

© Сырма Е.И., Скобеева В.М., Ульянов В.А.

УДК: 535.343: 612.017.4

Сырма Е.И.,¹ Скобеева В.М.,² Ульянов В.А.¹

¹Одесский национальный медицинский университет (пер. Валиховский, 2 г.Одесса, 65001, Украина); ²НИИ физики Одесского национального университета им. И.И.Мечникова (ул. Дворянская, 2, г.Одесса, 65000, Украина)

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДЕРМЫ КОЖИ ПРИ ВВЕДЕНИИ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА

Резюме. Исследование влияния наночастиц серебра на кожу является актуальным и практически значимым. Целью работы являлось исследовать морфофункциональные изменения дермы кожи, которые возникают при внутрикожном введении наночастиц серебра. Использовались наночастицы серебра сферической формы размером 30 нм, синтезированные цитратным методом. Эксперимент проводился на 140 крысах линии Вистар. После подкожного введения 0,01 мл раствора наночастиц серебра эффект оценивался на 1, 3, 7, 14, 21, 30, 45 сутки. Использовались стандартные гистологические методики. Показано, что при введении наночастиц серебра в кожу наблюдается изменение соотношения клеточных элементов дермы и соотношения различных по степени зрелости клеток фибробластического дифферона. Наиболее лабильными являются популяции макрофагов и фибробластов. Максимальное нарастание междифферонной и внутридифферонной гетероморфии наблюдается на 14 сутки.

Ключевые слова: наночастицы серебра, дерма кожи, морфометрия.

Введение

Активное развитие методов получения стойких наночастиц металлов раскрывает широкие перспективы их применения в промышленности, медицине. Исходя из литературных данных, можно сделать вывод, что наиболее актуальным и практически значимым является исследование влияния наночастиц серебра (НЧ Ag) на организм [Чекман та ін., 2010]. НЧ Ag является одним из наиболее последовательно изученных НЧ в вопросах токсичности. Это связано с тем, что НЧ серебра обладают доказанным антимикробным эффектом [Martinez-Gutierrez et al., 2012], который используются в настоящее время во многих продуктах, начиная от перевязочных материалов и заканчивая одеждой. Кожа является самым большим органом тела и выполняет функцию первой линии барьера между внешней средой и внутренними органами человеческого тела. Следовательно, наружно применяемые НЧ потенциально могут проникать в кожу и оказывать как местные, так и системные эффекты, попадая в общий кровоток. При этом следует отметить, что работ, описывающих морфофункциональные изменения, происходящие в тканях кожи недостаточно, а имеющиеся трудно сравнимы, т.к. эффекты НЧ сильно зависят от размера, поверхностного заряда, особенностей покрытия и рельефа поверхности. Имеющиеся литературные данные носят противоречивые сведения. С одной стороны, под влиянием AgНЧ усиливается клеточная пролиферация и ангиогенез, что приводит к повышению функциональной активности фибробластов и неоколлагеногенезу [Tian et al., 2007; Kwan et al., 2011; Gunasekaran et al., 2012], а с другой стороны есть данные про токсическое влияние на фибробласты *in vitro* [Samberg et al., 2010; Martinez-Gutierrez et al., 2012].

Цель нашей работы: изучить морфофункциональные изменения дермы кожи крыс при введении НЧ серебра 30нм.

Материалы и методы

1. Модель эксперимента

Экспериментальные исследования проведены на 140 интактных крысах линии Вистар обоих полов весом 0,18-0,24кг. Животные содержались в стандартных условиях вивария Одесского национального медицинского университета согласно научно-практическими рекомендациями по содержанию лабораторных животных и работе с ними. Животные были разделены на 4 группы: интактная группа; животные, которым вводили Ag НЧ 30 нм; группа животных, которым вводили 2% коллоидный р-р серебра; и группа животных, которым вводили физраствор. Введение физраствора в количестве 0,01 мл осуществляли в область холки животного строго подкожно на глубину 120 мкм с помощью инсулинового шприца. После введения эффект оценивали на 1, 3, 7, 14, 21, 30 и 45 сутки. Животных выводили из эксперимента путем передозировки эфирного наркоза. Эксперимент проводили строго с соблюдением норм Закона Украины "О защите животных от жестокого обращения", а также согласно общих этических принципов экспериментов на животных и Этическим кодексом ученого Украины.

2. Получение и характеристика Ag НЧ

В данной работе для получения НЧ Ag, был применен цитратный метод. Синтез НЧ Ag проводили при следующих технологических параметрах:

- эквимольные концентрации AgNO_3 и $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$: $5 \times 10^{-4}\text{M}$;
- отношение концентраций $(\text{AgNO}_3)/(\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7) = 1:4$;
- температура синтеза - 100°C ;
- время синтеза, мин: 60.

При используемых нами параметрах синтеза с применением цитрата натрия были получены наночастицы серебра сферической формы.

Для определения среднего размера наночастиц серебра нами применялся метод лазерной корреляцион-

ной спектроскопии, известный в литературе, как метод динамического рассеяния света [Гоцульский и др., 1997].

В нашем случае расчет размера наночастиц методом ЛКС был произведен путем сравнения корреляционных функций рассеяния коллоидного раствора, содержащего наночастицы серебра и раствора с эталонным объектом, которым являлась сильно разбавленная водная взвесь латекса. Диаметр частиц латекса, согласно паспортным данным, был равен $\varnothing = 0.06$ мкм (погрешность 5%). В этом случае размер оптических неоднородностей, вызванных наличием рассеивающих объектов, определяли по формуле:

$$d_i = d_{\text{латекс}} \frac{\tau_i}{\tau_{\text{латекс}}},$$

где $d_{\text{латекс}}$, d_i - диаметры частицы латекса и исследуемой наночастицы, и $\tau_{\text{латекс}}$, τ_i - характерные времена рассеяния монохроматического света, полученные на образце сравнения (латекс) и на исследуемых наночастицах серебра, равные, соответственно, 180 мксек и 90 мксек.

Исходя из этих данных, размер наночастиц серебра равен 30 нм, что согласуется с данными, полученными другими методами (оптическое поглощение, электронно-микроскопический). НЧ серебра синтезированы на базе НИИ физики ОНУ им.И.И.Мечникова.

3. Методики

Для морфологических исследований забирали кожу спины. Материал фиксировали в 10% нейтральном формалине и заливали гистамиксом (Биовитрум Россия) согласно общепринятой гистологической методики, готовили постоянные гистологические препараты. Срезы толщиной 5-7 мкм окрашивали гематоксилином, эозином, по ван Гизон, резорцином-фуксином, толuidиновым синим, по Фельгену, по Браше [Саркисов, Перов, 1996].

Постоянные гистологические препараты исследовали методом световой микроскопии на микроскопе "Zeiss", "AxioStar plus", оборудованном системой видеонализа изображений. Морфометрические исследования полученных изображений выполняли с использо-

ванием программы "ВидеоТест - Мастер Морфология" (ВидеоТест, Россия). Полученные изображения и цифровые данные хранили в архиве, созданном с помощью программного обеспечения "ВидеоТест Альбом".

Статистическую обработку результатов проводили с помощью компьютерной программы "STATISTIKA 6.0". Для математической обработки данных использовали дисперсионный анализ. В случае, если нулевая гипотеза отклонялась, для дальнейшего анализа использовали критерий Ньюмана-Кейлса. Исследования проводили на базе кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии ОНМедУ.

Результаты. Обсуждение

Клетки дермы представлены преимущественно фибробластами, макрофагами, тканевыми базофилами и представителями некоторых других клеточных дифферонов. Ведущим клеточным диффероном соединительной ткани является фибробластический и составляет 78-81% клеточного состава. Внутри фибробластического дифферона различают фибробласты и фиброциты, процентное соотношение фиброцитов в коже крысы до 6-7%. Тканевые базофилы располагаются преимущественно вокруг сосудов и составляют 4% клеток. Макрофаги составляют 8-9% клеток. Гранулоциты, плазматические клетки также являются частью многодифферонной соединительной ткани кожи крыс, однако они малочисленны и в норме составляют около 1% клеточного состава.

В результате внутрикожного введения наночастиц серебра размером 30 нм наблюдается клеточная инфильтрация в месте введения. В очаге размером 251,5±3,5 мкм нарастает междифферонная и внутридифферонная гетероморфия.

Первыми на введение реагируют тучные клетки, их количество увеличивается почти вдвое и они находятся в стадии дегрануляции. Под влиянием секреторных продуктов тканевых базофилов повышается проницаемость кровеносных сосудов, происходит гетерокинез клеток крови. На 3 сутки междифферонная гетероморфия нарастает за счет макрофагов. При этом

Таблица 1. Клеточный состав дермы кожи крыс при введении НЧ Ag 30нм ($M \pm m$, $n=6$, %).

Сутки опыта	Фибробласты	Фиброциты	Тканевые базофилы	Макрофаги	Гранулоциты	Лимфоциты
Интактные	75,0±2,7	7,9±0,8	4,4±0,5	9,4± 0,6	1,7±0,7	1,6±0,3
1	60,4±3,8*	7,5±0,8	9,9±0,04#	13,9±0,3*	4,7±,4*	1,8 ±0,5
3	62,4±7,8**	5,9±0,8**	8,9±0,07**	35,3 ±4,6**	3,6±2,9**	2,2±0,5
7	66,9 ±5,4**	5,1±0,8**	5,6 ±0,16**	25,4 ±6,6**	3,2±4,1**	1,9±0,5
14	72,9±9,3**	4,7±0,8**	4,5 ±0,03*	19,1 ±6,3**	0,8±0,03**	2,3±0,07#
21	79,81±8,5**	4,5±0,8#	1,5±0,2**	15,6 ±5,9**	0,1±0,06#	3,0±0,5**
30	82,6±7,4**	4,9 0,8#	0,8 ±0,1**	12,1 ±0,6**	0,3±0,07#	1,5±0,7*
45	79,4±8,6**	5,8±0,8**	2,1± 0,2**	8,2± 0,6	0,5±0,04#	0,3 ±0,5**

Примечание: * - $p < 0,05$ по сравнению с предыдущим сроком наблюдения; # - $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой.

Таблиця 2. Распределение клеток фибробластического дифферона по степени зрелости при введении НЧ Ag 30нм ($M \pm m$, $n=6,0\%$).

Срок эксперимента	Малодифференцированные	Дифференцированные	Зрелые фибробласты
Интактные	5,7±0,3	9,8±0,7	85,3±0,5
1	6,3±0,4	10,1±0,6	84,5±0,7
3	11,2±0,5**	21,1±0,7**	70,4±0,6**
7	17,9±0,6**	32,6±0,2**	56,2±0,9**
14	15,4±1,1**	40,6±0,9**	49,5±0,1**
21	14,3±0,1**	39,5±0,7**	55,5±0,3**
30	12,3±0,8**	19,6±0,5**	73,3±0,2**
45	8,2±0,6**	10,7±0,2**	80,4±0,5**

Примечание: * - $p < 0,05$ по сравнению с предыдущим сроком наблюдения; # - $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой.

следует отметить, что количество гранулоцитов и лимфоцитов изменяется незначительно. На 7 сутки в месте введения начинает формироваться "грануляционная ткань", снижается количество клеток гематогенного происхождения и увеличивается количество фибробластов. Восстановление соотношения клеточных элементов дермы происходит на 45 сутки (табл. 1).

Следует отметить, что изменение соотношения клеток дермы происходит лишь в очаге введения, в интактных зонах незначительные изменения были статистически недостоверными.

Кроме междифферонной гетероморфии под влиянием наночастиц серебра нарастает и внутридифферонная гетероморфия фибробластов. В зависимости от степени зрелости и функциональной активности различают 3 вида фибробластов: малодифференцированные, дифференцирующиеся и зрелые. Наиболее достоверным морфометрическим дифференциальным признаком является ЯЦИ [Алексеева и др., 2012], который снижается по мере дифференцировки, так малодифференцированные фибробласты характеризуются ЯЦИ равным $1,81 \pm 0,16$, дифференцированные - $1,23 \pm 0,08$, а для зрелых фибробластов характерен более низкий ЯЦИ - $0,42 \pm 0,06$, ЯЦИ фиброцитов - $3,8 \pm 0,4$. В нормальной коже наиболее численными являются зрелые фибробласты - 75-80%. При введении НЧ Ag 30 нм отмечается увеличение содержания малодифференцированных и дифференцированных фибробластов, максимальное количество которых отмечается на 14 сутки при формировании "грануляционной ткани" (табл. 2).

Анализируя результаты исследования можно сделать вывод, что под влиянием наночастиц серебра диаметром 30 нм происходит изменение процентного соотношения клеток дермы. Наиболее лабильными

Список литературы

Алексеева Н.Т. Роль клеток фибробластического дифферона в процессе за-

живления ран /Н.Т.Алексеева, А.А.Глухов, А.П.Остроушко //Вестник эк-

сперим. и клин. хирургии.- 2012.- №3.- С.601-607.

являются популяции макрофагов и фибробластов. Изменение количества тучных клеток происходит в первые сутки, когда они активно дегранулируют медиаторы воспаления, а затем происходит их истощение и уменьшение их количества. Такая реакция тучных клеток является закономерной и возникает в ответ на альтерацию. При этом следует отметить практически полное отсутствие реакции со стороны гранулоцитов и лимфоцитов, что подтверждает неиммунный характер воспаления. Что касается макрофагальной реакции, то по сравнению с течением типичного воспалительного процесса в коже крыс, под влиянием НЧ Ag 30 нм она длится дольше, но проявляется менее интенсивно. Нарастание междифферонной гетероморфии фибробластов также требует анализа. В нашем исследовании при анализе гетерогенности популяции фибробластов использовался ЯЦИ, как достоверный морфометрический дифференциальный признак. В результате, под влиянием НЧ Ag 30 нм изменялось соотношение различных по степени зрелости фибробластов в сторону увеличения незрелых форм.

Как известно, популяция фибробластов гетерогенна. Среди фибробластов выделяют две популяции: короткоживущие и долгоживущие. Короткоживущая популяция характеризуется высоким уровнем обновления клеток. Эти клетки активно участвуют в новообразовании соединительной ткани при заживлении ран. Долгоживущие клетки осуществляют преимущественно опорную (механическую) функцию. К тому же, фибробласты экспрессируют различные CD-маркеры: CD34 и CD49 [Алексеева и др., 2012], что подтверждает неоднородность популяции и, возможно, различные источники их развития. Учитывая выше сказанное, возможным механизмом воздействия НЧ Ag 30 нм является стимуляция пролиферации короткоживущих фибробластов.

Выводы и перспективы дальнейших разработок

1. При внутрикожном введении наночастиц серебра размером 30 нм отмечается изменение соотношения клеточных элементов дермы и соотношения различных, по степени зрелости, клеток фибробластического дифферона.

2. Наиболее лабильными являются популяции макрофагов и фибробластов. Максимальное нарастание междифферонной и внутридифферонной гетероморфии наблюдается на 14 сутки.

Уточнение механизмов влияния наночастиц серебра размером 30нм на гетерогенность популяции фибробластов требует дальнейшего иммуногистохимического исследования.

- Гоцульский В.Я. Коррелометр для случайных импульсных сигналов / В.Я.Гоцульский, В.Е.Чечко, В.Г.Заремба // ПТЭ.- 1997.- №2.- С.161-162.
- Саркисов Д.С. Микроскопическая техника / Д.С.Саркисов, Ю.Л.Перова.- М.: Медицина, 1996.- 362с.
- Наночастинки: впровадження у медичну практику / І.С.Чекман, Н.О.Горчакова, О.О.Нагорна [та ін.] // Вісник фармакол. та фармації.- 2010.- №10.- С.2-11.
- Antibacterial activity, inflammatory response, coagulation and cytotoxicity effects of silver nanoparticles / F.Martinez-Gutierrez, E.P.Thi, J.M.Silverman [et al.] // Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine.- 2012.- №8.- P.328-336.
- Gunasekaran T. Silver Nanoparticles as Real Topical Bullets for Wound Healing / T.Gunasekaran, T.Nigusse, M.Dasaratha Dhanaraju // J. of the American College of Clinical Wound Specialists.- 2012.- №3.- P.82-96.
- Modulation of collagen alignment by silver nanoparticles results in better mechanical properties in wound healing / K.H.L.Kwan, X.Liu, M.K.To [et al.] // Nanomedicine: Nanotechnol., Biol., and Med.- 2011.- №7.- P.497-504.
- Samberg M.E. Evaluation of silver nanoparticle toxicity in skin in vivo and keratinocytes in vitro / M.E.Samberg, N.A.Oldenburger, S.J.Monteiro-Riviere / Environ. Health Perspect.- 2010.- №118.- P.407-413.
- Topical delivery of silver nanoparticles promotes wound healing / J.Tian, K.K.Wong, C.M.Ho [et al.] // Chem. Med. Chem.- 2007.- №2.- P.129-136.

Сирма О.І., Скобеєва В.М., Ульянов В.О.

МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА ДЕРМИ ШКІРИ ПРИ ВВЕДЕННІ НАНОЧАСТИНОК СРІБЛА

Резюме. Дослідження впливу наночастинок срібла на шкіру є актуальним і практично значимим. Метою роботи було дослідити морфофункціональні зміни дерми шкіри, які виникають при внутрішньошкірньому введенні наночастинок срібла. Використовували наночастинки срібла сферичної форми розміром 30 нм, синтезовані цитратним методом. Експеримент проводили на 140 щурах лінії Вістар. Після підшкірного введення 0,01 мл розчину наночастинок срібла ефект оцінювали на 1, 3, 7, 14, 21, 30, 45 добу. Використовували стандартні гістологічні методики. Показано, що при введенні наночастинок срібла в шкірі спостерігається зміна співвідношення клітинних елементів дерми і співвідношення різних за ступенем зрілості клітин фібробластичного дифферона. Найбільш лабільними є популяції макрофагів і фіброblastів. Максимальна наростання міждифферонної і внутрішньодифферонної гетероморфії спостерігається на 14 добу.

Ключові слова: наночастинки срібла, дерма шкіри, морфометрія.

Syrma O.I., Skobeyeva V.M., Ulyanov V.A.

MORPHOFUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF DERMIS AFTER ADMINISTRATION OF SILVER NANOPARTICLES

Summary. Investigation of the influence of silver nanoparticles on the skin is relevant and practically significant. The goal of the work was to investigate the morphological changes of the dermis of the skin that occur when intradermal administration of silver nanoparticles. Spherical silver nanoparticles 30 nm were used. The experiment was carried out on 140 Wistar rats. After subcutaneous administration of 0.01 ml solution of silver nanoparticles effect were assessed on 1st, 3rd, 7th, 14th, 21st, 30th, 45th days. The standard histological techniques were used. It is shown that the introduction of silver nanoparticles in the skin, leads to a change in the ratio of the cellular elements of the dermis and the ratio of the different degree of maturity of fibroblasts. The most labile populations are macrophages and fibroblasts. The maximum rise of heteromorfia is observed on the 14th day.

Key words: silver nanoparticles, the dermis of the skin, morphometry.

Стаття надійшла до редакції 21 травня 2014 р.

Сирма Елена Ивановна - аспирант кафедри гістології, цитології і ембріології Одеського національного медичного університета; +38 048 731-70-59; lenasyrma@mail.ru

Скобеєва Валентина Михайлівна - к. физ.-мат. н., доцент, старший научный сотрудник НИИ физики ОНУ им. И.И.Мечникова; v_skobeyeva@ukr.net

Ульянов Вадим Олександрович - д. мед. н., проф., кафедри гістології, цитології і ембріології Одеського національного медичного університета; +38 048 731-70-59; e-mail: ulvad@mail.ru

© Булько М.П.

УДК: 616.341:616.428:611.428:611.428-089

Булько М.П.

Вінницький національний медичний університет імені М.І.Пирогова, кафедра оперативної хірургії та топографічної анатомії (вул. Пирогова, 56, м.Вінниця, 21018, Україна)

КЛІТИННИЙ СКЛАД ЛІМФОЇДНИХ ВУЗЛИКІВ ТОНКОЇ КИШКИ ПРИ ХІРУРГІЧНОМУ ЛІКУВАННІ ТА ЕНТЕРОДЕТОКСИКАЦІЇ ВИСОКОЇ ГОСТРОЇ ОБТУРАЦІЙНОЇ КИШКОВОЇ НЕПРОХІДНОСТІ

Резюме. Визначені структурні зміни лімфатичних вузликів тонкої кишки при хірургічному лікуванні високої гострої тонкої кишкової непрохідності в умовах ентеродетоксикації сорбентом Силлард П. При застосуванні сорбенту в лімфатичних вузликах тонкої кишки збільшується процентний вміст лімфоblastів і великих лімфоцитів (у 1,5 рази), малих лімфоцитів (у 1,5 рази), плазмоцитів (у 4 рази) і клітин, що діляться (у 2,3 рази), а показник об'ємної частки зруйнованих клітин знижується, особливо у периферичній частині (в 3,8 рази). Оперативне втручання без ентеросорбції викликає пригнічення імунної системи, зумовлює подальшу прогресію ендотоксикозу та наростання поліорганних дисфункцій.

Ключові слова: кишкова непрохідність, ентеродетоксикація, імунна система, лімфоїдні вузлики тонкої кишки.