

ДЕРЖАВНИЙ ЗАКЛАД
«ДНІПРОПЕТРОВСЬКА МЕДИЧНА АКАДЕМІЯ
МІНІСТЕРСТВА ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ»

СИРМА ОЛЕНА ІВАНІВНА

УДК 611.018:611.77

**МОРФОЛОГІЧНІ ЗМІНИ В ТКАНИНАХ ШКІРИ ЩУРІВ ЗА УМОВ
ВНУТРІШНЬОШКІРНОГО ВВЕДЕННЯ НАНОЧАСТИНОК СРІБЛА
РІЗНОГО РОЗМІРУ**

14.03.09 – гістологія, цитологія, ембріологія

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата медичних наук

Дніпропетровськ – 2015

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Одеському національному медичному університеті МОЗ України

Науковий керівник:

доктор медичних наук, професор **Ульянов Вадим Олексійович**, Одеський національний медичний університет МОЗ України, кафедра гістології, цитології та ембріології, завідувач кафедри.

Офіційні опоненти:

доктор біологічних наук, професор **Волков Костянтин Степанович**, ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет ім. І.Я. Горбачевського МОЗ України», кафедра гістології та ембріології, завідувач кафедри;

доктор медичних наук, доцент **Погорелов Максим Володимирович**, Сумський державний університет МОН України, кафедра гігієни та екології з курсом мікробіології, вірусології та імунології, завідувач кафедри.

Захист відбудеться « ____ » _____ 2015 року об ____ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 08.601.03 при ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України» (49005, м. Дніпропетровськ, вул. Севастопольська, 17).

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України» (49044, м. Дніпропетровськ, вул. Дзержинського, 9).

Автореферат розісланий “ ____ ” _____ 2015 р.

Учений секретар
спеціалізованої вченої ради Д 08.601.03
доктор медичних наук, доцент

О. Є. Олійник

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Науковий прогрес у технології синтезу специфічних частинок нанорозмірів зумовив можливість застосування наноматеріалів у біології та медицині (Чекман І. С. та ін., 2011; Doyle J., 2013; Mehlich J., Thiele F., 2014). Основними напрямками розвитку наномедицини є нанофармакологія, діагностика захворювань, виробництво хірургічного та стоматологічного інструментарію, наносенсори, тощо (Краснополина І. Г., 2014). Застосування наноматеріалів перспективне для адресної доставки лікарських речовин усередину клітини, створення нових протимікробних препаратів, вакцин, у яких антигени приєднані до наночастинок (НЧ), лікарських речовин, подрібнених до нанорозмірів (Чекман І. С. та ін., 2011; Ульберг З. Р., Чекман І. С., 2013; Caputo F. et al., 2014), розвитку високоточної ранньої діагностики онкологічних захворювань (Мамичев Д. А. и др., 2012; Li L. et al., 2015), покриття НЧ інструментарію (Никифоров В. Н., 2013), пластин для остеосинтезу. Широкого розвитку наноматеріали набули в косметології, засобах повсякденної побутової хімії (Nasir A., 2010; Lin L. et al., 2015).

Найбільше використовуються НЧ металів срібла (Савенкова О. О. и др., 2011; Hwang I. et al., 2012; Генік С. М., Трофимчук О. П., 2014). Наносрібло, яке відоме своїм широким протимікробним і протигрибковим спектром, використовується як антисептик для обробки ран, компонент дезінфікуючих розчинів тощо (Guzman M. et al., 2012; Lin J. J. et al., 2012; Franci G. et al., 2015), проте деякі аспекти взаємодії біологічних об'єктів з наноматеріалами вивчені недостатньо і потребують уточнення (Hubbs A. F. et al., 2011; Nel A. et al., 2013). Наночастинки часто мають непрогнозований вплив на біологічні об'єкти (Elsaesser A., Howard V., 2012; Oberdörster G., 2012; Murashov V., Howard J., 2015). У зв'язку з цим актуальними є дослідження кумулятивності, гено- і цитотоксичності, імунотоксичності, канцерогенних властивостей, вивчення метаболізму в організмі, а також біотрансформації в навколишньому середовищі, оцінки впливу НЧ на біологічні об'єкти, можливості застосування НЧ у клінічній практиці (Kim Y. J. et al., 2010; Yildirim L. et al., 2011; Hwang M. et al., 2012). Особливо актуальним є вивчення взаємодії НЧ з органами-«вхідними воротами», зокрема шкірою (Godwin H. et al., 2015).

Наявність формо- та розмірозалежних ефектів НЧ ускладнює аналіз існуючих даних літератури (Stoehr L., 2011; Rivera G. P., 2012; Guisbiers G., 2012). Незважаючи на постійно зростаючу кількість робіт, морфологічних досліджень, присвячених взаємодії шкіри з НЧ срібла, недостатньо (Seifalian A. M., 2011; Marin S., 2015). До того ж відомо, що біологічні ефекти НЧ залежать від способу введення (Murashov V., 2015). Більшість існуючих досліджень, присвячених вивченню біологічних ефектів НЧ, проводилися на культурах клітин, що не дає змогу оцінити можливі зміни в структурі основної речовини, базальної мембрани, особливості міжклітинних взаємодій та гетероморфію тканин шкіри за умов впливу НЧ.

Виходячи з вищенаведеного, вивчення морфофункціональних змін шкіри,

які виникають при введенні НЧ срібла різних розмірів, є перспективним і актуальним напрямком розвитку морфології. Це дозволить не тільки зрозуміти теоретичні аспекти механізмів взаємодії НЧ різних розмірів з біологічними об'єктами і розробити метод оцінки змін, що виникають при цій взаємодії, а й сприятиме розв'язанню низки практичних завдань медичного застосування НЧ срібла.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Дисертаційна робота виконана в рамках науково-дослідних тем кафедри гістології, цитології та ембріології Одеського національного медичного університету МОЗ України «Морфогенез епітеліальної та сполучної тканини за фізіологічних та патологічних умов» (державний реєстраційний номер 0109U008570) і «Міжклітинні взаємодії в епітеліальній та сполучній тканині за фізіологічних та патологічних умов» (державний реєстраційний номер 0114U007012). Автор є співвиконавцем даних науково-дослідних робіт.

Метою дослідження є вивчення морфофункціональних змін тканин шкіри, що виникають при внутрішньошкірному введенні наночастинок срібла різного розміру.

Завдання дослідження:

1. Вивчити морфофункціональні зміни в клітинах епідермісу, у базальній мембрані, клітинах і компонентах міжклітинної речовини сполучної тканини дерми при внутрішньодермальному введенні колоїдного розчину іонізованого срібла.

2. Встановити особливості морфофункціональних зрушень у клітинах епідермісу, у базальній мембрані, клітинах і компонентах міжклітинної речовини сполучної тканини дерми при внутрішньодермальному введенні колоїдного розчину наночастинок срібла розміром 20 нм.

3. Дослідити морфофункціональні зрушення в клітинах епідермісу, у базальній мембрані, клітинах і компонентах міжклітинної речовини сполучної тканини дерми при внутрішньодермальному введенні колоїдного розчину наночастинок срібла розміром 30 нм.

4. Вивчити морфофункціональні зрушення в клітинах епідермісу, у базальній мембрані, клітинах і компонентах міжклітинної речовини сполучної тканини дерми при внутрішньодермальному введенні колоїдного розчину наночастинок срібла розміром 70 нм.

5. Оцінити зміни мікроциркуляторного русла дерми за умов внутрішньодермального введення колоїдного розчину іонізованого срібла, наночастинок срібла розмірами 20, 30, 70 нм.

6. Визначити розмірозалежні ефекти, що виникають у тканинах шкіри за умов впливу наночастинок срібла різного розміру.

Об'єкт дослідження – реорганізація тканин шкіри за умов впливу НЧ срібла різних розмірів.

Предмет дослідження – морфологічні зміни клітин епідермісу, клітин і міжклітинної речовини сполучної тканини дерми та мікроциркуляторного русла дерми за умов впливу НЧ срібла розміром 20, 30 та 70 нм.

Методи дослідження: гістологічні (морфологічна оцінка змін тканин шкіри), морфометричний (кількісна оцінка морфологічних змін тканин шкіри), електронно-мікроскопічний (оцінка ультрамікроскопічних змін тканин шкіри). Достовірність одержаних даних і висновків підтверджували методами варіаційної статистики.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше виявлені особливості реорганізації структурних компонентів шкіри за умов інтрадермального введення наночастинок срібла різних розмірів, надана комплексна характеристика морфологічних змін і мітотичної активності клітин епідермісу, стану базальної мембрани, архітектоніки волокнистих структур дерми, активності та співвідношення клітин дерми гематогенного походження, змін складу популяцій фібробластів.

Вперше надано характеристику міждиферонної і внутрішньодиферонної гетероморфії епідермісу і дерми за умов впливу наночастинок срібла різного розміру. З'ясовано, що внутрішньодермальне введення наночастинок срібла викликає зміни функціональної активності фібробластів, мітотичної активності епітеліоцитів базального шару епідермісу, індексу дегрануляції тучних клітин, кількості макрофагів у дермі.

Вперше описано нелінійну залежність інтенсивності клітинних реакцій від розміру НЧ, а саме зростання кількості дистрофічних явищ у базальних клітинах епідермісу в ряду 30→70→20 нм, порушення мітотичного індексу (МІ), що збільшується в ряду 30→70→20, посилення функціональної активності фібробластів, що збільшується в ряду 20→70→30 нм, та кількості колагенових волокон, що зростає в ряду 20→70→30.

Розширено уявлення про вплив наночастинок металів на судини мікроциркуляторного русла. З'ясовано, що наночастинок срібла розміром 20, 30, 70 нм за умов внутрішньодермального введення спричиняють оборотне збільшення просвітів судин, наночастинок 30 нм, окрім цього, збільшують питому площу поверхні петель субпапілярного сплетення.

Отримано нові дані про зміни структури базальної мембрани при взаємодії з наночастинок металів. З'ясовано, що за умов внутрішньодермального введення наночастинок срібла розміром 20 нм виникають незворотні деструктивні її зміни у місці введення; наночастинок срібла 30 і 70 нм спричиняють оборотні дистрофічні зміни базальної мембрани епідермісу – розшарування та набряк.

Практичне значення одержаних результатів. Одержані в роботі дані уточнюють характеристику розмірозалежних біологічних ефектів НЧ металів, що створює передумови для розробки адекватних методів оцінки впливу НЧ срібла різного розміру на біологічні тканини, які можуть бути використані науковими і навчальними закладами, що займаються практичними та теоретичними проблемами використання НЧ у медицині, нанофармакології. Результати дослідження дозволять обґрунтувати нові об'єктивні критерії оцінки впливу НЧ срібла різного розміру на організм ссавців і на якісно іншому рівні вести розробку методів профілактики негативних ефектів НЧ і

використання їх позитивних ефектів.

Виявлена в роботі властивість НЧ срібла розміром 30 нм впливати на функціональну активність клітин дерми та прискорювати регенерацію може бути використана при лікуванні ран і розробці нових косметичних засобів.

Результати роботи впроваджено в навчальну роботу кафедр гістології Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова і ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України», кафедри гістології, цитології та ембріології Івано-Франківського національного медичного університету, кафедри гістології та ембріології ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет імені І.Я. Горбачевського МОЗ України», кафедри гістології, цитології та ембріології ВДНЗУ «Українська медична стоматологічна академія».

Особистий внесок здобувача. Дисертантом особисто проведено вивчення наукової літератури, разом із керівником визначено напрямки, мету і завдання дослідження, особисто виконано експериментальні, морфологічні, морфометричні та статистичні дослідження, аналіз одержаних результатів. Формулювання висновків було проведено разом з науковим керівником. Автором самостійно написано рукопис кандидатської дисертації, підготовлено до друку статті, тези доповідей. У наукових працях, опублікованих за темою дисертації в співавторстві, значна роль у визначенні завдань дослідження й аналізі результатів належить автору даної роботи.

Електронно-мікроскопічні дослідження проведені на базі лабораторії патоморфологічних і електронно-мікроскопічних досліджень ДУ «Інститут очних хвороб та тканинної терапії ім. В. П. Філатова НАМН України» за консультативної допомоги професора Думбрової Н. Є.

Синтез і визначення фізичних властивостей НЧ срібла проведено на базі інституту фізики Одеського національного університету ім. І. І. Мечникова під керівництвом доцента Скобеєвої В. М.

Апробація результатів дисертації. Основні матеріали та положення дисертації повідомлено й обговорено на міжнародній науковій конференції студентів і молодих вчених, присвяченій 100-річчю з дня народження К. Д. Двужильної «Сучасні теоретичні та практичні аспекти клінічної медицини» (Одеса, 2013), науково-практичній конференції, присвяченій 110-річчю з дня народження М. І. Зазибіна «Морфологічні основи наукових досліджень у медицині» (Київ, 2013), міжнародній науковій конференції, присвяченій 115-річчю з дня народження М. О. Ясиновського «Сучасні теоретичні та практичні аспекти клінічної медицини» (Одеса, 2014), науковій конференції, присвяченій 90-річчю з дня народження К. С. Кабака «Фундаментальна та клінічна медицина» (Київ, 2014), науковій конференції, присвяченій 100-річчю з дня народження Е. Д. Бромберг «Актуальні проблеми функціональної морфології» (Полтава, 2014).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 12 наукових праць: шість статей (у співавторстві) у фахових виданнях України, рекомендованих ДАК МОН України для публікації результатів дисертаційних робіт, з яких три

входять до міжнародних наукометричних видань; одна оглядова стаття; п'ять робіт у збірниках, матеріалах і тезах конференцій.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація викладена українською мовою на 174 сторінках комп'ютерного тексту (основний текст роботи становить 152 сторінки) і складається зі вступу, аналітичного огляду літератури, розділу «Матеріали та методи дослідження», 2 розділів власних досліджень, розділу «Аналіз та узагальнення результатів досліджень», висновків, списку використаних джерел (214 джерел, з яких 60 надруковані кирилицею, 154 – латиницею). Робота ілюстрована 65 рисунками (45 фотографій, 20 діаграм) і 21 таблицею.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали та методи дослідження. Експериментальні дослідження виконані на 303 щурах-самцях лінії Вістар масою (180 ± 10) г. Експеримент виконували із дотриманням норм Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» № 27, ст. 230 від 2006 р. зі змінами, внесеними згідно із Законом № 1759-VI (1759–17) від 15.12.2009 р., ВВР, 2010, № 9, ст. 76, а також загальними етичними принципами експериментів на тваринах (Національний конгрес з біоетики, 20.09.2001 р., Київ) і етичним кодексом вченого України (Національна академія наук України, 2009). Комісією з питань біоетики Одеського національного медичного університету порушень морально-етичних норм при проведенні науково-дослідної роботи не виявлено.

Піддослідні тварини були розподілені на три групи: перша – контрольна група (91 щур), друга – щури, яким вводили 2%-ний колоїдний розчин іонізованого срібла внутрішньошкірно (57 щурів), третя – тварини, яким вводили НЧ срібла внутрішньошкірно (153 щури). Контрольна група розподілялася на три підгрупи: інтактні тварини, щури, що одержували 0,9%-ний розчин NaCl, та особини, які одержували 0,5%-ний розчин цитрату натрію. Група 3 була поділена на три підгрупи залежно від розміру НЧ срібла (20, 30, 70 нм), які вводилися в шкіру. Наночастинки срібла сферичної форми розмірами 20, 30, 70 нм одержані на базі НДІ фізики ОНУ ім. І. І. Мечникова цитратним методом (Смынтына В. А. и др., 2012), розмір НЧ визначали методом лазерної кореляційної спектроскопії. Використовувалися колоїдні розчини НЧ срібла концентрацією 0,2 мг/мл.

Внутрішньошкірне введення 0,01 мл розчину здійснювали у ділянку холки на глибину 120 мкм за допомогою голки з міткою. Зміни в тканинах шкіри оцінювалися на 1-шу, 3-тю, 7-му, 14-ту, 21-шу, 30-ту та 45-ту добу після введення НЧ срібла.

Для гістологічних досліджень матеріал фіксували в 10%-ному нейтральному формаліні та заливали гістаміксом («Биовитрум», Росія), готували постійні гістологічні препарати. Зрізи завтовшки 5–7 мкм забарвлювали гематоксилін-еозином. Забарвлення толуїдиновим синім використовували для диференціювання та вивчення функціональної активності тучних клітин; для вивчення стану основної речовини використовували забарвлення за Ван Гізоном, резорцин-

фуксином і трихромом за Массоном; для вивчення стану та функціональної активності ядер застосовували забарвлення за Фельгеном, за Браше; для вивчення стану базальної мембрани використовували забарвлення за Шиффом (Саркисов Д. С., 1996). Морфометричні дослідження одержаних зображень виконували з використанням програми «ВидеоТест-Морфология» («ВидеоТест», Росія, серійний номер В2715466061102132580/700). Одержані зображення і цифрові дані зберігали в архіві, створеному за допомогою програмного забезпечення «ВидеоТест Альбом».

У місці введення НЧ підраховували кількість фібробластів і фіброцитів, гранулоцитів, мононуклеарних клітин, тканинних базофілів, макрофагів, плазматичних клітин (на 500 клітин). За результатами первинних підрахунків обчислювали відсоткове співвідношення різних клітин (Автандилов Г. Г., 1990). Для оцінки внутрішньодиферонної гетероморфії та ступеня зрілості фібробластів використовували ядерно-цитоплазматичний індекс (ЯЦІ) як основну диференційну ознаку (Алексеева Н. Т., 2012). Також морфометрично визначали питому площу колагенових волокон для оцінки їх кількості. Для оцінки мікроциркуляторного русла шкіри визначали діаметр судин шкірних сплетень. Стереометричний аналіз субпапілярного артеріального сплетення шкіри проводили методом лінійного інтегрування з використанням вищезазначеного програмного забезпечення. Визначали питому площу поверхні судин (Борис Р. Я., 2008; Дісковський І. С., 2013).

Для електронно-мікроскопічного дослідження фрагменти шкіри щурів фіксували у 2,5%-ному розчині глютаральдегіду на фосфатному буфері при значенні рН 7,4 з подальшою дофіксацією 1%-ним розчином OsO_4 при тому ж рН буферного розчину. Потім зразки зневоднювали в спиртах висхідної міцності. Просочення матеріалу та його ущільнення проводили в суміші епон-аралдит. Ультратонкі зрізи завтовшки 50-70 нм контрастували за методикою Рейнолдса (Reynoldes E. S., 1963). Матеріал вивчали під електронним мікроскопом ПЕМ-100-01 (SELMІ, Україна).

На електронних мікрофотографіях при кінцевому збільшенні у 10 000 разів проводили стереометричні дослідження із застосуванням універсальної сітки Вейбелла (Данилов Р. К., 1988). Одержані первинні дані: P_p – кількість тест-точок на сітці; a – період (крок) сітки; P_T – кількість тест-точок, що потрапили на профілі мітохондрій; P_{st} – кількість тест-точок, що потрапили на каналці гранулярної ендоплазматичної сітки; P_{sg} – кількість тест-точок, що потрапили на структури комплексу Гольджі. Після одержання первинних даних вираховували такі параметри органел клітин у 10 мкм площі зрізу цитоплазми: V_{mx} – об'ємна частка мітохондрій; V_{EPC} – об'ємна частка гранулярної ендоплазматичної сітки; $V_{кГ}$ – об'ємна частка комплексу Гольджі. Після чого за одержаними даними ультраструктурної будови визначали співвідношення різних функціональних типів макрофагів, серед яких розрізняли: фагоцитарний, секретуючий і моноцитарний (Мусіна Л. А., 2004).

Також ультраструктурні особливості будови органел використовувалися для визначення функціонального стану фібробластів (Одинцова І. А., 2004).

У процесі біометричного аналізу в роботі використовували методи варіаційної статистики з оцінкою відмінностей між вибірками за допомогою t-критерію Стюдента та критерію Манна-Уїтні (Петри А., Себин К., 2009). Усі розрахунки проводили за допомогою програмного забезпечення Microsoft Excel.

Результати дослідження та їх обговорення. У результаті введення НЧ срібла в дерму виникали зміни не тільки безпосередньо місця в місці введення, але й виявлялись пошкодження і в суміжних ділянках шкіри.

Проведені мікроскопічні дослідження епідермісу над місцем введення НЧ показали, що незалежно від їх розміру, спостерігалось порушення внутрішньодиферонної гетероморфії клітин базального шару, а саме збільшення кількості клітин з перинуклеарною вакуолізацією та зниження МІ. Відмічалось порушення структури базальної мембрани над місцем введення, зокрема її потовщення та розшарування. Порушення в дермі характеризувалися зміною міждиферонної гетероморфії за рахунок гетерокінезу тканинних базofilів і макрофагів, зниженням внутрішньодиферонної гетероморфії фібробластів, а саме зміною кількості фібробластів зі збільшеним вмістом органел синтезу, зміною кількості та порушенням структури колагенових волокон.

На електронно-мікроскопічному рівні визначалися порушення структури базальної мембрани, її гомогенізація та розшарування, місцями фрагментація, збільшення кількості клітин з перинуклеарною вакуолізацією в базальному шарі епідермісу. У дермі спостерігалось зниження кількості та порушення структури колагенових волокон, а саме ділянки їх розпушення та фрагментації. В цитоплазмі більшості фібробластів спостерігали зниження кількості органел синтезу.

Незважаючи на подібність розвитку морфофункціональних змін у тканинах шкіри за умов впливу НЧ срібла різних розмірів, відмічалася залежність морфометричних показників, що характеризували стан тканин шкіри, від розміру НЧ, які вводилися, як-от: терміни відновлення структури базальної мембрани, показники між- і внутрішньодиферонної гетероморфії клітин епідермісу та дерми, кількість колагенових волокон, морфометричні характеристики мікроциркуляторного русла дерми.

Комплекс морфофункціональних змін, які виникали за умов впливу 2%-ного колоїдного розчину іонізованого срібла в епідермісі, характеризувалися необоротними порушеннями структури базальної мембрани, що відзначались уже на 3-тю добу, а саме її гомогенізацією та потовщенням. Встановлено збільшення кількості клітин з перинуклеарною вакуолізацією в базальному шарі на 67,8 % ($p < 0,05$) порівняно з інтактними максимально на 21-шу добу; зниження МІ клітин епідермісу максимально на 55,3 % ($p < 0,05$) порівняно з інтактними, що фіксували на 7-му добу. Тобто в клітинах епідермісу, які безпосередньо не контактували з іонами срібла, виникали дистрофічні зміни, які збігалися за часом з порушенням структури базальної мембрани. В дермі виявлені зміни міждиферонної гетероморфії за рахунок гетерокінезу

тканинних базофілів і макрофагів, що характеризувалось збільшенням кількості тканинних базофілів порівняно з інтактними на 31,2 % ($p < 0,05$) максимально на 3-тю добу, зростанням кількості макрофагів на 22,9 % ($p < 0,05$) порівняно з показниками інтактних щурів, максимально на 7-му добу; зниженням внутрішньодиферонної гетероморфії фібробластів, зменшенням кількості фібробластів зі збільшеним вмістом органел синтезу, зменшенням кількості та порушенням структури колагенових волокон. Електронно-мікроскопічно визначалися розшарування, гомогенізація та, місцями, фрагментація колагенових волокон. Процес порушення структури колагенових волокон дерми перебігав синхронно з розвитком клітинної інфільтрації та порушенням структури базальної мембрани. Зниження кількості фібробластів з високою синтетичною активністю на 51,2 % ($p < 0,05$) призводило до зменшення кількості колагенових волокон дерми на 40,2 % ($p < 0,05$) порівняно з інтактними. Відмічалось оборотне розширення просвітів судин мікроциркуляторного русла, тобто збільшення діаметра субпапілярного сплетення порівняно з інтактними на 30,8 % ($p < 0,05$) максимально на 14-ту добу. Розширення судин інших сплетень мало швидкоминулий характер.

За умов впливу НЧ срібла розміром 20 нм у шкірі спостерігалися морфофункціональні зміни, які характеризувалися порушенням внутрішньодиферонної гетероморфії базальних клітин епідермісу, збільшенням кількості клітин з перинуклеарною вакуолізацією цитоплазми на 42,5 % ($p < 0,05$), що досягало максимуму на 14-ту добу; значне зниження мітотичної активності клітин епідермісу на 61,5 % ($p < 0,05$), яке відмічалось на 14-ту добу, на 45-ту добу МІ залишався зниженим на 29,3 % ($p < 0,05$) порівняно з показниками інтактних тварин. При електронній мікроскопії визначалися необоротні зміни структури базальної мембрани, а саме її потовщення, гомогенізація та осередкове руйнування.

Таким чином, в епідермісі за умов впливу НЧ срібла розміром 20 нм виникали порушення, подібні до тих, що виявлені за умов впливу 2%-ного колоїдного розчину іонізованого срібла. Так само, як і в попередній групі, зміни клітин епідермісу виникали за відсутності їх контакту з НЧ. Імовірно, дистрофічні явища та зниження мітотичної активності клітин епідермісу були викликані ушкодженням структури базальної мембрани, що призводило до порушення обмінних процесів. Тобто, введення НЧ срібла розміром 20 нм викликало глибокі зміни базальної мембрани, яка не відновлювалася протягом усього експерименту. У дермі також відмічалася реорганізація структур, подібна до такої, що виникала за умов впливу 2%-ного колоїдного розчину іонізованого срібла, а саме зміни міждиферонної гетероморфії за рахунок збільшення кількості макрофагів на 49,8 % ($p < 0,05$) максимально на 7-му добу та тучних клітин на 37,3 % ($p < 0,05$) максимально на 3-тю добу порівняно з інтактними.

Міждиферонна гетероморфія відновлювалася до показників інтактних тварин протягом 45 діб, а внутрішньодиферонна залишалася зміненою, насамперед у фібробластичному дифероні, де зменшувалася кількість

фібробластів зі збільшеним вмістом органел синтезу на 60,1 % ($p < 0,05$) порівняно з інтактними щурами, що призводило до зниження кількості колагенових волокон на 35,6 % ($p < 0,05$) максимально на 21-шу добу і тривало до 30-ї доби. Зміни мікроциркуляторного русла дерми характеризувалися розширенням судин субпапілярного сплетення порівняно з інтактними на 26,8 % ($p < 0,05$) максимально на 3-тю добу. Таким чином, динаміка та терміни змін між- і внутрішньодиферонної гетероморфії за умов внутрішньошкірного введення НЧ срібла розміром 20 нм подібні до таких при введенні 2%-ного колоїдного розчину іонізованого срібла.

Морфофункціональні зміни, що виникали в тканинах шкіри за умов впливу НЧ срібла розміром 30 нм відрізнялися від результатів у попередніх групах. При електронній мікроскопії на 3-тю добу спостерігалось осередковий набряк та гомогенізація базальної мембрани. Проте її зміни мали оборотний характер, і вже на 14-ту добу починалися процеси її відновлення. Відмічалась перинуклеарна вакуолізація в поодиноких клітинах базального шару, на 22,4 % ($p < 0,05$) більше випадків, ніж у інтактних тварин; зниження мітотичної активності епідермісу, але вже на 14-ту добу після відновлення структури базальної мембрани мітотична активність підвищувалася порівняно з інтактними на 16,5 % ($p < 0,05$), а на 45-ту добу МІ залишався підвищеним на 9,9 % ($p < 0,05$). Це можна пояснити відновленням структури базальної мембрани у термін з 14-ї до 21-ї доби та покращенням метаболізму між дермою і епідермісом, репарацією його структури.

У дермі, подібно як і в попередніх групах, зазнавала змін міждиферонна гетероморфія за рахунок збільшення кількості макрофагів порівняно з інтактними на 71,2 % ($p < 0,05$) максимально на 7-му добу, а тучних клітин порівняно з інтактними на 30,7 % ($p < 0,05$) максимально на 3-тю добу. Внутрішньодиферонна гетероморфія змінювалася, насамперед, у фібробластичному дифероні, де збільшувалася кількість фібробластів з високим рівнем синтетичної активності порівняно з інтактними на 44,5 % ($p < 0,05$) на 14-ту добу, що призводило до збільшення кількості колагенових волокон на 12,3 % ($p < 0,05$) на 21-шу добу.

Електронно-мікроскопічно відзначався набряк та потовщення колагенових волокон, починаючи з 3-ї доби, але вже на 14-ту добу спостерігалось збільшення кількості впорядкованих колагенових фібрил. Зазнавали змін морфометричні показники субпапілярного судинного сплетення, збільшення діаметра всіх судин і кількості судинних петель на одиницю площі, що було характерно для всіх термінів спостереження.

Таким чином, за умов впливу НЧ срібла розміром 30 нм встановлена оборотна реорганізація структури базальної мембрани, яка відновлювалася на 14-ту добу, підвищення синтетичної активності фібробластів і збільшення кількості колагенових волокон дерми на 12,3 % ($p < 0,05$) на 21-шу добу експерименту порівняно з інтактними тваринами.

За умов впливу НЧ срібла розміром 70 нм в структурах шкіри спостерігалися морфофункціональні зміни, подібні змінам в попередніх групах,

але мали деякі особливості. В епідермісі, який безпосередньо не контактував з НЧ, відмічалась більша кількість клітин базального шару з перинуклеарною вакуолізацією – на 36,4 % ($p < 0,05$), зниження їх мітотичної активності, максимально на 36,2 % ($p < 0,05$) на 7-му добу, порівняно з інтактними тваринами. Значні зміни структури базальної мембрани, а саме її гомогенізація та фрагментація, мали оборотний характер. Структура базальної мембрани відновлювалася на 21-шу добу, після чого відмічалися зниження дистрофічних явищ і підвищення мітотичної активності клітин базального шару епідермісу. Відновлення базальної мембрани за умов впливу НЧ розміром 70 нм відбувалося повільніше (на 21-шу добу), ніж при введенні НЧ розміром 30 нм (на 14-ту добу). Тобто незважаючи на порушення структури базальної мембрани, регенераторна функція тканин шкіри зберігалася, проте відбувалася з різною швидкістю залежно від розміру НЧ.

У дермі відмічалися зміни міждиферонної гетероморфії порівняно з інтактними за рахунок збільшення кількості макрофагів на 55,2 % ($p < 0,05$) максимально на 7-му добу та тучних клітин на 40,7 % ($p < 0,05$) максимально на 3-тю добу. Міждиферонна гетероморфія поверталася до норми протягом 45 діб, а внутрішньодиферонна залишалася зміненою, насамперед у фібробластичному дифероні, де, порівняно з інтактними, збільшувалася кількість функціонально активних фіброblastів на 27,5 % ($p < 0,05$), що не призводило до змін кількості колагенових волокон. Зміни мікроциркуляторного русла дерми характеризувались оборотним збільшенням питомої площі поверхні петель субпапілярного сплетення на 26,3 % ($p < 0,05$) максимально на 7-му добу. Терміни розширення судин збігалися в усіх експериментальних групах. Отже, зміни міждиферонної гетероморфії, які виникали за умов впливу НЧ срібла розміром 70 нм, мали таку саму періодичність, як і за умов впливу інших частинок срібла.

У результаті введення колоїдного розчину іонізованого срібла або НЧ срібла різних розмірів у тканинах шкіри виникали зміни з певною послідовністю (рис. 1).

В епідермісі провідними стали порушення структури базальної мембрани, що призводили до змін метаболізму і розвитку дистрофічних процесів у базальних клітинах епідермісу та зниження їх мітотичної активності. Пошкодження структури базальної мембрани, а саме її гомогенізація, виникали за умов впливу як іонів, так і НЧ срібла усіх досліджуваних розмірів, тобто ця реакція не була розмірозалежною. Залежно від розміру змінювалися лише терміни відновлення структури базальної мембрани. Так, за умов впливу НЧ розмірами 30 та 70 нм структура базальної мембрани відновлюється, а за умов впливу НЧ розміром 20 нм та іонів структура не відновлюється протягом усього терміну експерименту. Причому при введенні НЧ розміром 30 нм відновлення базальної мембрани відбувається швидше, ніж за умов впливу НЧ розміром 70 нм.

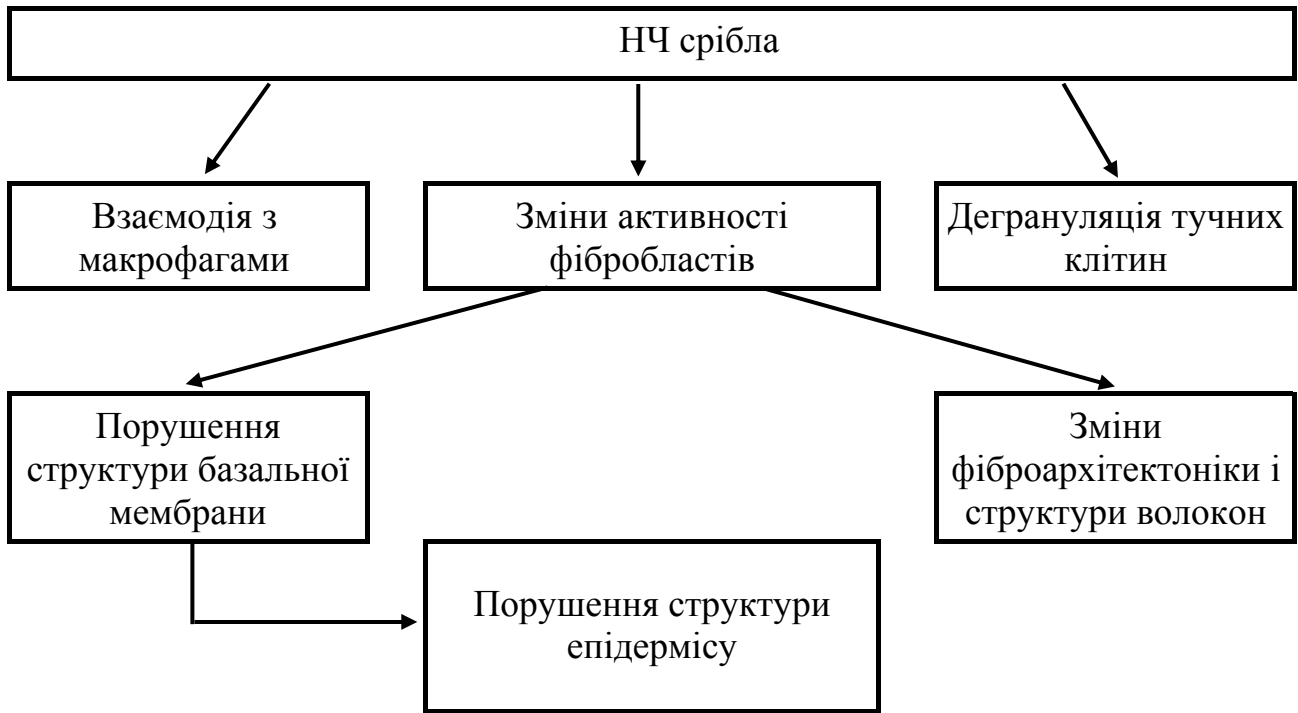


Рис. 1. Шляхи взаємодії наночастинок срібла зі структурами епідермісу та дерми шкіри.

Необоротні порушення структури базальної мембрани можна пояснити доведеною токсичністю іонів срібла та НЧ розміром 20 нм за відсутності токсичної дії у НЧ розміром 30 та 70 нм. Тобто, відмічалася залежність швидкості репаративних процесів від розміру НЧ. Подібні результати одержані у дослідженні, у якому доведена залежність швидкості загоєння ран від розміру НЧ (Park M. V. et al., 2011).

Порушення структури базальної мембрани викликали дистрофічні зміни клітин епідермісу внаслідок розладів метаболізму. У базальному шарі епідермісу визначалося збільшення кількості клітин з явищами перинуклеарної вакуолізації та зниження мітотичної активності (рис. 2).

Відновлення мітотичної активності та зменшення вираженості дистрофічних змін у клітинах базального шару епідермісу, що відмічалися за умов впливу НЧ срібла розмірами 30 та 70 нм, імовірно, не були пов'язаними з дією НЧ, а пояснювалися відновленням структури базальної мембрани, що підтверджувалося збігом термінів відновлення структури мембрани та мітотичної активності. Втім, раніш підтверджено можливий вплив НЧ срібла на проліферативну активність кератиноцитів (Lee P. Y. et al., 2010), де показані зміни рівня факторів росту епітелію за умов впливу НЧ.

При введенні НЧ, незалежно від їх розміру, у дермі зменшувалася кількість функціонально активних фібробластів, крім випадку введення НЧ розміром 30 нм, коли їх кількість збільшувалася. До того ж відмічалися зміни внутрішньодиферонної гетероморфії фібробластів, а саме збільшення кількості малодиференційованих клітин в усіх групах, окрім групи, яким вводили НЧ розміром 20 нм, де відмічається зниження їх кількості.

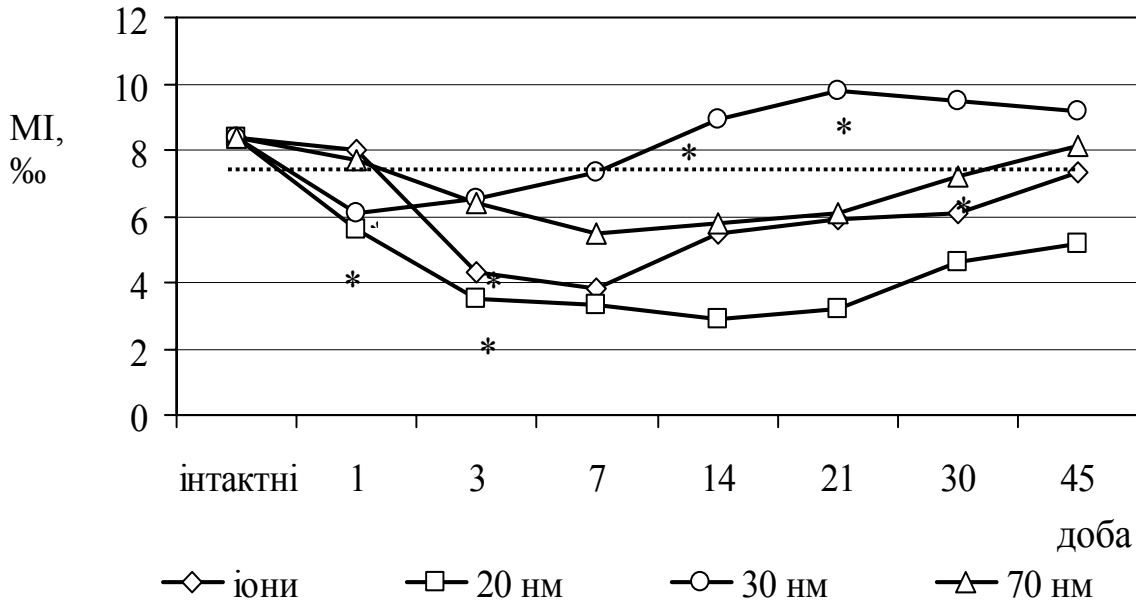


Рис. 2. Динаміка змін мітотичного індексу базальних клітин епідермісу за умов впливу наночастинок срібла різних розмірів.

Примітка. * – $p < 0,05$ порівняно з попереднім терміном спостереження.

У результаті проведених досліджень виявлені розмірозалежні зміни внутрішньодиферонної гетероморфії фібробластів, яку оцінювали за ступенем зрілості клітин (Алексеева Н. Т., 2012). Зокрема, за умов внутрішньошкірного введення НЧ срібла розміром 20 нм спостерігали збільшення кількості малодиференційованих фібробластів у період від 3-ї до 14-ї доби спостереження, максимально на 64,9 % порівняно з інтактними тваринами. Надалі спостерігали зменшення кількості зазначених клітин на 30-ту і 45-ту добу експерименту відповідно на 22,1 і 38,6 % ($p < 0,05$). За умов впливу НЧ срібла розміром 30 нм спостерігали зростання кількості малодиференційованих фібробластів дерми на всіх термінах спостереження з максимальним перевищенням показників інтактних тварин у 3,1 рази на 14-ту добу експерименту ($p < 0,05$).

Внутрішньошкірне введення НЧ срібла розміром 70 нм також спричиняло збільшення кількості малодиференційованих форм фібробластів на всіх термінах спостереження з максимальним перевищенням показників інтактних тварин у 2,8 рази на 21-шу добу експерименту ($p < 0,05$). Зменшення кількості зрілих форм фібробластів на всіх термінах експерименту спостерігалось за умов введення НЧ срібла 30 і 70 нм. Натомість, за умов впливу НЧ срібла розміром 20 нм на початку експерименту виявлено зниження кількості зрілих фібробластів від 3-ї до 14-ї доби спостереження, а починаючи з 30-ї доби їх кількість збільшувалась порівняно з інтактними тваринами.

Порушення внутрішньодиферонної гетероморфії фібробластів призводили до змін міжклітинної речовини дерми, зниження кількості колагенових волокон в усіх експериментальних групах. Лише за умов впливу

НЧ розміром 30 нм кількість колагенових волокон збільшувалася, починаючи з 7-ї доби, а після 14-ї навіть перевищувала показники інтактних тварин (рис. 3), досягаючи максимуму на 21-шу добу. Збільшення кількості колагенових волокон зберігалось до кінця експерименту.

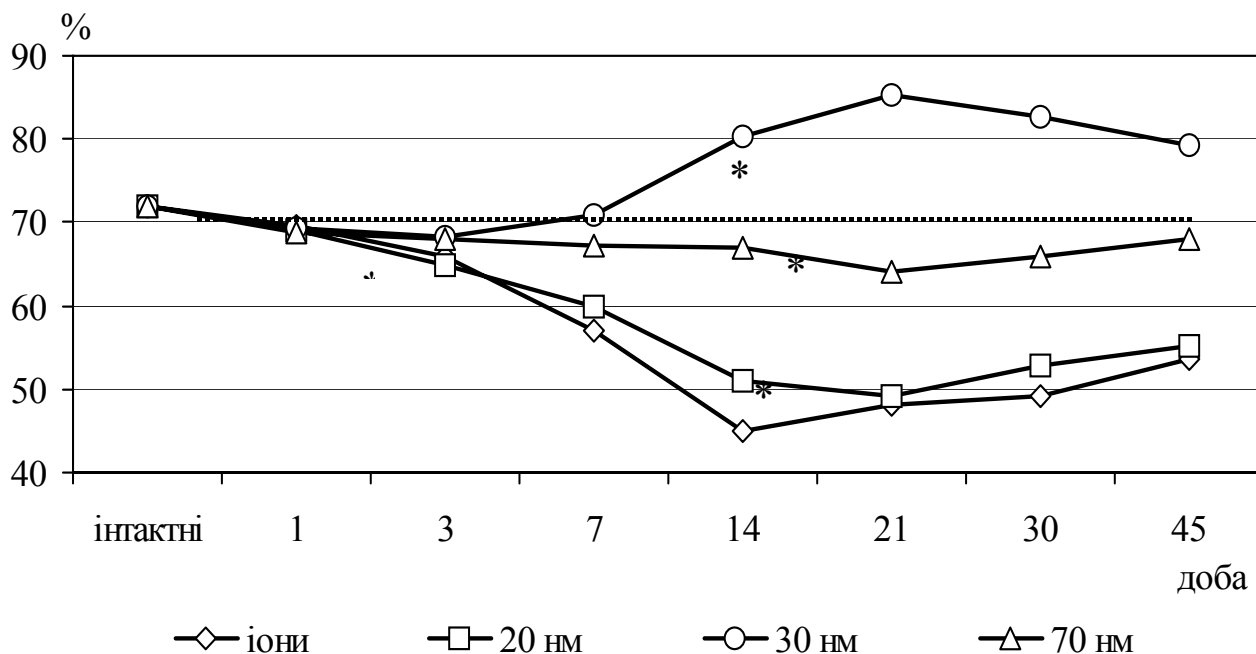


Рис. 3. Динаміка змін площі колагенових волокон дерми шкіри за умов впливу наночастинок срібла різних розмірів.

Примітка. * – $p < 0,05$ порівняно з попереднім терміном спостереження.

Зміни внутрішньодиферонної гетероморфії фібробластів і кількості колагенових волокон можна пояснити наявністю стимулювальної дії НЧ розміром 30 нм на дермальні фібробласти. Кількість фібробластів з високою функціональною активністю за умов впливу НЧ срібла розміром 30 нм збільшувалася порівняно з інтактними на 44,5 % ($p < 0,05$). Посилення колагеногенезу в ранах за умов впливу НЧ показано у дослідженнях Tian J. (2007), Gunasekaran T. (2012). Втім, за даними інших дослідників, виявлено негативний вплив НЧ срібла на дермальні фібробласти, при цьому використовувалися частинки розміром 5 нм (Asharani P. V. et al., 2009). У свою чергу, за умов впливу НЧ розмірами 20 та 70 нм спостерігалось зниження кількості вищезазначених клітин, що підтверджує наявність розмірозалежного впливу НЧ срібла на функцію фібробластів.

Аналізуючи якісні та кількісні зміни, що виникають при взаємодії структурних компонентів шкіри з НЧ срібла різних розмірів можна відзначити наявність характерної послідовності їх реорганізації, вказаних вище. Це може свідчити про однаковий механізм впливу на тканини шкіри НЧ срібла різних розмірів та іонів срібла. Цей висновок узгоджується з даними інших дослідників, які довели ідентичність механізму антибактеріальної дії НЧ срібла різних розмірів

і впливу іонізованого срібла, який зумовлений вивільненням іонів з поверхні НЧ (Xiu Z. et al., 2012). При цьому розмірозалежні ефекти зумовлені різною кількістю вивільнених іонів срібла, що обґрунтовується припущенням про подібність молекулярних механізмів дії НЧ та іонів срібла (Novo M. et al., 2015). Підсумовуючи вищевикладене, можна зробити підсумок, що за умов впливу НЧ срібла у шкірі, незважаючи на розмір частинки, виникала певна послідовність ушкоджень. У першу чергу, визначалися зміни міждиферонної гетероморфії тканин шкіри за рахунок гетерокінезу клітин гематогенного походження. На наступному етапі спостерігалися зміни внутрішньодиферонної гетероморфії клітин епідермісу та дерми, що зумовлювало особливості адаптивної перебудови.

Залежно від розміру НЧ срібла відрізнялися швидкість відновлення структури базальної мембрани (найшвидше за умов впливу НЧ срібла розміром 30 нм) та кількість колагенових волокон дерми (найвища за умов впливу НЧ срібла розміром 30 нм).

ВИСНОВКИ

У дисертації представлено теоретичне узагальнення та нове вирішення актуального наукового завдання, що полягає у визначенні морфофункціональних змін структурних компонентів шкіри за умов впливу наночастинок срібла різного розміру. На підставі отриманих результатів визначені розмірозалежні особливості послідовних реактивних змін внутрішньодиферонної гетероморфії клітин базального шару епідермісу і фібробластів дерми, міждиферонної гетероморфії тучних клітин, макрофагів, фібробластів дерми за умов внутрішньодермального введення наночастинок срібла розміром 20, 30 і 70 нм.

1. Внутрішньошкірне введення 2%-ного колоїдного розчину іонізованого срібла викликає необоротні порушення структури базальної мембрани епідермісу, що призводить до зміни внутрішньодиферонної гетероморфії клітин базального шару епідермісу та зниження їх мітотичної активності максимально на 55,3 % на сьому добу ($p < 0,05$); оборотні порушення міждиферонної гетероморфії клітин дерми за рахунок гетерокінезу тканинних базofilів і макрофагів з одночасними змінами внутрішньодиферонної гетероморфії фібробластів, зменшення кількості синтетично активних фібробластів на 51,2 % ($p < 0,05$), яке спричиняє зниження питомої площі колагенових волокон на 40,2 % ($p < 0,05$).

2. За умов внутрішньошкірного введення наночастинок срібла розміром 20 нм відбувається деструкція базальної мембрани, що призводить до зміни внутрішньодиферонної гетероморфії клітин базального шару епідермісу та зниження їх мітотичної активності максимально на 29,3 % ($p < 0,05$) на 45-ту добу з одночасними змінами внутрішньодиферонної гетероморфії фібробластів, а саме зниженням кількості фібробластів з високою синтетичною активністю на 60,1 % ($p < 0,05$) на 45-ту добу, внаслідок чого відмічається зменшення питомої площі колагенових волокон на 35,6 % ($p < 0,05$) на 21-шу добу експерименту.

3. Внутрішньошкірне введення наночастинок срібла розміром 30 нм призводить до оборотних порушень структури базальної мембрани епідермісу.

Відновлення структури завершується на 14-ту добу, що зумовлює підвищення мітотичної активності клітин базального шару епідермісу максимально на 16,5 % ($p < 0,05$) на 14-ту добу експерименту з одночасним підвищенням кількості синтетично активних фібробластів на 44,5 % ($p < 0,05$), що спричиняє збільшення питомої площі колагенових волокон на 12,3 % ($p < 0,05$) на 21-шу добу.

4. Внутрішньошкірне введення наночастинок срібла розміром 70 нм призводить до оборотних порушень структури базальної мембрани епідермісу. Відновлення структури завершується на 21-шу добу, що супроводжується зниженням мітотичного індексу клітин базального шару епідермісу на 36,2 % ($p < 0,05$) на 7-му добу, який відновлюється до рівня показників інтактних тварин на 30-ту добу експерименту. Спостерігається збільшення кількості синтетично активних фібробластів на 27,5 % ($p < 0,05$) на 21-шу добу експерименту, що не супроводжується змінами питомої площі колагенових волокон дерми.

5. Внутрішньошкірне введення наночастинок срібла розміром 20, 30 та 70 нм викликає розширення судин субпапілярного сплетення на тлі відсутності розмірозалежних ефектів. За умов введення наночастинок срібла розміром 30 нм відбувається достовірно збільшення питомої площі поверхні петель субпапілярного сплетення порівняно з показниками інших груп спостереження.

6. Виявлені розмірозалежні ефекти впливу наночастинок срібла на міждиферонну та внутрішньодиферонну гетероморфію тканин шкіри, а саме залежність від розміру наночастинок швидкості відновлення структури базальної мембрани (найшвидше за умов впливу наночастинок срібла розміром 30 нм); мітотичної активності базальних клітин епідермісу (зростає в ряду 20→70→30); кількості макрофагів (зростає в ряду 70→20→30); індексу дегрануляції тучних клітин (зростає в ряду 20→30→70); кількості синтетично активних фібробластів (зростає в ряду 20→70→30), що призводить до збільшення питомої площі колагенових волокон (найбільше за умов впливу наночастинок срібла розміром 30 нм).

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Сырма Е. И. Физические свойства наночастиц и их биологические эффекты / Е. И. Сырма // Интегративна антропология. – 2013. – № 1. – С. 30–33.

2. Сырма Е. И. Морфологические изменения кожи при введении наночастиц серебра / Е. И. Сырма, В. М. Скобеева, В. А. Ульянов // Морфология. – 2014. – № 1. – С. 90–95 *(Здобувачем проведено і експериментальні дослідження, аналіз їх результатів, написана стаття, зроблені висновки)*.

3. Сырма Е. И. Размерозависимые морфофункциональные изменения кожи крыс при введении наночастиц серебра / Е. И. Сырма, В. М. Скобеева, В. А. Ульянов // Вісник проблем біології і медицини. – 2014. – № 3. – С. 284–287 *(Здобувачем проведено і експериментальні дослідження, аналіз їх результатів, написана стаття, зроблені висновки)*.

4. Сырма Е. И. Морфофункциональная характеристика дермы кожи крыс

при введенні наночастиц срібла / Е. І. Сырма, В. М. Скобеева, В. А. Ульянов // Вісник морфології. – 2014. – № 2. – С. 245–248 (Здобувачем проведені експериментальні дослідження, аналіз їх результатів, написана стаття, зроблені висновки).

5. Сырма О. І. Морфометрична характеристика судинного русла шкіри за умов введення наночастинок срібла / О. І. Сырма, В. М. Скобеева, В. О. Ульянов // Одеський медичний журнал. – 2014. – № 4. – С. 23–28 (Здобувачем проведені експериментальні дослідження, аналіз їх результатів, написана стаття, зроблені висновки).

6. Ультраструктурные изменения кожи при введении наночастиц серебра / Е. И. Сырма, Н. Е. Думброва, Н. И. Молчанюк, В. А. Ульянов, В. М. Скобеева // Світ медицини та біології. – 2014. – № 3. – С. 150–154 (Здобувачем проведені експериментальні дослідження, аналіз їх результатів, написана стаття, зроблені висновки).

7. Сравнительная характеристика морфофункциональных изменений кожи крыс при введении наночастиц серебра разных размеров / Е. И. Сырма, В. А. Ульянов, Н. Е. Думброва, Н. И. Молчанюк, В. М. Скобеева // Світ медицини та біології. – 2015. – № 2. – С. 137–141 (Здобувачем проведені експериментальні дослідження, аналіз їх результатів, написана стаття, зроблені висновки).

8. Сырма О. І. Значення оцінки кінетики клітинних популяцій за умов введення нанометалів / О. І. Сырма // Сучасні теоретичні та практичні аспекти клінічної медицини : міжнар. наук. конф. студентів і молодих вчених, присв. 100-річчю з дня народження К. Д. Двужильної. Одеса, 14–15 березня 2013 р. : тези доп. – Одеса, 2013. – С. 31.

9. Сырма Е. И. Морфометрическая характеристика кожи intactных крыс / Е. И. Сырма // Морфологічні основи наукових досліджень у медицині: наук.-практ. конф., присв. 110-річчю з дня народження М. І. Зазибіна. Київ, 24–27 жовтня 2013 р. : тези доп. – К., 2013. – С. 71.

10. Сырма Е. И. Морфологические изменения дермы при введении наночастиц металлов / Е. И. Сырма // Сучасні теоретичні та практичні аспекти клінічної медицини : міжнар. наук. конф., присв. 115-річчю з дня народження М. О. Ясиновського. Одеса, 24–25 квітня 2014 р. : тези доп. – Одеса, 2014. – С. 41.

11. Сырма Е. И. Морфометрическая характеристика кожи крыс при введении наночастиц серебра 30 нм / Е. И. Сырма // Фундаментальна і клінічна медицина : наук. конф., присв. 90-річчю з дня народження К. С. Кабака. Київ, 27–28 травня 2014 р. : тези доп. – К., 2014. – С. 96.

12. Сырма Е. И. Ультрамикроскопические изменения эпидермиса при введении сферических наночастиц серебра размером 30 нм / Е. И. Сырма // Актуальні проблеми функціональної морфології : наук. конф., присв. 110-річчю з дня народження Е. Д. Бромберг. Полтава, 21 листопада 2014 р. : тези доп. – Полтава, 2014. – С. 36.

АНОТАЦІЯ

Сирма О. І. Морфологічні зміни в тканинах шкіри щурів за умов внутрішньошкірного введення наночастинок срібла різного розміру. – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.03.09 – гістологія, цитологія, ембріологія. – ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України», Дніпропетровськ, 2015.

У роботі досліджені особливості морфофункціональних змін шкіри щурів за умов внутрішньошкірного введення наночастинок срібла розмірами 20, 30, 70 нм. За допомогою кількісних гістологічних методик описані реактивні зміни внутрішньодиферонної гетероморфії клітин базального шару епідермісу і дермальних фібробластів, міждиферонної гетероморфії тучних клітин, макрофагів, фібробластів дерми. Виявлені розмірозалежні ефекти впливу наночастинок срібла: залежно від розміру наночастинок срібла відрізнялися швидкість відновлення структури базальної мембрани (найшвидше за умов впливу наночастинок срібла розміром 30 нм, при впливі наночастинок срібла розміром 20 нм регенерації не відбувалося); збільшення мітотичного індексу базальних клітин епідермісу (найвищий за умов впливу наночастинок срібла розміром 30 нм); зміни внутрішньодиферонної гетероморфії фібробластів дерми, а саме збільшення кількості функціонально активних фібробластів (найвища за умов впливу наночастинок срібла розміром 30 нм); зростання кількості колагенових волокон дерми (найвища за умов впливу наночастинок срібла розміром 30 нм).

Ключові слова: щури, тканини шкіри, наночастинки срібла, морфологічні зміни, гетероморфія, розмірозалежні ефекти.

АННОТАЦИЯ

Сырма Е. И. Морфологические изменения в тканях кожи крыс при внутрикожном введении наночастиц серебра разного размера. – На правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.09 – гистология, цитология, эмбриология. – ГУ «Днепропетровская медицинская академия МЗ Украины», Днепропетровск, 2015.

Применение наночастиц серебра, обладающих широким антибактериальным и противогрибковым спектром, является перспективным направлением развития наномедицины. При этом влияние наночастиц серебра на ткани недостаточно изучено в связи с наличием формо- и размерозависимых эффектов. Большинство исследований, посвященных изучению биологических эффектов наночастиц, проводились на культурах клеток, что не позволяет комплексно оценить морфологические изменения тканей, возникающие при взаимодействии с наночастицами серебра.

Цель работы – изучение морфофункциональных изменений кожи, возникающих при внутрикожном введении наночастиц серебра разных размеров.

Материалом для работы послужили участки кожи спины 303 крыс линии Вистар после внутрикожного введения 0,01 мл коллоидного раствора

наночастиц серебра сферической формы размерами 20, 30, 70 нм в концентрации 0,2 мг/мл.

Материал после выведения животных из эксперимента (через 1, 3, 7, 14, 21, 30 и 45 суток) изучали с помощью комплекса методов: гистологического, электронно-микроскопического, морфометрического и статистического.

В результате эксперимента установлено, что при введении наночастиц серебра в дерму возникал комплекс изменений, который отмечался не только непосредственно в месте введения, а наблюдалось и вовлечение в процесс смежных тканей. Выявлены особенности реактивных изменений внутридифферонной гетероморфии клеток базального слоя эпидермиса, а именно увеличение количества клеток с перинуклеарной вакуолизацией и снижение их митотического индекса. Отмечались нарушения структуры базальной мембраны над местом введения наночастиц серебра, а именно ее утолщение, расслоение, гомогенизация, местами фрагментация. Нарушения в дерме характеризовались изменением междифферонной гетероморфии за счет гетерокинеза тканевых базофилов и макрофагов, снижением внутридифферонной гетероморфии фибробластов, а именно изменением количества фибробластов с повышенным содержанием органелл синтеза. Выявлены изменение количества и нарушение структуры коллагеновых волокон. Невзирая на схожесть развития морфофункциональных изменений в тканях кожи при внутридермальном введении наночастиц серебра разных размеров, отмечалась зависимость морфометрических показателей от размера наночастиц.

При внутрикожном введении 2%-ного коллоидного раствора ионизированного серебра отмечались необратимые нарушения структуры базальной мембраны эпидермиса, которые приводили к изменению внутридифферонной гетероморфии клеток базального слоя эпидермиса и снижению их митотической активности максимально на 55,3 % ($p < 0,05$); обратимые нарушения междифферонной гетероморфии клеток дермы за счет гетерокинеза тканевых базофилов и макрофагов с одновременными изменениями внутридифферонной гетероморфии фибробластов, а именно снижением количества синтетически активных фибробластов на 51,2 % ($p < 0,05$), что приводило к уменьшению количества коллагеновых волокон на 40,2 % ($p < 0,05$).

Введение наночастиц серебра размером 20 нм приводило к необратимым нарушениям структуры базальной мембраны, что, в свою очередь, вызывало изменение внутридифферонной гетероморфии клеток базального слоя эпидермиса и снижение их митотической активности максимально на 29,3 % ($p < 0,05$) с одновременными изменениями внутридифферонной гетероморфии фибробластов, а именно снижению количества фибробластов с высокой синтетической активностью на 60,1 % ($p < 0,05$), в результате чего отмечалось уменьшение количества коллагеновых волокон на 35,6 % ($p < 0,05$).

При введении наночастиц серебра размером 30 нм отмечались обратимые нарушения структуры базальной мембраны эпидермиса. Восстановление структуры завершалось на 14-е сутки ($p < 0,05$), что приводило к повышению митотической активности клеток базального слоя эпидермиса максимально

на 16,5 % ($p < 0,05$) с одновременным повышением количества синтетически активных фибробластов на 44,5 % ($p < 0,05$), что вызывало увеличение количества коллагеновых волокон на 12,3 % ($p < 0,05$).

Внутрикожное введение наночастиц серебра размером 70 нм приводило к обратимым нарушениям структуры базальной мембраны эпидермиса – восстановление структуры завершалось на 21-е сутки ($p < 0,05$), что вызывало обратимое снижение митотической активности клеток базального слоя эпидермиса, которое возобновлялось после 21-х суток. Обратимые изменения междифферонной гетероморфии клеток дермы и внутридифферонной гетероморфии фибробластов исчезали на 45-е сутки.

Внутрикожное введение наночастиц серебра вызывало расширение сосудов субпапиллярного сплетения дермы. Зависимость диаметра сосудов микроциркуляторного русла дермы от размера наночастиц серебра не обнаружена.

В зависимости от размера наночастиц серебра различались скорость восстановления структуры базальной мембраны (быстрее всего при введении наночастиц серебра размером 30 нм) и содержания коллагеновых волокон дермы (наибольшее при введении наночастиц серебра размером 30 нм).

Ключевые слова: крысы, ткани кожи, наночастицы серебра, морфологические изменения, гетероморфия, размерозависимые эффекты.

SUMMARY

Syrma O. I. Morphological changes in skin tissues of rats under conditions of intradermal administration of silver nanoparticles of different size. – Printed as a manuscript.

The thesis for obtaining the scientific degree of Candidate of medical sciences in specialty 14.03.09 – histology, cytology, embryology. – SE “Dnipropetrovsk Medical Academy of the Ministry of Health of Ukraine”, Dnipropetrovsk, 2015.

This thesis is devoted to studying the features of the morphological changes of the rat skin with intradermal administration of 20, 30, 70 nm silver nanoparticles.

Reactive changes of intradifferon heteromorphism of epidermal basal cells and the dermal fibroblasts and interdifferon heteromorphism of mast cells, macrophages, fibroblasts of the dermis were described, using quantitative histological methods. Size-dependent effects of silver nanoparticles were identified, namely depending on the nanoparticles size recovery rate of basement membrane structure differs (the fastest – under conditions of 30 nm silver nanoparticles influence, under conditions of 20 nm silver nanoparticles influence, regeneration was absent); the increase of mitotic index of the epidermal basal cells (the highest under conditions of 30 nm silver nanoparticles influence); changes of dermal fibroblasts' heteromorphism, such as increasing of number of functionally active fibroblasts (the highest under the conditions of 30 nm silver nanoparticles influence); and the number of collagen fibers of the dermis (the highest under conditions of 30 nm silver nanoparticles influence).

Key words: rats, tissues of skin, silver nanoparticles, morphological changes, heteromorphism, size-dependent effects.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

МІ – мітотичний індекс

НЧ – наночастинки

ЯЦІ – ядерно-цитоплазматичний індекс

Підп. до друку 04.09.2015. Формат 60x90/16. Папір офсетний.
Гарн. «Times» Друк цифровий. Ум. друк. арк. 0,9.
Наклад 100 пр.
Видавець Букаєв Вадим Вікторович
вул. Пантелеймонівська 34, м. Одеса, 65012.
Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 2783 від 02.03.2007 р.
Тел. 0949464393, 0487431393 email - 7431393@gmail.com