

РАЗМЕРОЗАВИСИМЫЕ МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ КОЖИ КРЫС ПРИ ВВЕДЕНИИ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА

Одесский национальный медицинский университет (г. Одесса)

*НИИ физики Одесского национального университета им. Мечникова (г. Одесса)

Данная работа является фрагментом НИР «Морфогенез епітелиальної та сполучної тканини за фізіологічних та патологічних умов», № гос. регистрации 0109U008570.

Вступление. Уникальные физические, механические, химические, оптические, термические, биологические свойства наночастиц связаны с увеличением площади поверхности на единицу объема или массы, что обуславливает избыточную свободную поверхностную энергию. Размер частиц, как известно, является важным фактором, определяющим количество реакционноспособных групп на поверхности частицы. Именно этим фактом и объясняется размерозависимые эффекты НЧ, т. е. комплекс явлений, связанных с существенным изменением физико-химических и биологических свойств вещества, зависящие от размера частицы, причем эти изменения нелинейны по характеру [5].

Повышенный интерес медиков к наночастицам серебра обусловлен широким спектром противомикробного действия, отсутствием устойчивости у большинства патогенных микроорганизмов, а также хорошей переносимостью. Это подтверждается растущим количеством научных работ, описывающих биологические эффекты наночастиц серебра [7,9]. В большинстве этих исследований, однако, было немного доказательств, свидетельствующих о зависимости биологического эффекта от размера наночастиц серебра. Несколько работ, посвященных сравнению биологического эффекта различных по размеру наночастиц серебра, проводились *in vitro* на культурах клеток [8,10], при этом морфологических исследований *in vivo* не проводились. Кроме того, зависимость между размером частиц и биологической реакцией может облегчить понимание влияния поверхностных свойств частиц на биосовместимость.

Целью данной работы явилось изучение особенностей воздействия наночастиц серебра различных размеров на кожу крыс.

Объект и методы исследования.

1. Модель эксперимента

Экспериментальные исследования проведены на 116 intactных крысах линии Вистар обоих полов весом 0,18-0,24кг. Животные содержались в стандартных условиях вивария Одесского

национального медицинского университета согласно научно-практическим рекомендациями по содержанию лабораторных животных и работе с ними. Животные были разделены на 5 групп: интактная группа, животные, которым вводились *Ag НЧ* 30нм, животные, которым вводились *Ag НЧ* 20нм, животные, которым вводились *Ag НЧ* 70нм, животные, которым вводился физиологический рр.. Введение 0.01 мл раствора осуществлялось в область холки строго подкожно на глубину 120 мкм с помощью инсулинового шприца. После введения эффект оценивался на 1, 3, 7, 14 сутки. Вывод животных из эксперимента проводился методом передозировки эфирного наркоза. Эксперимент выполнялся с соблюдением норм Закона Украины «О защите животных от жестокого обращения», а также общими этическими принципами экспериментов на животных и Этическим кодексом ученого Украины.

2. Получение и характеристика *Ag НЧ*

НЧ серебра синтезированы на базе НИИ физики ОНУ им. И. И. Мечникова. В данной работе для получения *НЧ Ag*, был применен цитратный метод. При используемых нами параметрах синтеза с

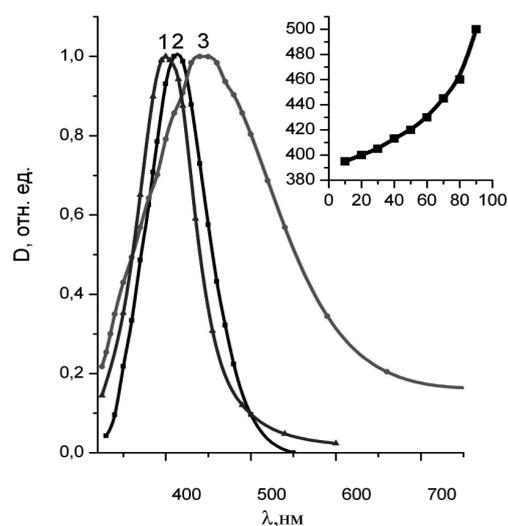


Рис. 1. Спектры поглощения наночастиц серебра размеров, нм: 20(1); 30 (2); 70 (3). На вставке показана зависимость положения максимума ЛППР от размера наночастиц.

Морфофункціональне состояние тучних кліток шкіри при введенні Ag НЧ різних розмірів (M ± m, n = 6, %)

Срок	Ag НЧ 20нм		Ag НЧ 30нм		Ag НЧ 70нм	
	Кл/0,01мм ²	Індекс	Кл/0,01мм ²	Індекс	Кл/0,01мм ²	Індекс
Норма	14,3±0,4	0,06±0,007	14,3±0,4	0,06±0,007	14,3±0,4	0,06±0,007
1	17,8±0,2**	0,68±0,03*	18,7±0,2*	0,63±0,02**	20,2±0,3*	0,71±0,05**
3	8,5±0,3**	0,83±0,04*	8,1±0,8**	0,89±0,06**	6,7±0,2*	0,92±0,02**
7	11,3±0,5**	0,72±0,07*	12,9±0,2**	0,67±0,04**	9,3±0,5*	0,45±0,03**
14	14,2±0,2*	0,51±0,08**	13,9±0,1**	0,41±0,05**	11,3±0,4**	0,32±0,07**

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

применением цитрата натрия были получены наночастицы серебра сферической формы.

Образованию наночастиц серебра соответствует появление в спектре поглощения полосы, максимум которой определяется размером наночастицы. Природа этой полосы связана с локальным поверхностным плазмонным резонансом (ЛППР) [3]. На **рис. 1** приведены спектры поглощения наночастиц серебра разных размеров. На вставке к **рис. 1** показана экспериментально установленная зависимость положения максимума ЛППР от размеров наночастиц серебра.

Нами были получены наночастицы Ag, максимум ЛППР которых локализован в области длин волн 400, 413 и 445 нм, что соответствует размерам наночастиц серебра 20, 30 и 70 нм.

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 – еозином, по ван Гизон, резорцином-фуксином, толуидиновым синим, по Фельгену, по Браше, по Массону [4].

Постоянные гистологические препараты исследовали методом световой микроскопии, на микроскопе «Zeiss» «Axiostar plus», оборудованном системой видеоанализа изображений. Морфометрические исследования полученных изображений выполняли с использованием программы «ВидеоТест – Мастер Морфология» (ВидеоТест, Россия). Полученные изображения и цифровые данные хранили в архиве созданном с помощью программного обеспечения «ВидеоТест Альбом». Статистическую обработку результатов производили с помощью компьютерной программы «STATISTIKA 6.0». Для математической обработки данных использовался дисперсионный анализ. В случае, если нулевая гипотеза отклонялась, для дальнейшего анализа использовали критерий Ньюмана- Кейлса. Исследования проводились на базе кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии ОНМедУ.

Результаты исследований и их обсуждение.

При введении наночастиц серебра 30нм в коже

возникает комплекс реактивных изменений. Сразу после введения отмечается отек и инфильтрация макрофагами, затем формируется грануляционная ткань, и завершает процесс адаптивная перестройка. В очаге отмечается нарушение фиброархитектоники. В камбиальном слое эпидермиса отмечается явления паракератоза, а затем вакуольной дистрофии. Регенерация осуществляется за счет пролиферации клеток эпителия наружных волосяных влагалищ. Структура ткани полностью восстанавливается на 45 сутки [6].

При введении НЧ размером 20 и 70 нм на 1-3 сутки отмечался отек дермы, клеточная инфильтрация, преимущественно макрофагами, с последующим формированием грануляционной ткани к 14 суткам. В эпидермисе отмечалось увеличение межклеточных промежутков, встречались единичные кератиноциты с вакуолизированной цитоплазмой, т. е. тип реакции был идентичен, однако ее интенсивность различалась в зависимости от размера частиц. Несмотря на высокую вероятность того, что макрофаги будут одними из самых чувствительных к размеру наночастиц типов клеток, наши исследования показали, что наиболее чувствительным к размеру наночастиц оказалась изменение функциональной активности тучных клеток. Это подтверждает регуляторную функцию тучных клеток и их роль в поддержании внутритканевого гомеостаза и обеспечении адаптивных механизмов [1,2].

Для оценки морфофункционального состояния тучных клеток использовались: количество клеток на единицу площади (0,01мм²) и индекс дегрануляции, который свидетельствует о секреторной активности тканевых базофилов и определяется отношением дегранулирующих клеток к общему количеству (**табл.**).

Анализируя данные, представленные в таблице можно сделать заключение, что под влиянием НЧ серебра функциональная активность тучных клеток повышается, т. е. отмечается значительное увеличение индекса дегрануляции. Причем наблюдается зависимость активности тучных клеток и размера наночастиц, т. е. при введении НЧ серебра 20нм отмечается наиболее высокий индекс дегрануляции. При этом такая же зависимость наблюдается при анализе количества клеток. Таким образом, можно сделать вывод, что меньшие НЧ вызывают

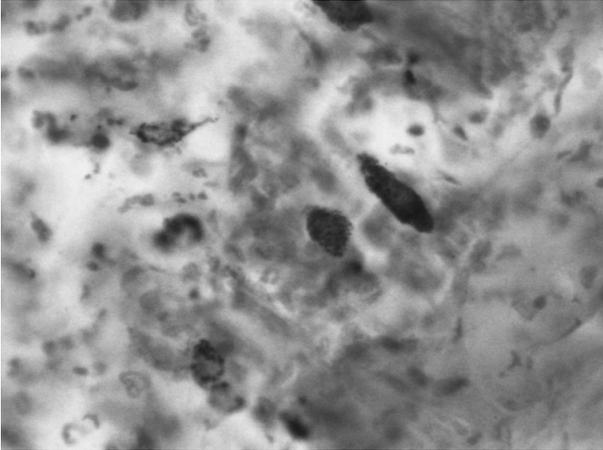


Рис. 2. Сосочковый слой дермы 7 сутки после введения. Окрашивание толуидиновым синим. Ч400

более активную дегрануляцию тучных клеток (рис. 2). Это подтверждается литературными данными, которые указывают на увеличение продукции ИЛ-8 и провоспалительных цитокинов при воздействии НЧ меньшего размера [10].

Следует отметить, что универсальной реакцией тучных клеток на стресс является дегрануляция. Секреция тучных клеток носит отчетливый регуляторный характер и наряду с дегрануляцией отмечается миграция тучных клеток и их

перераспределение в тканях [1,2]. При анализе полученных результатов и сравнении с типичным течением воспаления можно сделать вывод, что введение НЧ серебра, не изменяя общих закономерностей реакции тучных клеток при воспалительном процессе, увеличивает их функциональную активность, которая выражается в интенсивной миграции клеток в первые дни после введения, и повышении количества дегранулирующих форм в более поздние сроки. Реакция тучных клеток в дальнейшем определяет ход таких процессов как регенерация, адаптационная перестройка, как микроциркуляторного русла, так и ткани в целом.

Выводы.

1. При внутрикожном введении наночастиц серебра диаметром 10, 30 и 70 нм отмечается размерозависимый эффект.

2. Наиболее чувствительным к размеру наночастиц оказалась изменение функциональной активности тучных клеток.

3. При уменьшении размеров наночастицы отмечается увеличение дегрануляции тучных клеток.

4. Морфофункциональная характеристика тучных клеток кожи должна быть включена в комплексную оценку биосовместимости наноматериалов.

Перспективы дальнейших исследований. В дальнейшем планируется изучение и сравнительная характеристика динамики морфометрических изменений кожи при введении наночастиц серебра различных размеров.

Литература

1. Арташян О. С. Изучение функциональной активности тучных клеток при иммобилизационном стрессе / О. С. Арташян, Б. Г. Юшков, Е. А. Мухлынина // Цитология. – 2006. – № 8. – С. 665-668.
2. Арташян О. С. Морфологические аспекты участия тучных клеток в формировании общего адаптационного синдрома / О. С. Арташян, Б. Г. Юшков, Ю. С. Храмова // Таврический медико-биологический вестник. – 2012. – Т. 15, № 3. – С. 22-25.
3. Гоцульский В. Я. Коррелометр для случайных импульсных сигналов / В. Я. Гоцульский, В. Е. Чечко, В. Г. Заремба // ПТЭ. – 1997. – № 2. – С. 161-162.
4. Саркисов Д. С. Микроскопическая техника / Д. С. Саркисов, Ю. Л. Перова. – М.: Медицина, 1996. – 362 с.
5. Сырма Е. И. Физические свойства наночастиц и их биологические эффекты / Е. И. Сырма // Интегративная антропология. – 2013. – № 1. – С. 24-29.
6. Сырма Е. И. Морфологические изменения кожи при введении наночастиц серебра / Е. И. Сырма, Т. М. Скобеева, В. О. Ульянов // Морфология. – 2014. – Т. 8, № 1. – С. 90-94.
7. Чекман И. С. Наночастилки: впровадження у медичну практику / І. С. Чекман, Н. О. Горчакова, О. О. Нагорна, Т. І. Нагорна // Вісник фармакології та фармації. – 2010. – № 10. – С. 2-11.
8. Lim D. The effects of sub-lethal concentrations of silver nanoparticles on inflammatory and stress genes in human macrophages using cDNA microarray analysis / D. Lim, J. Jang, S. Kim, T. Kang // Biomaterials. – 2012. – № 33. – P. 4690-4699.
9. Martinez-Gutierrez F. Antibacterial activity, inflammatory response, coagulation and cytotoxicity effects of silver nanoparticles / F. Martinez-Gutierrez, E. P. Thi, J. M. Silverman, C. Camargo de Oliveira // Nanomedicine : Nanotechnology, Biology and Medicine. – 2012. – № 8. – P. 328-336.
10. Park M. V. D. Z. The effect of particle size on the cytotoxicity, inflammation, developmental toxicity and genotoxicity of silver nanoparticles / M. V. D. Z. Park, A. M. Neigh, J. P. Vermeulen, L. J. J. de la Fonteyne // Biomaterials. – 2011. – № 32. – P. 9810-9817.

УДК 535.343:612.017.4

РОЗМІРОЗАЛЕЖНІ МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНІ ЗМІНИ ШКІРИ ЩУРІВ ПРИ ВВЕДЕННІ НАНОЧАСТИНОК СРІБЛА

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

Резюме. Метою даної роботи було вивчення особливостей впливу наночастинок срібла різних розмірів на шкіру щурів. Використовувалися наночастилки срібла сферичної форми розміром 20, 30 і 70 нм, синтезовані цитратним методом. Дослідження проведені на 116 інтактних щурах лінії Вістар. Після підшкірного

введення 0,01 мл розчину наночастинок срібла ефект оцінювався на 1, 3, 7, 14 добу. Використовувалися стандартні гістологічні методики. Показано, що при внутрішньошкірньому введенні наночастинок срібла діаметром 20, 30 і 70 нм відзначається розмірозалежний ефект. Найбільш чутливим до розміру наночастинок виявилася зміна функціональної активності тучних клітин.

Ключові слова: наночастинок срібла, розмірозалежні ефекти, шкіра, тучні клітини.

УДК 535.343:612.017.4

РАЗМЕРОЗАВИСИМЫЕ МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ КОЖИ КРЫС ПРИ ВВЕДЕНИИ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА

Сырма Е. И., Скобеева Т. М., Ульянов В. О.

Резюме. Целью данной работы являлось изучение особенностей воздействия наночастиц серебра различных размеров на кожу крыс. Использовались наночастицы серебра сферической формы размером 20, 30 и 70 нм, синтезированные цитратным методом. Исследования проведены на 116 интактных крысах линии Вистар. После подкожного введения 0,01 мл раствора наночастиц серебра эффект оценивался на 1, 3, 7, 14 сутки. Использовались стандартные гистологические методики. Показано, что при внутрикожном введении наночастиц серебра диаметром 20, 30 и 70 нм отмечается размерозависимый эффект. Наиболее чувствительным к размеру наночастиц оказалась изменение функциональной активности тучных клеток.

Ключевые слова: наночастицы серебра, размерозависимые эффекты, кожа, тучные клетки.

UDC 535.343:612.017.4

Size-Dependent Morphofunctional Changes of Skin after Administration of Silver Nanoparticles

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

Abstract. Particle size is an important factor determining the number of reactive groups on the particle surface. It is this fact explains size-dependent effects. Scientific interest to silver nanoparticles caused a broad spectrum of antimicrobial action, the lack of stability in the majority of pathogenic microorganisms, as well as good tolerability. Several papers that compared the biological effect of different sizes of silver nanoparticles were conducted in vitro cell cultures, while morphological studies in vivo have not been conducted. The relationship between particle size and biological response may facilitate understanding of the effect of surface properties of the particles biocompatibility.

Objective was to investigate the size-dependent morphological changes of the skin that occur when intradermal administration of silver nanoparticles.

Methods. Spherical silver nanoparticles 20, 30, 70 nm were used. In this paper, for the Ag NP, citrate method was applied. When we use the parameters of the synthesis with the using of sodium citrate spherical silver nanoparticles were prepared. Ag NP is syntesied by Physics institute of ONU named Mechnicov I. I. The experiment was carried out on 116 Wistar rats. After subcutaneous administration of 0.01 ml solution of silver nanoparticles effect was assessed at 1, 3, 7, 14 day. For morphological studies back skin was taken. Standard histological techniques were used, such as hematoxylin – eosin, Van Gisonne, resorcin-fuchsin, toluidine blue, by Feulgen, by Brachet.

Results. With the introduction of silver nanoparticles in the skin occurs complex of reactive changes. Immediately after administration the marked edema and infiltration of macrophages is noted, then granulation tissue is formed, and the process of adaptive remodeling completes. There is a violation of fibroarchitectonics. In the cambium layer of the epidermis parakeratosis and vacuolar degeneration are marked. Regeneration occurs due to proliferation of epithelial cells in the outer sheath of the hair. Tissue is fully restored on day 45. It is shown that the intradermal administration of silver nanoparticles with a diameter of 20, 30 and 70 nm noted size-dependent effect. Changes in the functional activity of mast cells were dependent from the size of the nanoparticles. To assess the morphofunctional state of mast cells were used: the number of cells per unit area (0.01 mm²) and the index of degranulation. Has been a significant increase in the index of degranulation. It should be noted that a degranulation of mast cells is universal reaction to the stress. Mast cell secretion is distinct regulatory character and also founded migration of mast cells and their redistribution in the tissues.

Conclusion. The introduction of silver NP does not change the general laws of the reaction of mast cells in the inflammatory process, increasing their functional activity, which is expressed in the intensive migration of cells in the first days after administration, and increasing the amount of degranulate forms at a later date. When reducing the size of the nanoparticles marked increase in mast cell degranulation. Morphofunctional characteristic of mast cells of the skin should be included in a comprehensive assessment of the biocompatibility of nanomaterials.

Keywords: silver nanoparticles, size-depend effects, skin, mast cells.

Рецензент – проф. Непорада К. С.

Стаття надійшла 12. 06. 2014 р.