

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ
НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА НА МОДЕЛИ ПЕРИТОНИТА И МЕНИНГОЭНЦЕФАЛИТА IN VIVO

Е.И. САВИН*, Т.И. СУББОТИНА*, А.А. ХАДАРЦЕВ*, П.А. ХРЕНОВ*, Т.В. ЧЕСТНОВА*,
Ю.П. БУЗУЛУКОВ**, А.Н. АНЦИФЕРОВА**

*ГБОУ ВПО «Тульский государственный университет, Медицинский институт»,
ул. Болдина, 108, г. Тула, Россия, 300012, тел.: +7 (4872)332410, +7 (4872)254750

**НИЦ «Курчатовский институт», пл. Курчатова 1, г. Москва, Россия, 123182,
тел. +7 (499) 1967256, e-mail: hrenov.pawel@yandex.ru

Аннотация. В статье представлены результаты исследования антибактериального влияния наночастиц серебра при их пероральном поступлении на экспериментальные модели перитонита и менингоэнцефалита in vivo. В условиях возрастающей резистентности бактерий к применяемым антибактериальным препаратам актуален поиск альтернативных средств, которые позволяют эффективно бороться с клинически значимыми штаммами микроорганизмов. К таким средствам относятся наночастицы металлов, в частности, наночастицы серебра. Согласно результатам ранее проведенных исследований, они проявляют достаточно высокую антибактериальную и антибиопленочную активность. Проведенная работа показала, что при внутримозговом введении болезнетворных штаммов микроорганизмов (экспериментальный менингоэнцефалит), после пероральной дачи наносеребра – эффекта не наблюдалось, а в группе животных с внутрибрюшинным введением (экспериментальный перитонит) – признаков воспалительного поражения брюшины при микроскопическом исследовании не обнаружено.

Ключевые слова: наночастицы серебра, биопленки, антибактериальный эффект, антибиотики, перитонит, менингоэнцефалит, биоаккумуляция

EXPERIMENTAL STUDY OF ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF SILVER NANOPARTICLES ON
THE MODEL OF PERITONITIS AND MENINGOENCEPHALITIS IN VIVO

E.I. SAVIN*, T.I. SUBBOTINA*, A.A. KHADARTSEV*, P.A. KHRENOV*, T.V. TCHESNOVA*,
Yu.P. BUZULUKOV**, A.N. ANTIFEROVA**

*Medical University, Tula state University,
Str. Boldin, 108, Tula, Russia, 300012, tel.: +7 (4872) 332410, +7 (4872) 254750

**Kurchatov Institute, pl. Kurchatov 1, Moscow, Russia, 123182,
tel. +7 (499) 1967256, e-mail: hrenov.pawel@yandex.ru

Abstract. The paper presents the results of study of the antibacterial effect of silver nanoparticles when ingested, on the experimental model of peritonitis and meningoencephalitis in vivo. In conditions of the increasing resistance of bacteria to antibacterial drugs, the search of alternative means which will allow to effectively deal with clinically significant microorganisms, is relevant. Such tools are the nanoparticles of metals, particularly the silver nanoparticles. According to results of conducted research, they show quite a high antibacterial and antiviolence activity. The study prove that at intra-cerebral introduction of pathogenic strains of microorganisms (experimental meningoencephalitis), after per oral use of nanosilver – effect didn't observed; in the group of animals with intraperitoneal injection (experimental peritonitis) – the signs of inflammation of the peritoneum by microscopic examination didn't revealed.

Key words: silver nanoparticles, biofilms, antibacterial effect, antibiotics, peritonitis, meningoencephalitis, bioaccumulation.

В последние годы *наночастицы серебра* (AgNPs) успешно используются в медицине для доставки терапевтических агентов [3]. Они считаются менее токсичными, чем ионы серебра. Исследования показали, что AgNPs влияет на бактериальную проницаемость мембран и прикрепление бактерий к поверхности клеточной мембраны. Обнаружение в больших количествах наночастиц внутри бактерий предполагает, что это важнейший антибактериальный механизм. Кроме того, AgNPs взаимодействует с бактериальными мембранными белками, внутриклеточными белками, фосфатными остатками в ДНК, и вмешивается в деление клеток, что приводит к гибели бактериальной клетки [4, 5]. В фокусе научного анализа оказались *биопленки*, как особая и, тем не менее, абсолютно преобладающая форма существования микроорганизмов при инфекционных заболеваниях человека. Формируется новая ветвь профилактической и терапевтической медицины, нуждающаяся в разработке фармацевтических и нефармацевтических методов предупреждения образования *биопленок* или разрушения образовавшихся [1, 2].

Введение. *Наночастицы серебра* (AgNPs) рассматриваются в настоящее время как перспективное средство лечения инфекционных заболеваний человека. Особенности AgNPs являются их действие на широкий спектр микроорганизмов, отсутствие реакции выработки резистентности на воздействие AgNPs и выраженный антибиоплёночный эффект. Последняя особенность особенно важна в связи с формированием новой ветви профилактической и терапевтической медицины, нуждающейся в разработке фармацевтических и нефармацевтических методов предупреждения образования *биопленок* или разрушения образовавшихся [1, 2].

К сожалению, биологический механизм действия AgNPs на микроорганизмы и бактериальные биоплёнки, остается недостаточно изученным [6]. В исследовании [7] демонстрируется применение AgNPs *наночастиц серебра* в стоматологии, подтверждающее их высокую антибактериальную и антибиоплёночную активность, в сравнении с хлоргексидином и нитратом серебра, являясь их альтернативой, защищая от зубного налёта и вторичного кариеса. Кроме того, формирование *биопленок* почти полностью предотвращалось на катетерах, покрытых наносеребром [8].

В клинических испытаниях медицинских изделий, покрытых наносеребром, установлено, что их антимикробная функция нивелируется, если изделия покрываются макромолекулами или мертвыми микроорганизмами. Выявлено также снижение эффективности металлического серебра на медицинских приборах, контактирующих с кровью, так как покрытие стирается. Определена важность совершенствования методов покрытия или включения AgNPs в состав – для продления эффективности таких устройств [9, 10].

Неоднозначным является эффект AgNPs в отношении часто применяемых антибиотиков. Методом *вестерн-блоттинга* определена синергетическая активность *наночастиц серебра* и ампициллина, стрептомицина, рифампицина, тетрациклина – против планктонных форм *P. aeruginosa*. При использовании AgNPs и цефтазидима, оксациллина, ципрофлоксацина, меропенема – синергетического эффекта не обнаружено [11]. Выявлена активность комбинация пероксида водорода и ферромагнетических наночастиц, вызывающих деградацию биоплёнок [12]. В материалах [13] анализируется эффект действия *наночастиц серебра* на штаммы синегнойной палочки с множественной лекарственной резистентностью. Установлено, что концентрация AgNPs 20 мг/мл ингибировала образование биоплёнок у *чувствительных* штаммов – в 67%, а *резистентных* штаммов – в 56% случаев, при определенной концентрации бактерий.

Противогрибковая активность *наночастиц серебра* показана на примере грибов рода *Candida*. Определено влияние AgNPs на способность к адгезии грибов на клетки линии Hela, которая в значительной мере уменьшилась после обработки *наночастицами серебра* в концентрации 54 мг/мл [14].

Продемонстрирован сравнительный эффект антибиотика гентамицина и *наногибрида*, состоящего из *наночастиц серебра* и наноразмерных силикатных пластинок – в отношении биоплёнок *P. aeruginosa*. В сравнении с биоцидным эффектом гентамицина, *наногибрид* уменьшал распространение биоплёнок и инициировал активную гибель клеток с отслоением поверхностных многослойных биоплёнок *in vitro*. *In vivo* *наногибриды* обеспечивали существенный лечебный эффект, элиминируя биоплёнки при инфекциях роговицы, и способствуя восстановлению целостности роговицы [15].

В работе [16] изучались антимикробные свойства нанокомпозитных систем на основе лактозамещенного хитозана и *наночастиц серебра*: Chitlac-nAg. Двукратная серия разведений коллоидного раствора Chitlac-nAg была протестирована на *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans*, и *Streptococcus oralis* в планктонной фазе, и на росте биоплёнок, а также на образцах слюны. Для планктонных бактерий Chitlac-nAg показал ингибирующий и бактерицидный эффекты в отношении всех штаммов стрептококков на 0,1% (v/v), кроме *S. mitis* ATCC 6249, для которого ингибирующая концентрация была на порядок меньше. Для сформированных биоплёнок Chitlac-nAg, в концентрации 0,2%, ингибировал рост как в супернатантной фазе, так и зрелые биоплёнки. Для штаммов *S. mitis* ATCC 6249 – ингибирующая биоплёнки концентрация Chitlac-nAg составила 0,1%. Субингибирующая концентрация адгезивной способности для штаммов стрептококков на полистироловой поверхности имела дозозависимый механизм, характерный для метаболически активных биоплёнок. Согласно этим результатам, Chitlac-nAg представляется перспективным антибактериальным и антибиоплёночным агентом.

Целью исследования [17] была оценка антибактериальной эффективности *наночастиц серебра* на физиологическом растворе, при орошении в форме геля – против биоплёнок *Enterococcus faecalis*, формирующихся на корневом dentине. Орошение 0,1% раствором AgNPs не вызывало разрушения их структуры и доля жизнеспособных бактерий в биоплёнке не отличалась от таковой, обработанной стерильным солевым раствором ($p > 0,5$), но было меньше чем в группе контроля. В биоплёнках, обработанных 0,02% гелем *наночастиц серебра*, как лекарственного средства, нарушалась целостность структуры, в результате чего после лечения количество жизнеспособных клеток было меньше, чем при обработке 0,01% гелем и раствором гипохлорита ($p < 0,5$). Результат антибиоплёночной эффективности *наночастиц серебра* зависит от режима их применения. Положительное воздействие AgNPs оказалось выше при использовании в виде геля.

Показана высокая антибактериальная активность *наночастиц серебра* против полирезистентных, биопленкообразующих, коагулазонегативных штаммов *S. epidermidis*, *S. aureus*, *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi*. Особенно выраженная активность была против штаммов *S. Epidermidis*, определена также выраженная синергетическая активность *наночастиц серебра* и хлорамфеникола в отношении культур *Salmonella*

typhi [18]. Кроме исследования антибактериальной активности AgNPs *in vitro*, также проводились эксперименты по изучению бионакопления *наночастиц серебра* в тканях животных.

В работах [19, 20] методом нейтронно-активационного анализа показано, что наибольшее накопление *наночастиц серебра* выявлено в печени, крови, селезенке, гонадах, почках, головном мозгу и сердце (данные приведены в порядке убывания).

Цель исследования – изучение антибактериальной активности *наночастиц серебра* на модели перитонита, где есть возможность создания модели с биопленкообразованием в открытой биологической нише, и менингоэнцефалита (закрытая биологическая ниша, при моноинфекции отсутствует эффект биопленкообразования), при пероральном введении препарата лабораторным животным.

Объекты и методы исследования. Осуществлено исследование антибактериальной активности *наночастиц серебра*. У лабораторных животных было смоделировано экспериментальное воспаление путём внутрибрюшинного и внутримозгового введения 0,5 мл суспензии стафилококка, содержащей 12×10^8 /мл (4 по шкале McF) микробных тел. Режим применения *наночастиц серебра* был следующий: перед заражением животные получали серебро в профилактической дозе 5 суток по 0,2 мг/сутки. Итого – 1 мг AgNPs на животное. Лечебная стадия после заражения животного составляла по 0,3 мг в сутки на животное. Итого – 1,5 мг в сутки на животное. Исследование проводилось на 8 самцах беспородных крыс исходной массой 100-120 г.

Дизайн эксперимента включал следующие группы животных:

– группа 1 (2 крысы): контрольная, смоделирован перитонит, животные получали питьевую воду;

– группа 2 (2 крысы): контрольная, смоделирован менингоэнцефалит, получали питьевую воду;

– группа 3 (2 крысы): экспериментальная, смоделирован перитонит, получали *наночастицы серебра* с питьевой водой;

– группа 4 (2 крысы): экспериментальная, смоделирован менингоэнцефалит, получали *наночастицы серебра* с питьевой водой.

На протяжении всего периода эксперимента у животных фиксировали изменение внешнего вида и поведение. По окончании эксперимента животных подвергали глубокой эфирной анестезии и обескровливали из нижней полой вены. Брюшную полость в асептических условиях вскрывали, отбирали пробу брюшины и помещали в ёмкость с 40% раствором формалина для фиксации и транспортировки. Череп вскрывали по сагиттальному шву, извлечённый мозг также помещали в ёмкость с формалином. Из полученных образцов изготавливали гистологические препараты, которые затем подвергали микроскопии.

Результаты и их обсуждение. Во время подготовительного этапа эксперимента (введение AgNPs с профилактической целью) отличий в поведении и внешнем виде животных не зарегистрировано. После моделирования менингоэнцефалита и перитонита животные всех групп были угнетены. У животных с менингоэнцефалитом отмечались тонико-клонические судороги конечностей.

При изучении гистологических препаратов с моделью менингоэнцефалита не отмечено значимых различий между группами. При микроскопии ткани мозга видны множественные бактериальные тромбозы различной локализации (рис. 1, 2).

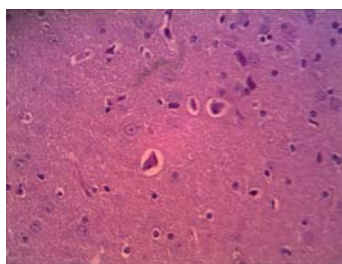


Рис. 1. Микропрепарат участка мозговой ткани животного контрольной группы, внутри сосудов видны бактериальные тромбозы (x600)

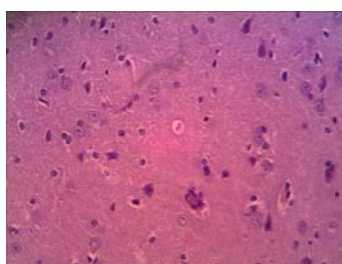


Рис. 2. Микропрепарат участка мозговой ткани животного экспериментальной группы, внутри сосудов видны бактериальные тромбозы (x600)

Исследование влияния *наночастиц серебра* при экспериментальном перитоните, показало (рис. 3), что в контрольной группе определяется локальный инфильтрат под брюшиной.

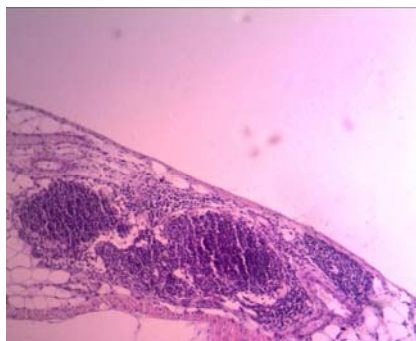


Рис. 3. Микропрепарат брюшины животного контрольной группы, под брюшиной локализуется инфильтрат (x600)

В экспериментальной группе – отсутствует инфильтрация и другие воспалительные изменения, то есть брюшина в воспалительный процесс – не вовлечена (рис. 4).

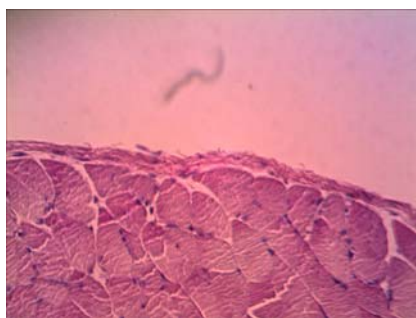


Рис. 4. Микропрепарат брюшины животного экспериментальной группы, видна интактная брюшина без признаков воспалительной инфильтрации (x600)

Заключение. В ходе эксперимента показана эффективность наночастиц серебра на экспериментальной модели перитонита и отсутствие такового (при применявшихся дозировках) при менингоэнцефалите. Этот результат объясняется неравномерностью биоаккумуляции наночастиц в организме (преимущественно в органах брюшной полости) и соответствующей разницей антибактериального эффекта, а также затруднением проникновения *наночастиц серебра* через гематоэнцефалический барьер, что, вероятно, требует увеличения дозы введения в эксперименте.

Литература

1. Голуб А.В. Бактериальные биопленки – новая цель терапии? // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2012. Т. 14. № 1. С. 23–29.
2. Хренов П.А., Честнова Т.В. Обзор методов борьбы с микробными биопленками при воспалительных заболеваниях // Вестник новых медицинских технологий (Электронный журнал). 2013. № 1. URL: <http://www.medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2013-1/4102.pdf>.
3. Xiao Y, Wu Z, Wong KY, Liu Z. Harpin DNA probes based on target-induced in situ generation of luminescent silver nanoclusters // Chem Commun (Camb). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24686790>.
4. Santoro CM, Duchsherer NL, Grainger DW. Antimicrobial efficacy and ocular cell toxicity from silver nanoparticles // Nanobiotechnology. 2007. 3(2). P. 55–65.
5. Sondi I, Salopek-Sondi B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on E. coli as a model for Gram-negative bacteria // J Colloid Interface Sci. 2004. 275(1). P. 177–182.
6. Markowska K., Grudniak A.M., Wolska K.I. Silver nanoparticles as an alternative strategy against bacterial biofilms // Acta Biochim Pol. 2013. 60(4). P. 523–530.
7. Besinis A., DePeralta T., Handy R.D. Inhibition of biofilm formation and antibacterial properties of silver nano-coating on humandentine // Nanotoxicology. 2014. 8(7). P. 745–754.
8. Kris N.J Stevens, Sander Croes, Rinske S. Boersma et al. Hydrophilic surface coatings with embedded biocidal silver nanoparticles and sodium heparin for central venous catheters // Biomaterials. 2011. Vol. 32. P. 1264–1269.

9. Markowska K, Grudniak A.M., Wolska K.I. Silver nanoparticles as an alternative strategy against bacterial biofilms.
10. Masadeh M.M., Karasneh G.A., Al-Akhras M.A., Albiss B.A., Aljarah K.M., Al-Azzam S.I., Alzoubi K.H. Cerium oxide and iron oxide nanoparticles abolish the antibacterial activity of ciprofloxacin against gram positive and gram negative biofilm bacteria // *Cytotechnology*. 2014. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24643389>.
11. Markowska K., Grudniak A.M., Krawczyk K., Wróbel I., Wolska K.I. Modulation of antibiotic resistance and induction of a stress response in *Pseudomonas aeruginosa* by silver nanoparticles // *J Med Microbiol*. 2014. doi: 10.1099/ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24623636>.
12. Gao L., Giglio K.M., Nelson J.L., Sondermann H., Travis A.J. Ferromagnetic nanoparticles with peroxidase-like activity enhance the cleavage of biological macromolecules for biofilm elimination// *Nanoscale*. 2014;6(5): <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24468900>.
13. Palanisamy N.K., Ferina N., Amirulhusni A.N., Mohd-Zain Z., Hussaini J., Ping L.J., Durairaj R. Antibiofilm properties of chemically synthesized silver nanoparticles found against *Pseudomonas aeruginosa* // *J Nanobiotechnology*. 2014;12:2.
14. Monteiro D.R., Negri M., Silva S., Gorup L.F., de Camargo E.R., Oliveira R., Barbosa D.B., Henriques M. Adhesion of *Candida* biofilm cells to human epithelial cells and polystyrene after treatment with silver nanoparticles // *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2014;114:410-2.
15. Li-Ping Tseng, Chih-Yin Juan, Shiun-Long Lin, Michael R Doran, Jiang-Jen Lin, Shan-hui Hsu, Jiunn-Wang Liao, Ching-I Shen & Hong-Lin Su. Nanohybrids of silver particles on clay platelets delaminate *Pseudomonas* biofilms // *Nanomedicine*, Vol. 0, No. 0, Pages 1-14.
16. Mara Di Giulio, Soraya Di Bartolomeo, Emanuela Di Campi, Silvia Sancilio, Eleonora Marsich, Andrea Travan, Amelia Cataldi and Luigina Cellini. The Effect of a Silver Nanoparticle Polysaccharide System on Streptococcal and Saliva-Derived Biofilms *Int. J. Mol. Sci.* 2013, 14(7), 13615-13625.
17. Wu D, Fan W, Kishen A, Gutmann JL, Fan B. Evaluation of the antibacterial efficacy of silver nanoparticles against *Enterococcus faecalis* biofilm // *J Endod.* 2014;40(2):285-90.
18. Thomas R, Nair AP, Kr S, Mathew J, Ek R. Antibacterial Activity and Synergistic Effect of Biosynthesized AgNPs with Antibiotics Against Multidrug-Resistant Biofilm-Forming Coagulase-Negative Staphylococci Isolated from Clinical Samples. // *Appl Biochem Biotechnol*. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24699812>.
19. Бузулуков Ю.П., Арианова Е.А., Демин В.Ф. и др. Изучение биоаккумуляции наночастиц серебра и золота в органах и тканях крыс методом нейтронно-активационного анализа // *Известия РАН. Серия биологическая*. 2014. № 3. С. 1–10.
20. Гмошинский И.В., Хотимченко С.А., Попов В.О. Наноматериалы и нанотехнологии: методы анализа и контроля // *Успехи химии*. 2013. Т. 82. № 1. С. 48–76.

References

1. Golub AV. Bakterial'nye bioplenki – novaya tsel' terapii? *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya*. 2012;14(1):23-9. Russian.
2. Khrenov PA, Chestnova TV. Obzor metodov bor'by s mikrobnymi bioplenkami pri vospalitel'nykh zabolovaniyakh [The microbial biofilms at the inflammatory diseases: general information and methods of struggle against them]. *Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologiy (Elektronnyy zhurnal)* [Internet]. 2013 [cited 2013 Feb 1];1:1:[about 4 p.]. Russian. Available from: <http://www.medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2013-1/4102.pdf>
3. Xiao Y, Wu Z, Wong KY, Liu Z. Harpin DNA probes based on target-induced in situ generation of luminescent silver nanoclusters // *Chem Commun (Camb)*. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24686790>
4. Santoro CM, Duchsherer NL, Grainger DW. Antimicrobial efficacy and ocular cell toxicity from silver nanoparticles. *Nanobiotechnology*. 2007;3(2):55-65.
5. Sondi I, Salopek-Sondi B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *J Colloid Interface Sci*. 2004;275(1):177-182.
6. Markowska K, Grudniak AM, Wolska KI. Silver nanoparticles as an alternative strategy against bacterial biofilms. *Acta Biochim Pol*. 2013;60(4):523-30.
7. Besinis A, DePeralta T, Handy RD. Inhibition of biofilm formation and antibacterial properties of silver-nano-coating on human dentine. *Nanotoxicology*. 2014;8(7):745-54.
8. Kris NJ, Stevens S, Sander Croes, Rinske S, Boersma et al. Hydrophilic surface coatings with embedded biocidal silver nanoparticles and sodium heparin for central venous catheters. *Biomaterials*. 2011;32:1264-9.
9. Markowska K, Grudniak AM, Wolska KI. Silver nanoparticles as an alternative strategy against bacterial biofilms.
10. Masadeh MM, Karasneh GA, Al-Akhras MA, Albiss BA, Aljarah KM, Al-Azzam SI, Alzoubi KH. Cerium oxide and iron oxide nanoparticles abolish the antibacterial activity of ciprofloxacin against gram positive and gram negative biofilm bacteria. *Cytotechnology*. 2014. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24643389>.

11. Markowska K, Grudniak AM, Krawczyk K, Wróbel I, Wolska KI. Modulation of antibiotic resistance and induction of a stress response in *Pseudomonas aeruginosa* by silver nanoparticles. *J Med Microbiol*. 2014. doi: 10.1099/ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24623636>.

12. Gao L, Giglio KM, Nelson JL, Sondermann H, Travis AJ. Ferromagnetic nanoparticles with peroxidase-like activity enhance the cleavage of biological macromolecules for biofilm elimination. *Nanoscale*. 2014;6(5): <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24468900>.

13. Palanisamy NK, Ferina N, Amirulhusni AN, Mohd-Zain Z, Hussaini J, Ping LJ, Durairaj R. Antibiofilm properties of chemically synthesized silver nanoparticles found against *Pseudomonas aeruginosa*. *J Nanobiotechnology*. 2014;12:2.

14. Monteiro DR, Negri M, Silva S, Gorup LF, de Camargo ER, Oliveira R, Barbosa DB, Henriques M. Adhesion of *Candida* biofilm cells to human epithelial cells and polystyrene after treatment with silver nanoparticles. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2014;114:410-2.

15. Li-Ping Tseng, Chih-Yin Juan, Shiun-Long Lin, Michael R Doran, Jiang-Jen Lin, Shan-hui Hsu, Jiunn-Wang Liao, Ching-I Shen & Hong-Lin Su. Nanohybrids of silver particles on clay platelets delaminate *Pseudomonas* biofilms. *Nanomedicine*;0(0):1-14.

16. Mara Di Giulio, Soraya Di Bartolomeo, Emanuela Di Campli, Silvia Sancilio, Eleonora Marsich, Andrea Travan, Amelia Cataldi and Luigina Cellini. The Effect of a Silver Nanoparticle Polysaccharide System on Streptococcal and Saliva-Derived Biofilms. *Int. J. Mol. Sci.* 2013, 14(7), 13615-13625.

17. Wu D, Fan W, Kishen A, Gutmann JL, Fan B. Evaluation of the antibacterial efficacy of silver nanoparticles against *Enterococcus faecalis* biofilm. *J Endod.* 2014;40(2):285-90.

18. Thomas R, Nair AP, Kr S, Mathew J, Ek R. Antibacterial Activity and Synergistic Effect of Biosynthesized AgNPs with Antibiotics Against Multidrug-Resistant Biofilm-Forming Coagulase-Negative Staphylococci Isolated from Clinical Samples. *Appl Biochem Biotechnol*. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24699812>.

19. Buzulukov YuP, Arianova EA, Demin VF i dr. Izuchenie bionakopleniya nanochastits serebra i zo-lota v organakh i tkanyakh krys metodom neytronno-aktivatsionnogo analiza. *Izvestiya ran. Seriya biologicheskaya*. 2014;3:1-10. Russian.

20. Gmoshinskiy IV, Khotimchenko SA, Popov VO. Nanomaterialy i nanotekhnologii: metody analiza i kontrolya. *Uspekhi khimii*. 2013;82(1):48-76. Russian.