

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ УЗБЕКИСТАН
ТАШКЕНТСКИЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ

На правах рукописи

УДК 544.72:547.96

ШЕРМАТОВА ИРОДА БАХТИЁР КИЗИ

**ТЕХНОЛОГИЯ И ИССЛЕДОВАНИЕ СОРБЕНТОВ С
НАНОЧАСТИЦАМИ СЕРЕБРА**

**5A510602- технология иммунобиологических и микробиологических
препаратов**

Диссертация на соискание академической степени магистра

Научный руководитель:

д. ф.н, доцент

М.Г.Исмаилова

Ташкент 2018

СОДЕРЖАНИЕ

	Стр
ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА I. Обзор литературы.	8
1. Серебро, его целебные свойства и применение в медицине. ...	8
2. Основные термины, понятия нанотехнологий и примерную классификацию наноматериалов, физико-химических свойств серебра.	15
3. Биологический синтез наночастиц металлов.	19
4. Механизм действия наночастиц серебра на микробную клетку и бактерицидной активности.....	23
5. Общая характеристика <i>Bidens Tripartita</i> и <i>Chamomilla officinalis</i>	26
6. Присыпки, применения и их состав.....	30
Заключение.	33

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

ГЛАВА II. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.	
1. Объекты исследований.	34
2. Методы исследований.	34
Заключение.	41
ГЛАВА III. Получение сорбентов и иммобилизация биологически активных веществ	42
1. Биосинтез наночастиц серебра из флавоноидсодержащих экстрактов.	42
2. Ик-спектроскопическое исследование флавоноид содержащих экстрактов с наночастицами серебра.....	43
3. Микроскопическое изучение наночастиц серебра.	46

4.	Антибактериальные свойства наночастиц серебра, полученных методом «зеленого синтеза»	52
5.	Получение антибактериальной присыпки с наночастицами серебра	60
	Заключение.	61
ГЛАВА IV. Фармакологические исследования присыпок с наночастицами серебра.		63
1.	Проведение доклинических фармакологических исследований присыпки с наночастицами серебра	63
	Заключение.	68
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.		69
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.		70
ПРИЛОЖЕНИЕ.		80

ВВЕДЕНИЕ

Обоснование темы магистерской диссертации и её актуальность.

В настоящее время одна из быстро развивающихся областей современной нанотехнологии – создание и использование наноразмерных частиц различных материалов. Особое внимание в последнее время обращено на наночастицы серебра. Наночастицы серебра, как и другие наночастицы, характеризуются уникальными свойствами, связанными с высоким отношением их поверхности к объему, что определяет большую эффективность их действия. Большое внимание уделяется функциональной активности наночастиц серебра с точки зрения придания как бактерицидных, так и бактериостатических свойств различным материалам и изделиям. Наиболее эффективны для уничтожения болезнетворных микроорганизмов частицы серебра размером 9–15 нм. Они имеют чрезвычайно большую удельную площадь поверхности, что увеличивает область контакта серебра с бактериями или вирусами, значительно улучшая его бактерицидные действия. Таким образом, применение серебра в виде наночастиц позволяет в сотни раз снизить концентрацию серебра с сохранением всех бактерицидных свойств. Наночастицы серебра применяются как биоцидная добавка - в форме модификатора, предназначенной для создания и производства новых материалов, покрытий и других видов продукции с биоцидными свойствами широкого спектра действия [1].

Серебро в ионном виде обладает бактерицидным, выраженным противогрибковым и антисептическим действием и служит высокоэффективным обеззараживающим средством в отношении патогенных микроорганизмов, вызывающих острые инфекции. Кроме того, в последнее время повышенный интерес к серебру объясняется не только его мощными антибактериальными и противовирусными свойствами, но также и с выявленным действием его в организме как микроэлемента [2].

Одним из наиболее перспективных методов получения наночастиц серебра является метод «зеленого синтеза». Биологический синтез наночастиц металлов считается нетоксичным, экологически чистым и экономически эффективным, поскольку в качестве восстановителей и стабилизаторов наночастиц используют растительные экстракты. Подход на основе "зеленого" синтеза, альтернативный физико-химическим методам получения наночастиц, связывает науку о материалах и биотехнологию. Главные преимущества биологических систем на основе растений для производства наночастиц – невысокая стоимость культивирования, малое время синтеза конечного продукта, биологическая безопасность процесса, возможность получения необходимого объема продукции без дополнительных затрат.

Весьма перспективным является получение различных косметических препаратов в виде пудры, присыпок, гели, мыла с наночастицами серебра, обладающих антисептическим и бактерицидным действием.

Объект и предмет исследования. Объектом исследования являются трава Череды (*Bidens Tripartita*) и цветки Ромашки (*Chamomilla officinalis*), экстракты растений Череды (*Bidens Tripartita*) и Ромашки (*Chamomilla officinalis*), суспензия экстрактов лекарственных растений с наночастицами серебра, присыпка с НЧ серебра.

Предметом исследования являются содержание флавоноидов путем определения функциональных групп спектрофотометрическим методом, изучение размеров наночастиц, торможение роста патогенной микрофлоры, быстрота заживления ран.

Цели и задачи исследования. Целью данной работы является изучение процесса образования наночастиц серебра с использованием растительных экстрактов, а также получение и исследование антибактериальных и фармакологических свойств присыпок.

Для достижения данной цели необходимо решить следующие задачи:

- 1) Отбор флавоноидсодержащих растений, обладающих как противовоспалительным действием, так и пригодных для выделения НЧ серебра методом «зеленого синтеза».
- 2) Получение и исследование экстрактов лекарственных растений
- 3) Выделение наночастиц серебра методом «зеленого синтеза» и их исследование физико-химическими методами.
- 4) Получение антибактериальных присыпок с наночастицами серебра и исследование их эффективности микробиологическим методом.
- 5) Исследование фармакологических свойств полученных присыпок с нч серебра.

Научная новизна. Предложены и экспериментально обоснованы научные положения, явившиеся теоретической основой для получения наночастиц. Впервые предложено получение наночастиц серебра методом «зеленого синтеза» с использованием экстрактов растений *Bidens Tripartita* и *Chamomilla officinalis*. Впервые разработана оригинальная антибактериальная и антимикробная присыпка с наночастицами серебра.

Гипотеза и основные задачи исследования. Основной задачей исследования является нахождение простого способа получения наночастиц серебра и изучение возможности получения антибактериальных присыпок.

Обзор научной литературы по теме. В данной научной работе были использованы различные источники литературы. К таковым относятся современная литература (публикации, журналы), интернет сайты, государственная фармакопея (первый, второй тома), дополнительная литература, периодические издания, в которых отражается информация о технология получения наночастиц серебра и их применения и т.д.

Методология и методы исследования. Получение наночастиц серебра осуществлялось методом «зеленого синтеза».

Образование наночастиц серебра фиксировали спектрофотометрическим методом на ИК – спектрофотометре (Cary 630 Ftir Agilent Technologies USA). Детальная картина визуализировалась микроскопическим методом – атомно-силовой микроскопией (АСМ).

Антимикробную активность наночастиц серебра определяли методом диффузии в агаре и серийных разведений на твердых питательных средах с использованием штаммов тест-культур.

Теоретическое и практическое значение результатов исследования. Теоретическое значение результатов исследования заключается в том, что научно обосновано получение наночастиц серебра методом “зеленого синтеза” с использованием местного растительного сырья –травы череды трехразделной и цветков ромашки аптечной. Исследована антибактериальная активность полученных присыпок с НЧ серебра.

Практическая значимость исследования заключается в том, что разработанная присыпка с НЧ серебра за счет высоких антибактериальных свойств, способствует профилактике пролежней и мокнущих ран у тяжелых лежачих больных.

Структура диссертации Диссертация изложена на 87 страницах компьютерного текста и состоит из введения, одной главы обзора литературы, трех главы экспериментальной частей, заключения и списка использованной литературы, а также приложений, необходимо дополняющих основной текст. Она иллюстрирована 7 таблицами и 33 рисунками. Библиографический указатель включает 117 источников.

ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1. Серебро, его целебные свойства и применение в медицине

Серебро (Ag) является переходным металлом, имеющим атомное число 47 и атомную массу - 107.87. Использование серебра как лекарства было зарегистрировано с 1 века до н.э. Серебро – лечебная добавка в традиционной китайской и индийской медицине Аюрведе. Его действие как антибиотика основано на том, что это неотборный токсический биоцид. Антибактериальные биоциды на основе серебра используются для защиты деревьев. Растворы серебра и меди использовались как дезинфицирующие средства в больницах и сети гостиниц, чтобы предотвращать действие инфекционных агентов (например, Legionella). Серебро вместе с медью, обычно используется, чтобы остановить бактериальный и грибковый рост на цыплячьих фермах и после сборов урожая от повреждения устрицами. Серебро использовалось для дисстерилизации воды на борту космической станции Мир и на шаттле НАСА. Микродин (коллоидное серебро в желатине) продается в супермаркетах, чтобы дезинфицировать овощи салата и питьевую воду. Химик Johnson Mathey (Ноттингем, Великобритания), открыл неорганическое соединение (восстановленный продукт серебра медленного выпуска) для использования в косметике, туалетных принадлежностях, и других подобных гигиенических продуктах. В Японии, новый состав (Amenitor, микросферы геля кварца, содержащие комплекс серебряного тиосульфата), добавляется в пластмассы для того, чтобы обеспечить антибактериальную защиту. В конце 1970-ых O.Becker обнаружил, что ионы серебра способствуют росту кости и убивают окружающие бактерии. Серебро убивает приблизительно 650 различных микроорганизмов, вызывающих болезни. Украшения из серебра широко использовались при лечении инфекций в ожогах, открытых ранах и хронических язвах. Наночастицы серебра и его переносчики могут использоваться в лечении ран у диабетиков при повторном заражением

инфекциями. Эти наночастицы помогут диабетикам излечиваться от ран, заживающих с минимальными шрамами. Нитрат серебра - общий антибактериальный препарат, используемый в обработке хронических ран.

При этом серебро не просто металл, способный убивать бактерии, но и микроэлемент, являющийся необходимой составной частью тканей любого живого организма. В суточном рационе человека должно содержаться в среднем 80 мкг серебра. При употреблении ионных растворов серебра не только уничтожаются болезнетворные бактерии и вирусы, но и активизируются обменные процессы в организме человека, повышается иммунитет.

Целебные эффекты серебра известны человечеству с давних времен. Наиболее ранние упоминания о целительных свойствах серебра датируются еще V веком до нашей эры. В историческом трактате «Истории» древнегреческого историка Геродота имеются сведения о том, что персидская армия по распоряжению царя Кира во время военных маршей использовала воду для питья, которая хранилась в серебряной посуде, что позволяло предотвратить развитие кишечных заболеваний среди воинов [3].

Кроме того, имеются сведения о том, что в III веке до нашей эры в армии македонского царя, полководца Александра Македонского во время похода в Персию и Индию возникла эпидемия желудочно-кишечных заболеваний, затронувшая в основном лишь солдат, которые пользовались оловянной посудой. Причем, среди военачальников, пользовавшихся серебряной посудой, распространения болезней удалось избежать [4].

Существенные биологические эффекты серебра были отмечены при хранении пищевых продуктов. Так, в Древнем Риме с целью предупреждения прокисания вино хранили в серебряных сосудах, тогда как американские поселенцы во время своих долгих переходов на

новые места бросали серебряный доллар в посуду с молоком, что предотвращало его скисание [5].

В литературных источниках по традиционной системе индийской медицины “аюрведа” есть упоминания на то, что очищение воды проводилось погружением в нее раскаленного серебра либо при длительном воздействии металлическим серебром в обычных условиях [6].

Широко известный факт целебности воды священной реки Ганг в Индии, по результатам проведенных исследований, объясняется тем, что грунтовые воды в некоторых местах омывают рудные месторождения серебра, в результате чего происходит обогащение воды ионами серебра.

В Средние века алхимики, среди которых встречалось немало профессиональных врачей, широко использовали серебро для изготовления лекарств, таких как «адский камень» или ляпис (азотнокислое серебро). Так, медик и алхимик Филипп Ауреол Теофраст Бомбаст фон Гогенгейм, по прозвищу Парацельс (годы жизни 1493 – 1541), с успехом лечил различные болезни лекарственными средствами, в состав которых входил «адский камень».

В 1846 году акушер-гинеколог, профессор Земмельвейс внедрил в акушерскую практику обязательную обработку рук нитратом серебра, заложив основы современной антисептики в гинекологической практике. Спустя 40 лет, в 1884 году, акушер-гинеколог Карл Креде предложил использовать ляпис (азотнокислое серебро) в акушерской практике для профилактики и лечения бленнореи новорожденных, вызванных гонококками Нейссера, что позволило снизить процент осложнений.

Первые фундаментальные исследования серебра в качестве антисептика начаты в 1887 году, когда немецкий врач, лауреат Нобелевской премии, создатель противодифтерийной сыворотки, Эмиль

Адольф фон Беринг обнаружил, что раствор нитрата серебра в разведении 1:10000 за 48 часов полностью разрушает споры сибирской язвы.

В том же году швейцарский ботаник Карл Негели обнаружил так называемый альгицидный или ингибирующий эффект раствора серебра в концентрации 0,01 мг/л по отношению к водным растениям. Позднее, исследования *in vitro*, выполненные при спонсировании NASA в 1970 году, подтвердили открытие Карла Негели. Было установлено, что раствор серебра в концентрации 50 мкг/л менее чем за 4 часа и концентрации 250 мкг/л менее чем за 2 часа обнаруживал высокоэффективные биоцидные свойства.

Первый опыт практического применения серебра в России в медицинской практике как антисептика датируется 1907 годом, когда впервые были поставлены опыты по обеззараживанию воды путем погружения в неё пластинок из чистого металлического серебра.

Позднее один из отечественных пионеров использования соединений серебра советский ученый, академик академии наук СССР Кульский Л.А. показал, что серебряная вода в одинаковой концентрации активнее хлора, хлорной извести, гипохлорита натрия и других сильных окислителей, в 1750 раз сильнее карболовой кислоты и в 3,5 раза – сулемы. Широкое применение в России препараты на основе серебра получили в военно-полевой хирургии. Так, во время русско-японской войны 1904 г. коллоидное серебро получило высокую оценку военных врачей, что способствовало его активному использованию при лечении раневого процесса.

Также имеются указания на применение листка из серебра для борьбы с раневой инфекцией в ходе первой мировой войны, а в годы Великой Отечественной войны препараты серебра получили широкое распространение как противовоспалительные и бактерицидные средства при эрозиях, язвах, избыточных грануляциях. В частности раствор колларгола использовали для промывания гнойных ран, при обработке

и лечении свежих, инфицированных ран, спринцевании мочевого пузыря при хронических циститах, уретритах, для промывания плевральной и брюшной полостей при гнойном плеврите и перитоните, при гнойных артритях и циститах, при абсцессах, карбункулах, фурункулах.

Серебряную воду использовали при лечении свищей и язв, образующихся в результате костного туберкулеза и туберкулеза лимфатических желез с распадом и нагноением. В тот же период в разных странах галогениды серебра находят широкое применение в качестве дезинфектантов при обработке питьевой воды. В Германии во вторую Мировую войну был налажен выпуск гранулированного и кускового хлорида серебра, который применяли для обеззараживания питьевой воды в полевых условиях.

Успешное применение серебра для дезинфекции питьевой воды отмечено при строительстве дороги Бирма— Ассам в 1942 году в Индии, когда англичанину Бентону удалось остановить свирепствовавшую в тех местах эпидемию холеры и дизентерии благодаря снабжению рабочих обеззараженной чистой питьевой водой, полученной с помощью электролитического растворения серебра до концентрации 0,01 мг/л .

Помимо обеззараживания питьевой воды, серебро в СССР использовали для стерилизации фруктовых и виноградных соков, а также вина.

В Одесском медицинском институте велись разработки по использованию серебра в различных концентрациях для пастеризации молока, при производстве сливочного масла, для обеззараживания куриных яиц, при производстве яичной массы и для борьбы с плесневением мяса в холодильных камерах. Серебро использовали для стабилизации микстур, настоев, глазных капель, для консервирования органолептических препаратов и приготовления различных вакцин .

С лечебной целью “серебряная вода” применялась при заболеваниях органов желудочно-кишечного тракта, таких как язвенная болезнь желудка и двенадцатиперстной кишки, холециститах, а также при воспалительных процессах зева, носа, глаз, поверхностных язвах и ранах кожных покровов.

Было установлено, что при полоскании серебряной водой полости рта сроки заживления ран после тонзиллэктомии наступают значительно раньше, чем при применении других средств, таких как риванол, фурациллин, перманганат калия.

В том числе, имеются примеры успешного применения серебра в других областях медицины, в частности в дерматологии и венерологии в качестве наружного средства при лечении вирусных, дрожжевых, стрепто-стафилококковых и трофических дерматозов, а также при лечении ожоговых ран [7].

В США в 60-х годах прошлого века имелись положительные наработки успешного использования 0,5 % раствора нитрата серебра при термических ожогах, а в 1961 году был предложен метод получения серебряной пудры на лабiline для лечения поверхностных ран и других поражений кожи.

Позднее, в 1968 году, в медицинской практике появился 1% крем сульфадиазина серебра, который и по сей день используется для лечения ожоговых ран.

В дальнейшем, тенденции к расширению количества методов использования препаратов на основе серебра только нарастали. Так, в 70-х годах прошлого века в клинике Киевского медицинского института имелись положительные наработки использования водного раствора электролитического серебра при лечении заболеваний желудочно-кишечного тракта, воспалительных процессах зева и катаральных ангилах. В пермском медицинском институте аэрозоли и электроаэрозоли с содержанием 5-10

мг/л серебра применяли в комплексной терапии острой и хронической пневмонии.

Полостным электрофорезом серебра лечили хронический гепатохолецистит.

В том числе имеются указания на положительный опыт применения серебра в офтальмологии.

Также на тот период имелись положительные наработки применения серебра в стоматологической практике. В частности, имеются указания на применение серебряной воды, полученной электролитическим путем, в виде орошений и аппликаций для лечения язвенного гингивостоматита, многоформной экссудативной эритемы, длительно незаживающих язв, острых стоматитов, в том числе грибковой этиологии, воспалительно-дистрофической формы пародонтоза.

В СССР была создана и успешно применялась в зубоврачебной практике уникальная серебряная паста, которая оказалась во много раз эффективнее, чем применяемые ранее пасты из фосфат-цемента и резорцин-формалиновой смеси.

Широкое практическое применение наночастиц (частиц размером менее 100 нм) обусловлено целым рядом их уникальных свойств [8-11].

В настоящее время для синтеза металлических наночастиц используют различные физические и химические процессы, позволяющие получать наночастицы с заданными свойствами [12–15].

Однако, несмотря на широкое распространение, это, как правило, дорогостоящие, трудоемкие способы, сопряженные с риском и потенциальной опасностью для окружающей среды и живых организмов [16-17].

Таким образом, существует очевидная потребность в альтернативных экономически эффективных и в то же время безопасных и экологически чистых методах производства наночастиц [18-20].

2. Основные термины, понятия нанотехнологий и примерную классификацию наноматериалов, физико-химических свойств серебра

Нанотехнологии – совокупность принципов, методов и технологий, развивающихся на атомном, молекулярном или макромолекулярном уровне, направленных на создание и использование структур, способов и систем модификации объектов и/или их компонентов в масштабе 1-100 нм, обладающих принципиально новыми свойствами и функциями. Наноматериалы – продукция и материалы, содержащие структурные элементы в виде наночастиц, обладающие качественно новыми свойствами, позволяющими осуществлять их интеграцию в полноценно функционирующие микро и макросистемы. Нанориски – количественные или качественные проявления негативного воздействия наноматериалов на здоровье и репродуктивные последствия людей и животных и среду их обитания. Критерии нанобезопасности – отсутствие или крайне низкий уровень объективных параметров нанорисков в отношении человека и окружающую среду. Нанотест-системы – биомедицинские, физические, химические, информационные модели для оценки, валидации и экспертизы наноматериалов и нанотехнологий. В соответствии с современными представлениями о форме, составе и физико-химических свойствах наноматериалов, можно выделить следующие направления исследований:

- углеродные наночастицы (фуллерены, нанотрубки, графены, нанопены, нанопровода и др.),
- неуглеродные простые наночастицы на основе кремния, магния, цинка, титана, золота, серебра и др. металлов,
- квантовые точки, нанороботы,
- наночастицы бинарных и композитных соединений,
- препараты наночастиц полимеров, биополимеров и др. сложных веществ.

Учитывая особенности поступления наночастиц в организм человека и животных, основными органами-мишенями являются ткани дыхательной, интестициальной, иммунной, кожной систем, а критичными по последствиям действия наноматериалов являются головной мозг, костный мозг, репродуктивные и выделительные органы. Отсутствие единой шкалы приоритетов для оценки безопасности всего многообразия наноматериалов и низкая информативность, а, зачастую, неприменимость традиционных токсико-гигиенических характеристик к наноразмерным структурам, делает необходимым поиск и использование новых биомедицинских подходов к их оценке. Можно полагать, что мишенями для наночастиц, в том числе углеродных, являются биологические макромолекулы (ДНК, РНК, белки), биологические мембраны, в том числе гистогематические (ГГБ), гематоэнцефалические (ГЭБ) барьеры, системы окисления–восстановления, в том числе перекисного.

В течение последнего десятилетия показано, что многие биологические системы, включая растения и водоросли [21], диатомовые водоросли [22], бактерии [23-24], дрожжи [25], грибы [26] и клетки человека [27], могут превращать ионы неорганических металлов в металлические наночастицы за счет процесса восстановления, осуществляемого белками и метаболитами, которые содержатся в этих организмах. Существенно, что производство наночастиц с использованием растений, описанию которого посвящен настоящий обзор, имеет важные преимущества перед другими биологическими системами. Низкая стоимость выращивания, короткие сроки производства, безопасность и возможность регуляции необходимого объема продукции делают растения привлекательной платформой для синтеза наночастиц [28].

Новые возможности использования известных биологических свойств серебра появились в связи с внедрением нанотехнологий, которые развиваются в последние десятилетие интенсивными темпами.

Так, впервые термин «нанотехнология» (с греческого: nanos – карлик, гномик, techno – мастерство, logos – наука) был предложен японским ученым, инженером из Токийского университета Норио Танигучи в 1974 году для описания объектов размерами 10⁻⁹ метра [29].

Новое направление в науке, изучающей физические, физико-химические, химические, биологические, фармакологические, токсикологические свойства наночастиц размером до 100 нм, а также их синтез с помощью современных нанотехнологий и применение в разных отраслях народного хозяйства объединено под общим термином – нанонаука.

Существенный вклад в сфере нанотехнологий внесли швейцарские ученые Герд Биннинг и Гейнрих Рорер, сконструировавшие сканирующий туннельный микроскоп, который позволял проводить исследования по изучению структуры и физических свойств разных размеров наночастиц органических и неорганических соединений.

Активное внедрение нанотехнологий в различных сферах народного хозяйства приходится на 2000-е года нынешнего века, когда интенсивные исследования и практические наработки в области нанотехнологий реализовались в производство различных наноматериалов.

Было отмечено, что в нанометровом диапазоне существенно изменяются физические, химические, физико-химические свойства веществ и материалов.

Одним из важнейших направлений исследований в области нанобиотехнологий является применение наночастиц как субстанций для создания новых фармакологических средств. Этими вопросами занимается новое направление в медицине - наномедицина, исследующая целесообразность применения материалов нанотехнологий

в медицинской практике для профилактики, диагностики и лечения заболеваний с контролем биологической активности, фармакологического и токсикологического действия полученных продуктов или медикаментов.

В связи с интенсивными темпами развития наномедицины, появилась возможность использовать нанотехнологии в медицинской практике для модификации и разработки лекарственных средств, открывающие большие перспективы для решения важнейших задач в области медицины.

Одной из наиболее приоритетных и перспективных задач наномедицины в настоящее время является использование нанотехнологических подходов для трансформации структуры металлов, приобретающих в наноразмерном диапазоне выраженную биологическую активность.

В настоящее время специалисты по нанотехнологиям сосредоточили научные исследования на разработке технологии получения наночастиц из металлов, таких как серебро [30].

Установлено, что наночастицы металлов размером от 5 до 60 нм проявляют свойства, которые не характерны для частиц большего размера [31].

Серебро, среди металлов, обладает наиболее сильным бактерицидным действием, а модификация структуры серебра с помощью нанотехнологий позволит представить уникальные свойства этого металла в новом качестве [32].

Физические свойства многих веществ зависят от размеров образца. Наночастицы вещества часто обладают свойствами, которых вообще нет у образцов этих веществ, имеющих обычные размеры.

Известно, что золото и серебро не участвуют в большинстве химических реакций. Однако наночастицы серебра или золота не только становятся очень хорошими катализаторами химических реакций

(ускоряют их протекание), но и непосредственно участвуют в химических реакциях. Например, обычные образцы серебра не взаимодействуют с соляной кислотой, а наночастицы серебра реагируют с соляной кислотой, и эта реакция протекает по следующей схеме:



Ионы серебра делают невозможным протекание многих химических реакций внутри бактерий, и поэтому в присутствии наночастиц серебра многие бактерии не размножаются. Так называемые грамотрицательные бактерии, которые нельзя окрасить по методу Грама (кишечная палочка, сальмонелла и др.), наиболее чувствительны к действию наночастиц серебра.

3. Биологический синтез наночастиц металлов

Биологический синтез наночастиц металлов считается нетоксичным, экологически чистым и экономически эффективным, поскольку в качестве восстановителей и стабилизаторов наночастиц используют растительные экстракты [33].

В то же время растительные экстракты, полученные из выращенных в грунте растений, имеют и некоторые недостатки. Так, в природных условиях растения подвергаются воздействию неблагоприятных факторов окружающей среды, что может влиять на образование в растениях активных соединений [34] и соответственно, сказываться на восстановительной способности экстрактов. Альтернативным источником получения активных веществ являются культивируемые *in vitro* клетки и ткани растений. Метод культуры клеток и тканей имеет ряд преимуществ для производства ценных метаболитов растений [35].

Это, прежде всего, независимость выхода продукта от климатических условий, сезона года, возможность получения экологически чистого продукта по сравнению с природным сырьем.

Большое влияние на формирование наночастиц оказывает величина pH растительного экстракта [36-39].

Изменение рН приводит к изменению заряда природных фитореагентов в составе экстракта, что влияет на их способность связывать и восстанавливать катионы и анионы металлов в процессе синтеза наночастиц, а это в свою очередь может влиять на форму, размер и выход наночастиц.

Разнообразные метаболиты растения, включающие терпеноиды, полифенолы, сахара, алкалоиды, фенольные кислоты и белки, играют важную роль в биовосстановлении ионов металла с образованием наночастиц. Показано, что в растениях флавоноиды могут включать ионы металлов в хелатный комплекс и восстанавливать их. Флавоноиды представляют собой обширную группу полифенольных соединений, в которых выделяют несколько классов: антоцианы, изофлавоноиды, флавонолы, халконы, флавоны и флаваноны. Флавоноиды содержат различные функциональные группы, которые могут вызывать образование наночастиц. Предположено, что таутомерные превращения флавоноидов из енольной формы в кетоформу могут высвобождать реакционноспособный атом водорода, который может восстанавливать ионы металлов с образованием наночастиц. Вполне вероятно, что внутренний механизм преобразования кетонов в карбоновые кислоты в флавоноидах может участвовать в восстановлении ионов Au^{3+} . Интересно, что некоторые флавоноиды обладают способностью хелатировать ионы металлов через их карбонильные группы или π -электроны. Например, кверцетин является флавоноидом с очень сильной хелатирующей активностью, так как он может образовывать три хелатных цикла с участием карбонила и гидроксильных групп в положении С3 и С5 и катехольной группы в положении С3' и С4'. Эти группы хелатируют разнообразные ионы металлов, такие, как Fe^{2+} , Fe^{3+} , cu^{2+} , Zn^{2+} , Al^{3+} , cr^{3+} , Pb^{2+} и co^{2+} . Действительно, наличие таких механизмов может объяснять способность флавоноидов адсорбироваться на поверхности формирующейся наночастицы. Это, вероятно, означает, что они принимают участие в

стадиях инициации формирования наночастицы (нуклеации) и дальнейшей агрегации в дополнение к стадии биовосстановления. Кроме того, изолированные флавоноиды и гликозиды флавоноидов обладают способностью индуцировать образование металлических наночастиц. Существуют данные, согласно которым сахара, присутствующие в растительных экстрактах, также могут индуцировать образование металлических наночастиц.

Известно, что такие моносахариды, как глюкоза (линейные и содержащие альдегидную группу), могут действовать как восстановители. Те моносахариды, которые содержат кетогруппу, например фруктоза, могут действовать в качестве антиоксидантов только после того, как претерпят серию таутомерных преобразований из кетона в альдегид. Более того, восстанавливающая способность дисахаридов и полисахаридов зависит от того, может или нет любой из их отдельных моносахаридных компонентов дециклизоваться в составе олигомера и, следовательно, обеспечить доступ (иона металла) к альдегидной группе.

Например, дисахариды лактоза и мальтоза обладают восстанавливающей способностью, так как, по крайней мере один из их мономеров может принимать открытую цепную форму. Напротив, у сахарозы нет способности восстанавливать ионы металлов, поскольку мономеры глюкозы и фруктозы связаны таким образом, что открытая цепная форма не может образоваться.

Ионы металла связываются с восстанавливающими метаболитами и стабилизирующими агентами, восстанавливаясь до атомов металлов. Полученный комплекс атома металла с метаболитом взаимодействует с другими комплексами, формируя металлическую наночастицу, затем происходит рост и слияние отдельных мелких наночастиц в более крупные за счет процесса переоконденсации до тех пор, пока частицы не примут форму и размер, стабильные в данных условиях. Большое влияние на

формирование наночастиц оказывает величина рН растительного экстракта [40].

Изменение рН приводит к изменению заряда природных фитореагентов в составе экстракта, что влияет на их способность связывать и восстанавливать катионы и анионы металлов в процессе синтеза наночастиц, а это в свою очередь может влиять на форму, размер и выход наночастиц.

Установлено, что общий механизм действия наносеребра является бактерицидным, а не бактериостатическим и основан на ингибировании синтеза клеточной стенки, синтез белка опосредованной 30-й рибосомальной субъединицей и синтеза нуклеиновых кислот [41].

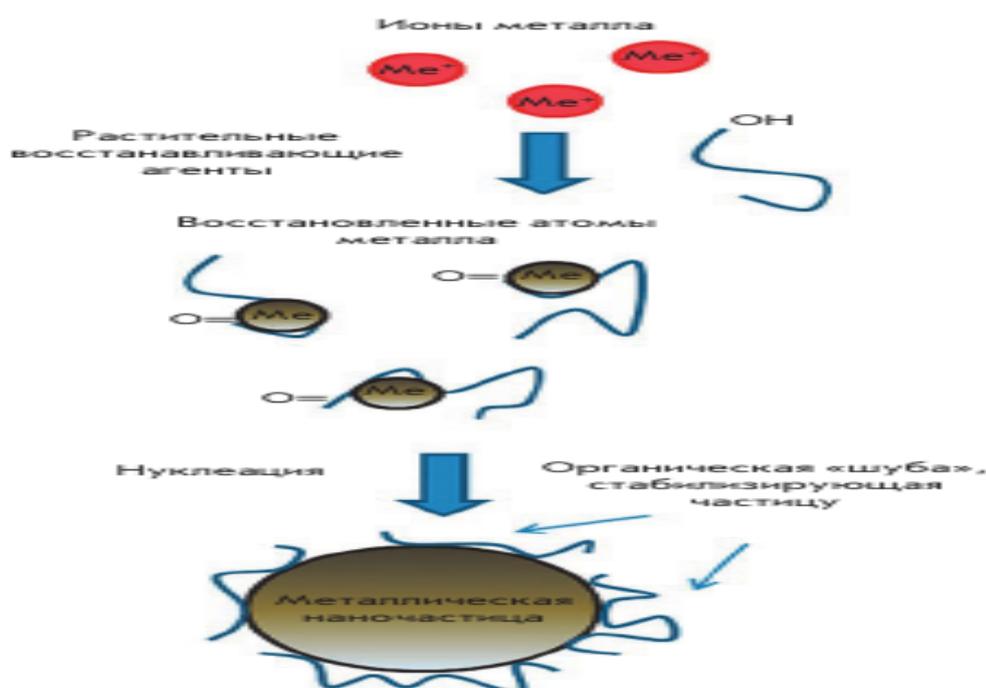


Рисунок 1. Схема синтеза металлических наночастиц в растительном экстракте. Ионы металла связываются с восстанавливающими метаболитами и стабилизирующими агентами, восстанавливаясь до атомов металлов. Полученный комплекс атома металла с метаболитом взаимодействует с другими комплексами, формируя металлическую наночастицу, затем происходит рост и слияние отдельных мелких наночастиц в более крупные за счет процесса

переконденсации до тех пор, пока частицы не примут форму и размер, стабильные в данных условиях.

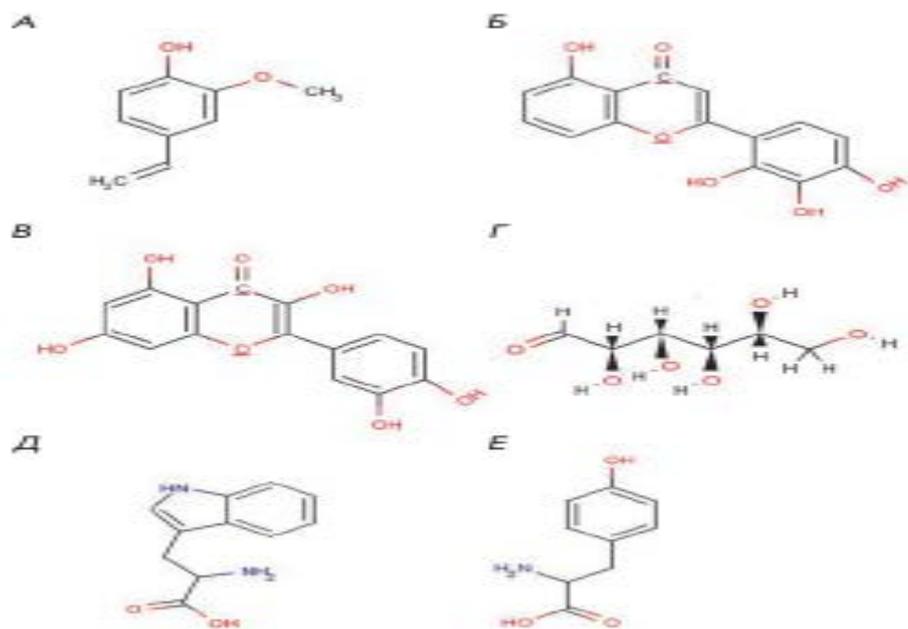


Рисунок 2. Основные типы растительных метаболитов, участвующих в синтезе металлических наночастиц. А – терпеноиды (эвгенол); Б,В – флавоноиды (лютеолин (Б), кверцетин (В)); Г – восстанавливающая гексоза с открытой формой цепи; Д,Е – аминокислоты (триптофан (Д), тирозин (Е)).

4. Механизм действия наночастиц серебра на микробную клетку и бактерицидной активности

Механизм действия серебра на микробную клетку в свете современных данных заключается в том, что ионы серебра сорбируются клеточной оболочкой, которая выполняет защитную функцию. Клетка остается жизнеспособной, но при этом нарушаются некоторые ее функции, например деление, так называемый бактериостатический эффект. Как только на поверхности микробной клетки сорбируется серебро, оно проникает внутрь клетки и ингибирует ферменты дыхательной цепи, а также разобщает процессы окисления и

окислительного фосфорилирования в микробных клетках, в результате чего клетка гибнет [42].

Действие наночастиц серебра на клеточную мембрану грамотрицательных бактерий разнонаправленное и может осуществляться в трех направлениях: наночастицы преимущественно в диапазоне 1-10 нм прикрепляются к поверхности клеточной стенки бактерий, тем самым нарушая такие функции мембраны, как проницаемость и дыхание; наночастицы серебра проникают внутрь бактерий и вызывают дальнейшее повреждение, взаимодействуя с серо- и фосфорсодержащими соединениями, например ДНК; а также наночастицы при окислении способны высвобождать ионы серебра, которые вносят дополнительный вклад в бактерицидный эффект наночастиц серебра.

Существует также мнение, что ионы серебра не оказывают прямого воздействия на ДНК клеток, а действуют косвенно, увеличивая количество внутриклеточных свободных радикалов, которые снижают концентрацию внутриклеточных активных соединений кислорода [43].

Установлено, что действие наночастиц серебра очень избирательно, они реагируют только с клеточной мембраной возбудителей инфекционных заболеваний, представляющую собой структуру из особых белков пептидогликанов, блокируя трансмембранный перенос кислорода внутрь клетки бактерии, что приводит к гибели микроорганизма [44].

Поскольку клетки млекопитающих имеют мембрану абсолютно другого типа и не содержат пептидогликанов, серебро не оказывает на них существенного влияния [45].

Долгое применение используемых ранее синтетических антибиотиков привело к снижению их терапевтической ценности, так как со временем микроорганизмы стали проявлять к ним устойчивость. Выработыванию устойчивости и увеличению сопротивляемости вирусов к действиям бактерицидных препаратов способствовала их мутация, а

также возможное изменение структур ДНК в результате приобретения части ДНК иного организма. Частицы серебра же напротив, демонстрируют свою неизменность, за прошедшие тысячелетия микроорганизмы так и не смогли добиться «иммунитета» к этому элементу.

Использование частиц серебра в нанобиотехнологии неслучайно, ведь именно серебро является наисильнейшим из существующих на планете естественным антибиотиком. К тому же он абсолютно безопасен и не несет вред людям, млекопитающим, растениям и вообще всем многоклеточным существам. Благодаря своим свойствам, а именно способности усиливать воздействие на микроорганизмы, и тому, что типичные размеры наночастиц серебра составляют порядка 25 нм, это позволяет им обладать большей удельной площадью поверхности, а, соответственно, и областью контакта, сохраняя даже при низкой концентрации серебра все бактерицидные свойства.

Функция частиц серебра заключается в том, что они реагируют с механически прочной и стабильной белковой структурой бактерии, в которой особые белки (пептидогликаны) соединены аминокислотой. Серебро, взаимодействуя с белками, блокирует передачу кислорода внутри мембраны, способствуя «удушенью» и дальнейшей гибели. Стоит отметить, что такого рода действие серебра оказывается лишь на клетки с химически неустойчивой стенкой, наподобие стенок одноклеточных либо вовсе бесклеточных организмов (бактерии, вирусы), а вот мембрана клеток млекопитающих отличается по структуре, она не имеет в составе пептидогликаны и поэтому не реагирует на серебро.

Обнаружено, что частицы наносеребра обладают следующими достоинствами:

- высокой стабильностью и сохранением всех физических, химических и биоцидных характеристик длительное время

- сохранение стабильности и биоцидной активности в щелочах и кислотах
- возможностью комбинироваться с другими элементами
- проявление биоцидной активности на бактерии, вирусы, грибы и водоросли
- более широким воздействием на микроорганизмы в сравнении с антибиотиками, причем с отсутствием приспособления микроорганизмов
- безопасностью здоровья человека и окружающего мира.

5. Общая характеристика *Bidens Tripartita* и *Chamomilla officinalis*

С учетом содержания биологические активные вещества выбрали флавоноид содержащие растение для получения экстрактов, природных для синтеза наночастиц. В качестве растительного сырья использовали траву Череды трёхраздельной и цветки ромашки аптечной.

Herba Bidentis представляет собой цельные или измельченные высушенные надземные части растения ***Bidens tripartita* L.** - череды трёхраздельной (семейство астровых - *Asteraceae*), собранные в фазу бутонизации и начала цветения[46]. Некоторые названия на национальных языках Череда трёхраздельная, золотушная трава, козы рожки, причепа, собачки, собачьи репяхи, стрелка, чернобривец болотный, bastard agrimony, bastard hemp, beggar-ticks, bident б feuilles tripartites, bident trifolий, bidens tripartita.

Внешний вид

Цельные облиственные стебли, цельные листья и цветочные корзинки или их фрагменты (Рис.3).



Рисунок 3. Черда трехраздельная

Органолептические свойства

Запах: слабый; вкус: горьковатый, слегка вяжущий.

Основные химические составляющие

Основными составляющими высушенных надземных частей растения являются флавоноиды (лютеолин, цинарозид), ассоциированные хальконы (бутеин, бутеин-7-О-β-D-глюкопиранозид и мареин), флаваноны (изокореопсин и флаваномареин), а также ауроны (сульфуретин, сульфуреин, маритиметин, маритимеин) [47-51].

Высушенные надземные части растения содержат 0,05-0,11% (о/в) эфирного масла и 4,51-4,65% сахаридов (арабиноза, галактоза, глюкоза, рамноза, хилоза) [52-53]. Сообщается также о присутствии кумаринов (умбеллиферон, скополетин, аэскулетин), тридекан-производных полиацетиленов (например, тридека-1,12-диен-3,5,7,9-тетраин), танинов, ксантофилла (желтый пигмент, широко распространенный в природе, иногда называемый лютеином), органических кислот, каротена и витамина С.

Описанное в традиционной медицине

Используется в качестве мочегонного, противодиарейного, антиаллергического и противовоспалительного средства, а также в

качестве противогельминтного, жаропонижающего, потогонного, тонизирующего желчный пузырь и почки средства. Используется при лечении алопеции, скрофулеза, подагры, артралгии, фурункулеза, диатеза (при врожденной склонности к особым состояниям или условиям, особенно аномальным или болезненным), дерматита, угрей, экземы, рахита у детей, расстройств функции пищеварительного тракта, язвенного колита, метеоризма, лихорадки, камней мочевого пузыря и почек, кровотечений, а также при укусах насекомых. Наружно применяется в виде ванны при различных диатезных состояниях, особенно у детей.

Ромашка аптечная (*Chamomilla officinalis*),

Определение

Flos Chamomillae представляет собой высушенные цветочные корзинки *Chamomilla recutita* (L.) Rauschert (Asteraceae – Астровые)

Синонимы

Matricaria chamomilla L., *M. recutita* L., *M. suaveolens* L.

В большинстве фармацевтических и других медицинских справочниках *Matricaria chamomilla* L. считается принятым названием вида. Однако, в соответствии с Международными правилами ботанической номенклатуры, для данного вида правильным считается *Chamomilla recutita* (L.) Rauschert [54].

Семейство астровых известно также под названием семейства сложноцветных. Некоторые названия на национальных языках Ромашка, ромашка аптечная, ромашка ободранная, ромашка лекарственная, ромашка дикая, камилла, маточная трава, моргун, романова трава, румянок, baboonig, babuna, babunah samomile, babunj, bunga kamil, samamilla, samomile, chamomilla [55-59].

Внешний вид

Flos Chamomillae состоит из конических цветочных корзинок, несущих краевые белые язычковые цветки и многочисленные бледно-

желтые, желтовато-оранжевые внутренние трубчатые цветки, расположенные на коническом, узком, полом цветоножке, с короткой цветоножкой (рис.4). [60].

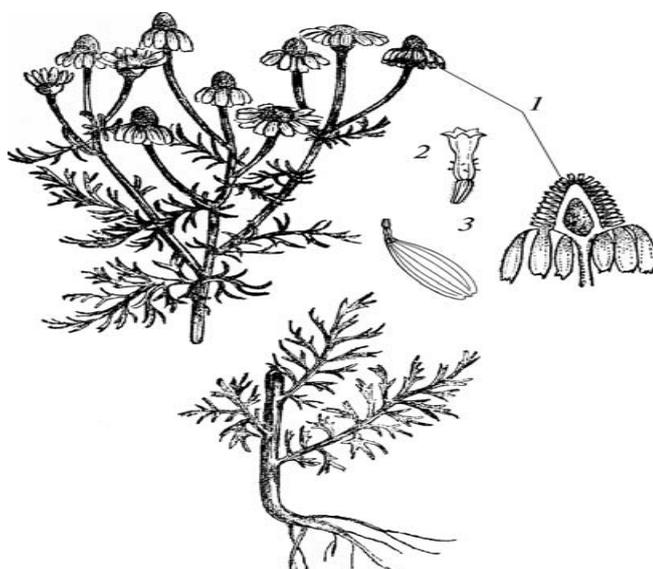


Рисунок 4. Ромашка аптечная

Органолептические свойства

Запах приятный, ароматный; вкус пряный, горьковатый.

Географическое распространение

Родина растения – Северная Европа. В диком виде оно произрастает в странах центральной Европы; особенно широко распространено в Восточной Европе. Встречается также в Западной Азии, в Средиземноморском регионе Северной Африки и в Соединенных Штатах Америки. Растение культивируется во многих странах[61].

Химический состав. Ромашка аптечная – содержит эфирное масло (0,25—2,0 %), компонентами которого являются фарнезен, α -бизаболол (40—50 %), кадинен, матрицин, матрикарин — соединения хамазуленового типа (5—18 %), относящиеся к ациклическим, моно_ и бициклическим сесквитерпеноидам, мирцен, гераниол (монотерпеноиды); флавоноиды (апигенин, лютеолин, кверцетин, изорамнетин и др.), кумарины (герниарин, умбеллиферон), дубильные вещества, фенолкарбоновые кислоты (анисовая, ванилиновая, кофейная, сиреневая,

салициловая, хлорогеновая), каротиноиды, полиеновые соединения, холин и слизь (до 17 %) [62].

Применение в медицине

Подтверждаемое клиническими данными

Внутреннее применение

Симптоматическое лечение таких нарушений пищеварения, как диспепсия, вздутие живота, расстройства пищеварения и газы в кишечнике [63-64]. Настой цветков ромашки применяется при лечении беспокойств и в легких случаях – бессонницы, связанной с нервными расстройствами.

Наружное применение

Воспаление и раздражение кожи и слизистой оболочки (трещины кожи, кровоподтеки, отморожения и укусы насекомых), включая раздражение и инфекции полости рта и десен, геморрой. Вспомогательное средство при лечении легких форм воспаления желудочно-кишечного тракта [65-66].

Применение, описанное в народной медицине, не подтверждаемое экспериментальными или клиническими данными.

В качестве антибактериального, противовирусного, рвотного и усиливающего месячные средства. Кроме того, применяется для снятия утомляемости глаз и для лечения инфекций мочевых путей и поноса.

6. Присыпки, применения и их состав

В качестве сорбента для иммобилизации наночастиц серебра выбрали присыпку. Так как, Присыпка-это лекарственная форма, представляющая собой не дозированный порошок или смесь нескольких порошков для наружного применения, предназначенных для припудривания кожи в лечебных, гигиенических и косметических целях. Присыпки представляют собой мельчайшие порошки, терапевтический эффект которых зависит от степени дисперсности, в связи с чем их необходимо растирать тщательнейшим образом. Они, как правило, содержат тальк, крахмал, бентонит, ликоподий, белую глину и

медикаменты направленного действия. Присыпки применяют в разных областях медицины и фармакологии. Они используются как детская лекарственная форма, их применяют при острых воспалительных состояниях кожи, с гигиенической, для защиты кожи от внешних раздражений, иногда для лучшей фиксации на коже мазей и паст. Для присыпок применяют обычно химически индифферентные растительные и минеральные порошкообразные вещества. В состав присыпок вводят при необходимости вещества, обладающие фармакологическим действием. В косметические присыпки добавляют также различные жиры, специальные красители, душистые вещества, эфирные масла. Присыпки состоят обычно из нескольких порошкообразных веществ - талька, крахмала, окиси цинка, ликоподия, таннина и т. д. Качество присыпки зависит от ее ингредиентов, величины их частиц. Чем эта величина меньше, тем качество присыпки выше. Присыпка, нанесенная на кожу, увеличивает поверхность ее испарения, усиливает отдачу тепла, благодаря чему производит охлаждающее, противовоспалительное и высушивающее действие. Присыпки обладают покровными свойствами, защищают от травматизации некоторыми внешними факторами (атмосферными, механическими и др.). На влажные поверхности кожи нельзя накладывать присыпки, содержащие крахмал, так как будет происходить клейстеризация крахмала и возможно развитие дерматита от раздражения клейстером, а также создаются условия для инфекции кожи пневмококками. На мокнущие участки кожи не следует накладывать присыпки, так как они будут смешиваться с экссудатом. При этом образуются наслоения корок, под которыми может скопиться экссудат с последующим его разложением и обострением процесса. Удаляют присыпки тампоном, сухим или смоченным в спирте, бензине, эфире или воде. Для усиления охлаждающего и противовоспалительного действия присыпки добавляют к ней 1-2% ментола. Добавление некоторого количества красной глины, охры, делает цвет присыпки близким к цвету кожи, что имеет косметическое значение

и, помимо того, придает ей защитные свойства при облучении солнечной радиацией. Присыпки могут служить основами для включения в них медикаментов.

Присыпки в терапии дерматозов

Основные задачи лечения кожных заболеваний заключаются в устранении причин и предрасполагающих моментов, вызвавших заболевание, и в поднятии сопротивляемости организма. Физические методы лечения при кожных заболеваниях все больше находят свое применение, дополняя остальные способы. Часто применяют холод и тепло, успешное действие которых объясняется тем, что затрагиваются соответствующие кожные терморцепторы. Возникающие рефлекторные ответы через нервную систему сказываются на всем организме в целом и на коже. Так, тепло, вызывая гиперемия, улучшает кровообращение, увеличивает секрецию кожи и обмен веществ. Под влиянием тепловых процессов рассасываются инфильтраты, вскрываются абсцессы. Они оказывают противозудное и болеутоляющее действие. Присыпки уменьшают воспалительные явления, подсушивают, охлаждают, успокаивают субъективные ощущения (зуд, жжение). Пудру наносят на кожу ватой (в дерматологии применяются при острых дерматозах, когда уже нет мокнутия). Чаще всего для присыпок в дерматологии используют крахмал, белую глину, углекислую магнезию, тальк, окись цинка и т. д. Присыпки наносятся на очаги поражения ровным тонким слоем. Особенно широкое применение имеют «индифферентные» порошки. Это определение является условным. Имеется в виду, что эти вещества при своевременном применении оказывают лечебный эффект благодаря своим физическим свойствам. Они являются достаточно размельченными, не раздражают кожный покров, не содержат никаких токсически действующих примесей. [67-69].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Обобщение и анализ научной литературы показали, что в настоящее время развитие современной техники невозможно без создания материалов нового поколения с заранее заданными свойствами. Одним из путей решения этой задачи является получение композиционных материалов, содержащих наночастицы серебра.

Серебро не просто металл, способный убивать бактерии, но и микроэлемент, являющийся необходимой составной частью тканей любого живого организма. Серебро в ионном виде обладает бактерицидным, выраженным противогрибковым и антисептическим действием и служит высокоэффективным обеззараживающим средством в отношении патогенных микроорганизмов, вызывающих острые инфекции.

В виде наночастиц его эффективность увеличивается, а также уменьшается стоимость материала.

Существенно, что производство наночастиц с использованием растений, имеет важные преимущества перед другими биологическими системами. Низкая стоимость выращивания, короткие сроки производства, безопасность и возможность регуляции необходимого объема продукции делают растения привлекательной платформой для синтеза наночастиц.

Оно имеет ряд существенных преимуществ. Во-первых, это позволит в сотни раз снизить концентрацию металла при сохранении всех его бактерицидных свойств, а во-вторых, за счет большей удельной поверхности наночастиц увеличиваются области контакта наносеребра с бактериями или вирусами, что значительно повышает его бактерицидные свойства.

Новая форма серебра в виде наночастиц открывает широкие возможности и создает перспективную основу для создания эффективных фармакологических средств с высокой биологической активностью.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Глава II. Объекты и методы исследований

1. Объекты изучения. Вспомогательные вещества и оборудование

При проведении исследований по биологического синтеза наночастиц серебра основными объектами являются флавоноид содержащие растения и нитрат серебра.

Аппаратурное описание технологического процесса

1. Ступки;
2. Электронные весы;
3. Колбы 500, 200, 100, 50 мл;
4. Термолобилная колба;
5. Пипетки;
6. Ложки (мг);
7. Мерные цилиндры;
8. Холодильник;
9. Мешалки;
10. Плитка;
11. Термостат;
12. Терморегулятор;
13. Стойка для штатива;
15. сушильный шкаф;
16. центрифуга

2. Методы исследования

Получение наночастиц серебра осуществлялось методом «зеленого синтеза». Образование наночастиц серебра фиксировали спектрофотометрическим методом на ИК – спектрофотометре (Cary 630 Ftir Agilent Technologies USA).

Детальная картина визуализировалась микроскопическим методом – атомно-силовой микроскопией (АСМ) для визуализации образующихся наночастиц.

Этот анализ применен для характеристики структуры и архитектуры наночастиц, включая их размер, форму и другие параметры. Традиционный АСМ представляет собой оригинальную конструкцию сверхчувствительного измерителя профиля поверхности. Но он позволяет измерять не только профиль поверхности, но и локальные силы трения, величину адгезии, упругие и вязкие свойства поверхности с субнанометровым пространственным разрешением. Принцип работы такого микроскопа основан на прохождении электроном потенциального барьера, который образован разрывом электрической цепи (небольшим пространством между зондирующим микроострием и поверхностью того или иного образца). В основе работы прибора лежит хорошо известный феномен электронного туннелирования (туннельный эффект). В качестве зонда обычно используется игла (сделана из нитрида кремния), расположенная на упругой микропластинке, именуемой кантилевером. Последний закреплен с одного конца. При сканировании поверхности силы, возникающие между острием иглы и образцом, вызывают деформацию кантилевера. Таким образом, и описывается топография исследуемой поверхности. Деформация кантилевера определяется, как правило, оптическим методом. Лазерный луч, направленный на зеркальную поверхность тыльной стороны кантилевера, отражается от нее и регистрируется фотодетектором.

Процедура подготовки образцов для атомно силовой микроскопии заключается в их иммобилизации на ровной подложке. Материал подложки можно варьировать в широких пределах в зависимости от поставленных задач. Традиционно в качестве субстрата используются атомно- гладкие подложки из слюды, графита и других слоистых

материалов, а также различные стёкла, полимерные материалы и металлические поверхности.

Антимикробную активность наночастиц серебра определяли методом диффузии в агаре и серийных разведений на твердых питательных средах.

Таблица №1. Штаммы тест-культур

№	Тест культуры	Шрифт	№ культур
1	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC-25923	004134
2	<i>Escherihia coli</i>	ATCC-25922	004136
3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC-27853	004135
4	<i>Bacillus subtilis</i>	B-1	03581
5	<i>Bacillus cereus</i>	128	003715
6	<i>Candida albicans</i>	От больного	
7	<i>Aspergillus fumigates</i>	От больного	
8	<i>Aspergillus nigri</i>	712	
9	<i>Aspergillus flavus</i>	6029	
10	<i>Penisillium spp</i>	От больного	
11	<i>Aspergillus Kruzei</i>	От больного	

Приготовление среды

Антимикробную активность наночастиц серебра [70-84] определяли методом диффузии в агаре и серийных разведений на твердых питательных средах. Для этого в стерильные чашки Петри, расположенные на горизонтальной поверхности, разливали по 15 мл плотной питательной среды в два слоя (перевар Хоттингера с содержанием 110—130 мг% аминного азота). Чашки подсушивают в течение 30 мин при 37°C с полуоткрытой крышкой. После затвердения агара вырезали лунки диаметром 6 мм (на 1 чашку не более 6 лунок), в каждую из них вносили равный объем раствора испытуемого препарата (концентрация 1 мл/мкг).

Чашки инкубировали в термостате при температуре 37°C в течение 18-24 часов, затем измеряли диаметр зон задержки роста вокруг лунки. Результаты учитывали путем изменения зон задержки роста микробов вокруг лунки (включая диаметр самой лунки).

Для каждого вида микроорганизмов применяли соответствующие питательные среды: среду Сабуро (*Candida albicans*, *Aspergillus fumigates*, *Aspergillus flavus*), желточно-солевой агар (*Staphylococcus aureus*), среда Эндо (*Escherichia coli*) и мясо пептонный агар (*Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*).

Приготовление мясо-пептонного агара.

К мясо-пептонному бульону прибавляют от 2 до 4% (в зависимости от сорта) мелко нарезанного агар-агара кипятят до полного растворения. Затем дают остыть до и прибавляют для просветления яичный белок (1 л агар берут взбитый и размешанный с небольшим количеством воды белок одного яйца), хорошо взбалтывают и помещают на 4-5 минут в автоклав. Белок во-время кипячения свертывается и увлекает за собой взвешенные частицы. Полученную мутную жидкость фильтруют в горячем виде через вату, смоченную горячей водой. Можно обойтись и без яичного белка, но агар получается недостаточно просветленным. Горячий профильтрованный агар разливают в пробирки по 5-8 мл или в колбы по 50-500 мл и стерилизуют в автоклаве 20 минут при температуре 120-125⁰ С. После стерилизации пробирки с еще жидким агаром следует положить почти горизонтально, чтобы агар застыл в скошенном положении с большой поверхностью, или дать ему застыть в виде столбика. Среда Эндо - готовится непосредственно перед употреблением. К 100 мл мясо-пептонного агара или агара на бульоне Хоттингера (рН 7,6) стерильно добавляют 1 г химически чистой лактозы, растворенной в 5 мл стерильной воды, охлаждают до 70°C и добавляют смесь 0,5 мл насыщенного раствора основного фуксина и 1,25 мл свежеприготовленного 10% раствора сернисто кислого натрия, взбалтывают и разливают по чашкам. Для

подсушивания открытые чашки помещают на 30 минут в термостат при температуре 37° С.

Приготовления жидкой среды Сабуро

Для приготовления жидкой среды Сабуро дистиллированной воды добавляют 10 г сухого ферментативного пептона, кипятят в течение 10 мин, фильтруют, прибавляют 40 г глюкозы, устанавливают рН (5,6±0,2) 1%-ной соляной кислотой. Разливают в стерильные пробирки и стерилизуют автоклавированием при температуре 121°С в течение 15 мин. Для получения агаризованной питательной среды к приготовленной жидкой среде Сабуро добавляют 10-20 г агара.

Желточно-солевой агар (Чистовича).

Для приготовления желточно- солевого агара готовят впрок мясо-пептонный агар (рН 7,2-7,4) с содержанием 10% хлорида натрия. После разливки во флаконы по 100-200 мл агар стерилизуют в автоклаве в течение 20 минут при температуре + 120°С. Перед употреблением расплавляют, охлаждают до +45-50°С и добавляют 20% (по объему) стерильной желточной взвеси (1 желток куриного яйца на 150-200 мл стерильного изотонического раствора хлорида натрия). Среду быстро помешивают, разливают в стерильные чашки, которые продолжительное время могут сохраняться в холодильнике.

Фармакологические исследования проводили в опытах in vivo .

Острая токсичность разработанной присыпки с наночастицами серебра была изучена на 20 крыс массой 160-175 г обоего пола. По методике [85].

С этой целью в двух местах обоих боков животных тщательно выстригали шерсть размером 1,5x1,5 см. Затем испытуемую присыпку наносили на животных два раза в день в течении шести дней. О токсичности судили по общему состоянию животных: сохранение двигательных функций, аппетита, состояние шерстного покрова, дыхания, реакция на внешние раздражители, и их гибели.

Таблица 2. Токсикологический тест с кожным нанесением присыпки с наночастицами серебра экспериментальным животным.

Препарат	Результат количество мышей погибших/всего
Череда с наночастицами серебра	0/10
Ромашка с наночастицами серебра	0/10

По гигиенической классификации (ГОСТ 121007-76) в соответствии с установленными параметрами пероральной токсичности и кожной токсичности присыпка с наночастицами серебра относится к 4 классу опасности, т.е малотоксичным соединениям.

Противовоспалительный эффект изучаемой присыпки на модели экспериментального воспаления, вызванного формалином. Принцип метода заключается в том, что в тыльную поверхность апоневроза голеностопного сустава правой ноги вводится небольшое количество 2% го раствора (0,1-0,12 мл) формалина. Опыты проводили на 15 крысах массой 165-183 г обоего пола, сравнительно с детской присыпкой.

О противовоспалительной активности изучаемой присыпки судили по разности объёма лапок контрольных и опытных животных. С этой целью у животных до введения формалина измеряли исходный объём лапок с помощью водяного плетизометра, а затем на тыльную поверхность апоневроза правой ноги крыс вводили 0,15 мл 2% раствор формалина. После этого животных разделили на 3 группы по 6 штук.

Первая контрольная, вторая и третья группы опытные, где были лечены с испытуемыми средствами: во второй опытной группе поверхность воспаленного участка лапок крыс наносили присыпку (ч.с н ч), а третьей опытной группе в аналогичных условиях наносили присыпку с (р.с.н.с), а контрольной группе-детскую присыпку. Затем крыс посадили в отдельные объёмные камеры по одной штуке, завязав хвосты, чтобы

крысы не смогли слизывать присыпку с лапок. Через 4 часа измеряли объем лапок у крыс опытной и контрольной группы.

В качестве животной модели использовали половозрелых беспородных крыс-самок с массой тела 220-250 г. Животных содержали по одной особи в клетке в стандартных условиях вивария с контролируемым режимом температуры (+24 °С) и освещения (в течение 12 ч) и свободным доступом к воде и пище. При работе с экспериментальными животными руководствовались методическими рекомендациями под редакцией Хабриева. Все болезненные для крыс манипуляции выполняли под эфирным наркозом в условиях асептики.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С целью изучения процесса образования наночастиц серебра с использованием растительных экстрактов, а также получения и исследование антибактериальных и фармакологических свойств присыпок с наночастицами серебра было выбрано следующие оптимальные материалы и методы:

Материалы: В качества растительного сырья использовали траву *Bidens Tripartita* и цветки *Chamomilla officinalis* производство ООО «Раъно» (Узбекистана) содержащее высокое количество флавоноидов и обладающее окислительно-восстановительным потенциалом.

Методы:

- Получение наночастиц основано на методе «Зеленого синтеза».
- Наличие фенольных экстрактов растений доказано ИК-Оспектроскопическим методом.
- Визуальное наблюдение образовавшихся наночастиц серебра установлено методом атомно-силовой-микроскопии.
- Антимикробную активность наночастиц серебра определяли методом диффузии в агаре и серийных разведений на твердых питательных средах.
- Острая токсичность разработанной присыпки с наночастицами серебра была изучена на 20 крыс массой 160-175 г обоего пола. По методике (Edson E.F., Sanderson D.M., Watson W.A., Noakes D.N. The stability of blood cholinesterase after death.// *Med.Sci.Low.*, 1962,2,4,P.258-267).

Глава III.

1. Биосинтез наночастиц серебра из флавоноидсодержащих экстрактов

Получения экстракта

Биологически активные вещества извлекали из растений путем экстракции в 70% раствор этанола.

Для этого в емкости помещали по 1 г мелко нарезанных листьев Череды Трехраздельной, заливали 100 мл 70% раствора этанола и ставили на паровую баню на 30 мин. Полученную вытяжку остужали до комнатной температуры, доводили до начального объема и фильтровали. Точно также, в емкости помещали по 1 г мелко нарезанных цветков ромашки, заливали 100 мл 70% раствора этанола и ставили на паровую баню на 30 мин. Полученную вытяжку остужали до комнатной температуры, доводили до начального объема и фильтровали [86].

Биосинтез наночастиц серебра

Для получения наночастиц серебра к 1 мл полученного экстракта добавляли 10 мл раствора нитрата серебра ($1 \cdot 10^{-3}$ моль/л).

Синтез наночастиц проводили при комнатной температуре при непрерывном перемешивании до изменения цвета.

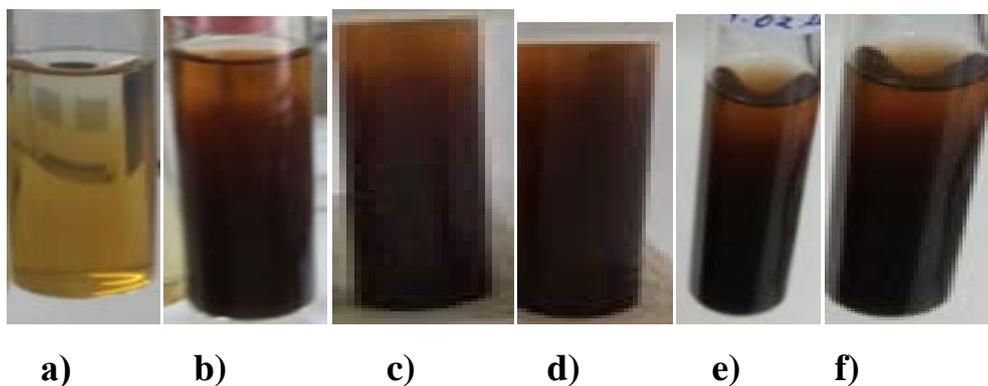


Рисунок 5. Изменения цвета суспензии при образовании НЧ серебра при комнатной температуре.

a) 5 мин, b) 10 мин, c) 15 мин, d) 30 мин, e) 45 мин, f) 60 мин.

Так, в процессе исследований мы наблюдали, что цвет исследуемых растворов резко меняется от светло-желтого (рис.5а) до красно-коричневого цвета, характерного для наночастиц серебра (рис.5f) в течение 60 минут инкубации при комнатной температуре.

2. Ик-спектроскопическое исследование флавоноид содержащих экстрактов с наночастицами серебра

Растительные экстракты, используемые для синтеза наночастиц металлов содержат большое количество вторичных метаболитов, которые обладают окислительно-восстановительным потенциалом и выполняют функцию восстановителей и стабилизаторов наночастиц. К растительным метаболитам относятся сахара, алкалоиды, терпеноиды, белки, полифенольные кислоты и флавоноиды. В процессе синтеза наночастиц эти биоактивные соединения играют различную роль. Например, установлено, что именно фенольные соединения и флавоноиды участвуют в образовании наночастиц серебра [87]. Из литературных источников также известно, что флавоноиды являются основными действующими веществами таких растений, обладающих противовоспалительной активностью, как череда трехраздельная и ромашка аптечная.

В связи с этим, мы сочли целесообразным ИК спектроскопическое изучение экстрактов череды трехраздельной и ромашки аптечной, и растворов наночастиц серебра в присутствии экстрактов лекарственных растений (рис.6,7,8,9)

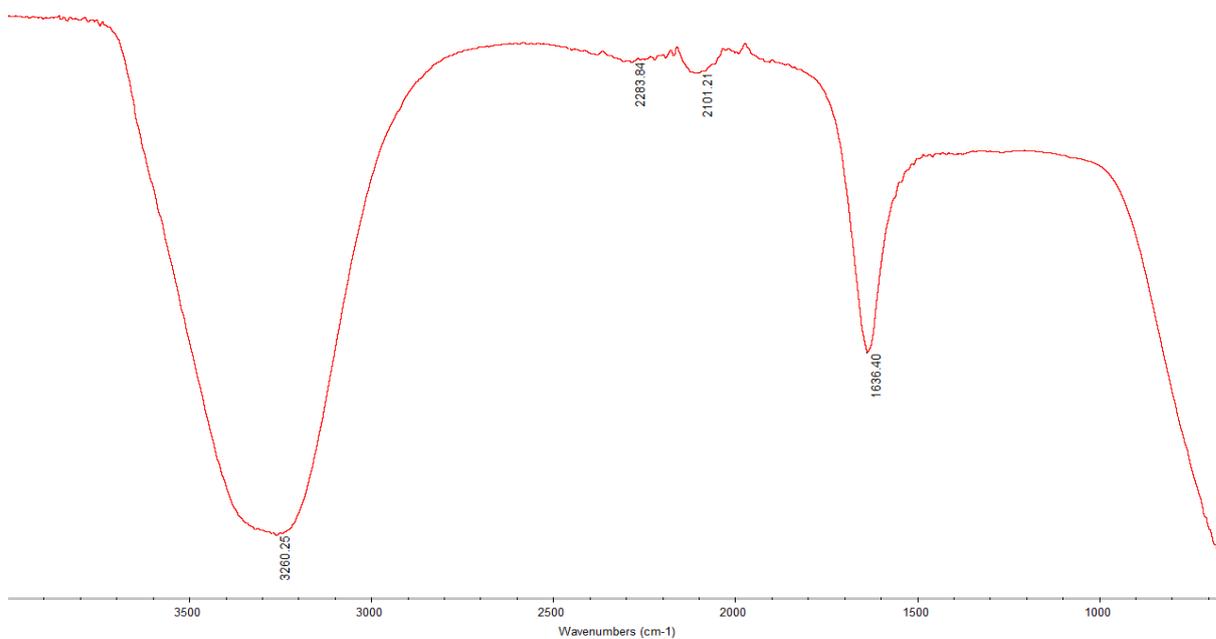


Рис. 6. ИК-спектр поглощения экстракта *Chamomilla officinalis*.

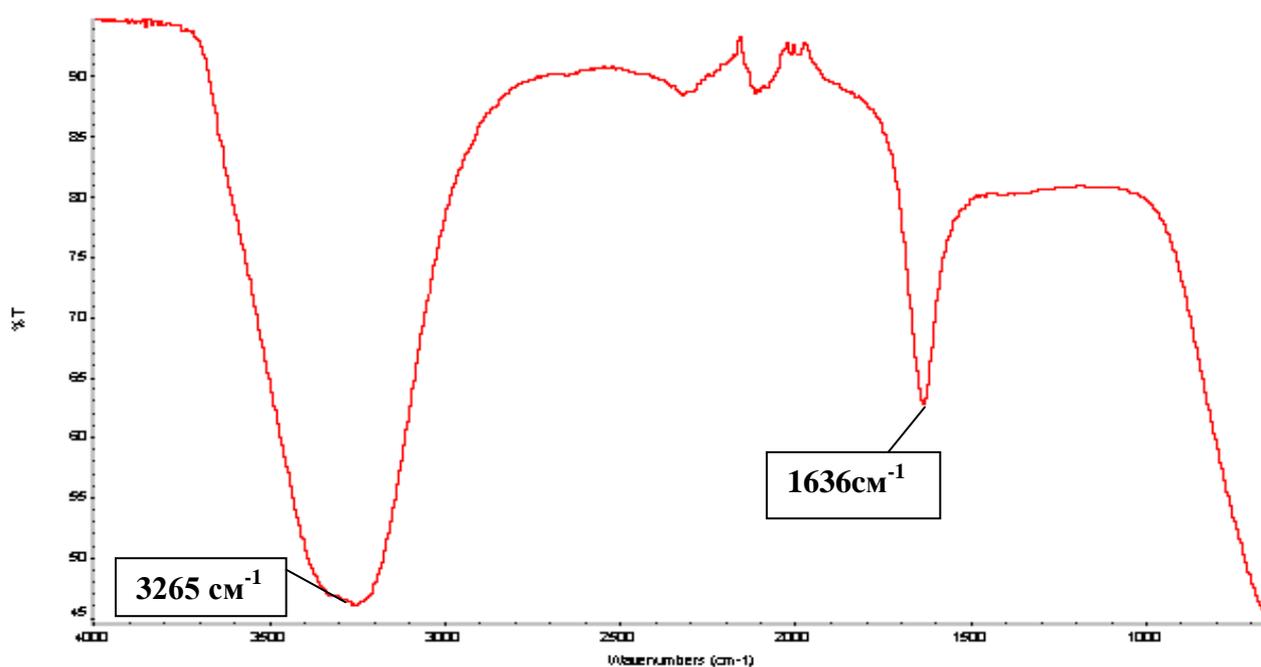


Рис 7. ИК-спектр поглощения раствора с наночастицами серебра в присутствии использованием экстракта *Chamomilla officinalis*.

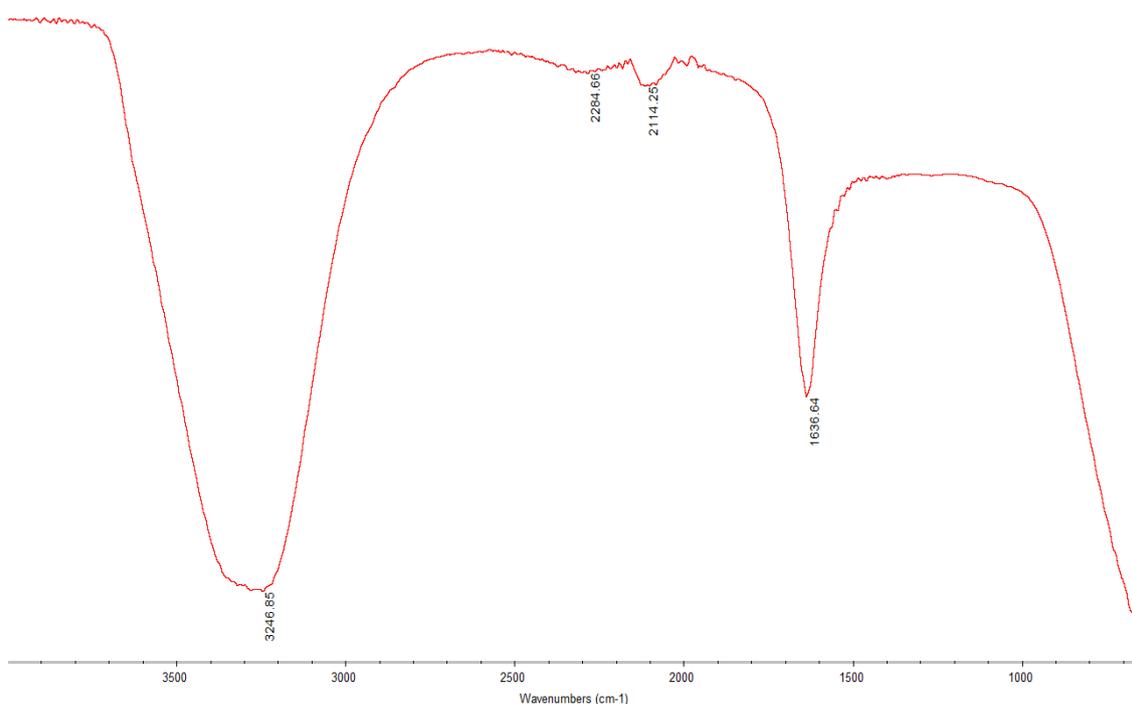


Рис. 8. ИК-спектр поглощения экстракта *Bidens Tripartita*.

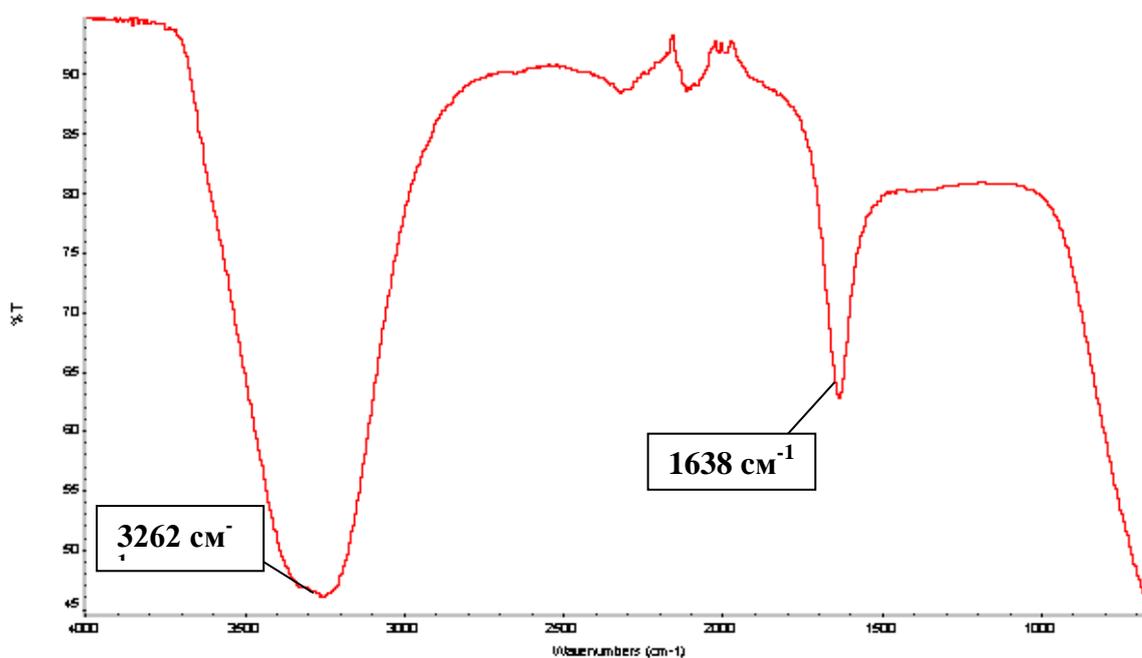


Рис.9. ИК-спектр поглощения раствора с наночастицами серебра в присутствии использованием экстракта *Bidens Tripartita*.

Для выявления восстановителей и стабилизаторов наночастиц были сняты ИК-спектры суспензий экстрактов лекарственных растений с предполагаемыми наночастицами серебра. Были сняты ИК-спектры как

самых экстрактов, так и растворов наночастиц серебра в присутствии этих экстрактов (рис.6,7,8,9).

Следует отметить, что ИК-спектры всех исследуемых образцов имели практически одинаковый набор полос поглощения и отличались незначительной интенсивностью и смещением некоторых полос.

Снятые ИК-спектры (рис.7,9) показали наличие первичных аминов при 1636 см^{-1} , пики в интервале 3262 см^{-1} и 3265 см^{-1} соответствуют –ОН группе, а также Н-связанным фенолам и спиртам в наночастицах серебра. Также можно увидеть спектры биосинтезированных наночастиц серебра, как возможного взаимодействия между белковыми и серебряными наночастицами.

Помимо этого, полученные результаты показали резкие пики поглощения, расположенные в интервале примерно 1636 см^{-1} и 3265 см^{-1} . При этом полоса поглощения при 1636 см^{-1} соответствует выраженным карбонильным фрагментам белков. Эти результаты указывают на то, что карбонильная группа белков сильно адсорбирована на металлах, это свидетельствует о том, что белки могли также образовывать слой с биоорганическими соединениями, обеспечивающими взаимодействие с биосинтезируемыми наночастицами, а вторичная структура не была затронута во время реакции с ионами серебра или после связывания с наночастицами серебра.

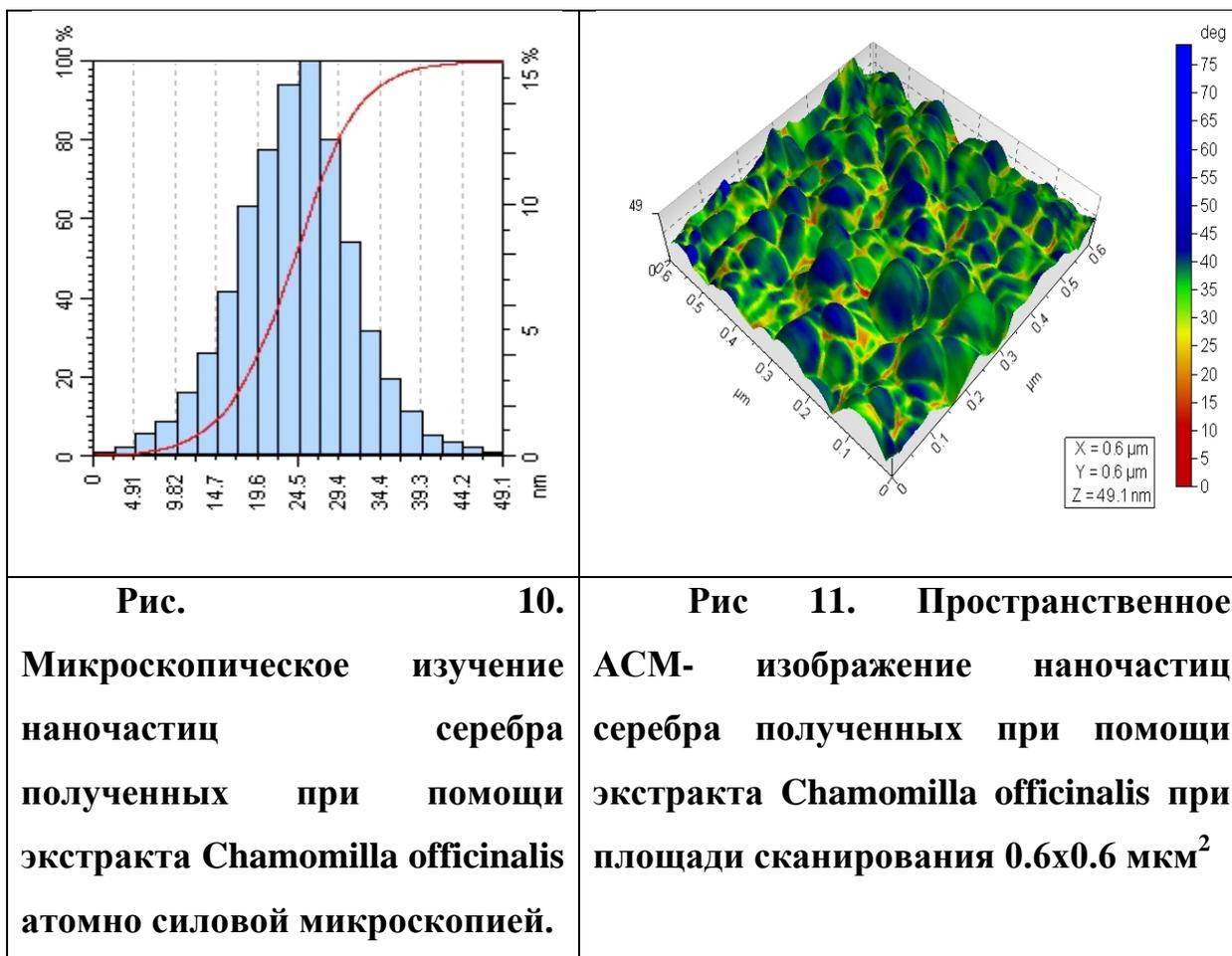
На основании данных ИК-спектроскопии можно предположить, что присутствующие в экстрактах *Chamomilla officinalis* и *Videns Tripartita* флавоноиды обладают окислительно-восстановительным потенциалом и способствуют образованию наночастиц.

3. Микроскопическое изучение наночастиц серебра

Известно, что в основном, наночастицы в диапазоне 1-10 нм прикрепляются к мембране и нарушают такие функции (свойства), как проницаемость и дыхание. НЧ размером 9–15 нм наиболее эффективны для уничтожения болезнетворных микроорганизмов. Установлено, что

наночастицы металлов размером от 5 до 60 нм проявляют свойства, которые не характерны для частиц большего размера. Типичные наночастицы серебра имеют размеры 25 нм. Они имеют чрезвычайно большую удельную площадь поверхности, что увеличивает область контакта серебра с бактериями или вирусами, значительно улучшая его бактерицидные действия. В последнее время всё более широкое распространение наночастицы серебра получают в области онкологии. Например, состав лекарственного средства для лечения рака легких включает следующие компоненты: порошок сферических наночастиц серебра диаметром 1–5 нм, фармацевтический диспергатор карбопол, триэтанолламин, глюкозу, чистую воду в качестве разбавителя. Результаты экспериментов показывают, что состав противораковых препаратов из наносеребра может полностью ингибировать пролиферацию клетки A549 человеческого немелкоклеточного рака легких и привести к смерти всех клеток.

Таким образом, применение серебра в виде наночастиц позволяет в сотни раз снизить концентрацию серебра с сохранением всех бактерицидных свойств. Поэтому нам представлялось интересным исследовать размеры полученных НЧ серебра. Определение проводили на приборе NtegraPrimaЗАО NT-MDT, Россия, методом Атомно силовой микроскопии. Результаты исследований представлены на Рис-10,11,12,13,14,15,16,17.

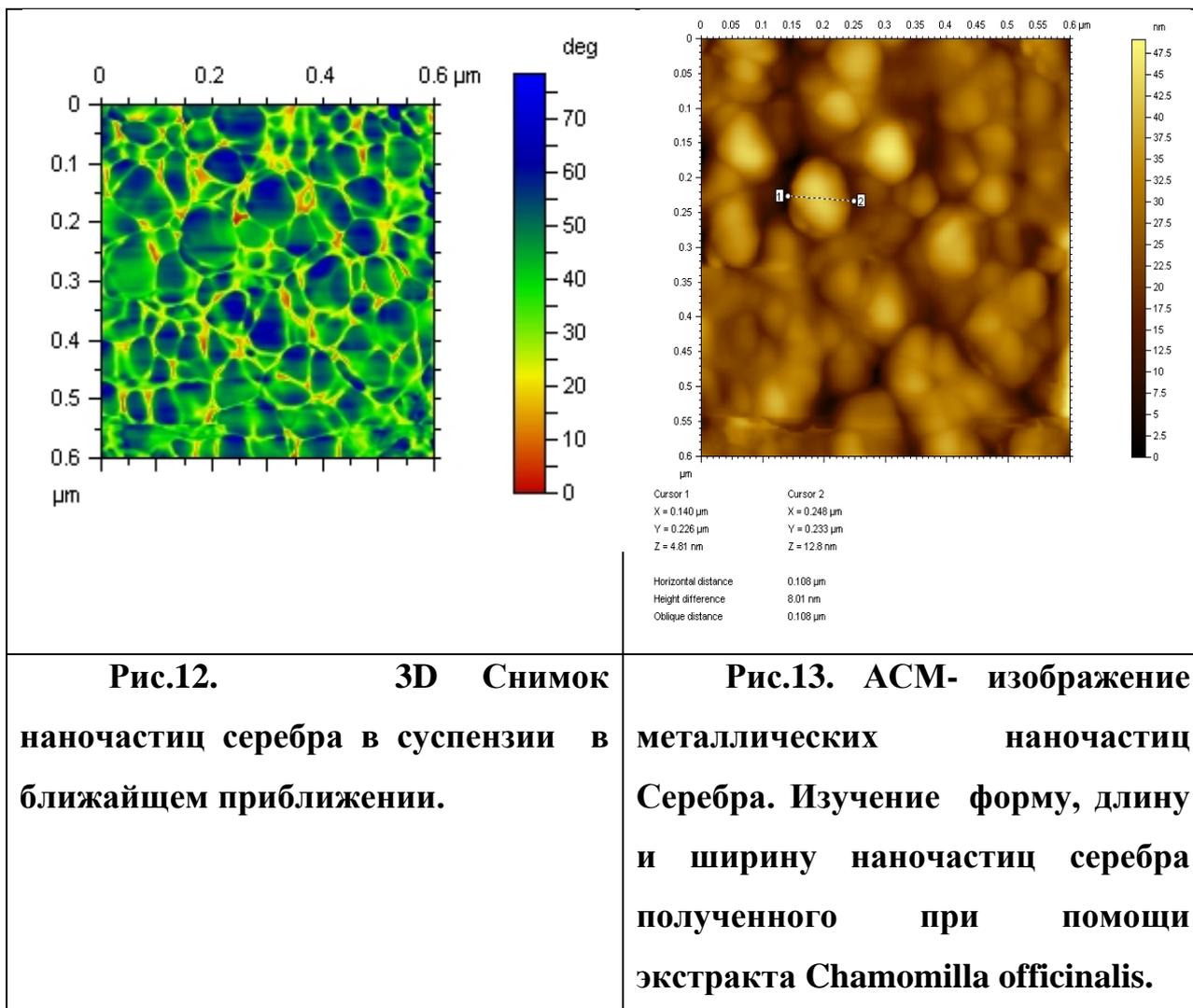


Из представленного рисунка (10) видно, что методом «зеленого синтеза» с использованием экстракта Ромашки аптечной были преимущественно получены наночастицы серебра размерами 4-44 нм. При этом значительное количество наночастиц имели размер 24,5 – 30 нм. Если принять общее количество наночастиц за 100%, то максимальное количество наночастиц, имеющих в исследуемом образце, составляет максимальное значение гистограммы.

В данном случае количество наночастиц с размерами частиц 24.5-30 нм составляет 15% от общего количества всех наночастиц в исследуемом образце. А количество наночастиц с размерами частиц 34.4 нм соответственно - 5%.

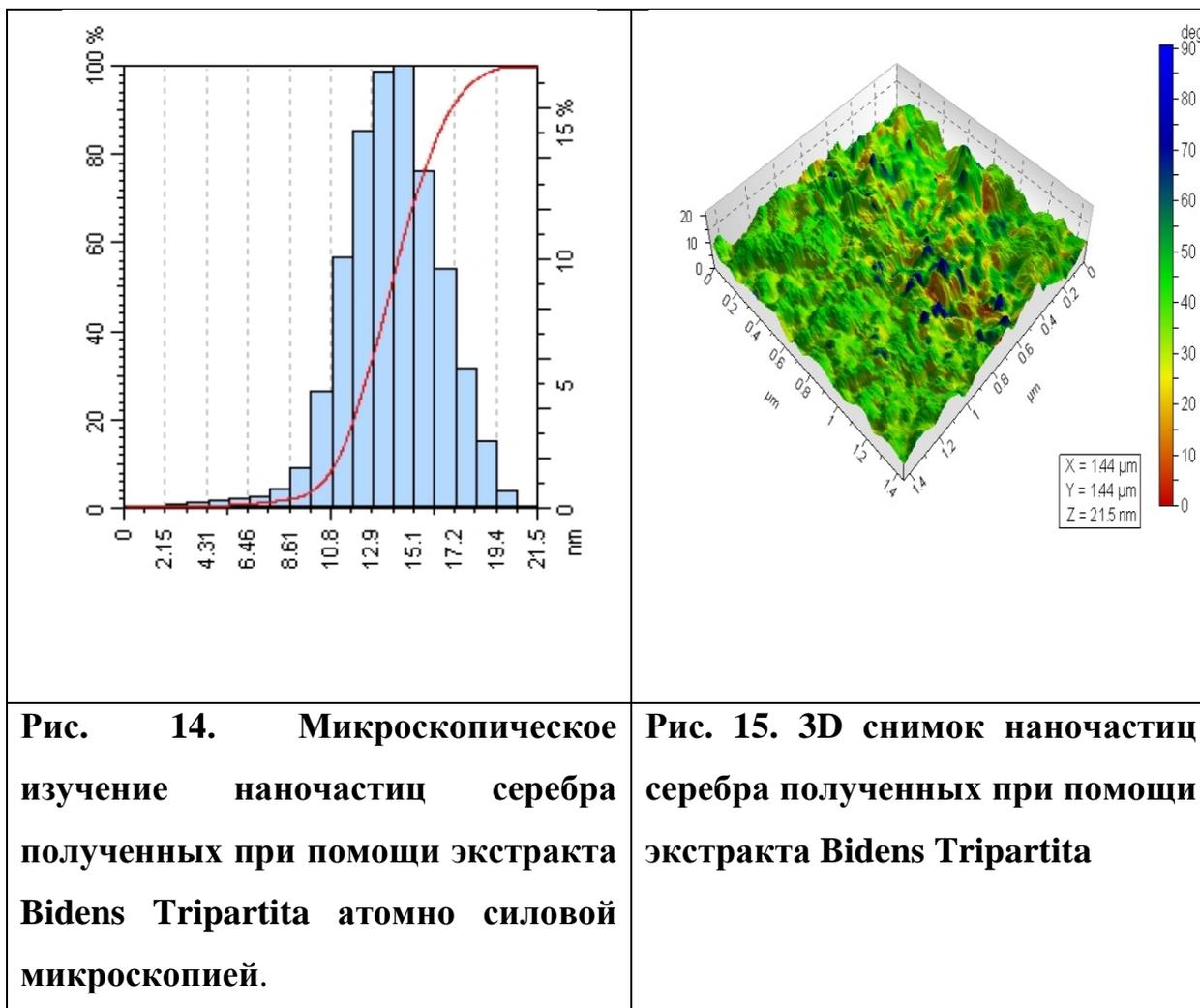
На рис.11- представлено 3 D изображение поверхностных ультраструктур с молекулярным разрешением в режиме реального времени и физиологических условиях. На этом рисунке X и Y обозначают

размеры площади сканирования, Z - самый большой размер наночастиц ($Z=49,1\text{нм}$) . Справа от изображений представлен градуировочный столбец с указанием степени твердости исследуемого образца. Наиболее твердые частицы, характеризующие наночастицы серебра, представлены в синем цвете.



Из рисунка 13- можно определить форму наночастиц. Как видно из рисунка, форма наночастиц серебра примерно сферическая. Выделенная наночастица с курсорный линейкой измеряет ширину и длину наночастиц. Ширина наночастиц составляет $0,106\ \mu\text{н} = 106\ \text{нм}$. Длина наночастиц составляет $8,01\ \text{нм}$. В градуировочном столбце, представленном справа, представлена световая гамма от светло-желтого до темно-коричневого цвета. Если светло желтый цвет при обзоре сверху

представляет высоту наночастиц, то темно-коричневый цвет, наоборот, свидетельствует о том, насколько глубоко расположены эти наночастицы. Образно говоря, этот рисунок рассматривает 3D рисунок в ближайшем приближении.



На рисунках 14,15 представлены результаты микроскопического изучения наночастиц серебра, полученных при помощи экстракта *Bidens Tripartita*. Как видно из представленных рисунков, в исследуемых образцах были преимущественно получены наночастицы серебра размерами 2-21 нм. При этом значительное количество наночастиц имели размер 12,9 – 15,1 нм.

В данном случае количество наночастиц с размерами частиц 15,1 нм составляет 15% от общего количества всех наночастиц в исследуемом

образце. А количество наночастиц с размерами частиц 10,8 нм соответственно - 5%.

На рис.15. представлено 3D изображение поверхностных ультраструктур с молекулярным разрешением в режиме реального времени и физиологических условиях. Z - Самый большой размер наночастиц (Z=21,5нм). Справа от изображений представлен градировочный столбец с указанием степени твердости исследуемого образца. Наиболее твердые частицы, характеризующие наночастицы серебра представлены в синем цвете.

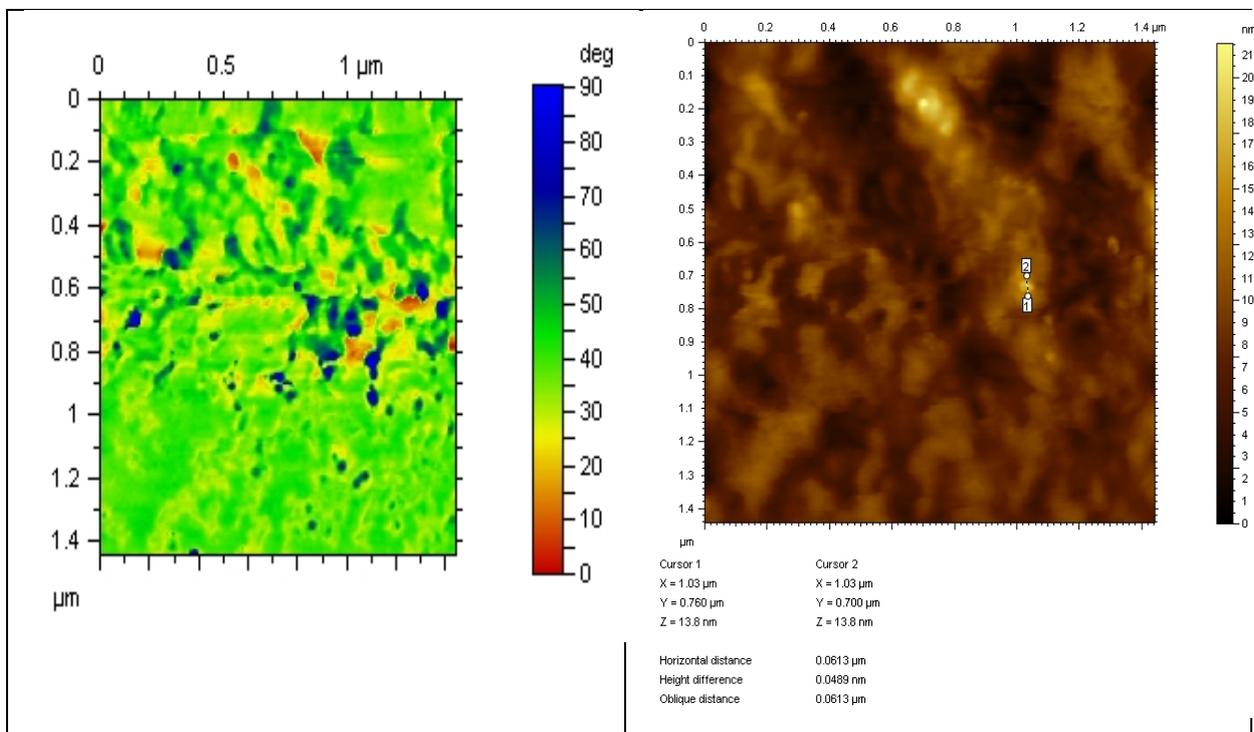


Рис.16. 3D Снимок наночастиц серебра в суспензии в ближайшем приближении.

Рис.17. АСМ- изображение металлических наночастиц Серебра. Изучение форму, длину и ширину наночастиц серебра полученного при помощи экстракта *Videns Tripartita* атомно силовой микроскопией.

Из рисунка 17- можно определить форму наночастиц, полученных с помощью экстракта *Bidens Tripartita*. Как видно из рисунка, форма наночастиц серебра также сферическая. Выделенная наночастица с курсорной линейкой измеряет ширину и длину наночастиц. Ширина наночастиц составляет $0,0613 \mu\text{m} = 61,3 \text{ нм}$. Длина наночастиц составляет $4,89 \text{ нм}$. В градуировочном столбце, представленном справа, представлена световая гамма от светло-желтого до темно-коричневого цвета. Если светло желтый цвет при обзоре сверху представляет высоту наночастиц, то темно-коричневый цвет, наоборот, свидетельствует о том, насколько глубоко расположены эти наночастицы.

Учитывая, что наиболее эффективны для уничтожения болезнетворных микроорганизмов является частицы серебра размером 9–15 нм [88], имеющие чрезвычайно большую удельную площадь поверхности, которая увеличивает область контакта серебра с бактериями или вирусами, значительно улучшая его бактерицидные действия, можно сделать вывод о том, что полученные наночастицы как с применением экстракта *Chamomilla officinalis*, так и *Bidens Tripartita* являются удовлетворительными. При этом наночастицы, полученные с использованием экстракта *Bidens Tripartita* по своему размеру в 2 раза меньше, чем полученные с применением экстракта *Chamomilla officinalis*, что свидетельствует об их лучших качественных характеристиках [89-98].

Выводы: Проведенные ИК спектроскопические исследования доказали присутствие в экстрактах *Bidens Tripartita* и *Chamomilla officinalis* флавоноидов, которые участвуют в образовании наночастиц. Следовательно, они могут быть перспективным сырьём для синтеза наночастиц серебра. Наночастицы серебра, полученные с использованием экстракта *Bidens Tripartita* имеют размеры (2-21 нм), наиболее эффективно обеспечивающие бактерицидные свойства.

4. Антибактериальные свойства наночастиц серебра, полученных методом «зеленого синтеза»

Среди металлов серебро (Ag) обладает наиболее сильным бактерицидным действием. При этом взаимодействие не самого металла, а его ионов с клетками микроорганизмов вызывает их гибель. Также известно, что механизм действия серебра на микробную клетку заключается в том, что ионы серебра поглощаются клеточной оболочкой микроба, в результате чего его клетка остается жизнеспособной, но при этом нарушаются некоторые ее функции, например деление (бактериостатический эффект). Таким образом, применение серебра в виде наночастиц позволяет в сотни раз снизить концентрацию серебра с сохранением всех бактерицидных свойств. В связи с этим, представлялось интересным изучение антимикробной активности наночастиц серебра, полученных методом “Зеленого синтеза” с использованием экстрактов *Videns Tripartita* [99-106].

Определение антимикробной активности препарата методом серийных разведений позволяет более точно определить минимальную концентрацию препарата, ингибирующую рост бактерий.

Бактериостатической дозой считали концентрацию препарата, которая задерживала рост культуры испытуемого штамма, а бактерицидной количество препарата, полностью подавляющее рост микробов. Чувствительность микроорганизмов оценивали унифицированным методом: 1 группа - высокочувствительные, 2 –чувствительные, 3- устойчивые.

Интерпретация результатов оценки чувствительности заключается в отнесении исследуемого микроорганизма к одной из трех категорий.

- высокочувствительные - штамм подавляется при концентрациях лекарственного препарата, создающихся в органах и тканях человека при рекомендуемых режимах дозирования.

-чувствительные - минимальной подавляющей концентрации лекарственного препарата в отношении штаммов этой категории выше чем в отношении высокочувствительных, но находится в пределах,

достижимых при рекомендуемых режимах дозирования.

Устойчивый - штамм не подавляется при концентрациях лекарственного препарата, создающихся в органах и тканях при рекомендуемых режимах дозирования.

Отсутствие зоны задержки роста микробов вокруг лунки свидетельствует о том, что испытуемый штамм не чувствителен к данному испытуемому препарату, при зоне диаметром до 10 мм штамм расценивается как малочувствительный. В стандартных условиях опыта по величине зон, образуемых препаратами, можно судить о степени чувствительности исследуемого микроорганизма.

Таблица 3. Результаты оценки чувствительности и диаметры зон ингибирования роста микроорганизмов экстрактом череды

№	Тест культуры	Диаметры зон ингибирования роста микроорганизмов, мм
1	Staphylococcus aureus	12
2	Escherihia coli	13
3	Pseudomonas aeruginosa	11
4	Bacillus subtilis	12
5	Bacillus cereus	12
6	Candida albicans	14
7	Aspergillus fumigates	12
8	Aspergillus niger	15
9	Aspergillus flavus	11
10	Penisillium spp	14
11	Aspergillus Kruzei	12

Из данных таблицы видно, что сам экстракт череды обладает умеренной антибактериальной активностью по отношению ко всем испытуемым микроорганизмам. Диаметры зон ингибирования при этом составили 11-15 мм.

Таблица 4. Результаты оценки чувствительности и диаметры зон ингибирования роста микроорганизмов наночастиц серебра

№	Тест культуры	Диаметры зон ингибирования роста микроорганизмов
1	Staphylococcus aureus	14
2	Escherihia coli	12
3	Pseudomonas aeruginosa	12
4	Bacillus subtilis	12
5	Bacillus cereus	12
6	Candida albicans	12
7	Aspergillus fumigates	12
8	Aspergillus niger	12
9	Aspergillus flavus	11
10	Penisillium spp	14
11	Aspergillus Kruzei	13

Таблица 5. Результаты оценки чувствительности и диаметры зон ингибирования роста микроорганизмов присыпки с наночастицами серебра

№	Тест культуры	Диаметры зон ингибирования роста микроорганизмов
1	Staphylococcus aureus	14
2	Escherihia coli	13

3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12
4	<i>Bacillus subtilis</i>	20
5	<i>Bacillus cereus</i>	12
6	<i>Candida albicans</i>	12
7	<i>Aspergillus fumigates</i>	12
8	<i>Aspergillus niger</i>	18
9	<i>Aspergillus flavus</i>	11
10	<i>Penisillium spp</i>	14
11	<i>Aspergillus Kruzei</i>	14

Результаты проведенных исследований показали таб.3,4,5, что наибольшая эффективность исследуемого образца отмечается по отношению к *Staphylococcus aureus* – диаметр зоны ингибирования составил 14 мм, а также к *Penisillium spp*-14 мм и *Aspergillus Kruzei* диаметр зоны ингибирования составил 12-14 мм.

Bacillus subtilis - диаметр зоны ингибирования составил 20 мм.

Изучение чувствительности микроорганизмов *Escherihia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Aspergillus fumigates*, *Aspergillus flavus* по отношению к испытуемым образцам методом диффузии в агаре показало неодинаковую чувствительность. Наиболее высокочувствительными оказались *Bacillus subtilis*, *Aspergillus nigeri*, зоны задержки роста вокруг лунок составляли 20 мм и 18 мм соответственно.

Наглядно, картину проведенных исследований можно увидеть на рисунках 18,19,20,21,22,23,24,25.

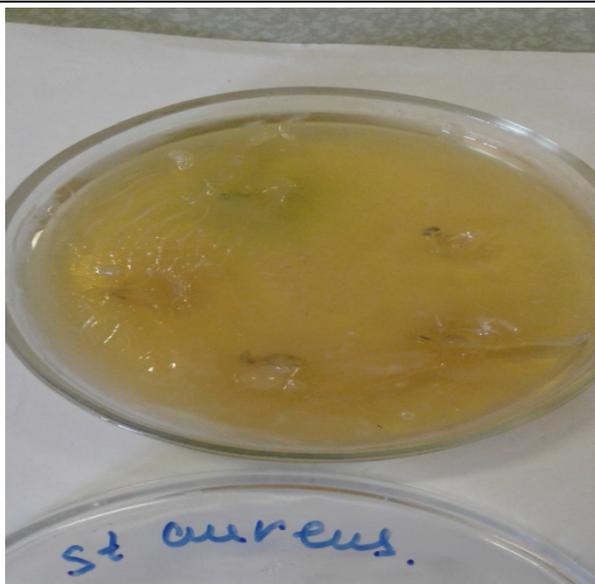


Рис 18. Результаты оценки чувствительности и диаметры зон ингибирования роста микроорганизмов Staphylococcus aureus: 1) Экстракт череды, 2) Наночастица серебра, 3) присыпка с наночастицами серебра



Рис 19. Результаты оценки чувствительности и диаметры зон ингибирования роста микроорганизмов Escherihia coli: 1) Экстракт череды, 2) Наночастица серебра, 3) присыпка с наночастицами серебра



Рис 20. Результаты оценки чувствительности и диаметры зон ингибирования роста микроорганизмов Pseudomonas aeruginosa: 1) Экстракт череды, 2) Наночастица серебра, 3) присыпка с наночастицами серебра



Рис 21. Результаты оценки чувствительности и диаметры зон ингибирования роста микроорганизмов Pseudomonas aeruginosa: 1) Экстракт череды, 2) Наночастица серебра, 3) присыпка с наночастицами серебра

ингибирования	роста	ингибирования	роста
микроорганизмов <i>Pseudomonas aeruginosa</i> :		микроорганизмов <i>Bacillus subtilis</i> :	
1) Экстракт череды, 2) Наночастица серебра, 3) присыпка с наночастицами серебра		1) Экстракт череды, 2) Наночастица серебра, 3) присыпка с наночастицами серебра	

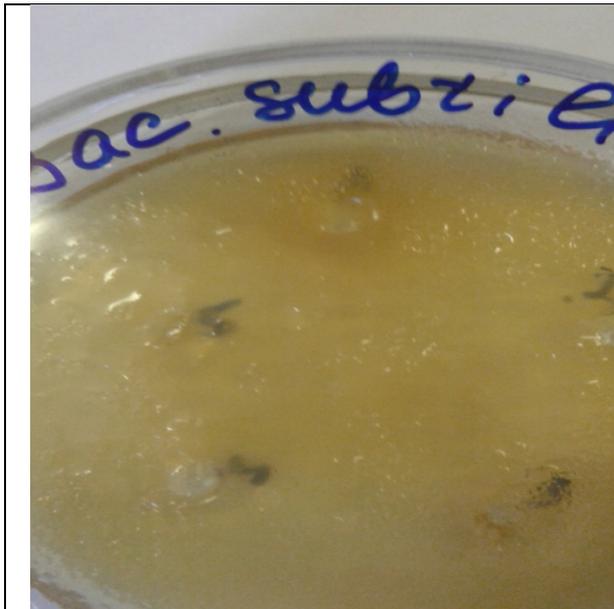


Рис 22. Результаты оценки чувствительности и диаметры зон ингибирования	роста	Рис 23. Результаты оценки чувствительности и диаметры зон ингибирования	роста
микроорганизмов <i>Bacillus cereus</i> :		микроорганизмов <i>Candida albicans</i> :	
1) Экстракт череды, 2) Наночастица серебра, 3) присыпка с наночастицами серебра		1) Экстракт череды, 2) Наночастица серебра, 3) присыпка с наночастицами серебра	

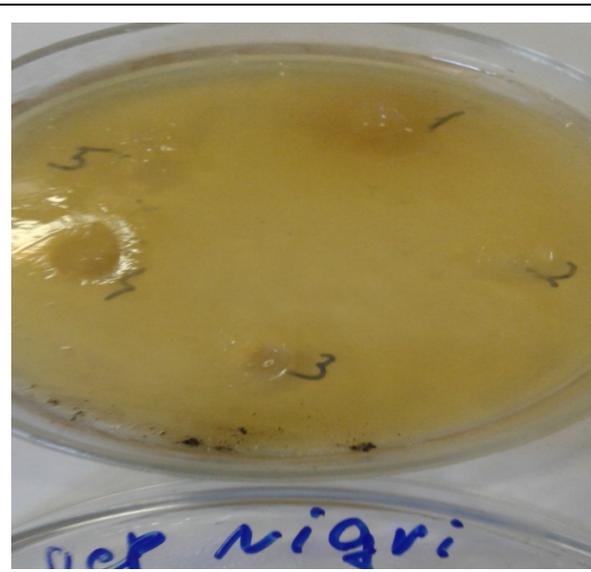


Рис 24. Результаты оценки чувствительности и диаметры зон ингибирования роста микроорганизмов *Aspergillus fumigates*: 1) Экстракт череды, 2) Наночастица серебра, 3) присыпка с наночастицами серебра

Рис 25. Результаты оценки чувствительности и диаметры зон ингибирования роста микроорганизмов *Aspergillus nigr*: 1) Экстракт череды, 2) Наночастица серебра, 3) присыпка с наночастицами серебра

Лечение инфекции, вызванной микроорганизмами, относящимися к этой категории, обычно эффективно при применении исследуемых препаратов в рекомендуемых дозах. К чувствительным относились *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* зона задержки роста вокруг лунок, которых составляла 14-12 мм. Лечение инфекции, вызванной категории может быть эффективным при применении испытуемого препарата в повышенных дозах, либо при локализации очага инфекции в тех органах или тканях, в которых в силу физиологических особенностей создаются повышенные концентрации препарата. Была устойчива к суспензия с НЧ Ag , *Bacillus cereus*, *Aspergillus fumigates*, *Aspergillus flavus*, зона роста вокруг лунок не

превышала 11-13 мм. Для устойчивых штаммов характерно наличие определенных механизмов резистентности. Лечение инфекции, вызванной микроорганизмом, относящимся к этой категории, скорее всего, будет неэффективным.

Результаты постановки метода серийных разведений в питательном агаре подтвердили данные предыдущего опыта, бактерицидная доза препарата оказалась выше, чем бактериостатическая. Наночастицы серебра, полученные с использованием экстрактов *Bidens Tripartita* проявляли сильную антимикробную активность, они бактерицидно действуют в отношении *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*. Из этого можно сделать **вывод**, что они могут использоваться для лечения воспалительных процессов.

Таким образом, результатами проведенных исследований показано, что наночастицы серебра, полученные методом «зеленого синтеза» с использованием экстракта *Bidens Tripartita* обладают бактерицидными и бактериостатическими свойствами в отношении ряда патогенных микроорганизмов.

5.Получение антибактериальной присыпки с наночастицами серебра

Практическое применение присыпки с НЧ серебра способствует ухудшению условий для вегетирования микрофлоры. Особенно эффективно это свойство присыпки проявляется при уходе за тяжелыми лежачими больными во избежание образования пролежней, при заживлении и полном излечении раны соответствующей этиологии, аллергиях, экземах и т.д.

Технология получения присыпок с НЧ серебра базировалась на физической иммобилизации суспензии с наночастицами в порошок.

Для этого 10 г порошка талька (присыпки) заливали 10 мл суспензии экстракта лекарственного растения (Череды трехраздельной и ромашки аптечной по отдельности) с наночастицами серебра, тщательно перемешивали и сушили при $t=40^{\circ}\text{C}$ до постоянной массы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Визуально образование наночастиц серебра установлено по изменению цвета от светло-желтого до красно-коричневого цвета, характерного для наночастиц серебра.

2. Результатами ИК-спектроскопии показано, что присутствующие в экстрактах *Chamomilla officinalis* и *Videns Tripartita* флавоноиды обладают окислительно-восстановительным потенциалом и способствуют образованию наночастиц.

3. Исследованием Атомно-силовой-микроскопии показано, что в исследуемых образцах с использованием экстракта Черда Трехраздельная были преимущественно получены наночастицы серебра размерами 2-21 нм. При этом значительное количество наночастиц имели размер 12,9 – 15,1 нм. В данном случае количество наночастиц с размерами частиц 15,1 нм составляет 15% от общего количества всех наночастиц в исследуемом образце. Количество наночастиц с размерами частиц 10,8 нм соответственно - 5%.

Также, в исследуемых образцах с использованием экстракта Ромашки аптечной были преимущественно получены наночастицы серебра размерами 4-44 нм. При этом значительное количество наночастиц имели размер 24,5 – 30 нм. Если принять общее количество наночастиц за 100%, то максимальное количество наночастиц, имеющих в исследуемом образце, составляет максимальное значение гистограммы. В данном случае количество наночастиц с размерами частиц 24,5-30 нм составляет 15% от общего количества всех наночастиц в исследуемом образце. А количество наночастиц с размерами частиц 34,4 нм соответственно - 5%.

4. Антибактериальные свойства полученных наночастиц серебра подтверждены микробиологическими исследованиями, так наиболее высокочувствительными оказались *Bacillus subtilis*, *Aspergillus niger*, зоны задержки роста вокруг лунок составляли 20 мм и 18 мм соответственно.

5. Разработана технология получения присыпок с наночастицами серебра.

ГЛАВА IV. Фармакологические исследования наночастица серебра

1. Проведение доклинических фармакологических исследований присыпки с наночастицами серебра.

Доклинические фармакологические исследования изучаемых присыпок с наночастицами серебра, содержащими экстракт череды и ромашки в отдельности, были направлены на изучение острой токсичности, ранозаживляющего действия ожоговой модели. [107-117].

Было обнаружено, что наночастицы некоторых металлов (золото, серебро) могут легко проходить плазматические мембраны клеток. Таким образом, в настоящее время изучено множество свойств наночастиц металлов, а также биологически активных эффектов нанопрепаратов: антибактериальный, иммуномодулирующий, антиоксидантный и др. Однако, большинство наноматериалов и нанобиокomпозитов изучены недостаточно: не установлены, в частности, общие биологические эффекты и возможная токсичность при их использовании на живых объектах, оптимальные концентрации при лечении ожоговых ран и их гнойных осложнений.

Результаты:

Во время проведения эксперимента наблюдение за состоянием животных вели в течении двух недель. Выявлено, что состояние животных в обеих опытных группах, где была нанесена испытуемая присыпка и препарата сравнения - детская присыпка, не отличались друг от друга. Животные были активными, хорошо принимали пищу и воду. На внешние раздражения реагировали активно, со стороны дыхания каких –либо отрицательных реакций, связанные с нанесением изучаемой присыпки не было. За время наблюдения гибели животных не наблюдалось. (Рисунок 26,27,28,29,30,31,32,33).

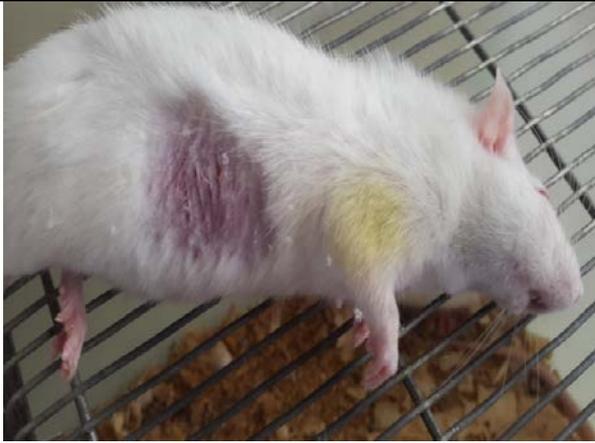


Рис.26 Изучение действие присыпок с наночастицами серебра у 18 крыс, массой 165-190г обоего пола.



Рис.27 Влияние присыпок на динамику воспаления у крыс массой 165-190г обоего пола.

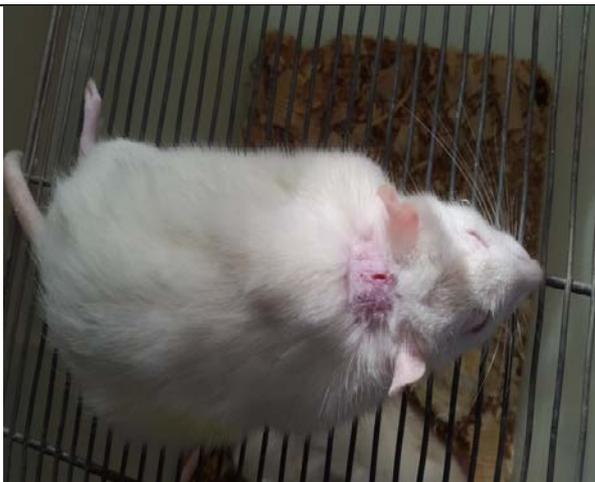


Рис.28 Изучение действие присыпок с наночастицами серебра на срезанной ране у 18 крыс, массой 165-190г обоего пола.

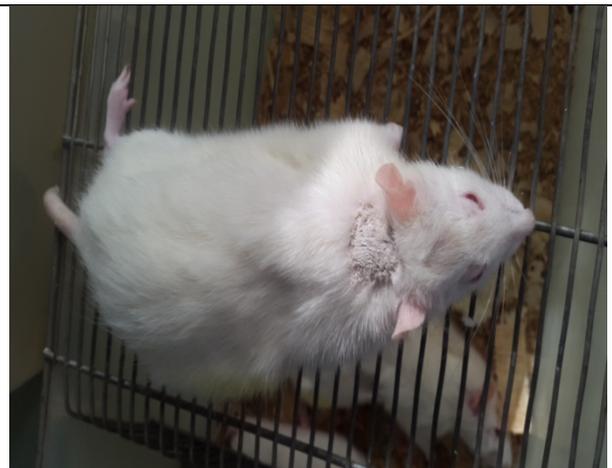


Рис.29 Результаты изучений действия присыпок на раневую поверхность у крыс



Рис.30 Результаты изучения действия присыпок на раневую поверхность у крыс, ранозаживляющий эффект.



Рис.31 Результаты изучения действия присыпок на раневую поверхность у крыс, ранозаживляющий эффект



Рис.32 Результаты изучения способности наносеребра снижать активность про воспалительных медиаторов при моделировании термического повреждения кожи.



Рис.33 Состояния крыс после экспериментов

Влияние действия исследуемых присыпок на динамику воспаления у крыс на модели эксудативного воспаления вызванного 2% формалином(прирост объёма конечностей, % относительно исходного, M=m; t=6) представлено в таблице 6.

Таблица 6. Влияние присыпок на динамику воспаления у крыс

Препарат	Время после инъекции					
	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	24,0
Контроль %	42±4,0	68±3,6	89±6,6	76±2,0	53±2,2	27±1,4
	100	100	100	100	100	100
Присыпка череды наночастицами серебра	20±1,7* с 43	33±2,2* 48,5	27,0±2,0* 30	17±1,2* 22,4	10±1,0* 18,9	20±0,1* 7,4
Присыпка ромашки наночастицами серебра	34±3,2* ^y с 81	27±2,5* 40	25±2,5* 28	15±0,6* 20	10±3,5* 18,9	14±0,1* ^y 5,2

***P<0.05**

Также было изучено действие присыпок с наночастицами серебра на срезанной ране у 18 крыс, массой 165-190г обоего пола. Хирургическим скальпелем сделали надрез поверхности длиной 1,5см и глубиной 1-2 мм затем, крыс разделяли на три группы по 6шт. В первой группе исследовалось влияние детской присыпки (контроль). Во второй группе влияние присыпка череды с наночастицами серебра, в третьей присыпка ромашки с наночастицами серебра (табл.7.).

Таблица7. Результаты изучения действия присыпок на раневую поверхность у крыс

Препарат	Количество животных в группе	Состояние животных
		Заживление раны(дни)
Детская присыпка	6	на 5-6
присыпка череды с наночастицами серебра	6	на 3-4
присыпка ромашки с наночастицами серебра	6	на 3-4

Два раза в сутки на протяжении трех дней наносили изучаемые присыпки на рану, контрольной группе наносили детскую присыпку.

В ходе опытов выявлено, что у животных контрольной группы заживление раны происходит на 5-6 день. У крыс, получавших присыпки череды и ромашки с наночастицами серебра исчезновение воспалительных изменений наблюдались на 3-4 дни. Таким образом, можно сделать **вывод** о том что заживление в опытных группах по сравнению с контрольной происходит 1-2 дня раньше.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Острая токсичность разработанной присыпки с наночастицами серебра была изучена на 20 крыс массой 160-175 г обоего пола. По методике (Edson E.F., Sanderson D.M., Watson W.A., Noakes D.N. The stability of blood chlinestrate after death.// Med.Sei.Low., 1962,2,4,P.258-267).С этой целью в двух местах обоих боков животных тщательно выстригали шерсть размером 1,5x1,5 см. Затем испытуемую присыпку наносили на аппликационное поле животных два раза в день в течении шести дней. О токсичности судили по общему состоянию животных: сохранение двигательных функций, аппетита, состояние шерстного покрова, дыхания, реакция на внешние раздражители, и их гибели.

Препарат	Результат количество крыс погибших/всего
Черёда с наночастицами серебра	0/10
Ромашка с наночастицами серебра	0/10

Наблюдение за состоянием животных вели в течении двух недель. Животные были активными, хорошо принимали пищу и воду. На внешние раздражения реагировали активно, со стороны дыхания каких-либо отрицательных реакций, связанные с нанесением изучаемой присыпки не было. За время наблюдения гибели животных не наблюдалось.

Результаты изучения действия присыпок на раневую поверхность у животных контрольной группы заживление раны происходит на 5-6 день. У крыс, получавших присыпки череды и ромашки с наночастицами серебра исчезновение воспалительных изменений наблюдались на 3-4 дни. Таким образом, можно сделать **вывод** о том что заживление в опытных группах по сравнению с контрольной происходит 1-2 дня раньше.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Подобрано флавоноидсодержащее лекарственное растительное сырье – Череда трехраздельная и Ромашка аптечная для получения экстрактов с целью их дальнейшего использования для получения наночастиц методом «зеленого синтеза».
2. Получены экстракты Череды трехраздельной и Ромашки аптечной, исследованы их ИК спектроскопические характеристики, доказано присутствие ОН групп в фенольных соединениях, участвующих в образовании наночастиц серебра.
3. Впервые методом «зеленого синтеза» получены суспензии наночастиц серебра в присутствии экстрактов лекарственных растений.
4. Методом АСМ установлено, что форма полученных наночастиц имеет сферический вид, наибольшее количество образованных наночастиц серебра с размерами частиц 2-21 и 4-44 нм составляет 15% от общего количества наночастиц в присутствии экстрактов.
5. Разработана технология получения присыпок с наночастицами серебра. Проведенными микробиологическими исследованиями доказана их высокая бактерицидная эффективность по отношению к ряду патогенных микроорганизмов.
6. Результатами проведенных фармакологических исследований в опытах *in vivo* показана специфическая активность разработанных присыпок с наночастицами серебра в присутствии экстрактов лекарственных растений при лечении ожоговых ран.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Основные литературы

1. Антибактериальные свойства и механизм бактерицидного действия наночастиц и ионов серебра, Получение антибактериальных текстильных материалов на основе наночастиц серебра посредством модификации поверхности текстиля неравновесной низкотемпературной плазмой / Ю.А. Букина, Е.А. Сергеева // Вестник Казанского технологического университета. – 2012. – № 7. – С. 125 – 128.
2. Doer R. Zur Oligodinamie des Silbers / R. Doer, W.Bergner // Biochem. Zeitschr. -1922. -N131. -P. 351-356.
3. П.А. Кульский, 1987; П.М. Соложенкин, 2003
4. В.А. Бурмистров, А.В. Бурмистров, 2014
5. S.M. Landage, A.I. Wasif, 2012; W.Likus, G. Bajor, K. Siemianowicz, 2013
6. Е.М. Блажитко, В.А. Бурмистров, 2004
7. В.С. Брызгунов, В.Н. Липин, В.Р. Матросова, Е.К. Наумова, 1964; А.Д.Ташинская, Е.И. Распопов, Л.Ф. Шанина, 1964; В.В. Дроздов, Н.Е. Никифорова, И.И. Павлова, 1971; В.И. Бабюк, 1972
8. Roco M.c. // Curr. Opin. Biotechnol. 2003. V. 14. P. 337–346
9. Zhang L., Gu F.X., chan J.M., Wang A.Z., Langer r.S., Farokhzad O.c. // clin. Pharmacol. ther. 2008. V. 83. P. 761–780.
10. Daniel M.c., Astruc D. // chem. rev. 2004. V. 104. P. 293–346
11. Wong t.S., Schwaneberg u. // curr. Opin. Biotechnol. 2003. V. 14. P. 590–596.
12. Nanoparticles and nanostructured films: Preparation, characterization and applications / ed. Fendler J.H. new York: John Wiley & Sons, 1998. 463 p.
13. Tsuji M., Hashimoto M., nishizawa Y., tsuji t. // chem. Lett. 2003. V. 32. P. 1114–1115.
14. Kundu S., Maheshwari V., Saraf r. // nanotechnology. 2008. V. 19. № 6. 065604.

15. Okitsu K., Mizukoshi Y., Yamamoto t.A., Maeda Y., nagata Y. // *Lett. Materials*. 2007. V. 61. P. 3429–3431
16. Narayanan K.B., Sakthivel n. // *Adv. colloid. Interface. Sci.* 2010. V. 22. № 156. P. 1–13.
17. Gan P.P., ng S.H., Huang Y., Li S.F. // *Bioresour. technol.* 2012. V. 113. P. 132–135.
18. Raveendran P., Fu J., Wallen S.L. // *Am. chem. Soc.* 2003. V. 125. № 46. P. 13940–13941.
19. Sharma H.S., Ali S.F., Hussain S.M., Schlager J.J., Sharma A. // *J. nanosci. nanotechnol.* 2009. V. 9. № 8. P. 5055–5072.
20. narayanan S., Sathy B.n., Mony u., Koyakutty M., nair S.V., Menon D. // *AcS. Appl. Mater. Interfaces*. 2012. V. 4. № 1. P. 251–260.
21. Govindaraju K., Khaleel Basha S., Ganesh Kumar V., Singa-ravelu G. // *J. Materials Sci.* 2008. V. 43. P. 5115–5122
22. Scarano G., Morelli e. // *Biometals*. 2002. V. 15. № 2. P. 145–151.
23. Scarano G., Morelli e. // *Plant Sci.* 2003. V. 165. P. 803–810.
24. Lengke M.F., Fleet M.e., Southam G. // *Langmuir*. 2007. V. № 5. P. 2694–2699
25. Kowshik M., Deshmukh n., Vogel W., urban J., Kulkarni S.K., Paknikar K.M. // *Biotechnol. Bioeng.* 2002. V. 78. № 5. P. 583–588
26. rautaray D., Ahmad A., Sastry M. // *J. Am. chem. Soc.* 2003. V. 125. № 48. P. 14656–14657.
27. Anshup A., Venkataraman J.S., Subramaniam c., Kumar r.r., Priya S., Kumar t.r., Omkumar r.V., John A., Pradeep t. // *Langmuir*. 2005. V. 21. № 25. P. 11562–11567
28. Njagi e.c., Huang H., Stafford L., Genuino H., Galindo H.M., collins J.B., Hoag G.e., Suib S.L. // *Langmuir*. 2011. V. 27. № 1. P. 264–271
29. Л.Г. Розенфельд, В.Ф. Москаленко, И.С. Чекман и др., 2008
30. D.H. Buchold, C. Feldmann, 2007; M.A. Garcia, J.M. Merino, Pinel Fernandez et al., 2007; C.N. Lok, C.M. Ho, R. Chen et al., 2007; K.

- Shankar, G.K. Mor, H.E. Prakasam et al., 2007; S. Laurent, D. Forge, M. Port et al., 2008; T.L. Chan, M.L. Tiago, E. Kaxiras, J.R. Chelikovsky, 2008; В.Ф. Москаленко, Л.Г. Розенфельд, Б.О. Мовчан, И.С. Чекман, 2008
31. А.И. Гусев, 2005; T.R. Pisanic 2nd, J.D. Blackwell, V.I. Shubayev et al. 2007; Z. Wang, B. Tan, I. Hussain et al. 2007; J.E. Martin, A.A. Herzing, W. Yan et al., 2008
32. Э.Г. Аконова, А.Х. Каде, Е.Ф. Курносенкова и др. 2007; Е.К. Баранова, А.А. Ревина, Л.И. Войно, 2003; Е.М. Блажитко, В.А. Бурмистров, А.П. Колесников, Ю.И Михайлов, П.П. Родионов, 2004
33. Iravani S. Green synthesis of metal nanoparticles using plants // *Green Chem.* – 2011. – 13. – P. 2638–2650
34. Харборн Дж. Биохимия фенольных соединений. – Москва: Мир, 1968. – 448 с.
35. Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. – Киев: Наук. думка, 1980. – 356 с
36. Gan P.P., Li S.F. // *rev. environ. Sci. Biotechnol.* 2012. V. 11. P. 169–206.
37. Ghodake G.S., Deshpande n.G., Lee Y.P., Jin e.S. *colloids Surf. B: Biointerfaces.* 2010. V. 75. P. 584–589.
38. Armendariz V., Herrera I., Peralta-Videa J.r., Jose-Yacamán M., troiani H., Santiago P., Gardea-torresdey J.L. // *J. nanopart. res.* 2004. V. 6. № 4. P. 377–382
39. Gan P.P., Li S.F. // *rev. environ. Sci. Biotechnol.* 2012. V. 11. P. 169–206.
40. Sathishkumar M., Sneha K., Yun Y.S. // *Bioresour. technol.* 2010. V. 101. № 20. P. 7958–7965.
41. Н. Н. Lara, N.V. Ayala-Nurñez, L. del Carmen Ixtepan Turrent, C. Rodríguez Padilla, 2010
42. W. Likus, G. Bajor, K. Siemianowicz, 2013; Г.П. Александрова, Л.А. Грищенко, Т.В. Фадеева и др., 2010; Е.М. Блажитко, В.А. Бурмистров,

- А.П. Колесников, Ю.И. Михайлов, П.П. Родионов, 2004, Л.А. Володина, 2007
43. З.Р. Ульберг, В.И. Подольская, Е.Ю. Войтенко и др., 2010; И.С. Чекман, А.М. Сердюк, Ю.И. Кундиев, 2008.
44. М. Рыбалкина, 2005; И.С. Чекман, Б.А. Мовчан, М.И. Загородный, Ю.В. Гапонов, Ю.А. Курапов, Л.А. Крушинская, М.В. Кардаш, 2008
45. W.K. Jung, H.H. Koо, K.W. Kim et al., 2008; J.R. Morones, J.L. Elechiguerra, A. Samacho et al., 2005
46. Фармакопея СССР, 11-ое изд., Том 2. Москва, Медицина, 1990 г.
47. Herb CD4: Herbal remedies. CD-ROM. Stuttgart, Medpharm Scientific, 2000.
48. Яковлев ГП, Блинова КФ. под ред. Лекарственное растительное сырье. Фармакогнозия. Санкт-Петербург, Спецлит, 2004 г
49. Гаммерман АФ, Кадаев ГН, Яценко-Хмелевский АА. Лекарственные растения. Москва, Высшая школа, 1983 г.
50. Муравьева ДА, Самылина ИА, Яковлев ГП. Фармакогнозия. Москва, Медицина, 2002 г
51. Baranska K. Certain flavonoids occurring in *Bidens tripartitus*. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 1963, 5:357–364.
52. Ivanic R, Miric M, Lukis P. Examination of chemical constituents of *Bidens tripartitus*. *Acta Pharmacologica Jugoslavia*, 1976, 3:253–256.
53. Карьев М.О. и др. Содержание биологически активных соединений в растениях флоры Туркмении. *Известия АН Туркменской ССР. Серия «Биологические науки»*, 1981 г., 4: 54-66.
54. Rauschert S. Nomenklatorische Probleme in der Gattung *Matricaria* L. *Folia geobotanica phytotaxonomica*, 1990, 9:249–260.
55. Farnsworth NR, ed. NAPRALERT database. Chicago, University of Illinois at Chicago, IL, August 8, 1995 production (an on-line database available

directly through the University of Illinois at Chicago or through the Scientific and Technical Network (STN) of Chemical Abstracts Services).

56. Youngken HW. Textbook of pharmacognosy, 6th ed. Philadelphia, Blakiston, 1950.

57. The Indian Pharmaceutical Codex. Vol. I. Indigenous drugs. New Delhi, Council of Scientific & Industrial Research, 1953.

58. Leung A, Foster S. Encyclopedia of common natural ingredients used in food, drugs, and cosmetics, 2nd ed. New York, John Wiley, 1996.

59. Bruneton J. Pharmacognosy, phytochemistry, medicinal plants. Paris, Lavoisier, 1995.

60. British herbal pharmacopoeia. London, British Herbal Medicine Association, 1990.

61. Tyler VE, Brady LR, Robbers JE, eds. Pharmacognosy, 9th ed. Philadelphia, Lea & Febiger, 1988.

62. Dülle B, Carle R, Müller W. Flavonoidbestimmung in Kamillenextrakt präparaten. Deutsche Apotheker Zeitung, 1985, 125 (Suppl. I):14–19

63. Carle R, Isaac O. Die Kamille-Wirkung and Wirksamkeit. Zeitschrift für Phytotherapie, 1987, 8:67–77.

64. 21. Carle R, Goma K. Chamomile: a pharmacological and clinical profile. Drugs of today, 1992, 28:559–565.

65. Hormann HP, Korting HC. Evidence for the efficacy and safety of topical herbal drugs in dermatology. Part 1. Anti-inflammatory agents. Phytomedicine, 1994, 1:161–171.

66. Weiy RF. Kamille-”Heilpflanze 1987”. Kneipp-Blätter, 1987, 1:4–8.

67. Журко В.В., Добротворский А.Е. К вопросу оценки механического загрязнения порошкообразных лекарственных препаратов // Фармация. - 1976. - № 5. - С.65-69.

68. Ляпунов, Н.А. Создание ассортимента препаратов для местного лечения ран / Н.А. Ляпунов, Л.А. Блатун, Б.М. Даценко // «Современные подходы к разработке эффективных перевязочных средств, шовных

материалов и полимерных имплантатов»: матер. Междунар. конф. М., 1995. С. 33-35.

69. Краснюк И.И. Лечебно-косметические средства: учеб.пособие для студ.высш.учеб.заведений / И.И. Краснюк, Г.В. Михайлова, Е.Т. Чижова; под ред. И.И. Краснова. - М.: Издательский центр «Академия», 2006.- 240с.

70. Sharma V.K., Yngard R.A., Lin Y., Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities, *Advances in Colloid and Interface Science*, vol. 145/1-2, pp 83-96, 2009.

71. Рамбиди Н.Г., Березкин А.В. Физические и химические основы нанотехнологии. – М.: Физматлит, 2008. – 454 с.

72. Рыжонков Д.И. Наноматериалы. – М.: Бином, 2008. – 365 с.

73. Сергеев Г.Б. Нанохимия. – М.: МГУ, 2003. –288 с.

74. Крутиков Ю. А., Кудринский А. А., Олейник А. Ю., Лисичкин Г. В. Синтез и свойства наночастиц серебра: достижения и перспективы // *Успехи химии*. 2008. Т. 77. № 3. С. 242-269.

75. Помогайло А. Д., Розенберг А. С., Уфлянд И. Е. Наночастицы металлов в полимерах. М.: Химия, 2000. 672 с.

С.М. Комаров. Камера – обскура для нанотехнолога // *Химия и жизнь*. 2007. № 3. С. 32–36.

76. Л.Н. Кузьмина. Получение наночастиц серебра методом химического восстановления // *Журнал Российского химического общества им. Д.И. Менделеева*. 2007. Т. XXX, № 8. С. 7–12.

77. Патент РФ № 2474471. Коллоидный раствор наночастиц серебра, металл-полимерный нанокомпозитный пленочный материал, способы их получения, бактерицидный состав на основе коллоидного раствора и бактерицидная пленка из металл-полимерного материала / В.А. Александрова, Л.Н. Широкова. – Оpubл. 10.02.2013; бюлл. № 4.

78. Патент РФ № 2448810. Способы получения наночастиц серебра / Р.Н. Галихметов, А.Г. Мустафин. –Оpubл. 27.04.2012.

79. Патент РФ № 2547982. Способ получения наночастиц / Г.А. Сычева. – Оpubл. 10.04.2015.
80. Патент РФ № 2390344. Способ получения наночастиц серебра в водной среде / Г.Н. Крейцберг и др. – Оpubл. 27.05.2010. Бюл. 15
81. А.И. Гусев. Наноматериалы, наноструктуры, нанотехнологии. – М.: Физматлит, 2007. 416 с.
82. Патент РФ № 2542280. Способ получения пленок с наноструктурным серебром / О.А. Баранова, П.М. Пахомов. – Оpubл. 20.02.2015. Бюлл. 5.
83. Патент РФ № 2562390. Способ получения наночастиц серебра / О.А.Баранова, П.М. Пахомов, С.Д. Хижняк. – Оpubл. 20.08.2014. Бюлл. № 23.
84. Патент РФ № 2572421. Способ получения нанокристаллического порошка сульфида серебра / С.И. Садовников, А.А. Ремпель. – Оpubл. 10.01.2016. Бюлл. № 1.
85. Edson E.F., Sanderson D.M., Watson W.A., Noakes D.N. The stability of blood choline stearate after death. // Med. Sei. Low., 1962, 2, 4, P. 258-267
86. J. Huang, C. Chen, N. He et al. Biosynthesis of silver and gold nanoparticles by novel sun dried Cinnamomum camphora leaf // Nanotechnology. - 2007. - V. 18. - P. 105-106.
87. N. Ahmad, S. Sharmab, Md. R. Alama, V. N. Singh, S. F. Shamsi, B. R. Mehta, A. Fatma “Rapid synthesis of silver nanoparticles using dried medicinal plant of basil” // Colloids Surf/ B/ -2010.-81.-P.81-86.
88. S. Irvani “Green synthesis of metal nanoparticles using plants” // Green Chem. – 2011. – 13. – P. 2638–2650.
89. И.В.Лагута, Т.В.Фесенко, О.Н. Ставинская, Л.М.Шпак, О.И.Дзюба «Биосинтез наночастиц серебра с использованием экстрактов стевии» ISSN 1025-6415 Украина, 2015, №12, С-97-102.
90. Shiv Shankar S., Ahmad A., Pasricha r., Sastry M.J. // Mater. chem. 2003. V. 13. P. 1822–1846.

91. . Maensiri S., Laokul P., Klinkaewnarong J., Prokha S., Promark V., Seraphin S. // *Optoelectronics Advanced Materials*. 2008. V. 2. P. 161–165.
92. Vilchis-nestor A.r., Sónchez-Mendieta V., camacho-Lypez M.A., Gymez-лдлдэспиноса r.M., camacho-Lypez M.A., Arenas-Alatorre J.A. // *Mater. Lett.* 2008. V. 62. P. 3103–3105.
93. Song J.Y., Kwon e.Y., Kim B.S. // *Bioprocess. Biosyst. eng.* 2010. V. 33. P. 159–164. TOM 6 № 1 (20) 2014 | ActA nAturAe | 47
94. Song J.Y., Kim B.S. // *Bioprocess. Biosyst. eng.* 2009. V. 32. № 1. P. 79–84
95. 30. Shiv Shankar S., rai A., Ahmad A., Sastry M. // *J. colloid. Interface. Sci.* 2004. V.275. P. 496–502.
96. Haverkamp r., Marshall A. // *J. nanoparticle. res.* 2009. V. 11. № 6. P. 1453–1464.

2. Научный статьи

97. raveendran P., Fu J., Wallen S.L. // *Am. chem. Soc.* 2003. V. 125. № 46. P. 13940–13941.
98. M. Jannathul Firdhouse and P. Lalitha “Biosynthesis of Silver Nanoparticles and Its Applications” *Journal of Nanotechnology*, vol. 2015, P. 1–18, 2015.
99. Воробьев А.А., Быков АС., Пашков Е.Л., Рыбакова А.М. *Микробиология. Медицина* - 2003. — С. 75
100. Государственная фармакопея Республики Беларусь. (ГФ РБ): Разработана на основе Европейской фармакопеи. Т.1 Общие методы контроля лекарственных средств/ М-воздравоохр. Республики Беларусь, УП «Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении», под общ. Ред. А.А. Шерякова. -Молодечно: Тип. «Победа», 2012. С.1220
101. М.Г. Григорьев, Л.Н. Бабич. Использование наночастиц серебра против социально значимых заболеваний // *Молодой ученый*. 2015. № 9. С. 396–401.

102. Наночастицы серебра малого размера для исследований биологических эффектов // Журнал физической химии. 2011. Т. 85. № 2. С. 1–10. Л.С. Сосенкова, Е.М. Егорова.
103. М.В. Самсонова. Наномедицина: современные подходы к диагностике и лечению заболеваний, вопросы безопасности // Пульмонология. 2008. № 5. С. 5–13
104. F.A. Mohammed, L. Chen, P. Kalaichelvan. Inactivation of microbial infectiousness by silver nanoparticles-coated condom: a new approach to inhibit HIV- and HSV-transmitted infection // Int. J. Nanomedicine. 2012. № 7. P. 5007–5018.2
105. Patent CN № 104415090. Production method of nano-silver antibacterial agent / S.Qixiang. – Publ. 18.03.2015
106. Patent CN № 103893830. Nano-silver anti-infection hernia repair patch and preparation method thereof / L. Wenbo. – Publ. 02.07.201431
107. Каркищенко Н.Н. Классические и альтернативные модели лекарственной токсикологии. // Биомедицина № 4, с. 5-23, 2006.
108. Абаев, Ю. К. Справочник хирурга. Раны и раневая инфекция / Ю. К. Абаев. – Ростов н/Д. : Феникс, 2006. – 427 с.
109. Белобородов, В. Б. Проблемы антибактериальной терапии хирургических инфекций, вызванных резистентной грамположительной флорой / В. Б. Белобородов // Сучасні інфекції. – 2010. – № 4. – С. 108-115.
110. Биопленки патогенных бактерий и их роль в хронизации инфекционного процесса. Поиск средств борьбы с биопленками / Ю. М. Романова [и др.] // Вестник РАМН. – 2011. – № 10. – С. 31-39.
111. Брискин, Б.С. Внутрибольничная инфекция и послеоперационные осложнения с позиций хирурга / Б.С. Брискин // Инфекц. и антимикроб.тер. – 2001. – Т. 2, № 45. – С. 124-128.
112. Aslam, S. Role of antibiofilm-antimicrobial agents in controlling device-related infections / S. Aslam, R. O. Darouiche // Int. J. Artif. Organs. – 2010 Sep. – Vol. 34, N 9. – P. 752-758.

113. Nichols, R. L. Surgical infections: prevention and treatment (1965-1995) / R. L. Nichols // Am. J. Surg. – 1996 Jul. – Vol. 172, N 1. – P. 68-74.
114. Kapil, A. The challenge of antibiotic resistance: need to contemplate / A. Kapil // Indian J. Med. Res. – 2005 Feb. – Vol. 121, N 2. – P. 83-91.
115. Антибиотики в хирургии и интенсивной терапии / Б. З. Белоцерковский [и др.] // Инфекции в хирургии. – 2009. – Т. 7, № 2. – С. 70-76.
116. Бархатова, Н. А. Динамика резистентности возбудителей локальных и генерализованных форм инфекций мягких тканей / Н. А. Бархатова // Казанский медицинский журнал. – 2009. – Т. 90, № 3. – С. 385-390.
117. Блатун, Л.А. Современные основы общей антибактериальной терапии раневой инфекции / Л.А. Блатун // Избранный курс лекций по гнойной хирургии / Л.А. Блатун; под ред. В.Д. Федорова и А.М. Светухина. – М.: Изд-во «Миклош», 2005. – С. 328-352.

3. WEB сайты

118. Wikipedia.org
119. Chem21.info

Приложение

Термические ожоги III степени воспроизводили контактным высокотемпературным способом в межлопаточной области крыс в проекции шейно-грудного отдела. С этой целью участок кожи животных депилировали и наносили термическую травму путем прикладывания на 14 сек разогретой до +240 °С медной пластины (площадь поверхности – 225 мм²) с силой 1.6 н. На 3-и сутки сформировавшийся струп и патологически измененные ткани удаляли методом острой некрэктомии, при этом средняя площадь поверхности сочетанной раны составляла 304.2 ± 4.7 мм².

Далее крыс делили на три группы: контрольную (5 крыс) и две опытные (по 6 крыс). В контрольной группе животных лечили детской присыпкой в соответствии с инструкцией по применению, нанося присыпку тонким слоем на пораженную поверхность 2 раза в сутки ежедневно до выздоровления. Животным из экспериментальных групп на обнаженную раневую поверхность однократно наносили присыпку ч.с.н.с (группа № 1) или р.с.н.с (группа № 2). Раневая поверхность не изолировалась от внешней среды, и заживление проходило под струпом.

Оценку динамики заживления осуществляли планиметрическими методами. Сразу после некрэктомии и потом через каждые 3 суток на рану накладывали пластинку плотного целлофана с разметкой в виде квадратов (длина стороны ячейки - 2.5 мм), фломастером обводили контур раны.

Общий срок заживления открытой раны определяется скоростью течения репаративно-регенеративного процесса, направленного на постепенное уменьшение раневой поверхности вплоть до ее полного закрытия.

В эксперименте использовали крыс массой 250–300 г по 6 животных в группе. На выстриженном участке спины размером 4 x 4 см² под барбиталовым наркозом у животных вызывали термический ожог. Для этого использовали прибор с установленной температурной шкалой и электропаяльником, на конце которого крепится металлическая пластина размером 2,5 x 2,5 см². Данный метод позволяет получить стандартные

ожоги по площади и глубине всей толщии кожи. Время экспозиции нагретой до 200⁰С контактной пластинки составляло 10 сек. При соблюдении этих условий ожог кожи у животных соответствовал III степени клинической классификации ожогов. Опытных животных распределяли на 3 группы. Крысам первой опытной группы ожоговую рану лечили мазью «Пролидоксид», второй — мазью прополисовой 3%, а животных контрольной группы не лечили. Лечение начинали на второй день после воспроизведения ожогов. Об общем состоянии животных судили на основании поведенческих реакций, аппетита, массы тела, выживаемости. Клинические наблюдения процессов заживления ожоговых ран проводили на 2, 5, 8, 9, 13, 16, 19, 21, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 сутки и в более поздние сроки, т. е. до полного заживления ран. В эти сроки регистрировали состояние раны, проводили измерение площади раны, прикладывая к ране прозрачный трафарет. Кроме того, о темпах заживления ожоговых повреждений судили по скорости заживления ран, которую вычисляли по формуле 2:

$$V = (S_{\text{макс}} - S_{\text{опыт}}) / S_{\text{опыт}}$$

$S_{\text{макс}}$ — максимальная площадь раны (в нашем опыте на 8-й день)

$S_{\text{опыт}}$ — площадь раны в день измерения.

Фиксировали также % животных с зарубцевавшимися ранами. Полученные цифровые данные обрабатывали статистически, используя критерий Стьюдента.

Опыты проведены на белых крысах массой 180-200 г, обоего пола. Лабораторные животные были разделены на 3 группы: контрольную (группа 1, n=6), группу сравнения (группа 2, n=6) и опытную (группа 3, n=6). Все животные содержались в условиях вивария и получали стандартный рацион питания со свободным доступом к воде.

Экспериментальную работу осуществляли в соответствии с «Правилами, принятыми в Европейской конвенции по защите позвоночных животных» (Страсбург, 1986).

Исследуется **«Острая» токсичность** как самого фармакологического вещества или средств для косметологии, содержащих наночастиц.

Результаты исследований показывают, что проявление токсических свойств наночастиц в значительной мере зависит от пути их поступления в организм. Это означает, что суждение об острой токсичности нанопрепаратов может базироваться исключительно на результатах, полученных доклинических исследованиях.

Общая продолжительность наблюдения на животных разделили на 4 группы:

1. контрольная,
2. опытная, + присыпка имеющего в составе наночастиц серебра и экстракт ромашки;
3. опытная, ожог + присыпка имеющего в составе наночастиц серебра и экстракт Череды трехраздельной;
4. опытная, ожог + детская присыпка ;

Второй опыт была проведена на белых крысах массой 180-200 г, обоего пола. Интенсивными исследованиями последних лет показаны **противовоспалительные эффекты** наночастиц серебра. В частности, выраженный противовоспалительный эффект наночастиц серебра отмечен в экспериментах при моделировании воспалительного процесса кожных покровов лабораторных животных, обработанных динитрохлорбензолом. Установлена способность наносеребра снижать активность провоспалительных медиаторов при моделировании термического повреждения кожи (117 S. Prabhu, E. Poulouse, 2012).

Также, было установлено, что лечение ожогов 1 степени у крыс ежедневным наложением прсыпки иммобилизованный с наночастицами серебра, приводит к значительной интенсификации

репарационных и регенерационных процессов, однако через 21 день было отмечено существенное повышение плазменных трансаминаз и инфильтрация полиморфоядерных лейкоцитов вокруг центральной печеночной вены (S. Vidgoli et al., 2013)

Животных разделили на 4 группы:

1. контрольная, вызывали ожог и затем оставляли без лечения
2. опытная, ожог+ присыпка имеющего в составе наночастиц серебра и экстракт ромашки;
3. опытная, ожог + присыпка имеющего в составе наночастиц серебра и экстракт Череды трехраздельной;
4. опытная, ожог + детская присыпка ;

В каждой группе находилось по 8 особей крыс. Ожог вызывали методом, приведенным в работе Асланова И. (2002) погружая правую заднюю стопу до скакательного сустава в воду с температурой 55 °С на 20 сек. Через 30 мин после ожога мышам 1 группы (контроль) на правую заднюю стопу апплицировали лейкопластырь. Животным 2-4 групп апплицировали лейкопластырь с соответствующими препаратами указанными выше. В среднем на аппликацию одной мыши расходовалось 80-95 мг исследуемого препарата. Спустя 24 часа после аппликации исследуемых веществ, животных забивали, одномоментной декапитацией, отсекали правой и левую лапку по тазобедренному суставу. Визуально осматривали и оценивали состояние кожных покровов здоровой и пораженной стопы мышей. Массу ампутированной лапки и отдельно стопы определяли гравиметрически на торсионных весах с точностью до 1 мг. По разнице массы правой и левой лапок и отдельно стопы определяли наличие противоожогового эффекта исследуемых веществ

Результаты и их обсуждение

Известно, что ожоги горячей водой, паром наиболее распространены и при поражении участков кожи более 10% от поверхности тела являются опасными для жизни больных. Данная

экспериментальная модель характеризуется ожогом III-IV степени с поражением эпидермального и дермального слоев кожи. В наших опытах наблюдается аналогичная картина, отмечается резкая гиперемия, местами кожный покров нарушен, наблюдаются сукровичные выделения на пораженном участке стопы. Данная картина характерна для всех 8 животных нелеченной (контрольной) группы.