

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

*На правах рукописи*

**ГОПТАРЕВА ЕКАТЕРИНА АЛЕКСЕЕВНА**

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

03.02.03 – микробиология

Диссертация на соискание учёной степени  
кандидата медицинских наук

**Научный руководитель:**

доктор медицинских наук, профессор  
Базиков Игорь Александрович

Ставрополь, 2019

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ .....	5
ГЛАВА 1. ПОВЫШЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ АНТИМИКРОБНОЙ ТЕРАПИИ ПРИ ПРИМЕНЕНИИ НИСОСОМАЛЬНЫХ ГЕЛЕЙ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ) .....	13
1.1 Применение антимикробных препаратов для лечения пародонтита .....	13
1.2. Антимикробные свойства атомов серебра .....	24
1.3 Таргентная доставка лекарственных веществ с помощью наночастиц. ....	31
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ .....	5
2.1. Микробиологические и молекулярно–генетические методы исследования биоплёнок полости рта и чувствительности пародонтопатогенов к ниосомальным гелям.....	39
2.2. Модификация ниосом атомами серебра.....	41
2.3. Технология получения ниосомальных гелей.....	41
2.4. Экспериментальные методы исследования на животных .....	44
2.5. Цитологические и морфометрические исследования лимфоцитов при использовании антимикробного ниосомального геля с атомами серебра.....	45
2.6. Методы оценки эффективности применения ниосомальных гелей .....	47
2.6.1. Определение чувствительности выделенной микрофлоры к серебрённым ниосомам и ниосомальным гелям .....	47
2.6.2. Клинические методы исследования эффективности антимикробного ниосомального геля с атомами серебра .....	48
ГЛАВА 3. ИЗУЧЕНИЕ АНТИМИКРОБНОЙ, ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ И КЛИНИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ НИСОСОМАЛЬНОГО ГЕЛЯ С АТОМАМИ СЕРЕБРА .....	50
3.1. Электронная и атомно–силовая микроскопия ниосом с атомами серебра	50
3.2. Изучение токсичности антимикробного ниосомального геля.....	53
3.3. Антимикробная активность ниосомальных гелей, модифицированных атомами серебра .....	54
3.4. Функциональная активность лимфоцитов .....	60
3.5. Результаты лечения пародонтита антимикробным ниосомальным гелем, модифицированным атомами серебра.....	66
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	72
ВЫВОДЫ .....	88
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ .....	89
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	90

## 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

PBI – papilla bleeding index

pH – водородный показатель

PI – пародонтальный индекс

PMA – папиллярно–маргинально–альвеолярный индекс

RES – ретикуло–эндотелиальная система

## ВВЕДЕНИЕ

### **Актуальность темы исследования и степень её разработанности**

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 [8, 29, 51, 99, 100, 122]. Хронические инфекции вызывают не только местные воспалительные изменения, но и воздействуют на организм в целом. Патология пародонта, часто сопровождается такими осложнениями, как пищеварительные дисфункции, нарушения психоэмоциональной сферы, снижение иммунологической резистентности [74,88,120].

Данная стоматологическая патология является даже не столько медицинской, сколько социальной проблемой [66, 92, 93, 148, 205]. В связи с этим, профилактика и лечение заболеваний пародонта и слизистой оболочки рта, остаётся одной из актуальных проблем современной медицины [16, 24, 162, 207]. Пародонтит – это воспалительное заболевание, ведущее к утрате зубов, которое во многом обусловлено формированием микробной биоплёнки в области края десны. Наддесневая биоплёнка распространяется по эмали зуба, а поддесневая биоплёнка располагается по шейке до корня зуба [80, 89]. Это объясняет необходимость антимикробной терапии пациентов с заболеваниями пародонта, направленной на удаление зубного налета и гигиенические мероприятия в полости рта [20, 45, 54, 79].

Неотъемлемой частью микробиоты полости рта является нормальная микрофлора. Она постоянно подвергается атаке любыми факторами, обеспечивая колонизационную резистентность [87]. В развитии заболеваний пародонтасимбионты и условно–патогенные микроорганизмы играют ведущую роль [37, 85, 89, 137].

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 [22, 30, 128, 138]. Адресная доставка лекарств при помощи 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 необходимой для его антимикробной активности [14, 22, 61, 117].

Для антимикробной терапии в пародонтологии используются фитоэкстракты из лекарственных трав солодки, ромашки, шалфея, календулы, зверобоя, обладающие мягким антибактериальным и противовоспалительным действием [65]. Лекарственные фитоэкстракты содержат антимикробные вещества и эффективны для лечения заболеваний пародонта. Резистентность микробов к ним возникает гораздо реже и медленнее [157].

Основную роль в противодействии пародонтопатогенам биопленок оказывают нейтрофильные лейкоциты, лимфоциты и цитокины [70, 76, 126]. Плацентарная ткань содержит уникальное сочетание низкомолекулярных природных антимикробных и регенераторных пептидов, однако широких исследований их воздействия на пародонтопатогены биоплёнок не проводились [5].

Полирезистентные штаммы микроорганизмов могут быть подавлены различными соединениями наноразмерных величин. Привлекают внимание различные антимикробные агенты, перспективными считаются материалы с

атомами серебра [98]. Высокая химическая активность позволяет им образовывать комплексные соединения с другими веществами с новыми свойствами. Известно, что атомы серебра могут связываться с нуклеиновыми кислотами. При разрушении белков, они проникают через мембраны микроорганизмов, оказывая на них повреждающее действие [107]. В 2009 году И.А.Базиковым и соавторами зарегистрировано научное открытие «Явление трансдермального переноса биологически–активных веществ с помощью ниосом кремнийорганической природы» [7]. Преимуществами таких наноконтейнеров являются: 1) деградация путём окисления и гидролиза, что свидетельствует о стабильности и чистоте 2) отсутствие органических растворителей при получении, 3) возможность модификации поверхности для регулирования направленной доставки [105, 201].

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.

Необходимость идентификации доминирующих условно–патогенных микроорганизмов в биоплёнках полости рта продиктована выяснением антимикробной эффективности разработанных ниосомальных гелей. Представляет интерес воздействие ниосом, 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 серебрянных 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 с атомами серебра.

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

#### **Практическая значимость работы.**

Разработана технология модификации ниосом атомами серебра для получения антимикробного геля. Показана антимикробная активность разработанного геля к пародонтопатогенам биоплёнок ротовой полости. Ниосомальный гель сокращает сроки лечения в сопоставлении с традиционной наружной терапией пародонтитов. При применении антимикробного геля, модифицированного атомами серебра, выявлено усиление функциональной активности лимфоцитов. Обнаружено изменение параметров площади их ядер и средней суммарной площади. Доказанная эффективность антимикробного ниосомального геля демонстрируют целесообразность его применения при лечении заболеваний пародонта.

Стоматологические клиники Ставропольского края и Ростовской области уже используют результаты, полученные в ходе выполнения исследований. Данные работы применяются на кафедрах микробиологии и стоматологии СтГМУ при преподавании этих дисциплин. Для производства антимикробного ниосомального геля подготовлены технические условия (ТУ). Они внедрены на базе малого инновационного предприятия СтГМУ «Регенерация», г.

Ставрополь. В Ростове–на–Дону используются в Клинике Лазерной Медицины 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.

Объект исследования – клинические изоляты грамположительных и грамотрицательных пародонтопатогенных штаммов бактерий биопленки. Ниосомы, модифицированные атомами серебра. Антимикробные фитοэкстракты и низкомолекулярные пептиды. Антимикробный ниосомальный гель. Пациенты с пародонтитом. Стоматологический статус у пациентов изучался в соответствии с рекомендациями ЦНИИС и ВОЗ, и включал осмотр, исследование гигиенического состояния полости рта, присутствие кариеса, особенности воспалительных изменений тканей пародонта. Использовались индексы КПУ, гигиены (ГИ), РМА и пародонтита. Дана оценка функциональной активности лимфоцитов и их белково–синтетической функции в зоне повреждения слизистой оболочек больных пародонтитом. Все

полученные клинические и лабораторные данные заносились в медицинскую карту, разработанную на основании предложений ЦНИИС.

**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.

**Личный вклад диссертанта в исследование.**

Автор принимал участие в планировании, постановке целей и задач исследования. Диссертант самостоятельно проанализировала и обобщила большой объём 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.

#### **Апробация работы.**

Результаты работы докладывались на всероссийских и международных 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.

#### **Публикации.**

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.

#### **Объем и структура диссертации.**

Материалы диссертации изложены на 114 страницах компьютерного текста и включают введение, обзор литературы, описание 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 нанотехнологии лекарственных средств Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Ставропольский государственный медицинский университет» Минздрава России в соответствии с планом НИР вуза.

# ГЛАВА 1. ПОВЫШЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ АНТИМИКРОБНОЙ ТЕРАПИИ ПРИ ПРИМЕНЕНИИ НИСОМАЛЬНЫХ ГЕЛЕЙ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

## 1.1 Применение антимикробных препаратов для лечения пародонтита

Инфекционные агенты являются основной причиной пародонтитов, поэтому правильное назначение антимикробных средств имеет решающее значение в лечении заболеваний пародонта [10, 31, 39, 41, 109]. Как правило, такие инфекции являются полимикробными комбинациями грамположительных, грамотрицательных, факультативных и строгих анаэробных бактерий [95, 193].

Устойчивость к антибиотикам может являться основной проблемой, с которой сталкиваются специалисты при лечении пародонтитов различной сложности. Основная причина резистентности формирование антибиотикоустойчивой популяции микроорганизмов, как правило, при неправильном назначении антибиотиков. В стоматологии существуют два объяснения этому: ограниченные знания в области терапии, когда назначаются в основном пенициллины, и во-вторых безрецептурное самолечение антибиотиками.

Растущая устойчивость к лекарственной терапии микроорганизмов сопровождается появлением новых патогенных штаммов. Поиск новых лекарственных средств, обладающих антимикробной активностью и отсутствием побочных эффектов приводит учёных к изучению лекарственных растений [44, 67]. Препараты на основе фитоэкстрактов, наиболее эффективны в лечении хронических заболеваний пародонта [17, 25, 65]. Современные исследования подтверждают данные об активном использовании антимикробных свойств лекарственных растений в традиционной медицине Индии, Китая, Тибета, Монголии, Кореи, а также Ирана и Персии [2, 33, 34, 77,

82, 83, 96, 97]. Имеются много данных о том, что фитозэкстракты обладают антимикробной активностью в отношении многих грамположительных и грамотрицательных патогенных бактерий. Особенно это касается микроорганизмов, способных образовывать микробную пленку и высокоустойчивых к антибиотикам. У ряда растений, антимикробное действие превосходит таковое у антибиотиков.

Так, мексиканскими учёными в 2016 г исследована антимикробная активность 343 видов лекарственных растений *in vitro* [184, 187]. Результаты исследований подтвердили антибактериальную эффективность большинства выделенных фитозэкстрактов, относящихся к 92 ботаническим семействам. Растения семейств *Asteraceae*, *Fabaceae*, *Lamiaceae* and *Euphorbiaceae* были наиболее активны в отношении 72 видов бактерий, включавших *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*, причём помимо антимикробной активности, они могут быть использованы и для лечения других патологических состояний. Исследователями описана их антибактериальная активность также в отношении микробной пленки, которая наиболее устойчива к действию антибиотиков. Такие плёнки образованы нозокомиальной бактериальной флорой и являются причиной серьёзных осложнений у пациентов [184].

Полынь горькая – растение семейства *Asteraceae*, из которого выделяют 6000 сесквитерпеновых лактонов. Эти природные соединения, обладают широким спектром антимикробного и противовоспалительного действия [42,84]. В лекарственных травах семейства *Asteraceae* содержится партенолид, способный останавливать резорбцию костной ткани пародонта, индуцируемую липосахаридами микроорганизмов [150, 218].

Кречина Е.К. (2012) установила высокую эффективность применения аппликаций 5%-го водного раствора *Artemisa absinthium L.* в комплексном лечении воспалительных заболеваний пародонта. В своих исследованиях она показала улучшение кровообращения тканей пародонта за счет нормализации

тканевого кровотока. Приенение *Artemisa absinthium* L. способствовало снижению содержания простогландинов E2 в смешанной слюне, что сокращало сроки воспаления.

Такие лекарственные растения, как женьшень, элеутерококк, бриония, эхинацея, содержат природные композиции биологически активных веществ, оказывающих иммуностропное действие. Куттубаева К.Б. и соавт. (2002) в своих исследованиях продемонстрировали, что повышение защитных сил организма, иммунного статуса влияет на эффективность лечения хронического генерализованного пародонтита и является не менее важной задачей, чем санация ротовой полости, антибактериальная и противовоспалительная терапия. Иммуномодулирующее действие галеновых препаратов черемухи Грея изучено при лечении 68 пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом. Учёные продемонстрировали уменьшение воспалительно–деструктивного процесса в тканях пародонта при лечении фитопрепаратом из черемухи Грея [47].

Вьетнамские учёные исследовали 12 фитоекстрактов традиционных растений, произрастающих на этой территории и выявили у этих растений высокую антимикробную активность в отношении к грам – положительной (*Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, and *Staphylococcus aureus*), и грам – отрицательной (*Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*) патогенной флоры in vitro [210].

Канадские исследователи в эксперименте in vitro изучали Кипрей узколистый (русское народное название – Иван–чай), как антисептик [108]. Авторы продемонстрировали выраженную антимикробную активность экстракта этого растения, показав, что он значительно ингибирует рост *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus* и *Pseudomonas aeruginosa*. Представляют интерес сведения о том, что экстракт кипрея ингибирует рост бактерий в культуре, более интенсивно, чем ванкомицин или тетрациклин [108].

При исследовании *in vitro* антимикробной активности этаноловых экстрактов семи видов типичных индийских специй и трав (куркума, черный перец, тмин, пажитник, корица, кардамон, гвоздика и имбирь лекарственный) изучалась чувствительность этих экстрактов к выделенным у пациентов высокоустойчивым к гентамицину штаммам энтерококка (*Enterococcus faecalis* в 80–90% и *E. fecium*). Наиболее выраженная антимикробная активность обнаружена у у корицы и имбиря, менее эффективны экстракты гвоздики и тмина, достоверные результаты были получены у экстракта пажитника. Черный перец и кардамон не обладали такими свойствами [188].

Максимальная антимикробная активность была продемонстрирована у экстрактов куркумы, корицы и водного экстракта чеснока относительно *E. coli* и *B. subtilis* [114, 165].

Kozłowska M. et al., в 2015 году выявлено, что штаммы золотистого стафилококка обладают чувствительностью к водным (этанольным и метанольному) экстрактам розмарина и шалфея водно–метанольному экстракту тимьяна. Бактерии *Klebsiella pneumoniae* и *Proteus vulgaris* были более восприимчивы к водно–метанольной вытяжке тимьяна, а *Listeria monocytogenes* была наиболее чувствительна к водно–этанольному экстракту розмарина [144]. Установлено, что грамположительные бактерии, как правило, более чувствительны к тестируемым экстрактам, чем грамотрицательные.

Исследования Orhan I.E. et al. в 2011 году продемонстрировали значительно превосходящее антибактериальное действие ампициллина, к которому бактерии были устойчивы и офлаксоцина эфирных масел фенхеля, двух видов мяты базилика, трех видов душицы. Эфирные масла фитоэкстрактов подвергали скринингу на 10 изолированных штаммах *Klebsiella pneumoniae*. Этот микроорганизм продуцирует бета–лактамазу, и делает этот его устойчивым ко многим антибиотикам.

Представляет интерес изучение синергичного действия экстрактов растений, примененных одновременно. В ряде работ есть сообщения о том, что

водные фитоэкстракты нескольких лекарственных растений, содержащие большее число химических веществ, обладают синергизмом, усиливающим антибактериальное действие при одновременном использовании. Так, проведена оценка антимикробной активности водных и спиртовых экстрактов Мелиссы лекарственной и Лавсонии безостой (хна) к таким наиболее устойчивым к антибиотикам патогенным бактериям, как *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter*, *Klebsiella pneumoniae*, и *Pseudomonas aeruginosa*. Максимально высокой активностью экстракты обладали по отношению к золотистому стафилококку, причём водные экстракты превосходили по действию спиртовые, поскольку содержали максимальное количество химических веществ [182].

В стоматологической практике нередко применяют лекарственные растения, обладающие противовоспалительными и вяжущими свойствами, а также содержащими дубильные вещества, к примеру, дуб обыкновенный, черника обыкновенная, арония черноплодная и др.

В последние годы приобретают популярность комплексные препараты, включающие фитоэкстракты многих растений, обладающих противовоспалительным, регенерирующим, ранозаживляющим и антибактериальным действием. К примеру, известен водно–спиртовый экстракт 7 видов растительного сырья: цветков ромашки, листьев мяты перечной, травы маклей сердцевидной, цветков ноготков, листьев шалфея лекарственного, травы эхинацеи пурпурной, травы тысячелистника [7, 9, 73]. В нём содержится ряд биологически активных веществ. Шалфей, ромашка, мята и тысячелистник содержат эфирное масло, эхинацее – комплекс фенолкарбоновых кислот, календуле – флавоноиды, в маклее – алкалоиды группы хелидонина. Мягким антибактериальным, противовоспалительным и вяжущим действием обладают настои лекарственных трав – солодки, ромашки, шалфея, календулы, коры дуба, зверобоя. Эти фитоэкстракты также широко применяются в пародонтологии [3, 11, 15, 25, 32, 43, 44, 49, 64]. Однако длительное

применение фитоэкстрактов может привести к появлению сухости, жжения слизистой оболочки рта, развитию дисбактериоза, нарушению вкусовой чувствительности, снижению защитных свойств слюны [15, 57].

Тем не менее, большинство лекарственных растений с антимикробным действием, содержащие ряд биологически активных веществ, эффективно используются для лечения пародонтитов [12, 13, 55]. Фитопрепараты с антимикробным действием повышают иммунитет, а резистентность микроорганизмов к ним возникает гораздо реже и медленнее, чем у антибиотиков [1].

Устойчивость микроорганизмов к пенициллинам и другим  $\beta$ -лактамам связана с одним из следующих механизмов: инактивация антибиотика бета-лактамазой, модификация целевых пенициллинсвязывающих белков, нарушение проникновения лекарственного средства [193]. Производство микроорганизмами бета-лактамазы является наиболее распространенным механизмом сопротивления [111].

Абсолютными показаниями для применения антибиотиков являются появление гноя в пародонтальных карманах, абсцедирование, изменения костной ткани, предварительная подготовка к хирургическому лечению, а также послеоперационный период [197, 198, 202]. Спектр современных антимикробных препаратов [63] широко используемый в пародонтологической практике в Российских клиниках включает такие антимикробные препараты, как макролиды, тетрациклины, фторхинолоны и другие [217].

Пенициллины все ещё являются одними из самых безопасных лекарств. Однако, нейротоксичность, нефротоксичность и катионная токсичность (гипокалиемия) иногда может встречаться среди восприимчивых пациентов [109, 140, 147, 203]. Пенициллины можно разделить на четыре широких категории, каждая из которых охватывает различный спектр антимикробной деятельности. Натуральные пенициллины (пенициллин G и пенициллин V) обладают активностью в отношении многих грамположительных организмов,

грамотрицательных кокков и некоторых других микроорганизмов. Аминопенициллины (ампициллин, амоксициллин, бакампициллин и пивампициллин) имеют активность в отношении чувствительных к пенициллину грамположительных бактерий, а также кишечной палочки, *Proteus mirabilis*, *Salmonella sp.*, *Shigella sp.* Антистафилококковые пенициллины (клоксациллин, диклоксациллин и др.) также активны против бета – лактамаз – продуцирующих стафилококков. Антипсевдомональные пенициллины обладают меньшей активностью в отношении грамположительных микроорганизмов, чем природные пенициллины или аминопенициллины [118]. Пенициллины нетоксичны и являются удивительно безопасным препаратом. Реакция гиперчувствительности, ведущая к анафилаксии – единственная серьезная проблема у 5–10% пациентов, принимающих пеницилл. Исследователи отмечают небольшие побочные эффекты включающие тошноту, рвоту, боль и воспаление в месте инъекции после внутримышечного введения [177].

Фторхинолоны – класс искусственных антибиотиков. Более 10000 аналогов фторхинолонов были синтезированы, в том числе, из них несколько с очень широким назначением. Фторхинолоны, используемые в настоящее время имеют большую эффективность, более широкий спектр антимикробной активности и лучший профиль безопасности, чем их предшественники [109]. Левофлоксацин широко распространен на фармакологическом рынке и является антибиотиком широкого спектра действия, относится к классу препаратов фторхинолонов (третье поколение хинолонов) [168]. Он действует на микроорганизмы, являющиеся возбудителями воспалительных процессов дыхательных путей, желудочно–кишечного тракта и мочевыводящих путей. К таким бактериям относят грамположительный золотистый стафилококк, эпидермальный стафилококк, бетагемолитический стрептококк, а также грамотрицательные бактерии (*Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Legionella pneumophila*, *Proteus mirabilis* и *Pseudomonas aeruginosa*) и

атипичные бактериальные патогены (*Chlamydophila pneumoniae*). Ципрофлоксацин, левофлоксацин, являются менее активными в отношении грамположительных бактерий, чем левофлоксацин. Иногда возникают серьезные побочные эффекты, описанные в медицинской литературе [140, 153, 195]. В пародонтологии пенициллины и левофлоксацин используются довольно часто.

В 2003 году появились сообщения о том, что хронические воспалительные заболевания пародонта не являются показаниями для применения антибиотиков. Учёными показано, что системные противомикробные препараты должны использоваться только при острых состояниях пародонта, в случаях невозможности провести дренаж или санацию. Недостатками системных противомикробных препаратов являются аллергические реакции, суперинфекция, токсичность и бактериальная резистентность [101].

В 2006 году отмечено, что наиболее эффективно использовать метронидазол с амоксициллином в качестве единственной терапии, воздействующей на субгингивальную микробиоту хронического пародонтита [156]. Это было подтверждено в исследовании, проведенном с двадцатью двумя пациентами с нелеченным хроническим пародонтитом. В 2013 году Анна К. Шкарадкевич и Томаш М. Карпинский описали пародонтит как хронический инфекционный процесс, разрушающий ткани пародонта. Учёными доказано, что анаэробные бактерии действуют на фибробласты, эпителиальные и эндотелиальные клетки, а также на компоненты внеклеточного матрикса [200]. Учёные пришли к выводу, что амоксициллин не оказывает влияния на лечение хронического пародонтита по сравнению с метронидазолом, который влияет на анаэробные кокки, и анаэробные грамотрицательные бациллы [109].

При сравнении эффективности левофлоксацина с офлоксацином, ципрофлоксацином, ампициллином, цефокситином и метронидазолом для выбранной группы анаэробов, выделенных из кожи и мягких тканей, выявлено,

что левофлоксацин обладает хорошей активностью в отношении определенных групп анаэробных изолятов (виды *Bacteroides*, *Veillonella*, *Prevotella* и *Porphyromonas*) [214]. Среди наиболее важных проблем при использовании пенициллинов – это аллергия. Аллергические реакции включают анафилактический шок (0,05% реципиентов); сывороточные реакции (крапивница, лихорадка, отек суставов, ангионевротический отек, интенсивный зуд и проблемы с дыханием, возникающие через 7–12 дней после применения, а также различные кожные высыпания [111]. При аллергических реакциях, левофлоксацин может быть безопаснее среди первого, второго или четвертого поколения хинолонов [154]. В 2003 году Штейн Г.Е., Гольдштейн Е.Ю. в клинических испытаниях левофлоксацина подтвердили его эффективность, при лечении пациентов, имеющих анаэробную микрофлору [196].

В 2014 году Авани Р. Прадип и др. провели исследование 65 пациентов с хроническим пародонтитом, в котором испытуемая группа получала перорально левофлоксацин 500 мг один раз в день. Результаты показали, что пациенты, получающие левофлоксацин, значительно улучшили клинико–микробиологические показатели при хроническом пародонтите [180]. В 2013 году Vorole В.М. и соавторы использовали стоматологический гель с левофлоксацином полугидратом. Результаты применения оценивались по таким параметрам биодоступности, как физико–химические свойства, вязкость, гелеобразование, температура гелеобразования, растекаемость, и стабильность [115]. Позже в 2014 году Неха Бишт и соавторы для создания стоматологического геля использовали карбопол 934Р и натрия–карбокси–метилцеллюлозу вместе с гидроксилпропилметил–целлюлозой для пролонгирования высвобождения левофлоксацина. Оценивались гелеобразующая способность, вязкость, прочность геля, сила биоадгезива, растекаемость, микробиологические исследования и высвобождение *in vitro*. Гель с левофлоксацином продемонстрировал хорошую антимикробную активность, увеличенное время пребывания и длительное высвобождение

лекарства, составившее более 8 часов (Prabushankar G.L.,2010). Обычные лекарственные формы, такие как растворы и мази имеют много недостатков, что приводит к плохой биодоступности препарата (Neha Bisht, 2014). В 2010 году Прабушанкар G.L., Gopalkrishna B., Manjunatha K.M., Girisha C.H. разработали и использовали полимеры, содержащие левофлоксацин для воздействия на пародонтальные ткани [179]. Исследования характеристик *in vitro* выявили, что левофлоксацин в такой форме пригоден для медленного высвобождения.

Амоксициллин – антибиотик с широким спектром, но он не эффективен против грамотрицательных микроорганизмов, поэтому метронидазол используется во многих терапевтических схемах [156]. Амоксициллин предпочтительнее, чем пенициллины, даже по сравнению с более новым (4–го) поколением хинолонов, что связано с его широким спектром деятельности и биодоступностью (100% по сравнению с 60–70% для пероральных пенициллинов) [215]. Чаще всего, стоматологи назначают комбинацию амоксициллина с метронидазолом [175].

В России также часто применяют такие антимикробные средства, как тетрациклин, доксициклин, моноциклин, линкомицин [78, 80, 86].

Отечественный антибиотик линкомицин повышает неспецифическую реактивность организма. Отмечено, что даже терапевтические дозы приводят к его накоплению в костной ткани. Рядом исследователей доказана эффективность линкомицина при обострении хронической формы пародонтита [18]. Установлено, что препарат быстро всасывается, поступает в различные органы и ткани.

Наиболее типичными представителями микрофлоры пародонтальных карманов являются анаэробы и микроаэрофилы, на которые эффективно действуют сумамед и рулид. Поглощение лекарственных молекул Рулида фагоцитами, позволяет ему эффективно действовать в очаге воспаления [18, 78,79,81]. Ограничением использования антибиотиков и сульфаниламидов

являются: индивидуальная непереносимость к препарату, нарушение равновесия макроорганизма и микроорганизмов, а также побочные реакции [17, 32].

К антисептикам, воздействующим на микроорганизмы, относят перекись водорода, перманганат калия и хлоргексидин. Однако эти препараты угнетают слюноотделение и снижают местный иммунитет [72, 85]. Учёными описаны бактерицидные и бактериостатические свойства хлоргексидина глюконата, основанные на абсорбции через стенку клеток микроорганизмов его активных веществ, в результате чего происходит преципитация и коагуляция цитоплазмы бактерий с их последующим лизисом. Ограничением использования хлоргексидина глюконата при лечении является окраска эмали зубов в желто-коричневый цвет, воздействие на вкусовые рецепторы [23, 110].

К антимикробным препаратам относится также метронидазол, тинидазол, нифуртал и орнидазол, которые являются противопротозойным средством достаточно широкого спектра действия [17, 18,]. Они действуют на амебы, трихомонады, лямблии, бактериоды и другие анаэробные инфекции, применяются в пародонтальных повязках. Недостатком их применения является отсутствие воздействия на аэробные микроорганизмы. Хотя перечисленные препараты воздействуют лишь на часть микрофлоры, однако, в целом, их назначение приводит к количественной стабилизации микрофлоры за счёт уменьшения численности некоторых видов анаэробов [24, 38].

Таким образом, стремление исследователей повлиять на различные звенья патогенеза воспалительного процесса привело к появлению большого количества лекарственных средств для лечения пародонтита [48, 65]. Тем не менее, в настоящее время не существует оптимального антимикробного лечения заболеваний пародонта, что является мотивом для разработки систем доставки лекарственных веществ. Адресность доставки лекарственных веществ и пролонгированность за счёт инкапсулирования приводит к повышению эффективности и оптимизации антимикробной терапии заболеваний пародонта.

Глобальный вызов человечеству – антибиотикорезистентность микроорганизмов. Так, как патогенные микроорганизмы являются причиной возникновения заболеваний пародонта, применение антимикробных препаратов является важнейшим компонентом терапии, а поиск и разработка новых антимикробных средств будут всегда актуальными.

Современная стратегия создания антимикробных препаратов, основана на концепции не только синтеза новых лекарственных молекул, но в первую очередь, на повышении терапевтической эффективности и снижении резистентности микроорганизмов при направленной доставке в зону поражения природных антимикробных веществ.

## **1.2. Антимикробные свойства атомов серебра**

Нанотехнологии в настоящее время играют ключевую роль практически во всех отраслях науки [176]. Серебряные наночастицы являются одним из самых изучаемых наноматериалов в биомедицинских исследованиях. Многократно доказано, что они обладают антибактериальными, противогрибковыми, противовирусными и противовоспалительными функциональными свойствами [104, 124].

Современные наноматериалы готовятся либо инкапсулированием атомов серебра в структуру матрицу, либо модификацией поверхности матрицы. Помимо широко используемых стандартных атомов серебра, существуют ещё три типа нестабильного состояния серебра во взаимодействии с кислородом:  $Ag^0$ ,  $Ag^{2+}$ ,  $Ag^{+3}$  [220]. Атомы серебра могут также взаимодействовать и с другими металлами [161]. Увеличение площади взаимодействия атомов серебра, имеющих наноразмеры, определяет их преимущество в способности воздействовать на микробную клетку [119]. В этой связи, наночастицы серебра активно используются для обработки ран, воды, предметов для новорожденных, биологических добавках, как антимикробные вещества [131, 159, 186, 219].

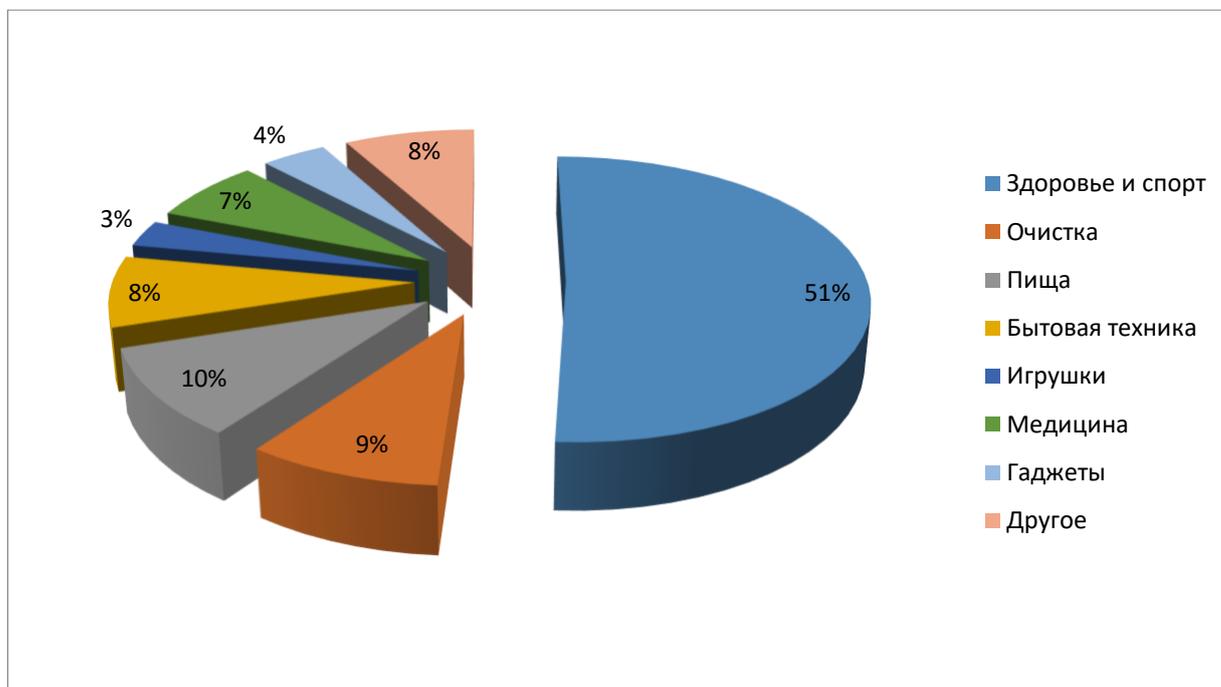


Рисунок 1. Использование наночастиц серебра в различных областях

Наночастицы серебра могут быть синтезированы различными физическими, химическими, биологическими и другими методами. Наиболее распространенными являются химические методы, при которых используются ряд неорганических и органических восстановителей, а также физико – химическое восстановление, радиолиз и электрохимические методы [174]. Подавляющее большинство этих методов до сих пор усовершенствуются для получения более высокой стабильности, накопления, сохранения морфологии и размера [191]. Кроме того, при получении наночастиц серебра, такие методы, как экстракция и очистка по–прежнему являются серьезной проблемой. Кроме того, наночастицы серебра могут быть использованы, как функциональные материалы [106]. Существуют также биологический метод синтеза [121, 155, 158] и метод с использованием полисахаридов [208]. Наночастицы серебра также могут быть синтезированы с помощью УФ–облучения, лазера, микроволнового воздействия и гамма–лучей [102, 167, 186, 206, 216]. Происходит следующий процесс: восстановление ионов серебра до атомов, которые затем поднимаются в кластеры олигомеров и преобразуются в

коллоидные частицы. Изготовление наночастиц серебра следует трем основным принципам, а именно: выбор безвредного растворителя, стабилизация наночастиц и контроль за окислительно – восстановительным потенциалом. Атомы серебра вместе с ионами меди используются для профилактики легионеллёза и в смеси с медью и хлором как дезинфицирующее средство в системах снабжения питьевой водой [130, 169]. Использование наночастиц серебра для покрытия различных материалов для придания функциональных свойств, продемонстрировано в таблице 1.

Таблица 1. – Покрытия наночастицами серебра в различных медицинских областях.

Стоматология	Нагруженная серебром нанокompозитная смола SiO <sub>2</sub> , используемая в качестве добавки в полимеризуемых компонентах зубов
Нейрохирургия	Покрытие катетера для дренирования спинномозговой жидкости
Уход за глазами	Нано–серебро используется в покрытии контактных линз
Анестезиология	Используется в покрытии дыхательной маски, а также в эндотрахеальной трубке для механической вентиляции
Диагностика	Нано–серебро используется при покрытии зондов для диагностических исследований

Учёными показано, что для придания антибактериальных свойств ткани целесообразно её обрабатывать нанопорошком, содержащим наночастицы серебра размером 50–60 нм [124, 127, 130, 142, 199]. Наночастицы серебра в сочетании с диоксидом титана обладают не только антибактериальной, но и противогрибковой эффективностью [116]. Исследована также антибактериальная эффективность наночастиц серебра на матрице полипропилена против золотистого стафилококка и кишечной палочки [212]. Поливиниловый спирт (ПВА) представляет собой нетоксичный, синтетический, а также водорастворимый полимер, используемый не только для стабилизации при синтезе наночастиц серебра, но также в комплексе с хитозаном проявляет

антимикробную активность в отношении патогенной микрофлоры для предупреждения пищевых токсикоинфекций [171]. Доказано, что антибактериальный препарат «Neosporin», содержащий наночастицы серебра, эффективен в лечении порезов, ожогов и царапин [142, 170, 178].

При характеристике синтезированных наночастиц серебра используют электронно–микроскопические, а также спектроскопические методы [145]. Это атомно–силовая микроскопия (АСМ), сканирующая электронная микроскопия, динамическое светорассеивание, УФ–видимая спектроскопия и инфракрасная спектроскопия с Фурье–преобразованием (FTIR). УФ–видимая спектроскопия является наиболее удобным и выполнимым методом для обнаружения нано–серебряных частиц, поскольку типичный пик в диапазоне 385–450 нм предсказывает их присутствие. Порошковая форма наночастиц серебра используется для захвата изображения СЭМ и дифракции рентгеновских лучей [143].

Атомно–силовая микроскопия используется для наблюдения за морфологией поверхности и размером соответствующих наночастиц серебра [146, 163]. Время от времени, после синтеза, наночастицы также рассматриваются при сканировании на электронном микроскопе (СЭМ) VEGA3 Tescan, который обеспечивает демонстрацию синтеза наночастиц [129] и морфологические структуры. Изображение с помощью сканирующей электронной микроскопии не только обеспечивает структурное изображение, но также обеспечивает изображение наночастицы и их размер (рисунок 2) [145].

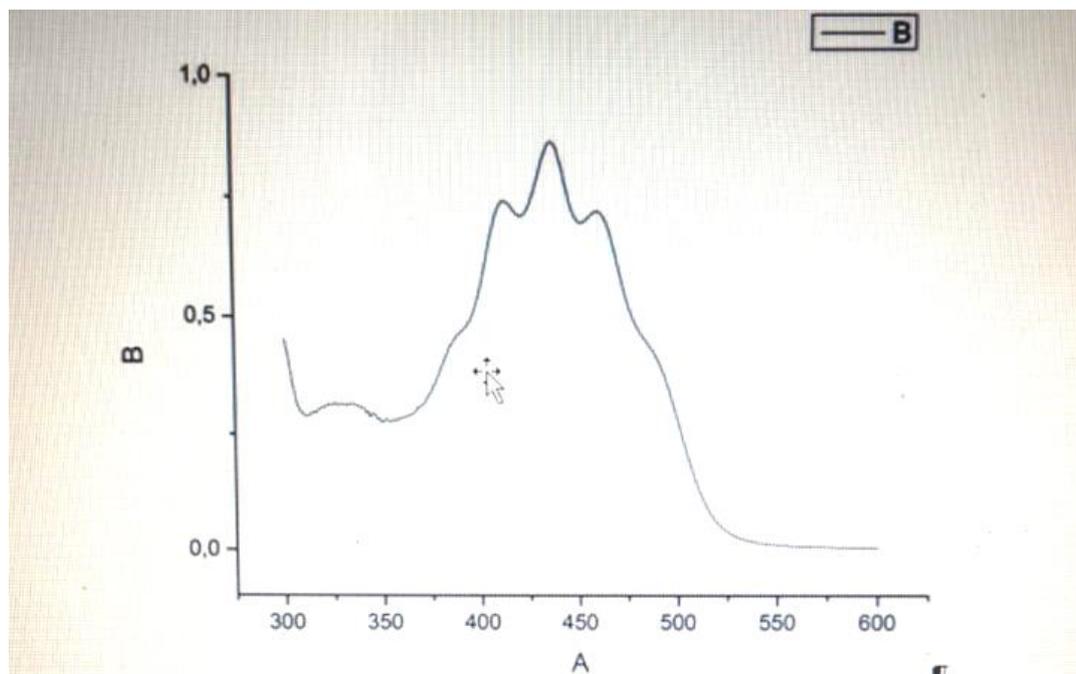


Рисунок 2. Пример УФ–видимых спектров наночастиц серебра

Динамическое светорассеивание (также известное, как фотонная корреляционная спектроскопия) представляет собой важный метод и в основном используется при определении размера очень мелких наночастиц серебра [134]. Просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ) демонстрирует кристаллический состав и форму наночастицы [194]. Покрытие медной сетки с угольной пленкой наночастицами серебра позволяет воде испариться внутри вакуумной сушилки и сканируется с помощью просвечивающего электронного микроскопа [145]. Точно так же, как рентген лучи фотоэлектронной спектроскопии (XPS) позволяют осмотреть валентность последующих наночастиц серебра, а также дают дополнительную информацию относительно состава наночастицы и инкапсулированных органических молекул [185]. С помощью анализа рентгеновской дифракции можно оценить структуру кристалла и соответствующий размер частиц [134]. Кристаллический размер рассчитывается исходя из ширины на полувысоте от пика дифракции с помощью уравнения Дебая Шеррера [163]. При спектрофотометрии [152] поглощение видимого диапазона непосредственно отражает воспринимаемый цвет химического вещества во всем процессе синтеза наночастиц серебра [163].

Для измерений расположения синтезированных наночастиц серебра, их центрифугируют при 10000 об / мин в течение 30 мин. Осадок трижды промывают 5 мл деионизированной воды, чтобы избавиться от свободных белков или химикатов, которые не покрывают наночастицы серебра. Затем осадок сушат с использованием вакуумной сушилки для последующего измерения (рисунок 3) [125].

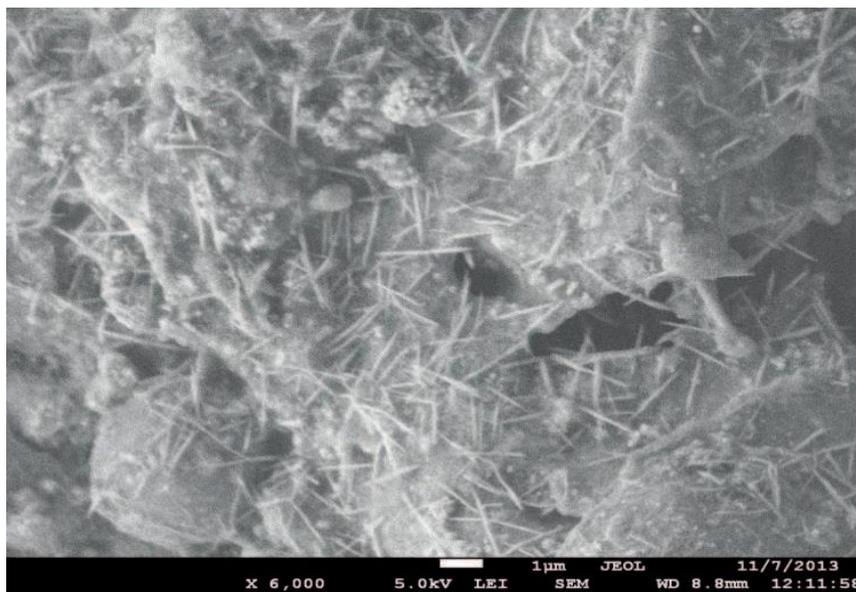


Рисунок 3. Изображение наночастиц серебра

Рядом исследователей получены данные по усилению антибактериального действия антибиотиков при использовании наночастиц серебра [135, 136, 139, 173]. Так, описано антимикробное действие пенициллина G, амоксициллина, эритромицина, клиндамицина и ванкомицина в отношении *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli* [190]. Учёными установлено, что антимикробное действие наночастиц серебра зависит от их фиксации и формы [133]. Наиболее эффективны серебряные наночастицы круглой формы, в форме полюсов, усеченных треугольных нанопластины (рисунок 4) [139].

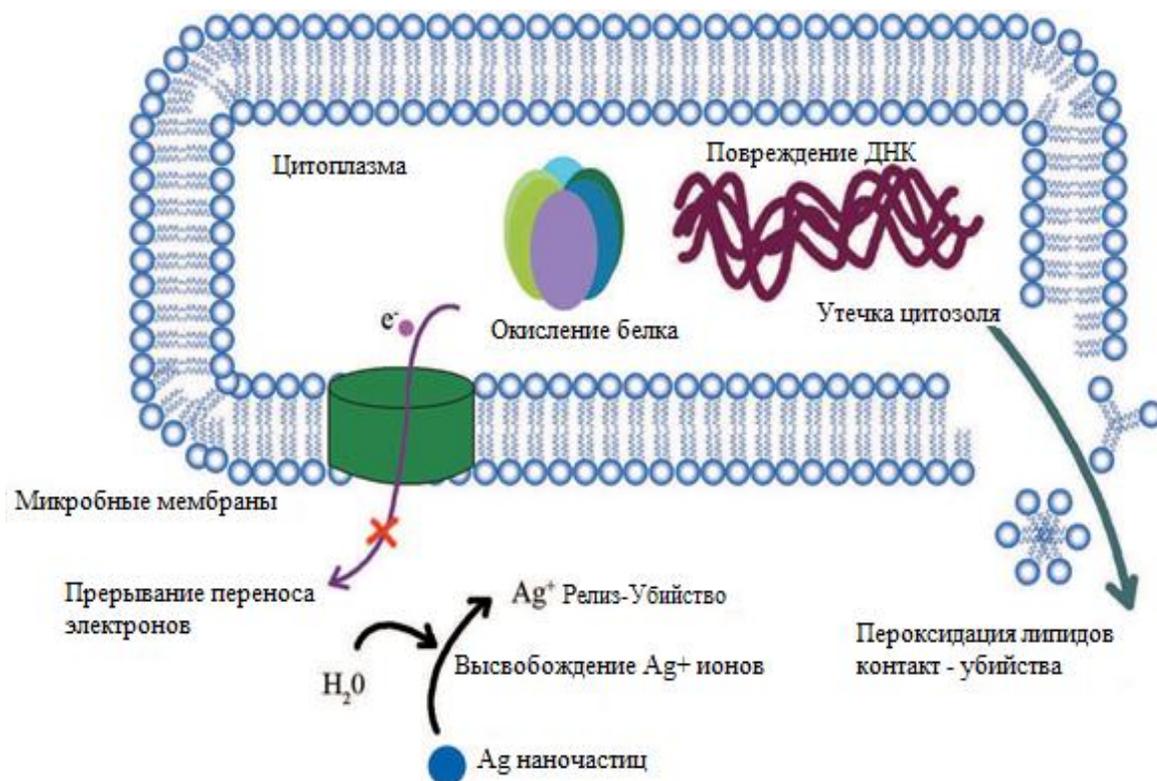


Рисунок 4. Наночастицы серебра, разрушающие клеточную мембрану

Биологическое действие наночастиц серебра зависит от морфологии и физико-химических свойств наночастиц, а также от особенностей микроорганизмов, с которыми сталкиваются наночастицы серебра [107, 132]. На антимикробную активность играют роль такие факторы, как форма, размер и дзета-потенциал частиц, рН ионные примеси и др. [151]. Учёными доказано, что основной антибактериальный эффект наночастиц серебра обусловлен частичным окислением наночастиц и продукцией серебряных ионов ( $\text{Ag}^+$ ) [192]. Происходит взаимодействие наночастиц серебра и ионов серебра ( $\text{Ag}^+$ ) с бактериальными белками, которое приводит к нарушению синтеза белков. Серебряные наночастицы оказывают непосредственное повреждение мембраны клетки, взаимодействующей с пептидогликанами клеточной стенки и плазматической мембраной, вызывающей лизис клеток [204].

### **1.3 Таргентная доставка лекарственных веществ с помощью наночастиц.**

В настоящее время 95 процентов всех новых потенциальных терапевтических средств имеют плохие фармакокинетические и биофармацевтические свойства [112]. Следовательно, есть необходимость разработать подходящую систему лекарств, которая распределяет терапевтически активные молекулы препарата целенаправленно до места действия, не влияя на здоровую ткань или орган [166]. Известны носители лекарственных веществ, при разработке которых использованы биоразлагаемые полимеры природного и синтетического характера, растворимые полимеры, микрокапсулы. Помимо этого для доставки лекарственных веществ используются такие клетки, как нейтрофилы, фибробласты, искусственные клетки, липопротеины, липосомы, ниосомы, иммунные мицеллы, моноклональные антитела [160]. Большинство клинических применений целевой доставки лекарств нацелены на ткань с или без экспрессии целевых молекул распознавания на липидной мембране. Микросферная система доставки лекарств, в последние годы, привлекла огромное внимание из-за ее широкого спектра приложений, поскольку оно охватывает нацеливание препарата на конкретный сайт для визуализации и оказания направленного действия [103]. В будущем, комбинируя различные другие стратегии, микросферы найдут центральное место в доставке новых лекарств, особенно в сортировке больных клеток, диагностике, генах и генетических материалах. Техника моноклональных антител включает слияние нормальных антител, продуцирующая В-клетки с миеломной клеткой для получения гибридной клетки или гибридомы в качестве носителя терапевтических агентов для доставки на конкретные сайты [213]. Очень медленный прогресс в лечении тяжелых заболеваний привел к принятию междисциплинарного подхода к адресной доставке и выпуску лекарств на основе нанотехнологий. Разрабатываемые

системы доставки лекарств и таргетирования направлены на сведение к минимуму вредных побочных эффектов, а также на повышение доступности препарата на поражённые ткани. Система адресной доставки лекарств предпочтительна в следующих ситуациях (рис. 5).

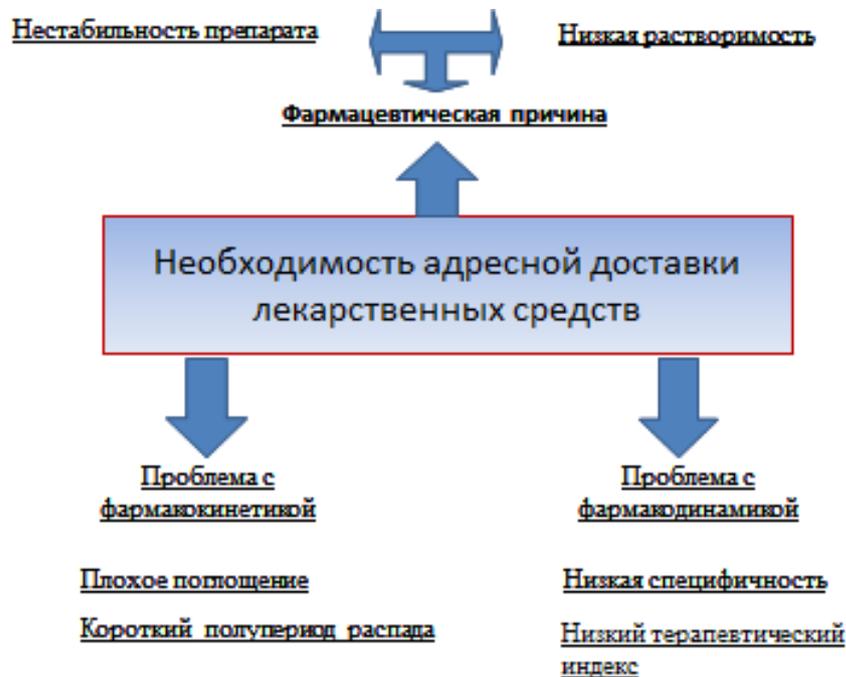


Рисунок 5. Необходимость применения адресной доставки лекарств.

Концепция адресной системы доставки была предложена ещё Полом Эрлихом, который был микробиологом. Он предложил идею лекарственной доставки в виде волшебной пули. Адресная доставка лекарств означает накопление фармакологически активных веществ в желаемой цели в необходимой терапевтической концентрации, в то же время, ограничивая доступ к нормальным клеткам, тем самым, сводя к минимуму терапевтический индекс. Проектирование и разработка потенциальных носителей для клеточно-специфической доставки лекарств должна основываться на поверхности клеток-мишеней, а также на понимании взаимодействия таких макромолекул. Помимо этого, к наночастицам для целевой доставки лекарственных средств предъявляется ряд требований [164].

– Наночастицы должны быть нетоксичными, биоразлагаемыми, биосовместимыми и физико-химически стабильными *in vivo* и *in vitro*.

– Иметь ограничение для доставки лекарств к клеткам–мишеням, тканям или органам или иметь равномерное распределение по капиллярам.

– Скорость высвобождения лекарств должна быть предсказуемой и контролируемой.

– Высвобождение лекарств не должно влиять на их доставку.

– При высвобождении лекарства необходимо его терапевтическое количество

– Во время доставки должна быть минимальная потеря лекарств.

– Используемый носитель должен быть биоразлагаемым или легко выводиться из организма без каких–либо проблем и болезненных состояний.

Носители можно разделить на растворимые, клеточные носители и типы частиц. Носители типа частиц включают липосомы, ниосомы, липидные частицы (с низкой и высокой плотностью липопротеинов), полимерные мицеллы, наночастицы, микросферы. Растворимые носители состоят из моноклональных антител и их фрагментов, модифицированные белки плазмы, пептиды и биоразлагаемые носители, состоящие из полимеров различного химического состава. Липосомы представляют собой небольшие пузырьки, состоящие из однослойных или многослойных фосфолипидных бислоев [149, 189, 209]. Заряд, липидный состав и размер (от 20 до 10000 нм) липосом могут варьироваться и эти вариации сильно влияют на их поведение в естественных условиях. Хотя наночастицами нередко называются дисперсии частиц или твердые частицы с размером в диапазоне 10–1000 нм, наиболее эффективными являются наночастицы до 100 нм. В этом случае, лекарственные молекулы захватываются, инкапсулируются или прикрепляются к наночастицам более продуктивно. Микросферы определяются, как структура, состоящая из непрерывной фазы одного или нескольких смешивающихся полимеров, в которых частицы лекарственного средства диспергированы на молекулярном или макроскопическом уровне [141, 181, 183]. Он имеет размер частиц (1– 1000 нм).

К компонентам целевой доставки лекарственных средств относят носитель и мишень. Носитель – это одна из специальных молекул или систем, необходимая для эффективной транспортировки загруженного лекарственного средства до предварительно выбранных участков. Они представляют собой инженерные векторы, которые удерживают лекарственное средство внутри или на них либо посредством инкапсулирования и транспортируют или доставляют его в непосредственной близости от клетки–мишени. Мишень означает конкретный орган или клетку или группу клеток, которые в хроническом или остром состоянии нуждаются в лечении.

Существуют следующие стратегии лекарственного таргетинга:

– Пассивное нацеливание. Системы доставки лекарств, предназначенные для системного кровообращения, характеризуются как пассивные системы доставки. Способность некоторого коллоида поглощаться эндотелиальными системами (RES), особенно в печени и селезенке, делала их идеальным субстратом для пассивного воздействия лекарств на печень.

– Обратное нацеливание: в этом типе нацеливания предпринимаются попытки избежать пассивного поглощения коллоидного носителя RES, и, следовательно, процесс называется обратным нацеливанием. Для достижения обратного нацеливания нормальная функция RES подавляется путем предварительного введения большого количества чистых коллоидных носителей или макромолекул, таких как сульфат декстрана. Этот тип нацеливания представляет собой эффективный подход к нацеливанию лекарственного средства (средств) на органы, не относящиеся к RES.

– Активное нацеливание: при таком подходе система–носитель, несущая лекарственное средство, достигает определенного участка на основе изменений, сделанных на его поверхности, а не естественного поглощения RES.

– Способ модификации поверхности включает покрытие поверхности либо биоадгезивным, неионогенным поверхностно–активным веществом, либо

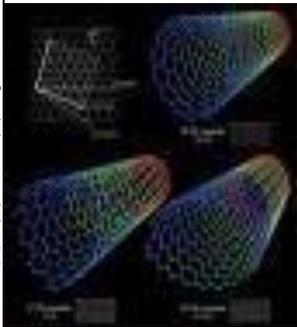
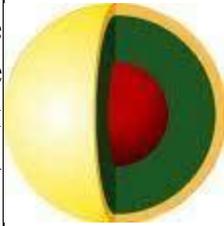
специфическими клеточными или тканевыми антителами (то есть моноклональными антителами), либо белком альбумина.

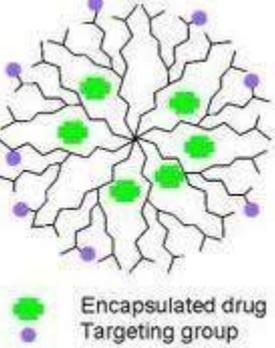
– Двойное нацеливание. При таком подходе нацеливания молекулы–носители сами обладают собственной терапевтической активностью и, таким образом, увеличивают терапевтический эффект лекарственного средства. Например, молекула–носитель, обладающая собственной противовирусной активностью, может быть загружена противовирусным лекарственным средством, и наблюдается синергетический эффект лекарственного конъюгата.

– Пространственное размещение относится к нацеливанию лекарств на конкретные органы, ткани, клетки или даже субклеточные компартменты.

Основные наноносители представлены ниже.

Таблица 2. Основные наноносители

S.no	Nanocarriers	Description	Image
1	Нанотрубки	Это полый цилиндр из углерода, атомы которого могут быть заполнены и опечатаны для возможной доставки лекарств. Помогает определить изменения ДНК, связанные с раковыми клетками	
2	Нанооболочки	Нанооболочки – это полые кварцевые сферы, покрытые золотом. Имеет потенциал для таргетирования раковых препаратов	

3	Квантовые точки	<p>Это крошечные кристаллы, которые светятся под воздействием ультрафиолетового излучения. Латексные шарики, наполненные этими кристаллами, когда стимулируются светом, излучают цвет, который освещает интересующую последовательность. Латексные шарики, наполненные кристаллами, могут быть предназначены для связывания с специфическими последовательностями ДНК.</p>	
4	Дендримеры	<p>Дендримеры – это новый класс макромолекул, которые имеют симметричное ядро и образуют трехмерную сферическую структуру. Они имеют форму ветвления, которая дает им обширную количество площади поверхности для присоединения терапевтических агентов или других биологически активных молекул.</p>	

Основной целью в разработке наночастиц как системы доставки является контроль размера частиц, а также характеристик поверхности и контроля потребления фармакологически активных веществ. Эта проблема решается при взаимодействии с сайт-специфическими структурами молекулы лекарственного средства с целью оптимизации терапевтического эффекта и режима дозирования. В результате появляются определённые преимущества целевой направленной доставки биологически активных веществ:

1. Регулирование размеров и поверхностных свойств наночастиц для нацеливания лекарственных молекул после парентерального введения.
2. Наночастицы высвобождают биологически активные вещества при движении к месту локализации (пораженные ткани), изменяя распределение лекарственного средства между органами и последующей очисткой

лекарственного средства, чтобы повысить терапевтическую эффективность лекарственного средства и уменьшить побочные эффекты последствия.

3. Характеристики контролируемого высвобождения частиц можно легко изменить, выбрав соответствующую матрицу.

4. Конкретное нацеливание на конкретную пораженную область может быть достигнуто путем прикрепления целевых лигандов к поверхности частиц или с помощью магнитного нацеливания.

Тем не менее, наночастицы имеют определённые недостатки и ограничения. К примеру, агрегация частиц связана с их небольшим размером и большой площадью поверхности. Нередко, это делает невозможной физическую обработку наночастиц, которые находятся в жидкой и сухой форме. Эти же факторы приводят ограниченной загрузке молекул биологически активных веществ и их высвобождению. Вышеперечисленные недостатки устраняются до того, как наночастицы можно будет использовать в клинических условиях или подготовить к продаже. Для получения наночастиц Наночастицы получают из таких материалов, как полисахариды, белки и синтетические полимеры. Для выбора материалов носителя предварительно нужно понимать приоритетность таких факторов, как: требуемый размер наночастиц; свойства препарата, например, стабильность; характеристики поверхности (необходимо знать, какие лекарственные молекулы могут быть прикреплены).

В стоматологической практике адресная доставка биологически активных веществ имеет особое значение. Быстрое вымывание лекарственных веществ из ротовой полости связано с непрерывным увлажнением зубов и дёсен слюной. Поэтому для достижения терапевтического эффекта приходится в ротовую полость лекарственные вещества вводить многократно. Этот факт является веским аргументом для разработки более эффективных лекарственных форм, обеспечивающих пролонгацию действия.

Одной из новых лекарственных форм, являются быстрорастворимые лекарственные плёнки. Основной целью является достижение пролонгированного введения в ткани пародонта лекарственных веществ. Так, Жезняковская Л.Ф. с соавт. (2012) использовала стоматологическую полимерную плёнку, с экстрактами лекарственных растений, обладающих дубильными веществами. Такая плёнка обеспечивала эффективность лечения в течение длительного времени.

## ГЛАВА 2. 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 чувствительность 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.

### **2.1. Микробиологические и молекулярно–генетические методы исследования биоплёнок полости рта и чувствительности пародонтопатогенов к ниосомальным гелям**

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. Крамарь и Е.О. Кравцова (1994).

Изучали микрофлору полости рта, слизистых оболочек языка, неба и щеки, обследованы пародонтальные карманы. Количественный и качественный состав пародонтопатогенов был изучен с помощью молекулярно–генетического метода. Метод основан на ПЦР с последующей обратной ДНК – гибридизацией с праймерами для обнаружения пародонтопатогенных бактерий. 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. Использован метод ускоренной пробоподготовки. Набора реагентов включал: «Энзимикс» (протеолитический комплекс – 1 пробирка с лиофилизированным содержимым); «Экстраген» (суспензия смеси гранул ионообменников – 10 мл); растворитель «Энзимикса» – 100 мкл. Выделенный генетический материал амплифицировали в термоциклере «Терцик МС–2» («ДНК–Технология», Москва). 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).

## 2.2. Модификация ниосом атомами серебра

С целью серебрения ниосом их модифицировали 1мМ раствором  $\text{AgNO}_3$ , который добавляли соотношении 10:1 соответственно (Базиков И.А., 2016). Восстанавливали серебро с помощью реакции серебрения, которую проводили в химически чистой медной посуде, при этом протекала следующая реакция:  $\text{Cu} + 2\text{AgNO}_3 \rightarrow 2\text{Ag} + \text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ . 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.

Наличие серебра в ниосомах определяли с помощью атомно-адсорбционного спектрофотометра (ААС), тип-1N (Германия). Для изучения сорбционной способности ниосом использовали формулу:  $\text{СС \%} = \frac{\text{ниос С Ag}}{\text{общ С Ag}} \times 100$ , где СС% – сорбционная способность ниосом, Ниос С Ag – концентрация серебра в ниосомах, Общ С Ag – концентрация серебра вносимого в реакционную смесь.

## 2.3. Технология получения ниосомальных гелей

Для создания оболочки ниосом использовано соединение ПЭГ-12 диметикон. Ниосомы создавались по оригинальной технологии профессора И.А.Базикова (Патент РФ №2014146031).

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*). Ранее были получены результаты исследований антимикробных свойств этих фитоэкстрактов к широкому спектру микроорганизмов [65].

Приготовление фитоэкстрактов из растительного сырья было основано на выделения биологически активных веществ, обладающих антимикробной эффективностью, и заключалось в диспергировании и очистке. Для этого использовали ультразвуковой дезинтегратор. Фитоэкстракты затем инкапсулировали в ниосомы при добавлении 2% ПЭГ–12 диметикона и обрабатывали на АПВ гомогенизаторе высокого давления. При разработке антимикробного ниосомального геля суспензию ниосом с фитоэкстрактами вносили к другим компонентам эмульсии при комнатной температуре.

Помимо фитоэкстрактов, использовали низкомолекулярные пептиды, выделенные из плацентарной ткани животного происхождения, содержащие, цитокины, факторы роста и природные антимикробные пептиды: альфа–дефензины. Из плацентарной ткани экстрагировали низкомолекулярные пептиды с высоким регенераторным потенциалом. 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 (рН) до 6,6–7,0 и формирования структуры геля. В заключительной фазе гель повторно эмульгировали на АПВ гомогенизаторе APV Lab Series Homogenizers – 1000.

Исползовали консервант DC–RM 205 (Dow Corning, США) и гелеобразователь Salcare SC 80 (CIBA, Швейцария).

Таблица 3. Рецепттура антимикробного ниосомального геля, модифицированного атомами серебра.

№	Наименование ингредиента	Содержание в %
Фаза А		
1	Дистиллированная вода	До 100
2	Консервант: DC–RM 2051 (Dow Corning, США)	0,05
3	Гелеобразователь: Salcare SC 80 (CIBA, Швейцария)	2,5
Фаза Б		
4	Ниосомы, модифицированные атомами серебра и содержащие пептиды и фитоэкстракты	1,5,10
Фаза В		
5	Триэтаноламин	2
Фаза Г		
6	Эмульгирование геля на АПВ гомогенизаторе	–

Установлено, что наиболее высокая стабильность при формировании гелей у композиций с 10%-м содержанием ниосом и биологически активных веществ. В этом случае, установлен наиболее высокий процент включения водорастворимых соединений (60–82%) и жирорастворимых соединений (78–91%) в ниосомы.

Таким образом, вышеуказанные фазы приготовления позволили разработать антимикробный стоматологический ниосомальный гель с инновационной системой доставки комбинации биологически активных веществ.

## 2.4. Экспериментальные методы исследования на животных

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 разделены на 4 группы по 12 животных (6 самок, 6 самцов), кролики разделены также на 4 группы по 3 особи.

Дозы ниосомального геля для оценки его токсичности выбирали по оптимальному содержанию 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). В течение 2–х недель наблюдали за опытными животными. Наблюдали за следующими показателями: общее состояние животных, их поведение, интенсивность и характер двигательной активности, реакция на тактильные, болевые, звуковые

и световые раздражители, частота и глубина дыхательных движений, наличие и характер судорог, координация движений, состояние волосяного и кожного покрова, консистенция фекальных масс, потребление корма и воды.

Контрольным группам животных обрабатывали кожу эквивалентным количеством физиологического раствора.

Токсикологические показатели: кожно–раздражающее, кожно–резорбтивное и сенсibiliзирующее действие средства определяли согласно требованиям СанПиН 1.2.681–97 и Инструкции по экспериментально–клинической апробации (1986 г.).

При проведении доклинических исследований соблюдались правила защиты позвоночных животных, используемых в научных целях (Руководства и рекомендации для Европейских независимых комитетов по вопросам этики 1997; Рекомендации по этике проводящим экспертизу биомедицинских исследований, 2000).

## **2.5. Цитологические и морфометрические исследования лимфоцитов при использовании антимикробного нисомального геля с атомами серебра**

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. Предварительно мазки из крови фиксировали метиловым спиртом, высушивали и промывали дистиллированной водой. Затем их помещали в раствор KCl (0,57 г KCl на 100 мл дистиллированной H<sub>2</sub>O) на 20 минут, а после промывания дистиллированной водой помещали в смесь 50% раствора азотнокислого серебра (раствор «А») и 2% раствора желатины на 1% растворе муравьиной кислоты растворов (раствор «В»). Раствор «А» (5 мл) и «В» (5 мл) смешивали и в полученной смеси мазки крови выдерживали в термостате в течение 20 минут

при температуре 37 С. Затем мазки погружали на 2–3 секунды в дистиллированную воду, выдерживали дважды по 8 минут в 5% растворе тиосульфата Na, (при 37 С), промывали водопроводной водой, а затем дистиллированной водой. Для дифференцировки форменных элементов крови проводили окраску по методу Романовского в течение 30 минут, промывали водопроводной водой, высушивали и помещали мазки в канадский бальзам.

Окрашенные мазки крови исследовали с помощью светового микроскопа OLYMPUS–BX 43 (Япония), цифровые изображения получали с помощью фотоаппарата OLYMPUS С 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 каждой 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).

Для числовых показателей использовали метод однофакторного дисперсионного анализа и двустороннего критерия Стьюдента в программе Primer of Biostatics 4–03 для Windows. Различия при  $p < 0,05$  считали достоверными. Для морфометрических исследований применяли следующие реактивы: калия хлорид и тиосульфат натрия (РЕАХИМ, Россия); желатин (Мосхимфармпрепараты, Россия); азотнокислое серебро (ПЗЦМ–Втормет, Россия); метиловый спирт (Метанол, Россия); муравьиная кислота (Реактив, Россия); краситель Романовского (БиоВитрум, Россия); канадский бальзам (Bio–Optica, Италия).

## **2.6. Методы оценки эффективности применения ниосомальных гелей.**

### **2.6.1. Определение чувствительности выделенной микрофлоры к серебрённым ниосомам и ниосомальным гелям.**

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 – Pak (OXOID, Англия). Выделенные микроорганизмы идентифицировали с учётом 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-20A (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. Засеянные чашки держали при комнатной температуре 1–2 часа, а затем на 16–18 часов помещали в термостат при  $36 \pm 1^\circ\text{C}$ . Избежать попадания конденсационной воды на поверхность посевов, помогало хранение чашек вверх дном. Формирование вокруг дисков зоны лизиса (угнетения роста) чувствительных к нему бактерий, происходило при диффундировании в агар посеребрённых ниосом и ниосомального геля. По величине зоны лизиса определяли степень чувствительности микроба к дискам, пропитанным посеребрёнными ниосомами и ниосомальным гелем. 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. Количественные показатели зон задержки роста микроорганизмов оценивались в соответствии с общепринятыми статистическими методами.

### **2.6.2. Клинические методы исследования эффективности антимикробного ниосомального геля с атомами серебра**

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, жалоб пациентов, объективного клинического, рентгенологического и лабораторного исследований. Изучены результаты клинического и лабораторного обследования 88 пациентов с пародонтитом за 2016 – 2019 г. Пациенты были распределены на 4 группы по 22 человека в каждой. В первой группе проводили стандартное местное лечение. Пациентам вводили в пародонтальные карманы 1 раз в день пасту с метронидазолом и ацетилсалициловой кислотой на основе вазелина. Пациентам, которым вводили антимикробный комплекс в форме геля с пептидами и фитоэкстрактам без ниосом, составили 2 группу. Пациенты, получавшие лечение ниосомальным гелем с инкапсулированными, пептидами и фитоэкстрактами составили 3а группу. 3б группа получала лечение ниосомальным гелем с инкапсулированными, пептидами и фитоэкстрактами, 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). Использовали также 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; кровоточивость десневой борозды – индекс РВI; стойкость капилляров десны к дозированному вакууму; выраженность воспаления в разных зонах десны – индекс ПМА; тяжесть воспалительно–деструктивных изменений в тканях пародонта; индекс десневой жидкости – ИДЖ; 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 отёка, кровоточивости, увеличение ремиссии. Осмотры пациентов проводили сразу после окончания лечения, и через 6 и 12 месяцев после лечения.

## **2.7. Статистическая обработка материала**

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

### ГЛАВА 3. ИЗУЧЕНИЕ АНТИМИКРОБНОЙ, ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ И КЛИНИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ НИОСОМАЛЬНОГО ГЕЛЯ С АТОМАМИ СЕРЕБРА

#### 3.1. Электронная и атомно–силовая микроскопия ниосом с атомами серебра

Полученные данные электронной и атомно–силовой микроскопии ниосом демонстрировали преобладание частиц от 100 до 140 нм, с незначительным присутствием ниосом меньших размеров от 80 до 100 нм (рис 6).

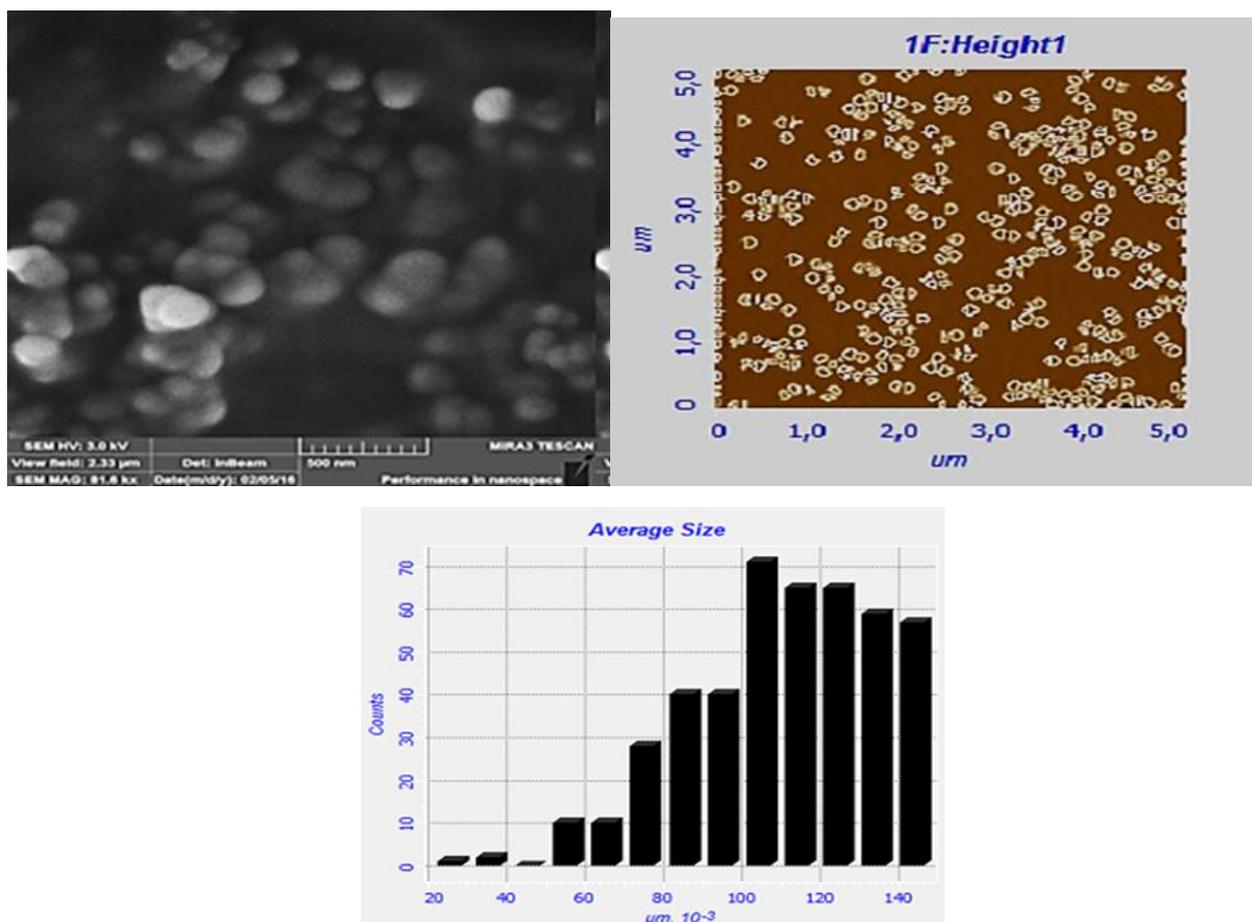


Рисунок 6. Электронная и атомно–силовая микроскопия ниосом и гистограмма зависимости среднего размера ниосом к их количеству.

Модификация атомами серебра приводила к уменьшению размеров ниосом. Ниосом имели размер до 110 – 120 нм (рис. 8), позволяющий осуществлять транспорт многих лекарственных молекул. Кремнийорганические ниосомы являлись эффективным сорбентом атомов серебра. Это подтверждалось тем, что в нейтральной среде (рН = 7) около 80% восстановленного серебра, инкапсулировалось в ниосомы.

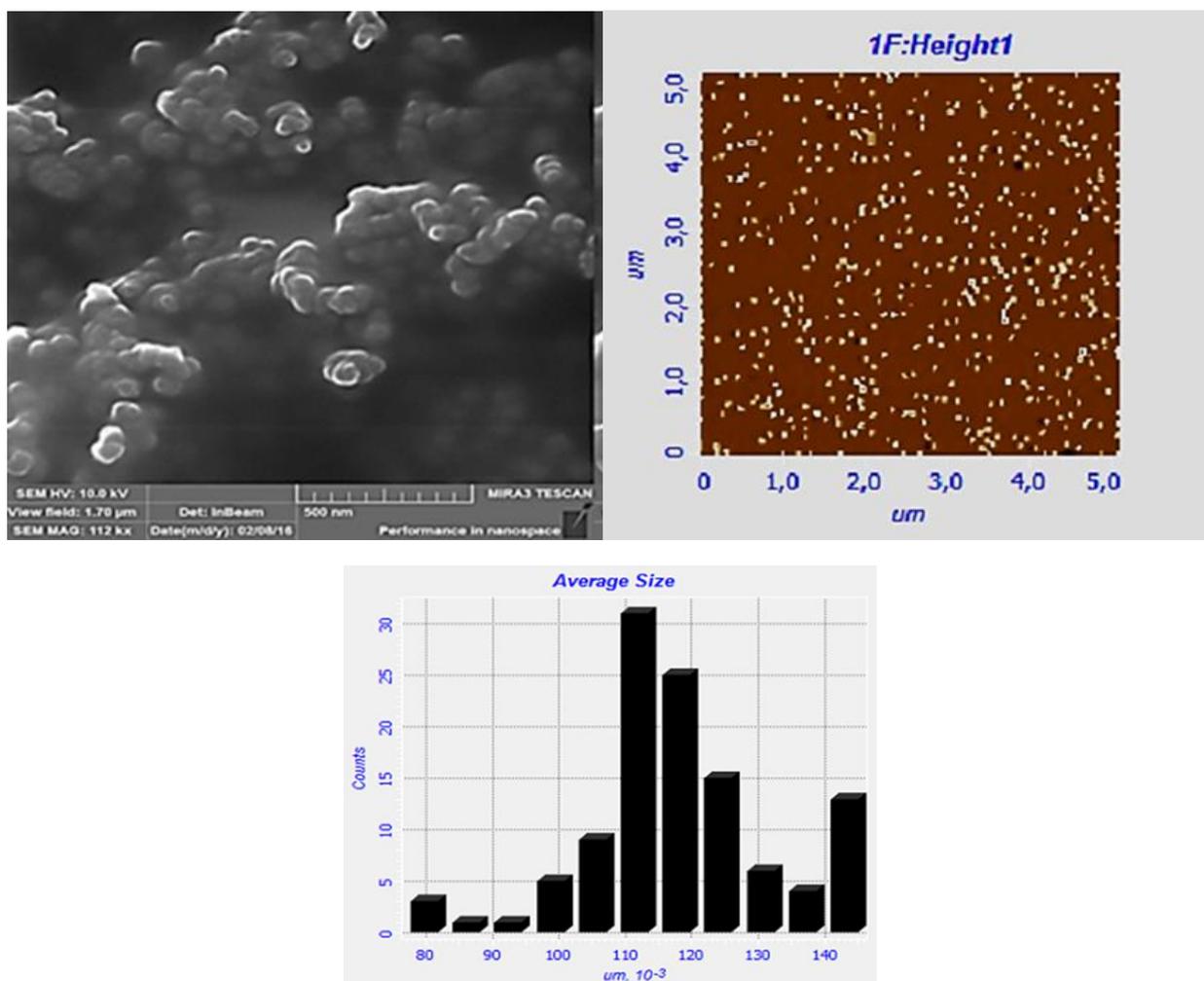


Рисунок 7. Электронная и атомно–силовая микроскопия серебрянных ниосом с антимикробными экстрактами и гистограмма зависимости среднего размера ниосом к их количеству.

Исследования показали, что количество серебра в ниосомах составило  $0,864 \pm 0,054$  мг/л. Сорбционная ёмкость кремнийорганических ниосом обусловлена наличием функциональных групп Si–O–Si в молекуле диметикона. Электрический потенциал формировался благодаря присутствию на

поверхности ниосом атомов серебра. Это приводило к формированию ниосом с атомами серебра меньших размеров по сравнению со свободными от атомов серебра ниосомами.

Электронная микроскопия зафиксировала толщину стенок ниосом 3–4 нм. Диаметр наноконтейнера для низкомолекулярных пептидов составлял до 12 нм (рис. 8). Молекулы полидиметилсилоксановой основы стенок ниосом эластичны, что позволяет направленно доставлять широкий спектр антимикробных веществ и направленно их высвобождать из ниосом. Это обусловлено наличием функционально активных групп в молекуле ПЭГ –12 Диметикона. К примеру, ковалентные связи Si–O–Si в гидрофобной части молекулы полидиметилсилоксановой основы эластичны и осаждают атомы серебра на поверхности ниосом.

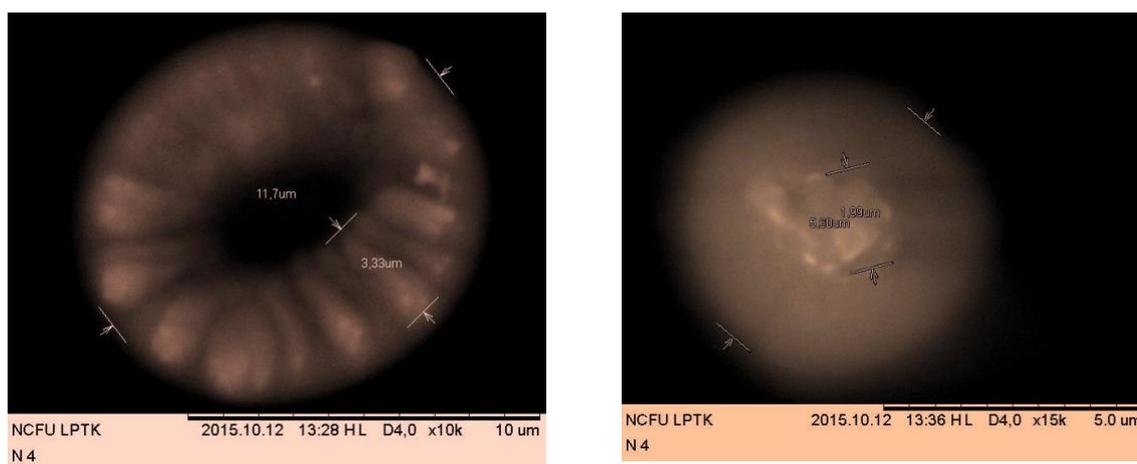


Рисунок 8 Электронная микроскопия кремнийорганической ниосомы с включенными в неё низкомолекулярными пептидами и фитоэкстрактами.

Ниосомы содержат гибрид кремния (диметикона) и углерода (полиэтиленгликоля). СН<sub>3</sub> – (метильные) группы образуют «облако» вокруг атомов Si. Это обуславливает стабильность ниосом. Длина молекулярной связи Si – O намного длиннее связи C – C, что определяет эластичность ниосом по сравнению фосфолипидами. Этот факт также позволяет образовывать нановезикулы без значительных энергетических усилий. Длина молекулярной связи Si–O 1,6 Å, в то время, как длина связи аналогов ПАВ C –C 1,4 Å. Угол



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

### 3.3. Антимикробная активность ниосомальных гелей, модифицированных атомами серебра

При изучении микробиологического статуса с помощью молекулярно-генетических методов исследования определяли количество и частоту выявления пародонтогенов в контрольной и опытной группах.

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. 9).

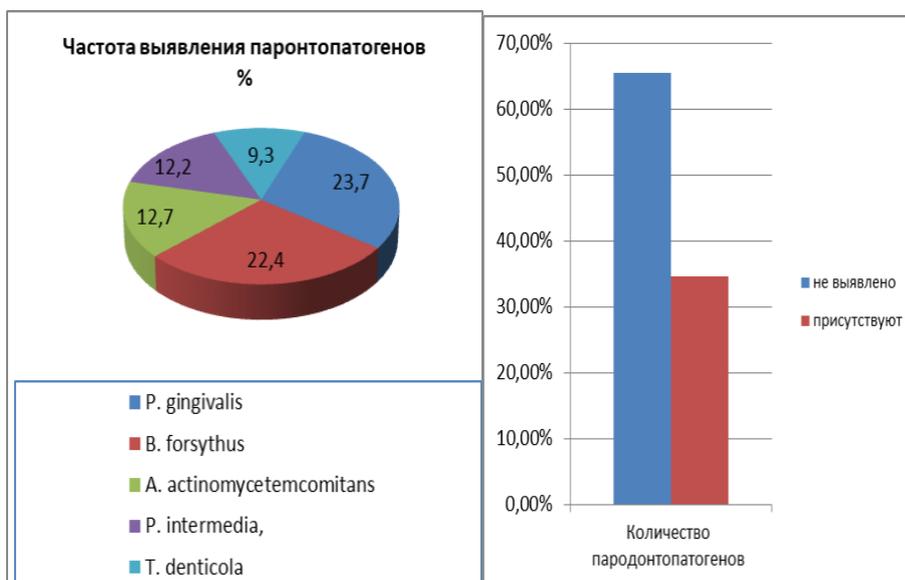


Рисунок 9. Количество и частота выявления маркеров пародонтопатогенов в биопленке у пациентов контрольной группы.

Проведённые лабораторно-диагностические исследования позволили

установить, что у пациентов группы с воспалительными заболеваниями пародонта, частота выявления носительства пародонтопатогенных видов составила 48,3%. У 51,7% лиц не было выявлено пародонтопатогенной микрофлоры. Исследования маркеров, выделенных из проб у пациентов 2 этой группы, показали, что 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. 10).

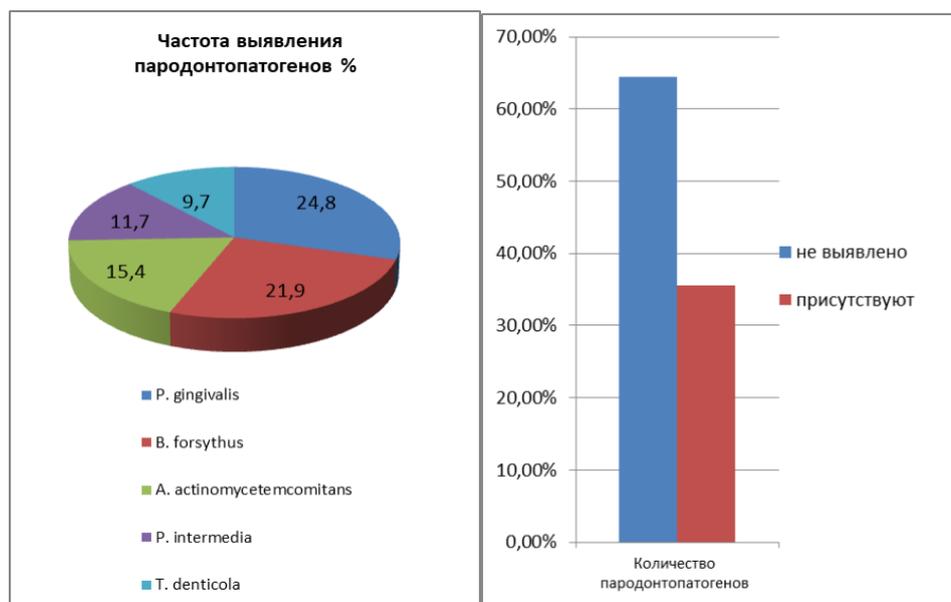


Рисунок 10. Количество и частота выявления маркеров пародонтопатогенов в биопленке у пациентов группы с воспалительными заболеваниями пародонта.

Исследования, проведённые в опытной группе со стандартным местным лечением, показали, что частота выявления носительства пародонтопатогенных видов составила 44,1%. У 55,9% пациентов не было выявлено ни одного вида пародонтопатогенной микрофлоры. Исследования маркеров, выделенных из проб у пациентов этой группы, позволили установить, что 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. 11).

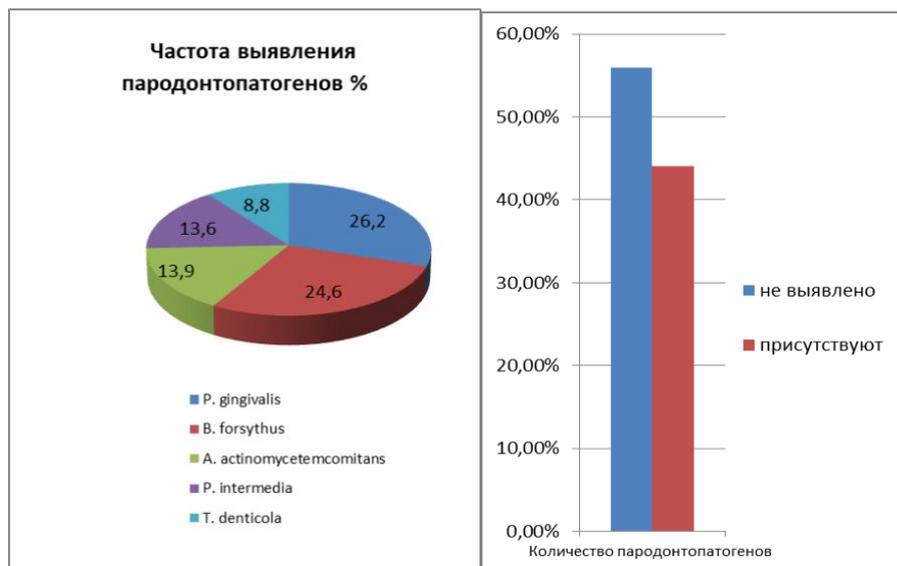


Рисунок 11 Количество и частота выявления маркеров пародонтопатогенов в биопленке у пациентов опытной группы после стандартного местного лечения

Наблюдение за пациентами с заболеваниями пародонта опытной группы со стандартным местным лечением пастой, содержащей метронидазол и ацетилсалициловую кислоту, выявили снижение числа анаэробных пародонтопатогенных бактерий в биопленке.

После лечения антимикробным ниосомальным гелем, модифицированным атомами серебра, у больных опытной группы, анализ структуры маркеров пародонтопатогенных видов показал их наличие в 35,6%. У 64,4% пациентов 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. 12).

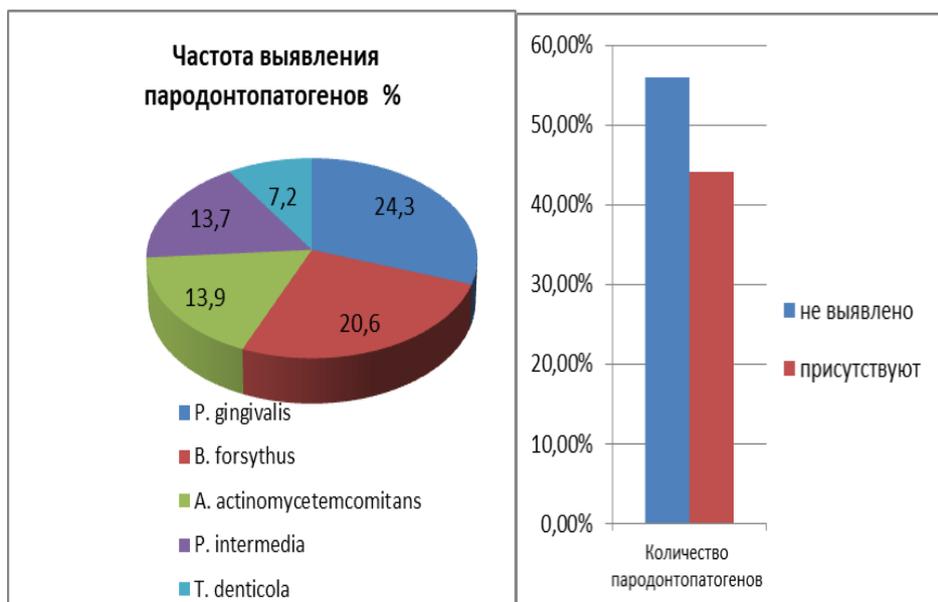


Рисунок 12. Количество и частота выявления маркеров пародонтопатогенов в биопленке у пациентов опытной группы после лечения ниосомальным гелем с атомами серебра.

Полученные данные по резидентной микрофлоре биопленки имели разнонаправленную динамику. В сравнении с количественными показателями контрольной группы, происходящее увеличение содержания *Streptococcus salivarius* в 1,03–1,0 раза, сопровождается снижением *Peptostreptococcus anaerobius* в 1,44 раза и *Veillonella parvula* в 1,19 раза.

Антимикробная активность ниосомального геля с атомами серебра при местном применении в стоматологической практике объяснялась также непосредственным действием самих ниосом кремнийорганической природы. При контакте ниосом с плазматическими мембранами пародонтопатогенов увеличивалась их проницаемость для антимикробных веществ. В результате, изменялось внутриклеточное осмотическое давление, что приводило к набуханию, и разрывам и к их неизбежной гибели.

Бактериологические исследования антимикробной активности ниосомальных гелей показали, что антимикробные ниосомальные гели с атомами серебра подавляют рост микроорганизмов.

Так, в отношении *Porphyromonas gingivalis* зона задержки роста для ниосомального геля с ниосомами, немодифицированными атомами серебра, находилась в пределах  $16,8 \pm 0,14$  мм. Выявлено, что антибактериальная эффективность ниосомального геля с атомами серебра была в два раза больше, чем у ниосомального геля без атомов серебра и 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, на поверхности которых не адсорбированы атомы 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* (табл. 5, рис. 13).

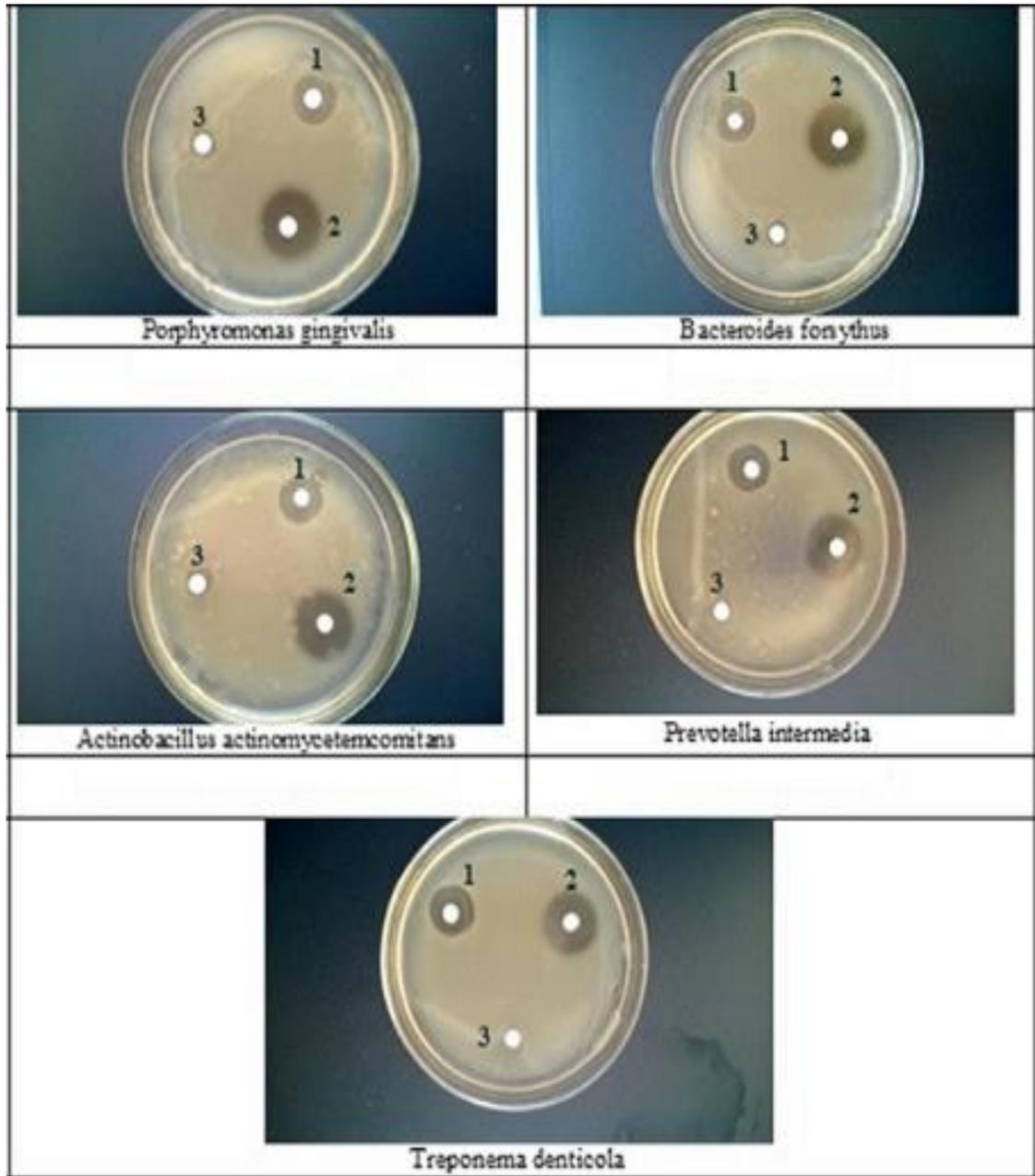


Рисунок 13. Зоны лизиса пародонтопатогенов вокруг дисков с ниосомальным гелем с антимикробными экстрактами без атомов серебра (1), ниосомальным гелем с посеребрёнными ниосомами (2), контролем (3).

Таблица 5. Исследование чувствительности парадонтопатогенов диско–  
диффузионным методом к опытным образцам ниосомальных гелей

Виды микроорганизмов	Диаметр зоны задержки роста микроорганизма (мм) (D±d)*		
	Контроль (чистые не пропитанные бумажные диски)	Антимикробный ниосомальный гель с без атомов серебра	Антимикробный ниосомальный гель с атомами серебра
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	–	16,8 ± 0,14 *	35,1 ± 0,16 * <sup>@</sup>
<i>Bacteroides forsythus</i>	–	15,2 ± 0,11*	37,1 ± 0,17* <sup>@</sup>
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	–	12,9 ± 0,21*	38,7 ± 0,29* <sup>@</sup>
<i>Prevotella intermedia</i>	–	13, 7± 0,12*	36,6 ± 0,18* <sup>@</sup>
<i>Treponema denticola</i>	–	15, 7± 0,12*	37,6 ± 0,28* <sup>@</sup>

Известно, что антимикробные экстракты потенцируют свободно–радикальное окисление, меняя физико–химические показатели клеточной стенки у резистентных бактерий. Нами выявлено увеличение проницаемости плазматической мембраны и соответственно усиление проникновения активных веществ через клеточную стенку бактерий. Данные фармакокинетики демонстрируют антибактериальную эффективность экстрактов, накапливающихся в повреждённых воспалительных тканях пародонта.

### 3.4. Функциональная активность лимфоцитов

При микроскопическом исследовании проведено цитоморфологическое изучение биопленки пародонта. Обнаружены различия у пациентов контрольной групп с интактным пародонтом и у больных с пародонтальной патологией. Микробная биопленка у пациентов контрольной группы была структурированного характера. В биоплёнке отчетливо определялись дренажные отверстия, и укрепляющие матрикс тяжи. При микроскопии с

увеличением в 100 раз слабо можно было разглядеть контуры бактерий, прикрытые полимерной мантией. С увеличением в 16 000 раз, бактерии были отчетливо видны под мантией. Клеточные элементы пародонтопатогенов имели размер от 250 до 850 нм. Иная картина наблюдалась у группы с воспалением пародонта. Микробная биопленка была структурирована нечетко, плохо прослеживались отверстия, выполняющие дренажную функцию.

При изучении функциональной активности лимфоцитов (в зоне повреждения слизистой оболочки пародонтитом) на фиксированных и окрашенных мазках крови обнаружены ядра лимфоцитов обычной формы. Внутри лимфоцитов выявлены акроцентрично лежащие, имеющие округлую форму AgЯО. При микроскопии они имели окраску темно-коричневого цвета (рис. 14, 15.). Установлено, что средняя площадь ядра в лимфоцитах находилась в пределах от  $64,96 \pm 2,79$  мкм<sup>2</sup> до  $113,20 \pm 5,89$  мкм<sup>2</sup>, она изменялась волнообразно и зависела от времени, прошедшего после лечения и применения ниосомального геля и без него (таблица 6).

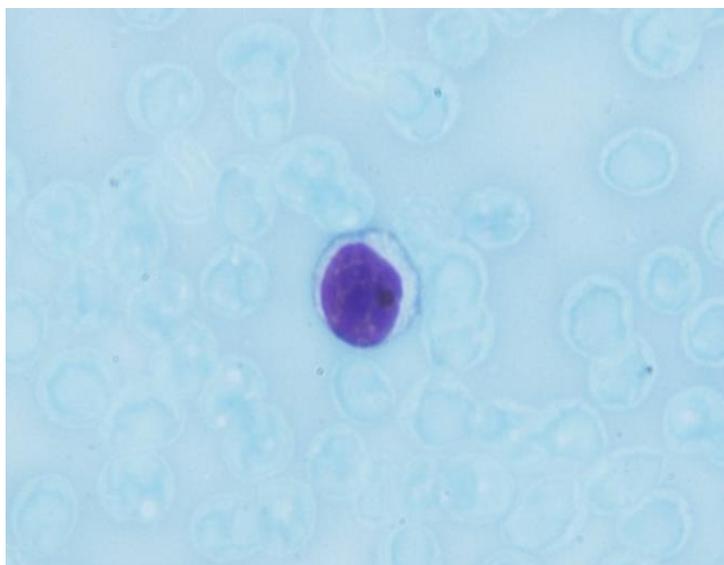


Рисунок 14. Лимфоцит с аргентофильным ядрышковым организатором.

Окраска по методике W. Howell и D. Black (1980) в модификации

В.И. Трухачева с соавт. (2015). Ув.  $\times 400$ .

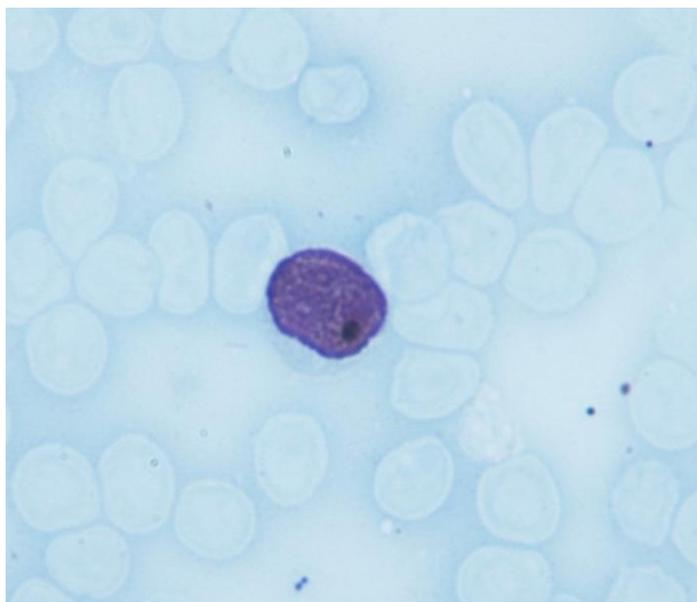


Рисунок 15. Лимфоцит с аргентофильным ядрышковым организатором.

Окраска по методике W. Howell и D. Black (1980) в модификации

В.И. Трухачева с соавт. (2015). Ув.  $\times 400$ .

Таблица 6. Функциональные показатели лимфоцитов крови (n=26)

№ п/п	Показатель	Лечение пастой с метронидазолом (n=13)				Лечение антимикробным ниосомальным гелем с серебром (n=13)			
		Сроки исследования				Сроки исследования			
		В начале лечения, (M±m)	На 3 день после начала лечения, (M±m)	На 6 день посленачала лечения, (M±m)	На 9 день после начала лечения, (M±m)	В начале лечения, (M±m)	На 3 день после начала лечения, (M±m)	На 6 день посленачала лечения, (M±m)	На 9 день после начала лечения, (M±m)
1	Площадь ядра лимфоцита, мкм <sup>2</sup>	87,01±2,59	94,38±7,41	64,96±2,79* <sup>&amp;</sup>	84,48±3,82*	87,01±2,59	86,82±2,69	113,20±5,89* <sup>#&amp;</sup>	83,15±2,8* <sup>6</sup>
2	Суммарная площадь зон ядрышковых организаторов, мкм <sup>2</sup>	2,69±0,18	4,99±0,49* <sup>&amp;</sup>	2,40±0,16*	4,13±0,27* <sup>&amp;</sup>	2,69±0,18	3,30±0,17 <sup>#</sup>	5,00±0,43* <sup>#&amp;</sup>	2,25±0,27* <sup>#</sup>

Примечание: \* – различия достоверны в сравнении с предыдущим сроком исследования,  $p \leq 0,05$ ; # – различия достоверны между группами в аналогичный срок исследования,  $p \leq 0,05$ ; & – различия достоверны со значениями до лечения,  $p \leq 0,05$ .

Так, у пациентов, которые при лечении использовали пасту с метронидазолом, средние значения площади ядер лимфоцитов возрастали к 3 дню после лечения на 7,81 %. К 6 дню после лечения средняя площадь ядер лимфоцитов значительно снижалась, по сравнению с предыдущим периодом исследования (на 31,17 %,  $p < 0,05$ ), и даже, была достоверно ниже ( $p < 0,05$ ), чем в материале, отобранном во время лечения (на 25,34 %). К 9 суткам после лечения в этой группе пациентов средние значения площади ядер лимфоцитов возрастали на 23,11 % ( $p < 0,05$ ) и приближались к значениям, полученным в материале, отобранном во время лечения. Исследованиями установлено, что у пациентов, которым применяли антимикробный ниосомальный гель с серебром, наблюдается несколько иная динамика в изменении средних значений площади лимфоцитов. Через 3 дня после лечения средние значения площади ядер лимфоцитов не отличались от данных в материале, полученном во время операции. К 6 суткам после лечения в лимфоцитах значительно увеличились ( $p < 0,05$ ), достигнув максимума, средние значения площади их ядер ( $113,20 \pm 5,89$  мкм<sup>2</sup>), по сравнению как с данными, полученными в предыдущий период исследования (на 23,30 %), так и с данными в материале, отобранном в начале лечения (на 23,14 %). На 9 день после лечения в этой группе средние значения площади ядер лимфоцитов достоверно ( $p < 0,05$ ) снизились на 26,55 % и не отличались от данных, полученных в материале в начале лечения. Таким образом, 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, а в группе где применялся гель не изменяясь на 3 день, значительно возрастали к 6 суткам после начала лечения и возвращались также к 9 суткам. 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 геля они, вероятно, более функционально активны. Количество единиц AgЯО в ядре типичного лимфоцита, независимо от срока после начала составило 1–2, преимущественно компактного или нуклеолонемно–компактного типа. Подтверждением различной функциональной активности лимфоцитов в зоне лечения при применении и без применения антимикробного ниосомального геля является изменение суммарной площади AgЯО, как одного из показателей функциональной активности клетки. Установлено, что средняя суммарная площадь AgЯО в ядрах лимфоцитов находится в пределах от  $2,25 \pm 0,27$  мкм<sup>2</sup> до  $5,00 \pm 0,43$  мкм<sup>2</sup> (таблица 6). У пациентов, которым не применяли ниосомальный гель с серебром, средние значения суммарной площади AgЯО в ядрах лимфоцитов достоверно ( $p < 0,05$ ) возрастали к 3 дню после операции на 46,09 %. К 6 дню после вмешательства средняя суммарная площадь AgЯО в ядрах лимфоцитов значительно снижалась, по сравнению с предыдущим периодом исследования (на 51,90 %,  $p < 0,05$ ), и даже была незначительно ниже. К 9 суткам после начала лечения в этой группе пациентов средние значения суммарной площади AgЯО в ядрах лимфоцитов возрастали на 41,89 % ( $p < 0,05$ ), по сравнению с предыдущим сроком исследования, достоверно не отличались от данных на 3 день, но были достоверно ( $p < 0,05$ ) выше (на 34,87 %) по сравнению со значениями, полученными в материале, отобранном в начале лечения. Что касается пациентов, которым применяли антимикробный ниосомальный гель с атомами серебра, наблюдается несколько иная динамика в изменении средних значений суммарной площади AgЯО в ядрах лимфоцитов. Через 3 дня после начала лечения средние значения суммарной площади AgЯО в ядрах лимфоцитов, то они достоверно не отличались от данных в материале, полученном во время лечения. Однако к 6 суткам после начала лечения в

лимфоцитах она значительно увеличилась ( $p < 0,05$ ) и достигла максимума. Ее средние значения по сравнению как с данными, полученными в предыдущий период исследования (на 34,00 %), так и с данными в материале, отобранном во время лечения (на 46,20 %) были достоверно ( $p < 0,05$ ) выше. На 9 день после начала лечения в этой группе средние значение суммарной площади AgЯО в ядрах лимфоцитов достоверно ( $p < 0,05$ ) снизились в 2,22 раза по сравнению с данными 6 дня, но они достоверно не отличались от данных, полученных в материале после начала лечения. Таким образом, исследованиями выявлены различия в динамике средних значений суммарной площади AgЯО в ядрах лимфоцитов. В группе пациентов с традиционным лечением пастой с метронидазолом, значения этого показателя изменяются волнообразно, повышаясь на 3 сутки, затем снижаются к 6 дню, и возрастают к 9 дню. В то время, как в группе с применением антимикробного ниосомального геля с сербром, средняя суммарная площадь AgЯО в ядрах лимфоцитов достоверно не изменяясь на 3 день, значительно возрастает только на 6 сутки после начала лечения, а затем снижается на 9 сутки, приближается к средним значениям, полученным во время начала лечения. На 6 сутки после начала лечения у пациентов опытной группы средняя суммарная площадь AgЯО в ядрах лимфоцитов была в 2,08 раза больше, чем у пациентов контрольной группы.

Полученные данные по изменению средней суммарной площади AgЯО в ядрах лимфоцитов также указывают на то, что в поражённом участке изменяется функциональное состояние лимфоцитов. При использовании антимикробного ниосомального геля лимфоциты в меньшей степени реагируют на характер течения процесса репарации, что проявляется одним пиком (на 6 день) повышения их функциональной активности.

### **3.5. 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.

У представителей контрольной группы с интактным пародонтом воспалительные процессы в тканях пародонта не обнаружены. При хроническом пародонтите результаты обследования существенно различались в зависимости от степени тяжести. Показатели индексов и проб свидетельствовали о наличии неудовлетворительной гигиены полости рта и выраженного воспалительного процесса в тканях пародонта. Индекс показатель тонуса сосудов (ПТС) до лечения был повышен –  $27,93 \pm 2,12\%$ . Также были повышены индекс периферического сопротивления (ИПС) –  $119,62 \pm 4,04\%$ , но индекс эластичности (ИЭ) –  $55,19 \pm 2,48\%$  был снижен. Такие данные демонстрировали нарушение микроциркуляции и возрастание тонического напряжения сосудов пародонта.

Продолжительность лечения пастой на основе метронидазола в 1-й группе составила 16 дней. В результате отмечалась улучшение гигиенического состояния полости рта, произошла нормализация цвета и плотности дёсен, неприятный запах изо рта и кровоточивость прекратились. Гигиенические и пародонтальные индексы и пробы снизились: Green–Vermillion – в 2,53 раза; ПМА – в 3,45 раза, Loe–Silness – в 1,89 раза, РВІ – в 2,47 раза, РІ – в 1,44 раза, ПК – уменьшился на 0,29 мм, ИДЖ– в 7,96 раз, проба Кулаженко возросла в 7,19 раз (табл.7).

Во 2 группе, где применяли гель с пептидами и фитоэкстрактами, лечение продолжалось 13 дней, и после лечения слизистая оболочка была бледно–

розового цвета, увеличилась стойкость капилляров десны. Произошло снижение гигиенических и пародонтальных индексов: Green–Vermillion – снизился в 2,57 раза; ПМА – 3,2 раза; Loe–Silness – в 1,42 раза; PBI – в 2,54 раза; PI – в 1,32 раза; ПК – стал меньше на 0,2 мм; ИДЖ– снизился в 8,62 раза; проба Кулаженко – 8,44 раза (табл 7).

В 3 группе, подгруппе «А», где лечение происходило антимицробным ниосомальным гелем, составило 9 дней. После лечения исчезал неприятный запах из полости рта, кровоточивость и болезненность десен прекращались быстрее на 2–3 дня. Снижение гигиенических и пародонтальных индексов и проб было следующим: Green–Vermillion – снизился в 3,92 раза; ПМА – 9,62 раза; Loe–Silness – в 3,22 раза; PBI – в 4,94 раза; PI – в 2,04 раза; ПК – стал меньше на 1,08 мм; ИДЖ снизился в 12,42 раза, проба Кулаженко увеличилась в 8,4 раза (табл.7).

В подгруппе «Б» 3–й группы, проводили лечение антимицробным ниосомальным гелем, модифицированным атомами серебра. И изменения здесь оказались более значительными в течение 7 дней, что подтвердилось снизившимися показателями гигиенических и пародонтальных индексов и проб (табл 7).

Изменения реопародонтограммы после лечения оказалась общей для больных 1–й, 2–й и 3–й групп. Так, восходящая часть анакроты стала более крутой, вершина стала более острой, а на катакроте появился дикротический зубец. Снижение периферического тонуса сосудов и индекса периферического сопротивления произошло во всех группах у больных, а индекс эластичности сосудов повысился.

Таблица 7. Показатели индексов и проб у больных с пародонтитом непосредственно после лечения антимикробным ниосомальным гелем

Индексы	Группы				
	До лечения	Непосредственно после лечения			
		1	2	3 «А»	3 «Б»
Green– Vermillion, баллы	2,18±0,12	0,92± 0,07*	0,86± 0,06*	0,59± 0,14*	0,41± 0,09*
ПМА, %	44,02±0,08	10,42±1,34*	14,01±0,52*	4,31± 0,19*	2,19± 0,24*
Loe–Silness, баллы	1,79±0,15	0,94 ± 0,09*	1,08 ± 0,12*	0,61±0,08 *	0,34 ± 0,06
PBI, баллы	1,75±0,17	0,72 ± 0,24*	0,81 ± 0,30*	0,41 ±0,14*	0,23 ± 0,09*
PI, баллы	3,77±0,16	2,53 ± 0,49*	2,44 ± 0,16*	1,86 ±0,14*	1,34 ± 0,03*
ПК, мм	4,39±0,16	4,12±0,13*	4,23±0,19	3,41±0,09	3,13±0,09 *
ИДЖ, мг	1,53	0,21	0,19	0,15	0,11
Проба Кулаженко, сек.	8	66± 1,19*	75 ±1,64*	89 ±1,44*	93± 1,19*

\* $p < 0,05$  – различия статистически достоверны по сравнению с показателями до лечения.

Через 6 месяцев воспалительный процесс в тканях пародонта возобновился у 18 пациентов в 1-й группе, у 12 пациентов 2-й группы, у 1 пациента 3 «А» группы (таблица 8). Отмечено повышение показателей индекса ИПС и снижение ИЭ. В подгруппе 3 «Б» группы, воспалительных изменений не обнаружено. Нарушение кровообращения в тканях пародонта продемонстрировано показателями РПГ. Рентгенологическое обследование

выявило деструкцию межзубных перегородок до  $\frac{1}{2}$  длины корня, повышение прозрачности кости, наличие очагов остеопороза, а также расширение периодонтальной щели по всей окружности корней зубов.

Таблица 8 – Показатели индексов и проб у больных с пародонтитом через 6 месяцев после лечения

Индексы	Группы				
	До лечения	Через 6 месяцев после лечения			
		1	2	3 «А»	3 «Б»
Green–Vermillion, (баллы)	2,42±0,06	2,17± 0,02*	2,13± 0,04*	0,58± 0,13*	0,38 ±0,04*
ПМА (%)	39,42±1,10	35,19±1,09*	37,35±1,19*	4,39±1,15*	2,53±0,19*
Loe–Silness, (баллы)	1,67±0,15	1,82±0,07*	2,06±0,12*	0,49± 0,06*	0,28±0,02*
РВИ, (баллы)	1,75±0,19	1,73±0,06*	1,70±0,17*	0,32±0,04*	0,26±0,02*
PI, (баллы)	3,69±0,15	3,18±0,13*	2,99± 0,18*	0,29± 0,05*	0,18± 0,03*
ПК, (мм)	4,39±0,17	4,19±0,08*	4,11±0,05*	2,49±0,09*	2,24±0,02*
ИДЖ, (мг)	1,49	1,33	1,52	0,13	0,08
Проба Кулаженко, (сек.)	9	13,89±1,17*	14,99±0,25*	74±1,33*	89±1,19*

\* $p < 0,05$  – различия статистически достоверны по сравнению с показателями до лечения

Через 12 месяцев после начала лечения были получены различные показатели в разных группах. Показатели индексов и проб у больных с пародонтитом через 12 месяцев после лечения представлены в таблице 9. Рентгенологическое исследование тканей пародонта в период обострения

выявило неравномерное расширение периодонтальной щели, остеопороз, резорбция костной ткани на ½ высоты межзубных перегородок.

Таблица 9 – Показатели индексов и проб у больных с пародонтитом через 12 месяцев после лечения

Индексы	Группы				
	До лечения	Через 12 месяцев после лечения			
		1	2	3 «А»	3 «Б»
Green– Vermillion, Баллы	2,39±0,08	2,29 ±0,06*	2,11 ± 0,12*	0,59 ± 0,08*	0,49 ±0,09*
ПМА, %	40,32±1,12	40,11 ±15*	39,91± 2,39*	5,58 ±0,19*	4,11 ±0,14*
Loe–Silness, Баллы	1,79±0,16	2,29 ±0,09*	2,23 ±0,06*	0,65 ±0,09*	0,41 ±0,06*
РВІ, Баллы	1,87±0,21	2,45 ±0,19*	2,19 ±0,11*	0,59 ±0,09*	0,33 ±0,04*
РІ,баллы	3,77±0,15	3,43 ±0,21*	3,37 ±0,24*	0,55 ±0,13*	0,25 ±0,04 *
ПК,мм	4,42±0,19	4,24±0,06*	4,18±0,08*	2,73±0,05*	2,65±0,03*
ИДЖ,мг	1,49	1,55	1,56	0,11	0,08
Проба Кулаженко,сек	9	13 ±1,22*	12 ±0,11*	89 ±2,77*	89 ±2,41*

\* $p < 0,05$  – различия статистически достоверны по сравнению с показателями до лечения.

Ремиссия наблюдалась у 85 % больных 3–й «А» подгруппы и 90% 3–й «Б» подгруппы. Воспалительные изменения отсутствовали. Обнаружено отсутствие мягких и твердых зубных отложений, уменьшение глубины пародонтальных карманов и кровоточивости дёсен. У пациентов 3 «А» и 3–й «Б» подгрупп рентгенограмма продемонстрировала стабилизацию

воспалительного процесса в виде восстановления плотности кортикальной пластинки, уплотнения костной ткани межзубных перегородок и отсутствие остеопороза.

Через 12 месяцев после лечения были выявлены нарушения в кровообращении у 90% больных в 1-й группе и у 80% во 2-й группе. Реографические данные продемонстрировали пологую анакроту, плоскую вершину, сглаженную и смещенную вверх катакроту дикротического зубца.

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 в ниосомы и модификация атомами серебра позволило осуществить пролонгированную дозированную доставку антимикробных веществ в ткани пародонта больных 3-й группы, и 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.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Пародонтит - это воспалительное заболевание, вызванное микроорганизмами ротовой полости, и имеет высокую распространенность во всем мире, затрагивая 50% взрослых и более 60% людей старше 65 лет [128]. Однако, пародонтит не является только воспалительными заболеваниями полости рта, к настоящему времени выявлено много потенциальных ассоциаций между системными заболеваниями и заболеваниями пародонта [138].

Поддесневые полимикробные сообщества индивидуумов с заболеваниями пародонта и без него, теперь хорошо выявляются с использованием молекулярно-генетических методов исследования [87]. Показано, что микробные сообщества в биоплёнках больше тесно связаны с заболеваниями пародонта, чем любые отдельные виды бактерий [85]. В ряде исследований изучалась связь между иммунными ответами хозяина и такими патогенами, как *Porphyromonas gingivalis*, *Streptococcus gordonii* и *T. Forsythia* [128]. Однако пероральный микробиом не ограничивается только тремя видами, а комплексное воздействие различных бактерий на заболевания пародонта более сложное, чем исследование одной бактерии [207].

Первоначально считалось, что патогенные бактерии ответственны за периодонтит, но теперь известно, что единственное присутствие патогенов недостаточно для разрушения тканей. Высказываются предположения, что помимо дисбиоза микробиома человека, воспалительная дисрегуляция также играет важную роль в заболеваниях пародонта [138].

В этой связи, особую роль играет целевая доставка комбинации лекарственных молекул, комплексно и пролонгировано воздействующих на воспалительный участок пародонта. Антимикробные, регенераторные и иммуностимулирующие компоненты могут быть таргентно доставлены с помощью наноконтейнеров при использовании ниосомальных гелей.

Преимущества ниосомальных гелей заключаются в увеличении биодоступности инкапсулированных веществ путем улучшения проникновения, а также в пролонгации действия и накоплении в месте нанесения [6,14].

Основной показатель возможности направленного транспорта биологически активных веществ, является размер везикул ниосом [143]. С помощью электронной и атомно–силовой микроскопии получены результаты измерения ниосом. Данные свидетельствовали о преобладании везикул от 80 до 140 нм. Аналитические методы измерения размеров частиц, основанные на физических и физико–химических явлениях, используются при участии сложных измерительных приборов [183]. К ним относятся лазерное корреляционное светорассеяние и микроскопирование, однако высокая стоимость оборудования делает актуальным поиск альтернативных методов контроля наночастиц. Фотометрический метод исследования размеров ниосомальных везикул, как в процессе их получения, так и в процессе хранения, представляется эффективной альтернативой в будущем [117].

Использование методики серебрения приводило к уменьшению размеров ниосом. Большинство ниосом имели размер до 110 – 120 нм, что увеличивало их возможность для переноса молекул. Кремнийорганические ниосомы являлись эффективным сорбентом атомов серебра. Это подтверждалось тем, что в нейтральной среде ( $\text{pH} = 7$ ) около 80% восстановленного серебра, инкапсулировалось в ниосомы. Исследования показали, что количество серебра в ниосомах составило  $0,864 \pm 0,054$  мг/л. Сорбционная ёмкость кремнийорганических ниосом обусловлена наличием функциональных групп Si–O–Si в молекуле диметикона. Электрический потенциал формировался благодаря присутствию на поверхности ниосом атомов серебра. Это приводило к формированию ниосом с атомами серебра меньших размеров по сравнению со свободными от атомов серебра ниосомами.

Биологическое действие частиц серебра зависит от морфологии и физико–химических свойств наночастиц, а также, от особенностей микроорганизмов, с которыми они сталкиваются [119, 129].

Электронная микроскопия зафиксировала толщину стенок ниосом 3–4 нм. Диаметр наноконтейнера для низкомолекулярных пептидов составлял до 12 нм. Молекулы полидиметилсилоксановой основы стенок ниосом эластичны, что позволяет направленно доставлять широкий спектр антимикробных веществ и направленно их высвобождать из ниосом. Это обусловлено наличием функционально активных групп в молекуле ПЭГ –12 Диметикона. К примеру, ковалентные связи Si–O–Si в гидрофобной части молекулы полидиметилсилоксановой основы эластичны и осаждают атомы серебра на поверхности ниосом. Ниосомы содержат гибрид кремния (диметикона) и углерода (полиэтиленгликоля). СН<sub>3</sub> – (метильные) группы образуют «облако» вокруг атомов Si. Это обуславливает стабильность ниосом. Длина молекулярной связи Si – O намного длиннее связи C – C, что определяет эластичность ниосом по сравнению фосфолипидами. Этот факт также позволяет образовывать нановезикулы без значительных энергетических усилий. Длина молекулярной связи Si–O 1,6 Å, в то время, как длина связи аналогов ПАВ C –C 1,4 Å. Угол связи Si–O–Si гораздо больше и составляет 130 градусов, в отличие от 109 градусов связи C–C–C. К тому же связь Si – O – Si вращается, что придаёт дополнительную эластичность.

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.

Крысы были разделены на 4 группы по 12 животных (6 самок, 6 самцов), кролики разделены также на 4 группы по 3 особи.

Дозы ниосомального геля для оценки его токсичности выбирали по оптимальному содержанию 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). В течение 2–х недель наблюдали за опытными животными. Наблюдали за следующими показателями: общее состояние животных, их поведение, интенсивность и характер двигательной активности, реакция на тактильные, болевые, звуковые и световые раздражители, частота и глубина дыхательных движений, наличие и характер судорог, координация движений, состояние волосяного и кожного покрова, консистенция фекальных масс, потребление корма и воды.

Контрольным группам животных обрабатывали кожу эквивалентным количеством физиологического раствора.

Выявление повреждающего действия антимикробного ниосомального геля позволили определить, какие органы и ткани наиболее чувствительны к гелю перед проведением клинических испытаний. 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.

При изучении микробиологического статуса с помощью молекулярно–генетических методов исследования определяли количество и частоту выявления пародонтогенов в контрольных и опытных группах.

Современные технологии анализа микробиоты биопленки полости рта расширяют наши возможности в раскрытии новых сторон патогенеза такого частого стоматологического заболевания как хронический пародонтит в его взаимодействии с соматической патологией [85,89]. Очевидно, что в результате введения в лабораторную практику новых молекулярно–биологических технологий, основанных на приемах ПЦР–диагностики и высокопроизводительного секвенирования, удалось обнаружить и другие микроорганизмы, которые культивируются и не выявляются при обычном бактериологическом исследовании [207].

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*.

При заболеваниях пародонта гигиеническое состояние полости рта ухудшается. Это связано с наличием микробной колонизации. Количество микрофлоры возрастает, следовательно, увеличивается содержание продуктов её жизнедеятельности [128]. Благодаря присутствию пародонтопатогенной микрофлоры инициируется развитие метаболических, морфологических и функциональных изменений в полости рта [138]. Вследствие этого течение воспалительных процессов пародонта утяжеляется.

Проведённые лабораторно–диагностические исследования позволили установить, что у пациентов группы с воспалительными заболеваниями пародонта, частота выявления носительства пародонтопатогенных видов составила 48,3%. У 51,7% лиц не было выявлено пародонтопатогенной микрофлоры. Исследования маркеров, выделенных из проб у пациентов 2 этой группы, показали, что 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*.

Исследования, проведенные в опытной группе со стандартным местным лечением, показали, что частота выявления носительства пародонтопатогенных видов составила 44,1%. У 55,9% пациентов не было выявлено ни одного вида пародонтопатогенной микрофлоры. Исследования маркеров, выделенных из проб у пациентов этой группы, позволили установить, что 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*.

Наблюдение за пациентами с заболеваниями пародонта опытной группы со стандартным местным лечением пастой, содержащей метронидазол и ацетилсалициловую кислоту, выявили снижение числа анаэробных пародонтопатогенных бактерий в биопленке.

После лечения антимикробным ниосомальным гелем, модифицированным атомами серебра, у больных опытной группы, анализ структуры маркеров пародонтопатогенных видов показал их наличие в 35,6%. У 64,4% пациентов 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.

Следовательно, лечение антимикробным ниосомальным гелем, модифицированным атомами серебра, приводило к очевидному снижению пародонтопатогенной микрофлоры.

Полученные данные по резидентной микрофлоре биопленки имели разнонаправленную динамику. В сравнении с количественными показателями контрольной группы, происходящее увеличение содержания *Streptococcus salivarius* в 1,03–1,0 раза, сопровождается снижением *Peptostreptococcus anaerobius* в 1,44 раза и *Veillonella parvula* в 1,19 раза.

Антимикробная активность ниосомального геля при местном применении в стоматологической практике объяснялась также непосредственным действием самих ниосом кремнийорганической природы. Ниосомы взаимодействовали с плазматическими мембранами микроорганизмов, увеличивая их проницаемость для низкомолекулярных веществ, что приводило к их гибели при набухании и разрывам вследствие изменения внутриклеточного осмотического давления.

Бактериологические исследования антимикробной активности ниосомальных гелей показали, что антимикробные ниосомальные гели с атомами серебра подавляют рост микроорганизмов. Так, в отношении *Porphyromonas gingivalis* зона задержки роста для ниосомального геля с ниосомами, на поверхности которых не находилось серебро, составила  $16,8 \pm 0,14$  мм. Антимикробная активность препарата с атомами серебра вдвое превышала активность ниосомального геля без атомов серебра и 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, 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*.

Установлена высокая антимикробная активность всех разработанных ниосомальных гелей. Антимикробная активность атомов серебра усиливала действие ниосомальных гелей ко всем обнаруженным пародонтогенам микробной биоплёнки. Этот факт подтверждается данными, исследования антимикробной активности, как атомов серебра, так и фитоэкстрактов. Ранее, при изучении антимикробной активности для штаммов *Porphyromonas gingivalis* минимальная ингибирующая концентрация составила 7,08 мкг/мл при диапазоне значений от 25 до 1,5 мкг/мл. Исследованиям ряда авторов показано,

что значения МИК для штаммов *Porphyromonas gingivalis* составляют от 2,5 до 60 мкг/мл. Известно, что антимикробные экстракты потенцируют свободно-радикальное окисление, меняя физико-химические показатели клеточной стенки у резистентных бактерий. Нами выявлено увеличение проницаемости плазматической мембраны и соответственно усиление проникновения активных веществ через клеточную стенку бактерий. Данные фармакокинетики демонстрируют антибактериальную эффективность экстрактов, накапливающихся в повреждённых воспалительных тканях пародонта.

При микроскопическом исследовании проведено цитоморфологическое изучение биопленки пародонта. Обнаружены различия у пациентов контрольной групп с интактным пародонтом и у больных с пародонтальной патологией. Микробная биопленка у пациентов контрольной группы была структурированного характера. В биоплёнке отчетливо определялись дренажные отверстия, и укрепляющие матрикс тяжи. При микроскопии с увеличением в 100 раз слабо можно было разглядеть контуры бактерий, прикрытые полимерной мантией. С увеличением в 16 000 раз, бактерии были отчетливо видны под мантией. Клеточные элементы пародонтопатогенов имели размер от 250 до 850 нм. Иная картина наблюдалась у группы с воспалением пародонта. Микробная же биопленка при пародонтальной патологии имела другую картину: структурирована была нечетко, плохо прослеживались отверстия, выполняющую функцию дренажа.

В настоящее время оценка болезни пародонта основана на исследовании периодонтального кармана. Однако статус карманов не может рассматриваться только с помощью измерений их глубины или доступных стандартных микробиологических тестов [138]. Необходимо не только контролировать восстановление периодонтального кармана во время лечения, но и определять потенциальный риск периодонтита среди здоровых пациентов. В этой связи представляет интерес изучение корреляции между соотношением дисбактериозов полости рта и глубиной карманного пародонта [128].

Определение видового и количественного состава пародонтопатогенов периодонтальных карманов во многом определяет разницу между состоянием здоровья и болезнью пациента. Выявленный процент родов микроорганизмов и соотношение бактерий в полости рта должен быть ассоциирован с состоянием здоровья или болезни [217]. Определение микробиоты, типичной для здоровья полости рта или хронического периодонтита, до настоящего времени, пока ещё затруднено [200]. Конкретные роды (*Veillonella*, *Neisseria*, *Rothia*, *Corynebacterium* и *Actinomyces*) широко распространены (> 95%) и свидетельствуют о состоянии здоровья. Тогда, как другие роды (*Eubacterium*, *Campylobacte*, *Treponema* и *Tannerella*) часто связаны с хроническим периодонтитом. Расчет показателей дисбактериоза, основанный на относительной численности родов, обнаруженных в состоянии здоровья, по сравнению с периодонтитом свидетельствует о значимости этого показателя и представляется нам, как перспективный критерий потенциальных заболеваний пародонта.

Микробный дисбактериоз при пародонтите обусловлен непропорциональным воспалительным иммунным ответом. Такой дисбаланс в составе микрофлоры полости рта, как правило, приводит к развитию хронического деструктивного воспаления [193].

В результате исследований функций активности лимфоцитов в зоне повреждения слизистой полости рта больных пародонтитом выявлено, что на фиксированных и окрашенных мазках крови ядра лимфоцитов имеют свойственную для них форму, в них отчетливо просматриваются лежащие акроцентрично округлой формы AgЯО, окрашенные в темно-коричневый цвет.

Установлено, что средняя площадь ядра в лимфоцитах находилась в пределах от  $64,96 \pm 2,79$  мкм<sup>2</sup> до  $113,20 \pm 5,89$  мкм<sup>2</sup>, она изменялась волнообразно и зависела от времени, прошедшего после лечения и применения ниосомального геля и без него.

Так, у пациентов, которым при лечении использовали пасту с метронидазолом, средние значения площади ядер лимфоцитов возрастали к 3–му дню после лечения на 7,81 %. К 6–му дню после лечения средняя площадь ядер лимфоцитов значительно снижалась, по сравнению с предыдущим периодом исследования (на 31,17 %,  $p < 0,05$ ), и даже была достоверно ниже ( $p < 0,05$ ), чем в материале, отобранном во время операции (на 25,34 %). К 9–м суткам после лечения в этой группе пациентов средние значения площади ядер лимфоцитов возрастали на 23,11 % ( $p < 0,05$ ) и приближались к значениям, полученным в материале, отобранном во время лечения. Исследованиями установлено, что у пациентов, которым применяли антимикробный ниосомальный гель, модифицированный атомами серебра, наблюдается несколько иная динамика в изменении средних значений площади лимфоцитов. Через 3 дня после лечения средние значения площади ядер лимфоцитов не отличались от данных в материале, полученном во время операции. К 6–м суткам после лечения в лимфоцитах значительно увеличились ( $p < 0,05$ ), достигнув максимума, средние значения площади их ядер ( $113,20 \pm 5,89$  мкм<sup>2</sup>) по сравнению как с данными, полученными в предыдущий период исследования (на 23,30 %), так и с данными в материале, отобранном в начале лечения (на 23,14 %). На 9 день после лечения в этой группе средние значения площади ядер лимфоцитов достоверно ( $p < 0,05$ ) снизились на 26,55 % и не отличались от данных, полученных в материале в начале лечения.

Таким образом, 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 повышались на 3–е сутки, затем резко снижались к 6–му дню, и стабилизировались к 9–му дню, а в группе, где применялся ниосомальный гель с атомами серебра, не изменяясь на 3 день, значительно возрастали к 6–м суткам после начала лечения и возвращались также к 9–м суткам. На 6–е 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 геля они, вероятно, более функционально активны. Количество единиц AgЯО в ядре типичного лимфоцита, независимо от срока после начала составило 1–2, преимущественно компактного или нуклеолонемно–компактного типа. Подтверждением различной функциональной активности лимфоцитов в зоне лечения при применении и без применения антимикробного ниосомального геля с серебром является изменение суммарной площади AgЯО, как одного из показателей функциональной активности клетки. Установлено, что средняя суммарная площадь AgЯО в ядрах лимфоцитов находится в пределах от  $2,25 \pm 0,27$  мкм<sup>2</sup> до  $5,00 \pm 0,43$  мкм<sup>2</sup>. У пациентов, которым не применяли гель, средние значения суммарной площади AgЯО в ядрах лимфоцитов достоверно ( $p < 0,05$ ) возрастали к 3–му дню после операции на 46,09 %. К 6–му дню после вмешательства средняя суммарная площадь AgЯО в ядрах лимфоцитов значительно снижалась, по сравнению с предыдущим периодом исследования (на 51,90 %,  $p < 0,05$ ), и даже была незначительно ниже. К 9–м суткам после начала лечения в этой группе пациентов средние значения суммарной площади AgЯО в ядрах лимфоцитов возрастали на 41,89 % ( $p < 0,05$ ), по сравнению с предыдущим сроком исследования, достоверно не отличались от данных на 3–й день, но были достоверно ( $p < 0,05$ ) выше (на 34,87 %) по сравнению со значениями, полученными в материале, отобранном в начале лечения. Что же касается пациентов, которым применяли антимикробный гель с серебром, наблюдается несколько другая динамика в изменении средних значений суммарной площади AgЯО в ядрах лимфоцитов. Через 3 дня после начала лечения средние значения суммарной площади AgЯО в ядрах лимфоцитов, то они достоверно не отличались от данных в материале, полученном во время лечения. Однако к 6–

м суткам после начала лечения в лимфоцитах она значительно увеличилась ( $p < 0,05$ ) и достигла максимума. Ее средние значения по сравнению как с данными, полученными в предыдущий период исследования (на 34,00 %), так и с данными в материале, отобранном во время лечения (на 46,20 %) были достоверно ( $p < 0,05$ ) выше. На 9 день после начала лечения в этой группе средние значение суммарной площади AgЯО в ядрах лимфоцитов достоверно ( $p < 0,05$ ) снизились в 2,22 раза по сравнению с данными 6-го дня, но они достоверно не отличались от данных, полученных в материале после начала лечения. Таким образом, исследованиями выявлены различия в динамике средних значений суммарной площади AgЯО в ядрах лимфоцитов. В группе пациентов с традиционным лечением пастой с метронидазолом, значения этого показателя изменяются волнообразно, повышаясь на 3-е сутки, затем снижаются к 6-му дню, и возрастают к 9-му дню. В то время, как в группе с применением антимикробного ниосомального геля с атомами серебра, средняя суммарная площадь AgЯО в ядрах лимфоцитов достоверно не изменяясь на 3 день, значительно возрастает только на 6-е сутки после начала лечения, а затем снижается на 9-е сутки, приближается к средним значениям, полученным во время начала лечения. На 6-е сутки после начала лечения у пациентов опытной группы с лечением ниосомальным гелем, модифицированным атомами серебра, средняя суммарная площадь AgЯО в ядрах лимфоцитов была в 2,08 раза больше, чем у пациентов группы с традиционным лечением.

Полученные данные по изменению средней суммарной площади AgЯО в ядрах лимфоцитов также указывают на то, что в поражённом участке изменяется функциональное состояние лимфоцитов. При использовании антимикробного ниосомального геля лимфоциты в меньшей степени реагируют на характер течения процесса репарации, что проявляется одним пиком (на 6-й день) повышения их функциональной активности.

Можно предположить, что увеличение ядер лимфоцитов связано с увеличением репликативных процессов в их геномной ДНК, и, соответственно, увеличением нуклеопротеинового комплекса.

Для изучения эффективности антимикробного нисомального геля, модифицированного атомами серебра, 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.

У представителей контрольной группы с интактным пародонтом воспалительные процессы в тканях пародонта не обнаружены. При хроническом пародонтите результаты обследования существенно различались в зависимости от степени тяжести. Показатели индексов и проб свидетельствовали о наличии неудовлетворительной гигиены полости рта и выраженного воспалительного процесса в тканях пародонта. Индекс показатель тонуса сосудов (ПТС) до лечения был повышен –  $27,93 \pm 2,12\%$ . Также были повышены индекс периферического сопротивления (ИПС) –  $119,62 \pm 4,04\%$ , но индекс эластичности (ИЭ) –  $55,19 \pm 2,48\%$  был снижен. Такие данные демонстрировали нарушение микроциркуляции и возрастание тонического напряжения сосудов пародонта.

Продолжительность лечения пастой на основе метронидазола в 1-й группе составила 16 дней. В результате отмечалась улучшение гигиенического состояния полости рта, произошла нормализация цвета и плотности дёсен, неприятный запах изо рта и кровоточивость прекратились. Гигиенические и пародонтальные индексы и пробы снизились: Green–Vermillion – в 2,53 раза; ПМА – в 3,45 раза, Loe–Silness – в 1,89 раза, РВІ – в 2,47 раза, РІ – в 1,44 раза, ПК – уменьшился на 0,29 мм, ИДЖ– в 7,96 раз, проба Кулаженко возросла в 7,19 раз.

Во 2 группе, где применяли гель с пептидами и фитоэкстрактами, лечение продолжалось 13 дней, и после лечения слизистая оболочка была бледно-розового цвета, увеличилась стойкость капилляров десны. Произошло снижение гигиенических и пародонтальных индексов: Green–Vermillion – снизился в 2,57 раза; ПМА – 3,2 раза; Loe–Silness – в 1,42 раза; PBI – в 2,54 раза; PI – в 1,32 раза; ПК – стал меньше на 0,2 мм; ИДЖ– снизился в 8,62 раза; проба Кулаженко – 8,44 раза.

В 3 группе, подгруппе «А», где лечение происходило антимикробным ниосомальным гелем и составило 9 дней. После лечения исчезал неприятный запах из полости рта, кровоточивость и болезненность десен прекращались быстрее на 2–3 дня. Снижение гигиенических и пародонтальных индексов и проб было следующим: Green–Vermillion – снизился в 3,92 раза; ПМА – 9,62 раза; Loe–Silness – в 3,22 раза; PBI – в 4,94 раза; PI – в 2,04 раза; ПК – стал меньше на 1,08 мм; ИДЖ снизился в 12,42 раза, проба Кулаженко увеличилась в 8,4 раза.

В подгруппе «Б» 3–й группы, проводили лечение антимикробным ниосомальным гелем, модифицированным атомами серебра. И изменения здесь оказались более значительными в течение 7 дней, что подтвердилось снизившимися показателями гигиенических и пародонтальных индексов и проб.

Таким образом, наиболее эффективное лечение больных было в 3–й «Б» подгруппе.

Изменения реопародонтограммы после лечения оказалась общей для больных 1–й, 2–й и 3–й групп. Восходящая часть анакроты стала более крутой, вершина более острой, на катакроте появился дикротический зубец. Во всех группах у больных произошло снижение периферического тонуса сосудов и индекса периферического сопротивления, повышения индекса эластичности сосудов.

Через 6 месяцев воспалительный процесс в тканях пародонта возобновился у 18 пациентов в 1-й группе, у 12 пациентов 2-й группы, у 1 пациента 3 «А» группы. Отмечено повышение показателей индекса ИПС и снижение ИЭ. В подгруппе 3 «Б» группы, воспалительных изменений не обнаружено.

Показатели РПГ демонстрировали нарушение кровообращения в тканях пародонта. При рентгенологическом обследовании выявлена деструкция межзубных перегородок до  $\frac{1}{2}$  длины корня, наличие очагов остеопороза, повышение прозрачности кости, расширение периодонтальной щели по всей окружности корней зубов.

Через 12 месяцев после начала лечения были получены различные показатели в разных группах. Показатели индексов и проб у больных с пародонтитом через 12 месяцев после лечения представлены в таблице 8. В период обострения рентгенологическое исследование тканей пародонта выявило остеопороз, резорбция костной ткани на  $\frac{1}{2}$  высоты межзубных перегородок, неравномерное расширение периодонтальной щели.

Ремиссия наблюдалась у 85 % больных 3-й «А» подгруппы и 90% 3-й «Б» подгруппы. Воспалительные изменения отсутствовали. Зафиксировано уменьшение глубины пародонтальных карманов, отсутствие мягких и твердых зубных отложений и кровоточивости десен. У пациентов 3 «А» и 3-й «Б» подгрупп рентгенограмма показала признаки стабилизации воспалительного процесса в виде уплотнения костной ткани межзубных перегородок, отсутствие остеопороза, восстановление плотности кортикальной пластинки.

Через 12 месяцев после лечения были выявлены нарушения в кровообращении у 90% больных в 1-й группе и у 80% во 2-й группе. Реографические данные продемонстрировали пологую анакроту, плоскую вершину, сглаженную и смещенную вверх катакроту дикротического зубца.

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. Значительное сокращение времени лечения у пациентов, получавших антимикробный ниосомальный гель, модифицированный атомами серебра, продемонстрировало его антимикробную эффективность при лечении заболеваний пародонта в сравнении с традиционными методами лечения.

Таким образом, реализована современная стратегия создания антимикробных препаратов, основанная на концепции не синтеза новых лекарственных молекул, а на повышении терапевтической ценности и резистентности микроорганизмов при направленной доставке в зону поражения природных антимикробных веществ.

## 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 позволяет 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 ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Авакьянц, Б.М. Лекарственные растения в ветеринарной медицине / Б.М. Авакьянц, 2001. – 336 с.
2. Амасиаци, А. Ненужное для неучей / А.Амасиаци. – М., 1990. – 879с.
3. Амхадова, М.А. Применение комплексной терапии в сочетании фитопрепарата масла солодки и ультразвукового скейлера при лечении больных хроническим генерализованным пародонтитом на фоне сахарного диабета 2–го типа / М.А. Амхадова, Б.С. Жаналина, Н.Ж. Жолдасова и др. // Российский стоматологический журнал. – 2014. – №4. – С. 20–22.
4. Ахметова, С.Б. Антимикробная и противогрибковая активность арглабина и его аналогов / С.Б. Ахметова // Российский биотерапевтический журнал. – 2005. – №2. С. 47–49.
5. Базиков, И.А. Трипсинизация плацентарной ткани животного происхождения для получения культуры клеток, используемой при лечении заболеваний пародонта / И.А. Базиков, А.Л. Гукасян, В.А. Зеленский/ Медицинский вестник Северного Кавказа. –2011.№2.С.59.
6. Базиков, И.А. Оценка репаративной способности, антимикробной и лимфоцитарной активности ниосомального геля «РЕГЕНЕРИН» в стоматологической практике / И.А. Базиков, А.А. Долгалев, А.Н. Квочко, В.А. Зеленский, М.А. Матюта, А.А. Долгалева, Е.А. Гоптарева, В.И. Королькова // Бактериология. – 2018. – Т. 3. № 2. – С. 7–11.
7. Базиков, И.А. Оценка размеров и стабильности везикул кремнийорганической природы, используемых для трансдермальной доставки активных субстанций / И.А. Базиков, В.А. Аксененко, Э.М. Хатков, А.Л. Гукасян, З.А. Сеираниду / Медицинский вестник Северного Кавказа. –2012.– №1.С.81
8. Булкина, Н.В. Хронический пародонтит при заболеваниях органов пищеварения: клинико–инструментальные, морфологические и

иммуногистохимические критерии возникновения и прогнозирования течения: автореф. дис. докт.мед. наук./ Н.В. Булкина. – Волгоград, 2005. – 26 с.

9. Волик, Н.А. Биогенные стимуляторы в лечении воспалительных заболеваний пародонта/ Н.А. Волик // Стоматология. – 1998. – №2. – С. 22–26.

10. Волчегорский, И.А. Сравнительный анализ эффективности применения производных 3-оксипиридина и янтарной кислоты в лечении хронического генерализованного пародонтита / И.А. Волчегорский, Н.В. Корнилова, И.А. Бутюгин //Пародонтология. – 2010. – №4 (57). – С. 55–59.

11. Гализина, О.А. Эффективность фитопрепарата при лечении и профилактике кариеса зубов и катарального гингивита: автореф.дис. канд. мед.наук. – М., 2013. – 24 с.

12. Георгиевский, В.П. «Биологически активные вещества лекарственных растений / В.П. Георгиевский, Н.Ф. Комисаренко, С.Е. Дмитрук. / Новосибирск, 1990. – 333 с.

13. Головкин, Б.Н. Биологически активные вещества растительного происхождения / Б.Н. Головкин, Р.Н. Руденская, И.А. Трофимова. – М; 2001. – 233 с.

14. Гоптарева, Е.А. Антимикробная активность ниосомального геля «РЕГЕНЕРИН» при лечении пародонтита // В сборнике: БИОТЕХНОЛОГИЯ: ВЗГЛЯД В БУДУЩЕЕ Материалы 5 международной научно–практической конференции. – 2019.

15. Горбатова, Е.А. Отечественные препараты из растительного сырья в комплексном лечении заболеваний /Е.А. Горбатова, Т.И. Лемецкая, Б.М. Мануйлов // Институт стоматологии. – 2000. – №1. – С. 32–33.

16. Гродницкая, Е.И. Стандартизация комплексного препарата для лечения заболеваний пародонта / Е.И. Гродницкая, О.А. Коновалова, Я.Ф. Копытько и др. // Химико–фармацевтический журнал. – 2002. – №9. – С. 44–46.

17. Грудянов, А.И. Лекарственные средства, применяемые при заболеваниях пародонта / А.И. Грудянов, Н.А. Стариков // Пародонтология. – 1998. – №2. – С. 6–17.
18. Грудянов, А.Н. Антимикробная и противовоспалительная терапия в пародонтологии / А.Н. Грудянов, В.В. Овчинникова, Н.А. Дмитриева. – М., 2004. – 80 с.
19. Грудянов, А.И. Профилактика воспалительных заболеваний пародонта / А.И. Грудянов. – М., 2007. – 80 с.
20. Грудянов, А.И. Сравнительная оценка клинических показателей эффективности различных способов чистки зубов в процессе ортодонтического лечения / А.И. Грудянов, В.В. Булыгина, М.Г. Курчанинова // Пародонтология. – 2010. – №1 (54). – С. 65–67.
21. Давыдов, А. Б. Микрокапсулирование / А. Б. Давыдов, В. Д. Солодовник // Энциклопедия полимеров. 1974. – Т. 2. – С. 247–258.
22. Диденко, Л.В, Формирование биопленок на стоматологических полимерных материалах как основа персистенции микроорганизмов при патологии зубов и пародонта / Л.В. Диденко, Г.А. Автандилов, Е.В. Ипполитов, Е.В. Царева, Т.А. Смирнова, Н.В. Шевлягина, В.Н. Царев // Эндодонтия Today – 2015. – Vol. 4. – P. 13–17.
23. Дмитриева, Л.А. Клинические и микробиологические аспекты применения реставрационных материалов и антисептиков в комплексном лечении заболеваний пародонта / Л.А. Дмитриева, А.Е. Романов, В.Н. Царев. – М., 2002. – 94 с.
24. Дмитриева, Л.А. Современные представления о роли микрофлоры в патогенезе заболеваний пародонта / Л.А. Дмитриева, А.Г. Крайнова // Пародонтология. – 2004. – №1. – С. 8–15.
25. Жезняковская, Л.Ф. Стоматологические пленки на основе растительных экстрактов / Л.Ф. Жезняковская, Д.Г. Долинина, Л.Б. Оконенко // Фармация. – 2012. – №7. – С. 35–37.

26. Жиновский, Ф. Безболезненная терапия пародонта / Ф. Жиновский // Клиническая стоматология. – 2003. – №1. – С. 48–50.
27. Заболевания пародонта / Под ред. проф. Ореховой Л.Ю. – М., 2004. – 432 с.
28. Заболевания пародонта: руковод.к прак. занятиям по терапевт. стоматологии для студ. IV и V курсов стомат. факультетов /И.М. Макеева, Т.В. Кудрявцева, А.И. Ерохин, А.В. Акулович. – М., 2009. – 96 с.
29. Заболевания пародонта: современный взгляд на клинико–диагностические и лечебные аспекты / под. ред. Проф. О.О. Янушевича. – М., 2010. – 146 с.
30. Зорина, О. А. Цитокины и их роль в развитии агрессивного пародонтита [Текст] / О. А. Зорина, О. А. Борискина, Н. К. Аймадинова [и др.] // Фарматека. – 2013. – № 3–13. – С. 39–43. – СПЕЦВЫПУСК: Стоматология.
31. Зорян, Е.В. Опыт клинического применения антисептических препаратов при заболеваниях пародонта /Е.В. Зорян, Т.Д. Бабич, В.Г. Романова // Клиническая стоматология. – 2005. – №3 (35). – С. 26–28.
32. Зорян, Е.В. Современные направления фармакотерапии заболеваний слизистой оболочки полости рта /Е.В. Зорян //Клиническая стоматология. – 2009. №3(51). – С. 22–25.
33. Ибн Сино, А.А. Канон врачебной науки. Избр. отделы. – Ч.1. / А.А. Ибн Сино. – М., 1994. – 400с.
34. Ибрагимов, Ф.И. Основные лекарственные средства китайской медицины / Ф.И. Ибрагимов, В.С. Ибрагимова. – М., 1960. – 412 с.
35. Иванов, В.С. Заболевания пародонта /В.С. Иванов. – М., 2001. – 300 с.
36. Ипатова, О.М. Фосфолипидная система доставки лекарственных веществ / О.М. Ипатова, А.И. Арчаков, А.С. Иванов // Человек и лекарство: тезисы докладов VI Рос. нац. конгресса. – М. 1999. – С. 412 – 414.

37. Ипполитов, Е.В. Мониторинг формирования микробной биопленки и оптимизация диагностики воспалительных заболеваний пародонта / Дис. док. мед. наук – М. – 2016. – 337 с.

38. Калинин, В.И. Эффективность применения пролонгированных препаратов для лечения воспалительных заболеваний пародонта / В.И. Калинин, Т.В. Кудрявцева, Л.Ю. Орехова // Пародонтология. – 1997. – №2(4). – С.16–18.

39. Караков, К.Г. Лекарственные средства в пародонтологии. Методы лечения / К.Г. Караков, Т.П. Данченко, Т.Н. Власова. – Ростов н/Д., 2007. – 144с.

40. Караков, К.Г. Применение современных препаратов в комплексном лечении пародонтита // К.Г. Караков, А.А. Саркисов, З.А. Сеираниду и др. // Актуальные вопросы стоматологии. Ростов–на–Дону, 2011. – С. 183–190.

41. Караков, К.Г. Способ лечения гипертрофического гингивита / К.Г. Караков, Т.Н. Власова, А.В. Оганян, З.А. Сеираниду. Патент Р.Ф. №2568852 от 23.09.2014.

42. Коновалов, Ю.Б. Фармакогностическое изучение полыни австрийской как источника фармакологически активных сесквитерпеновых лактонов: автореф дис. ... канд. мед.наук. /Ю.Б. Коновалов. – Пятигорск, 2007. – 27 с.

43. Кохан, С.Т. Влияние экстракта молочая паласа на микроциркуляцию тканей пародонта у больных с хроническим гингивитом в условиях Забайкалья / С.Т. Кохан, И.И. Бородулина, Ю.В. Кухаренко и др. // Российский стоматологический журнал. – 2009. – №3. – С. 40–42.

44. Кречина, Е.К. Применение фитопрепарата *Artemisia absinthium* L. в комплексном лечении воспалительных заболеваний пародонта / Е.К. Кречина, В.В. Белоруков // Стоматология, – 2012. – Т. 91, – №4. – С. 22–24.

45. Кулаков, А. А. Роль защитных факторов организма в патогенезе воспалительных заболеваний пародонта [Текст] / А. А. Кулаков, О. А. Зорина, О. А. Борискина // Стоматология. – 2010. – № 6. – С. 72–77.

46. Курякина, Н.В. Заболевания пародонта /Н.В. Курякина. – Н. Новгород, 2007. – 289 с.
47. Куттубаева, К.Б. Лечение рефрактерных форм генерализованного пародонтита с использованием растительных иммуномодуляторов – фитопрепаратов из *Radus Grajana Maxim* /К.Б. Куттубаева, Л.Б. Сабурова, Т.С. Сабирова и др. //Новое в стоматологии. – 2002. – №1. – С. 95–98.
48. Лепилин, А.В. Применение стоматологического комплекса КАП «Пародонтолог» при лечении заболеваний пародонта /А.Л. Лепин, Ю.М. Райгородский, Л.Ю. Островская и др. //Стоматология. – 2008. – №5. – С. 39–41.
49. Лоншакова, К.С. Использование фитопленки Хастаплен при экспериментальном моделировании пародонтита /К.С. Лоншакова, С.Р. Аюшиева, Д.Н. Оленников //Стоматология. – 2009. – №1. – С. 14–16.
50. Лукиных, Л.М. Болезни пародонта /Л.М. Лукиных, Е.Н. Жулев, М.Н. Чупрунова // – Н. Новгород, 2005. – 322 с.
51. Максимова, О.П. Старт болезней пародонта /О.П. Максимова // Клиническая стоматология. – 2012. – №4(64). – С. 44–50.
52. Максимовская, Л.Н. Лекарственные средства в стоматологии: Справочник /Л.Н. Максимовская, П.И. Рощина. – М., 2000. – 240 с.
53. Малышева Л. Ю. Оценка клинических, иммунологических и микробиологических показателей у пациентов с хроническим одонтогенным верхнечелюстным синуситом с различной продолжительностью заболевания 288 [Текст] / Л. Ю. Малышева, Л. С. Латышина, И. И. Долгушин // Актуальные вопросы хирургии: сб. научно–практ.работ. – Челябинск, 2014. – С. 184–186.
54. Мартиросян, В. Г. Клинико–микробиологические особенности диагностики хронического генерализованного пародонтита [Текст] / В. Г. Мартиросян, Н. В. Плескановская, Е. Н. Николаева [и др.] // Российский стоматологический журнал. – 2012. – № 4. – С. 29–34.
55. Москвин, С.В. Лазерно–вакуумный массаж /С.В. Москвин, Н.А. Горбани. – Тверь, 2006. – С. 41–66.

56. Муравьева, Д.А. Фармакогнозия / Д.А. Муравьева, И.А. Самылкина, Г.П. Яковлев. – М., 2002. – 665 с.
57. Николаев, А.И. Практическая терапевтическая стоматология. Учебное пособие /А.И. Николаев, Л.М., Цепов. – М., 2003. – 547 с.
58. Обоснование комплекса лечебных мероприятий для пациентов с пародонтитом / Т.Н. Модина [и др.] //Клиническая стоматология. – 2012. – №4(64). С. 56–60.
59. Оганесян, Э.Т. Новые лекарственные препараты из растительного сырья и отходов его переработки / Э.Т. Оганесян, А.В. Симонян, С.Х. Чамаев. // Российский национальный конгресс. – М., 1992. – С. 212–214.
60. Олесова, В.Н. Сравнение результатов обследования пародонта, полученных мануальным (инструментальным) и автоматизированным методами /В.Н. Олесова, О.М. Кузьминых //Пародонтология. –2004. – №2. – С. 37–41.
61. Орехова, Л.Ю. Основы профессиональной гигиены полости рта: Методические указания / Л.Ю. Орехова, Е.Д. Кучумова, Я.В. Стюф – СПб, 2004. – 56 с.
62. Орехова, Л.Ю. Новые технологии в пародонтологии /Л.Ю. Орехова, А.А. Луковенко //Материалы XIII Международной конференции челюстно–лицевых хирургов и стоматологов. – СП, 2008. – С. 171.
63. Регистр лекарственных средств России. РЛС. Энциклопедия лекарств /Под ред. Г.Л. Вышковского. – 14–й вып. – М. РЛС. 2007. – С. 537, 1028.
64. Решетняк, В.Ю. Изучение компонентов состава летучей фракции экстрактов растений, входящих в состав сбора для лечения заболеваний пародонта, методом газовой хромато–масс–спектрометрии /Решетняк В.Ю, Попков В.А., Нестерова О.В. и др. //Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2010. – №10. – С. 3–9.

65. Сеираниду, З.А. Лечение пародонтита при использовании наносомального геля «Регенерин» с фитозэкстрактами и лазерной фотодинамической терапии. В сборнике: Биотехнология: взгляд в будущее / З.А. Сеираниду, И.А. Базиков, К.Г. Каракоев // Материалы 4 международной научно–практической конференции. – Ставрополь. 2018. – С. 95–98.

66. Симановская, О.Е. Влияние стоматологического здоровья на качество жизни / О.Е. Симановская // Стоматология. – 2008. – №5. – С. 75–77.

67. Сохов, С.Т. Принцип выбора нестероидных противовоспалительных препаратов в стоматологии /С.Т. Сохов, Е.В. Зорян //Клиническая стоматология. – 2014. – №2(70). – С. 30–32.

68. Стоматология профилактическая / Под. Ред. Проф. Ореховой Л.Ю. – М., 2005. – 271 с.

69. Суетенков, Д.Е. Диагностическое обеспечение взаимодействия ортодонта и пародонтолога: оценка фиксирующей способности пародонта /Д.Е. Суетенков, А.В. Акулович, И.В. Фирсова // Пародонтология. – 2010. – №4 (57). – С. 26–30.

70. Теблоева, Л. М. Современные иммунологические аспекты в патогенезе заболеваний пародонта [Текст]: автореф.дис. докт.мед.наук: 14.01.14 / Теблоева Лаура Михайловна. – М., 2015. – 39 с.

71. Терентьева, Е.В. Выбор минимальных инвазивных средств при проведении наддесневой профгигиены /Е.В. Терентьева //Новое в стоматологии. – 2013. – №7(195). – С. 26–28.

72. Трезубов, В.Н. Справочник врача–стоматолога по лекарственным препаратам: учебное пособие /В.Н. Трезубов, И.В. Марусов, Л.М. Мишнев. СПб, 2005. – 398 с.

73. Улитовский, С.Б. Профилактика и лечение начальных форм заболеваний пародонта растительными лекарственными средствами /С.Б. Улитовский, Л.И. Шаламай //Пародонтология. – 2002.– №3. – С. 33–37.

74. Улитовский, С.Б. Индивидуальная гигиеническая программа профилактики стоматологических заболеваний / С.Б. Улитовский. – Н. Новгород, 2003. – 291с.
75. Улитовский, С.Б. Гигиена полости рта в пародонтологии /С.Б. Улитовский. – М., 2006. – 268 с.
76. Улитовский, С.Б. Гигиенический уход при воспаленном пародонте. Учебное пособие / С.Б. Улитовский. – М., 2008. – 280 с.
77. Упур, Х. Секреты китайской медицины. Лечение травами и минералами / Х. Упур, В.Г. Начатой. – СПб, 1992. – 204 с.
78. Ушаков, Р.В. Местное антимикробное лечение в стоматологии: учеб пособие /Р.В. Ушаков, В.Н. Царев. – М., 2004. – 134 с.
79. Ушаков, Р.В. Антимикробная терапия в стоматологии. Принципы и алгоритмы / Р.В. Ушаков, В.Н. Царёв // М., Практическая медицина, 2018. – 240 с.
80. Ушаков, Р.В. Антимикробная терапия в стоматологии. Принципы и алгоритмы / Р.В. Ушаков, В.Н. Царев. //Практическая медицина, – М., 2019. – 240 с.
81. Филатова, Н.А. Перспективы применения нового макролидного антибиотика – азитромицина (сумамеда) в комплексном лечении пародонтита /Н.А. Филатова, Е.А. Кузнецов, Л.А. Дмитриева //Стоматология. – 1995. – №1. С.12–15.
82. Фроули, Д. Аюрведическая терапия / Д. Фроули. – М., 1998. – 448 с.
83. Хайдав, Ц. Лекарственные растения в монгольской медицине / Ц. Хайдав, Т.А. Меньшикова. – Улан–Батор, 1978. – 192 с.
84. Ханина, М.А. Новые данные по химическому составу эфирного масла *Artemisa absintium* L. Сибирской флоры /М.А. Ханина, Е.А. Серых, Л.М. Покровский //Химия растительного сырья. – 2000. – №3. – С. 33–40.
85. Царев, В.Н. Особенности влияния хлоргексидин–содержащих препаратов на состояние микробиоциноза полости рта у больных пародонтитом

/В.Н. Царев, В.И. Чувилкин, Н.А. Мегрешвили //Пародонтология. – 2003. – №2(27). – С.49–54.

86. Царев, В.Н. Антимикробная терапия в стоматологии /В.Н. Царев, Р.В. Ушаков. – М., 2004. – 143 с.

87. Царёв, В. Н. Клиническая микробиология [Текст] / В. Н. Царёв, Р. В. Ушаков // Одонтогенные воспалительные заболевания / под ред. Т. Г. Робустовой. – М.: Медицина, 2006. – С. 112–138.

88. Царёв, В.Н. Бета–лактамы: цефалоспорины. В кн.: Антибиотики и противоинфекционный иммунитет / В.Н. Царёв, И.П. Балмасова, О.Ф. Еремина. Под ред. Н.Д. Ющука, И.П. Балмасовой, В.Н. Царёва. // М.: Практическая медицина, 2013 – с. 56–78.

89. Царев, В.Н. Генетические аспекты антибиотикорезистентности биоплёнко–формирующих штаммов клинических изолятов патогенов / В.Н.Царёв, Е.В. Ипполитов, А.А. Арутюнян, А.А. Лабазанов // В сборнике: Материалы IV национального конгресса бактериологов и международного симпо–зиума «Микроорганизмы и биосфера «MICROBIOS–2018» – г.Омск – 2018. Сентябрь. – С.32–34.

90. Ценер, П.П. Систематическое применение прибора «Вектор» в повседневной профилактике стоматологических заболеваний /П.П. Ценер //Клиническая стоматология. – 2002. – №2. – С. 38–43.

91. Цепов, Л.М. Диагностика и лечение заболеваний пародонта /Л.М. Цепов, А.И. Николаев. – М., 2004. – 200 с.

92. Цепов, Л.М. Заболевания пародонта: взгляд на проблему /Л.М. Цепов. – М., 2006. – 162 с.

93. Цепов, Л.М. Диагностика, лечение и профилактика заболеваний пародонта /Л.М. Цепов, А.И. Николаев, Е.А. Михеева. – М., 2008. – 272 с.

94. Цимбалистов, А.В. Комплексное лечение генерализованного пародонтита тяжелой степени тяжести с применением депульпирования зубов.

Руководство для врачей. / А.В. Цимбалистов, Э.Д. Сурдина, Г.Б. Шторина, Е.Д. Жидких. СПб., 2008 – 109с.

95. Чепуркова, О.А. Выбор антимикотических препаратов, используемых в комплексном лечении хронического генерализованного пародонтита, осложненного дрожжеподобными грибами рода *Candida spp.* / О.А. Чепуркова, М.Г. Чеснокова, В.Б. Недосеко // Клиническая стоматология. – 2008. – №1. – С. 32–35.

96. Чжуд–ши. Канон тибетской медицины / Чжуд–ши, пер. с тибетского, предисловие, примечания, указатели Д.Б. Дашиева. – М., 2001. – 766 с.

97. Чхве, Тхэсоп. Лекарственные растения / Чхве Тхэсоп. – М., 1987. – 606 с.

98. Шульгина, Т.А. Изучение антимикробных свойств дисперсных систем на основе наночастиц серебра и меди и обоснование перспектив их использования [Текст]: дис. ... канд. биол. наук / Шульгина, Т.А. – Саратов, 2015. – 117 с.

99. Янушевич, О.О. Современные организационные подходы к обеспечению качества стоматологической помощи /О.О. Янушевич, В.М. Гринин// Российская стоматология. –2009.–№1 – С. 5–8.

100. Янушевич, О.О. Стоматологическая заболеваемость населения России / О.О. Янушевич, Э.М. Кузьмина, И.Н. Кузьмина // М., 2009. – 63 с.

101. Addy, M. Systemic antimicrobials in the treatment of chronic periodontal diseases: a dilemma / M. Addy, M.V. Martin // Oral Dis. – 2003. – 9 (Suppl 1). – P. 38–44.

102. Adit, D. Using silver nano–particle ink in electrode fabrication of high frequency copolymer ultrasonic transducers: Modeling and experimental investigation / D. Adit, S. Wagle, S. Jacobsen, F. Melandsø// Textile Engineering and Fashion Design Blog. – 2015. – Vol. 23(2). – P. 9210–9227.

103. Agnihotri, J. Targeting: New Potential carriers for Targetted Drug Delivery system / J. Agnihotri, S. Saraf, A. Khale // International Journal of pharmaceutical sciences Review and Research. – 2011. – Vol. 8(2). – P. 117–120.

104. Ahamed, M. Silver nanoparticle applications and human health / M. Ahamed, M.S. Alsalhi, M.K.J. Siddiqui // Clinical Chemica Acta. – 2010. – Vol. 411(23). – P. 1841–1848.

105. Alsarra, I.A. Molecular weight and degree of deacetylation effects on lipase-loaded chitosan bead characteristics / I.A. Alsarra, S.S. Betigeri, H. Zhang, B.A .Evans, S.H. Neau // Biomaterials. – 2002. Septeber. – Vol. 23(17). – P. 3637–3644.

106. Banerjee, S. Structural evolution of silver nanoparticles during wet-chemical synthesis / S. Banerjee, K. Loza, O. Prymak, M. Epple // Chemical Materials. – 2014. – Vol. 26(2). – P. 951–957.

107. Bankura, K.P. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of dextran stabilized silver nanoparticles in aqueous medium / K.P. Bankura, D. Maity, M.M.R. Mollick, D. Mondal, B. Bhowmick, M.K. Bain, A. Chakraborty, J. Sarkar, K. Acharya, D. Chatopadhyay // Carbohydrate Polymers. – 2012. – Vol. 89(4). – P. 1159–1165.

108. Bartfay, W.J. Gram-Negative and Gram-Positive Antibacterial Properties of the Whole Plant Extract of Willow Herb (*Epilobium angustifolium*) / W.J. Bartfay, E. Bartfay, J. Green // Johnson Biol. Res. Nurs. – 2012. – Vol.14; №1. – P.85–89.

109. Bennet, P. Clinical pharmacology: 9th ed CHURCHILL LIVINGSTONE / P. Bennet, M. Brown. – 2003. P. 201– 209.

110. Bernstein, D. In vito viruciadal effectiveness of a 0,12% – chlorhexidin jluconat moufhrinse / D. Bernstein, G. Schiff, G. Echler // J. Den. Res. – 1990. – Vol. 69. – №3, – P. 874–876.

111. Bertram, G. Basic & Clinical Pharmacology 12th ed. / G. Bertram, B.S. Masters, A.J. Trevor // Lange Medical. – 2010.

112. Bhargav, E. Targeted drug delivery – A review / E.Bhargav, N.Madhuri, K.Ramesh, Anand manne, V.Ravi // World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. – 2013. – Vol. 3. – P. 159–169.
113. Bisht, N. Preparation and evaluation of in-situ oral topical gel of levofloxacin by using combination of polymers / N. Bisht, L. Goswami, P. Kothiyal // Indian Journal of Drugs. – 2014. – Vol. 2(4). – P. 142–151.
114. Bisht, S.S. Antimicrobial properties of few plants used in traditional system of medicine / S.S Bisht, P. Ramani et al. // IJRAP. – 2012. – Vol. 3; №4. – P. 12–19.
115. Borole P.M. Preparation and evaluation of insitu gel of levofloxacin hemihydrate for treatment of periodontal disease / P.M. Borole, S. Yogesh Chaudhari, Sanket S. Daaharashikvar, Suresh D. Kumavat, Khushbu Shenghani, Pankit R. Shah // IJPRBS. – 2013. – Vol. 2(3). P. 185– 190.
116. Dankovich, T.A. Bactericidal paper impregnated with silver nanoparticles for point-of-use water treatment / T.A. Dankovich, D.G. Gray // Environmental Science and Technology. – 2011. – Vol. 45(5). – P. 1992–1998.
117. Diskaeva, E.I. Investigation ultrasound influence on the size of niosomes vesicles on the based of PEG–12 Dimethicone / E.I. Diskaeva, I.A. Bazikov, O.V. Veher, K.S. Elbekyan, L.S. Mecyaceva // Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. – 2018. – T. 9. № 6. – P. 1016–1021.
118. Drugs Formulary for District Hospitals – Ethiopia. – DACA. – 2004. – P. 322.
119. Duran, N. Mechanical aspect of biosynthesis of silver nanoparticles by several *Fusarium oxysporum* strains / N. Duran, D.P. Marcato, L.O. Alves, G. De Souza, E. Esposito // Journal of Nanobiotechnology. – 2005. – Vol. 3. – P. 8–15.
120. Ezzo, P. J. Microorganisms as risk indicators for periodontal disease [Text] / P. J. Ezzo, C. W. Cutler // Periodontology 2000. – 2003. – Vol. 32. – P. 24–35.

121. Fayaz, A.M. Biogenic synthesis of silver nanoparticles and their synergistic effect with antibiotics: A study against gram-positive and gram-negative bacteria / A.M. Fayaz, K. Balaji, M. Girilal, M. Yadav, M.P. Kalaichelvan, R. Venketesan // *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. – 2010. Vol. 6(1). – P. 103–109.
122. Feng, Z. Role of bacteria in health and disease of periodontal tissues / Z. Feng, A. Weinberg // *Periodontol 2000*. – 2006. – Vol. 40. – P. 50–76.
123. Goswami, L. Engineered nano particles: Nature, behavior and effect on the environment / L. Goswami, K–H. Kim, A. Deep, P. Das, S. Sundar, S. Kumar, A. Adelodun // *Journal of Environmental Management*. – 2017. – Vol. 196. – P. 297–315.
124. Gulina, L.B. Silver nanoribbons synthesized on a silicon surface by the ‘layer-by-layer’ technique / L.B. Gulina, E.V. Tolstobrov, V.P. Tolstoi // *Russian Journal of General Chemistry*. – 2010. – Vol. 80(6):1149–1151.
125. Haase, A. A novel type of silver nanoparticles and their advantages in toxicity testing in cell culture systems / A. Haase, A. Manton, P. Graf, J. Plendl, A.F. Thuenemann, W. Meier, A. Taubert, A. Luch // *Archives of Toxicology*. – 2012. – Vol. 867. – P. 1089–1098.
126. Han, Y. W. *Fusobacterium nucleatum*: a commensal-turned pathogen [Text] / Y. W. Han // *Current Opinion in Microbiology*. – 2015. – Vol. 23. – P. 141–147.
127. Harii, T. Review on textile sonoprocessing: A special focus on sonosynthesis of nanomaterials on textile substrates / T. Harii, M.A. Montazer // *Ultrasonics Sonochemistry*. – 2010. – Vol. 23. P. 1–10.
128. Hasegawa, Y. Gingival epithelial cell transcriptional responses to commensal and opportunistic oral microbial species [Text] / Y. Hasegawa, J. J. Mans, S. Mao, [et al.] // *Infection and Immunity*. – 2007. – Vol. 75. – P. 2540–2547.
129. Hellmers, J. Light scattering simulation for the characterization of sintered silver nanoparticles / J. Hellmers, N. Rieler, T. Wriedt, Y.A. Eremin //

Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer. – 2008. – Vol. 108(8). –P. 1363–1373.

130. Hiroshi, H. Photoreduction of silver ion in aqueous and alcoholic solutions / H. Hiroshi, A. Yoshida, A. Kurakake // The Journal of Physical Chemistry. – 1976. – Vol. 80(25). – P. 2728–2731.

131. Hong, X. Silver nanowire–carbon fiber cloth nanocomposites synthesized by UV curing adhesive for electrochemical point-of-use water disinfection / X. Hong, J. Wen, J. Xiong, Y. Hu // Chemosphere. – 2016. – Vol. 154. – P. 537–545.

132. Humberto, P. Antimicrobial polymers with metal nanoparticles / P. Humberto // International Journal of Molecular Sciences. – 2015. – Vol. 16. – P. 2099–2116.

133. Hungund, B.S. Comparative evaluation of antibacterial activity of silver nanoparticles biosynthesized using fruit juices / B.S. Hungund, G.R. Dhulappanavar, N.H. Ayachit // Nanomaterials and Nanoscience. – 2015. – Vol. 6(2). – P. 1–6.

134. Hussain, I.J. Silver nanoparticles: Preparation, characterization and kinetics / I.J. Hussain, S. Kumar, A.A. Hashmi, Z. Khan // Advanced Materials. – 2011. – Vol. 2(3). – P. 188–194.

135. Hyeong–seon, L. Antibacterial activity of silver–nanoparticles against Staphylococcus aureus and Escherichia Coli / L. Hyeong–seon, D–S. Ryu, S–J. Choi, D–S. Lee // Korean Journal of Microbiology Biotechnology. – 2011. – Vol. 39(1). – P. 77–85.

136. Ibrahim, H.M.M. Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using banana peel extract and their antimicrobial activity against representative microorganisms / H.M.M. Ibrahim // Journal of Radiation Research and Applied Science. – 2015. – Vol. 8(3). – P. 265–275.

137. Iwasaki, A. Control of adaptive immunity by the innate immune system / A. Iwasaki, R. Medzhitov // Nature Immunology. – 2015. April. – Vol. 16(3). – P. 343–353.

138. Ji, S. Innate immune responses of gingival epithelial cells to nonperiodontopathic and periodontopathic bacteria [Text] / S. Ji, Y. Kim, B. M. Min [et al.] // *Journal of Periodontal Research*. – 2007. – Vol. 42. – P. 503–510.

139. Juanni, C. Enhancement of the antibacterial activity of silver nanoparticles against phytopathogenic bacterium *Ralstonia solanacearum* by stabilization / C. Juanni, S. Li, J. Luo, R. Wang, W. Ding // *Journal of Nanomaterials*. – 2016. P. 1–15.

140. Karageorgopoulos, D.E. Fluoroquinolones compared with beta-lactam antibiotics for the treatment of acute bacterial sinusitis: a meta-analysis of randomized controlled trials / D.E. Karageorgopoulos, K.P. Giannopoulou, A.P. Grammatikos, G. Dimopoulos, M.E. Falagas // *CMAJ* 178 (7): 845–54.oi:10.1503/cmaj.071157.PMC 2267830. PMID 18362380. – 2008. March.

141. Khan, S.A. Microspheres: A Review / S.A. Khan, T. Tiwari, N. Rao, A. Joshi, B. K. Dubey // *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. – 2012. – Vol. 1(1). – P. 126– 129,139–142.

142. Khan, Z. Preparation and characterization of silver nanoparticles using aniline / Z. Khan, J. Ijaz, A. Adil // *Arabian Journal of Chemistry*. – 2013. – Vol. 10(2). – P. 1–6.

143. Klapetek, P. Atomic force microscopy analysis of nanoparticles in non-ideal conditions / P. Klapetek, M. Valtr, D. Ne, O. Salyk, P. Dzik // *Nanoscale Research Letters*. – 2011. – P. 1–9.

144. Kozłowska, M. Chemical composition and antibacterial activity of some medicinal plants from lamiaceae family / M. Kozłowska, A.E. Laudy, J. Przybył, M. Ziarno, E. Majewska // *Acta Pol. Pharm.* – 2015. – Vol. 72; №4. – P.757–767.

145. Kumar, A. Biosynthesis and characterization of silver nanoparticles with bacterial isolate from gangetic-alluvial soil / A. Kumar, A. Ghosh // *International Journal of Biotechnology and Biochemistry*. – 2016. – Vol. 12(2). – P. 95–102.

146. Kumari, J. Characterization of silver nanoparticles synthesized using *urtica dioica* Linn leaves and their synergistic effects with antibiotics / J. Kumari, M.

Baunthiyal, A. Singh // *Journal of Radiation Research and Applied Science*. – 2015. – Vol. 9(3). – P. 217–227.

147. Lafredo, S.C. Induction of resistance of *Streptococcus pneumoniae* to quinolones in vitro / S.C. Lafredo, B.D. Foleno, K.P. Fu // *Chemotherapy* 39 (1): 36–9. doi:10.1159/000238971. PMID 8383031. – 1993.

148. Laleman, I. Influence of tongue brushing and scraping on the oral microflora of periodontitis patients / I. Laleman R. Koop W. Teughels C. Dekeyser M. Quirynen // *Journal of Periodontal Research*. – 2018. – Vol. 53. – P. 73–79.

149. Lasic, D.D. Applications of Liposomes / D.D. Lasic // Elsevier Science B.V. – 1995. P. 493–494.

150. Lee, H.G. Tetramethoxy hydroxyflavine p.7 downregulates, inflammatory mediators via the inhibition of nuclear factor kappa B. / H.G. Lee, H. Kim, Oh W.K., Yu K.A. // *Ann N Y Acad Sci*. 2004; 68 555.

151. Li, R. Synergistic reaction of silver nitrate, silver nanoparticles, and methylene blue against bacteria / R. Li, J. Chen, T.C. Cesario, X. Wang, J.S. Yuan, M.R. Peter // *PNAS*. – 2016. – Vol. 113(48). – P. 13612–13617.

152. Lim, J. Preparation and characterization of gelatin nanofibers containing silver nanoparticles / J. Lim, W.H. Park // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2014. – Vol. 15. – P. 6857–6879.

153. Liu, H.H. Safety profile of the fluoroquinolones: focus on levofloxacin / H.H. Liu // *Drug Saf* 33 (5): 353–69. doi:10.2165/11536360-000000000-00000. PMID 20397737. – 2010. May.

154. Lobera, T. Allergy to Quinolones: Low Cross-reactivity to Levofloxacin / T. Lobera, M.T. Audicana, E. Alarcón, N. Longo, B. Navarro, D. Muñoz // *J Invest Allergol Clin Immunol*. – 2010. – Vol. 20(7). – P. 607–611.

155. Logeswari, P. Synthesis of silver nanoparticles using plants extract and analysis of their antimicrobial property / P. Logeswari, S. Silambarasa, J. Abraham // *Journal of Saudi Chemical Society*. – 2015. – Vol. 19(3). – P. 311–317.

156. López, N.J. Effects of metronidazole plus amoxicillin as the only therapy on the microbiological and clinical parameters of untreated chronic periodontitis / N.J. López, S.S. Socransky, I. Da Silva, M.R. Japlit, Haffajee // *ADJ Clin Periodontol.* – 2006. September. – Vol. 33(9). – P. 648–60.

157. Manconi, M. Niosomes as carriers for tretinoin: III. A study into the in vitro cutaneous delivery of vesicleincorporated tretinoin / M. Manconi, C. Sinico, D. Valenti // *Int. J. Pharm.* – 2006. – Vol. 311. – P.11–19.

158. Mano, P.M. Green synthesis of silver nanoparticles from the leaf extracts of *euphorbia hirta* and *nerium indicum* / P.M. Mano, B.K. Selvi, J.A.J. Paul // *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures.* – 2011. – Vol. 6(2). – P. 869–877.

159. Marcato, P.D. Potential use of silver nanoparticles on pathogenic bacteria, their toxicity and possible mechanisms of action / P.D.Marcato, M.R. Conti, O.L. Alves, F.T.M Costa, M. Brocchi, N. Durán // *Journal of Brazillian Chemical Society.* – 2010. – Vol. 21. – P. 6949–6959.

160. Martis, E.A. Nanotechnology Based Devices and Applications in Medicine: An Overview / E.A. Martis, R.R. Badve, M.D. Degwekar // *Medicinal Chemistry.* – 2015. – Vol. 5(2). – P. 81–89.

161. McGillicuddy, E. Silver nanoparticles in the environment: Sources, detection and ecotoxicology / E. McGillicuddy, I. Murray, S. Kavanagh, L. Morrison, A. Fogarty, M. Cormican, P. Dockery, M. Prendergast, N. Rowan, D. Morris // *The Science of the Total Environment.* – 2017ю – Vol. 575. – P. 231–246.

162. Meuric, V. Signature of Microbial Dysbiosis in Periodontitis / V. Meuric, S. Le Gall–David, E. Boyer, L. Acuña–Amador, B. Martin, S.B. Fong, F. Barloy–Hubler, M. Bonnaure–Mallet // *Applied and Environmental Microbiology.* – 2017. – Vol. 83.

163. Min, J. SEM/EDX and XRD characterization of silver nanocrystalline thin ilm prepared from organometallic solution precursor / J. Min // *Journal of Mining and Metallurgy.* – 2009. – Vol. 49(1). – P. 91–95.

164. Mohanraj, V.J. Nanoparticles – A Review / V.J. Mohanraj, Y. Chen // *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. – 2006. – Vol. 5(1). – P. 561–564.
165. Mukhtar, S. Antibacterial activity of aqueous and ethanolic extracts of garlic, cinnamon and turmeric against *Escherichia coli* atcc 25922 and *Bacillus subtilis* dsm 3256 / S. Mukhtar, I. Ghori // *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*. – 2012. – Vol. 3. – P. 131–136.
166. Mullaicharam, A.R. Nanoparticles in Drug Delivery systems / A.R. Mullaicharam // *International Journal of Nutrition, Pharmacology, Neurological diseases*. – 2011. – Vol. 1(2). – P. 103–108.
167. Natalia, P.L. Synthetic routes for the preparation of silver nanoparticles a mechanistic / P.L. Natalia, C.D. Borsarelli, V. Rey, A.V. Veglia // *Perspective*. – 2015. – Vol. 6. – P. 13–46.
168. Nelson, J.M. Fluoroquinolone-resistant *Campylobacter* species and the withdrawal of fluoroquinolones from use in poultry: a public health success story / J.M. Nelson, T.M. Chiller, J.H. Powers, F.J. Angulo // *Clin Infect Dis* 44 (7): 977–80. doi:10.1086/512369. PMID 17342653. – 2007. April.
169. Nicolle, S.T. Characterization of silver nanoparticles in selected consumer products and its relevance for predicting children's potential exposures / S.T. Nicolle, A.B. Stefaniak, M.E. Vance, K. Rogers, S. Mwilu, R.F. Lebouf, D. Schweglerberry, R. Willis, T.A. Thomas, L.C. Marr // *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. – 2015. – P. 21831–21833.
170. Nurani, S.J. Silver nanoparticles synthesis, properties, applications and future perspectives: A short review Sharif Masnad Hossain Sunny / S.J. Nurani, C.K. Saha, A.R. Khan // *Journal of Electrical and Electronics Engineering*. – 2015. – Vol. 10(6). – P. 117–126.
171. Olayinka, O.J. Synthesis and characterization of chitosan–silver nanocomposite ilm / O.J. Olayinka, E.O. Dare, O.R. Adetunji, O.O. Adedeji, S.O. Ogungbesan // *Nano Hybrids and Composites*. – 2016. – Vol. 11. P 22–29.

172. Orhan, I.E. Inhibitory effects of various essential oils and individual components against extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) produced by *Klebsiella pneumoniae* and their chemical compositions / I.E. Orhan, B. Ozcelik, Y. Kan, M. Kartal // *J. Food Sci.* – 2011. – Vol.76; №8. – P. 538–546.

173. Ouay, B.L. Antibacterial activity of silver nanoparticles: A surface science insight / B.L. Ouay, S. Francesco // *Nano Today.* – 2015. – Vol. 10(3). – P. 339–354.

174. Pal, S. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli* / S. Pal, Y.K. Tak, J.M. Song, S. Pal S // *Applied and Environmental Microbiology.* – 2007. – Vol. 73(6). – P. 1712–1720.

175. Palmer, N. A. O. A study of prophylactic antibiotic prescribing in National Health Service general dental practice in England / N. A. O. Palmer, R. Pealing, R.S. Irelandet // *British Dental Journal.* – 2000. – Vol. 189. – P. 43–46.

176. Perez, D.P., editor. *Silver Nanoparticles* / D.P. Perez // Rijeka: InTech Publishers. – 2010.

177. *Pharmacology in Dentistry.* New Age International (P) Ltd., Publishers Published by New Age International (P) Ltd., Publishers; chapter 9.3 – 2007. – P. 318–319.

178. Pourjavadi, A. Novel silver Nano-wedges for killing microorganisms / A. Pourjavadi, R. Soleyman // *Materials Research Bulletin.* – 2011. – Vol. 46(11). – P. 1860–1865.

179. Prabushankar, G.L. Formulation and evaluation of levofloxacin dental films for periodontitis / G.L. Prabushankar, B. Gopalkrishna, K.M. Manjunatha, C.H. Girisha // *Int J Pharm & Pharm Sci.* – 2010. – Vol. 2(1). P. 162–08.

180. Pradeep A.R. Clinical and microbiological effects of levofloxacin in the treatment of chronic periodontitis: a randomized, placebo-controlled clinical trial / A.R. Pradeep // *Journal of investigative and clinical dentistry.* – 2014. P. 5–19.

181. Prasanth, V.V. Microspheres – An Overview / V.V. Prasanth, A.M. Chakraborty, S.T. Mathew, R. Mathapan // International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences. – 2011. – Vol. 2(2). P. 332–337.

182. Rabbani, M. Assessment of the antimicrobial activity of *Melissa officinalis* and *Lawsonia inermis* extracts against some bacterial pathogens / M. Rabbani, Z. Etemadifar, F. Karamifard, M.S. Borhani // Comparative Clinical Pathology. – 2016. – Vol. 25 (1). – P. 59–65.

183. Sahil, K. Microsphere: A Review / K. Sahil, M. Akanksha, S. Premjeet, A. Bilandi, B. Kapoor // International Journal of research in Pharmacy and Chemistry. – 2011. – Vol. 1. – P. 1186–1188.

184. Sánchez, E. Antibacterial and Antibiofilm Activity of Methanolic Plant Extracts against Nosocomial Microorganisms / E. Sánchez, C. Rivas Morales, S. Castillo, C. Leos–Rivas, L. García–Becerra, D.M. Ortiz Martínez // Complementary and Alternative Medicine. – 2016. June. – Vol. 2016 (2016). – 8 pages.

185. Satish, B. Extensive studies on X–ray diffraction of green synthesized silver nanoparticles / B. Satish, M. Ahmadipour, S. Narisngam, V.R. Kalagadda, S.C. Chidurala // Advances in Nanoparticles. – 2015. – Vol. 4(1). – P. 1–10.

186. Shafqat, S. The sonochemical impregnation of silver particles into luf pulp for enhanced antimicrobial eicacies / S. Shafqat, C. Munir, M. Abbas // NUST Journal of Engineering Sciences. – 2013. – Vol. 6(1). – P. 10–14.

187. Sharma, A. Antibacterial activities of medicinal plants used in Mexican traditional medicine/ A. Sharma, R.D. Flores–Vallejo, A. Cardoso–Taketa, M.L. Villarreal // J. Ethnopharmacol. – 2017. – August 17. – Vol. 208. – P. 264–329.

188. Sharma, R. In vitro antibacterial activity of seven Indian spices against high level gentamicin resistant strains of enterococci / R. Sharma, B. Chapagain, C. Pai (Bhat), M. Bhattacharjee // Arch. Med. Sci. – 2015. – Vol. 11; №4. – P. 863–868.

189. Shashi, K. A Complete Review on Liposomes / K. Shashi, K. Satinder, P. Bharat // International research Journal of Pharmacy. – 2012. – Vol. 3(7). P. 10–15.

190. Simoncic, B. Structures of novel antimicrobial agents for textiles – A review / B. Simoncic, B. Tomsic // *Textile Research Journal*. – 2010. – Vol. 80(16). – P. 1721–1737.
191. Singh, M. Chemo–biosynthesis of silver nanoparticles / M. Singh, R. Bajaj, H. Kaur, H. Kaur, N. Kaur // *Journal of Nano Research*. – 2016. – Vol. 4(3). – P. 1–4.
192. Singh, M. Loss of outer membrane integrity in gram–negative bacteria by silver nanoparticles loaded with camellia Sinensis leaf phytochemicals: Plausible mechanism of bacterial cell disintegration / M. Singh, A.K. Mallick, M. Banerjee, R. Kumar // *Bulletin of Materials Science*. – 2016. – Vol. 39(7). P. 1871–1878.
193. Siqueira, J. F. Jr. Prevalence and clonal analysis of *Porphyromonas gingivalis* in primary endodontic infections / J. F. Jr. Siqueira, I. Roc, M. Silva // *Journal of Endodontics*. – 2008. – Vol. 34, № 11. – P. 1332–1336.
194. Srivastava, G. Synthesis and characterization of silver nanoparticles using transmission electron microscopy (TEM) and nanoparticle tracking analysis (NTA) technique / G. Srivastava, R.P. Narayan, P.Kumar // *Journal of Biological Sciences and Medicine*. – 2017. – Vol. 3(1). – P. 1–4.
195. Stahlmann, R. Risks associated with the therapeutic use of fluoroquinolones / R. Stahlmann, H.M. Lode // *Expert Opin Drug Saf* 12 (4): 497–505. doi:10.1517/14740338.2013.796362. PMID 23651367. – 2013. July.
196. Stein, G.E. Review of the in vitro activity and potential clinical efficacy of levofloxacin in the treatment of anaerobic infections / G.E. Stein, E.J. Goldstein // *Anaerobe*. – 2003. April. – Vol. 9(2). – P. 75–81.
197. Stewart, P.S. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms / P.S. Stewart, J.W. Costerton // *Lancet*. – 2001. № 358. P. 135 – 138.
198. Stewart, P.S. Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms / P.S. Stewart // *Int J Med Microbiol*. – 2002. № 292. – P. 107 –113.

199. Sunghyun, N. Importance of poly (ethylene glycol) conformation for the synthesis of silver nanoparticles in aqueous solution / N. Sunghyun, D.V. Parikh // *Journal of Nanoparticle Research*. – 2011. – Vol. 13(7). – P. 3755–3764.
200. Szkaradkiewicz, A.K. Microbiology of chronic periodontitis / A.K. Szkaradkiewicz, M. Tomasz, Karpiński // *Journal of Biology and earth sciences*. – 2013. – Vol. 3(1). – P. 14–20.
201. Tabbakhian, M. Enhancement of follicular delivery of finasteride by liposomes and niosomes: In vitro permeation and in vivo deposition studies using hamster flank and ear models./ M. Tabbakhian, N. Tavakoli, M.R. Jaafari // *Int. J. Pharm.* – 2010. – Vol. 323. P. 1–10.
202. Tetz, V.V. Formation and structure of mixed bacterial communities / V.V. Tetz // *Acta Patol Microbiol Immunol Scand*. 1999. № 1007. P 645 – 654.
203. Thomas, D. W. Antibiotic prescription for acute dental conditions in the primary care setting / D. W. Thomas, J. Satterthwaite, E.G. Absi, et al. // *British Dental Journal*. – 1996. – P. 401–419.
204. Thombre, R. Antimicrobial activity and mechanism of inhibition of silver nanoparticles against extreme Halophilic archaea / R. Thombre, S. Vinaya, E. Thaiparambil, S. Zende, S. Mehta // *Frontiers in Microbiology*. – 2016. – Vol. 7. – P. 1–171.
205. Tsarev, V.N. Prevalence of genetic markers of resistance to antibiotics in biofilm-forming strains of obligate and elective anaerobes / V.N. Tsarev, E.V. Ippolitov, E.N. Nikolaeva // *Zh. Mikrobiol. (Moscow)*. – 2017. – Vol. 2. – P. 74–80.
206. Usha, M. Mesoporous polyacrylic acid supported silver nanoparticles as an efficient catalyst for reductive coupling of nitrobenzenes and alcohols using glycerol as hydrogen source. *Journal of Colloid and Interface Science*. – 2016. – Vol. 472. – P. 202–209.
207. Ushakov, R.V. Antimicrobial therapy in dentistry. Principles and algorithms / R.V. Ushakov, V.N. Tsarev // Moscow: «Prakticheskaya meditsina». – 2018. – 240 p. (In Russian).

208. Vikas, S. Nanosilver: Potent antimicrobial agent and its biosynthesis / S. Vikas, K.K. Selwal, M.K. Selwal // African Journal of Biotechnology. – 2014. – Vol. 13(4). – P. 546–554.
209. Vishvakrama, P. Liposomes: An Overview / P. Vishvakrama, S. Sharma // International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences. – 2012. Vol. 3(3). – P. 1074–1076.
210. Vu, T.T. In vitro antibacterial activity of selected medicinal plants traditionally used in Vietnam against human pathogenic bacteria/ T.T. Vu, H. Kim, V.K. Tran, Q. Le Dang, H.T. Nguyen, H. Kim, I.S. Kim, G.J. Choi, J.C. Kim // Complement. Altern. Med. – 2016. – Vol. 27. – P.16–32.
211. Walmsley, A.D. Effects of cavitation activity on the root surface of teeth during ultrasonic scaling / A.D. Walmsley // J. Clin. Periodontol. – 1990. Vol. 17. – P. 306 – 312.
212. Wankhede, Y.B. Synthesis and characterization of silver nanoparticles embedded in polyaniline nanocomposite / Y.B. Wankhede, S.B. Kondawar, S.R. Thakare, P.S. More // Advanced Materials Letters. – 2013. – Vol. 4(1). P. 89–93.
213. Ward, P.A. Methods of Producing Monoclonal antibodies / P.A. Ward // Washington (DC): National Academies Press (US). – 1999. P. 4–9.
214. Wexler, H. M. In Vitro Activity of Levofloxacin against a Selected Group of Anaerobic Bacteria Isolated from Skin and Soft Tissue Infections / H. M. Wexler, E. Molitoris, D. Molitoris, S. M. Finegold // ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY. – 1998. April. – Vol. 42, № 4. – P. 984– 986.
215. Whalen, K. Lippincott Illustrated Reviews / K. Whalen, R. Finkel, T.A. Panavelil // Pharmacology, Sixth Edition. – 2015. – P. 513– 523.
216. Whan, C.J. Polyurethane–Silver fibers prepared by infiltration and reduction of silver nitrate / C.J. Whan, J.H. So // Materials Letters. – 2006. Vol. 60. – P. 2653–2656.
217. Winkelhoff, A.J. Systemic antibiotic therapy in periodontics / A.J. Winkelhoff, T.E. Rams, J. Slots // Periodontology. – 2000. – 1996. № 10. – P. 45–78.

218. Yip, K.H. Sesquiterpene lactone parthenolide brocks lipopolysaccharide – induced osteolysis through the suoression of № F – kappa B activity. /K.H. Yip, M.H. Zheng, H.T. Feng et al. // J. Bone Miner Res. 2004; – P. 1905 – 1916.

219. Zahra, Q. Mini review on the synthesis of Ag–nanoparticles by chemical reduction method and their biomedical applications / Q. Zahra, A. Fraz, A. Anwar, M. Awais, M.A. Abbas // NUST Journal of Engineering Sciences. – 2016. Vol. 9(1). – P. 1–7.

220. Zhang, P. Silver nanowires: Synthesis technologies, growth mechanism and multifunctional applications / P. Zhang, I. Wyma, J. Hu, S. Lin, Z. Zhong, Y. Tu // Materials Science and Engineering. – 2017. P. 1–23.