

На правах рукописи

ГОПТАРЕВА ЕКАТЕРИНА АЛЕКСЕЕВНА

**АНТИМИКРОБНАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ НИСОМАЛЬНЫХ ГЕЛЕЙ,
МОДИФИЦИРОВАННЫХ АТОМАМИ СЕРЕБРА ПРИ ИХ
ВОЗДЕЙСТВИИ НА МИКРОБНУЮ БИОПЛЁНКУ ПАРОДОНТА**

03.02.03 – микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание учёной степени
кандидата медицинских наук**

Ставрополь 2019

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Ставропольский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научный руководитель:

Базиков Игорь Александрович, доктор медицинских наук, профессор

Официальные оппоненты:

Меринова Людмила Константиновна, доктор медицинских наук, профессор, заведующая лабораторией ФГУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт».

Алиева Елена Васильевна, доктор медицинских наук, профессор кафедры клинической фармакологии, бактериологии, иммунологии и аллергологии ФПДО СтГМУ, главный специалист по клинической микробиологии и антимикробной резистентности по СКФО МЗ РФ.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Омский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита состоится 25 ноября 2019 года в 10 часов на заседании диссертационного совета Д 208.008.06 при федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 400131, г. Волгоград, пл. Павших борцов, 1.

С диссертацией можно ознакомиться в фундаментальной библиотеке ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России по адресу: 400131, г. Волгоград, пл. Павших борцов, 1 и на сайте www.volgmed.ru

Автореферат разослан « ____ » _____ 2019 года

Ученый секретарь
диссертационного совета Д208.008.06,
доктор медицинских наук,

А.Н. Долецкий

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Ряд заболеваний с длительным, хроническим течением плохо поддаётся лекарственной терапии, требует назначения различных, комбинируемых препаратов и методов медикаментозной терапии. Одним из таких заболеваний является пародонтит. Пародонтиты формируют очаги хронической инфекции в полости рта (Z. Feng, 2006; О.О. Янушевич, 2009; О.П. Максимова, 2012). Хронические инфекции вызывают не только местные воспалительные изменения, но и воздействуют на организм в целом. Патология пародонта, часто сопровождается таким осложнением, как пищеварительные дисфункции, нарушения психоэмоциональной сферы, снижение иммунологической резистентности (С.Б. Улитовский, 2008; P. J. Ezzo, C. W. Cutler, 2003). Данная стоматологическая патология является даже не столько медицинской, сколько социальной проблемой. (Л.М. Цепов, V.N. Tsarev, 2017). В связи с этим, профилактика и лечение заболеваний пародонта и слизистой оболочки рта, остается одной из актуальных проблем современной медицины (Л.А. Дмитриева, А.Г. Крайнова, 2004; Meuric, V. et al., 2017; R.V. Ushakov, V.N. Tsarev, 2018). Пародонтит – это воспалительное заболевание, ведущее к утрате зубов, которое во многом обусловлено формированием микробной биопленки в области края десны. Наддесневая биопленка распространяется по эмали зуба, а поддесневая биопленка уходит вглубь по пришеечной части до корня зуба (Р.В. Ушаков, В.Н. Царев, 2019; В.Н. Царёв и др., 2018). Это объясняет необходимость антимикробной терапии пациентов с заболеваниями пародонта, направленной на удаление зубного налета и гигиенические мероприятия в полости рта (В. Г. Мартиросян и соавт., 2012; Р.В. Ушаков, В.Н. Царев, 2018).

Неотъемлемой частью микробиоты полости рта является нормальная микрофлора. Она постоянно подвергается атаке любыми факторами, обеспечивая колонизационную резистентность (В.Н. Царёв и др., 2018; С. Casey, 2018). В развитии заболеваний пародонта симбионты и условно-патогенные микроорганизмы играют ведущую роль (Е.В. Ипполитов, 2016; A. Iwasaki, R. Medzhitov, 2015). С учётом богатого спектра пародонтопатогенов в микробных плёнках полости рта (до 800 видов микробов), целесообразна разработка новых, таргентных антимикробных препаратов с использованием атомов серебра. Микробиологические и молекулярно-генетические методы идентификации резидентной и пародонтопатогенной микрофлоры позволят объективно оценить и обосновать целесообразность применения антимикробных ниосомальных гелей, модифицированных атомами серебра.

Степень разработанности темы исследования

Причиной персистенции бактерий на слизистой оболочке полости рта и пародонта является формирование биопленок (И. И. Долгушин с соавт. 2013; Л.В. Диденко с соавт, 2015; Y. Kim et al., 2007; S. Ji et al., 2011). Адресная доставка лекарств с помощью наноконтейнеров является новой областью

исследований в стоматологии. Наномедицина предлагает инновационные методы для изучения воздействия антибактериальных препаратов на микроорганизмы в условиях сформировавшихся биопленок при пародонтите. При этом, оптимизируется необходимое количество вещества нужное для его антимикробной активности (Е.И. Дискаева, 2018, И.А. Базиков, 2018). Для антимикробной терапии в пародонтологии используются фитоэкстракты из лекарственных (З.А.Сеираниду и соавт. 2018). Лекарственные фитоэкстракты содержат антимикробные вещества и эффективны для лечения заболеваний пародонта. Резистентность микробов к ним возникает гораздо реже и медленнее.

Основную роль в противодействии пародонтопатогенам биопленок оказывают нейтрофильные лейкоциты, лимфоциты и цитокины (Ганковская О. А., 2012; Долгушин И. И. с соавт., 2014; Теблоева Л.М., 2015; Y. Hasegawa et al., 2007; Han Y. W., 2015). Плацентарная ткань содержит уникальное сочетание низкомолекулярных природных антимикробных пептидов, и цитокинов, обладающих антибактериальным действием, однако широких исследований их воздействия на пародонтопатогены биоплёнок не проводились (И.А.Базиков и соавт, 2018).

В качестве антимикробных агентов для борьбы с полирезистентными штаммами микроорганизмов испытываются различные классы соединений, особенно перспективными считаются материалы наноразмерных величин, в том числе атомы серебра (Т.А. Шульгина с соавт. 2015). Наночастицы могут связываться с нуклеиновыми кислотами, белками, проникать через мембраны микроорганизмов, оказывая на них разрушающее действие (И.А. Базиков и соавт., 2017). В 2009 году И.А.Базиковым и соавторами зарегистрировано научное открытие «Явление трансдермального переноса биологически-активных веществ с помощью ниосом кремнийорганической природы». Преимуществами таких ниосом являются: 1) более высокая чистота и стабильность (деградация путём окисления и гидролиза), 2) при производстве не используются органические растворители, 3) возможность контроля скорости высвобождения веществ и адресацию путём модификации поверхности (M. Manconi et al., 2006).

Серебро, кремний, фитоэкстракты и низкомолекулярные пептиды исторически известны как средства, обладающие антибактериальным эффектом [98]. Однако, для обоснования их практического использования в составе ниосомального геля, необходимо исследование их антимикробной эффективности на пародонтопатогены биоплёнок с учетом их внутривидового разнообразия. Критериями эффективности антимикробного лечения патологии пародонта служат состав и количество резидентной и пародонтопатогенной микрофлоры. Для выявления этих показателей целесообразно применение микробиологических и молекулярно-генетических методов обнаружения микроорганизмов. Выявление спектра доминирующих условно-патогенных микроорганизмов в биоплёнках полости рта необходимо для выяснения антимикробной эффективности воздействия ниосомальных гелей,

модифицированных атомами серебра на пародонтопатогены микробных плёнок. Это послужило основанием для выполнения диссертационного исследования.

Цель исследования: изучение антимикробной эффективности разработанных ниосомальных гелей, модифицированных атомами серебра, в отношении микробной биопленки пародонтопатогенов.

Задачи исследования:

1. Разработать технологию модификации ниосом атомами серебра, провести электронную и атомно–силовую микроскопию серебрённых ниосом и изучить их антимикробную активность.

2. В ниосомы кремнийорганической природы инкапсулировать антимикробные фитозэкстракты и низкомолекулярные пептиды. Изучить токсичность полученного антимикробного ниосомального геля.

3. Провести сравнительную оценку чувствительности выделенных пародонтогенов биоплёнок к ниосомальным стоматологическим гелям *in vitro*.

4. Изучить динамику изменений количества и частоты выявления генетических маркеров основных пародонтопатогенов микробной биопленки до и после лечения пародонтита антимикробным ниосомальным гелем с атомами серебра.

5. Оценить функциональную активность лимфоцитов и их белково–синтетическую функцию в зоне повреждения слизистой оболочки больных пародонтитом до и после использования антимикробных ниосомальных гелей, модифицированных атомами серебра.

6. Оценить антимикробную эффективность применения ниосомальных гелей с атомами серебра при лечении заболеваний пародонта в сравнении с традиционными методами лечения.

Научная новизна.

1. Разработана технология модификации ниосом атомами серебра, впервые получены данные об антимикробной активности модифицированных атомами серебра ниосом.

2. В ниосомы инкапсулированы антимикробные фитозэкстракты и низкомолекулярные пептиды. Изучена токсичность полученного антимикробного ниосомального геля.

3. Впервые исследована чувствительность представителей микрофлоры биоплёнки полости рта к ниосомальным гелям *in vitro*.

4. Изучена динамика изменений количества и частоты выявления генетических маркеров основных пародонтопатогенов микробной биопленки до и после лечения пародонтита антимикробным ниосомальным гелем с атомами серебра.

5. Дана оценка роли местного иммунитета в снижении распространения и колонизации микроорганизмов в биоплёнках полости рта в норме, при патологии и лечении пародонтита ниосомальными гелями.

6. Впервые продемонстрирована клиническая эффективность антимикробного нiosомального геля, модифицированного атомами серебра у больных пародонтитом в сравнении с традиционными методами лечения.

Практическая значимость работы.

Разработана технология модификации нiosом атомами серебра для получения антимикробного геля. Показана антимикробная активность разработанного геля к пародонтопатогенам биоплёнок ротовой полости. Нiosомальный гель, модифицированный атомами серебра, сокращает сроки лечения в сопоставлении с традиционной наружной терапией пародонтитов. При применении антимикробного геля, модифицированного атомами серебра, выявлена функциональная активность лимфоцитов. Обнаружено изменение параметров площади их ядер и средней суммарной площади. Доказанная эффективность антимикробного нiosомального геля демонстрируют необходимость его применения при лечении заболеваний пародонта.

Результаты исследований используются в работе стоматологических клиник Ставропольского края и Ростовской области. Полученные в ходе исследований данные применяются в учебном процессе на кафедрах микробиологии и стоматологии СтГМУ. Технические условия (ТУ) для производства антимикробного нiosомального геля внедрены на базе малого предприятия СтГМУ «Регенерация», г. Ставрополь. В городе Ростове–на–Дону используется в стоматологических клиниках ООО «Луч» и ООО «Дента–Бьюти».

Методология и методы исследования

Основой для выполнения диссертации явились работы отечественных и зарубежных ученых в области исследований антимикробного воздействия препаратов на пародонтопатогенную микрофлору биоплёнок ротовой полости. Комплексный анализ и системный подход применялся для выполнения экспериментов и изложения результатов. Для достижения поставленных задач были внедрены современные нанотехнологии.

Доказательность выполненного исследования основывается на проведении экспериментального и клинического апробирования и сравнения, контролируемого рандомизированного исследования, а также дедуктивного обобщения. Исследование включало выбор биологически активных действующих веществ, микробиологические и биотехнологические технологии, доклинические испытания токсичности на животных, инструментальные методы для определения физиологических параметров, и клинические методы изучения эффективности разработанных антимикробных средств. При анализе результатов исследований использованы классические методы вариационной статистики.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Увеличение количества и частоты выявления генетических маркеров пародонтопатогенов в биоплёнках коррелирует с интенсивностью изменений при пародонтите.

2. Антимикробная активность атомов серебра усиливает действие ниосом, что подтверждается оценкой чувствительности пародонтопатогенов, выделенных из биоплёнок полости рта к ниосомальным гелям.

3. Технология инкапсулирования пептидов в ниосомы и модификация их атомами серебра, позволяет разработать ниосомальный гель с антимикробной и регенерирующей активностью.

4. Ниосомы с атомами серебра действуют на плазматические мембраны пародонтопатогенов, приводя их к гибели вследствие изменения внутриклеточного осмотического давления, за счёт увеличения проницаемости при набухании и разрывах.

5. Антимикробный ниосомальный гель с атомами серебра не обладает токсичностью при доклинических исследованиях на лабораторных животных.

6. Лечение антимикробным ниосомальным гелем, модифицированным атомами серебра приводит к снижению резидентной и пародонтопатогенной микрофлоры, в сравнении с традиционным лечением пастой с метронидазолом.

Внедрение результатов исследования

Результаты исследования внедрены и используются в учебном процессе кафедр микробиологии, стоматологии общей практики и детской стоматологии Ставропольского государственного медицинского университета (СтГМУ), в практике отделений базовой и детской стоматологических поликлиник СтГМУ, стоматологических учреждений г. Ростова–на–Дону: ООО "Луч" Клиника Лазерной Медицины и ООО "Дента Бьюти".

Личный вклад автора в исследования

Автор принимал участие в планировании, постановке целей и задач исследования. Диссертант самостоятельно проанализировала и обобщила большой объем данных современной научной литературы по теме исследования. Принимала участие в разработке биотехнологических и микробиологических методов. Ею проведены диагностика и комплексное лечение пациентов с пародонтитом. При анализе результатов исследований автором самостоятельно использованы классические методы вариационной статистики, позволившие сделать выводы и дать практические рекомендации.

Публикации и апробация работы.

По материалам диссертации опубликовано 14 научных работ, в том числе 3 из них в периодических изданиях из перечня ведущих рецензируемых научных журналов, утвержденных ВАК Министерства образования и науки России и рекомендованных для публикации основных научных результатов диссертации на соискание искомой учёной степени. Результаты работы докладывались на международных и всероссийских научных конференциях: «Биотехнология: взгляд в будущее в 2017 году в г. Ставрополь, IV Национальном конгрессе бактериологов и международном симпозиуме «Микроорганизмы и биосфера «MICROBIOS в 2018, в г. Омск.

Объем и структура диссертации.

Материалы диссертации изложены на 114 страницах компьютерного текста, и включают введения, обзор литературы, описания материалов и

методов исследования, три главы собственных исследований, обсуждение результатов, заключение, выводы и практические рекомендации, список литературы, включающий 100 отечественных и 120 зарубежных источников.

Работа иллюстрирована 15 рисунками и 9 таблицами. Исследования выполнены на кафедре микробиологии и лаборатории нанотехнологий лекарственных средств ФГБОУ ВО СтГМУ Минздрава России в соответствии с планом НИР вуза.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования.

Исследование проводилось в три основных этапа в течение 2016–2019 гг. на кафедре микробиологии, в лаборатории нанотехнологии лекарственных средств и на кафедре терапевтической стоматологии СтГМУ. На первом этапе изучали штаммы клинических изолятов грамотрицательных и грамположительных микроорганизмов, а также клинические изоляты анаэробных бактерий биопленки. Для усиления антимикробной эффективности разработали технологию модификации ниосом атомами серебра. В ниосомы инкапсулировали антимикробные фитоэкстракты и низкомолекулярные пептиды. Изучена токсичность полученного антимикробного ниосомального геля. Второй этап включал исследование чувствительности микрофлоры полости рта к ниосомальными гелям *in vitro*, а также изучение роли местного иммунитета в снижении распространения и колонизации микроорганизмов в биоплёнках полости рта в норме, при патологии и в период лечения пародонтита антимикробными ниосомальными гелями. Оценивали функциональную активность лимфоцитов и их белково–синтетической функции в зоне повреждения слизистой оболочки больных пародонтитом. На третьем этапе работы *in vitro* изучали антимикробную эффективность ниосомальных гелей при лечении заболеваний пародонта в сравнении с традиционными методами лечения.

Использовали следующие клинические изоляты грамотрицательных и грамположительных микроорганизмов (*P. aeruginosa*, *S. aureus*), а также клинические изоляты анаэробных бактерий биопленки: *Porphyromonas gingivalis* и *Tannerella forsythia* (пародонтопатогенные виды 1 порядка), *Prevotella intermedia* и *Fusobacterium nucleatum/periodonticum* (пародонтопатогенные виды 2 порядка), *Streptococcus sanguis*, *Veillonella parvula*, *Enterococcus faecalis*, *Actinomyces naeslundii* (представители резидентной микробиоты полости рта), дрожжевых грибов *Candida albicans*. Исследование микрофлоры проводилось стандартными методами. Материал для бактериологического исследования брали по методике Б.С. Крамар и Е.О. Кравцова (1994). Изучали микрофлору полости рта, слизистых оболочек языка, неба и щеки, обследованы пародонтальные карманы. Количественный и качественный состав пародонтопатогенов было изучен с помощью молекулярно–генетического метода. ПЦР была проведена с использованием тест–набора «МультиДент» (ООО НПФ «ГенЛаб», РФ). Тестовый набор MultiDent является

идентификатором маркерных патогенных микроорганизмов: *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides forsythus*, *Treponema denticola*, *Porphyromonas gingivalis* и *Prevotella intermedia*. Из полученного материала выделяли ДНК. Пользовались компьютерной программой для осуществления мультиплексной ПЦР, рекомендованной фирмой–изготовителем. Образцы ДНК после амплификации анализировали на 1,6% агарозе после окрашивания бромидом этидия (медицинская технология FS–2006/043–U).

Для создания оболочки ниосом использовано соединение ПЭГ–12 диметикон. Ниосомы создавались по оригинальной технологии профессора И.А.Базикова (Патент РФ №2014146031). Для модификации ниосом атомами серебра использовали 1мМ раствор AgNO_3 . Для этого серебро восстанавливали в реакции $\text{Cu} + 2\text{AgNO}_3 \rightarrow 2\text{Ag} + \text{Cu}(\text{NO}_3)_2$. В дальнейшем, реакционную смесь обрабатывали ультразвуком для сорбции серебра на поверхность ниосом. Экспозиция озвучивания составляла 10 – 15 минут при частоте 20 кГц и мощности 200 Вт. Такой режим позволил получить максимальную сорбционную ёмкость ниосом.

При разработке технологии получения антимикробных гелей использовали как растительные экстракты, так и низкомолекулярные пептиды, выделенные из плаценты животного происхождения. Фитоэкстракты получали из дикорастущего растительного сырья: трава зверобоя (*Hypericum*), шалфей лекарственный (*Salvia officinalis*) и солодка голая (*Glycyrrhiza glabra*). Использовали низкомолекулярные пептиды, выделенные из плацентарной ткани животного происхождения, содержащие, цитокины, факторы роста и природные антимикробные пептиды: альфа–дефензины. Пептиды были представлены цитомединами (1000–10000 Da), поддерживающими структурный гомеостаз клеточных популяций. Выделение молекул и их инкапсулирование в наноконтейнеры ниосомы кремнийорганической природы, а также получение ниосомальных гелей проводились по оригинальной запатентованной технологии (Патент РФ №2014146031).

Фазы приготовления ниосомального геля состояли из чередования водных и липидных фаз. Водная фаза содержала гидрофильную активную субстанцию, в которой находилась комбинация фитоэкстрактов и низкомолекулярных плацентарных пептидов. При изготовлении липидной фазы геля, использовали 5% циклометикон и 2% ПЭГ–12 диметикон, которые перемешивали и вносили в водную фазу. Для интенсивного эмульгирования использовали АПВ–гомогенизатор. Затем в суспензию вносили триэтаноламин с целью стабилизации концентрации водородных ионов (pH) до 6,6–7,0 и формирования структуры геля. В заключительной фазе гель повторно эмульгировали на АПВ–гомогенизаторе APV Lab Series Homogenizers – 1000. Использовали консервант DC–RM 205 (Dow Corning, США) и гелеобразователь Salcare SC 80 (CIBA, Швейцария).

Исследования острой токсичности проводили на белых беспородных крысах обоего пола весом 180–220 г и кроликах обоего пола весом 2,1–2,3 кг. Животных содержали в условиях вивария, кормление осуществлялось по

графику, автопоилки использовались непрерывно. При содержании животных руководствовались Международными рекомендациями Европейской конвенции по защите позвоночных животных, Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных (1985), а также национальному стандарту Российской Федерации ГОСТ Р–53434–2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики», правилам GLP. Эксперименты не противоречили принципам гуманности, изложенным в директивах Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) и Хельсинкской декларации. Крысы были разбиты на 4 группы по 12 особей (6 самок, 6 самцов), кролики разделены также на 4 группы по 3 животных. Дозы ниосомального геля для оценки острой токсичности выбирали исходя из оптимального содержания ниосом в геле. Основным критерием служило достижение необходимой терапевтической концентрации (10%) на максимальной обработанной площади кожи при поступлении компонентов геля в системный кровоток. Антимикробный ниосомальный гель наносили крысам на кожу в следующих дозах: 0,08 мг/кг (двойная ТД), 0,2 мг/кг (пятикратная ТД), 0,8 мг/кг (десятикратная ТД), 2 мг/кг (пятидесятикратная ТД). Для нанесения антимикробного ниосомального геля на кожу кроликов, использовали дозы: 1 мг/кг (двойная ТД), 2,5 мг/кг (пятикратная ТД), 5 мг/кг (десятикратная ТД), 25 мг/кг (пятидесятикратная ТД). Контрольным группам животных обрабатывали кожу эквивалентным количеством физиологического раствора. Токсикологические показатели определяли согласно требованиям СанПиН 1.2.681–97 и Инструкции по экспериментально-клинической апробации (1986 г.).

Для цитоморфологических исследований использовали методику W. Howell и D. Black (1980) в модификации В. И. Трухачева с соавт. (2015), окрашивая азотнокислым серебром мазки крови больных пародонтитом. Окрашенные мазки крови исследовали с помощью светового микроскопа OLYMPUS–BX 43 (Япония), цифровые изображения получали с помощью фотоаппарата OLYMPUS C 300 (Япония). В каждой мазке крови выбирали и фотографировали 10 полей зрения с использованием объективов 40× (для обзорных целей) и 100× (для морфометрических исследований). Изучали такие показатели, как площадь ядра лимфоцита, количество и площадь областей ядрышковых организаторов (в 10 ядрах на каждом снимке, итого 100 измерений AgЯО в мазке).

Для морфометрических исследований применяли программы VideoTest Master 4.0 для Windows XP (АОЗТ «ИСТА», Санкт–Петербург) на IBM–совместимом компьютере согласно рекомендациям Г.Г. Автандилова (2005).

Определяли чувствительность микрофлоры при помощи диско–диффузионного метода (ДДМ) согласно стандартам Национального комитета по клиническим лабораторным стандартам (NCCLS 2000). Анаэробы культивировали в микроанаэроостате системы Gas – Рак (OXOID, Англия). Выделенные микроорганизмы идентифицировали с учетом морфологических, культуральных, биохимических и антигенных признаков, используя

классификацию Берджи (1980). Для биохимической идентификации стрептококков, стафилококков, энтеробактерий пользовались тест–системой Staph. test, Entero–test, анаэробов –API–20А (Франция). Пропитывали бумажные диски, посеребрёнными ниосомами и ниосомальным гелем, наносили на предварительно выделенную из полости рта суспензию микроорганизмов, выросших сплошным слоем на агаровой чашке Петри. Контролем служили не пропитанные чистые бумажные диски. Исследования каждой культурой производили параллельно на трех чашках. Измерение диаметра зоны лизиса производили с помощью миллиметровой бумаги. Степень чувствительности микроорганизмов определяли на основе диаметра зоны лизиса с точностью до 0,1 мм. Использовали следующие соотношения: менее 10 мм – слабая чувствительность; 10 мм – умеренная чувствительность; более 10 мм – высокая чувствительность.

Клиническая часть исследования заключалась в верификации диагноза, с использованием МКБ 10 по данным клинико–лабораторного обследования пациентов. Для формирования групп использовали результаты сбора анамнеза, анкетирования, выяснения жалоб пациентов, объективного клинического, рентгенологического и лабораторного исследования. Изучены результаты клинического и лабораторного исследования 88 пациентов с пародонтитом за 2016 по 2019 г. Пациенты были распределены на 4 группы по 22 человека в каждой. В первой группе проводили стандартное местное лечение (метронидазол и ацеталсалициловая кислота на основе вазелина). Пациенты, которым вводили гель с пептидами и фитоэкстрактами без ниосом, составили 2 группу. В группе 3А было проведено лечение ниосомальным гелем с фитоэкстрактами и пептидами, в группе 3Б таким же ниосомальным гелем, но модифицированным атомами серебра. Пациентам были диагностированы такие воспалительные заболевания пародонта, как хронический пародонтит и хронический катаральный гингивит. Контрольная группа была с интактным пародонтом. У пациентов исследовали образцы крови в зоне воспалительного процесса, а также на 3, 6 и 9 сутки после лечения, из которых готовили мазки. Оценивали состояние слизистой оболочки полости рта и красной каймы губ по А.Л. Машкиллейсону (1984), а также были использованы индексы КПУ, гигиены (ГИ), РМА и пародонтита. Объективную оценку состояния пародонта получали при изучении таких индексов, как уровень гигиены полости рта – упрощенный индекс ОНI–S; выраженность воспаления в разных зонах десны – индекс ПМА; кровоточивость десневой борозды – индекс РВI тяжесть воспалительно–деструктивных изменений в тканях пародонта; индекс десневой жидкости – ИДЖ; стойкость капилляров десны к дозированному вакууму; подвижность зубов. Полученные результаты заносили в медицинскую карту. Эффективность лечения пациентов определяли по таким показателям, как сокращение сроков лечения, отсутствию мягкого налета на зубах, исчезновению гиперемии и отека, кровоточивости, увеличению ремиссии. Осмотры пациентов проводили сразу после окончания лечения, и через 6 и 12 месяцев после лечения.

Были использованы методы вариационной статистики, на основе компьютерных программ, включенных в «Microsoft Excel» и прикладных программ «Statistica» версии 8.0. Статистическая значимость отличия средних величин оценивалась по Стьюденту (t – критерий). Проверяли нормальность распределения по Джири и сравнение дисперсий по Фишеру, а затем сопоставляли выборки ординарного объема. Применяли поправку Уэлша (В.А.Уткин, 2012) для устранения возможного неравенства (проблема Беренса–Фишера). При вероятности ошибки не меньше $p < 0,05$, результаты считались статистически значимыми.

Основные результаты исследования и их обсуждение.

Полученные данные электронной и атомно–силовой микроскопии ниосом показывали преобладание частиц от 100 до 140 нм, с незначительным присутствием ниосом меньших размеров от 80 до 100 нм (рис1). Модификация атомами серебра приводила к уменьшению размеров ниосом. Ниосомы имели размер до 110 – 120 нм (рис.2), позволяющий осуществлять транспорт многих лекарственных молекул. Электронная микроскопия зафиксировала толщину стенок ниосом 3–4 нм. Диаметр наноконтейнера для низкомолекулярных пептидов составлял до 12 нм (рис. 1).

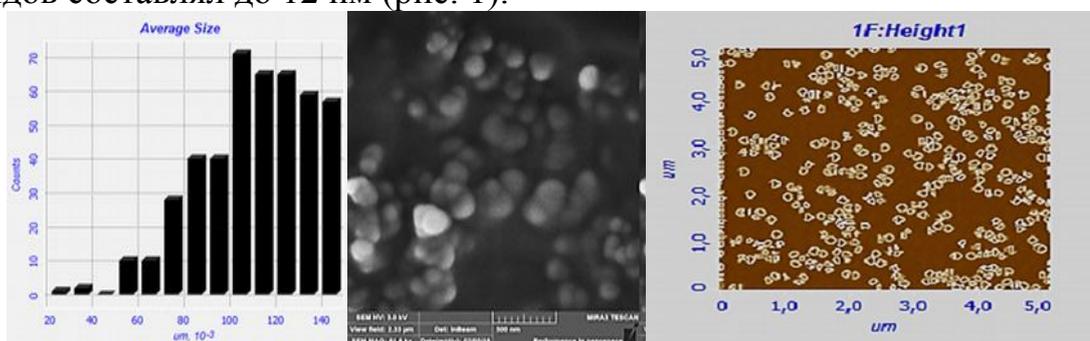


Рисунок 1. Электронная и атомно–силовая микроскопия ниосом и гистограмма зависимости среднего размера ниосом к их количеству.

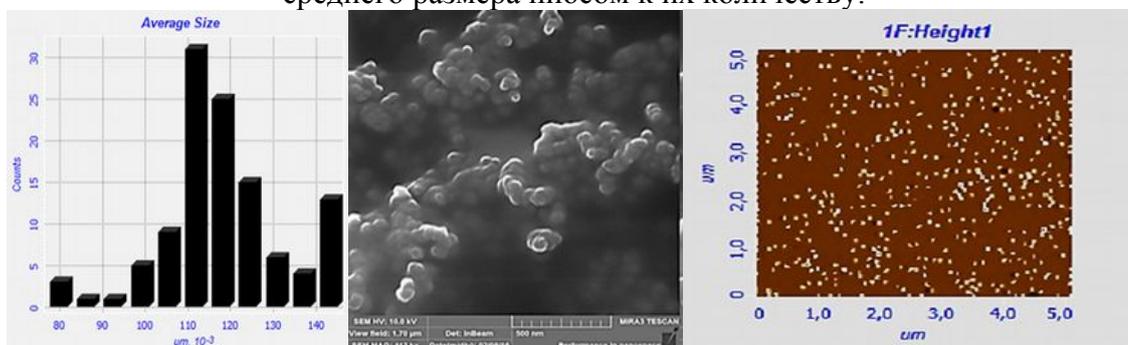


Рисунок 2. Электронная и атомно–силовая микроскопия серебрянных ниосом с антимикробными экстрактами и гистограмма зависимости среднего размера ниосом к их количеству

Ниосомы содержат гибриды кремния (диметикона) и углерода (полиэтиленгликоля). СН₃ – (метильные) группы образуют «облако» вокруг атомов Si, что необходимо для стабильности ниосом. Длина связи Si – O длиннее связи C – C, что определяет эластичность ниосом по сравнению с

фосфолипидами. Этот факт также позволяет образовывать нановезикулы без значительных энергетических усилий.

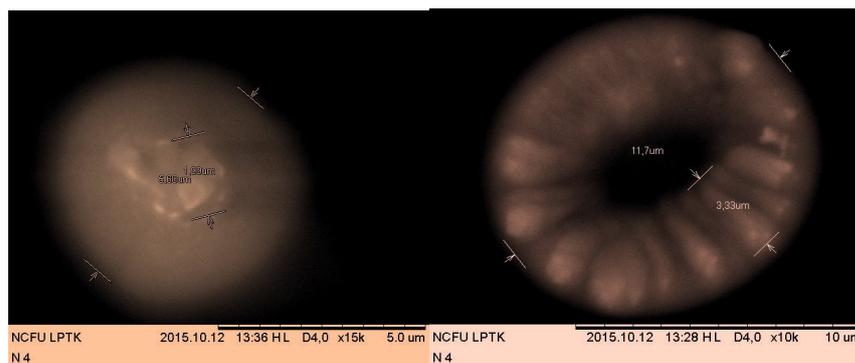


Рисунок 3 Электронная микроскопия кремнийорганической ниосомы с включёнными в неё низкомолекулярными пептидами и фитоэкстрактами

Изучение токсичности антимикробного ниосомального геля.

При изучении безопасности геля в экспериментальной группе не выявлено отличий от данных контрольной группы (интактные животные). Это свидетельствовало об отсутствии токсичности разработанного препарата.

Полученные данные доклинического исследования на животных позволили перейти к оценке клинической эффективности антимикробного ниосомального геля.

Антимикробная активность ниосомальных гелей, модифицированных атомами серебра.

У 65,4% пациентов из контрольной группы (с интактным здоровым пародонтом) не была выявлена пародонтопатогенная микрофлора. Установлено, что наиболее часто (23,7%) были выявлены маркеры *P. gingivalis*, в 22,4 % случаев – *B. forsythus*, в 12,7% случаев – *A. actinomycetemcomitans*, в 12,2% случаев – *P. intermedia*, в 9,3% случаев – *T. denticola* (рис. 4).

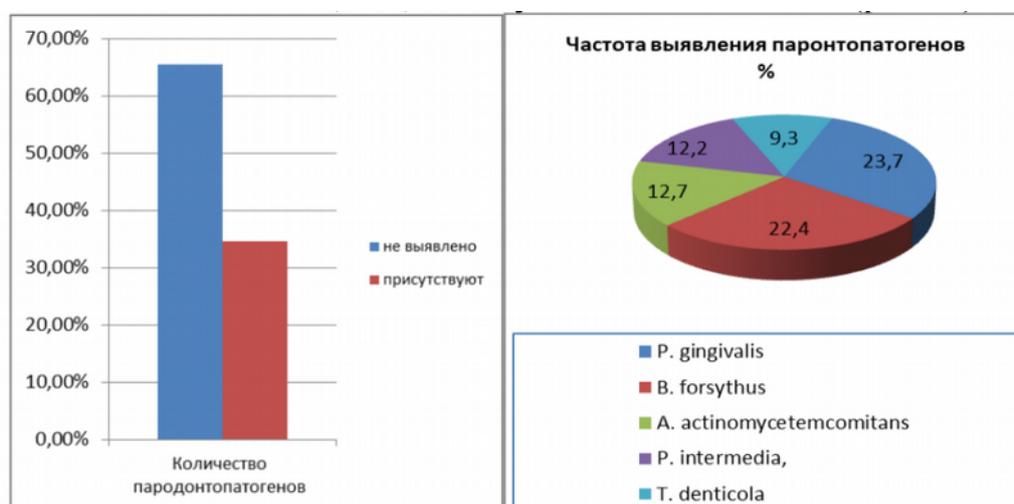


Рисунок 4. Количество и частота выявления маркеров пародонтопатогенов в биопленке у пациентов контрольной группы

У пациентов группы с воспалительными заболеваниями пародонта, частота выявления носительства пародонтопатогенных видов составила 48,3%.

Наиболее часто (24,8%) были выявлены маркеры *P. gingivalis*, в 21,9% случаев – *B. forsythus*, в 15,4% случаев – *A. actinomycetemcomitans*, в 11,7% случаев – *P. intermedia*, в 9,7% случаев – *T. denticola* (рис. 5).

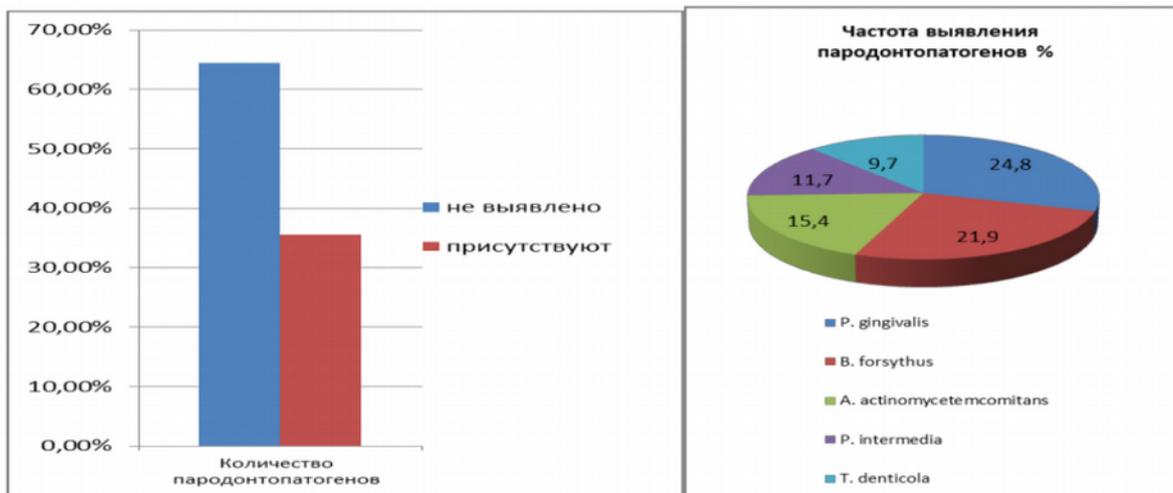


Рисунок 5. Количество и частота выявления маркеров пародонтопатогенов в биопленке у пациентов группы с воспалительными заболеваниями пародонта

Исследования, проведённые в группе со стандартным лечением, показали, что частота выявления носительства пародонтопатогенных видов составила 44,1%. Наиболее часто (26,2%) выявлялись маркеры *P. gingivalis*, в 24,6 % случаев – *B. forsythus*, в 13,9% случаев – *A. actinomycetemcomitans*, в 13,6% случаев – *P. intermedia*, в 8,8% случаев – *T. denticola* (рис. 6).



Рисунок 6. Количество и частота выявления маркеров пародонтопатогенов в биопленке у пациентов опытной группы после стандартного местного лечения

У 64,4% пациентов опытной группы с лечением ниосомальным гелем с серебром пародонтопатогенной микрофлоры не было обнаружено. Исследования позволили установить маркеры *P. gingivalis* в 24,3%, *B. forsythus* в 20,6 % случаев, *A. actinomycetemcomitans* в 13,9% случаев, *P. intermedia* в 13,7% случаев и *T. denticola* в 7,2% случаев (рис. 7).

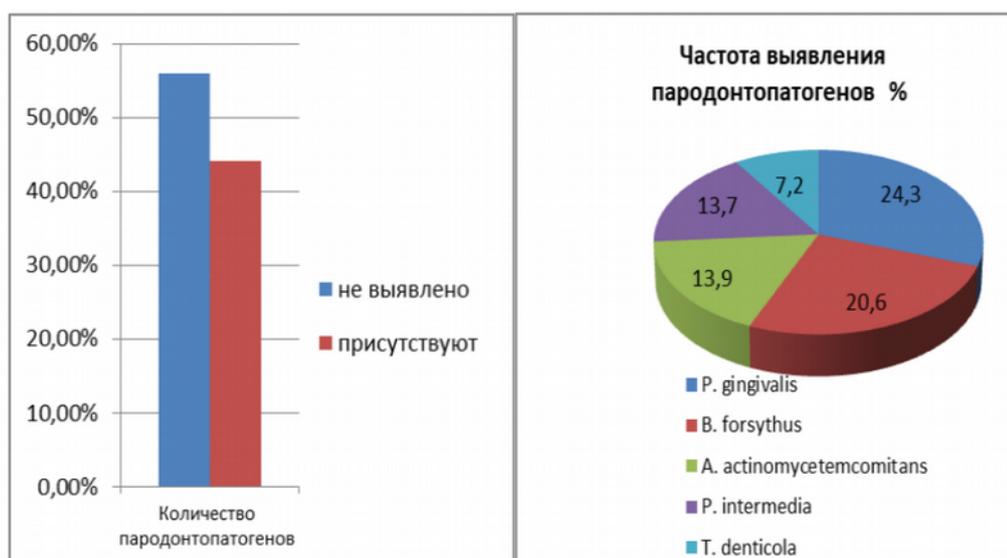


Рисунок 7. Количество и частота выявления маркеров пародонтопатогенов в биопленке у пациентов опытной группы после лечения ниосомальным гелем с атомами серебра

Следовательно, лечение антимикробным ниосомальным гелем, модифицированным атомами серебра, приводило к очевидному снижению пародонтопатогенной микрофлоры. Бактериологические исследования антимикробной активности ниосомальных гелей показали, что антимикробные ниосомальные гели с атомами серебра подавляют рост микроорганизмов.

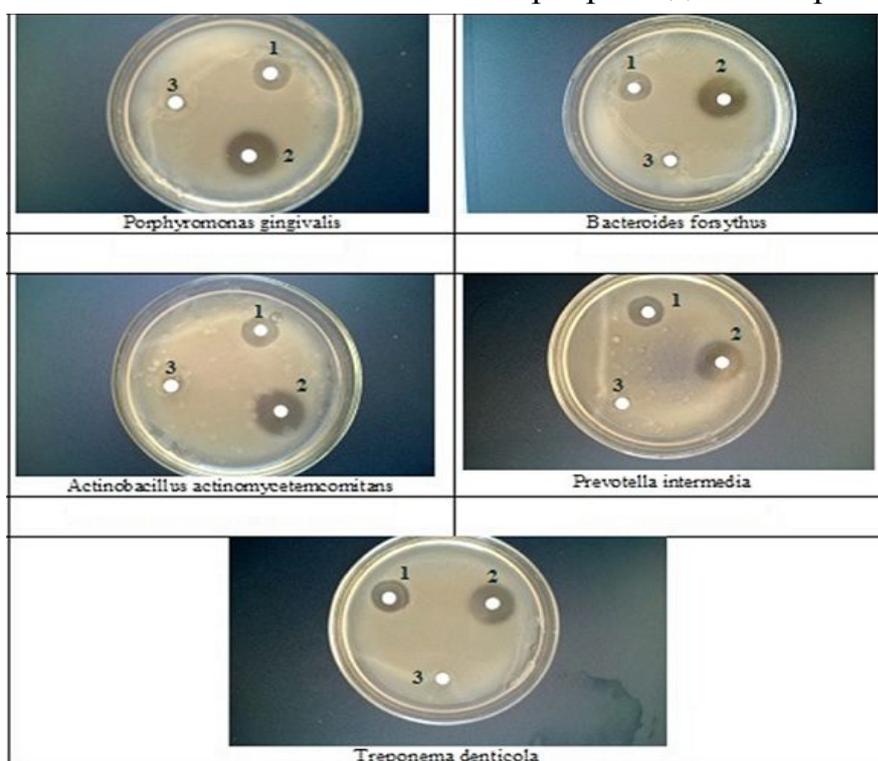


Рис.8. Зона лизиса пародонтопатогенов вокруг диском с ниосомальным гелем с экстрактами(1), с ниосомальным гелем с атомами серебра(2), контролем(3).

Для *Porphyrromons gingivalis* зона задержки роста дл ниосомального геля без атомов серебра, находилась в пределах $16,8 \pm 0,14$ мм. Антибактериальная эффективность ниосомального геля с атомами серебра была в два раза больше составила $35,1 \pm 0,16$ мм.Для *Bacteroides forsythus* зоны задержки роста

составили $15,2 \pm 0,11$ мм для ниосомального геля без атомов серебра и $37,1 \pm 0,17$ мм для геля, содержащего серебряные ниосомы. Зоны задержки роста *Actinobacillus actinomycetemcomitans* составили соответственно $12,9 \pm 0,21$ мм и $38,7 \pm 0,29$ мм соответственно. Ниосомальный гель с без атомов серебра, достоверно подавлял рост *Prevotella intermedia* в диаметре $13,7 \pm 0,12$ и $36,6 \pm 0,18$ соответственно с атомами серебра. Аналогичная ситуация наблюдалась и по отношению к *Treponema denticola* (рис. 8).

Установлена высокая антимикробная активность всех разработанных ниосомальных гелей. Антимикробная активность атомов серебра усиливала действие ниосомальных гелей ко всем обнаруженным пародонтогенам микробной биоплёнки.

Функциональная активность лимфоцитов

При изучении функциональной активности лимфоцитов на фиксированных и окрашенных мазках крови в зоне повреждения слизистой оболочки полости рта больных пародонтитом, обнаружены ядра лимфоцитов обычной формы. Внутри лимфоцитов выявлены акроцентрично лежащие округлой формы ядрышковые организаторы, имеющие окраску темно-коричневого цвета.

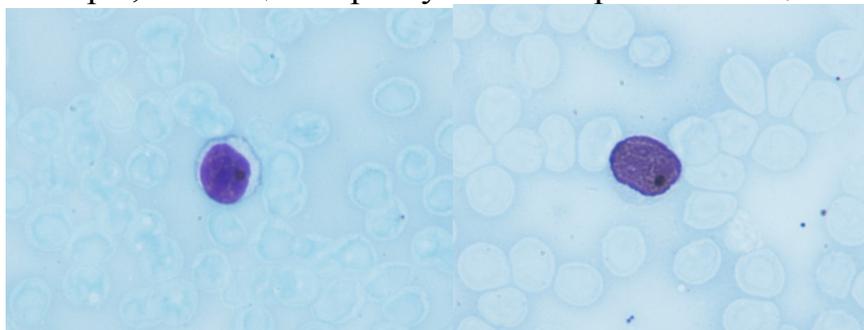


Рисунок 9.

Рисунок 10.

Лимфоцит с аргентофильным ядрышковым организатором. Окраска по методике W. Howell и D. Black (1980) в модификации В.И. Трухачева с соавт. (2015). Ув. $\times 400$.

Исследования показали, что изменение динамики средних значений площади ядер лимфоцитов зависит от метода обработки воспалительного участка. В группе пациентов, где лечение проводилась по стандартной методике, значения этого показателя незначительно повышаясь на 3 сутки, затем резко снижались к 6 дню, и стабилизировалась к 9 дню. На 6 сутки после начала лечения у пациентов, которым применяли антимикробный ниосомальный гель с атомами серебра, площадь ядер лимфоцитов была в 1,74 раза больше, чем у пациентов с традиционным наружным лечением. Полученные данные свидетельствуют о том, что в поражённом участке изменяется функциональное состояние лимфоцитов, но при использовании ниосомального геля с атомами серебра, они, вероятно, более функционально активны. При использовании антимикробного ниосомального геля с серебром лимфоциты в меньшей степени реагируют на характер течения процесса репарации, что проявляется одним пиком (на 6 день) повышения их функциональной активности.

Результаты лечения пародонтита антимикробным ниосомальным гелем, модифицированным атомами серебра

Для изучения эффективности антимикробного ниосомального геля проведено клиническое обследование пациентов с хроническими воспалительными заболеваниями тканей пародонта. Представляла интерес корреляция клинических параметров заболеваний пародонта с микробиологическими и иммунологическими данными, полученными в группах сравнения. Невысокая эффективность лечения в 1 и 2 группе, обусловлена тем, что метронидазол и ацетилсалициловая кислота в 1-й группе и гель с пептидами и экстрактами во 2-й группе действовали только поверхностно. Противовоспалительный и антибактериальный эффект на ткани пародонта был краткосрочным без эффективной, регулярной, поддерживающей терапии. Инкапсулирование низкомолекулярных пептидов и фитоэкстрактов в ниосомы и модификация атомами серебра обеспечивали пролонгированную дозированную доставку активных субстанций в клетки тканей пародонта больных 3 группы, что позволило повысить эффективность лечения заболеваний пародонта.

Полученные показатели индексов и проб свидетельствуют об эффективности лечения и коррелируют со значительным снижением резидентной и пародонтопатогенной микрофлоры при анализе генетических маркеров пародонтогенов. Результаты показали значительное сокращение времени лечения у пациентов, получавших антимикробный ниосомальный гель, модифицированный атомами серебра.

ВЫВОДЫ:

1. Разработанная технология модификации ниосом атомами серебра с инкапсулированными низкомолекулярными пептидами и фитоэкстрактами позволила получить антимикробный ниосомальный гель для лечения пародонтита.

2. Доклиническое изучение безопасности разработанного антимикробного ниосомального геля проведенное на лабораторных животных установило отсутствие местнораздражающего и токсического действия.

3. Динамика изменений количества и частоты выявления генетических маркеров пародонтопатогенов микробной биопленки до и после лечения пародонтита продемонстрировало антимикробную эффективность ниосомального геля с атомами серебра.

4. Функциональная активность лимфоцитов и их белково-синтетической функции в зоне повреждения пародонта до и после использования антимикробного ниосомального геля продемонстрировало его иммунологическую эффективность.

5. Применение антимикробного ниосомального геля с атомами серебра при лечении заболеваний пародонта в сравнении с традиционными методами лечения оказалось более эффективным, снижая характеризующие глубину патологии индексы примерно в 1,5 – 3 раза, улучшая показатели гигиены

полости рта в 3 – 6 раз. При этом число посещений стоматолога сокращается с 8–9 посещений за 15–17 дней до 5–6 посещений за 7–9 дней.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Результаты исследования позволяют рекомендовать применение разработанного антимикробного ниосомального геля, модифицированного атомами серебра как высокоэффективный метод лечения заболеваний пародонта.

2. Антимикробный ниосомальный гель, модифицированный атомами серебра, рекомендуется вводить в пародонтальные карманы из шприца 1 раз в день на 10 минут с 2–разовой заменой геля через каждые 5 минут. Эффективность такого лечения будет оптимальной при 5 посещениях за неделю.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:

1. Базиков И.А., Бейер Э.В., Мальцев А.Н., Гоптарева Е.А., Малинина Н.И., Селимов М.А., Боташева В.С. Исследование кардиотоксичности ниосомальной формы доксорубицина. *Медицинский вестник Северного Кавказа*. 2016. Т. 11. № 3.

2. Базиков И.А., Бейер Э.В., Мальцев А.Н., Гоптарева Е.А., Малинина Н.И., Боташева В.С., Королькова В.И. Изучение гепатотоксичности ниосомальной формы доксорубицина. *Медицинский вестник Северного Кавказа*. 2016. Т. 11. № 4.– 525 с.

3. Королькова Н.И., Базиков И.А., Зеленский В.А., Гоптарева Е.А., Хатков Э.М. Антибактериальная эффективность ниосомальных цитостатиков при меланомах челюстно–лицевой области//В сборнике: Биотехнология: взгляд в будущее Материалы III международной научно–практической конференции. 2017. С. 45–51.

4. Гоптарева Е.А., Базиков И.А., Бейер Э.В., Мальцев А.Н., Лысогора В.А.//Определение диапазона переносимых, токсических и летальных доз препарата «Регенерин» при местном применении В сборнике: Биотехнология: взгляд в будущее Материалы III международной научно–практической конференции. 2017. С. 76–78.

5. Базиков И.А., Гукасян А.Л., Гоптарева Е.А., Бинатова В.В., Мальцев А.Н. Разработка ниосомального седативного геля с фитоэкстрактами//В сборнике: Биотехнология: взгляд в будущее Материалы III международной научно–практической конференции. 2017. С. 82–87.

6. Сумкина О.Б., Калинкина Н.И., Гоптарева Е.А., Базиков И.А., Королькова В.И. Экспериментальные исследования химических ожогов кожи при лечении препаратом «Регенерин»//В сборнике: Биотехнология: взгляд в будущее Материалы III международной научно–практической конференции. 2017. С. 88–92.

7. Базиков И.А., Долгалев А.А., Мальцев А.Н., Зеленский В.А., Аветисян З.А., Гоптарева Е.А., Королькова В.И., Брусницын Д.А. Сравнительное исследование процессов адгезии и пролиферации фибробластов на биорезорбируемых мембранах «кардиоплант» и bio-gide//*Медицинский алфавит*. 2017. Т. 1. № 1. С. 16–19.

8. Базиков И. А., Мальцев А. Н., Зеленский В. А., Королькова В. И., Калинкина Н. И., Гоптарева Е. А. Антимикробная активность ниосомального геля с доксорубицином в комплексном лечении меланомы челюстно–лицевой области// *Бактериология*.– 2017. — 2 (1) — 61–65 с.

9. Базиков И.А., Долгалев А.А., Квочко А.Н., Зеленский В.А., Матюта М.А., Долгалева А.А., Гоптарева Е.А., Королькова В.И. Оценка репаративной способности, антимикробной и лимфоцитарной активности ниосомального геля «Регенерин» в стоматологической практике *бактериология*. 2018. т. 3.. с. 7–11.

10. Гоптарева Е.А., Базиков И.А. Изменения микрофлоры пародонта при применении ниосомального геля «Регенерин» в стоматологической практике//

В сборнике: Материалы IV национального конгресса бактериологов и международного симпозиума «Микроорганизмы и биосфера «Microbios–2018» сентябрь 2018г. Омск, С. 32–34.

11. Гоптарева Е.А., Базиков И.А. Изучение антимикробной активности модифициро–ванных атомами серебра ниосом с фитоэкстрактами к пародонтопатогенам.// В сборнике: Материалы IV национального конгресса бактериологов и международного симпозиума «Микроорганизмы и биосфера «MICROBIOS–2018» сентябрь 2018г., Омск, С.38–40.

12. Гоптарева Е.А., Базиков И.А., Долгалев А. А., Королькова В.И Антимикробная активность ниосомального геля «регенерин» при лечении пародонтита»//В сборнике: Биотехнология: взгляд в будущее Материалы 5 международной научно–практической конференции. 2019. С.143–146.

13. Гоптарева Е.А., Базиков И.А., Долгалев А. А., Ефременко А.А., Королькова В.И функциональные показатели лимфоцитов крови при лечении пародонтита ниосомальным гелем «регенерин» //в сборнике: биотехнология: взгляд в будущее, Материалы 5 международной научно–практической конференции. 2019. С.151–155.

14. Гоптарева Е.А., Базиков И.А., Долгалев А. А., Ефременко А.А., Королькова В.И репаративная способность ниосомального геля «регенерин» при лечении пародонтита//в сборнике: биотехнология: взгляд в будущее Материалы 5 международной научно–практической конференции. 2019. С.163–166.

СПИСОК ОСНОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АОЗТ – акционерное общество закрытого типа

АСМ – атомно–силовая микроскопия

БАВ – биологически активные вещества

ВАК – Высшая аттестационная комиссия

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения

ГИ – индекс гигиены

ДДМ – диско–диффузионный метод

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИДЖ – индекс десневой жидкости

ИПС – индекс периферического сопротивления

ИЭ – индекс эластичности

КПУ – сумма кариозных, пломбированных и удаленных постоянных зубов у одного человека

МИК – минимальная ингибирующая концентрация

МКБ – международная классификация болезней

мкМ – микрометр

НИР – научно–исследовательская работа

Нм – нанометр

ПАВ – поверхностно–активное вещество
ПВС – поливиниловый спирт
ПК – пародонтальный карман
ПМА – папиллярно–маргинально–альвеолярный индекс
ПТС – показатель тонуса сосудов
ПЦР – полимеразная цепная реакция
ПЭГ – полиэтиленгликоль
ПЭМ – просвечивающая электронная микроскопия
рентген лучи фотоэлектронной спектроскопии (XPS)
РПГ – реакция пассивного гемолиза
СтГМУ – Ставропольский государственный медицинский университет
СЭМ – сканирование на электронном микроскопе
ТД – терапевтическая доза
ТУ – техническое условие
УФ – ультрафиолетовые лучи
ФС – Федеральный стандарт
ЦНИИС – Центральный научно–исследовательский институт стоматологии
ЯО – ядрышковый организатор
CFU – colony–forming unit
FTIR – Fourier–transform spectroscopy
IBM – International Business Machines
NCCLS – Национальный комитет по клиническим лабораторным стандартам
p – уровень значимости
РВІ – papilla bleeding index
pH – водородный показатель
PI – пародонтальный индекс
PMA – папиллярно–маргинально–альвеолярный индекс
RES – ретикуло–эндотелиальная система