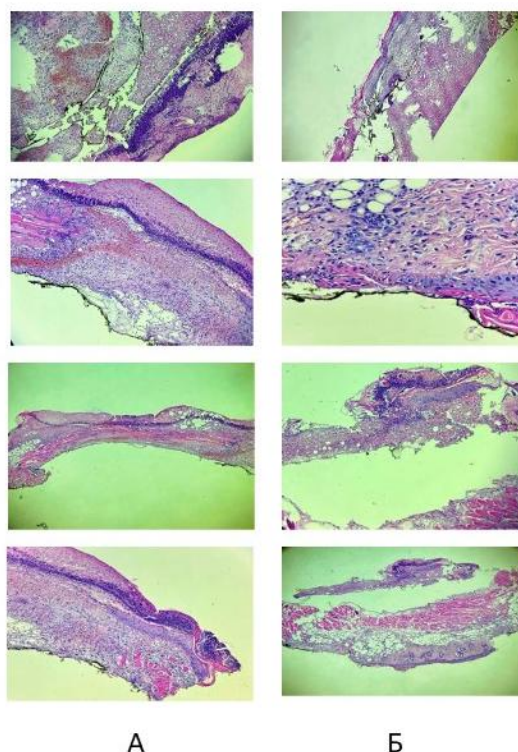


Рис. 3.3. Мікрофотографії зрізу шкіри мишей на 4-ту добу експерименту. Стан тканин навколо необроблених інфекційних ран (А) та ран, оброблених наночастинками CeO_2 (Б) (забарвлення гематоксиліном; збільшення $\times 40$)

Гістологічний аналіз тканин після застосування пробіотика *L. casei* проводили на 3-тю, 7-му та 10-ту добу після початку експерименту. На 3-тю добу мікроскопічна картина контролю демонструвала високі патологічні зміни в товщі дерми. Спостерігалися виражені ділянки некрозу, численні крововиливи та масивна інфільтрація лімфоцитами, макрофагами й нейтрофілами. В той же час поверхневий епідермальний шар залишався цілим, а будь-які ознаки алергічної реакції були відсутні. Вираженість цих патологічних порушень відповідала 2 балам (рис. 3.4 А).

У дослідній групі з *L. casei* на ту ж 3-тю добу ситуація виглядала значно краще. Хоча в дермі все ще фіксувалися осередки з високою концентрацією макрофагів, лімфоцитів та нейтрофілів, судинна реакція була в нормі, оскільки крововиливів виявлено не було. Структура епідермісу також не порушена.

Крім того, площі некротизованих тканин візуально були значно меншими порівняно з контролем. Загальна оцінка уражень також склала 2 бали, оскільки сам характер запалення вказував на суттєве гальмування деструктивних процесів (рис. 3.4 Б).

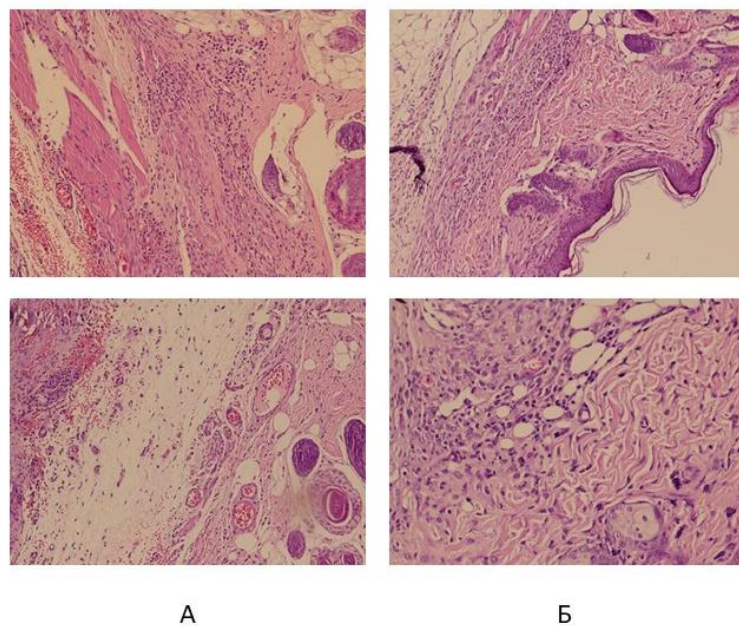


Рис. 3.4. Мікрофотографії зрізу шкіри мишей на 3-тю добу експерименту. Гістологічна будова тканин у контрольній (А) та дослідній (Б, після обробки *L. casei*) групах (забарвлення гематоксиліном та еозином; збільшення $\times 200$ та $\times 400$)

На 7-му добу в контрольній групі ознаки гострої фази значно зменшилися, оскільки крововиливи зникли, а епідерміс зберігав свою будову. У дермальному шарі все ще залишалися локуси некрозу, щільно заповнені макрофагами та лімфоцитами, то ж оцінка змін сягає 1-2 бали. (рис. 3.5 А).

На 7-му добу у тварин з обробленими ранами *L. casei* крововиливів не помічено, епідерміс залишався цілим. У дермі локалізувалися лише залишкові зони некрозу зі скупченнями нейтрофілів, макрофагів і лімфоцитів, тому

відповідно ступінь змін 2 бали (рис. 3.5 Б). Наявність такої кількості клітинного інфільтрату на пізніх етапах свідчить про контрольовану, довгу імунну відповідь. Вона необхідна організму для остаточного знищення стафілокока та активного фагоцитозу, що є обов'язковим процесом для побудови повноцінної грануляційної тканини.

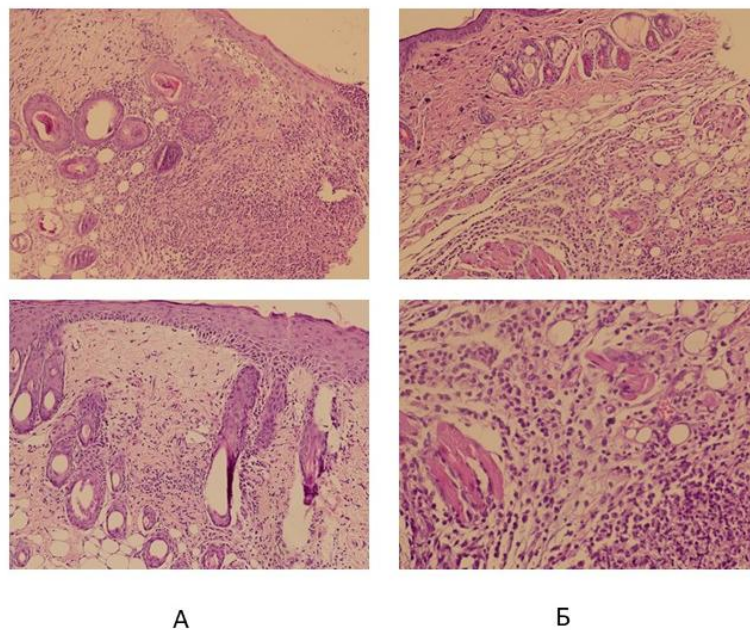


Рис. 3.5. Мікрофотографії зрізу шкіри мишей на 7-му добу експерименту. Гістологічна будова тканин у контрольній (А) та дослідній (Б, після обробки *L. casei*) групах (забарвлення гематоксиліном та еозином; збільшення $\times 200$ та $\times 400$)

На 10-ту добу експерименту морфологічні особливості тканин продемонстрували позитивну динаміку регенерації, особливо у дослідній групі. У контрольній групі структура органу в цілому була збережена, без масивних ділянок некрозу епідермісу та дерми. Однак, при більшому збільшенні все ще виявлено поодинокі ділянки некрозу та значне скупчення лімфоцитів, макрофагів і нейтрофілів у тканинах дерми, що свідчить про незавершений запальний процес. Ступінь патологічних змін у контролі

становив 2 бали (рис. 3.6 А). Натомість, у тварин, рани яких обробляли штамом *L. casei*, на 10-ту добу спостерігалось більш виражене та глибоке відновлення тканин. У дермі виявлялися лише поодинокі лімфоцити та макрофаги, без еозинофілів та гетерофілів, а також відмічалися лише незначні ділянки некрозу та дрібні точкові крововиливи у глибинних шарах. Загальний ступінь патологічних уражень у цій групі достовірно знизився до 1 балу (рис. 3.6 Б). Отримані дані підтверджують позитивний вплив пробіотичних штамів молочнокислих бактерій на відновлення структури шкіри після запального процесу та свідчать про їхню високу антагоністичну активність щодо вторинної бактеріальної інфекції.

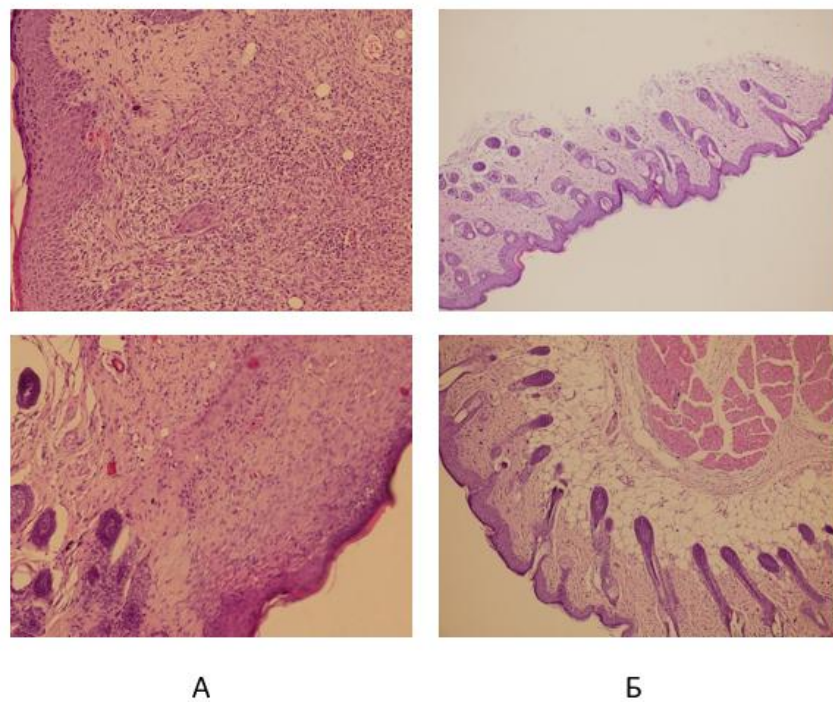


Рис. 3.6. Мікрофотографії зрізу шкіри мишей на 10-ту добу експерименту. Гістологічна будова тканин у контрольній (А) та дослідній (Б, після обробки *L. casei*) групах (забарвлення гематоксиліном та еозином; збільшення $\times 100$ та $\times 200$)

3.4. Антимікробна активність досліджуваних засобів щодо збудників ранової інфекції

Антимікробна ефективність досліджуваних препаратів *in vivo* оцінювалася шляхом висіву гомогенатів тканин з інфікованих ран на щільні поживні середовища. Оскільки механізми дії наночастинок CeO_2 та пробіотичних лактобактерій суттєво відрізняються, мікробіологічне дослідження було адаптоване під специфіку кожного агента.

Під час оцінки бактерицидної дії наночастинок CeO_2 , головним критерієм ефективності була елімінація цільового патогена. Для ізоляції та кількісного підрахунку колонієутворюючих одиниць золотистого стафілокока використовували високоселективне середовище BAIRD-PARKER-Agar.

Дослідження впливу наночастинок CeO_2 на мікробіоценоз інфікованих ран було проведено на 4-ту добу експерименту. Під час висіву гомогенатів тканин на селективне середовище Baird-Parker Agar був помічений ріст колоній, що є типовими для *S. aureus*. Вони мали округлу форму, гладку поверхню, характерний золотисто-жовтий колір та діаметр 2–4 мм. Кількісний аналіз підтвердив виражену антимікробну дію досліджуваного препарату. Встановлено, що мікробне навантаження в ранах тварин контрольної групи становило $2,8 \times 10^3$ КУО/мл. В той же час, із ран, які оброблялися наночастинами CeO_2 , стафілокок висівався у меншій кількості $1,0 \times 10^2$ КУО/мл ($p < 0,001$) (рис. 3.7).

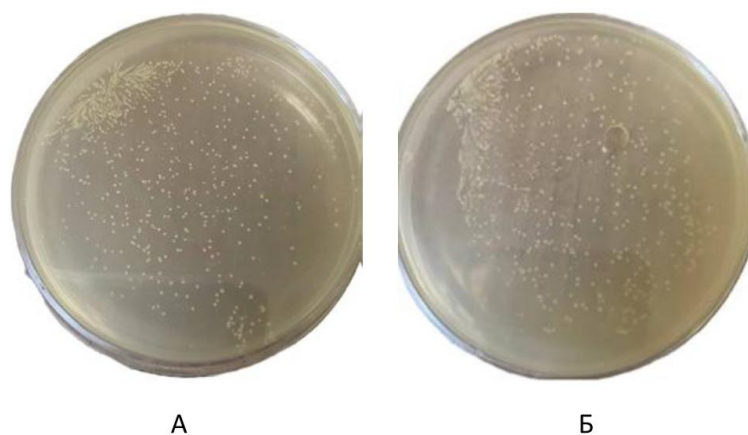


Рис.3.7. Фотографії чашок Петрі з колоніями *S. aureus*, який висівали з необроблених (А) та оброблених наночастинками CeO_2 (Б) інфекційних ран шкіри мишей на селективному середовищі Baird-Parker Agar на 4-ту добу

Отримані мікробіологічні показники візуально підтверджуються різницею у кількості вирощених колоній на чашках Петрі (рис. 3.8).

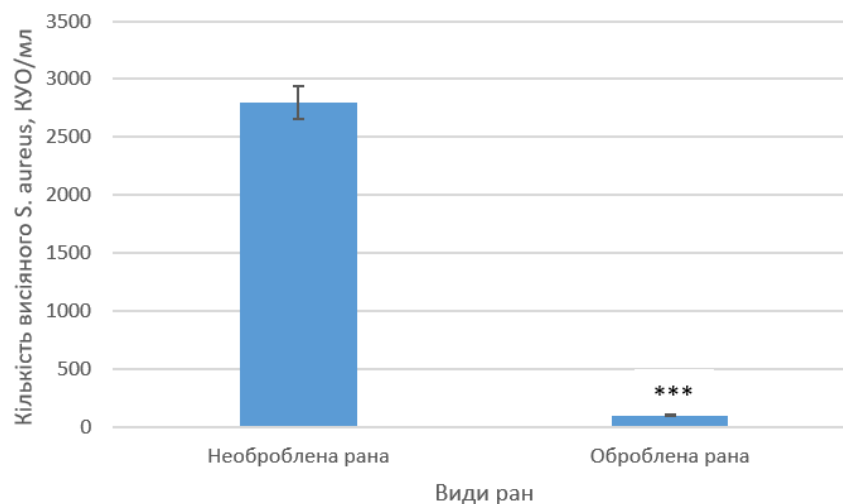


Рис. 3.8. Кількість *S. aureus*, який висівався з необроблених та оброблених інфекційних ран наночастинками CeO_2

* – $p \leq 0,001$ в порівнянні з необробленою раною

Для аналізу результатів зміни мікрофлори ран під дією лактобактерій *L. casei*, об'єднано дані висівів за 3-тю, 7-му та 10-ту добу. Усі кількісні показники в КУО/мл наведено у табл. 3.2.

Таблиця 3.2

**Загальна кількість бактерій, зокрема, *S. aureus* в інфікованих ранах шкіри мишей за умов застосування пробіотика *L. casei*, КУО/мл
($M \pm m$, $n=5$)**

Поживне середовище	3 день		7 день		10 день	
	Не оброблено	Оброблено на <i>L. casei</i>	Не оброблено	Оброблено на <i>L. casei</i>	Не оброблено	Оброблено на <i>L. casei</i>
CHROM	1400 $\pm$ 112	1000 $\pm$ 80*	850 $\pm$ 68	450 $\pm$ 36*	330 $\pm$ 26	320 $\pm$ 26
МПА	3500 $\pm$ 280	600 $\pm$ 48*	780 $\pm$ 62	260 $\pm$ 21*	150 $\pm$ 12	180 $\pm$ 14
MSA	400 $\pm$ 32	150 $\pm$ 12*	590 $\pm$ 47	320 $\pm$ 26*	240 $\pm$ 19	250 $\pm$ 20

* $p \leq 0,05$ в порівнянні з відповідною контрольною раною на тій самій тварині

За результатами висівів підтверджено, що *L. casei* дійсно має виражену антимікробну дію. Вже на 3-тю добу загальна кількість бактерій, а саме на середовищі МПА, у дослідній групі стала майже в 6 разів меншою, ніж у контролі, і впала до 600 КУО/мл. Схожа ситуація була і з золотистим стафілококом, де на середовищах CHROM та MSA його колоній виростало значно менше порівняно з контрольною групою.

На 7-му добу рани продовжували активно очищуватися. Загальне мікробне навантаження зменшилося до 260 КУО/мл. Оскільки лактобактерії витісняли патогенні мікроорганізми, кількість стафілокока в ранах тварин, що оброблялися пробіотиком, знизилася майже вдвічі порівняно з необробленими ранами.

До 10-ї доби показники в обох групах майже зрівнялися і впали до мінімуму. Загальна кількість бактерій зупинилася на рівні 150–180 КУО/мл, а стафілокока приблизно 320–330 КУО/мл. Це може свідчити про те, що гострої інфекції вже немає, і нормальна мікрофлора шкіри повністю відновилася.

Слід зазначити, що якісний аналіз висівів на середовище MRS підтвердив успішну колонізацію рани пробіотичним штамом *L. casei* протягом усього терміну спостереження. Візуальна динаміка мікробіологічних показників на всіх середовищах представлена на рисунку 3.9.

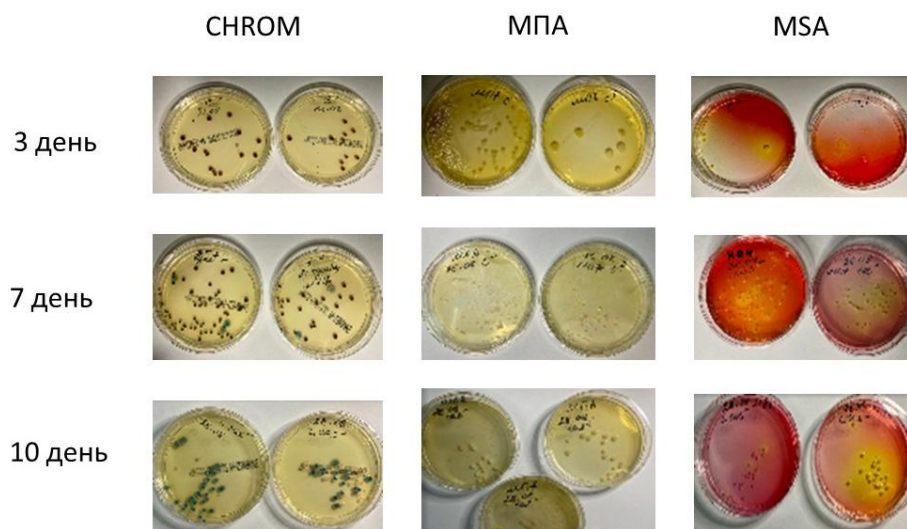


Рис. 3.9. Фотографії чашок Петрі з колоніями бактерій, які висівали з необроблених (А) та оброблених пробіотичним штамом *L. casei* (Б) інфекційних ран шкіри мишей на різних поживних середовищах на 3-тю, 7-му та 10-ту добу

Отже, спираючись на отримані дані, можна зазначити, що і наночастинки CeO_2 , і штам *L. casei* мають високу активність проти стафілокока. Діоксид церію працює як швидкий бактерицидний засіб, потужно знижуючи кількість мікроорганізмів у перші дні запалення. А застосування лактобактерій забезпечує поступове і тривале очищення рани, повністю відновлюючи здорову мікрофлору до 10-ї доби. Обидва препарати ефективно пригнічують інфекцію та допомагають тканинам швидше регенерувати.

3.5. Обговорення результатів

Результати проведених нами досліджень показали, що наночастинки CeO_2 та пробіотичні бактерії штаму *L. casei* загалом мали виражену лікувальну дію та сприяли прискореному загоєнню ран, інфікованих *S. aureus*. Про це переконливо свідчило зменшення їх розмірів та активація процесів епітелізації. У випадку лікування наночастинками CeO_2 було виявлено найшвидший лікувальний результат. Вже на 2-гу добу експерименту спостерігалось достовірне зменшення діаметра інфікованих ран до 5,0 мм порівняно з контролем. У наступний період спостереження відбувалась активна регенерація тканин та швидке зникнення ознак гострого запалення. Динаміка загоєння під впливом *L. casei* мала незначний період адаптації на початку, однак починаючи з 3-ї доби швидкість регенерації значно зросла. На 8-му добу експерименту розмір ран, оброблених CeO_2 , зменшувався до 1,0 мм, а оброблених *L. casei* – до 1,2 мм проти 2,0–2,2 мм у контролі. Це підтверджує, що обидва засоби забезпечують майже повне загоєння в термін, що вдвічі менший за природний. Результати гістологічного дослідження біоптатів шкіри показали, що під впливом наночастинок CeO_2 інтенсивність запалення та площа некротизованих тканин суттєво зменшувались вже на 4-ту добу. Застосування пробіотики *L. casei* також сприяло зупинці руйнування тканин,

де на 3-тю добу була збережена структура епідермісу та були відсутні крововиливи. На 7-му добу в цій групі спостерігалася контрольована імунна відповідь, яка є необхідною для остаточного знищення стафілокока та формування грануляційної тканини. Встановлено, що лікувальна дія обох досліджуваних препаратів за інфекційних ран безпосередньо пов'язана з їх високою антимікробною активністю. Із рани, обробленої CeO_2 , стафілокок висівався у значно меншій кількості вже на 4-ту добу експерименту. Це зумовлено ефективними антиоксидантними властивостями діоксиду церію, які сприяють зниженню гострого запалення. У випадку застосування *L. casei* відбувалося конкурентне витіснення патогенних мікроорганізмів. Кількість стафілокока та загальне бактеріальне навантаження різко знижувались починаючи з 3-ї доби, а до 10-ї доби гостра інфекція повністю зникла і нормальна мікрофлора шкіри відновлювалася. Таким чином, отримані нами результати показали, що наночастинки CeO_2 діють як швидкий бактерицидний засіб на етапі гострого запалення, тоді як застосування лактобактерій *L. casei* створює пролонгований ефект, забезпечуючи тривале очищення рани. Обидва ці методи є високоефективними альтернативами антибіотикам, що допомагають тканинам швидше відновлюватися.

ВИСНОВКИ

Обидва досліджувані засоби, а саме наночастинки CeO_2 та пробіотичний штам *Lactobacillus casei*, виявили виражену лікувальну дію та сприяли прискореному загоєнню інфікованих ран шкіри у мишей. Це підтверджувалося швидким зменшенням їх розмірів, активним відновленням гістологічної структури тканин та ефективним знищенням *Staphylococcus aureus* без розвитку системних ускладнень.

1. Успішно змодельовано процес інфікованої рани шкіри у мишей шляхом створення ексцизійних ран з подальшим їх інфікуванням патогенним штамом *Staphylococcus aureus*. Застосування моделі внутрішнього контролю дозволило об'єктивно та точно дослідити процеси загоєння ран, мінімізувавши вплив індивідуальних особливостей організму тварин на результати експерименту.
2. Встановлено, що під впливом наночастинок CeO_2 та пробіотика *L. casei* значно прискорювалося зменшення розмірів ран порівняно з контролем. На 8-му добу їхній діаметр зменшувався до 1,0 та 1,2 мм проти 2,0 – 2,2 мм у контролі. Гістологічний аналіз підтвердив, що обидва препарати ефективно зупиняють некротичні процеси, сприяють збереженню епідермісу та прискорюють формування грануляційної тканини.
3. Обидва препарати продемонстрували високу антимікробну активність щодо збудника ранової інфекції *S. aureus*. Наночастинки CeO_2 діяли як потужний бактерицидний засіб, швидко і достовірно знижуючи мікробне навантаження в рані вже на 4-ту добу. Натомість лактобактерії забезпечували конкурентне витіснення патогену, що призводило до поступового і повного відновлення мікробіологічного балансу шкіри до 10-ї доби.

4. Застосування наночастинок CeO_2 та лактобактерій сприяло формуванню контрольованої імунної відповіді в зоні ураження. Гістологічно підтверджено наявність необхідної кількості імунних клітин, а саме макрофагів та лімфоцитів, необхідної для ефективного фагоцитозу та очищення рани, без ознак надмірного або неконтрольованого запалення, яке спостерігалось в контрольних групах.
5. Порівняльний аналіз показав, що кожен із методів має свої переконливі переваги: нанотехнологічний підхід з використанням CeO_2 забезпечує миттєвий бактерицидний та протизапальний ефект на найгостріших стадіях пошкодження, тоді як біотехнологічний метод з використанням пробіотики *L. casei* забезпечує тривале очищення рани та захищає тканини від повторного розвитку інфекції. Обидва засоби є безпечними та високоефективними альтернативами традиційним антибіотикам у терапії інфікованих ран.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Sharma, D., Misba, L. and Khan, A.U. (2019). Antibiotics versus biofilm: an emerging battleground in microbial communities. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, [online] Volume 8, p. 76. Available at: <https://link.springer.com/article/10.1186/s13756-019-0533-3> [Accessed 16 May 2019].
2. Lord, M., Berret, J.-F., Singh, S., Vinu, A. and Karatoki, A. (2021). Redox-Active Cerium Oxide Nanoparticles: Current Status and Burning Issues. *Small*, [online] Volume 17(35), p. 2102342. Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/sml.202102342> [Accessed 6 Aug. 2021].
3. Alpha Cell (2022). *Шкіра: що про неї треба знати?* [online] Available at: <https://alphacellclinic.com/blog/dermatologiya/shkira-shho-pro-neyi-treba-znaty/> [Accessed 20 Jun. 2022].
4. Rodrigues, M., Kosaric, N., Bonham, C.A. and Gurtner, G.C. (2018). Wound Healing: A Cellular Perspective. *Physiological Reviews*, [online] Volume 99(1), pp. 665–706. Available at: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6442927/> [Accessed 21 Nov. 2018].
5. Jin, C., Jin, Y., Ding, Z., Nuch, K.S., Han, M., Shim, J., Chien, P.N. and Heo, C.Y. (2025). Cellular and Molecular Mechanisms of Wound Repair: From Biology to Therapeutic Innovation. *Cells*, [online] Volume 14(23), p. 1850. Available at: <https://www.mdpi.com/2073-4409/14/23/1850> [Accessed 24 Nov. 2025].
6. Wallace, H.A., Basehore, B.M. and Zito, P.M. (2023). Wound Healing Phases. *StatPearls*, [online]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470443/> [Accessed 12 Jun.2023].
7. Dasari, N., Jiang, A., Skochdopole, A., Chung, J., Reece, E., Vorstenbosch, J. and Winocour, S. (2021). Updates in Diabetic Wound Healing, Inflammation,

- and Scarring. *Seminars in Plastic Surgery*, [online] Volume 35(3), pp. 153–158. Available at: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8432997/> [Accessed 15 Jul. 2021].
8. Malone, M., Bjarnsholt, T., McBain, A.J. et al. (2017). The prevalence of biofilms in chronic wounds: a systematic review and meta-analysis of published data. *Journal of Wound Care*, [online] Volume 26(1), pp. 20–25. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28103163/> [Accessed 2 Jan. 2017].
 9. Mulani, M.S., Kamble, E.E., Kumkar, S.N. et al. (2019). Emerging Strategies to Combat ESKAPE Pathogens in the Era of Antimicrobial Resistance: A Review. *Frontiers in Microbiology*, [online] Volume 10, p. 539. Available at: <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2019.00539/full> [Accessed 1 Apr. 2019].
 10. Serra, R., Grande, R., Butrico, L. et al. (2015). Chronic wound infections: the role of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, [online] Volume 13(5), pp. 605–613. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25746414/> [Accessed 8 Mar. 2015].
 11. Dhall, A. and Self, W. (2018). Cerium Oxide Nanoparticles: A Brief Review of Their Synthesis Methods and Biomedical Applications. *Antioxidants*, [online] Volume 7(8), p. 97. Available at: <https://www.mdpi.com/2076-3921/7/8/97> [Accessed 24 Jul. 2018].
 12. Nosrati, H., Heydari, M. and Khodaei, M. (2023). Cerium oxide nanoparticles: Synthesis methods and applications in wound healing. *Materials Today Bio*, [online] Volume 23, p. 100823. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2590006423002831> [Accessed 4 Oct. 2023].
 13. Nadeem, M., Khan, R., Afridi, K., Nadeem, A., Ullah, S., Faisal, S., Mabood, Z., Hano, C. and Abbasi, B. (2020). Green synthesis of cerium oxide nanoparticles using *Olea europaea* leaf extract for their antibacterial and

antioxidant activities. *Microscopy Research and Technique*, [online] Volume 83(10), pp. 1166–1174. Available at:

<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7429212/> [Accessed 11 Aug. 2020].

14. Manne, N.D.P.K., Arvapalli, R., Nepal, N., Thulluri, S., Selvaraj, V., Shokuhfar, T., He, K., Rice, K.M., Asano, S., Maheshwari, M. and Blough, E.R. (2015). Therapeutic potential of cerium oxide nanoparticles for the treatment of peritonitis induced by polymicrobial insult in Sprague-Dawley rats. *Crit. Care Med.*, [online] Volume 43(11), pp. e477–89. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26327202/> [Accessed Nov. 2015].
15. Hosseini, M. and Mozafari, M. (2020). Cerium oxide nanoparticles: recent advances in tissue engineering. *Materials*, [online] Volume 13(14), p. 3072. Available at: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7411590/> [Accessed 9 Jul. 2020].
16. Augustine, R., Hasan, A., Patan, N.K., Dalvi, Y.B., Varghese, R., Antony, A., Unni, R.N., Sandhyarani, N. and Al Moustafa, A.-E. (2020). Cerium oxide nanoparticle incorporated electrospun poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) membranes for diabetic wound healing applications. *ACS Biomater. Sci. Eng.*, [online] Volume 6(1), pp. 58-70. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33463234/> [Accessed 13 Jan. 2020].
17. Lukic, J., Chen, V., Strahinic, I., Begovic, J., Lev-Tov, H., Davis, S.C., Tomic-Canic, M. and Pastar, I. (2017). Probiotics or pro-healers: the role of beneficial bacteria in tissue repair. *Wound Repair and Regeneration*, [online] 25(6), pp. 912–922. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29315980/> [Accessed Nov. 2017].
18. Abootaleb, M., Mohammadi Bandari, N. and Arbab Soleimani, N. (2021). Interference of *Lactobacillus casei* with *Pseudomonas aeruginosa* in the treatment of infected burns in Wistar rats. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, [online] Volume 24(2), pp. 143–149. Available at:

- <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8061325/#sec8> [Accessed Feb. 2021].
19. Abdollahpour, D., Homayouni-Rad, A., Nourizadeh, R., Hakimi, S. and Mehrabi, E. (2023). The effect of probiotic supplementation on episiotomy wound healing among primiparous women: a triple-blind randomized clinical trial. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, [online] Volume 23, p. 149. Available at: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10161970/#Sec10> [Accessed 5 May 2023].
 20. Lukic, J., Chen, V., Strahinic, I., Begovic, J., Lev-Tov, H., Davis, S.C., Tomic-Canic, M. and Pastar, I. (2018). Probiotics or pro-healers: the role of beneficial bacteria in tissue repair. *Wound Repair and Regeneration*, [online] Volume 25(6), pp. 912–922. Available at: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5854537/#S8> [Accessed 9 Feb. 2018].
 21. Gordillo Altamirano, F.L. and Barr, J.J. (2019). Phage therapy in the postantibiotic era. *Clinical Microbiology Reviews*, [online] Volume 32(2), p. e00066– 18. Available at: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6431132/#s3> [Accessed 16 Jan. 2019].
 22. Huan, Y., Kong, Q., Mou, H. and Yi, H. (2020). Antimicrobial Peptides: Classification, Design, Application and Research Progress in Multiple Fields. *Frontiers in Microbiology*, [online] Volume 11, p. 582779. Available at: <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2020.582779/full#h4> [Accessed 16 Oct. 2020].
 23. Minden-Birkenmaier, B.A. and Bowlin, G.L. (2018). Honey-Based Templates in Wound Healing and Tissue Engineering. *Bioengineering*, [online] Volume 5(2), p. 46. Available at: <https://www.mdpi.com/2306-5354/5/2/46> [Accessed 16 Jun. 2018].

24. Combarros-Fuertes, P., Fresno, J.M., Estevinho, M.M., Sousa-Pimenta, M., Tornadijo, M.E. and Estevinho, L.M. (2020). Honey: Another Alternative in the Fight against Antibiotic-Resistant Bacteria? *Antibiotics*, [online] Volume 9(11), p. 774. Available at: <https://www.mdpi.com/2079-6382/9/11/774> [Accessed 14 Nov. 2020].
25. Bezerra, A., Alves, M.J., Saavedra, M.J., Russo-Almeida, P., Aires, A., Fonseca, H., Rodrigues, F., Delerue-Matos, C., Garcia, J. and Gouvinhas, I. (2024). Anti-biofilm properties of Portuguese honeys against multi-drug resistant microorganisms: A promising strategy for chronic wounds healing. *Food Bioscience*, [online] Volume 61, p. 104796. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2212429224012264> [Accessed 30 Aug. 2024].
26. Talapko, J., Matijević, T., Juzbašić, M. and Antolović-Požgain, A. (2020). Antibacterial Activity of Silver and Its Application in Dentistry, Cardiology and Dermatology. *Microorganisms*, [online] Volume 8(9), p. 1400. Available at: https://www.researchgate.net/publication/344206792_Antibacterial_Activity_of_Silver_and_Its_Application_in_Dentistry_Cardiology_and_Dermatology [Accessed 11 Sep. 2020].
27. Kaya, M., Akdaşçi, E., Eker, F., Bechelany, M. and Karav, S. (2025). Recent Advances of Silver Nanoparticles in Wound Healing: Evaluation of In Vivo and In Vitro Studies. *Int. J. Mol. Sci.*, [online] Volume 26(20), p. 9889. Available at: <https://www.mdpi.com/1422-0067/26/20/9889> [Accessed 11 Oct. 2025].
28. Madan, A. and Dutta, R. (2026). Cytotoxic and Genotoxic Effects of Silver and Gold Nanoparticles in Human Cells: Implications for Safe Applications in Plant Health Nanotechnology. In: *Managing Plant Viral Diseases With Advanced Nanoparticles*. pp. 393-420. Available at: https://www.researchgate.net/publication/399627975_Cytotoxic_and_Genotoxic_Effects_of_Silver_and_Gold_Nanoparticles_in_Human_Cells_Implications_for_Safe_Applications_in_Plant_Health_Nanotechnology

- ns for Safe Applications in Plant Health Nanotechnology [Accessed Jan. 2026].
29. Bekeschus, S., von Woedtke, T., Emmert, S. and Schmidt, A. (2021). Medical gas plasma-stimulated wound healing: Evidence and mechanisms. *Redox Biology*, [online] Volume 46, p. 102116. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213231721002755#sec4> [Accessed 30 Aug. 2021].
 30. Masson-Meyers, D.S., Andrade, T.A.M., Caetano, G.F., Guimaraes, F.R., Leite, M.N., Leite, S.N. and Frade, M.A.C. (2020). Experimental models and methods for cutaneous wound healing assessment. *International Journal of Experimental Pathology*, [online] Volume 101(1-2), pp. 21–37. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32227524/> [Accessed 30 Mar. 2020].
 31. Grada, A., Mervis, J. and Falanga, V. (2018). Research Techniques Made Simple: Animal Models of Wound Healing. *Journal of Investigative Dermatology*, [online] Volume 138(10), pp. 2095–2105. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30244718/> [Accessed Oct. 2018].
 32. Rhea, L. and Dunnwald, M. (2020). Murine Excisional Wound Healing Model and Histological Morphometric Wound Analysis. *Journal of Visualized Experiments*, [online] Volume 162, e61616. Available at: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9280391/> [Accessed 14 Jul. 2022].
 33. D.-J., Shen, C.-A., Sun, T.-J., Zhang, L., Deng, H.-P. and Chai, J. (2017). Mesenchymal stem cells promote incision wound repair in a mouse model. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, [online] Volume 16(6), pp. 1317–1323. Available at: <chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://pdfs.semanticscholar.org/6bc1/986664d34e953c927c5ea77f561a6869b508.pdf> [Accessed Jun. 2017].
 34. Matsuda, N., Sato, C., Ishikawa, K., Miura, T., Funayama, E., Yamamoto, Y., Fuyama, K., Ohnishi, S. and Maeda, T. (2025). A novel mouse model for studies of burn wound conversion using a top hat-shaped brass template.

- Burns*, [online] Volume 51(2), p. 107348. Available at:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0305417924003887>
 [Accessed Mar. 2025].
35. Rogers, L.C., Bevilacqua, N.J., Armstrong, D.G. and Andros, G. (2010). Digital Planimetry Results in More Accurate Wound Measurements: A Comparison to Standard Ruler Measurements. *Journal of Diabetes Science and Technology*, [online] Volume 4(4), pp. 799–802. Available at:
<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2909508/#sec5> [Accessed 1 Jul. 2010].
 36. van de Vyver, M., Boodhoo, K., Frazier, T., Hamel, K., Kopcewicz, M., Levi, B., Maartens, M., Machcinska, S., Nunez, J., Pagani, C., Rogers, E., Walendzik, K., Wisniewska, J., Gawronska-Kozak, B. and Gimble, J.M. (2021). Histology Scoring System for Murine Cutaneous Wounds. *Stem Cells and Development*, [online] Volume 30(23), pp. 1141–1152. Available at:
<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9022171/#s020> [Accessed 3 Dec. 2021].
 37. Negut, I., Grumezescu, V. and Grumezescu, A.M. (2018). Treatment Strategies for Infected Wounds. *Molecules*, [online] Volume 23(9), p. 2392. Available at:
<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6225154/#sec2-molecules-23-02392> [Accessed 18 Sep. 2018].
 38. Krzyszczyk, P., Schloss, R., Palmer, A. and Berthiaume, F. (2018). The Role of Macrophages in Acute and Chronic Wound Healing and Interventions to Promote Pro-wound Healing Phenotypes. *Frontiers in Physiology*, [online] Volume 9, p. 419. Available at:
<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5938667/#s10> [Accessed 1 May 2018].
 39. Закон України №3447–IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» (Відомості Верховної Ради України (ВВР), 2006, № 27,

ст.230). За посиланням: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/3447-15#Text> (Набрав чинності від 21.02.2006).

40. Katharina S Fischer, Ben Litmanovich, Dharshan Sivaraj, Hudson C Kussie, William W Hahn, Andrew C Hostler, Kellen Chen, Geoffrey C Gurtner. (2023). Protocol for the Splinted, Human-like Excisional Wound Model in Mice. *Journal of Bio-Protocol*, [online] Volume 3, p. e4606. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36816987/> [Accessed 5 Feb. 2023].
41. Jiaxin Liang, Guofa Zou, Chiming Gu, Shuhong Tao, Libing Guo, Chunping Tang, Jinhong Zhang, Zujun Deng and Yanfen Chen. (2023). Study on skin infection model of *Staphylococcus aureus* based on analytic hierarchy process and Delphi method. *Journal of Heliyon*, [online] Volume 9(6), p. e16327. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37287617/> [Accessed 16 May 2023].
42. Jade Ros, Marthe Vilotte, Julie Rivière and Cecile Grohs. (2024). *Histology examination: preparation and staining of bovine tissues*, [online] protocol. Available at: <https://www.protocols.io/view/histology-examination-preparation-and-staining-of-c9a3z2gn.html> [Accessed 7 May 2024].
43. Identifying wound infection: taking a swab. (2010). *Wound Essentials*, [online] Volume 5, pp. 62-64. Available at: https://wounds-uk.com/wp-content/uploads/2023/02/content_9492.pdf [Accessed 2010].
44. Silvio D Brugger, Christian Baumberger, Marcel Jost, Werner Jenni, Urs Brugger, Kathrin Mühlemann. (2012). Automated Counting of Bacterial Colony Forming Units on Agar Plates. *Journal of Plos*, [online] Volume 7(3), p. e33695. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22448267/> [Accessed 20 Mar. 2012].