

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

На правах рукопису

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

**Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата
медичних наук**

Науковий керівник:
Ульянов Вадим Олексійович,
доктор медичних наук, професор

Одеса – 2015

ЗМІСТ

Перелік умовних скорочень	4
Вступ	5
Розділ 1	
Основні закономірності біологічних ефектів наночастинок срібла при взаємодії з тканинами шкіри (аналітичний огляд літератури)	11
1.1. Фізичні властивості наночастинок та їх біологічні ефекти ...	11
1.2. Біологічні ефекти нанометалів	19
1.3. Морфофункціональні зрушення в тканинах шкіри за умов впливу наночастинок срібла	24
Розділ 2	
Матеріал і методи дослідження	29
2.1. Моделювання експериментальних досліджень	29
2.2. Методики експериментальних досліджень	30
2.3. Характеристика наночастинок срібла	33
2.4. Статистичні методи дослідження	36
Розділ 3	
Морфофункціональна характеристика шкіри щурів контрольних груп .	38
3.1. Морфофункціональна характеристика шкіри інтактних щурів	38
3.2. Морфофункціональна характеристика шкіри за умов впливу 2%-ного колоїдного розчину іонізованого срібла.	51
3.2.1. Морфофункціональна характеристика епідермісу	51
3.2.2 .Морфофункціональна характеристика дерми	58
Розділ 4	
Морфофункціональна характеристика шкіри за умов впливу наночастинок срібла	72
4.1. Морфофункціональна характеристика шкіри за умов впливу	

наночастинок срібла розміром 20 нм	72
4.1.1. Морфофункціональна характеристика епідермісу	72
4.1.2. Морфофункціональна характеристика дерми	79
4.2. Морфофункціональна характеристика шкіри за умов впливу наночастинок срібла розміром 30 нм	92
4.2.1. Морфофункціональна характеристика епідермісу	92
4.2.2. Морфофункціональна характеристика дерми	102
4.3. Морфофункціональна характеристика шкіри за умов впливу наночастинок срібла розміром 70 нм	119
4.3.1. Морфофункціональна характеристика епідермісу	119
4.3.2. Морфофункціональна характеристика дерми	125
Розділ 5	
Аналіз та узагальнення результатів дослідження	138
Висновки	150
Список використаних джерел	153

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ЗЕС – зерниста ендоплазматична сітка

МІ – мітотичний індекс

НЧ – наночастинки

ПОЛ – перекисне окиснення ліпідів

ЯЦІ – ядерно-цитоплазматичний індекс

ВСТУП

Актуальність теми. Науковий прогрес у технології синтезу специфічних частинок нанорозмірів зумовив можливість застосування наноматеріалів у біології та медицині [1-4]. Основними напрямками розвитку наномедицини є нанофармакологія, діагностика захворювань, виробництво хірургічного та стоматологічного інструментарію, наносенсори, тощо [5-8]. 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 [7-9], розвитку високоточної ранньої діагностики онкологічних захворювань [5, 6], покриття НЧ інструментарію [4, 5], пластин для остеосинтезу. Широкого розвитку наноматеріали набули в косметології [10], засобах повсякденної побутової хімії [11].

Найбільше використовуються НЧ металів срібла [2, 6, 8, 12]. Наносрібло, яке відоме своїм широким протимікробним і протигрибковим спектром, використовується як антисептик для обробки ран, компонент дезінфікуючих розчинів тощо [12], проте деякі аспекти взаємодії біологічних об'єктів з наноматеріалами вивчені недостатньо і потребують уточнення [13, 14]. Наночастинки часто мають непрогнозований вплив на біологічні об'єкти [15, 16]. 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 [13, 16]. Особливо актуальним є вивчення взаємодії НЧ з органами-«вхідними воротами», зокрема шкірою [15].

Наявність формо- та розмірозалежних ефектів НЧ ускладнює аналіз існуючих даних літератури [14, 16]. Незважаючи на постійно зростаючу кількість робіт, морфологічних досліджень, присвячених взаємодії шкіри з НЧ срібла, недостатньо. До того ж відомо, що біологічні ефекти НЧ залежать

від способу введення [15]. 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 внутрішньо-дермального 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 популяції 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 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 наночастинками 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.

РОЗДІЛ 1
ОСНОВНІ ЗАКОНОМІРНОСТІ БІОЛОГІЧНИХ ЕФЕКТІВ
НАНОЧАСТИНОК СРІБЛА ПРИ ВЗАЄМОДІЇ З ТКАНИНАМИ ШКІРИ
(ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

1.1. Фізичні властивості наночастинок та їх біологічні ефекти

Незважаючи на те, що розробка та вивчення наноматеріалів тривають понад 30 років, до 2010 р. не було прийнято єдиної термінології і номенклатури, що викликало різночитання та дискусії [17]. Робота в цьому напрямку почалася в 2005 р. [18, 19], і лише у 2010 р. прийняття остаточного варіанта ISO / TS 80004 [20] міжнародним співтовариством уніфікувало термінологію, застосовувану в науці [21, 22]. До наноматеріалів зараховують частинки розміром 1–100 нм, при цьому наноматеріали поділяють на нанооб'єкти та наноструктурні матеріали. У свою чергу до нанооб'єктів належать НЧ (3D, сферичні) і нановолокна (2D), до яких входять нанострижні та нанотрубки (порожнисті) [20].

Номенклатура НЧ заснована на хімічному складі матеріалу, що лежить в основі, з приставкою «нано» [20, 21, 22]. Однак слід зазначити, що при цьому не враховуються форма і розмір частинки, а також вона не зручна для речовин однакового складу, але різної структури, наприклад, сполуки вуглецю [17]. У нашій роботі ми використовували термінологію, прийняту ISO / TS 80004 [20].

Широка зацікавленість нанооб'єктами зумовлена тим, що методи нанотехнології дозволяють одержати нові матеріали з унікальними фізичними, механічними, хімічними, оптичними, магнітними та термічними властивостями [23, 24], а при контакті з біологічними об'єктами відзначаються і унікальні біологічні властивості [25]. Особливі властивості НЧ пов'язані зі збільшенням площі поверхні на одиницю її об'єму або маси [26, 27]. Розроблено концепцію, яка пояснює незвичайні властивості

нанооб'єктів [28]. Провідну роль у концепції наноматеріалів, розробленій Г. Глейтером (1981) на прикладі металевих наноматеріалів, відіграють поверхні розділення, так звані межі зерен [29]. Доведено, що метали складаються з великої кількості кристалів (зерен), тобто є полікристалічними. Кристали в полікристалічному металі не мають правильної форми й ідеально правильного розташування атомів. У них трапляються різного роду недосконалості кристалічної будови, які мають вплив на його властивості [29, 30]. Розрізняють такі недосконалості кристалічної будови: точкові, лінійні та поверхневі.

Точкові недосконалості малі у всіх трьох вимірах. До них відносять вакансії, міжвузлові (дислоковані) атоми. Точкові дефекти значною мірою впливають на деякі фізичні властивості металів (електропровідність, магнітні властивості тощо) і на фазові перетворення в металах і сплавах.

Лінійні недосконалості (дислокації) мають малі розміри в двох вимірах і велику протяжність у третьому вимірі. Розрізняють крайові, гвинтові і змішані дислокації. Щільність дислокації значною мірою визначає пластичність і міцність матеріалу.

Поверхневі, або плоскі недосконалості малі тільки в одному вимірі і великі в двох інших вимірах. До них відносять межі зерен (кристалітів) і блоків мозаїки (субзерен).

Зерна металу розорієнтовані один відносно одного на величину від кількох часток градуса (малокутові межі) до кількох градусів або кількох десятків градусів (висококутові межі). Межа між окремими зернами являє собою тонку перехідну зону (5-10 атомних діаметрів) з максимальним порушенням порядку в розташуванні атомів. Атоми, розташовані на межах зерен, мають підвищену енергію внаслідок некомпенсованості сил міжатомної взаємодії. Ця обставина призводить до того, що багато процесів розвиваються або здійснюються на межі зерен і субзерен [29, 30].

Кількість поверхонь розділу залежить від багатьох факторів, зокрема методу одержання НЧ, але при цьому доведено, що при зменшенні розміру їх

кількість збільшується, що зумовлює надлишкову вільну поверхневу енергію [28, 29]. Саме цим фактом і пояснюються розмірозалежні ефекти НЧ [31, 32], тобто комплекс явищ, пов'язаних з істотною зміною фізико-хімічних властивостей речовини внаслідок безпосереднього зменшення розміру частинок (зерен, кристалітів), внеску межі розділення у властивості системи, співмірності розміру частинок з фізичними параметрами, що визначають властивості системи (розмір магнітних доменів, довжина вільного пробігу, електронна, дебройлевська довжина хвилі, розмір екситону в напівпровідниках тощо). Такі ефекти з'являються, коли середній розмір кристалічних зерен не перевищує 100 нм, і найбільш чітко проявляються при розмірах зерен менше 10 нм [33].

Квантові розмірні ефекти проявляються в електронних властивостях речовини або матеріалу і пов'язані зі зменшенням розмірності електронного газу, що приводить до зміни енергетичного спектра [29]. Вплив розміру частинок на фізико-хімічні властивості речовини можна пояснити наявністю поверхневого тиску, що діє на речовину. Цей додатковий тиск, який обернено пропорційний розміру частинок, призводить до збільшення енергії Гіббса і, як наслідок, підвищення тиску насичених парів на НЧ, зменшення температур кипіння рідкої фази і плавлення твердої. Змінюються й інші термодинамічні характеристики – константи рівноваги та стандартні електродні потенціали [28, 29, 33].

Розмірний ефект вельми поширений у гетерогенному каталізі. У багатьох випадках НЧ проявляють каталітичну активність там, де більші частинки не активні. Так, нанокластери золота каталізують селективне окиснення стиролу на повітрі до бензальдегіду, тимчасом як частинки золота більшого розміру на цю реакцію не діють [27, 30, 33]. Розмірні ефекти в біології мають зовсім інший характер. Біологічні молекули, полімери та внутрішньоклітинні структури нанорозмірні, проте їх властивості (функції) визначаються в основному структурою, а не розмірністю [34]. Разом із тим, взаємодія штучних конструкцій з біологічними структурами визначається не

тільки структурою, а й розмірністю [35]. Наприклад, проникність шкіри та кровеносних судин для ліпосом залежить від розмірів останніх [36]. Як наслідок, пакування в ліпосоми лікарських засобів приводить до зміни таких важливих фармакологічних властивостей медикаментів, як час циркуляції в крові та розподіл в органах. Створення нанорозмірного рельєфу на поверхні синтетичних матеріалів краще стимулює адгезію клітин порівняно з мікрорельєфом і використовується у тканинній інженерії [37]. Від розміру і рельєфу поверхні НЧ залежать механізм і ефективність їх ендоцитозу, а також внутрішньоклітинна локалізація. Токсичність частинок також може визначатися розмірністю [38].

Викладена вище концепція створена 30 років тому і є базовою для вивчення властивостей наноматеріалів, проте вона і досі постійно розширюється і уточнюється за рахунок виявлення нових властивостей НЧ. Так, проводяться дослідження з кількісних вимірювань кінетики переносу електрона на нанорівні [39, 40]. При цьому спостерігається справжній «наноефект» (кінетичне прискорення електронів залежно від розміру НЧ) [40]. Поверхневі електрони мають величезний вплив на властивості НЧ. Відомо, що вільні електрони на поверхні металу можуть здійснювати колективні коливання, для обліку яких були введені квазічастинки – плаزمони [29]. Ці частинки можуть взаємодіяти з фотонами електромагнітного випромінювання, що спричиняє так званий плазмонний резонанс [41]. Наночастинка в даному разі служить джерелом плазмонів і може значно збільшувати електромагнітне поле в прилеглому просторі. При цьому довжина хвилі поверхневого плазмонного резонансу залежить від форми і розміру НЧ [42]. Цей ефект лежить в основі нового напрямку в технології наносистем, що швидко розвивається, названого «наноплазмоніка» [43].

Однак слід зазначити, що квантові ефекти відзначаються у частинок розміром близько 10 нм, тимчасом як для частинок значно більших 10 нм вони менш характерні, а традиційні поняття про поверхневу енергію цілком

прийнятні [29, 30].

Підсумовуючи вищесказане, можна зробити висновок, що унікальні фізичні, механічні, хімічні, оптичні, магнітні та термічні властивості зумовлені особливістю поверхні, збільшенням її по відношенню до об'єму частинки, співмірності розміру частинок з довжиною вільного пробігу електрона тощо, що призводить до зміни поверхневої енергії та заряду НЧ. При цьому поверхневі характеристики залежать від розміру, форми, а також технології одержання НЧ. Біологічні ефекти НЧ також залежать від особливостей поверхні, що, можливо, зумовлює різні механізми впливу на біооб'єкти та потребує подальшого вивчення.

Завдання збільшення тривалості та якості життя мотивує інтенсивні розробки у галузі нанобіоматеріалів. Основними напрямками розвитку є: хірургічний та стоматологічний інструментарій, діагностика і наносенсори, нанофармакологія [2, 5]. Застосування наноматеріалів є перспективним для адресної доставки лікарських речовин всередину клітини [7], розвитку високоточної ранньої діагностики захворювань [6, 44], покриття наночастинками інструментарію [45], пластин для остеосинтезу [5], створення нових протимікробних препаратів, вакцин, наноліків [7, 8, 9, 45]. Сьогодні розробляються:

- наносоми – частинки нанорозмірів, вкриті одним або декількома шарами ліпідів, подібних до ліпідів біологічних мембран. Така форма робить їх безпечними і надійними транспортними системами для доставки препаратів [6, 46, 47]

- вуглецеві наноматеріали – розрізняють фулерени та нанотрубки. Останні бувають одностінними та багатостінними, прямими і У-подібними [31, 34]. Карбонові нанотрубки застосовують частіше інших НЧ завдяки їх електричним характеристикам. Такі частинки мають на своїй поверхні багато точок, які можна функціоналізувати, наприклад, приєднати молекулу лікарської речовини [45, 47]

- НЧ металів. Перспективними для медицини препаратами є

наночастинки оксиду заліза, міді, цинку, срібла, золота, титану розміром 5 - 60 нм [48]. Такі НЧ металів можуть використовуватися як самостійно, так і покриватися органічними сполуками: декстранами, фосфоліпідами. У такому вигляді вони інгібують агрегацію і підвищують стабільність колоїдних розчинів [49, 50]. Перспективним може бути застосування таких наноматеріалів для цільової доставки лікарських речовин до патологічного осередку [7, 48].

Особливу групу становлять так звані НЧ у золотій оболонці. Це сферичні утворення нанорозмірів, які складаються з діелектричного ядра, вкритого, як оболонкою, тонким шаром металу [48, 51]. Такі НЧ, завдяки своїм оптичним і хімічним властивостям, у перспективі можуть використовуватися в біомедичній візуалізації та з терапевтичною метою як нанобіотехнологічні платформи для діагностики й адресної доставки лікарських речовин [49, 51].

Після синтезу та вивчення фізико-хімічних властивостей нового наноматеріалу важливим етапом є дослідження гострої і хронічної токсичності, кумулятивності, гено- й цитотоксичності, імунотоксичності, канцерогенних властивостей, вивчення метаболізму в організмі, а також біотрансформації в навколишньому середовищі [13, 14]. На жаль, нанотоксикологія, наука про вплив НЧ на здоров'я, відстає від прогресу нанотехнологій [52]. За минуле десятиліття до існуючої літератури про ультрадрібні частинки і волокна були додані дослідження про перші покоління нанопродуктів [53]. Ці дослідження підтвердили, що нанорозмір підвищує токсичність багатьох частинок [54, 55]. Було з'ясовано, що фулерени, нанотрубки, НЧ металів та їх оксидів, а також наноматеріали з нерегулярною або дефектною структурою виявилися токсичними сполуками [55]. Реалізація токсичних властивостей наноматеріалів забезпечується фізичною спорідненістю до біологічних структур, наприклад, за допомогою електростатичної або гідрофобної взаємодії; каталітичною дією, з активацією окисно-відновних реакцій, наприклад індукція молекул кисню і води з

утворенням пероксидних радикалів; розпадом НЧ з утворенням токсичних сполук [52, 53, 55].

Точний механізм токсичності поки не вивчений, але останні дані свідчать про роль оксидативного стресу, мітохондріальних дисфункцій і активації прозапальних генів [16, 54, 55]. Хоча токсикокінетика НЧ все ще не визначена, є докази залежності фізико-хімічних характеристик і біологічних властивостей НЧ [54, 56]. Найбільш важливі характеристики – розмір, форма, особливості поверхні [57, 58]. Розмір частинки, в першу чергу, впливає на проникність у клітину [59, 60]. Проникнення в клітину може відбуватися або шляхом ендоцитозу, або через мембранні канали завширшки 10 – 30 нм [61]. Доведено, що більшість НЧ проникають у клітину за допомогою клатринзалежного, тобто рецепторного ендоцитозу [62, 63]. Встановлено, що зі зменшенням розміру підвищується токсичність, особливо це стосується частинок менше 10 нм [64]. Мабуть, це пов'язано з підвищеною пенетрацією, можливістю проникнути в ядерний апарат і виявленими квантовими ефектами НЧ [65, 66].

Вплив форми на біологічні ефекти можна пояснити зміною площі поверхні [67]. Це припущення підтверджується тим, що найбільш активними є сферичні НЧ, тобто частинки з найбільшою питомою площею поверхні [68, 69]. Особливості поверхні, зокрема функціоналізація, покриття, крім безпосередньої взаємодії з клітинною мембраною, змінюють поверхневий заряд частинки [32, 70]. При цьому встановлено, що позитивно заряджені НЧ швидше поглинаються, ніж негативно заряджені. Це пов'язано з негативним зарядом плазматичної мембрани. Також відмічено, що позитивно заряджені частинки більш токсичні [71]. Біологічні ефекти НЧ поділяють на внутрішньоклітинні, гістопатологічні, системні [58, 69].

До внутрішньоклітинних належать: генерація вільних радикалів [72], яка призводить до оксидативного стресу [73, 74], перекисного окиснення ліпідів, і внаслідок цього, ушкодження біомембран й апоптозу [75], що є провідним біоефектом для більшості нанометалів [48, 75]; ушкодження

мітохондрій, порушення енергетичного балансу клітини [76], хромосомні порушення [77], здатність до канцерогенезу, генотоксичності [78], порушення мітотичних процесів, наприклад, внаслідок вбудовування у веретено поділу, що є характерним для вуглецевих нанотрубок [79].

Серед гістопатологічних ефектів виділяють здатність НЧ викликати фіброз і гранулематозне запалення, характерне для вуглецевих нанотрубок [80, 81].

Системні ефекти також різноманітні, ступінь їх вираженості залежить від дози і шляху введення НЧ. Підвищення периферичного опору, мікроваскулярна дисфункція, зниження вироблення NO в ендотелії судин [82, 83]; здатність проникати крізь гематоенцефалічний бар'єр, через нюховий епітелій і нюховий нерв при інгаляції підвищують ризик нейротоксичності [59, 84]. При цьому активуються механізми клітинного пошкодження ЦНС, в основі якого лежить оксидативний стрес [72, 73, 74]. Також спостерігається вплив НЧ на систему імунної відповіді [85] і неспецифічного захисту переважно за рахунок активації toll-рецепторів макрофагів [86].

Проаналізувавши літературу, можна зробити висновок про зростаючу кількість наукових експериментів у галузі нанотоксикології [16, 52, 68]. При цьому властивості наноматеріалів і нанокомпозитів залежать від розмірів, форми, поверхневих характеристик, причому зміни яких не завжди лінійні за характером [57, 58, 60]. Це ускладнює аналіз і порівняння одержаних результатів. Застосування ультрависоких доз НЧ *in vitro* на культурах клітин для визначення токсичності важко екстраполювати для людини [58, 59]. Відкритою проблемою нанотоксикології є велика кількість досліджень з використанням різних за розміром, формою та складом НЧ, результати яких суперечливі, ненадійні та нерегульовані [58, 59, 69]. Сьогодні не досліджений цілий аспект тривалого перебування наноматеріалів у організмі людини [59, 69, 87]. Немає даних про взаємодію між собою різних нанопродуктів [57, 59]. Залишається відкритим питання трансформації та міграції НЧ у

навколишньому середовищі [54, 57, 60], а також категоризація НЧ згідно з їх можливим ризиком [88]. Найбільш вивченими залишаються морфологічні зміни, що виникають при взаємодії з НЧ вуглецю- нанотрубками, що може бути пов'язано з більш стрімким і успішним розвитком технологій ожержання та застосування нанотрубок [79, 80, 81], проте ефекти, що виникають при взаємодії з нанометалами вивчені недостатньо та потребують подальшого дослідження.

1.2. Біологічні ефекти нанометалів

Загальновідомо, що багато металів життєво важливі для функціонування організму, тому що каталізують біохімічні реакції, одночасно є необхідними мікроелементами і токсичними важкими металами [48, 88]. При цьому слід враховувати, що НЧ металів мають високу реактивну здатність і активний метаболізм у живих об'єктах [89]. Хоча зміни, що виникають у тканинах при взаємодії з нанометалами, вивчені недостатньо. Отже, вивчення впливу НЧ металів на біологічні об'єкти є актуальним і необхідним для розвитку використання нанометалів у медичному інструментарії, створення нових медикаментів, способів діагностики [48, 49].

Сьогодні синтезовані НЧ багатьох металів. Серед усього розмаїття існуючих НЧ металів особливої уваги заслуговують НЧ золота, срібла, міді, заліза, цинку, так звані пріоритетні нанометали [2, 3, 48] через їх оптичні властивості (зокрема, золото і срібло) і «композитних» структур на їх основі. А саме наявність локалізованого поверхневого плазмонного резонансу (ППР), що виділяє їх серед НЧ металів [41, 42, 90]. Стосовно медицини і біології засновані на використанні ППР нанотехнології можуть бути використані для створення різного роду сенсорів [91, 92, 93], діагностики та лікування пухлин та інших захворювань [94], спрямованої доставки ліків [94, 95] тощо. При всій різноманітності наявних експериментальних робіт можна

виділити загальні закономірності: основним механізмом дії НЧ срібла, міді, заліза, цинку є оксидативний стрес [74, 89], активація ROS-комплексу [96], порушення системи ПОЛ [97] і внаслідок цього ушкодження плазматичних мембран еукаріотичних клітин, ушкодження мітохондрій, енергетичний дисбаланс і, насамкінець, клітинна смерть [73, 89, 98]. При цьому дані літератури про подібні цитотоксичні ефекти НЧ золота суперечливі [98, 99]. Можливо, що подібна відмінність між НЧ металів пояснюється наявністю так званого справжнього наноефекту (кінетичне прискорення електронів через розмір НЧ) у срібла, заліза і його відсутності у нанозолота [40].

Генотоксичні ефекти нанометалів пов'язані зі здатністю НЧ металів, зокрема міді, золота, проникати в ядерний апарат клітини, зв'язуватися з гуаніновими залишками молекули ДНК і порушувати її структуру [77, 78]. Генотоксичні ефекти нанозолота можуть пояснюватися здатністю специфічно вбудовуватися у велику борозенку ДНК, але цей ефект спостерігається тільки при використанні частинок розміром 1,4 нм [98]. Мутагенні ефекти НЧ золота, срібла, заліза і міді не встановлені [93, 94, 95], подібний ефект відзначається у наноцинку і нанокобальту [77, 78]. Даних літератури про тератогенну дію НЧ металів недостатньо [87, 100].

Крім токсичного впливу, відзначено велику кількість позитивних ефектів НЧ металів [100]. Встановлено здатність НЧ золота розміром 20 і 30 нм стабілізувати клітинну оболонку, змінювати активність багатьох ферментів, наприклад, Н⁺-АТФ-азну активність мембранної фракції та β-лактамазну активність клітин [101, 102]. Відмічено позитивний вплив НЧ золота на синтез колагену 1-го типу [103]. Незважаючи на деякі дослідження, що вказують на негативний вплив НЧ золота на фібробласти [104], є велика кількість даних літератури, що підтверджують біосумісність НЧ золота і дермальних фібробластів, а також стимулювання синтетичних процесів у фібробластах під їх впливом [105, 106]. Відомий вплив солей золота на імунну систему. Ефект полягає в інгібуванні моноцит-індукованої проліферації лімфоцитів [107]. Цікавою також є взаємодія НЧ золота з

антигенпредставляючими клітинами (АПК) макрофагами, дендритними клітинами, клітинами Лангерганса [107]. Наночастинки захоплюються АПК, після чого представляються імунокомпетентним клітинам [108, 109, 110]. Цей феномен використовують для створення нановакцин, у тому числі транскутальних [108, 109]. Також є дані про взаємодію НЧ золота з ендотеліальними клітинами, що призводить до інгібування VEGF і антиангіогенного ефекту [111]. Хоча є й протилежні дані, що вказують на ангіогенний ефект НЧ золота [112]. Імовірно, це зумовлено вивченням різних за формою, розміром та зарядом НЧ [113, 114].

Наночастинки міді здатні проникати всередину пухлинних клітин і порушувати їх синтетичний апарат [115]. Унікальні оптичні властивості НЧ цинку і його оксидів використовуються для захисту шкіри від УФ опромінення [116, 117], однак є дані про негативну дію на дермальні фібробласти [116, 118]. Фототоксичність НЧ оксиду титану і його здатність проникати в шкіру також знаходить медичне застосування [119, 120]. Здатність НЧ CdSe проникати в шкіру широко досліджується у зв'язку з можливим розвитком професійної патології [121]. Під впливом НЧ церію відзначається прискорення регенераційного процесу в шкірі за рахунок прискореної проліферації та міграції фібробластів і кератиноцитів [122]. Також активуючу дію на проліферацію клітин при регенерації ран мають НЧ заліза і магнію [123]. Крім того, наявність магнетичних властивостей у цих НЧ виділяють їх серед інших і розширюють можливості для керованої доставки лікарських речовин [124] і променевої терапії [125].

Значний науково-практичний інтерес становить дослідження препаратів наносрібла [126, 127]. Колоїдне срібло відоме ще з давніх часів і використовувалося з лікувальною метою завдяки своїм антибактеріальним властивостям [5, 48]. Відомо, що біоцидний ефект НЧ срібла істотно перевищує дію іонів срібла в цих же концентраціях [127]. Наводяться приклади успішного застосування нанопрепаратів срібла при лікуванні остеомієліту [127], гнійних ран [128, 129], опікових поверхонь [130], у

комплексному лікуванні бактеріального вагінозу, хронічних запальних захворювань органів малого таза, а також у хірургії, травматології [48], ветеринарії [35] та ін. Таким чином, застосування НЧ срібла дозволяє значно знизити концентрацію срібла в лікарських формах зі збереженням бактерицидної активності [12, 48, 127]. Наночастинки срібла активні проти мікроорганізмів, стійких до антибіотиків [130], що зумовлює можливість їх застосування для лікування багатьох інфекційних хвороб, до того ж є дані, що підтверджують синергізм НЧ срібла і деяких антибіотиків [131]. При цьому деякі НЧ срібла стимулюють проліферацію власних клітин і негативно впливають на бактерії [132].

Таким чином, виходячи з даних літератури, можна зробити висновок, що найбільш актуальним і практично значущим є дослідження впливу на організм НЧ срібла, враховуючи його широкі можливості застосування в медицині й особливості механізмів впливу на клітини, пов'язані з особливостями структури НЧ (наявність «справжнього наноефекту», плазмонного резонансу).

Срібло є одним з найбільш послідовно вивчених на токсичність НЧ. Використання НЧ срібла в медичних і фармацевтичних галузях зумовлене широким антибактеріальним і протигрибковим спектром [133, 134], високою реакційною здатністю, що робить їх поверхні зручними для модифікації та функціоналізації за допомогою декількох біомолекул, що використовується в доставці ліків [135, 136], та спорідненістю НЧ срібла до молекул, які містять тіолові або аміногрупи [136].

НЧ срібла мають сильний бактерицидний ефект [137]. Результати останніх досліджень показали, що механізм цього ефекту заснований на тому, що метал зв'язується з мікробними білками в реакцію тіолових груп, і це призводить до інактивації білка. Цей процес вважається найбільш значущим серед усіх інших [137, 138]. При цьому важливий вплив на мРНК, що також змінює активність білкового синтезу [138]. Не слід забувати про доведену залежність антибактеріальної активності НЧ срібла від їх форми і

розміру [139, 140].

Точний механізм антимікробного ефекту НЧ срібла невідомий, але поява активних форм кисню (ROS) і окиснювальний стрес – два ймовірних пояснення. Наносріблоіндукований апоптоз пов'язаний з генерацією активних форм кисню і JNK-активацією, індукованою звільненням цитохрому С у цитозоль і транслокацією Вах в мітохондріях, що вказує на те, що механізм наносріблоопосередкованого апоптозу є мітохондріальнозалежним [99, 140, 141].

Специфіка токсичного впливу НЧ срібла на мікроорганізми потребує з'ясування для виключення їх потенційно несприятливого впливу на інші типи клітин в організмі [12]. Тривале застосування катіона срібла може викликати доброякісний стан, відомий як аргірія, що характеризується сіро-блакитним кольором шкіри і печінки, спричиненим осіданням частинок Ag в базальній мембрані тканин.

Вивчено механізм надходження НЧ срібла в клітину. Так само, як і інші НЧ, частинки срібла потрапляють всередину шляхом клатрин-залежного ендоцитозу [63], взаємодіючи при цьому з toll-like рецепторами 2-го типу [141]. Цей механізм проникнення НЧ у клітину відомий в літературі, як «ефект троянського коня», тому що потрапляючи всередину і вивільняючи іони, клітини НЧ металу індукують утворення реактивних форм кисню [142].

Крім того, численні дослідження токсичності НЧ срібла були проведені на клітинних лініях, у тому числі фібробластів миші, печінки щурів, гепатоцелюлярного раку людини і клітин раку шкіри [143, 144]. У всіх випадках спостерігається зростання ROS і окисного стресу, що призводить до мітохондріальної дисфункції, енергетичного дисбалансу, опосередкованої загибелі клітин і апоптозу [145]. При надмірному підвищенні ROS перевищує антиоксидантну систему клітини [146, 147], розвиваються окисний стрес [148], подальша продукція медіаторів запалення, ушкодження ДНК [149], порушення процесів глікозилювання ДНК та її репарації [150], апоптоз [151].

Заслуговують на увагу механізми впливу НЧ на клітинний цикл. Є дані,

що НЧ срібла призводять до блокади G2 / M переходу [152], хоча інші дані літератури вказують на підвищення проліферативної активності клітин під впливом НЧ срібла [132, 153].

Характер біологічних ефектів нанометалів і ступінь їх прояву завжди залежать від концентрації і особливостей поверхні. Слід зауважити, що при вивченні ефектів НЧ металів основні дослідження присвячені змінам на клітинному рівні, тимчасом як морфологічних даних, що описують зміни на тканинному рівні, в цілому недостатньо.

1.3. Морфофункціональні зрушення в тканинах шкіри за умов впливу наночастинок срібла

Ефект НЧ безпосередньо залежить від шляху та способу введення. Найактуальнішими «вхідними воротами», виходячи з літературних даних, є легені, слизова оболонка шлунково-кишкового тракту, шкіра [10, 52, 57]. Шкіра є найбільшим органом тіла і виконує функцію першої лінії бар'єру між навколишнім середовищем і внутрішніми органами людського тіла [154]. Отже, зовнішньо застосовані НЧ потенційно можуть проникати в шкіру і надавати як місцеві, так і системні токсичні ефекти, потрапляючи в системний кровообіг [11]. Крім того, транскутальне введення ліків, у тому числі через шкірну вакцинацію, знаходиться в стадії активної розробки і є дуже перспективним і багатообіцяючим напрямом [12, 109, 110]. Вищесказане робить вивчення особливостей взаємодії НЧ срібла зі шкірою актуальним.

Розміри НЧ вважаються найбільш важливими параметрами, тому що проникнення в шкіру може відбуватися через волосяні пори (діаметр 10 – 70 нм), пори потових залоз (діаметр 60 – 80 нм), а найчастіше – через ліпідну матрицю, яка заповнює щілини 75 нм між корнеоцитами *stratum corneum*. Крім того, в шкірі існують ліпофільний-гідрофільний градієнт і градієнт рН. Слід також враховувати ізоелектричну точку шкіри. Нині визнано, що вона

знаходиться між 3,5 і 4,8, це означає, що шкіра негативно заряджена за фізіологічних умов [154]. Отже, можна припустити, що проникнення НЧ, розміри яких порівняні зі шкірними отворами, залежить від їх поверхневих зарядів та інших характеристик [155]. Це підтверджується численними експериментальними роботами, які довели, що в шкіру проникають НЧ розміром до 75 нм, при цьому спостерігається залежність між проникненням в шкіру і характеристиками покриття НЧ [156, 157, 158]. Samberg et al (2010) продемонстрували, що при аплікації проникнення частинок відбувається тільки в поверхневій шарі рогового шару [159, 160].

Дані літератури описують значну токсичність НЧ срібла без покриття на людські епідермальні кератиноцити, зниження кількості мітозів у епітеліальних клітинах, що пов'язано з блокуванням G2/M періоду [152]. При контакті НЧ срібла з клітинами епідермісу мікроскопічно спостерігалися дозозалежні набряки, гіперплазія [161]. З другого боку, є дані про підвищення проліферації та міграції кератиноцитів у рані під впливом НЧ срібла [162]. При цьому досліджувалися різні за розміром і покриттям НЧ, що може зумовлювати розбіжності одержаних результатів [163, 164]. Це потребує детального вивчення кінетики та функціональної активності кератиноцитів під впливом НЧ срібла різних розмірів.

Серед внутрішньоклітинних ефектів НЧ срібла викликає інтерес порушення цитоскелета. Механізм інтерналізації пояснюється деградацією важкого ланцюга клатрину, при цьому кавеолін не піддається зміні. Ці дані підтверджуються впливом НЧ срібла на білковий синтез в фібробластах, у тому числі колагену [165, 166].

За умов контакту з неушкодженою шкірою наносрібло не проникає в дерму, а проникає тільки в поверхневій шарі шкіри, але при контакті з клітинами дерми, в першу чергу, НЧ взаємодіють з дендритними клітинами [167, 168], а також з фібробластами [169]. При взаємодії механоцитів з НЧ спостерігається інтерналізація НЧ у цитоплазму, при цьому проникнення крізь ядерну оболонку не спостерігається [170]. При контакті з

фібробластами наносрібло індукує дозо- і розмірозалежний апоптоз мітохондріальним шляхом [141, 142]. Проте є дані, що підтверджують стимулювальну дію наносрібла на фібробласти [171]. Також є повідомлення про вплив НЧ срібла на синтез колагену шляхом впливу на білковий синтез фібробластів і активацію фіброгенних цитокінів [172, 173]. При цьому деспозиція колагену сприяє загоєнню ран «за ембріональним типом» [171].

У зв'язку з впливом НЧ на синтез колагену та інших білків міжклітинного матриксу, заслуговують на увагу дані літератури про безпосередню дію на полімеризацію колагену 1-го типу, зміни 3D будови колагенової сітки, механічних властивостей матриксу, що позитивно впливає на стан шкіри і загоєння ран [171]. З другого боку, відомо, що присутність НЧ срібла призводить до порушення синтезу міжклітинної речовини [174]. Такі суперечливі дані пояснюються різними розмірами і способом отримання НЧ та потребують подальшого вивчення.

Натомість відсутні дослідження присвячені взаємодії НЧ срібла з базальною мембраною епідермісу. Враховуючи доведений вплив НЧ на синтез фібрилярних білків і міжклітинної речовини сполучної тканини, можна припустити істотний вплив НЧ срібла на морфофункціональні властивості базальної мембрани.

Є дані про гістопатологічні ефекти НЧ. Так, наносрібло значно знижує запальні процеси шляхом зменшення рівня нейтрофільної інфільтрації дерми після введення НЧ срібла [175]. До того ж частинки наносрібла діють на активність фагоцитозу [176], зміну продукції цитокінів, тим самим впливаючи на імунну відповідь і викликаючи протизапальний ефект [177, 178]. З другого боку, в дослідженні доведено розвиток гранульозного запалення після експозиції НЧ срібла.

Цікаві дані про вплив НЧ на диференціацію клітин. Згідно з джерелами літератури, НЧ срібла значно знижують функціональну активність стовбурових клітин шкіри [179], при цьому описана можливість їх активації, що може застосовуватися при загоєнні ран [171]. Доведено, що НЧ срібла

активізують диференціювання фібробластів у міофібробласти [166]. Також є дані про зміну диференціювання стовбурових клітин шкіри в механоцити під впливом НЧ срібла [171]. Ці суперечливі дані потребують уточнення і вивчення кінетики клітинної популяції фібробластів під впливом НЧ.

Морфологічні зміни в судинному руслі шкіри під впливом НЧ описані недостатньо. Є поодинокі дані про антиангіогенні ефекти НЧ срібла [180], пов'язані з інгібуванням VEGF індукованої проліферації [181], хоча інші дослідження підтверджують ангіогенний ефект НЧ срібла при загоєнні ран [182]. Це ще раз доводить необхідність розширення досліджень морфологічних змін у тканинах шкіри під впливом НЧ.

Тенденції, які намітилися останнім часом у літературі, припускають, що переваги штучних наночастинок для застосування в медицині, фармакології, косметиці як інструмент для вивчення організму переважають потенційні проблеми токсичності [1, 2]. При цьому властивості наноматеріалів і нанокомпозитів вивчені недостатньо. Ускладнює аналіз і порівняння одержаних результатів те, що ефект НЧ залежить від розмірів, форми, поверхневих характеристик, при чому зазначені властивості НЧ не завжди лінійні за характером [22]. Біологічні ефекти НЧ безпосередньо залежать від шляху та способу введення [13]. Шкіра є найбільш перспективним і найпоширенішим місцем контакту з НЧ. [11, 36]. Існуючі дослідження характеризують особливості та глибину проникнення наносрібла в шкіру. Доведено, що при простому контакті нанометалів зі здоровою шкірою, глибина проникнення нанометалів залежить від розміру НЧ, поверхневого заряду й особливостей покриття та рельєфу поверхні [36, 155]. Також доведено, що НЧ срібла при контакті зі здоровою шкірою проникають тільки в поверхневі шари епідермісу [159]. Є дані, що описують різні реакції епітеліоцитів, дендритних клітин, фібробластів при введенні наносрібла. Багато з них суперечать один одному, що може бути пов'язано з дослідженням різних за розміром і формою НЧ срібла. При цьому слід зазначити, що існують роботи, присвячені внутрішньоклітинним змінам за

умов впливу НЧ, а морфологічних робіт, що описують зміни, які відбуваються в тканинах, недостатньо. Так, потребують детального вивчення кінетика і функціональна активність кератиноцитів. Також недостатньо висвітлені ефекти від взаємодії НЧ з дендритними клітинами дерми і клітинами Лангерганса, зміна функціональної активності фібробластів, кінетики їх популяції, архітекtonіки та кількості волокон шкіри, зміни структури базальної мембрани. Потрібна деталізація ефектів НЧ срібла на імунокомпетентні й антигенпрезентуючі клітини шкіри, зміни мітотичної активності в епідермісі та дермі залежно від розміру частинок, їх покриття і глибини їх проникнення.

Недостатньо даних про морфологічні зміни в тканинах. Так, не до кінця вивчено вплив НЧ срібла на процес запалення, ангиогенез, порушення фібро-і ангиоархітекtonіки, що потребує системного підходу до тканинних змін. Також потрібний аналіз залежності морфофункціональних змін у тканинах від розмірів НЧ срібла.

Результати аналізу опрацьованої наукової літератури оприлюднено в таких публікаціях: [183].

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Моделювання експериментальних досліджень

У ході дослідження були використані 303 щура самця лінії Вістар віком 3 місяці, середній показник маси тіла яких становив 180 ± 10 г. Тварини утримувалися в стандартних умовах експериментально-біологічної клініки Одеського національного медичного університету згідно з науково-практичними рекомендаціями з утримання лабораторних тварин та роботи з ними [184]. Експеримент виконувався з дотриманням норм Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» № 27, ст. 230, від 2006 зі змінами, внесеними згідно із Законом № 1759-VI (1759-17) від 15.12.2009, 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).

Колоїдні розчини НЧ вводили за умов місцевої анестезії 2%-ним розчином лідокаїну шляхом внутрішньошкірних ін'єкцій. Ін'єкції виконувалися одноразовими інсуліновими шприцями «Мікро-Файн» Demi, 0,01 мл розчину вводили у ділянку холки на глибину 120 мкм за допомогою голки з міткою. В подальшому щоденно відмічали місце проведення ін'єкції аніліновими барвниками.

Тварин розподілили на 3 групи.

Група 1 (контрольна) складалася з трьох підгруп:

1) інтактні тварини.

2) щури, яким вводили 0,01 мл 0,9%-ного розчину NaCl внутрішньошкірно. Використовувався «Натрія хлорид» розчин для ін'єкцій 0,9 % в ампулах по 5 мл (виробник ТОВ «НІКО», Україна Р.П. № UA / 0652/02/01 від 30.07.2009).

3) щури, яким вводився 0,01 мл 0,5%-ного розчину цитрата натрія *ex tempore* внутрішньошкірно.

Група 2 (група порівняння) складалася зі щурів, які одержували 0,01 мл 2%-ного колоїдного розчину іонізованого срібла внутрішньошкірно.

Група 3 (експериментальна) складалася зі щурів, яким вводили 0,01 мл колоїдного розчину НЧ срібла концентрацією 0,2 мг/мл внутрішньошкірно. Група була поділена на три підгрупи залежно від розміру НЧ срібла, які вводили у шкіру. В експерименті використовувалися колоїдні розчини НЧ срібла розмірами 20, 30, 70 нм.

Кількісний розподіл тварин за підгрупами представлено в табл. 2.1.

Таблиця 2.1

Кількісний розподіл експериментальних тварин за групами

№ групи	Вплив	Термін спостереження (доба)							Σ
		1	3	7	14	21	30	45	
1.1	Інтактні								9
1.2	Р-н NaCl	6	6	6	6	6	6	6	42
1.3	Р-н цитрату натрія	6	6	6	6	6	6	6	42
2	Іони срібла	6	6	12	12	9	6	6	57
3.1	НЧ срібла 20 нм	6	6	9	9	6	6	6	48
3.2	НЧ срібла 30 нм	6	6	12	12	9	6	6	57
3.3	НЧ срібла 70 нм	6	6	9	9	6	6	6	48

Тварин виводили з експерименту на 1-шу, 3-тю, 7-му, 14-ту, 21-шу, 30-ту, 45-ту добу після внутрішньошкірного введення розчинів шляхом передозування ефірного наркозу.

2.2. Методики експериментальних досліджень

Для світлової мікроскопії матеріал фіксували у 10%-ному нейтраль-

ному формаліні та заливали гістаміксом («Біовитрум», Росія) [185], готували постійні гістологічні препарати. Зрізи завтовшки 5-7 мкм забарвлювали гематоксиліном та еозином для оцінки морфологічних змін тканин шкіри. Забарвлення толуїдиновим синім використовували для диференціювання та вивчення функціональної активності тучних клітин. Для визначення стану основної речовини використовувалися забарвлення за Ван Гізоном, резорцин-фуксин і трихром за Массоном. Для з'ясування стану та функціональної активності ядер застосовували забарвлення за Фельгеном, за Браше. Для вивчення стану базальної мембрани використовували забарвлення за Шиффом [185].

Постійні гістологічні препарати досліджували методом світлової мікроскопії на мікроскопі "Zeiss Axiostar plus", обладнаному системою відеоаналізу зображень. Морфометричні дослідження одержаних зображень виконували з використанням програми «ВидеоТест-Морфологія» («ВидеоТест», Росія; серійний номер B2715466061102132580/700). Одержані зображення і цифрові дані зберігали в архіві, створеному за допомогою вищезазначеного програмного забезпечення.

У місці введення НЧ підраховували кількість фібробластів і фіброцитів, гранулоцитів, мононуклеарних клітин, тканинних базофілів, макрофагів, плазматичних клітин, ендотеліоцитів (на 500 клітин). За результатами первинних підрахунків обчислювали відсоткове співвідношення різних клітин [186].

Для оцінки внутрішньодиферонної гетероморфії та ступеня зрілості фібробластів використовували ядерно-цитоплазматичний індекс (ЯЦІ), як основну диференційну ознаку [187]. Визначали ЯЦІ морфометрично. Також морфометрично обчислювали питому площу колагенових волокон для оцінки їх кількості [186].

Зметою визначення морфофункціонального стану тучних клітин використовувалися такі дані: кількість клітин на одиницю площі ($0,01 \text{ мм}^2$) й індекс дегрануляції, який є відношенням клітин, що дегранулюють до

загальної кількості клітин.

Для оцінки мікроциркуляторного русла шкіри визначали діаметр судин шкірних сплетень. Обчислювали питому площу поверхні судин [188, 189].

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 OsO₄ при тому ж рН буферного розчину. Потім зразки зневоднювали в спиртах висхідної міцності. Просочення матеріалу та його ущільнення проводилося в суміші епон-аралдит. Ультратонкі зрізи завтовшки 50-70 нм контрастували за методикою Reynolds [190]. Матеріал вивчали під електронним мікроскопом ПЕМ-100 – 01 (SELMІ, Україна).

На електронних мікрофотографіях при кінцевому збільшенні в 10000 разів проводили стереометричні дослідження. Застосовували універсальну сітку Вейбелла, що містить 144 тест-точки, довжина тест-лінії – 4,2 мм. На кожний термін досліджували не менше 25 електронних мікрофотографій. Дотримувалася випадкова орієнтація сітки відносно поверхні фотографії [191]. При накладанні морфометричної сітки на електронні мікрофотографії були одержані такі 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 отримання первинних даних вираховували наступні параметри органел клітин в 10 мкм площі зрізу цитоплазми: V_{mx} - об'ємна частка мітохондрій; $V_{зЕС}$ - об'ємна частка гранулярної ендоплазматичної сітки; $V_{кГ}$ - об'ємна частка комплексу Гольджі. Після цього, за даними особливостей ультраструктурної будови визначали співвідношення різних функціональних типів макрофагів, серед яких розрізняли: фагоцитарний, секретуючий та моноцитарний залежно від переважання органел [192]. Також ультраструктурні особливості будови органел використовували для визначення функціонального стану фібробластів [191].

2.3. Характеристика наночастинок срібла

Доведена наявність формо- і розмірозалежного ефектів НЧ [16, 27] приводить до необхідності обґрунтування вибору форми і розміру НЧ для подальших досліджень. При виборі розмірів і форми НЧ ми керувалися питаннями їх токсичності та функціональної активності. Враховуючи дані літератури, які вказують на пряму залежність функціональної активності НЧ і питомої площі поверхні [27, 28], найбільш активними є сферичні НЧ [114, 139]. Виходячи з даних літератури, у НЧ срібла розміром 30 нм відсутній цитотоксичний, мутагенний і генотоксичний ефекти [164]. Отже, ця частинка найбільш перспективна для застосування в медицині. Для оцінки розмірозалежних ефектів застосовувалися ще два розміри НЧ срібла: НЧ розміром 20 нм, згідно з даними літератури, характеризуються токсичним ефектом на фібробласти та кератиноцити [69, 143], а НЧ розміром 70 нм не мають токсичного впливу, але є найбільшими, які здатні проникати в неушкоджену шкіру [155].

У даній роботі для отримання НЧ срібла, застосовували цитратний метод, у якому цитрат натрію ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) виконував функції як відновника, так і стабілізатора частинок. Вибір цитратного методу синтезу НЧ пояснюється мінімальною токсичністю цитрату натрію.

У типовій методиці синтезу до розчину нітрату срібла (AgNO_3) певної концентрації додавали такий же об'єм розчину відновника (цитрат натрію). Швидке та рівномірне нагрівання усього об'єму реакційного розчину забезпечувалося за допомогою магнітної мішалки з підігрівом, що сприяло однорідності складу в умовах нуклеації та росту зародків.

Синтез НЧ проводився за такими технологічними параметрами:

- еквімолярні концентрації AgNO_3 і $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$: $5 \cdot 10^{-4}$ М;
- відношення концентрацій $(\text{AgNO}_3)/(\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7) = 1:4$;
- температура синтезу – 100 °С; час синтезу, 60 хв.:

Застосовані параметри синтезу з використанням натрію цитрату

дозволили одержати НЧ срібла сферичної форми (рис. 2.1).

Для визначення середнього розміру НЧ срібла застосовувався метод лазерної кореляційної спектроскопії [193]. В основі методу лежало експериментальне визначення характерного часу розсіювання досліджуваним об'єктом монохроматичного випромінювання. У разі дифузії в однорідному середовищі НЧ характерний час розсіяного випромінювання визначався при побудові кореляційної функції інтенсивності монохроматичного випромінювання розсіяного світла.

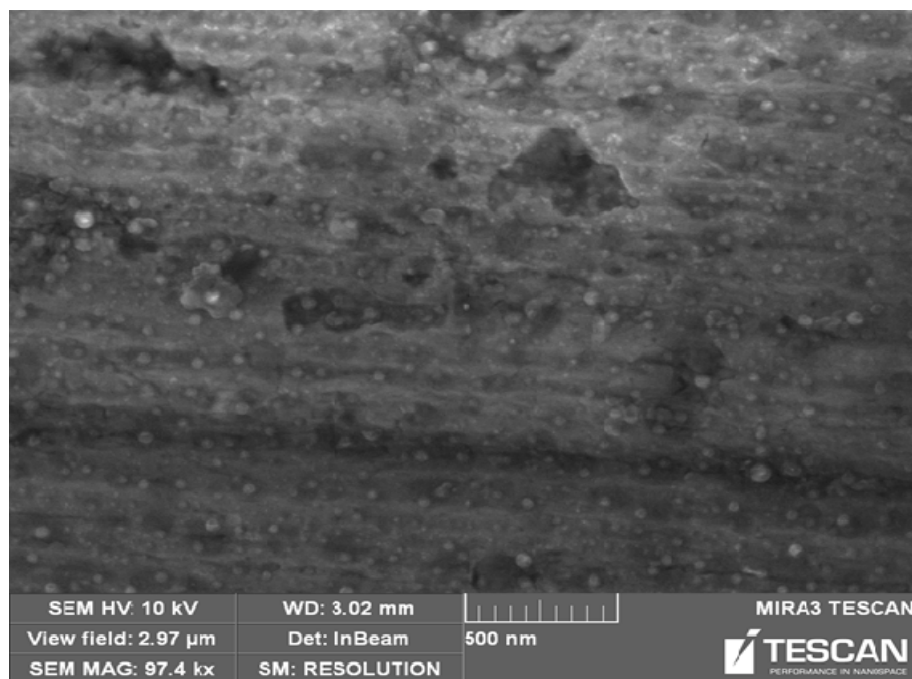


Рис. 2.1 Наночастинки срібла розміром 30 нм. Растрова електронна мікроскопія. $\times 97400$.

У нашому випадку розрахунок розміру НЧ методом лазерної кореляційної спектроскопії був проведений шляхом порівняння кореляційних функцій розсіювання колоїдного розчину, що містив НЧ срібла, і розчину з еталонним об'єктом, яким була розведена водна суспензія латексу. Діаметр частинок латексу, згідно з паспортними даними, дорівнював $(0,06 \pm 0,003)$ мкм. У цьому разі розмір оптичних неоднорідностей, спричинених наявністю розсіювальних об'єктів, визначався за формулою [193]:

$$d_{i\pm} = d_{\text{латекс}} \frac{\tau_{i\pm}}{\tau_{\text{латекс}}}$$

де $d_{\text{латекс}}$, $d_{i\pm}$ - діаметри частинки латексу і досліджуваної НЧ,

$\tau_{\text{латекс}}$ та $\tau_{i\pm}$ - характерний час розсіювання монохроматичного світла, одержаний за зразком порівняння (латекс) і на досліджуваних НЧ срібла, дорівнюють, відповідно, 180 мкс і 90 мкс.

Утворення і збільшення частинок залежало від технологічних параметрів синтезу (концентрації та співвідношення концентрацій вихідних компонентів, швидкості введення реактивів у середовище, рН розчину). Утворенню НЧ срібла відповідала поява у спектрі поглинання смуги, максимум якої визначався розміром НЧ (рис 2.2).

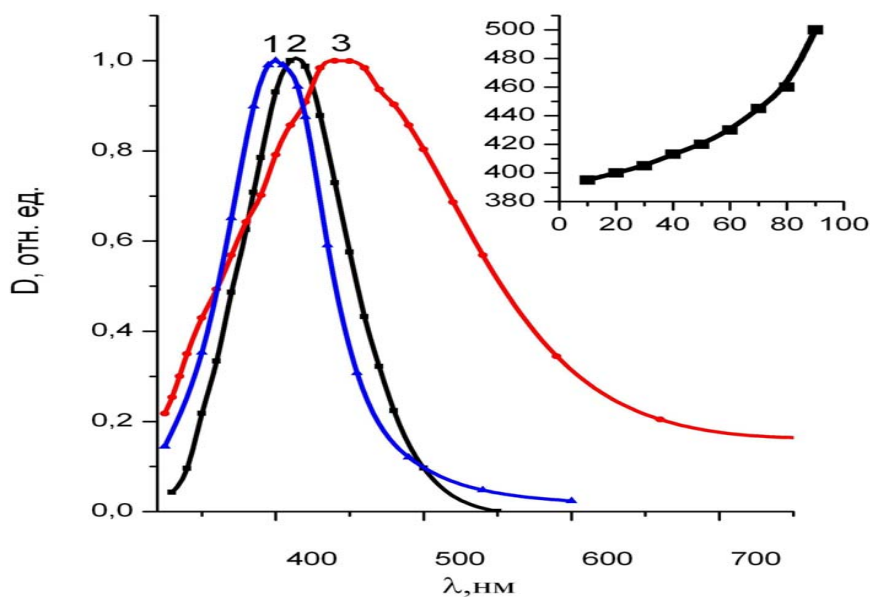


Рис. 2.2. Спектри поглинання НЧ срібла розмірів: 20 нм (1); 30 нм (2); 70 нм (3). Залежність положення максимуму локального поверхневого плазмонного резонансу від розміру НЧ.

Природа цієї смуги пов'язувалась з локальним поверхневим

плазмонним резонансом (ЛППР). На рис. 2.2 (А) приведені спектри поглинання НЧ срібла різних розмірів. На рис. 2.2 (Б) показана експериментально встановлена залежність положення максимуму ЛППР від розмірів НЧ срібла.

Нами були одержані НЧ срібла, максимум ЛППР яких локалізовано у ділянці довжин хвиль 400, 413 і 445 нм, що відповідало розмірам НЧ срібла 20, 30 і 70 нм.

Виходячи із цих даних, розмір НЧ срібла дорівнював 20, 30 і 70 нм, що узгоджувалося з показниками, одержаними іншими методами (оптичне поглинання, електронно-мікроскопічний). Усі одержані частинки мали сферичну форму. Використовувалися колоїдні розчини концентрацією 0,2 мг/мл. Синтез НЧ срібла проводився на базі НДІ фізики ОНУ ім. Мечникова.

2.4. Статистичні методи дослідження

Усі кількісні результати досліджень піддавалися статистичній обробці. Для визначення необхідного об'єму вибірки визначали наближене значення середньої арифметичної та середнього квадратичного відхилення [194]:

$$x = \frac{x_{\max} + x_{\min}}{2},$$

$$s_x = \frac{x_{\max} - x_{\min}}{K}$$

де x – середня арифметична;

x_{\min} і x_{\max} – ліміти значень параметра;

s_x – середнє квадратичне відхилення;

K – коефіцієнт, що встановлюється в залежності від об'єму вибірки.

Визначення необхідного об'єму вибірки встановлювали за формулою:

$$n = \frac{t^2 s_x^2}{\Delta^2},$$

де n – чисельність вибірки;

t – нормоване відхилення, з яким пов'язаний той чи інший рівень значущості;

s_x – вибіркова дисперсія;

Δ - величина, що визначає межі довірчого інтервалу.

Перед проведенням математичної обробки даних за кожним вивченим параметром виконували графічний аналіз статистичного розподілення величин. Відповідність одержаних розподілень якому-небудь зі стандартних розподілів оцінювали за допомогою критерію J Ястремського.

У тому разі, якщо одержане в роботі статистичне розподілення відповідало нормальному розподілу Гаусса, одержані в дослідженні кількісні дані піддавали статистичній обробці, яка включала визначення таких характеристик: \bar{x} - середня арифметична; s_x^2 - дисперсія; s_x – середнє квадратичне відхилення; s_s – помилка середнього квадратичного відхилення; C_v – коефіцієнт варіації. Для обчислення зазначених характеристик використовували методи варіаційної статистики [194].

Визначення достовірності відмінностей між вибірками проводили з урахуванням t-критерію Стьюдента. У тому випадку, якщо отримане в дослідженні емпіричне розподілення не відповідало нормальному закону, оцінку відмінностей між вибірками оцінювали за допомогою непараметричних критеріїв Вілкоксона, Манна-Уїтні за методикою, викладеною у [194].

РОЗДІЛ 3

МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА ШКІРИ ЩУРІВ КОНТРОЛЬНИХ ГРУП.

3.1. Морфофункціональна характеристика шкіри щурів інтактної групи

Поверхня шкіри спини щурів інтактної групи мала дрібноскладчастий рельєф, а її товщина складала 1,2-1,4 мм. Мікроскопічно вона побудована багатошаровим плоским зроговілим епітелієм, дермою та гіподермою, в якій, крім адипоцитів, знаходились волокна поперечно-м'язової тканини шкірного м'яза. Епідерміс утворений базальним, шипуватим, зернистим і роговим шарами (рис. 3.1).

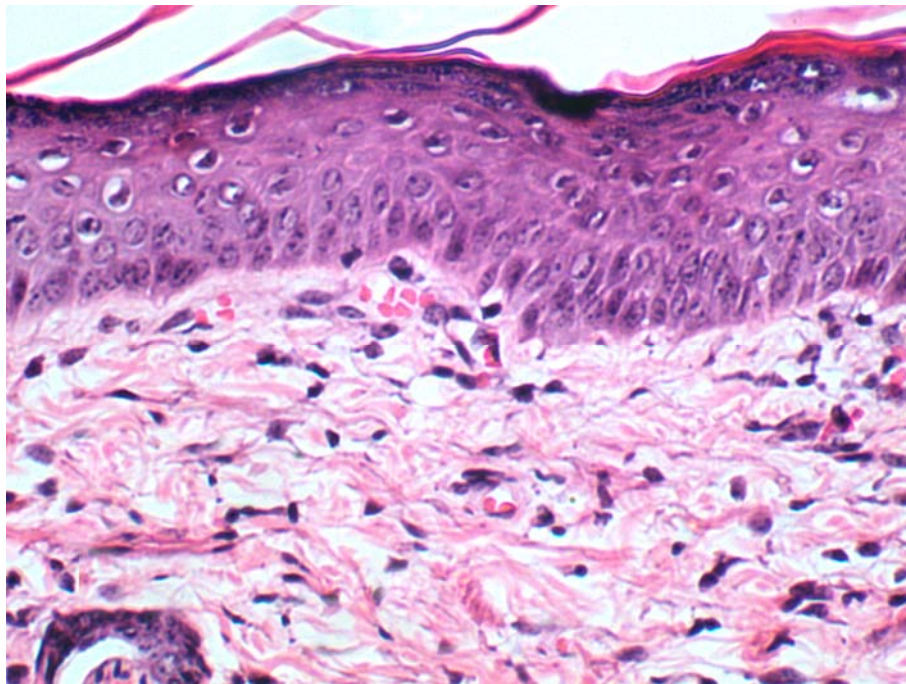


Рис. 3.1. Мікроскопічна організація шкіри щура інтактної групи. Епідерміс та дерма. Забарвлення гематоксиліном-еозином. $\times 200$.

Епітеліальний пласт спини тварин мав відносно рівномірну товщину - 13-19 мкм. Він містив 1-2 ряди клітин базального, 2-3 ряди кератиноцитів

зернистого шарів. Вище знаходився зернистий, який складали епітеліоцити, що мали в цитоплазмі інтенсивно зафарбовані грудки кератогіаліну. Роговий шар представлений роговими лусочками.

Епідерміс відокремлений від дерми шкіри базальною мембраною, своєрідною гомогенною пластинкою, що обмежена плазмолемою кератиноцитів базального шару, а з боку сполучної тканини немає чіткої границі.

Пухка сполучна тканина сосочкового шару дерми утворювала невеликі сосочки. Субепідермальний шар мав товщину 200-250 мкм. Сітчастий шар дерми був в 2-3 рази товстіший субепідермального і мав товщину 450-650 мкм. Дерма переходила в підшкірну жирову тканину.

Проведені електронно-мікроскопічні дослідження показали, що базальні епітеліоцити щільно прилягали один до одного. Ширина міжклітинних просторів невелика, становила 10-13 нм. В окремих ділянках міжклітинні простори потовщені. На бічних поверхнях визначались невеликі випячування плазмолеми. До базальної мембрани клітини прикріплювались за допомогою напівдесмосом, а між собою вони з'єднувались десмосомами (рис 3.2). Округлоовальне ядро займало значну частину клітини. Каріолема мала рівні контури, але іноді утворювала невеликі інвагінації. В каріоплазмі переважав еухроматин і виявлялись 1-2 ядерця. Мітохондрії в невеликій кількості локалізувались поблизу ядра. Гранулярна ендоплазматична сітка представляла собою окремі короткі каналці. Комплекс Гольджі виявлявся рідко. Цитоплазма містила велику кількість рибосом і полісом, тонкі фібрили, місцями об'єднаними в пучки.

Шипуваті клітини мали невеликі вирости, які входили у поглиблення сусіднього епітеліоцита. В зонах контакту сусідніх клітин виявлялись численні десмосоми. Ядро мало округлу форму, чіткі контури каріолеми в каріоплазмі переважав еухроматин. Мітохондрії округлої або овальної форми, з помірно осміофільним матриксом відносно рівномірно розподілялись по всій цитоплазмі. Визначались короткі та вузькі каналці

гранулярної ендоплазматичної сітки, чисельні рибосоми і полісоми. В цитоплазмі знаходилось багато тонофіламентів. Епітеліоцити зернистого шару характеризувались плоскою, витягнутою формою. В цитоплазмі таких клітин виявлялись гранули кератогіаліну високої електронної щільності.

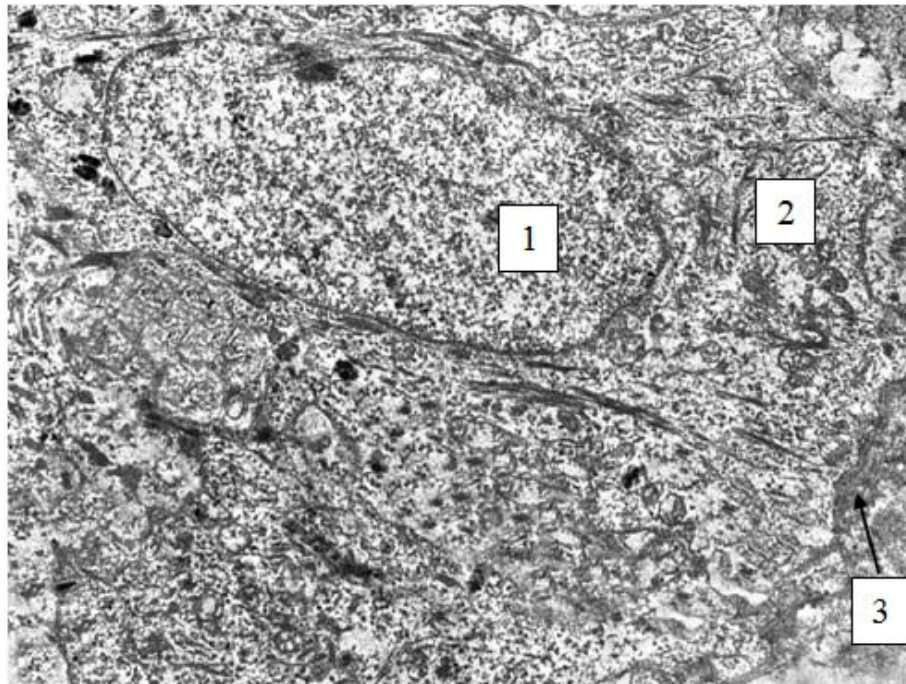


Рис. 3.2. Ультраструктурний стан епідермісу шкіри щура інтактної групи. Трансмісійна електронна мікроскопія. $\times 6000$:

- 1 – ядро базального кератиноцита;
- 2 – цитоплазма базального кератиноцита;
- 3 – базальна мембрана.

У частини епідермоцитів ядра були пікнотичні, в інших внаслідок каріорексису - розпадались на окремі фрагменти. Мітохондрії мали електроннопрозорий матрикс і малу кількість крист. Канальці ендоплазматичної сітки і комплекс Гольджі практично не виявлялись.

Роговий шар складався з плоских, витягнутих в довжину пластинок, які мали гомогенний різної електронної щільності вигляд.

Іноді в епітеліальному шарі зустрічались внутрішньоепідермальні

макрофаги. Нерівна плазмолема цих клітин десмосом не утворювала. Ядро мало округлі контури, в ньому переважав еухроматин. У цитоплазмі знаходилось багато мітохондрій з численними кристами. Ендоплазматична сітка і комплекс Гольджі були добре розвинені. Зустрічались лізосоми, аутофагосоми, ліпідні включення. Відмінною особливістю цих клітин були особливі гранули у формі тенісної ракетки.

Між епідермісом і дермою розташовувалась базальна мембрана, при забарвленні за Шиффом вона виявлялась у вигляді гомогенної стрічки товщиною 0,5-1,0 мкм (рис. 3.3).

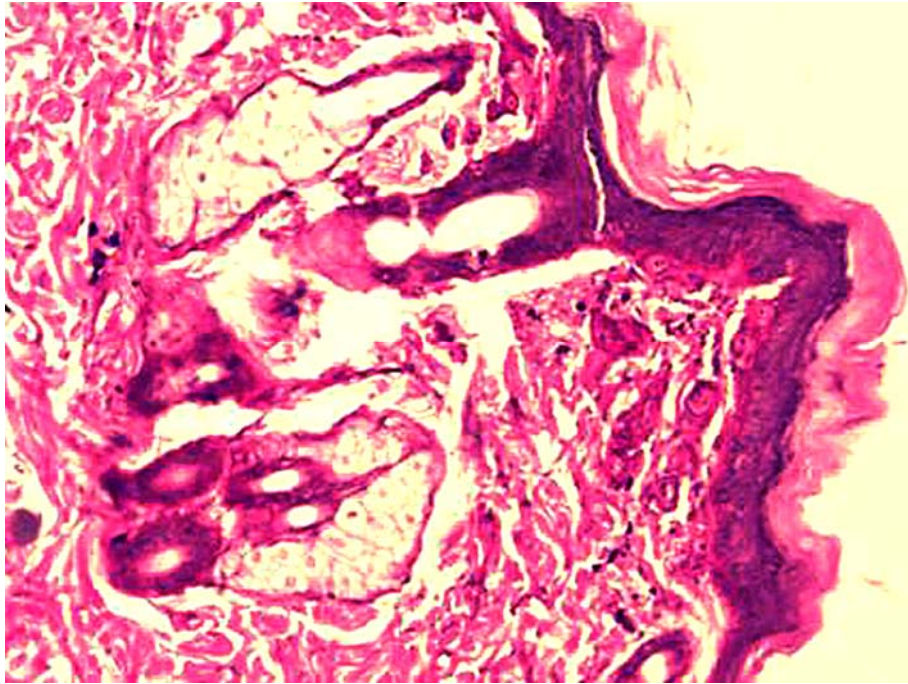


Рис. 3.3. Шкіра щура інтактної групи. Епідерміс та дерма між якими базальна мембрана. PAS–реакція. $\times 100$.

Верхня частина базальної мембрани складалась з цитоплазматичних тонофіламентів базальних клітин, які з'єднувались з напівдесмосомами якірними філаментами. Нижня частина базальної мембрани теж з'єднувалась з дермою якірними філаментами, що проходили крізь її колагенові волокна.

Дерма займала основну частину шкіри спини щура і без різкої межі

переходила в підшкірну жирову клітковину. Сосочковий шар дерми виглядав згладженим, сосочки в ньому спостерігались нечасто. Субепідермальна сполучна тканина проростала в сітчастий шар дерми, оточуючи залози і волосяні фолікули.

Корені волосся розташовувались в шкірі відносно рівномірно, на певній відстані один від одного поодиноці або маленькими групами. Волосяні цибулини лежали в підшкірній жировій клітковині. Зовнішня епітеліальна піхва утворена 2-3-ма шарами світлозабарвлених клітин, з'єднаних між собою за допомогою десмосом і інтердигтацій. Серед них зустрічались поодинокі епітеліоцити з пікнотичними ядрами. Епітелій воронки мав ряд особливостей: він містив великий запас клітин Лангерганса, безпігментні меланоцити, мітози тут зустрічались частіше, ніж в базальному шарі епідермісу. Це підтверджувало провідну роль епітелію зовнішніх волосяних піхв у регенерації епідермісу. Епітелій зовнішніх волосяних піхв біля виходу волосся на поверхню шкіри не відрізнявся від епідермісу ні за товщиною, ні за клітинним складом. Сальні залози мали досить великі розміри і локалізувались поблизу волосяних фолікулів. Сальні залози в шкірі щура мали розгалужені кінцеві відділи, представлені 1–2-ма часточками. Потові залози були відсутніми.

Субепідермальний шар був утворений пухкою сполучною тканиною. Клітинний склад його різноманітний, основними клітинами були фіброласти різної ступені зрілості. Залежно від ступеня зрілості та функціональної активності розрізняли три види фіброblastів: малодиференційовані, клітини, що диференціюються, і зрілі клітини. Наявні також фіброцити. Для розподілу використовувався ЯЦІ, як найбільш достовірний морфометричний диференціальний ознака ступеня зрілості фіброblastів. Так, малодиференційовані фіброласти характеризувались ЯЦІ, що дорівнював $1,81 \pm 0,16$, диференційовані – $1,23 \pm 0,08$, а для зрілих фіброblastів був характерний більш низький ЯЦІ – $0,42 \pm 0,06$, ЯЦІ фіброцитів – $3,8 \pm 0,4$. У шкірі інтактних тварин найбільш численними були зрілі фіброласти – 75-80 %. Крім цього у цитоплаз-

мі вони мали різний вміст органел, що характеризувало їх різну функціональну активність. Об'ємні частки органел клітин фібробластичного диферона в залежності від ступеня їх диференціювання представлені в табл. 3.1.

Таблиця 3.1.

**Об'ємна частка органел клітин фібробластичного диферона
($M \pm m$, $n=6$, %)**

Органели	Юні фібробласти	Фібробласти, що диференціюються	Зрілі фібробласти
Мітохондрії	1,08±0,44#	1,29±0,23#	3,14±0,45*
ЗЕС	3,12±0,55#	9,08±0,90*#	37,80±2,72*
Комплекс	1,15±0,15	0,85±0,22	0,78±0,19

Примітки:

1. * - $p < 0,05$ порівняно з юними фібробластами;
2. # - $p < 0,05$ порівняно з зрілими фібробластами.

Юні фібробласти мали овальну або веретеноподібну форму, містили великі світлі ядра, що займали більшу частину цитоплазми. Зрілі фібробласти мали подовгасту форму з нечисельними відростками, округло овальне ядро з еухроматином і одним, двома ядерцями.

Ультраструктурна організація різних типів фібробластів відрізнялась також ступенем розвитку органел, що забезпечували синтетичні процеси. У зрілих, функціонально активних фібробластах містилися овальні ядра, в їх каріоплазмі переважав еухроматин. У ядрі виявлялись 1–2 ядерця. У цитоплазмі наявні добре розвинена гранулярна ендоплазматична сітка, що характеризувалась чисельними каналцями, просвіт яких місцями розширений. Комплекс Гольджі був представлений декількома розширеними паралельними каналцями, великими вакуолями і мікропухирцями. Мітохондрії в помірній кількості розподілялись по всій цитоплазмі, їх

матрикс характеризувався середньою електронною щільністю, а кристи були щільно упаковані. По периферії цитоплазми лежали нечисельні опорно-рухові структури -мікрофіламенти.

Функціонально неактивні фібробласти мали подовгасту форму і менші розміри, ніж зрілі клітини. Плазмолема їх була згладжена, відростки не виражені. В каріоплазмі неправильної форми ядра переважав гетерохроматин. Мітохондрії мали просвітлений матрикс та короткі або пошкоджені кристи. Канальці гранулярної ендоплазматичної сітки були вузькими та короткими. Комплекс Гольджі був утворений невеликими сплещеними цистернами і пухирцями. У деяких клітинах він не виявлявся. В невеликій кількості зустрічались термінальні клітини фібробластичного диферона – фіброцити. Для них були характерні невеликі розміри і сплещена форма. Ядро розташовувалось вздовж довгої осі клітини. Значну площу в ядрі займав гетерохроматин. Органели (поодинокі мітохондрії з невеликою кількістю крист, окремі короткі та вузькі канальці ендоплазматичної сітки, слабо виражені компоненти комплексу Гольджі) були нечисельними і погано розвиненими.

Крім клітин фібробластичного ряду в дермі виявлялись макрофаги. Форма їх частіше була округлою, але зустрічались також овальні або видовжені макрофаги. Плазмолема утворювала вирости за типом псевдоподій, число яких варіювало. Співвідношення еухроматину і гетерохроматину в кулястому ядрі було різним в залежності від активності клітини.

Субмікроскопічно характерною ознакою цитоплазми макрофагів була наявність лізосом. Виявлялись мітохондрії округлої або овальної форми, рівномірно розподілені в цитоплазмі. Їх матрикс мав середню електронну щільність. Гранулярна ендоплазматична сітка була розвинена помірно. Комплекс Гольджі виявлявся у вигляді 1-3-х диктіосом, кожна з яких утворювалась декількома цистернами, вакуолями і мікропухирцями.

Виділяли три функціональних типа макрофагів: фагоцитарний, моноцитарний та секретуючий. За ультраструктурною організацією

розділяли макрофаги на ті, в яких переважали фагосоми і лізосоми (це макрофаги з вираженою фагоцитарною функцією), і на ті, в яких були виражені органели синтезу (це макрофаги з переважанням секреторної функції). Виявлялись клітини, які містили розширені цистерни гранулярної ендоплазматичної сітки і добре розвинений комплекс Гольджі разом з фагосомами. Зазначені особливості субмікроскопічної будови макрофагів давали можливість припускати, що для них однаковою мірою характерна як секреторна, так і фагоцитарна функція, тобто функціонально вони займали проміжне положення між фагоцитарними і секреторними макрофагами та належали до змішаного, моноцитарного типу. Об'ємна частка органел макрофагів різних функціональних типів представлена в таблиці 3.2.

Таблиця 3.2.

Об'ємні частки органел макрофагів різних функціональних типів
($M \pm m$, $n=6$, %)

Органела	Моноцитарна форма	Фагоцитарний тип	Секреторний тип
Мітохондрії	1,95±0,17 *	3,58±0,33 *,#	2,27±0,16 #
ЗЕС	1,56±0,23 *, **	3,34±0,29 *,#	5,28±0,41 #,**
Лізосоми	2,88±0,18 *, **	5,05±0,45 *, #	2,07±0,23 #,**
Фагосоми	0,18±0,02 *	9,88±0,85 *, #	0,22±0,01 #
Комплекс Гольджі	1,14±0,23 *, **	2,08±0,12 *,#	3,14±0,15 #,**

Примітки:

1. * - $p < 0,05$ між моноцитарною формою і фагоцитарним типом;
2. # - $p < 0,05$ між фагоцитарним і секреторним типами;
3. ** - $p < 0,05$ між секреторним типом і моноцитарною формою.

Найчисельнішими в шкірі тварин інтактної групи були макрофаги фагоцитарного типу. Відсоткове співвідношення різних типів макрофагів представлено на рисунку 3.4.

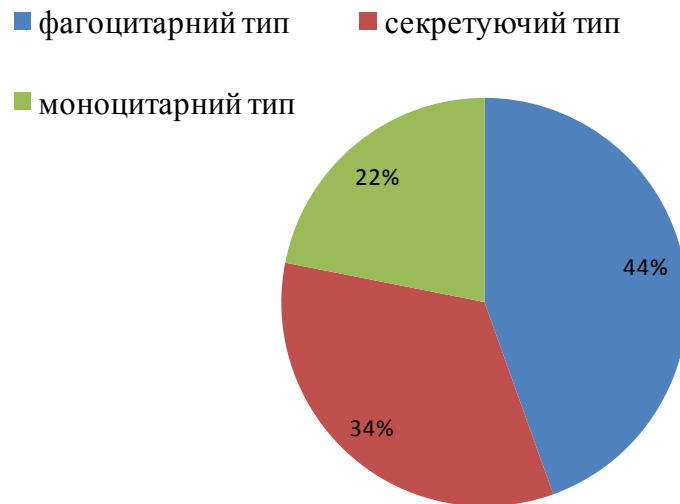


Рис. 3.4. Співвідношення різних типів макрофагів у шкірі інтактних щурів.

Навколо дрібних кровоносних судин субепідермального шару зустрічались плазмоцити. Вони характеризувались округлою формою клітини і ядра, з крупним ядерцем і характерним розташуванням гетерохроматину. Мітохондрії були малочисельними. Майже всю цитоплазму займали каналці гранулярної ендоплазматичної сітки. У перинуклеарній ділянці знаходився добре розвинений комплекс Гольджі, представлений короткими розширеними цистернами, 4-5 світлими вакуолями і численними мікропухирцями.

В шкірі щурів інтактної групи виявлялись тканинні базофіли, вони розташовувались переважно навколо судин. Більше їх визначалось в гіподермі та сосочковому шарі дерми. Вони мали округлу або овальну форму, відносно невелике округле або овальне ядро, в якому переважав гетерохроматин. Цитоплазма цих клітин була заповнена досить великими метахроматичними гранулами 0,3-1 мкм в діаметрі (рис. 3.5).

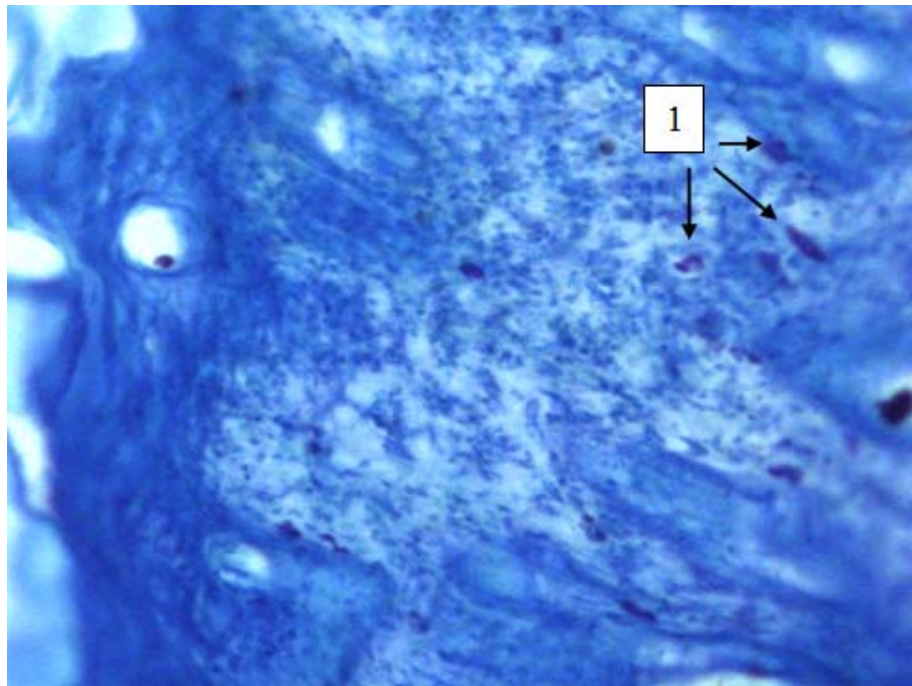


Рис. 3.5. Шкіра тварини інтактної групи. Забарвлення толуїдиновим синім. $\times 100$:

1 – тучні клітини.

Вміст гранул характеризувався середньою або вираженою електронною щільністю. Плазмолема утворювала інвагінації, мала розширені перинуклеарні простори, наявні гранулярна ендоплазматична сітка, вільні рибосоми, що підтверджувало функціональну активність клітин.

У сполучній тканині шкіри, переважно поряд з кровоносними судинами, зустрічались поодинокі нейтрофільні гранулоцити. Вони мали округлу форму, з невеликими короткими випинаннями цитолемі. Ядро виявлялось у вигляді сегментів із значним вмістом гетерохроматину. Вузькі перемички, що з'єднували між собою ядерні сегменти, не завжди виявлялись на електронних мікрофотографіях. Цитоплазма містила невелику кількість дрібних мітохондрій з матриксом помірної електронної щільності. Канальці гранулярної ендоплазматичної сітки були нечисельними, короткими, сплюсненими. Комплекс Гольджі, розташовувався поблизу ядра і складався з 2-4-х паралельних цистерн, 1-2-х вакуолей і декількох мікропухирців. Значна

частина цитоплазми була заповненою дрібними поліморфними гранулами, переважно високої електронної щільності.

Дрібні артеріоли, венули і кровоносні капіляри по їх ходу супроводжувались перицитами. Периваскулярні клітини мали витягнуту форму, тісно прилягали зовні до базальної мембрани ендотелію. У тих місцях, де базальна пластинка переривалась або мала отвори, вирости цитоплазми ендотеліоцитів контактували з перицитами. Ультраструктура цих клітин свідчила про їх слабку диференцію. Ядро займало більшу частину цитоплазми, містило різне співвідношення еухроматину і гетерохроматину, кількість ядерних пор знижувалась. Кількість органел в цитоплазмі невелика, зустрічались окремі мітохондрії, нечисельні полісоми. Іноді у вузькій облямівці цитоплазми виявлялись вузькі короткі канальці ендоплазматичної сітки.

Ендотеліоцити стінки кровоносних капілярів мали переважно плоску форму, за винятком ядровмісних ділянок. Їх плазмолема була гладкою, але в деяких ділянках утворювали нечисленні випинання. Ядро мало подовгасту форму, у її каріоплазмі переважав гетерохроматин. Ядерце на зрізах виявлялось зрідка. Кількість органел загального призначення знижувалась. В цитоплазмі виявлялись багато везикул, які брали участь в транспортних процесах.

Міжклітинна речовина субепідермального шару представляла собою аморфну речовину та колагенові, еластичні і ретикулярні волокна, що орієнтовані в різних напрямках. Субепідермальна сполучна тканина проникала в сітчастий шар дерми, оточуючи кровоносні судини, залози і волосяні фолікули (рис. 3.6). Основну частину сітчастого шару дерми займали товсті колагенові волокна.

Клітини сітчастого шару були представлені, головним чином, фіброцитами, які мали витягнуту, веретеноподібну форму та невеликі пікнотично змінені ядра, в каріоплазмі яких переважав гетерохроматин. Кількісне співвідношення різних клітин в субепідермальному і сітчастому шарах дерми шкіри спини щура представлено в таблиці 3.3.

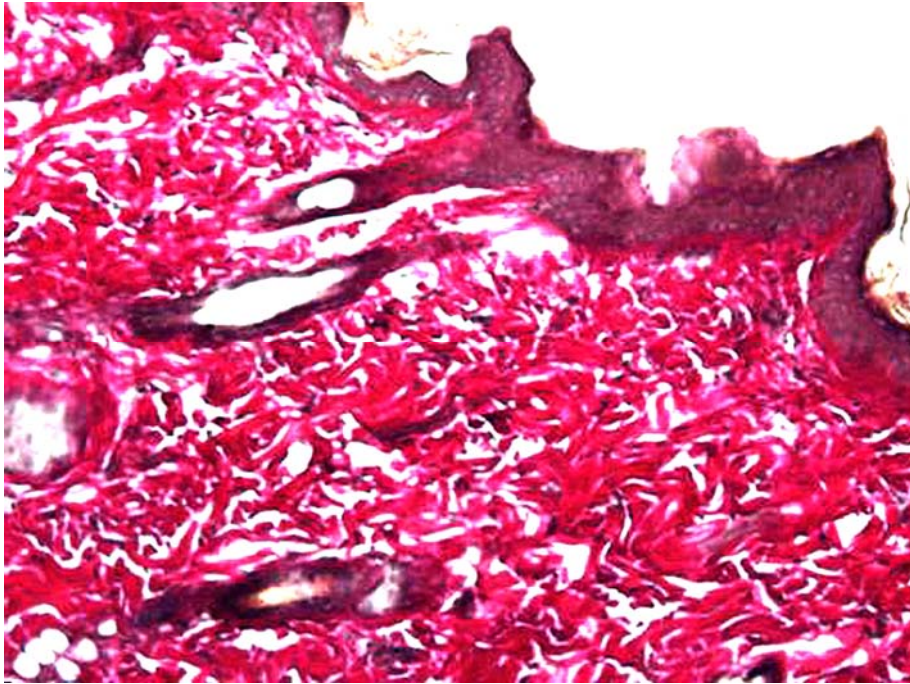


Рис. 3.6. Шкіра тварини інтактної групи. Забарвлення за Ван Гізоном. $\times 100$.

Таблиця 3.3

Співвідношення клітин дерми в субепідермальному та сітчастому шарах шкіри інтактних щурів ($M \pm m$, $n=6$, %)

Шари шкіри, відстань до БМ	Фібро бласти	Фіброци ти	Тучні клітини	Макро фаги	Грануло цити	Лімфо цити
Субепідермал ьний, 150 мкм	$75,0 \pm 2,7$ *	$7,9 \pm 0,8^*$	$4,4 \pm 0,5^*$	$9,4 \pm 0,6^*$	$1,7 \pm 0,7$	$1,6 \pm 0,3$
Сітчастий, 300 мкм	$2,9 \pm 0,1$	$94,5 \pm 2,2$	$0,2 \pm 0,1$	$2,1 \pm 0,1$	0	0

Примітка. * - $p < 0,05$ між субепідермальним і сітчастим шарами.

Глибше сітчастого шару розташовувалась гіподерма. В ній знаходилась велика кількість адипоцитів, серед яких розташовувався шкірний м'яз в сполучнотканинному футлярі.

Шкіра щура кровопостачалась артеріями трьох груп. Перша група артерій розміщувалась в міжм'язових фасціальних перетинках. Гілки цих артерій прямували до фасцій і підшкірної жирової клітковини. Артерії другої групи – це гілки м'язових артерій. Судини утворювали сплетення, які розміщувались відповідно до пошарової будови шкіри. Виділяли гіподермальне, субдермальне та субпапілярне сплетення. Гістологічно стінки артеріол гіподермального сплетення мали м'язовий тип будови. Ендотелій рівномірно розподілявся по периметру мікросудини. Внутрішня еластична мембрана рівномірно звивалась. Середній м'язовий шар містив циркулярно розміщені гладкі м'язові клітини з еліпсоїдними ядрами. Зовнішня еластична мембрана звивиста, виявлялась по всьому периметру мікросудини.

Субдермальне сплетення утворювалось судинами меншого калібру. Артеріоли мали добре виражену м'язову оболонку. Ендотелій тісно прилягав до внутрішньої еластичної мембрани. На межі сосочкового і сітчастого шарів розташовувалось сплетення. Середня оболонка була утворена спіралью орієнтованими гладкими міоцитами з веретеноподібними ядрами. Кількість їх значно зменшувалась, ніж у суміжних шарах, розміщались вони розрізнено. Від субпапілярної артеріолярної сітки відгалужувались термінальні артеріоли. Їхня м'язова оболонка складалась з поодиноких поздовжньо або циркулярно розміщених клітин. Артеріоли прямували вертикально до сосочків, одна артеріола живила 3-4 сосочки.

Збірні венули мали хвилясті контури, вони утворювали поверхнєве субпапілярне сплетення. На межі сосочкового і сітчастого шарів формувалось глибоке субпапілярне сплетення. У венулах даного сплетення траплялись поодинокі міоцити. У стінці венул субдермальної венулярної сітки погано визначались три шари. Найоб'ємніша венозна сітка спостерігалась в гіподермі. Ядра ендотеліоцитів розміщувались по всьому периметру судин. Середня оболонка складалась з 2-3 шарів гладких міоцитів, між якими виявлялись тонкі колагенові та еластичні волокна, що переплітались. Дані про діаметр судин кожного сплетення представлені в таблиці 3.4.

**Діаметр судин шкірних сплетьєнь шкіри інтактних щурів (M±m,
n=6, мкм)**

Назва сплетьєння	Артеріоли	Капіляри	Венули
Субпапілярне	13,6±0,5#**	6,1±0,1	54,8±0,4# **
Субдермальне	43,1±0,2* **	5,9±0,1	100,6±0,6* **
Гіподермальне	54,6±0,6*#	6,1±0,1	114,4±0,4* #

Примітки:

1. * - $p < 0,05$ порівняно з субпапілярним сплетьєнням;
2. # - $p < 0,05$ порівняно з субдермальним сплетьєнням;
3. ** - $p < 0,05$ порівняно з гіподермальним сплетьєнням.

Виявлені структурні і морфометричні особливості будови шкіри інтактних щурів необхідні для порівняння реорганізації її структурних компонентів при проведенні експериментальних досліджень.

Після підшкірного введення 0,01 мл 0,9%-ного розчину NaCl в шкірі щурів не встановлено морфофункціональних змін. Структура шкіри в усі терміни спостереження не відрізнялась від шкіри інтактних тварин.

Після підшкірного введення 0,01 мл 0,5%-ного розчину цитрата натрія в шкірі щурів також не виявлялись морфофункціональні зміни її структурних компонентів. Гістологічна організація шкіри в усі терміни спостереження не відрізнялась від шкіри інтактних тварин.

3.2. Морфофункціональна характеристика шкіри за умов впливу 2%-ного колоїдного розчину іонізованого срібла

3.2.1. Морфофункціональна характеристика епідермісу. Проведені гістологічні дослідження шкіри при внутрішньошкірному введенні 2%-ного колоїдного розчину іонізованого срібла встановили, що порушення структури епідермісу спостерігались не тільки безпосередньо над місцем

введення, а й поширювались на ділянку в радіусі 50 мкм. Реорганізація епітеліального пласту залежала від терміну досліду.

Так на 1-шу добу експерименту структурна організація епідермісу була відносно збережена. В ньому визначались всі чотири шари, проте в них спостерігався міжклітинний набряк. Базальна мембрана була суцільна, місцями потовщена. Між епідермоцитами базального шару розширювались міжклітинні проміжки, але при цьому всі клітини зберігали зв'язок з базальною мембраною за допомогою напівдесмосом, а між собою з'єднувались десмосомами. В ядрах більшості епітеліоцитів переважав еухроматин. Частина мітохондрій мала електронноосвітлий матрикс, каналця гранулярної ендоплазматичної сітки помірно розширені. Мітози епідермоцитів спостерігались рідко.

В шипуватому шарі також визначались ознаки міжклітинного набряку, міжклітинні проміжки потовщені, але міжклітинні контакти зберігались. Зернистий та роговий шари були незмінні, їх структурна організація збережена.

На 3-тю добу досліду гістологічний стан був подібний попередньому терміну. Відмічався міжклітинний набряк. Шар базальних епідермоцитів безперервний, розташований на базальній мембрані, яка місцями потовщена. У цитоплазмі частини клітин наявні парануклеарно просвітлені ділянки, ядро округлої форми, що містило переважно еухроматин.

Шипуваті епітеліоцити зберігали десмосомальні контакти, хоча міжклітинні проміжки були розширені. Зернистий і роговий шар не зазнавали змін (рис. 3.7).

Крім епітеліоцитів у базальному шарі зустрічались внутрішньоепідермальні макрофаги. Ядро мало округлу форму, переважав еухроматин, плазмолема нерівна. В цитоплазмі зустрічались добре розвинені ендоплазматична сітка і комплекс Гольджі, багато лізосом, аутофагосом, що вказували на високу функціональну активність цих клітин.

На 7-му добу структура епідермісу змінювалась незначно, він

утворювався базальним, шипуватим, зернистим і роговим шаром.

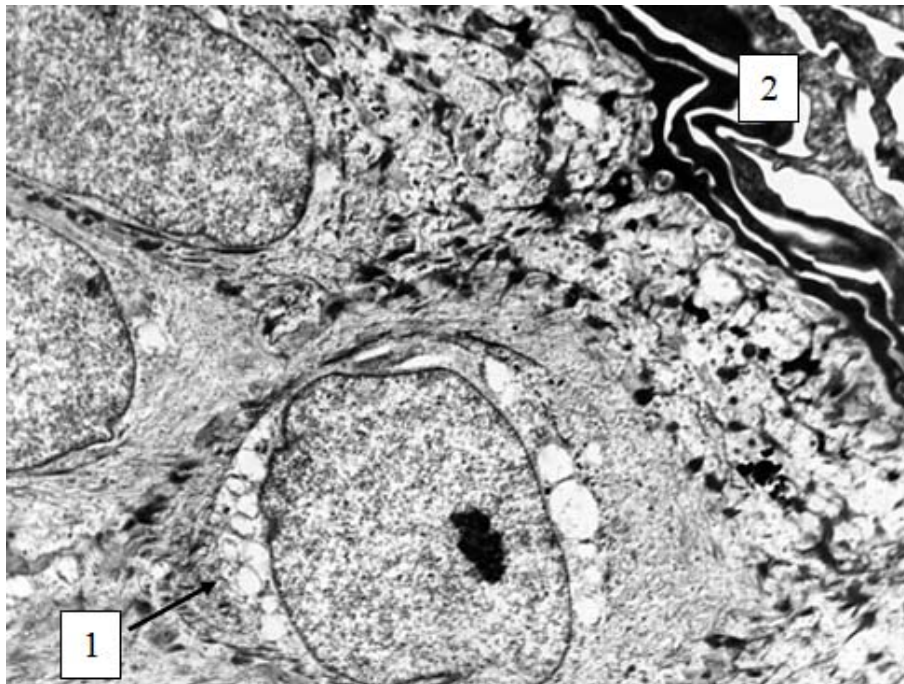


Рис. 3.7. Ультрaструктурний стан епідермісу щура на 3-ю добу після введення колоїдного розчину іонів срібла. Трансмiсійна електронна мiкроскопiя. $\times 4000$:

- 1 – парануклеарне просвітлення цитоплазми остистих клітин;
- 2 – розшарування шару рогових лусочок.

Базальні епідермоцити містили овальні ядра, каріоплазма яких включала переважно еухроматин. Гіалоплазма була помірної електронної щільності. Наявні пучки мікрофіламентів і помірна кількість органел. Клітини тісно контактували одна з одною за допомогою десмосом. Окремі базальні епітеліоцити ділянках мали ознаки ультрaструктурних порушень. (рис. 3.8). Парануклеарно відмічались вакуолеподібні структури різні за розмірами, з тенденцією до злиття. Наявні ділянки дезорганізації цитоплазми. Базальна мембрана у таких ділянках потовщена, нечітко оконтурована.

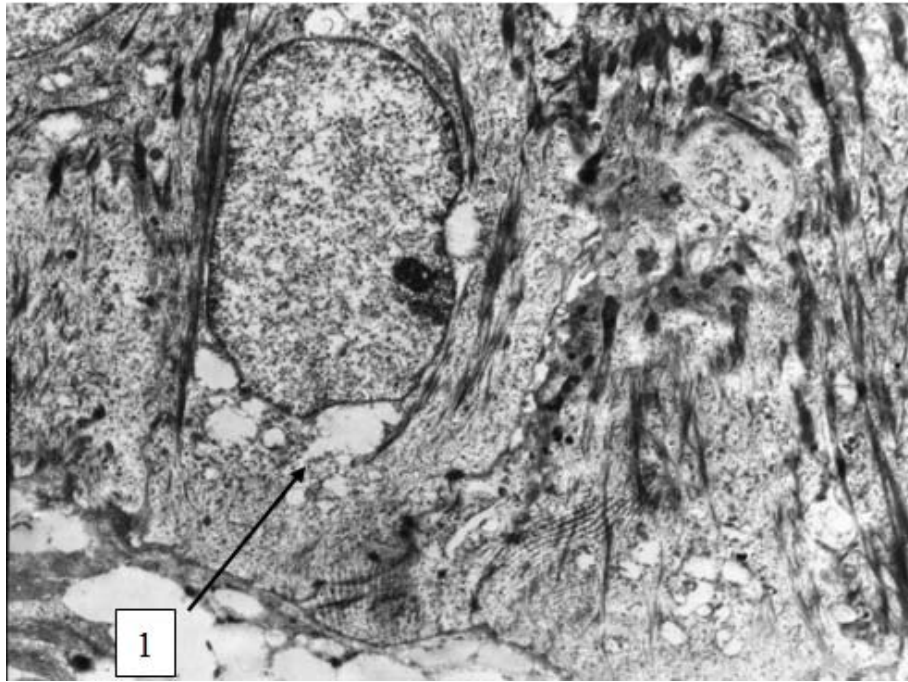


Рис. 3.8. Ультраструктура епідермісу щура на 7-му добу після введення розчину іонів срібла. Вакуолізація цитоплазми базальних клітин. Трансмисійна електронна мікроскопія. $\times 4000$:

1 – патологічні зміни цитоплазми базальної клітини епідермісу.

Епідермоцити остистого шару були малозмінені, зберігали структурну організацію, Лише в окремих клітинах виявлялись парануклеарні просвітлення цитоплазми та потовщені пучки мікрофіламентів. В цитоплазмі кератиноцитів зернистого шару виявлялась значна кількість зерен кератогіаліну. В цей термін досліду частіше зустрічались міжепідермальні лімфоцити та макрофаги (рис. 3.9).

На 14-ту добу експерименту структурна організація епідермісу шкіри щурів була помірно зміненою. Базальна мембрана майже на всьому проміжку збережена, безперервна. У цитоплазмі базального та остистого шару епідермоцитів збільшувався вміст більш грубих осміюфільних пучків мікрофіламентів. Окремі клітини мали зміненої форми ядра з осміюфільною каріоплазмою і вузьким обідком цитоплазми, в яких невисокий вміст мітохондрій з світлим матриксом.

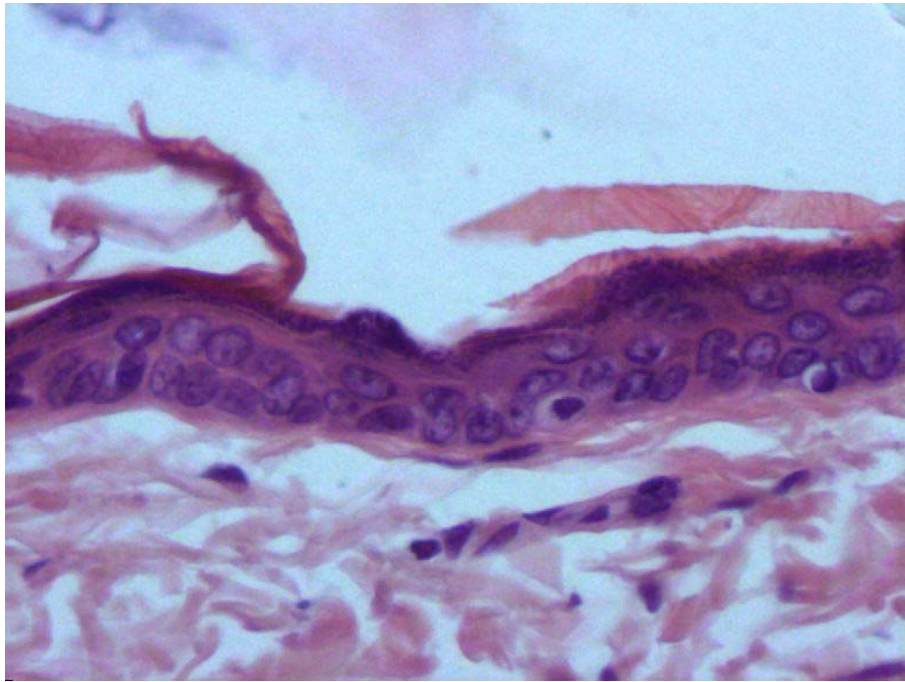


Рис. 3.9. Мікроскопічна організація шкіри щура на 7 добу після введення 2%-ного колоїдного розчину іонізованого срібла. Помірні зміни епідерміса, міжепідермальні лімфоцити. Забарвлення гематоксиліном-еозином. $\times 400$.

В частині епітеліоцитів епідермісу наявна перинуклеарна вакуолізація цитоплазми. Зернистий шар включав клітини з високим вмістом гранул кератогіаліну. Роговий шар був розволокнений (рис. 3.10).

На 21-шу добу над ділянкою введення розчину іонів срібла в базальному і шипуватому шарах епідермісу збільшувався вміст клітин, в цитоплазмі яких знаходились різної величини вакуолеподібні структури, що розташовані переважно перинуклеарно. При цьому їх плазмолема була збережена, а базальна її частина з'єднувалась за допомогою напівдесмосом з базальною мембраною. Відмічалось потовщення та гомогенізація базальної мембрани, а місцями наявні ділянки її пошкодження.

Епітеліоцити зернистого шару мали плоску, подовгасту форму, їх цитолема виглядала потовщеною. Ядро було пікнотичне, каріоплазма включала гетерохроматин. В цитоплазмі виявлялось багато грудок кератогіаліну.

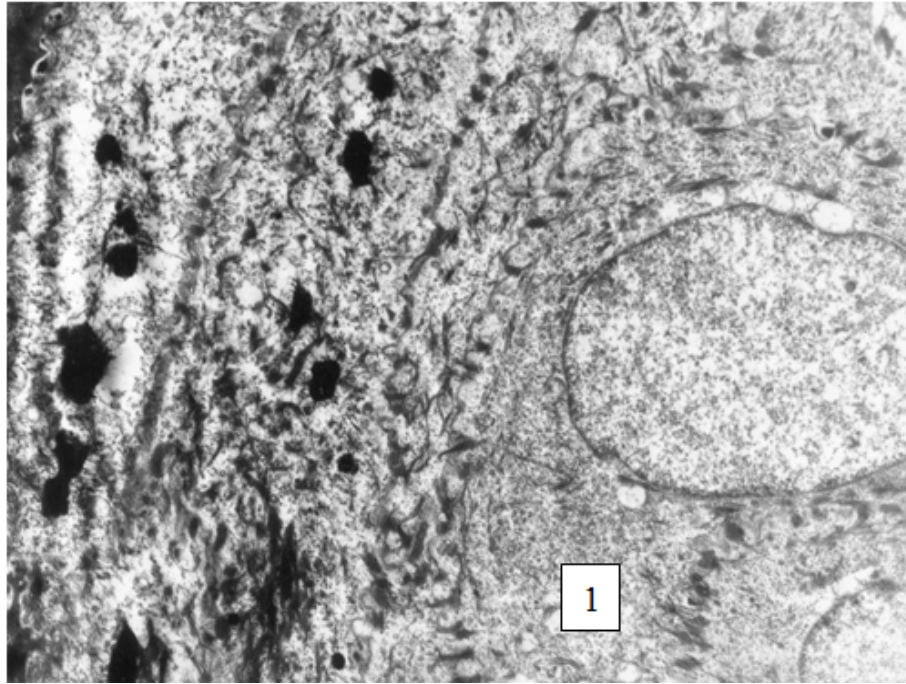


Рис. 3.10. Ультраструктура епідермісу щура на 14-ту добу після введення розчину іонів срібла. Трансмісійна електронна мікроскопія. $\times 4000$:
1 – епідермоцит остистого шару.

Мітохондрій в зазначених клітинах небагато, їх матрикс був електроннопрозорим. Спостерігалось руйнування частини мітохондрій, виявлялись мієліноподібні структури. Канальці ендоплазматичної сітки і комплекс Гольджі практично не спостерігались. Роговий шар був розшарованим і представлений подовгастої форми роговими лусочками. У проміжках між ними містилась дрібнозерниста речовина. (рис 3.11).

На 30-у добу експерименту гістологічні дослідження шкіри встановили, що загальна архітектоніка епідермісу була збережена. Безперервний базальний шар містив епідермоцити, що контактували з базальною мембраною. Рідше зустрічались клітини з перинуклеарною вакуолізацією, мітозів також було мало. Базальна мембрана залишалась однорідною, дещо потовщеною, місцями гомогенізованою. В зернистому шарі виявлялось багато гранул кератогіаліну. Відзначалось потовщення та розшарування рогового шару.

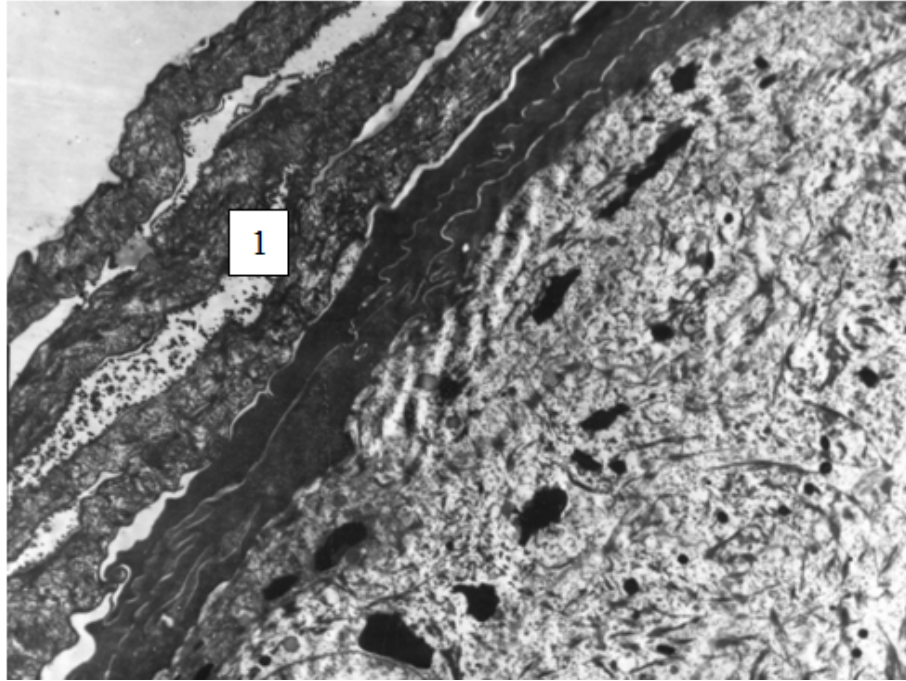


Рис. 3.11. Ультраструктура епідермісу щура на 21-шу добу після введення розчину іонів срібла. Трансмісійна електронна мікроскопія. $\times 4000$:
1 – шар рогових лусочок.

Повне відновлення структурних компонентів епідермісу та відносна нормалізація ядра і цитоплазми епідермоцитів відбувалось на 45-ту добу. При цьому відмічалось помірне стоншення шарів епідермісу.

Динаміка змін мітотичного індексу епідермісу за умов впливу 2%-ного колоїдного розчину іонізованого срібла представлена на графіку (рис. 3.12).

Середнє значення мітотичного індексу знижувалось максимально на 54,3 % на 7-му добу, потім поступово індекс підвищувався, але навіть на 45-ту добу залишався зниженим на 12,2 %. Можливо, це пов'язано з порушеною структурою базальної мембрани, що не відновлювалась до кінця експерименту.

Таким чином, при введенні 2%-ного колоїдного розчину іонізованого срібла, в епідермісі виникали морфофункціональні зміни епідерміса, які характеризувались збільшенням кількості клітин з вакуолізацією цитоплазми в базальному шарі на 67,8 % ($p < 0,05$) максимально на 21-у добу;

пошкодженнями структури базальної мембрани, а саме її потовщенням, гомогенізацією та частковим руйнуванням, зниженням мітотичного індексу клітин епідермісу максимально на 55,3 % ($p < 0,05$), що встановлений на 7-у добу, який не відновлювався до показника тварин інтактної групи до кінця експерименту.

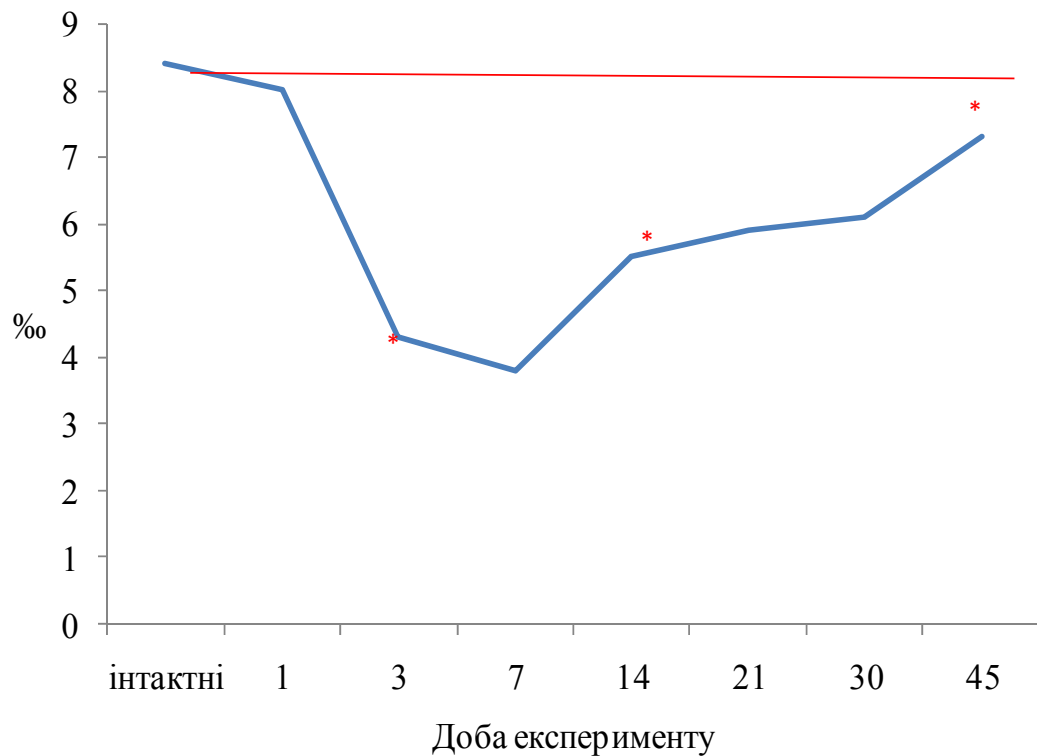


Рис. 3.12. Динаміка змін мітотичного індексу епідермісу за умов впливу 2%-ного колоїдного розчину іонізованого срібла. * - $p < 0,05$ порівняно з попереднім терміном спостереження.

3.2.2. Морфофункціональна характеристика дерми. Гістологічні дослідження шкіри тварин при внутрішньошкірному введенні 2%-ного колоїдного розчину іонізованого срібла показали, що в дермі виникала запальна реакція. На 1-шу добу після введення структура сосочкового шару дерми порушувалась переважно за рахунок набряку. Сосочки були помірно згладженими, фіброархітектоніка порушувалась за рахунок набряку. Змінювалось співвідношення клітинного складу сосочкового шару за рахунок

гетерокінезу клітин крові та макрофагів. Тканинні базофіли активізувались, частина з них перебувала в стадії дегрануляції (рис. 3.13). Збільшувалась кількість макрофагів і нейтрофілів. У сітчастому шарі відзначались незначні явища набряку, фіброархітектоніка зберігалась. Судини всіх сплетень були розширені, їх стінка набрякла, місцями інфільтрована нейтрофілами.

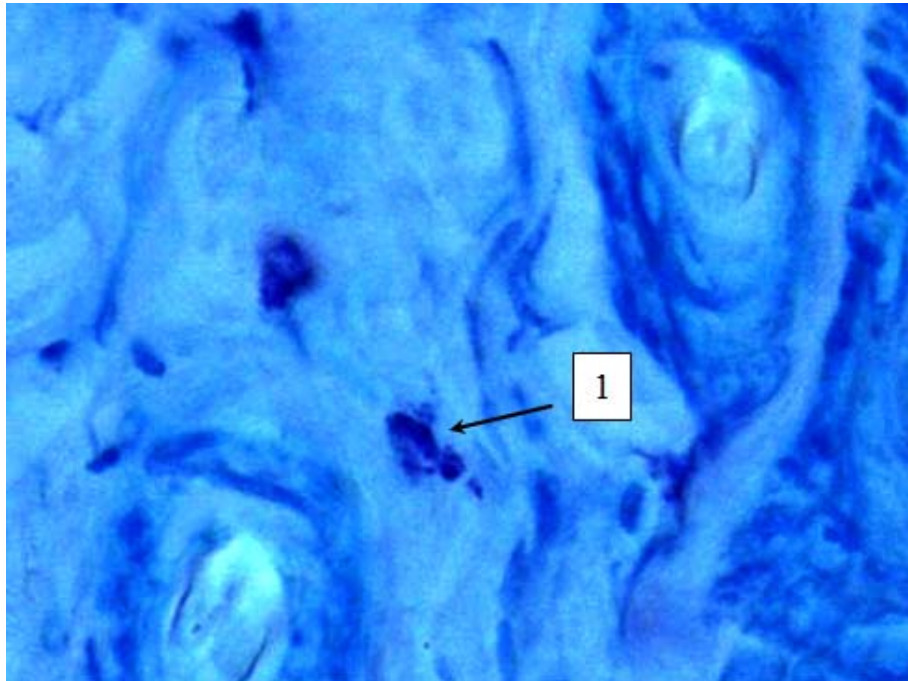


Рис. 3.13. Дерма шкіри щура на першу добу після введення 2%-ного колоїдного розчину іонізованого срібла. Забарвлення толуїдиновим синім. $\times 400$:

1 – тучна клітина.

На 3-тю добу набряк дерми зберігався, шари визначались. В сосочковому шарі переважав набряк менш виражений у порівнянні з попереднім терміном. У сітчастому шарі відмічався незначний набряк. Відмічалось розпушення, місцями гомогенізація волокон сосочкового шару. Клітинний склад змінювався за рахунок гетерокінезу клітин крові. Спостерігалась клітинна інфільтрація вогнища, де переважали макрофаги, які розташовувались групами й активно фагоцитували солі срібла (рис 3.14).

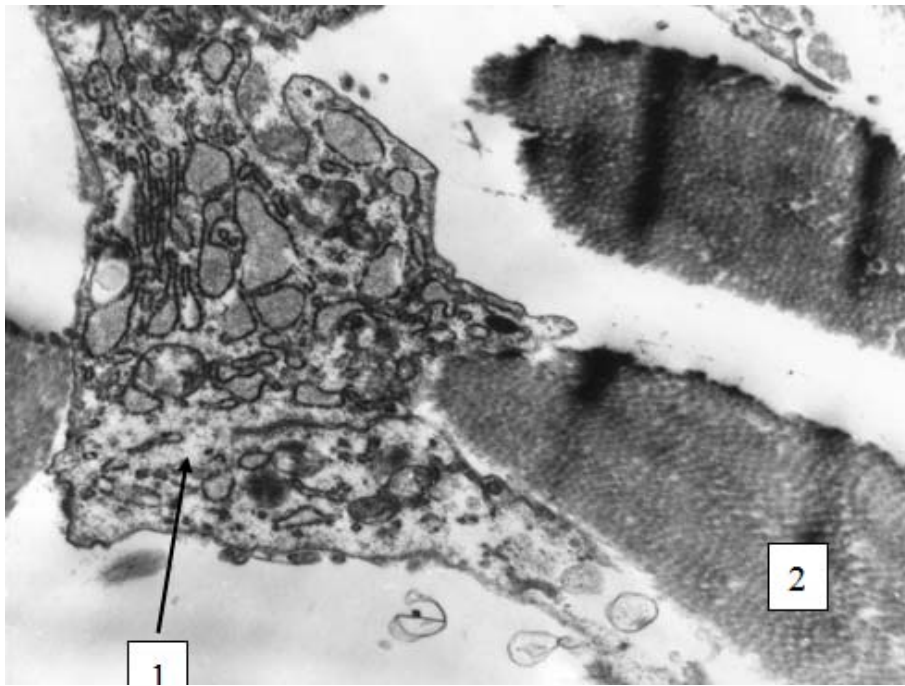


Рис. 3.14. Ультраструктура дерми щура на 3-тю добу після введення розчину іонів срібла. Трансмійна електронна мікроскопія. $\times 8000$:

1 – фрагменти макрофага зі збільшеною кількістю фагосом.

Активність і кількість тучних клітин поступово знижувалась. Відносна кількість фіброblastів знижувалась, серед них визначалась значна кількість клітин з великим ядром, світлою цитоплазмою. Судини всіх сплеть розширені, їх кількість не змінювалась. Навколо судин відзначалось скупчення макрофагів.

На 7-му добу дерма складалась з 2 шарів. При світловій мікроскопії в сосочковому шарі явища міжклітинного набряку знижувались. Пухкі, частково гомогенізовані колагенові волокна мали вигляд сітки. Різко знижувалась міждиферонна гетероморфія, кількість макрофагів знижувалась, проте не досягала початкових значень. Фіброblastи розташовувались відокремлено, мали великі світлі ядра. Навколо груп фіброblastів іноді відзначалась збільшена кількість незрілих колагенових волокон.

При електронній мікроскопії дерма складалась з пухких пучків колагенових фібрил і фіброblastів (рис. 3.15). Зустрічались ділянки з

великою кількістю сполучнотканинних елементів: клітин і пучків колагенових фібрил. Фібробласти містили великі ядра з ядерцями в них, у цитоплазмі знаходились скупчення елементів ЗЕС, рибосом і полісом. Частина з них мала великі довгі ядра з ядерцем і цитоплазму із збільшеною кількістю елементів, що брали участь у білковому синтезі. У тканині зустрічались також макрофаги. Судини субпапілярного сплетення залишались розширеними, тоді як діаметр судин інших сплетень відновлювався до нормальних показників.

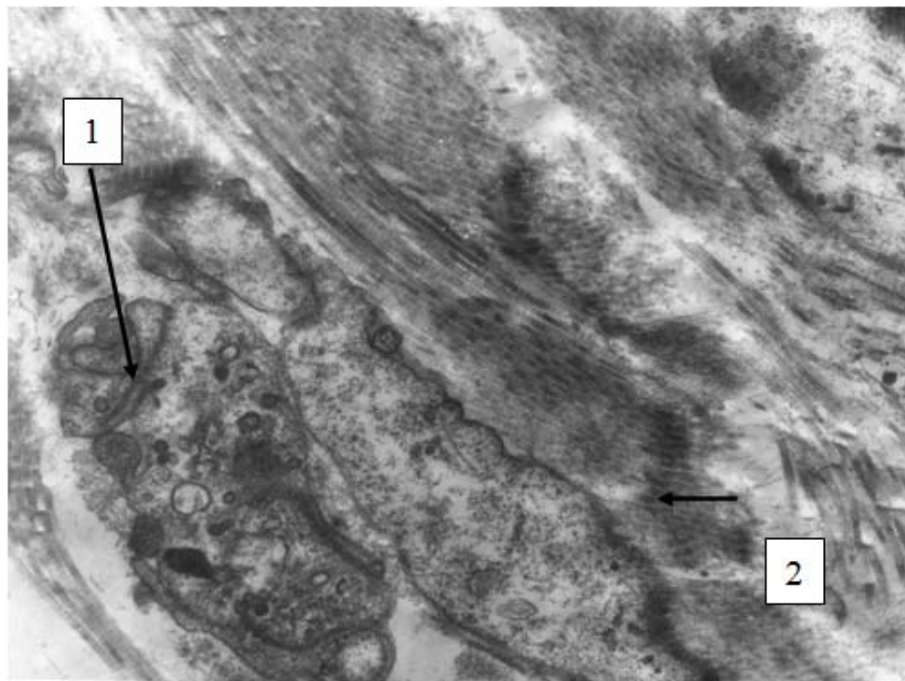


Рис. 3.15. Ультраструктура дерми щура на 7-му добу після введення розчину іонів срібла. Розпушення колагенових волокон. Трансмісійна електронна мікроскопія. $\times 10000$:

- 1 – фібробласт зі збільшеною кількістю органел синтезу;
- 2 – пухкі колагенові волокна

Через 14 діб фіброархітектоніка сосочкового шару дерми залишалась порушеною, спостерігались частково дезорганізовані колагенові волокна, місцями спостерігались скупчення еозинофільних волокон. В осередку

введення відмічалось формування грануляційної тканини (рис 3.16), в якій переважали гістіоцити. Фібробласти розташовувались поодинокі, їх кількість знижувалась.

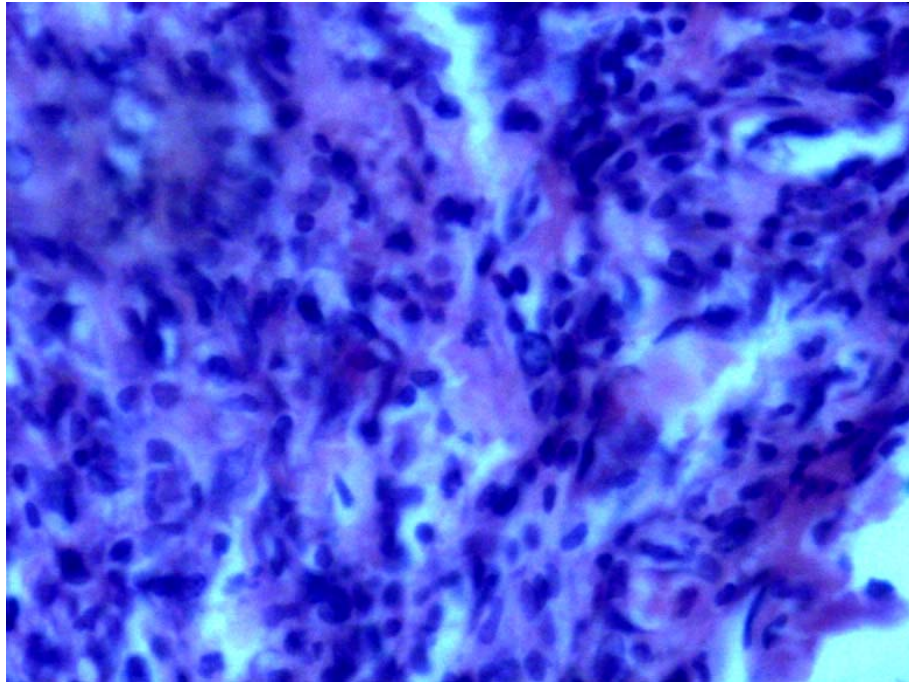


Рис. 3.16. Дерма шкіри щура на 14-ту добу після введення 2%-ного колоїдного розчину іонізованого срібла. Формування грануляційної тканини. Забарвлення гематоксиліном-еозином. $\times 400$.

При електронній мікроскопії субепідермальна визначалась частково пухка, місцями більш щільна сполучна тканина. Частина клітин фібробластів містила ознаки активації білок-синтезуючої системи, а саме збільшення кількості мітохондрій та каналців ЗЕС. В цілому, фібробластів визначалось менше, ніж через 7 діб. Такі клітини мали фестончате осміофільне ядро і вузький обідок цитоплазми. Судини субпапілярного сплетення залишались розширеними, проте їх стінки, оточувались щільною сполучною тканиною.

На 21-шу добу починалась поступова реорганізація грануляційної тканини. Однак, враховуючи знижену кількість фібробластів і гістіоцитів, цей процес проходив повільно і сполучна тканина, що формувалась, була

дезорганізована, волокна невпорядковані, розташовані на відстані один від одного (рис 3.17).

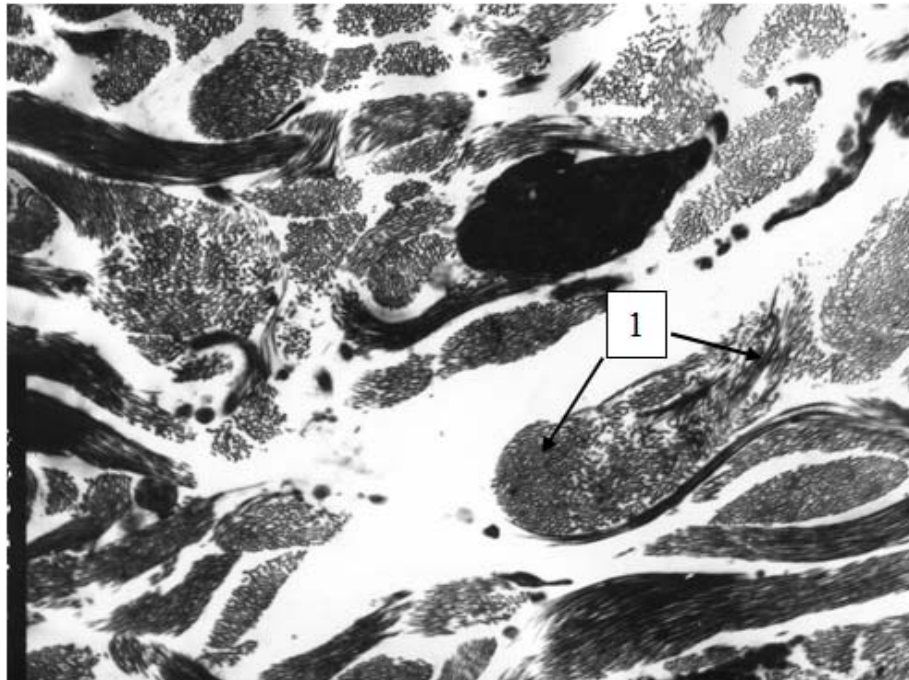


Рис. 3.17. Ультраструктура дерми щура на 21-шу добу після введення розчину іонів срібла. Дезорганізація колагенових волокон. Трансмісійна електронна мікроскопія. $\times 4000$:

1 – ділянка дезорганізації колагенових волокон.

Поступово знижувалась міждиферонна гетероморфія, внутрішньодиферонний розподіл фібробластів за ступенем зрілості також змінювався. Переважали зрілі та дефінітивні форми, кількість молодих фібробластів була значно знижена. Судини всіх сплетень приходили до своїх початкових показників, їх кількість залишалась незмінною, місцями спостерігалось навіть деяке звуження артеріол.

На 30-ту добу тенденції зберігались. Шари дерми помітні, в сосочковому шарі порушувалась фіброархітектоніка в місці введення розчину іонізованого срібла. Спостерігались різноспрямовані, грубі, потовщені волокна. Серед фібробластів переважали клітини з низькою функціональною

активністю, збільшувалась кількість фіброцитів.

На 45-ту добу після введення 2%-ного колоїдного розчину іонізованого срібла реорганізації сполучнотканинного рубця не відбувалось, фібро-архітектоніка в осередку залишалась порушеною, міждиферонна гетероморфія залишалась зміненою (табл. 3.5).

Таблиця 3.5

Клітинний склад дерми шкіри щурів при введенні 2%-ного колоїдного розчину іонізованого срібла (M±m, n=6, %)

Доба	Фібробласти	Фіброцити	Тканинні базофіли	Макрофаги	Гранулоцити	Лімфоцити
Інтактні	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	65,3±3,2 [#]	7,5±0,8	7,9±0,1 [#]	13,9±0,3 [#]	3,1±0,4 [#]	1,8±0,5
3	57,4±2,8* #	5,4±0,8* [#]	6,5±0,1* [#]	27,2±2,3* #	2,6±0,2 [#]	2,2±0,5
7	62,8±3,4 [#]	5,1±0,3 [#]	4,9±0,2*	19,4±2,2 [#] *	1,8±0,1	1,9±0,5
14	73,6±2,2*	5,7±0,2 [#]	4,0 ±0,2*	14,1±1,3 [#] *	1,1±0,2* [#]	2,1±0,1
21	76,5±3,3*	7,5±0,8	2,5±0,1* [#]	10,6±1,9 [#]	0,7±0,2 [#]	2,3±0,1 [#]
30	79,2±3,4*	8,7±0,2	2,7±0,1 [#]	9,1±0,6	0,3±0,1 [#] *	1,4±0,2*
45	79,4±2,6	9,8±0,4* [#]	3,3±0,1*	8,2±0,6	0,4±0,05 [#]	0,5±0,2* [#]

Примітки:

1. * - $p < 0,05$ порівняно з попереднім терміном спостереження.
2. # - $p < 0,05$ порівняно з інтактними.

Водночас змінам піддавались волосяні цибулини, розташовані поблизу

місця введення. До того ж, структура оточуючої їх сполучної тканини була змінена за рахунок порушення цито- і фіброархітекtonіки, що призводило до змін трофіки. Уже на 7-му добу епітелій зовнішніх піхв потовщувався, розпушувався, однак мітотична активність залишалась на колишньому рівні. Одиначні епітеліоцити мали ознаки ультраструктурної патології. Ядра цих клітин дещо деформувались, хроматин нерівномірно розподілявся. Структура цитоплазми мала ознаки дезорганізації, місцями з деструкцією. Кількість мітохондрій знижувалась. Зустрічались поодинокі внутрішньоепідермальні макрофаги. Мітотична активність злегка наростала лише на 14-ту добу і тривала до 21-ї доби. На 30-ту добу спостерігався значний спад мітотичної активності, стоншення епітелію зовнішніх піхв, яке поступово відновлювалось лише на 45-ту добу.

Тучні клітини першими реагували на введення колоїдного розчину іонів срібла збільшенням кількості вже на 1-шу добу, після чого спостерігалось зменшення їх кількості. Найбільш лабільною була кількість макрофагів, яка збільшувалась майже вдвічі на 7-у добу, але потім поверталась до попередніх значень після 21-ої доби. При цьому кількість інших клітин гематогенного походження (лімфоцитів і гранулоцитів) не змінювалась. Зниження кількості фібробластів на 3-тю добу не було абсолютним, а лише відображало ступінь зміни міждиферонної гетероморфії, але вже на 7-у добу кількість клітин знижувалось в абсолютних цифрах, до того ж змінювалась кількість дефінітивних форм.

Крім міждиферонної гетероморфії під впливом іонів срібла наростала і внутрішньодиферонна гетероморфія фібробластів. Залежно від ступеня зрілості та функціональної активності розрізняли 3 види фібробластів: малодиференційовані, які диференціюються і зрілі. Вони відрізнялись кількістю органел синтезу білка, особливо ЗЕС та комплексу Гольджі. Для диференціювання використовувався ЯЦІ, як найбільш достовірну морфометричну диференційну ознаку. В осередку введення відзначалось збільшення вмісту малодиференційованих і диференційованих фібробластів,

максимальна кількість яких відзначалась на 14-ту добу при формуванні грануляційної тканини (табл. 3.6), але після 21-ї доби відмічалось збільшення кількості зрілих форм фібробластів, яка тривала протягом усього експерименту, тоді як кількість малодиференційованих фібробластів була знижена порівняно з інтактними навіть наприкінці експерименту. Підвищення кількості фібробластів, що диференціюються, тривало до 21-ї доби, потім відзначалось поступове їх зниження, а наприкінці експерименту їх кількість повернулась до початкових значень. До того ж кількість органел синтезу залишалась зниженою в усіх видах фібробластів, що свідчило про зниження рівня синтетичних процесів.

Таблиця 3.6

Розподіл клітин фібробластичного диферона за ступенем зрілості при введенні 2%-ного колоїдного розчину іонізованого срібла ($M \pm m$, $n=6$, %)

Доба експерименту	Малодиференційовані	На стадії диференціювання	Зрілі фібробласти
Інтактні	5,7±0,3	9,8±0,7	85,3±0,5
1	6,3±0,4	10,1±0,6	84,2±0,7
3	9,3±0,5 ^{#*}	15,1±0,7 ^{#*}	75,2±0,2 ^{#*}
7	11,4±0,4 ^{#*}	19,6±0,2 ^{#*}	72,8±0,4 ^{#*}
14	8,4±0,9 ^{#*}	34,6±0,9 ^{#*}	58,3±0,1 ^{#*}
21	6,3±0,2 [*]	26,5±0,7 ^{#*}	69,5±0,8 ^{#*}
30	4,9±0,4 [*]	13,6±0,5 ^{#*}	81,9±0,2 ^{#*}
45	2,8±0,3 ^{#*}	9,7±0,2 [*]	88,4±0,4 ^{#*}

Примітки:

1. * - $p < 0,05$ порівняно з попереднім терміном спостереження;
2. # - $p < 0,05$ порівняно з інтактними.

Популяція макрофагів найпершою реагувала на введення іонів срібла.

Найбільших змін зазнавала кількість макрофагів моноцитарного типу, яка збільшувалась з 3-ї доби протягом усього експерименту і досягала максимуму на 7-му добу, коли збільшувалась на 40,6 % ($p < 0,05$), потім відзначалось поступове зниження показника. При цьому кількість клітин секретуючого типу постійно знижувалась і не досягала значень інтактних тварин навіть наприкінці експерименту (рис. 3.18). Кількість макрофагів фагоцитарного типу не зазнавала значних змін.

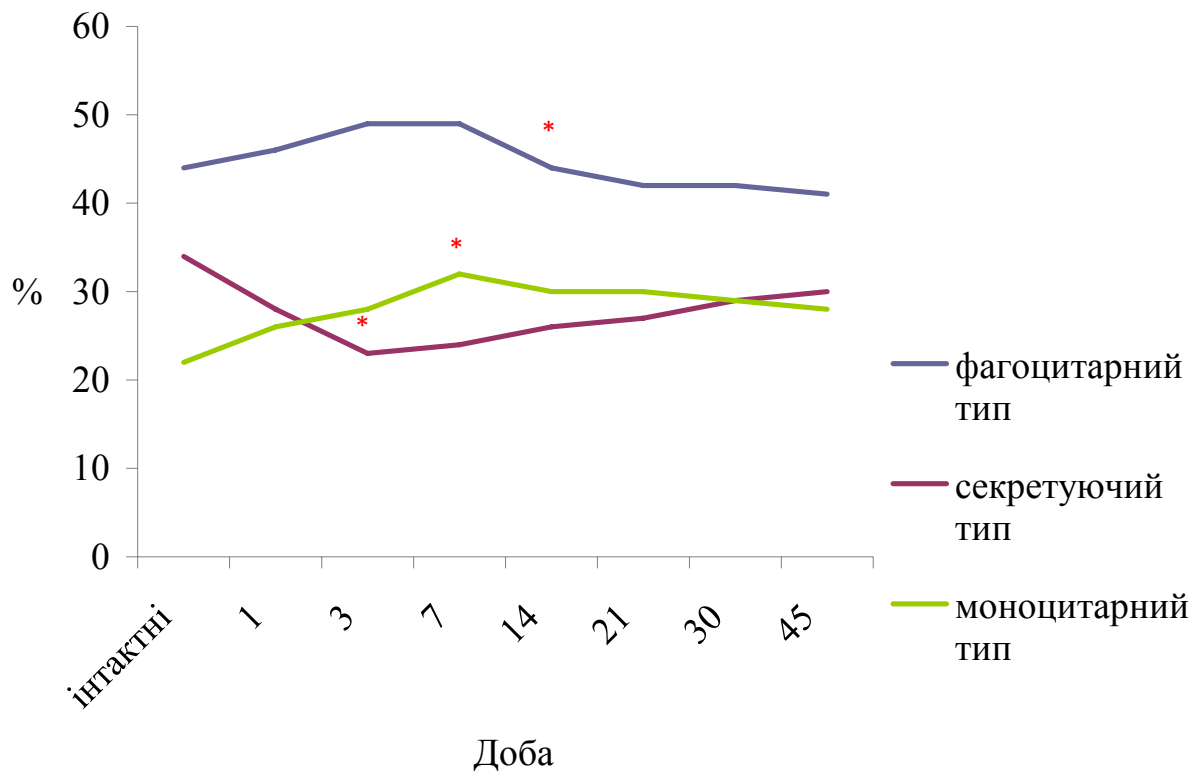


Рис. 3.18. Динаміка змін співвідношення різних функціональних типів макрофагів за умов впливу НЧ срібла 20 нм. * - $p < 0,05$ порівняно з попереднім терміном спостереження.

Зважаючи на зміни в диферонах, які відповідальні за синтез міжклітинної речовини та волокон, а саме зміни кількості фібробластів та макрофагів секретуючого типу, оцінка кількості волокон являлась важливою характеристикою реакції тканини на введення іонів.

Кількість волокон оцінювалась морфометрично, вимірювалась питома

площа, результати досліджень представлені на рис. 3.19. Як видно з діаграми, спостерігалось зниження кількості колагенових волокон протягом усього експерименту, яке досягало максимуму – 41,4 % на 14-ту добу. Після 14-ї доби спостерігалось незначне підвищення показника, але навіть наприкінці експерименту кількість волокон залишалась зниженою.

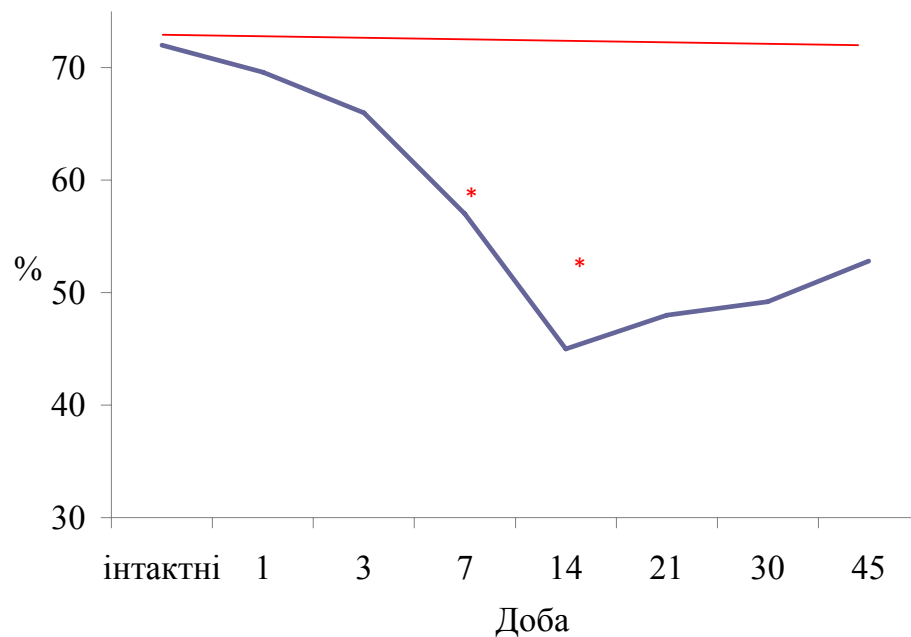


Рис. 3.19. Динаміка зміни площі колагенових волокон дерми за умов впливу розчину іонів срібла. * - $p < 0,05$ порівняно з попереднім терміном спостереження.

Тканинні базофіли першими відреагували на введення збільшенням кількості в 1-шу добу (табл. 3.7). Як бачимо максимальна кількість тучних клітин спостерігалась на 1-шу добу після введення, потім їх кількість знижувалась, але функціонально активність залишалась дуже високою, яка потім поступово відновлювалась до 14-ої доби.

Під впливом вивільнених з гранул тучних клітин біологічно активних речовин судини розширювались. При чому найбільші зміни відбувались в субпапілярному сплетенні, тоді як розширення судин інших двох сплетень шкіри були швидкоминущими та незначними.

Таблиця 3.7

Морфофункціональний стан тучних клітин шкіри при введенні 2%-ного колоїдного розчину іонізованого срібла ($M \pm m$, $n=6$, кл/0,01 мм², %)

Доба	Кількість клітин	Індекс
Норма	14,3± 0,4	0,06±0,007
1	19,9±0,2 [#]	0,46± 0,02 [#]
3	9,2± 0,8* [#]	0,54±0,06 [#]
7	13,4± 0,2*	0,32±0,04* [#]
14	13,8± 0,1	0,24±0,05 [#]

Примітки:

1. * - $p < 0,05$ порівняно з попереднім терміном спостереження;
2. [#] - $p < 0,05$ порівняно з інтактними.

У таблиці 3.8 представлено динаміку змін діаметру судин субпапілярного кровоносного сплетення за умов внутрішньо шкірного введення колоїдного розчину іонізованого срібла. Збільшення діаметру артеріол спостерігали вже через добу після введення розчину іонізованого срібла, на 19,1 %, порівняно з інтактними тваринами. В період з 1-ї по 3-ю добу експерименту діаметр артеріол зростав ще на 18,5 % і перевищував показники інтактних тварин на 41,2 % ($p < 0,05$). Діаметр артеріол збільшувався максимально на 7-му добу експерименту і перевищував показники інтактних тварин на 52,9 %, тоді як діаметр капілярів та венул змінювався не так істотно. Після 14-ї доби експерименту спостерігали поступове зменшення діаметру артеріол субпапілярного сплетення. У період з 14-ї по 21-шу добу експерименту діаметр артеріол зменшувався на 15,1 % ($p < 0,05$), а відновлення діаметру артеріол до показників інтактних тварин спостерігали на 45-ту добу.

Динаміка змін питомої площі поверхні судинних петель представлена на рис 3.20. За умов впливу 2%-ного колоїдного розчину іонізованого срібла питома площа судин знижувалась і досягала мінімуму на 21-шу добу, але потім поверталась до початкових значень.

Таблиця 3.8

Динаміка змін діаметру судин субпапілярного сплетення щура за умов впливу 2%-ного колоїдного розчину іонізованого срібла ($M \pm m$, $n=6$, мкм)

Доба	Артеріоли	Капіляри	Венули
Інтактні	13,6±0,5	6,1±0,1	54,8±0,4
1	16,2±0,6*	6,8±0,1*	58,8±0,2*
3	19,2±0,4* [#]	7,2±0,3*	57,5±0,1*
7	20,8±0,3*	7,5±0,1*	56,2±0,2* [#]
14	19,9±0,5*	7,4±0,3*	55,8±0,4
21	16,9±0,6* [#]	6,9±0,3*	55,7±0,4
30	15,4±0,6*	6,6±0,5	54,4±0,3
45	13,8±0,4	6,2±0,6	54,9±0,2

Примітки:

- 1.* - $p < 0,05$ порівняно з інтактними,
2. [#] - $p < 0,05$ порівняно з попереднім терміном спостереження.

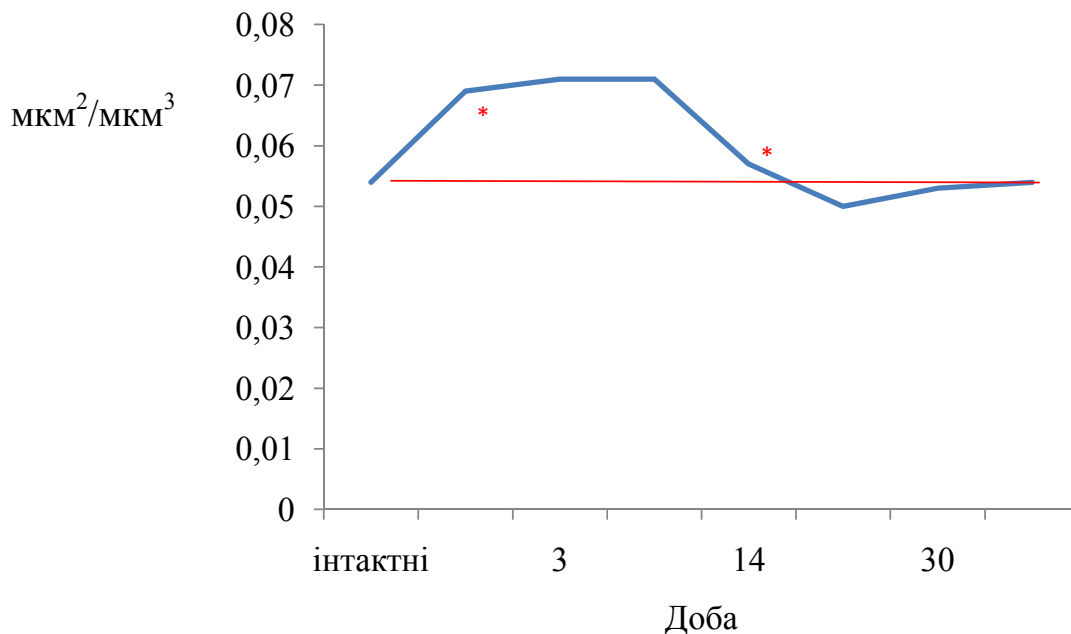


Рис. 3.20. Питома площа поверхні петель субпапілярного сплетення шкіри за умов впливу 2%-ного колоїдного розчину іонізованого срібла, * - $p < 0,05$ порівняно з попереднім терміном спостереження.

Таким чином, за умов впливу 2%-ного колоїдного розчину іонізованого срібла в тканинах шкіри розвивався комплекс морфофункціональних змін, який характеризувався порушенням міждиферонної гетероморфії за рахунок гетерокінезу тканинних базофілів та макрофагів, що призводив до збільшення кількості тканинних базофілів на 31,2 % ($p < 0,05$) максимально на 3-тю добу, збільшенню кількості макрофагів на 22,9 % ($p < 0,05$) максимально на 7-му добу; зниженням кількості функціонально активних фібробластів на 51,2 % ($p < 0,05$) на 45-ту добу, зменшенням кількості колагенових волокон на 40,2 % ($p < 0,05$) та зворотнім розширенням судин мікроциркуляторного русла на 30,8 % ($p < 0,05$) порівняно з інтактними. Внутрішньошкірне введення розчину іонізованого срібла спричиняло в епідермісі збільшенням кількості клітин з вакуольною дистрофією в базальному шарі епідермісу максимально на 21-шу добу, зниження митотичного індексу клітин базального шару епідермісу максимально на 7-му добу експерименту, а також спричиняло незворотні порушення структури базальної мембрани.

Результати та підсумки, що викладені у даному розділі роботи, оприлюднені в таких публікаціях: [195, 196].

РОЗДІЛ 4

МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА ШКІРИ ЗА УМОВ ВПЛИВУ НАНОЧАСТИНОК СРІБЛА

4.1. Морфофункціональна характеристика шкіри за умов впливу наночастинок срібла розміром 20 нм

Морфологічні дослідження встановили, що у результаті введення НЧ срібла в дерму виникали зміни не тільки в місті їх введення, але й спостерігались порушення суміжних ділянок шкіри.

4.1.1. Морфофункціональна характеристика епідермісу. При внутрішньо-шкірному введенні НЧ срібла розміром 20 нм порушення структури епідермісу спостерігались не тільки безпосередньо в ділянці введення, а й поширювались на суміжні ділянки шкіри в радіусі 90 мкм. При цьому на першу добу структура епідермісу змінена помірно, товщина епідермісу збільшувалась до $30,1 \pm 0,9$ мкм. Усі чотири шари епітеліального покриву визначались. Проте спостерігався міжклітинний набряк. Набряклі клітини базального шару лежали безперервним шаром на базальній мембрані, міжклітинні проміжки розширювались, але напівдесмосоми і десмосоми зберігались. В ядрах епідермоцитів переважав еухроматин. Кількість мітохондрій була невеликою, ЗЕС була розвинена слабо. Мітози виявлялись рідко. Базальна мембрана була безперервною, її структура зберігалась.

Електронномікроскопічні дослідження також виявили міжклітинний набряк у базальному та шипуватому шарах. міжклітинні контакти зберігались. Цитоплазма епітеліоцитів виглядала менш електроннощільною, овальні ядра включали переважно еухроматин. Зернистий і роговий шари зберігали свою структурну організацію.

Гістологічні дослідження, проведені на 3-тю добу досліду показали, що міжклітинний набряк в епідермісі зберігався. Епідерміс не змінював свою архітектоніку шарів, мав товщину $32,5 \pm 1,2$ мкм. Шар базальних клітин

залишався безперервним. Визначались набряклі епітеліоцити з зернистою цитоплазмою, ядрами округлої форми, що в каріоплазмі мали еухроматин (рис. 4.1).

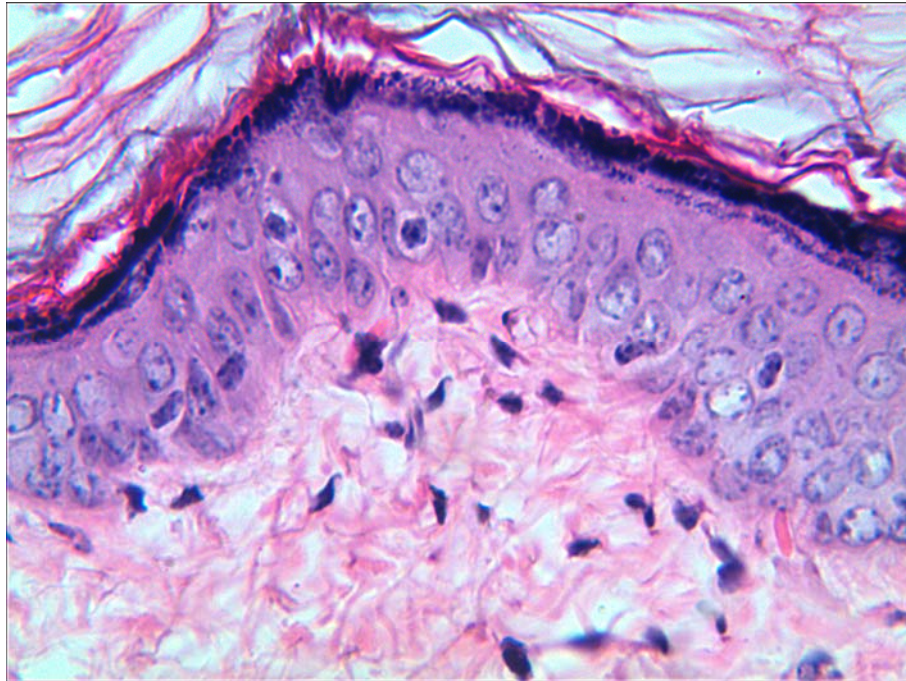


Рис. 4.1. Мікроскопічний стан шкіри щура на 3-тю добу після введення НЧ срібла 20 нм. Епідерміс та дерма, набряк епідермоцитів. Забарвлення гематоксиліном- еозином. $\times 400$.

У базальному шарі виявлялись мігруючі лімфоцити та внутрішньо-епідермальні макрофаги. Лімфоцити мали невеликі розміри, світлу цитоплазму, базофільні, неправильної форми ядра. Кератиноцити шипуватого шару зберігали міжклітинні контакти, хоча міжклітинні проміжки були розширені. Структурна організація зернистого і рогового шарів не зазнавали змін. Базальна мембрана була безперервна, структура її частково порушувалась, вона потовщувалась, місцями гомогенізувалась.

На 7-му добу архітектоніка епідермісу не порушувалась, він був утворений базальним, шипуватим, зернистим і роговим шарами, товщина складала $33,45 \pm 1,5$ мкм. Пласт епідермісу зберігався. Клітини базального шару

безперечно лежали на базальній мембрані і з'єднувались з плазмолемою погано контурованими напівдесмосомами. Сама базальна мембрана представляла собою пластинку, місцями гомогенну, потовщену (рис. 4.2).

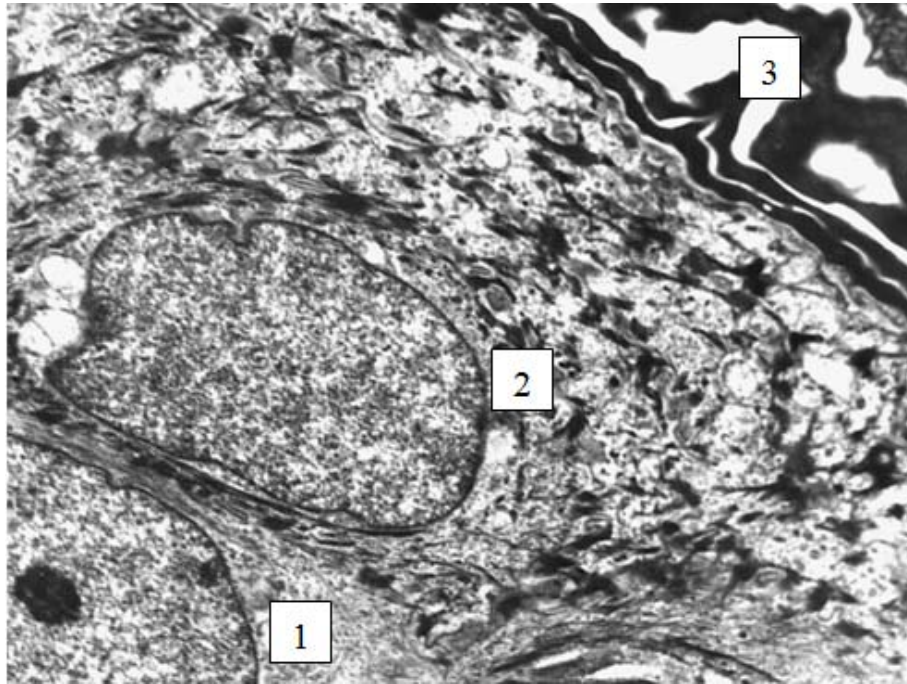


Рис. 4.2. Ультраструктура епідермісу на 7-му добу після введення НЧ срібла 20 нм. Трансмійна електронна мікроскопія. $\times 5000$:

- 1 – епідермоцит остистого шару;
- 2 – епідермоцит зернистого шару;
- 3 – шар рогових лусочок.

Епідермоцити містили великі овальні ядра з диспергованим хроматином, цитоплазму помірної електронної щільності. В ній розташовувалась значна кількість пучків мікрофіламентів і невелика кількість інших органел. Клітини контактували одна з одною за допомогою десмосом. Деякі базальні клітини мали ознаки ультраструктурних змін. Невеликі, дещо деформовані ядра клітин містили грудки гетерохроматину. Ядро оточували різних розмірів вакуоле подібні структури. Частіше зустрічались внутрішньо-епідермальні макрофаги. Епітеліоцити зернистого шару містили пікнотичні

ядер. Цитоплазма включала грудки кератогіаліну. Роговий шар потоншувався до $6,0 \pm 1,1$ мкм.

На 14-ту добу архітектоніка шарів епідермісу не порушувалась. Базальний шар залишався безперервним. Кількість клітин з явищами перинуклеарної вакуолізації збільшувалась. Подібні зміни спостерігались в епітеліоцитах шиповатого шару (рис. 4.3).

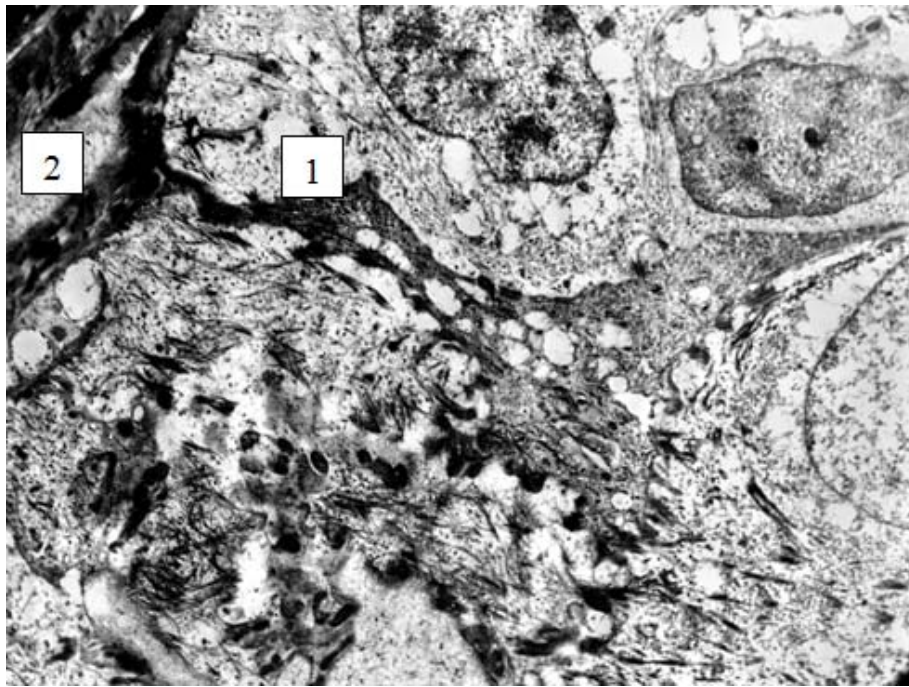


Рис. 4.3. Ультраструктура епідермісу щура на 14-ту добу після введення НЧ срібла 20 нм. Трансмісійна електронна мікроскопія. $\times 4000$:

1 – епідермоцит остистого шару з ознаками парануклеарної вакуолізації;

2 – шар рогових лусочок.

У цитоплазмі збільшувался вміст більш грубих осміофільних пучків мікрофіламентів. Кількість мітохондрій знижувалась, гіалоплазма виглядала просвітленою. Базальна мембрана також представляла собою гомогенний електроннощільний тяж, різної товщини, що контактував з плазмолемою базальних клітин. Напівдесмосоми були мало помітними. Шипуватий шар

стоншувався, клітини мали округлу форму, мітозів не спостерілось. Зустрічались клітини з перинуклеарною вакуолізацією. Зернистий шар потоншувався, роговий шар розшаровувався. Кількість внутрішньоепідермальних лімфоцитів та макрофагів залишалась високою.

На 21-шу добу над ділянкою введення НЧ срібла 20 нм у базальному і шипуватому шарах епідермісу наявні епідермоцити, в цитоплазмі яких визначались різних розмірів вакуолеподібні структури, розташовані перинуклеарно (рис 4.4).

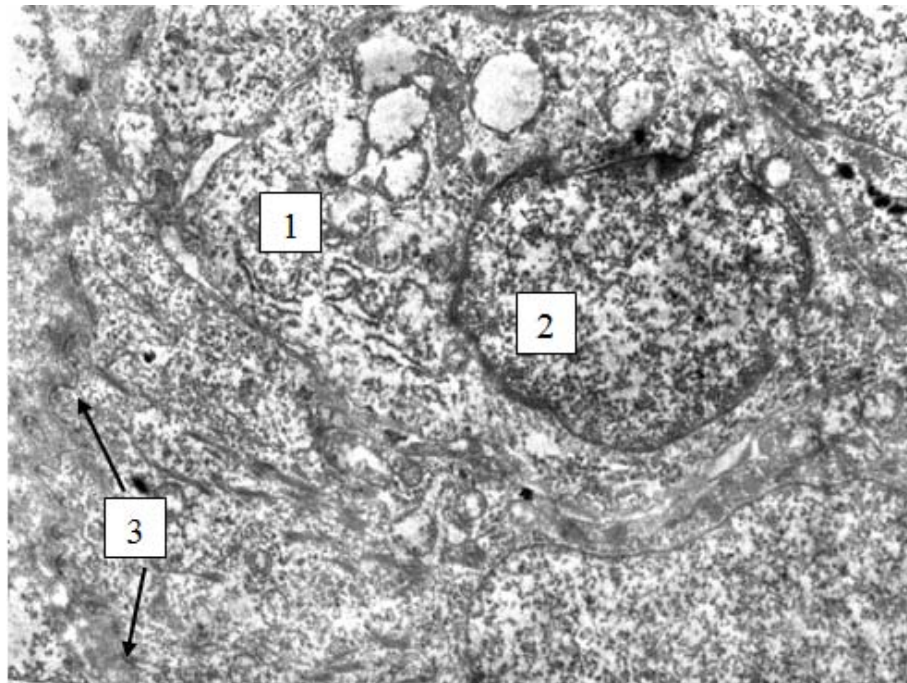


Рис. 4.4. Ультраструктура епідермісу щура на 21-у добу після введення НЧ срібла 20 нм. Трансмійна електронна мікроскопія. $\times 6000$:

- 1 – цитоплазма базального епітеліоцита з вакуолями;
- 2 – ядро епідермоцита;
- 3 – базальна мембрана.

Спостерігались інвагінації ядра, нечіткі ділянки каріолеми. Органел було небагато, мітохондрій мало, вони з просвітленим матриксом і пошкодженими кристами. Плазмолема збережена, з'єднувалась за допомогою

нечітко оконтурованих напівдесмосом з базальною мембраною. Структура базальної мембрани залишалась порушеною, вона потовщувалась, гомогенізувалась. Мітози також зустрічались рідко.

Кератиноцити зернистого шару характеризувались подовгастою, плоскою формою, в цитоплазмі виявлялись грудки кератогіаліну у значній кількості. Спостерігвся пікнотиз ядра, каріоплазма була осміофільна. Канальці ендоплазматичної сітки і комплекс Гольджі практично не виявлялись. Сильно розшарований роговий шар був представлений витягнутими в довжину лусочками. У міжклітинних проміжках містилась дрібнозернисті речовина.

На 30-ту добу експерименту архітектоніка епідермісу зберігалась, але він стоншувався до $(23,4 \pm 1,2)$ мкм. Базальний шар залишався безперервним, епідермоцити контактували з базальною мембраною. Рідше зустрічались клітини з перинуклеарною вакуолізацією, мітозів було також мало. Ядро мало округлу форму, визначались 1-2 ядерця. В зернистому шарі зберігалась збільшена кількість гранул. Роговий шар розпушувався, потовщувався (рис. 4.5).

Мікроскопічно встановлено, що відновлення структури епідермісу і наближення його структурної організації до шкіри інтактних тварин відбувалось на 45 добу досліду після введення НЧ срібла 20 нм. Проте наявне стоншення епідермісу до $(24,1 \pm 0,8)$ мкм. Кількість мітозів було невисоким.

Волосяні цибулини, що розташовувались поблизу місця введення, були реактивно змінені. До того ж, структура сполучної тканини, що їх оточувала, зазнавала змін за рахунок порушення фіброархітектоніки, що призводило до змін трофіки. На 3-ю добу епітелій зовнішніх піхв потовщувався, розпушувався, однак мітотична активність залишалась на попередньому рівні. На 7-му добу зустрічались поодинокі епітеліоцити з ознаками субмікроскопічних змін. Структура цитоплазми була дезорганізованою, наявна очагова деструкція. Кількість мітохондрій значно знижувалась. Зустрічались поодинокі внутрішньоепідермальні макрофаги.

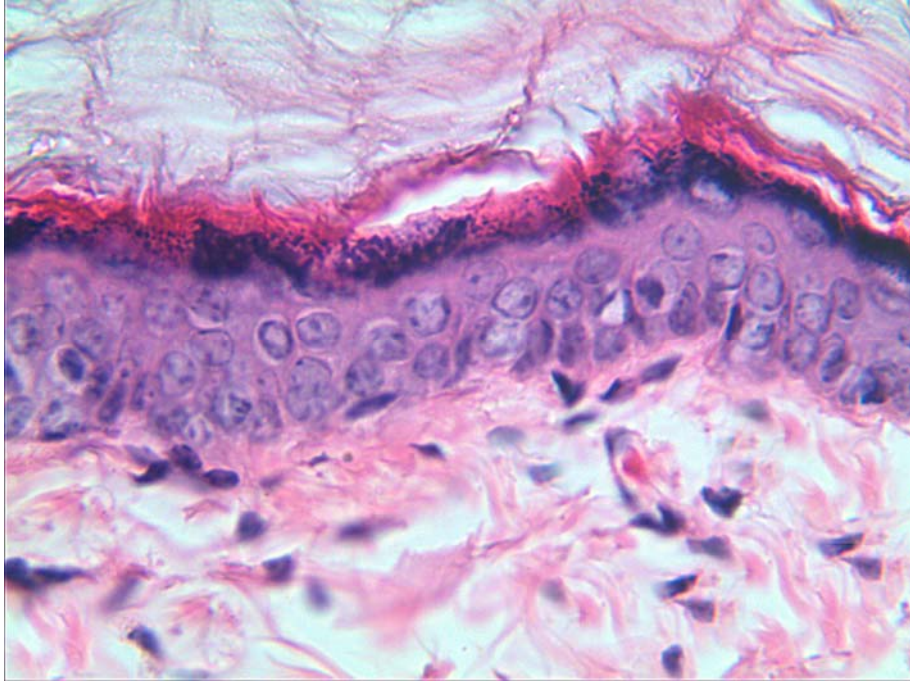


Рис. 4.5. Мікроскопічний стан шкіри щура на 30-ту добу після введення НЧ срібла 20 нм. Збережена структура епідермоцитів. Забарвлення гематоксиліном – еозином. $\times 400$.

Поодинокі мітози епідермоцитів починали з'являтися на 14-ту добу, однак при цьому мітотичний індекс залишався зниженим до кінця експерименту. На 30-ту добу все ще спостерігалась невисока мітотична активність, стоншення епітелію зовнішніх піхв, яке поступово відновлювалось до 45-ої доби, але не досягало показників норми. Ймовірно, це пов'язано з порушенням структури базальної мембрани. Динаміка змін мітотичного індексу представлена на рисунку 4.6.

Порівняно з даними, отриманими в контрольній 2-ій групі тварин, яким вводився колоїдний розчин іонів срібла, за умов впливу НЧ срібла 20 нм відмічалось значне зниження МІ. Максимальне зниження МІ спостерігали на 14-ду добу експерименту. Навіть на 45-у добу в групі 3.1 МІ на 25,4 % ($p < 0,05$) нижчий, ніж в цей термін в 2-ій групі.

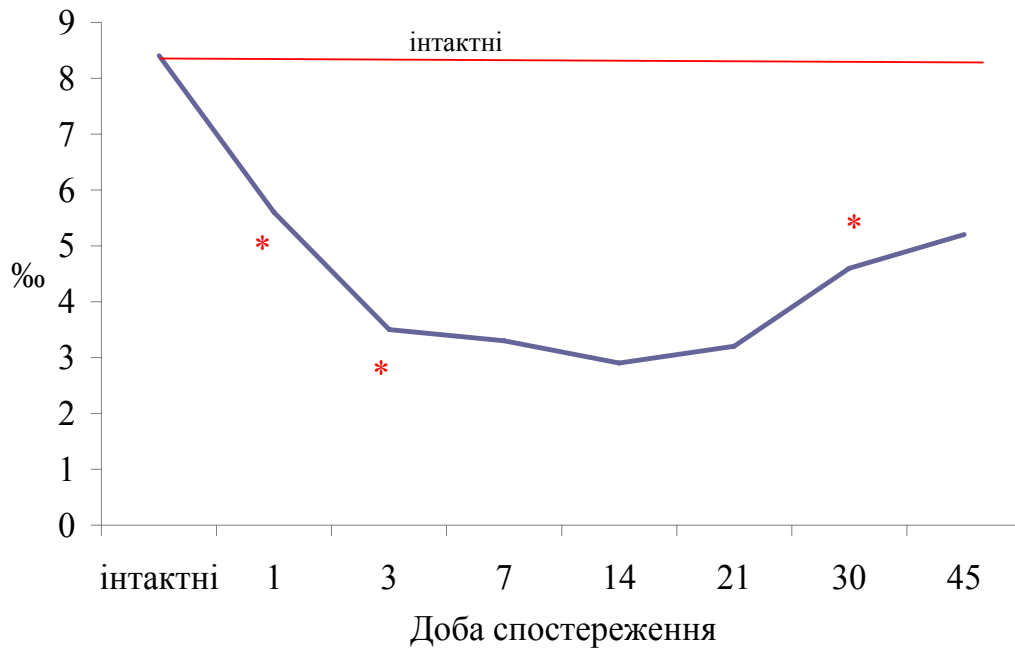


Рис. 4.6. Динаміка змін МІ клітин епідермісу за умов впливу НЧ срібла 20 нм, * - $p \leq 0,05$ порівняно з попередніми термінами спостереження.

Таким чином, за умов впливу НЧ срібла розміром 20 нм спостерігалось порушення структури та функціональної активності епідермісу, а саме: збільшення кількості клітин базального шару з явищами вакуольної дистрофії на 42,5 % ($p < 0,05$), що досягало максимуму на 14-ту добу; значне зниження мітотичної активності клітин епідермісу, максимальне зниження на 61,5 % ($p < 0,05$) відмічалось на 14-ту добу, на 45-ту добу МІ залишалось зниженим на 29,3 % ($p < 0,05$); зміни структури базальної мембрани, а саме її гомогенізація та потовщення.

4.1.2. Морфофункціональна характеристика дерми. Після введення НЧ срібла 20 нм на першу добу досліджу структури сосочкового шару дерми порушувалась внаслідок набряку, змінювалась фіброархітектоніка. Сосочки помірно згладжувались. Змінювалось співвідношення клітинного складу сосочкового шару за рахунок гетерокінезу клітин гематогенного походження і макрофагів. Тучні клітини активізувались, багато з них перебувало в стадії дегрануляції. Збільшувалась кількість макрофагів і нейтрофілів. У сітчастому

шарі відзначались незначні явища набряку, фіброархітектоніка зберігалась. Просвіти судин всіх сплетьонь розширювались, визначався набряк їх стінки, наявні ділянки лейкоцитарної інфільтрації периваскулярних просторів.

Мікроскопічні дослідження на 3-ю добу досліду показали, що структурна організація дерми зберігала шаровість, проте в сосочковому шарі наявний набряк, проте він був меншим у порівнянні з попереднім терміном. У сітчастому шарі набряк був незначним. Волокна сосочкового шару виглядали розпушеними, місцями гомогенізованими. Клітинний склад змінювався за рахунок гетерокінезу клітин гематогенного походження (рис. 4.7).

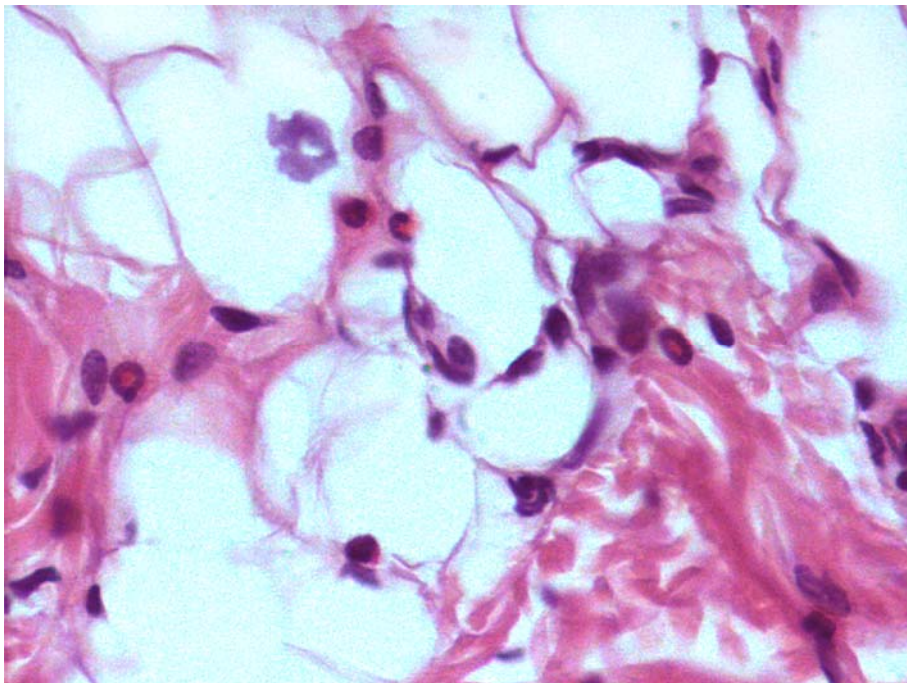


Рис. 4.7. Мікроскопічна організація дерми шкіри щура на третю добу після введення НЧ срібла 20 нм. Набряк сосочкового шару, збільшена кількість клітин гематогенного походження. Забарвлення гематоксиліном – еозином. $\times 400$.

Спостерігались лейкоцитарна інфільтрація у якій було багато макрофагів, вони розташовувались групами. Зустрічались поодинокі нейтрофільні гранулоцити. Кількість де гранульованих тучних клітин знижувалась. Менше

виявлялось фібробластів, серед них були клітини з великим ядром, світлою цитоплазмою. Просвіти судин всіх сплетьень були розширені, їх кількість не змінена. Навколо судин відзначалось скупчення макрофагів.

Субмікроскопічно визначаються набряклі, розпушені, місцями ущільнені колагенові волокна. В цитоплазмі фібробластів органел, що забезпечують синтетичні процеси було небагато.

На 7-му добу експерименту в сосочковому шарі мікроскопічно відмічалось зниження міжклітинного набряку. Колагенові волокна розташовані пухко. Значно знижувалась міждиферонна гетероморфія за рахунок кількості макрофагів, проте вона не досягала значень тварин інтактної групи.

Фібробласти розташовувались місцями групами, місцями відокремлено, мали великі світлі ядра. Навколо груп фібробластів відзначалась збільшена кількість еозинофільних незрілих волокон.

Електронномікроскопічні дослідження показали, що в складі дерми наявні пухкі колагенових фібрил між якими розташовані фібробласти. Частина клітин мала подовгасті ядра з ядрцем. Зустрічались ділянки з значною кількістю пучків колагенових фібрил (рис. 4.8).

У сполучній тканині зустрічались також макрофаги. Просвіти судин субпапілярного сплетення розширювались, їх стінки були набряклими, потовщеними, спостерігалась периваскулярна інфільтрація.

Через 14 діб досліду структурна організація пухкої сполучної тканини сосочкового шару дерми залишалась зміненою. Фіброархітектоніка порушувалась, наявні ділянки дезорганізованих колагенових волокон, місцями спостерігались скупчення еозинофільних волокон. В осередку грануляційної тканини переважали гістіоцити. Фібробласти розташовувались поодинокі, їх кількість знижувалась.

При електронній мікроскопії субепідермальна сполучна тканина виглядала пухкою, місцями більш щільною. Лише незначна частина клітин фібробластів містила ознаки активації білок-синтезуючих органел. Такі клітини мали округле ядро з еухроматином в каріоплазмі (рис. 4.9).

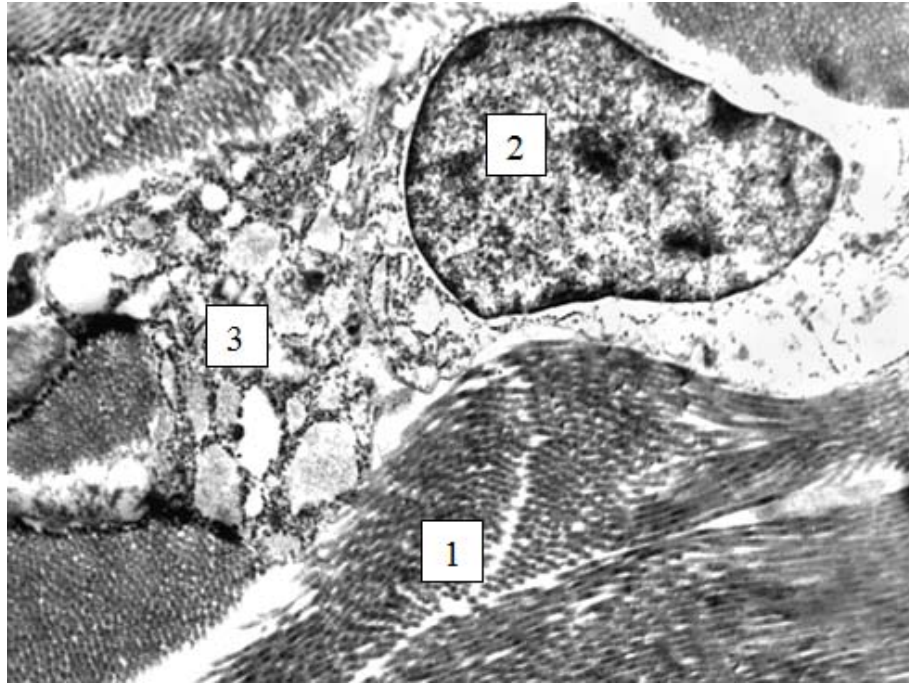


Рис. 4.8. Ультраструктура дерми шкіри щура на 7-му добу після введення НЧ срібла 20 нм. Трансмісійна електронна мікроскопія. $\times 5000$:

- 1 – пучки колагенових фібрил;
- 2 – ядро фібробласта;
- 3 – цитоплазма фібробласта.

Судини субпапілярного сплетення залишались розширеними, проте їх стінки добре оконтуровані, були оточені набряклою сполучною тканиною.

На 21-шу добу відмічалась поступова реорганізація грануляційної тканини в щільну сполучну. Це відбувалось повільно через знижену кількість фібробластів і гістіоцитів. Тому спостерігалась дезорганізація структури тканини, волокна не мали спрямованості, були нещільними, відстояли один від одного. Поступово знижувалась міждиферонна гетероморфія, внутрішньо-диферонний розподіл фібробластів за ступенем зрілості також змінювався. Переважали зрілі та дефінітивні форми, кількість молодих фібробластів була малою. Судини всіх сплетень за структурною організацією були подібні інтактної групі тварин. Місцями спостерігалось навіть звуження артеріол.

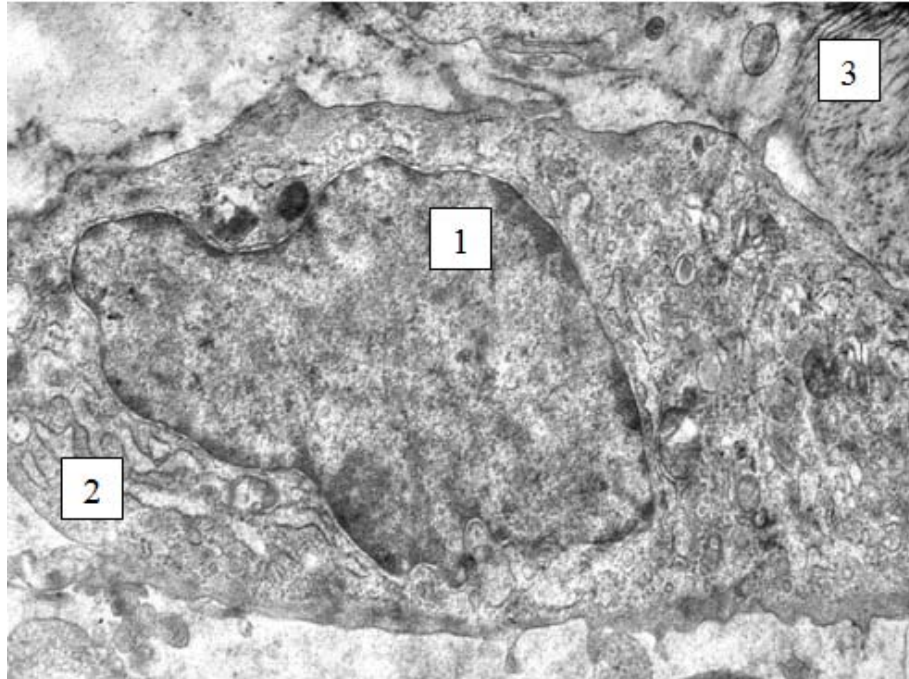


Рис. 4.9. Ультраструктурний стан дерми шкіри щура на 14-ту добу після введення НЧ срібла 20 нм. Трансмісійна електронна мікроскопія. $\times 7000$:

- 1 – ядро фібробласта,
- 2 – цитоплазма фібробласта,
- 3 – колагенові фібрили.

В пізні терміни дослідження (30-та, 45-та доби) мікроскопічно спостерігались зміни дерми, подібні попереднім термінам дослідження зберігались. В сосочковому шарі порушена фіброархітектура в місці введення наночастинок. містились різноспрямовані, потовщені волокна (рис. 4.10).

Серед фібробластів переважали клітини з низькою функціональною активністю, збільшувалась кількість фіброцитів.

Співвідношення клітинних елементів сполучної тканини відновлювалось поступово, а внутрішньодиферонна гетероморфія фібробластів залишалась зміненою. Збільшувалась кількість дефінітивних форм, тоді як кількість юних клітин та фібробластів, що диференціюються, знижувалась.

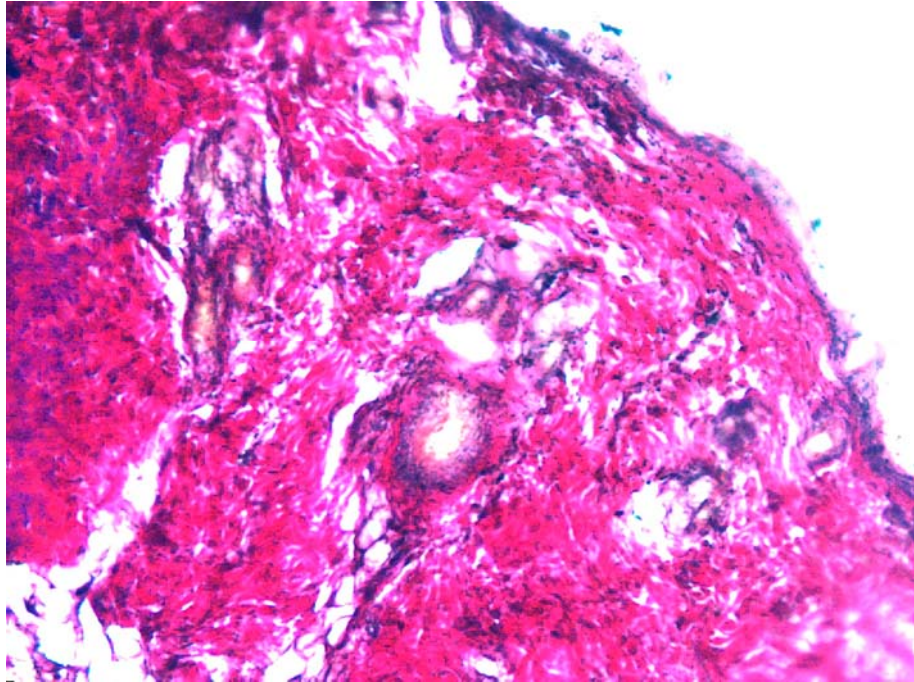


Рис. 4.10. Дерма шкіри щура на 30-ту добу після введення НЧ срібла 20 нм. Потовщенні колагенові волокна. Забарвлення за Ван Гізоном. $\times 100$.

Оцінка міждиферонної та внутрішньодиферонної гетероморфії проводилась за допомогою морфометричних досліджень. Визначали співвідношення клітин дерми; співвідношення різних, за ступенем зрілості, форм клітин одного диферону. Зміни співвідношення клітин сосочкового шару дерми залежно від терміну експерименту представлені в таблиці 4.1.

Морфометрично встановлено, що найбільших змін зазнавала популяція макрофагів та фібробластів. Зниження відсоткової кількості фібробластів досягало мінімуму на 3-ю добу, а з 7-ї доби відмічалось поступове збільшення їх кількості. Частка макрофагів значно збільшувалась на 1-шу добу, тенденція росту кількості макрофагів зберігалась до 3-ї доби. Потім відмічалось їх поступове зменшення, але їх кількість залишалась підвищеною до 21-ї доби. При порівнянні з 2-ою групою тварин, що отримувала іони срібла привертала увагу подібність показників кількості всіх типів клітин крім кількості макрофагів, що була значно нижчою, ніж у цієї групи. Це могло свідчити про наявність специфічної взаємодії НЧ з макрофагами.

**Динаміка змін клітинного складу дерми шкіри щурів за умов
впливу НЧ 20 нм ($M \pm m$, $n=6$, %)**

Доба	Фібробласти	Фіброцити	Тканинні базофіли	Макрофаги	Гранулоцити	Лімфоцити
Інтактні	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	62,3±3,2 [#]	8,5±0,8	7,9±0,4 [#]	15,9±0,3 [#]	3,9±0,4 [#]	1,7±0,2
3	50,4±3,1* #	8,9±0,2	9,5±0,1* [#]	22,2±1,2* ***	2,0±0,2*	2,0±0,4
7	61,0±3,4* #	9,1±0,1	4,8±0,1*	17,4±1,8 [#] * **	1,6±0,1*	1,7±0,5
14	70,6±2,2*	9,9±0,2* [#]	4,3±0,1*	13,9±2,3 [#] *	0,7±0,1* [#]	2,3±0,7
21	74,5±3,3	9,5±0,1	2,3±0,2* [#]	9,6±1,9*	0,3±0,2 [#]	1,6±0,5
30	75,8±4,4	9,9±0,1 [#]	1,8±0,1* [#]	8,9±0,6	0,2±0,2 [#]	1,4±0,3
45	76,4±7,4	9,8±0,2 [#]	3,1±0,5* [#]	8,8±0,2	0,4±0,2 [#]	1,2±0,4

Примітки:

1. * - $p < 0,05$ порівняно з попереднім терміном спостереження;
2. # - $p < 0,05$ порівняно з контрольною групою;
3. ** - $p < 0,05$ порівняно з групою 2, що отримувала іони.

Як відомо, популяція макрофагів неоднорідна, виділяли 3 типи макрофагів згідно їх функціональної активності та особливостей ультраструктурної будови. За умов внутрішньо шкірного введення НЧ срібла розміром 20 нм відмічалась зміна гетеромофії популяції макрофагів (рис. 4.11).

Як видно з діаграми, найбільших змін зазнавала кількість макрофагів моноцитарного типу, яка збільшувалась максимально на 21-шу добу.

Збільшення кількості макрофагів фагоцитуючого типу на 3-ю добу мало тимчасовий характер. Кількість макрофагів секретуючого типу була знижена протягом всього експерименту. При порівнянні з 2-ою групою відмічалась подібна динаміка показників внутрішньодиферонної гетероморфії макрофагів. Але відмічались деякі особливості: а саме більш виражене підвищення кількості макрофагів моноцитарного типу за умов впливу НЧ срібла розміром 20 нм

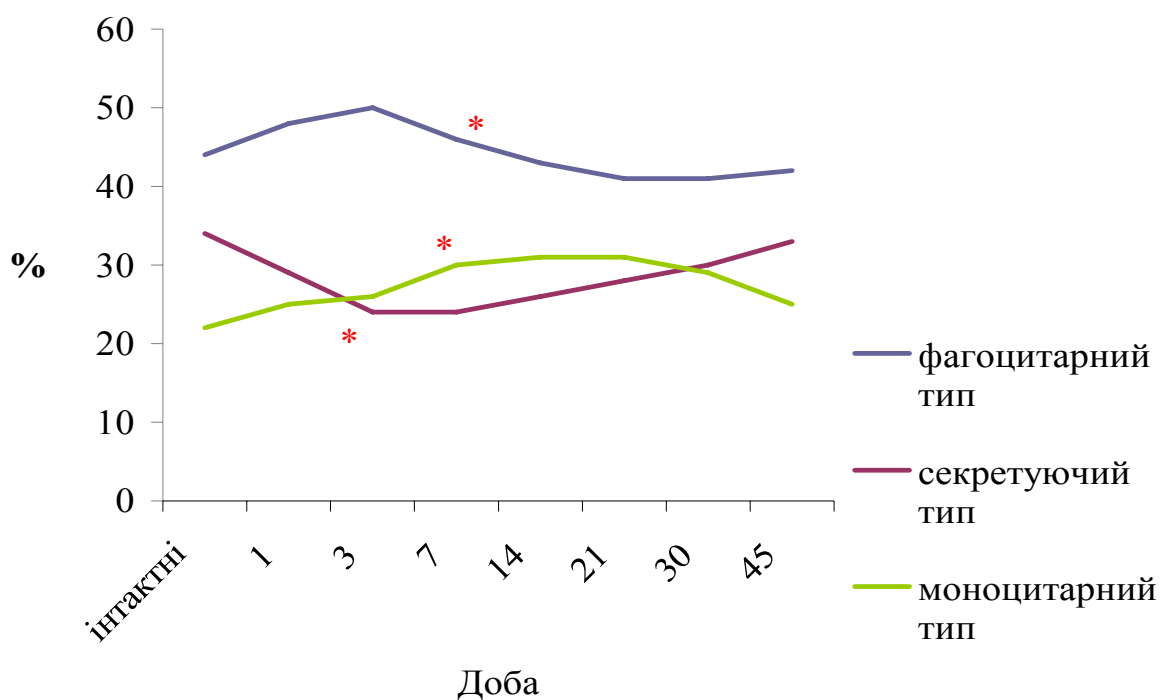


Рис. 4.11. Динаміка змін співвідношення різних функціональних типів макрофагів за умов впливу НЧ срібла 20 нм. * - $p < 0,05$ порівняно з попередніми термінами спостереження.

За умов впливу НЧ срібла наростала і внутрішньодиферонна гетероморфія фібробластів. При введенні НЧ Ag 20 нм відзначалось незначне збільшення вмісту малодиференційованих і диференційованих фібробластів, максимальна кількість яких відзначалась на 14-ту добу при формуванні грануляційної тканини, проте у результаті їх кількість знижувалась, і на 45-ту добу їх менше, ніж в інтактних тварин (табл. 4.2).

Розподіл клітин фібробластичного диферона за ступенем зрілості за умов впливу НЧ 20 нм ($M \pm m$, $n=6$, %)

Доба експерименту	Малодиференційовані	В стадії диференціювання	Зрілі фібробласти
Інтактні	5,7±0,3	9,8±0,7	85,3±0,5
1	6,4±0,7	10,7±0,6	82,2±0,7
3	8,9±0,8 ^{#*}	14,5±0,7 ^{#*}	77,5±0,2 ^{#*}
7	9,4±0,4 [#]	17,5±0,2 ^{#*}	75,4±0,8 ^{#*}
14	8,0±0,4 ^{#*}	22,6±0,9 ^{#*}	69,3±0,2 ^{#*}
21	5,9±0,2 [*]	16,5±1,7 ^{#*}	79,5±3,8 [*]
30	4,5±0,3 ^{#*}	12,8±0,5 ^{#*}	82,9±0,2 [#]
45	2,2±0,6 ^{#*}	8,8±0,5 [*]	89,1±0,8 ^{#*}

Примітки:

1. * – $p < 0,05$ порівняно з попереднім терміном спостереження;
2. # – $p < 0,05$ порівняно з контрольною групою;
3. ** – $p < 0,05$ порівняно з групою 2.

Проте, кількість зрілих фібробластів збільшувалась і на 45-ту добу їх кількість була збільшеною, порівняно зпоказником інтактних тварин.

При порівнянні з показниками, отриманими в другій групі, відмічалось значне зниження кількості фібробластів на стадії диференціювання, особливо на 14-ту добу на 16,3 % за умов впливу НЧ 20 нм. В обох групах відзначалось збільшення кількості зрілих фібробластів наприкінці експерименту. Зважаючи на те, що абсолютна кількість фібробластів не змінювалася, оскільки їх відсоткове співвідношення серед інших клітин дерми залишалось незмінним, то відносне збільшення зрілих форм фібробластів та зменшення юних форм могло свідчити про старіння популяції фібробластів.

Зміни в складі фібробластичного диферона та популяції макрофагів, а

саме зменшення макрофагів секретуючого типу, призводили до змін характеристик міжклітинної речовини і волокон. У шкірі щура колагенові волокна домінували, саме вони і зазнавали максимальних змін за умов впливу НЧ срібла 20 нм. Крім зміни структури волокон, які описані вище, відмічалися зміни їх кількості. На графіку (рис. 4.12) відображена динаміка змін кількості волокон за умов впливу НЧ 20 нм.

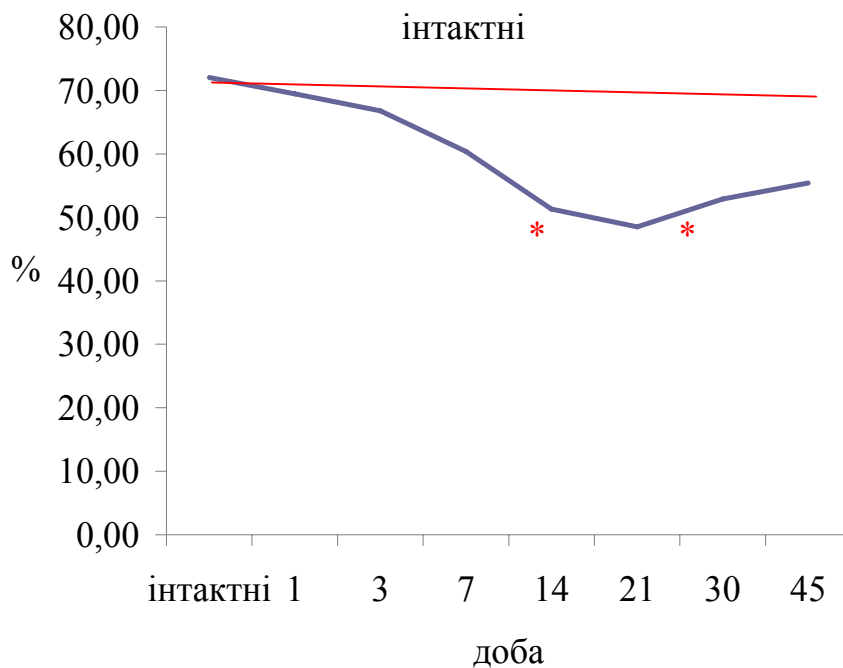


Рис. 4.12. Динаміка кількості колагенових волокон дерми за умов впливу НЧ срібла 20 нм. * - $p < 0,05$ порівняно з попередніми термінами спостереження.

Як видно, протягом усього експерименту спостерігалось зниження кількості колагенових волокон, яке починалось на 7-му добу і досягало максимуму на 21-шу добу. Потім, поступово кількість волокон збільшувалась, але не приходила до фізіологічних значень навіть на 45-ту добу. При порівнянні показників з групою 2, що отримувала 2%-ний колоїдний розчин іонів срібла, спостерігалась подібність динаміки змін, але в групі, в якій вводився розчин НЧ срібла розміром 20 нм, кількість колагенових волокон на

21-шу добу була нижчою, ніж в зазначений термін в групі, що отримувала колоїдний розчин іонізованого срібла. Це могло бути спричинено змінами внутрішньодиферонної гетероморфії фібробластів і макрофагів, що відбувалось в зазначені терміни та підтверджувало зниження їх синтетичної активності.

Кількість тучних клітин активно змінювалось лише в перші три доби експерименту, але зміна їх функціональної активності тривала довше. Для оцінки морфофункціонального стану тучних клітин використовувалися: кількість клітин на одиницю площі ($0,01 \text{ мм}^2$) й індекс дегрануляції, який свідчив про секреторну активність тканинних базофілів і визначався відношенням клітин, що дегранулюють, до загальної кількості тучних клітин. На 1-шу добу відмічалось збільшення кількості клітин та значне, майже в 10 разів збільшення їх активності. Тобто більшість клітини знаходились у стані дегрануляції. На третю добу, незважаючи на різке зниження кількості клітин, що свідчило про виснаження клітинного диферону, функціональна активність збільшувалась, тобто майже всі клітини, знаходились в стані дегрануляції. Поступове повернення кількості клітин до фізіологічних норм не призводило до відновлення функціонального стану, який залишався підвищеним (табл. 4.3). При порівнянні результатів з другою групою відмічалась подібність динаміки змін функціонального стану тучних клітин та їх кількості в обох групах.

Під впливом продуктів дегрануляції тучних клітин спостерігалось розширення просвітів судин дерми. Найдовше за терміном розширення судин спостерігалось в субпапілярному кровоносному сплетенні. При цьому спостерігалась кореляція між функціональною активністю тучних клітин і діаметром судин. Так, найбільш виражене розширення спостерігалось на 3-7-му добу, коли індекс дегрануляції найвищий, потім поступово діаметр судин зменшувався, але швидше, ніж знижувалась функціональна активність тучних клітин.

Динаміка зміни діаметру судин субпапілярного кровоносного спле-

тєння за умов впливу НЧ 20 нм представлена в таблиці (табл. 4.4). Як видно, найбільших змін зазнає діаметр венул, тоді як діаметр просвіту капілярів залишався майже незмінним. Розширення судин інших сплетень мало швидкоминучий характер. Порівняно з групою 2 за умов впливу НЧ срібла 20 нм відзначалась подібна реакція судин, а саме їх розширення, при цьому достовірна різниця в морфометричних показниках судинного русла була відсутня.

Таблиця 4.3

Морфофункціональний стан тучних клітин шкіри за умов впливу НЧ 20 нм ($M \pm m$, $n=6$, кл/0,01мм²)

Доба	Кількість клітин	Індекс дегрануляції
Норма	14,3±0,4	0,06±0,007
1	17,8±0,2* [#]	0,68± 0,03 [#]
3	8,5±0,3* [#]	0,83± 0,04* [#]
7	11,3±0,5* [#]	0,72± 0,07 [#]
14	14,2±0,2*	0,51± 0,08* [#]

Примітки:

1. * – $p < 0,05$ порівняно з попереднім терміном спостереження
2. # – $p < 0,05$ порівняно з контрольною групою.

Для оцінки кількості судин використовувався показник питомої площі петель. Незважаючи на зміни діаметру, питома площа петель залишалася майже незмінною, що свідчило про те, що кількість судин залишалася незмінною, а може навіть зменшувалась. Невелике збільшення питомої площі петель судинного сплетення на 3-тю добу корелювало зі збільшенням діаметру судин, але потім відмічалось суттєве зниження показника, який повертався до попередніх значень лише на 45-ту добу після внутрішньошкірного введення НЧ срібла розміром 20 нм (рис. 4.13).

**Динаміка змін діаметру судин субпапілярного кровоносного сплетення
щура за умов впливу НЧ 20 нм ($M \pm m$, $n=6$, мкм)**

Доба	Артеріоли	Капіляри	Венули
Інтактні	$13,6 \pm 0,5$	$6,1 \pm 0,1$	$54,8 \pm 0,4$
1	$16,8 \pm 0,8^*$	$6,8 \pm 0,2^*$	$56,8 \pm 0,2^*$
3	$18,2 \pm 0,4^{* \#}$	$7,2 \pm 0,1^*$	$61,5 \pm 0,1^{* \#}$
7	$19,2 \pm 0,3^*$	$7,2 \pm 0,2^*$	$64,5 \pm 0,3^{* \#}$
14	$18,8 \pm 0,5^*$	$7,4 \pm 0,3^*$	$57,6 \pm 0,4^{* \#}$
21	$16,4 \pm 0,4^{* \#}$	$6,8 \pm 0,4$	$55,6 \pm 0,4^{\#}$
30	$15,4 \pm 0,4^*$	$6,7 \pm 0,2^*$	$54,9 \pm 0,3$
45	$13,8 \pm 0,3$	$6,1 \pm 0,2$	$54,4 \pm 0,2$

Примітки:

1. * - $p < 0,05$ порівняно з інтактними тваринами;
2. # - $p < 0,05$ порівняно з попереднім терміном спостереження.

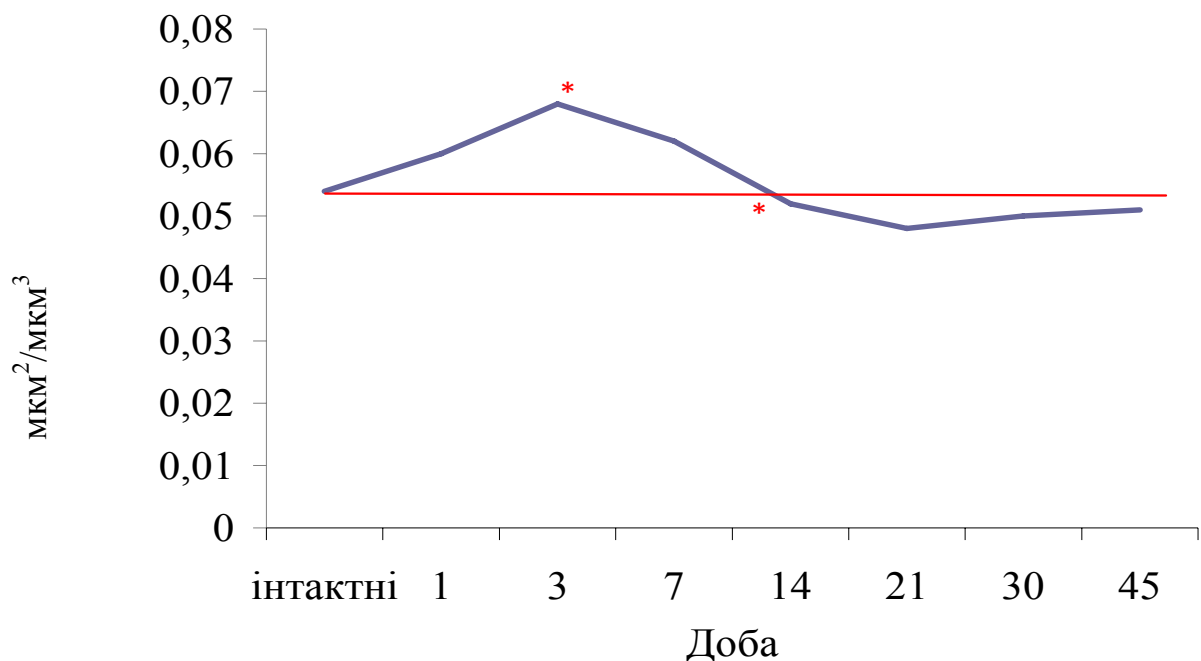


Рис. 4.13. Динаміка питомої площі поверхні петель субпапілярного сплетення шкіри за умов впливу НЧ срібла 20 нм, * - $p < 0,05$ порівняно з попередніми термінами спостереження.

Таким чином, за умов впливу НЧ срібла розміром 20 нм в тканинах шкіри щура спостерігалось порушення структури та функціональної активності епідермісу, а саме: збільшення кількості клітин базального шару з явищами вакуольної дистрофії на 42,5 % ($p < 0,05$), що досягало максимуму на 14-ту добу; значне зниження мітотичної активності клітин епідермісу, максимальне зниження на 61,5 % ($p < 0,05$) відмічалось на 14-ту добу, на 45-ту добу мітотичний індекс залишався зниженим на 29,3 % ($p < 0,05$); спостерігались необоротні зміни структури базальної мембрани, а саме її гомогенізація та потовщення. В дермі відмічались зміни 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-ю добу. Міждиферонна гетероморфія відновлювалась до показників інтактних тварин протягом 45 діб, а міждиферонна залишалась зміненою, насамперед у фібробластичному дифероні, де зменшувалась кількість функціонально активних фібробластів на 60,1 % ($p < 0,05$), що призводило до зниження кількості колагенових волокон на 35,6 % ($p < 0,05$) максимально на 21-шу добу. Зміни мікроциркуляторного русла дерми характеризувались розширенням на 6,8 % ($p < 0,05$) максимально на 3 добу.

4.2. Морфофункціональна характеристика шкіри за умов впливу наночастинок срібла розміром 30 нм

4.2.1. Морфофункціональна характеристика епідермісу. Незважаючи на те, що безпосередній контакт епідермісу і НЧ був відсутнім, після внутрішньошкірного введення в епідермісі спостерігався ряд морфологічних змін. Найбільш інтенсивні зміни відзначались лише над місцем введення. Ймовірно, реакція епідермісу на введення НЧ в ранні терміни пояснювалась типовою відповіддю на альтерацію, тоді як в більш пізні терміни епідерміс реагував на трофічні порушення у зв'язку зі зміною структури базальної мембрани.

На першу добу після введення НЧ срібла розміром 30 нм архітектоніка епідермісу зберігалась. Він був утворений базальним, шипуватим, зернистим і роговим шарами, товщина ($31,4 \pm 1,2$) мкм. Клітини базального шару мали ознаки набряку, міжклітинні проміжки розширювались, але при цьому всі клітини зберігали зв'язок з базальною мембраною за допомогою напівдесмосом, а між собою з'єднувались десмосомами. В ядрі переважав еухроматин, знаходилось 1-2 великих ядерця. Мітохондрії в невеликій кількості локалізувались поблизу ядра. Гранулярна ендоплазматична сітка була розвинена слабо і представлена окремими короткими канальцями. Цитоплазма містила велику кількість рибосом і полісом. Іноді на електронних мікрофотографіях виявлявся комплекс Гольджі. Органели опори і руху епітеліоцитів були представлені тонкими кератиновими фібрилами. Клітин, що мітотично ділились, практично не зустрічалось.

Структура базальної мембрани зберігалась, вона мала вигляд електронно-щільний, складалася з двох шарів, хоча й зустрічалися ділянки набряку. У шипуватому шарі також відзначались явища міжклітинного набряку, міжклітинні проміжки розширювались, але міжклітинні контакти зберігались. Зернистий шар зберігав свою структуру, клітини містили зерна кератогіаліну. Роговий шар залишався незмінним, відмічалось відшарування лусочок.

На 3-ю добу після введення явища міжклітинного набряку зберігались. Епідерміс був представлений чотирма шарами, товщиною $31,4 \pm 1,2$ мкм. Безперевний шар базальних клітин лежав на базальній мембрані.

Структура базальної мембрани не зазнавала змін, хоча іноді зустрічались ділянки її набряку та потовщення. Крім епітеліоцитів у базальному шарі все частіше зустрічались внутрішньоепідермальні макрофаги, 2-3 шари шипуватих епітеліоцитів зберігали міжклітинні контакти, хоча міжклітинні проміжки були значно розширеними. Зернистий і роговий шар не змінювались.

На 7-му добу в структурі епідермісу визначались базальний, шипуватий

зернистий і роговий шари. Міжклітинні проміжки залишались розширеними за рахунок набряку. Наростала міждиферонна гетероморфія епідермісу за рахунок гетерокінеза клітин крові. При цьому частіше зустрічались внутрішньоепідермальні макрофаги. Плазмолема цих клітин виглядала нерівною, десмосом не утворювала. Ядро мало округлі форми обриси, в ньому переважав еухроматин. У цитоплазмі знаходилося багато мітохондрій з численними кристами, велика кількість лізосом і аутофагосом.

Базальні клітини містили округле ядро, часто 1-2 ядерця. Ядерна мембрана визначалась. Гетерохроматин ядра був рівномірно диспергований. Цитоплазма помірної електронної щільності містила велику кількість мікрофіламентів. У цитоплазмі також був підвищений вміст елементів гранулярної ендоплазматичної сітки, вільних рибосом, полісом дрібних щільних мітохондрій. Плазмолема базальних клітин прикріплювалась до базальної мембрани за допомогою напівдесмосом. Шар базальних клітин епідермісу не переривався. Клітини тісно контактували одна з одною за допомогою десмосом (рис. 4.14).

Базальна мембрана була потовщеною, місцями значно, мала гомогенний вигляд, хоча напівдесмосоми зберігались.

Крім описаного, зустрічались поодинокі базальні клітини з ознаками деструкції як ядерних, так і цитоплазматичних структур. При цьому вони зберігали плазмолему, яка з'єднувалась за допомогою напівдесмосом з вищеописаним матеріалом базальної мембрани.

В одиничних клітинах шипуватого шару зустрічались елементи перинуклеарного набряку (рис. 4.15). Великі ядра в цих клітинах містили ядерце. Епітеліоцити зернистого шару включали пікнотичні ядра, а їх цитоплазма містила зерна кератогіаліну. Шар рогових лусочок розпушувався, місцями розшаровувався.

На 14-ту добу архітектоніка шарів епідермісу не порушувалась, проте міждиферонна гетероморфія знижувалась за рахунок зниження кількості внутрішньодермальних макрофагів.

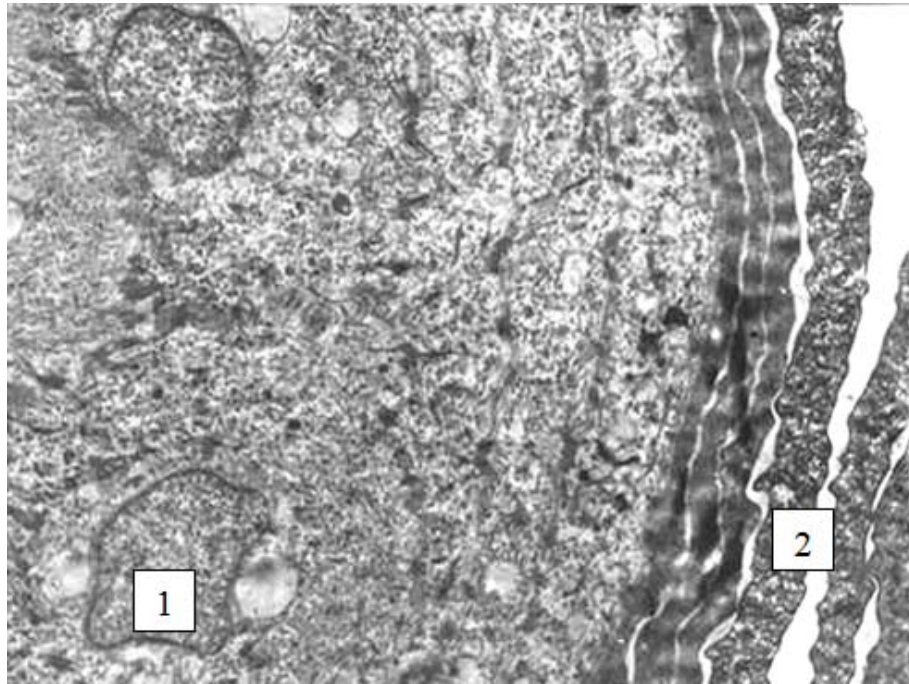


Рис. 4.14. Ультраструктура епідермісу щура через 7 днів після введення НЧ срібла 30 нм. Трансмісійна електронна мікроскопія. $\times 4000$:

- 1 – епідермоцити остистого шару;
- 2 – шар рогових лусочок.

В той же час наростала внутрішньодиферонна гетероморфія серед епітеліоцитів базального шару. Серед них зустрічались поодинокі фігури мітозу і клітини із пікнотичними ядрами. Клітини базального шару тісно з'єднанувались за допомогою десмосом. Частина клітин містила великі овальні ядра з диспергованим хроматином, інша частина базальних клітин містила ядра з багатопористою каріолемою. Цитоплазма епідермоцитів містила пучки тонких мікрофіламентів, у великій кількості вільні рибосоми і полісоми. Кількість клітин з перинуклеарною вакуолізацією значно знижувалась. Плазмолема базальних клітин прикріплювалась до базальної мембрани. Базальна мембрана була мало зміненою.

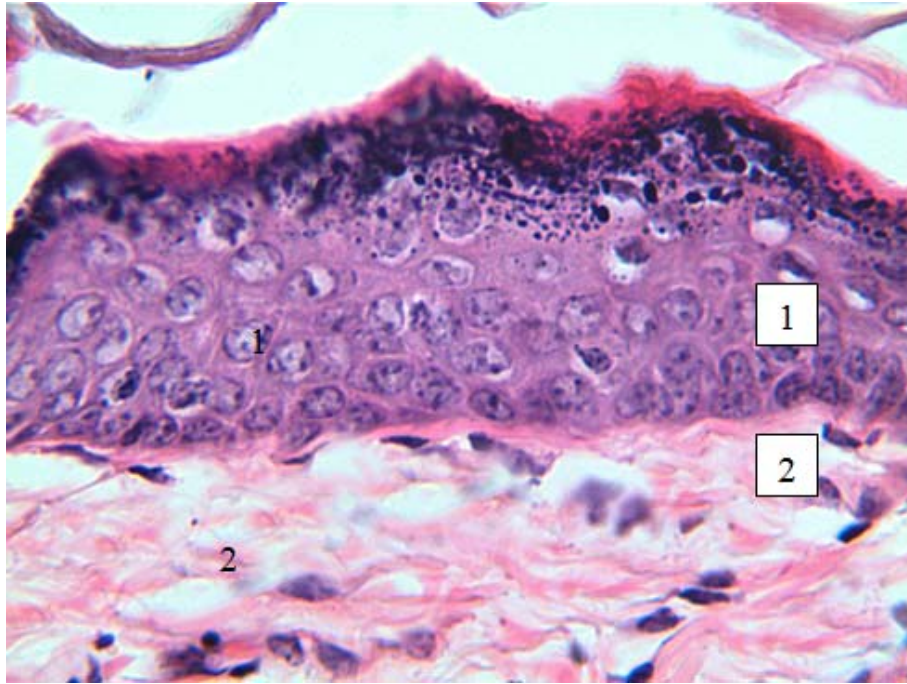


Рис. 4.15. Мікроскопічний стан шкіри щура на 7-му добу після введення НЧ срібла 30 нм. Забарвлення гематоксиліном – еозином. $\times 400$.

1 – епідерміс;

2 – сосочковий шар дерми.

Таким чином, слід зазначити, що субмікроскопічно стан органел цитоплазми і структура ядер частини епідермоцитів базального і шипуватого шарів були подібні епідермісу тварин інтактної групи (рис. 4.16) .

На 21-шу добу епідермоцити базального шару містили світлі, округлої форми ядра, одно, а іноді два ядерця, світлу зернисту цитоплазму. При цьому вони мали незмінену плазмолему, яка з'єднувалась за допомогою напівдесмосом з базальною мембраною.

Базальна мембрана представляла собою електронно-щільну структуру, що складалась з двох шарів, та за структурою наближалася до нормальної. Структура клітин шипуватого шару була подібна до структури клітин тварин інтактної групи. Епідермоцити шипуватого шару містили ядро з ядерцем, зернисту цитоплазму зі збільшеною кількістю каналців ЗЕС, комплекс Гольджі та велику кількість мітохондрій. Вони з'єднувались між собою за

допомогою десмосом (рис. 4.17), міжклітинні проміжки складали 12-13 нм, тобто наближались до таких в інтактному епідермісі.

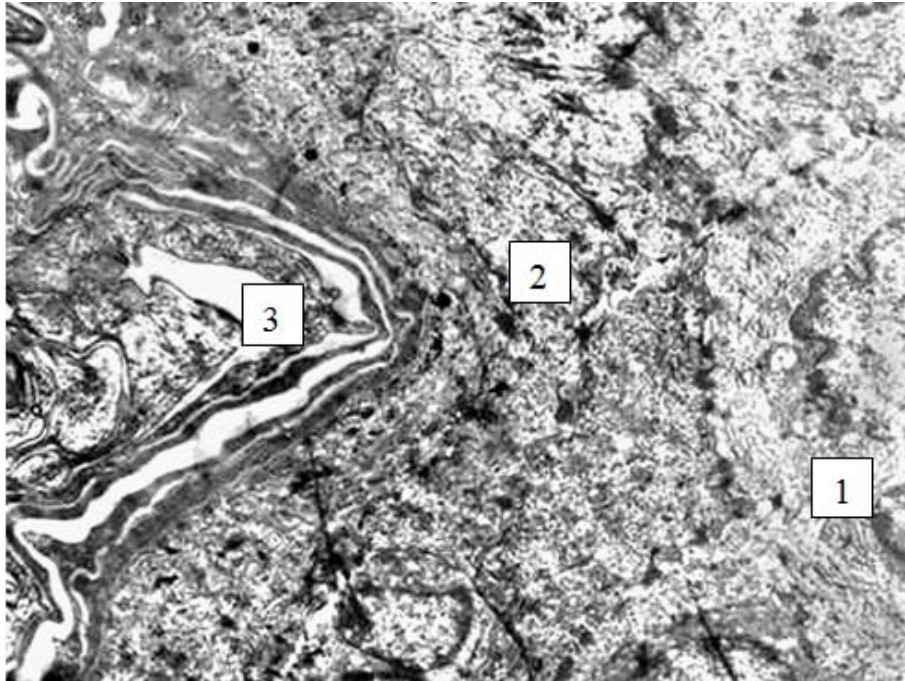


Рис. 4.16. Ультраструктурний стан епідерміса щура через 14 діб після введення НЧ срібла 30 нм. Трансмісійна електронна мікроскопія. $\times 4000$:

- 1 – епідермоцити шипуватого шару;
- 2 – кератиносоми зернистого шару;
- 3 – шар рогових лусочок.

Епітеліоцити зернистого шару характеризувались подовгастою формою. Цитолема їх виглядала потовщеною. У цитоплазмі виявлялись грудочки кератогіаліну у значній кількості.

У клітинах містилось пікнотичне ядро. Частина мітохондрій була зруйнована, в них виявлялись мієліноподібні структури. Канальця ендоплазматичної сітки і комплекс Гольджі практично не визначались. Роговий шар розшаровувався і був представлений витягнутими в довжину роговим лусочками.

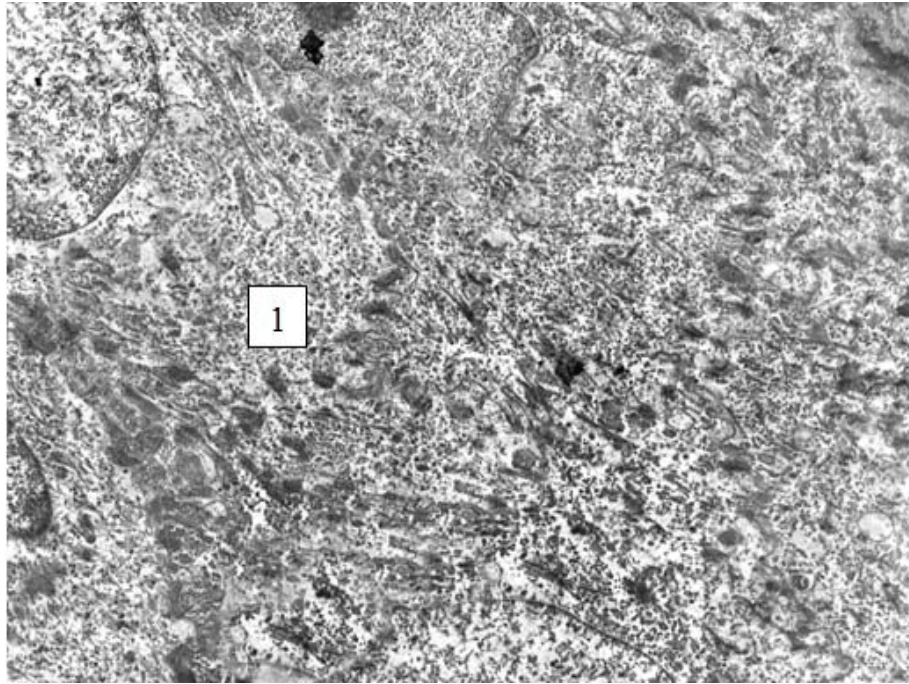


Рис. 4.17. Ультраструктура епідермісу щура через 21 добу після введення НЧ срібла 30 нм. Трансмісійна електронна мікроскопія. $\times 4000$:

1 – незмінені епідермоцити шипуватого шару.

На 30-ту добу експерименту продовжувалось зниження міждиферонної і внутрішньодиферонної гетероморфії. Архітектоніка епідермісу не зазнавала змін. В базальному шарі збільшувалась кількість клітин, що мітотично ділились, міжклітинні проміжки повертались до нормальних розмірів. Структура базальної мембрани не зазнавала змін. Клітини шипуватого шару мали невеликі пальцеподібні вирости. В зернистому шарі зберігалась збільшена кількість гранул. Роговий шар був розпушеним потовщеним (рис. 4.18).

Повне відновлення структури епідермісу і відновлення провідного клітинного диферона відбувалось на 45-ту добу.

Водночас епітеліальні піхви волосяних цибулин зазнавали реактивних змін. Найбільшим змінам піддавались волосяні цибулини, розташовані поблизу місця введення НЧ. До того ж, структура, оточуючої їх, сполучної тканини зазнавала значних змін, що могло спричинити зміни трофіки.

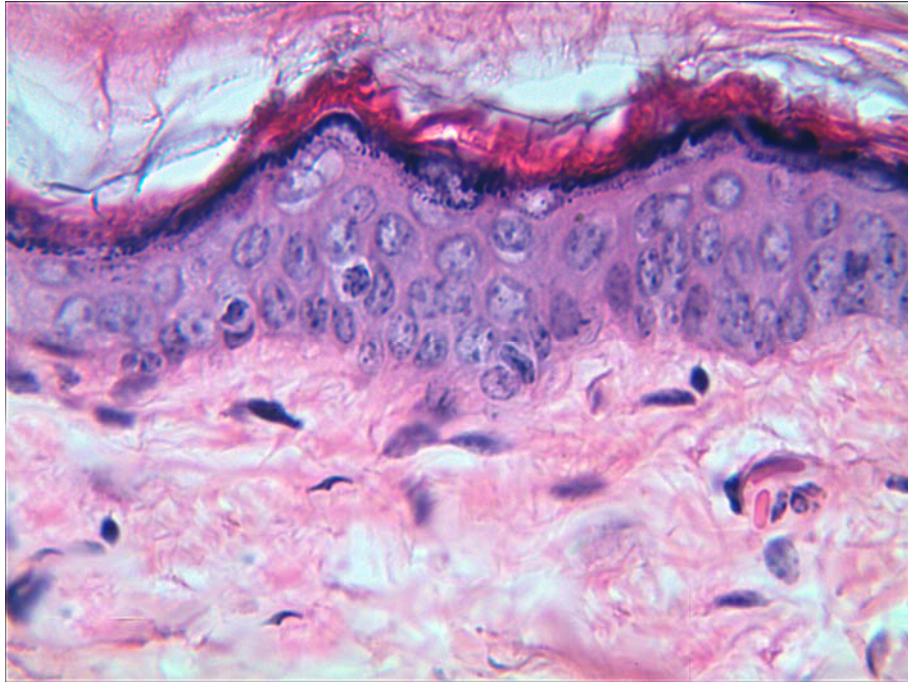


Рис. 4.18. Мікроскопічний стан шкіри щура на 30-ту добу після введення НЧ срібла 30 нм. Структура епідерміса подібна шкірі тварин інтактної групи. Забарвлення гематоксиліном – еозином. $\times 400$.

Регенераційний гістогенез епітелію починався з підвищення мітотичної активності епітеліоцитів покривного епітелію і волосяних піхов. Гістологічними маркерами регенераційного процесу було зростання ступеня гетероморфії епітеліоцитів, а також гетерокінез, що характеризував активацію міграції епітеліоцитів покривного епітелію і епітелію волосяних піхов. Уже на 7-му добу епітелій зовнішніх піхов потовщувався, розпушувався і в епітеліоцитах з моменту введення збільшувалась мітотична активність, зростали розміри і базофілія клітин, зазнавав гіпертрофії сам пласт (рис. 4.19). При диференційному забарвленні для виявлення нуклеїнових кислот визначалось збільшення кількості РНК у волосяних цибулинах, що розташовувались ближче до місця введення. Це свідчило про підвищення синтетичних процесів в епітелії. Свого максимуму гіпертрофічні процеси в епітелії волосяних цибулин досягали на 14-21-шу добу, що характеризувалось збільшенням кількості мітозів, гіпертрофією шару. Збільшення мітотичної

активності співпадало за термінами з відновленням структури базальної мембрани, яке відбувалось після 14-ї доби.

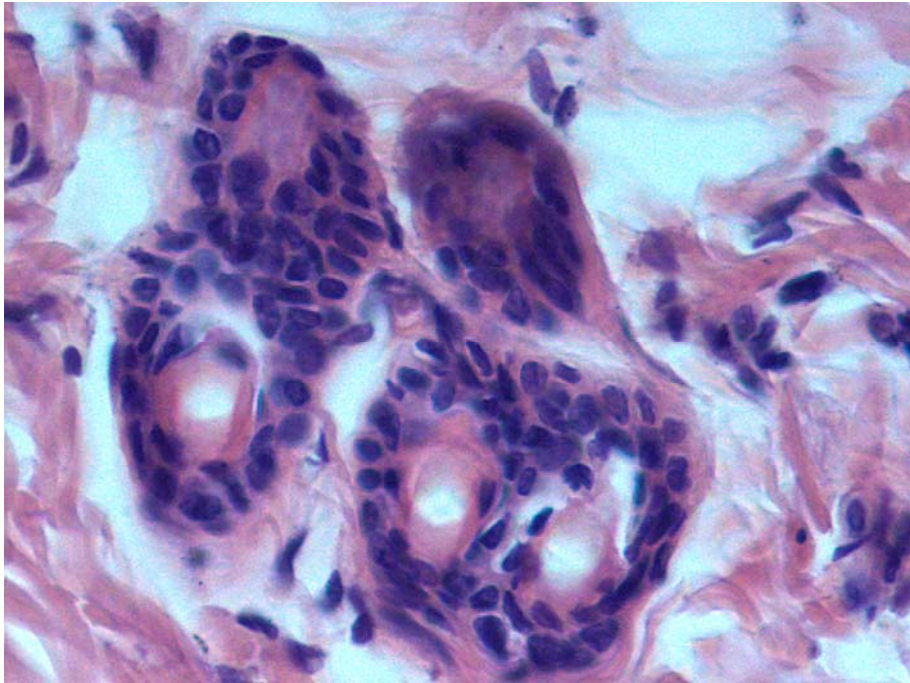


Рис. 4.19. Мікроскопічний стан волосяних цибулин дерми шкіри щура на 7-му добу після введення НЧ срібла 30 нм. Гіпертрофія епітелію зовнішніх піхв. Забарвлення гематоксиліном – еозином. $\times 400$.

У цей термін дослідження відзначалось збільшення МІ базальних клітин епідермісу, який знижувався на 36,1 % на третю добу, але потім, починаючи з 14-ї доби, зростав і досягав максимуму на 21-шу добу, після чого починав знижуватись на 30-ту добу, але все одно на 45-ту добу був вищим за показники інтактних тварин (рис. 4.20).

Ці дані відповідали термінам регенерації базальної мембрани, тобто ріст МІ відбувався після повної регенерації базальної мембрани на 14-у добу.

Порівняно з результатами експериментальної групи 3.1, що отримувала НЧ 20 нм, та 2-ої групи, яка отримувала іони срібла, в дослідній групі 3.2 відмічалось збільшення МІ, починаючи з 14-ї доби, тоді як в попередніх групах МІ був знижений протягом усього експерименту, і не досягав

показників інтактної шкіри на 45-ту добу експерименту.

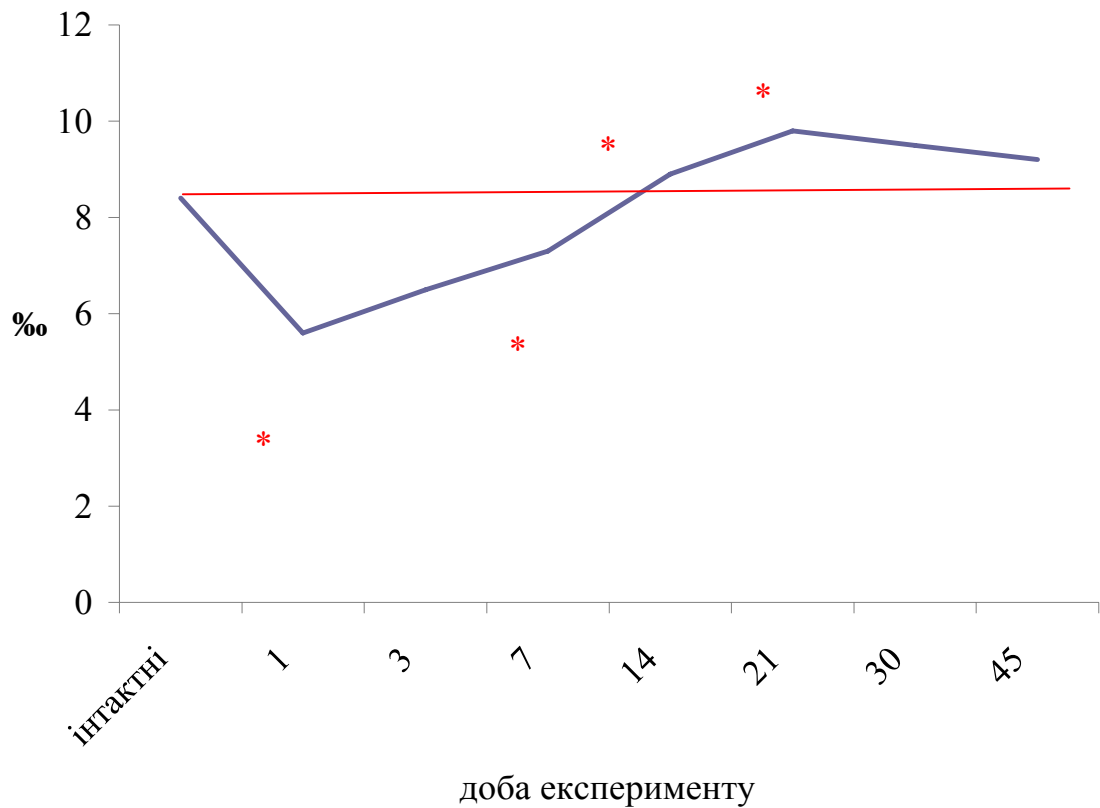


Рис. 4.20. Динаміка змін мітотичного індексу епідермісу за умов впливу НЧ срібла 30 нм, * - $p < 0,05$ порівняно з попереднім терміном спостереження.

У наступні терміни відбувалась гіпертрофія епітелію переважно за рахунок зміщення сюди епітелію зовнішніх волосяних піхв, що активно проліферували.

Таким чином, за умов впливу НЧ срібла розміром 30 нм спостерігались зміни структури та функціональної активності епідермісу, а саме: підвищення кількості клітин базального шару з явищами вакуольної дистрофії на 22,4 % ($p < 0,05$); значне підвищення мітотичної активності клітин епідермісу, максимальне підвищення на 16,5 % ($p < 0,05$) відмічалось на 21-шу добу, на 45-ту добу МІ залишався підвищеним на 9,9 % ($p < 0,05$);

зміни структури базальної мембрани мали зворотній характер, і вона повністю відновлювалась на 14-ту добу.

4.2.2. Морфофункціональна характеристика дерми. У результаті внутрішньошкірного введення НЧ срібла розміром 30 нм в шкірі виникав комплекс реактивних змін. Відразу після введення на межі сосочкового і сітчастого шарів формувалось вогнище розміром $251,5 \pm 3,5$ мкм, в якому визначався набряк і клітинна інфільтрація, потім формувалась грануляційна тканина, і завершувала процес адаптивна перебудова. В процесі наростала міждиферонна і внутрішньодиферонна гетероморфія і порушувалась фібро- і ангиоархітектоніка. Слід зазначити, що морфофункціональні зміни дерми відбувались лише у вогнищі введення, у віддалених ділянках відбувалися незначні зміни, які були статистично недостовірні.

У першу добу після введення структура дерми порушувалась, сосочки згладжувались, відмічався набряк пухкої сполучної тканини сосочкового шару. У місці введення збільшувалась кількість тучних клітин, з'являлись поодинокі нейтрофільні гранулоцити, незначно зростала кількість макрофагів та клітин фібробластичного диферона. Першими на введення майже вдвічі збільшували кількість тучні клітини, і більшість з них знаходились в стадії дегрануляції (рис. 4.21).

Під впливом секреторних продуктів тканинних базофілів підвищувалась проникність кровоносних судин, відбувався гетерокінез клітин системи крові.

Судини всіх сплетень були розширеними, повнокровними, їх стінки набряклими, інфільтрованими, навколо визначались поодинокі скупчення макрофагів. Колагенові волокна були набряклими, при забарвленні за Ван Гізоном вони зберігали фуксинофільність, фіброархітектоніка зберігалась. У сітчастому шарі дерми структура зберігалась, але визначались ознаки набряку. Судини сітчастого шару розширювались, але значно менше, ніж в сосочковому, макрофаги зустрічались значно рідше.

Проведені електронномікроскопічні дослідження показали, що в

сполучній тканині наявні пухкі, набряклі пучки колагенових фібрил, що розташовані один від одного. Частіше зустрічались макрофаги, які розташовувались поблизу судин.

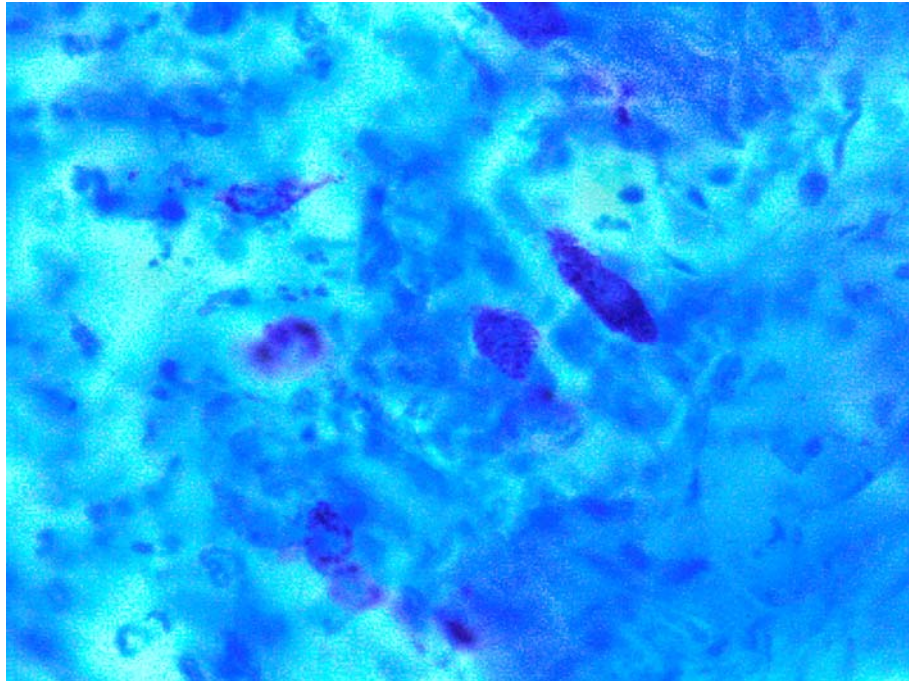


Рис. 4.21. Дерма шкіри щура на 3-ю добу після введення НЧ срібла 30 нм. Тучні клітини у стані дегрануляції. Забарвлення толуїдиновим синім. $\times 400$.

На третю добу в місці введення міждиферонна гетероморфія наростала за рахунок клітин крові, переважно макрофагів, кількість яких наростала до 35 % і вони активно фагоцитували (рис. 4.22).

Лейкоцитарна інфільтрація змінювалась гістіоцитарно, при цьому міждиферонна гетероморфія зростала, і фібробластичний диферон переставав домінувати. Це дозволяло констатувати трансформацію клітинного складу, і провідними елементами були макрофаги. Таким чином, міграція гематогенних клітин відбувалась гетерохронно і призводила до збільшення міждиферонної гетероморфії, що характерно для формування гістіона запалення.

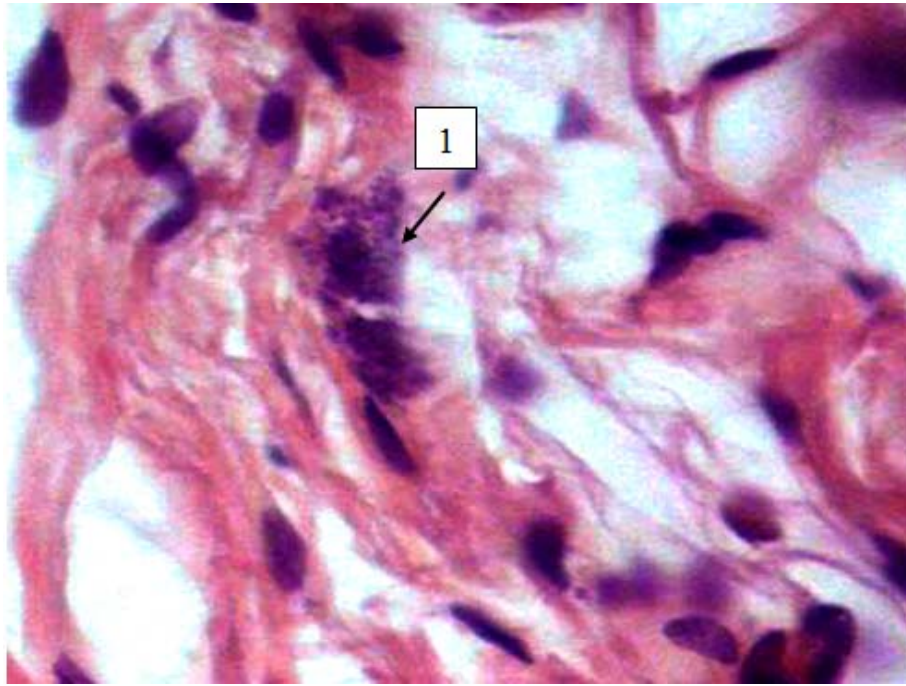


Рис. 4.22. Мікроскопічний стан дерми шкіри щура на 3 добу після введення НЧ срібла 30 нм. Забарвлення гематоксиліном – еозином. $\times 400$:

1 – активні макрофаги.

Фіброархітектоніка сосочкового шару дерми порушувалась. Біля ділянки введення наночастинок виявлялись набряклі, місцями гомогенізовані, або потовщені колагенові волокна, в зв'язку з дезорганізацією. При фарбуванні за Ван Гізоном вони характеризувались тільки осередковою пікринофілією. Еластичні волокна були розташовані рихло і нерівномірно розподілялись в пошкодженій ділянці.

При гістологічному дослідженні більш глибоких відділів дерми було встановлено, що межа між сосочковим і сітчастим шаром дерми нечітка, в останньому були виражені ознаки внутріщньодермального набряку. Разом з тим, хоча відзначалось набухання колагенових волокон, вони зберігали фуксинофілію при фарбуванні за Ван Гізоном, тобто їх тинкторіальні властивості зберігались (рис. 4.23).

Еластичні волокна сітчастого шару відмежовувались один від одного за рахунок набряку сполучної тканини. В сітчастому шарі дерми спостерігалась

клітинна інфільтрація прилеглої сполучної тканини.

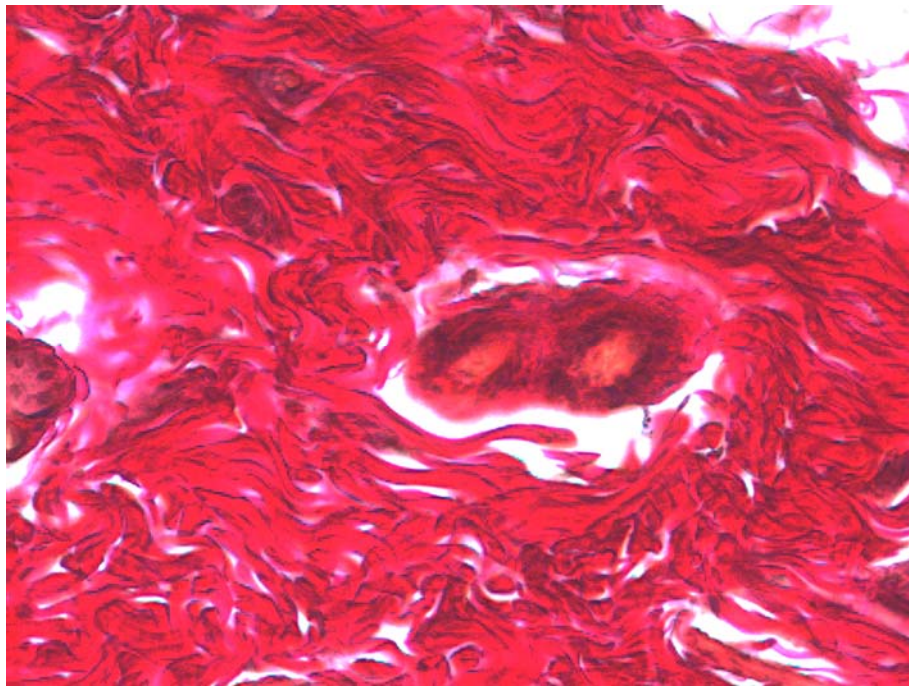


Рис. 4.23. Мікроскопічні зміни дерми шкіри щура на 3-ю добу після введення НЧ срібла 30 нм. Набряк колагенових волокон. Забарвлення за Ван Гізоном. $\times 400$.

На 7-му добу в місці внутрішньодермального введення НЧ срібла 30 нм починала формуватися грануляційна тканина, поступово знижувалась кількість клітин гематогенного походження і збільшувалась кількість клітин фібробластичного ряду. Архітектоніка дерми порушувалась. В осередку відзначались зміни структури й орієнтації колагенових волокон: вони були разволокнені й орієнтовані паралельно поздовжньої осі вогнища.

Просвіти кровоносних судин біля вогнища розширені, розташовувались групами, їх кількість збільшувалась. Найбільші зміни відмічались у субпапілярному сплетенні, судини якого значно розширювались, були повнокровними. Спостерігалось потовщення їх стінок, місцями периваскулярна інфільтрація лейкоцитами.

Електронномікроскопічні дослідження показали, що частина

фібробластів містили велике ядро і ядерце, ядерну оболонку з інвагінаціями, в цитоплазмі збільшену кількість органел, що забезпечували синтетичні процеси: канальця ЗЕС, вільні рибосоми і полісоми, комплекс Гольджі, збільшену кількість мітохондрій. Такі клітини були активними в синтезі попередників колагену. Частина фібробластів була менш активна, містила невелике ядро і помірно розвинені органели в цитоплазмі.

Пучки колагенових фібрил розташовувались часто на різній відстані один від одного, розділені електронно-прозорими ділянками аморфної речовини. Крім цього товщина колагенових пучків відрізнялась. Зустрічались товсті пучки, що складались з досить однорідних колагенових фібрил, за структурою близьких до нормальних. Водночас поряд розташовувались менш організовані колагенові пучки, а також короткі пучки. Частина фібрил розпушувались, мали неоднорідну осміофільну поперечну смугастість (рис. 4.24).

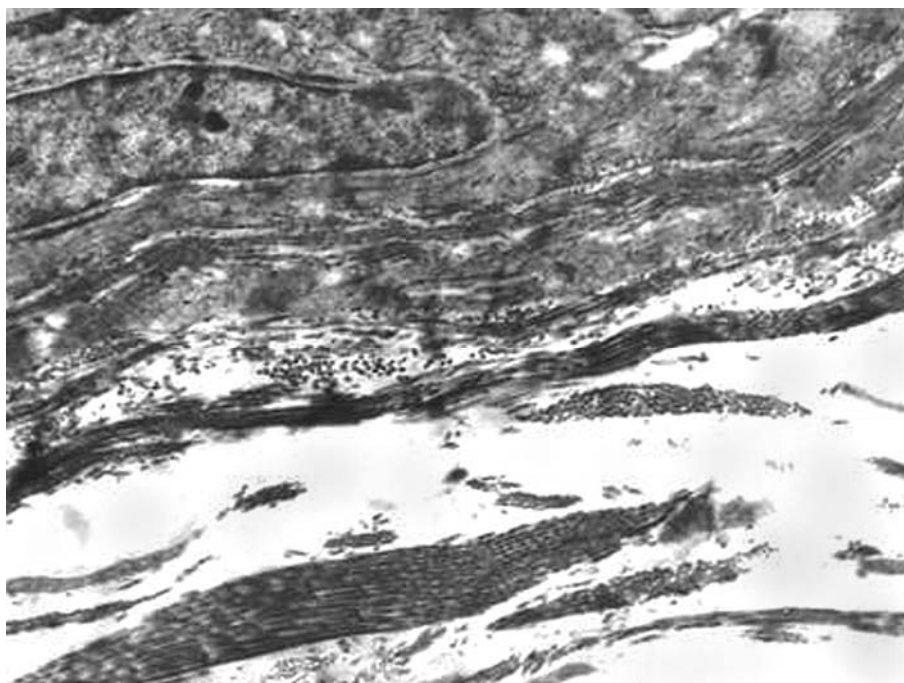


Рис. 4.24. Ультраструктура дерми шкіри щура через 7 діб після введення НЧ 30 нм. Сітчастий шар, пучки колагенових фібрил різної товщини. Трансмійна електронна мікроскопія. $\times 6000$.

Пучки колагенових фібрил мали різну товщину, зустрічались ділянки ущільнення чи розрихлення. Еластичні волокна стоншувались, їх кількість знижувалась.

Проведені гістологічні дослідження на 14-ту добу експерименту встановили домінування фібробластичного диферону. Міждиферонна гетероморфія дещо знижувалась, зате наростала внутрішньодиферонна, тобто серед фібробластів спостерігались різні за ступенем зрілості клітини, які мали ряд морфологічних особливостей залежно від ступеня диференціювання. Так спостерігалась певна динаміка ядерно-цитоплазматичного співвідношення.

При електронно-мікроскопічному дослідженні спостерігалась збільшення кількості фібробластів зі структурою близькою до нормальної, в порівнянні з попереднім терміном. Частина фібробластів містила різну кількість органел, що приймали участь у синтезі, тобто клітини знаходились на різних стадіях активності: від вираженої активації відповідних ультраструктур до слідів цих процесів, що підтверджувало наростання внутрішньодиферонної гетероморфії та активацію синтетичних процесів в дермі.

Структура дерми виглядала більш організованою, поступово відновлювалась фіброархітектоніка. Кількість колагенових волокон збільшувалась. Волокна утворювали сітку, або розташовувались паралельно. Також спостерігались колагенові пучки різних розмірів, одні складались з більш товстих фібрил, а інші – з тонких, але вони лежали більш впорядковано (рис. 4.25).

Просвіти судин субпапілярного сплетення залишались розширеними, повнокровними, вони лежали групами, кількість їх збільшувалась, стінки потовщувались, проте інфільтрація стінок знижувалась. Судини інших сплетень не зазнавали змін.

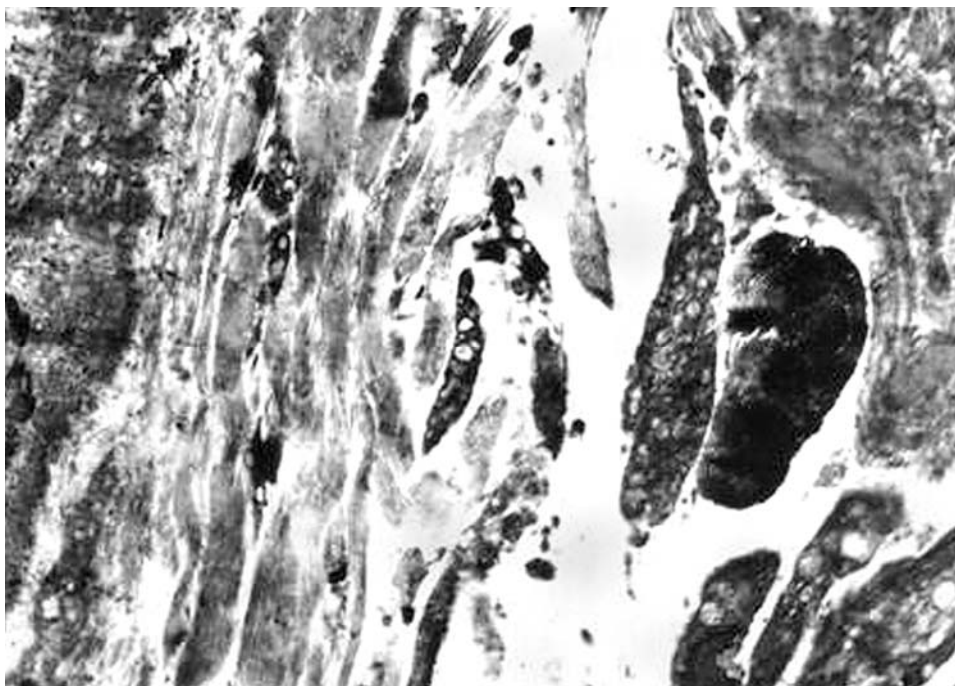


Рис. 4.25. Ультраструктура дерми шкіри щура через 14 діб після введення НЧ срібла 30 нм. Впорядковано розташовані пучки колагенових волокон. Трансмісійна електронна мікроскопія. $\times 4000$.

На 21-шу добу в фібробластичному ряді клітин переважали диференційовані фіброласти. Про їх високу синтетичну активність свідчила значна кількість органел, що забезпечують цей процес, а саме каналці ЗЕС, комплекс Гольджі, полісоми (рис. 4.26). Структура колагенових волокон була подібна до їх організації в дермі шкіри тварин інтактної групи. Переважним клітинним типом у осередку введення наночастинок стали термінальні клітини фібробластичного диферона – фіброцити, в яких більшу частину цитоплазми займало щільне ядро, ядерце практично не зустрічалось, кількість органел синтезу була значно зниженою, або майже відсутньою.

Фаза адаптації полягала в поступовій реорганізації грануляційної тканини і формуванні сполучнотканинного рубця. При цьому відбувалось зниження междиферонної і внутрідиферонної гетероморфії макрофагів, тканинних базофілів, фіброblastів, ендотеліоцитів, поступово знижувалось

число кровоносних судин. Грануляційна тканина заміщувалась щільною сполучною, що була представлена щільно прилеглими один до одного пучками колагенових волокон і розташованими між ними фіброцитами (рис. 4.27).

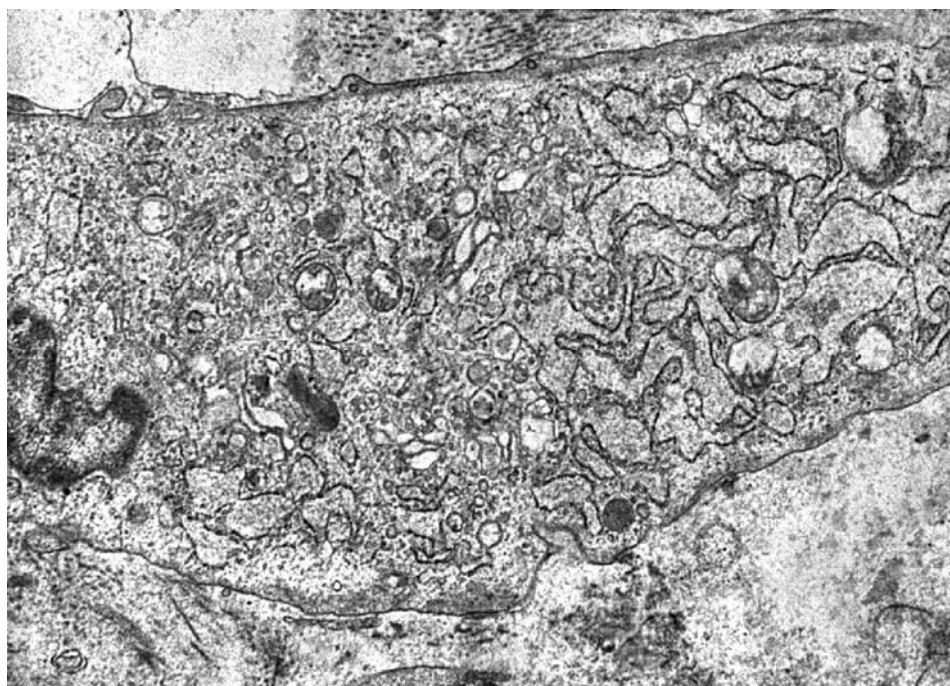


Рис. 4.26. Ультраструктура дерми шкіри щура через 21 добу після введення НЧ срібла 30 нм. Фрагмент фібробласта зрозвиненими органелами. Трансмісійна електронна мікроскопія. $\times 6000$.

Остаточно регенераційне оновлення структур шкіри відбувалась на 45-ту добу після внутрішньодермального введення колоїдного розчину НЧ срібла розміром 30 нм. Відновлювались фібро архітектоніка дерми, співвідношення клітинного складу. В дермі фібробластичний диферон домінував, хоча внутрідиферонна гетероморфія фібробластів залишалась зміненою. Збільшувалась кількість фібробластів з високим вмістом у цитоплазмі органел, що забезпечують синтетичні процеси.

Це засвідчувало підвищення функціональної активності фібробластів. Динаміка змін співвідношення клітин сосочкового шару дерми залежно від

терміну експерименту представлені в таблиці 4.5.

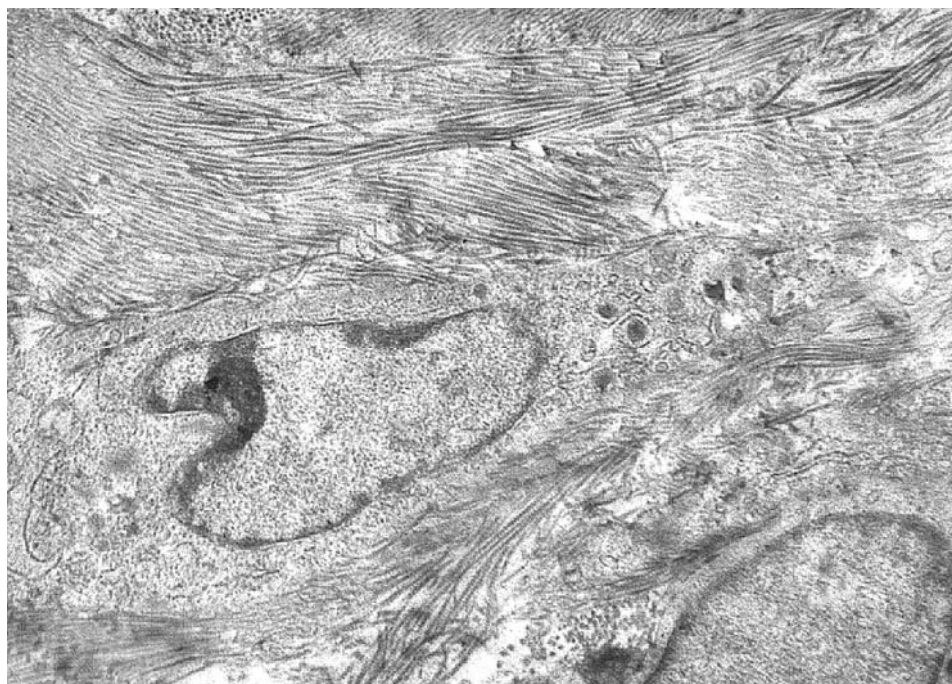


Рис. 4.27. Субмікроскопічна організація дерми шкіри щура через 21 добу після введення НЧ срібла 30 нм. Щільно розташовані колагенові фібрили. Трансмісійна електронна мікроскопія. $\times 6000$.

Макрофаги і тучні клітини першими реагували на внутрішньошкірне введення НЧ срібла розміром 30 нм. Найбільш значущіми були зміни макрофагів, їх кількість збільшувалась на 1-шу добу експерименту на 50,0 % порівняно з показниками інтактних тварин. Протягом наступних двох діб спостереження відносна кількість макрофагів зростала в 2,5 рази, досягаючи максимальних значень на третю добу експерименту, перевищуючи показники інтактних щурів в 3,8 рази ($p < 0,05$). На подальших термінах спостереження частка макрофагів серед інших клітин поступово зменшувалась і досягала показників інтактних щурів на 45-ту добу експерименту. Кількість тканинних базофілів збільшувалась починаючи з першої доби експерименту в 2,3 рази від показників інтактних щурів, але вже на 3-ю добу після внутрішньошкірного введення НЧ срібла розміром 30 нм спостерігали зменшення частки

зазначених клітин. На 14-ту добу експерименту частка тучних клітин відповідала показникам інтактних тварин. Надалі спостерігали виразне зменшення відносної кількості тучних клітин порівняно з показниками інтактних щурів.

Таблиця 4.5

**Динаміка змін клітинного складу дерми шкіри щурів за умов впливу НЧ
Ag 30нм (M±m, n=6, %)**

Доба	Фібробласти	Фіброцити	Тканинні базофіли	Макрофаги	Гранулоцити	Лімфоцити
Інтактні	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±0,7	9,9±0,04 [#]	14,1±0,3 [#]	4,7±1,4 [#]	1,8±0,5
3	62,4±1,4 [#]	5,9 ± 0,5 [#]	8,9±0,07 [*] #**	35,3±1,6 [*] #**	3,6±0,9 [#]	2,2±0,5
7	66,9±1,4 [*] #	5,1±0,2 [#]	5,6±0,16 [*] #	25,4±2,3 [#] ***	3,2±0,1 [#]	1,9±0,5
14	72,9±2,3 [*]	4,7±0,3 [#]	4,5±0,03 [*] #	19,1±0,3 [#] ***	0,8±0,03 [*] #	2,3±0,1 [#]
21	79,8±5,5 **	4,5±0,1 [#] **	1,5±0,2 ^{*#}	16,6±2,9 [#] **	0,1±0,06 [#] *	3,0±0,5 [#]
30	82,6±2,4 [#] **	4,9±0,4 [#] **	0,8±0,1 ^{*#}	12,1±0,6 [#]	0,3±0,07 [#] *	1,5±0,7 [*]
45	89,4±4,6 [#] **	5,8±0,2 ^{*#} **	2,1±0,2 [#]	8,5±0,6	0,5±0,04 [*] #	0,3±0,5 [#]

Примітки:

1. * – $p < 0,05$ порівняно з попереднім терміном спостереження;
2. # – $p < 0,05$ порівняно з контрольною групою;
3. ** – $p < 0,05$ порівняно з групою 2, що отримувала іони.

Зменшення кількості фібробластів в ранні терміни експерименту носило адаптивний характер і, починаючи з 14-ї доби, відмічалась тенденція до збільшення їх кількості, яка зберігалась до 45-ї доби, коли кількість фібробластів залишалась вищою за показники інтактних тварин на 19,2 % ($p < 0,05$). Частка гранулоцитів збільшувалась починаючи з 1-ї доби експерименту в 2,8 рази порівняно з показниками інтактних тварин і залишалась такою на 3-ю і 7-му добу спостереження. Починаючи з 14-ї доби спостереження частка гранулоцитів навпаки різко зменшувалась з мінімальними значеннями на 21-шу добу експерименту. Відновлення частки гранулоцитів до показників інтактних щурів не спостерігали до завершення спостереження на 45-ту добу експерименту.

Частка гранулоцитів збільшувалась починаючи з 1-ї доби експерименту в 2,8 рази порівняно з показниками інтактних тварин і залишалась такою на 3-ю і 7-му добу спостереження. Починаючи з 14-ї доби частка гранулоцитів, навпроти, різко зменшувалась з мінімальними значеннями на 21-шу добу експерименту. Відновлення частки гранулоцитів до показників інтактних щурів не спостерігали до завершення спостереження.

Порівняно з 2-ю групою, що отримувала іони срібла, спостерігалось більш виражене збільшення макрофагів за умов впливу НЧ 30 нм протягом усього експерименту, до того ж відмічалось більш тривале, до третьої доби, підвищення кількості тканинних базофілів. Так, максимальні розбіжності спостерігали на 3-ю добу експерименту, коли за умов впливу НЧ срібла розміром 30 нм, частка макрофагів в дермі перевищувала показники щурів, що отримували колоїдний розчин іонізованого срібла на 29,7 %, а частка тканинних базофілів перевищувала відповідні показники на 36,9 %. Привертає увагу той факт, що починаючи з 21-ї доби експерименту і до його завершення частка тканинних базофілів в дермі тварин, які отримували НЧ срібла розміром 30 нм, була меншою, ніж у тварин, які отримували колоїдний розчин іонізованого срібла на 36,4 – 70,4 % ($p < 0,05$). Кількість фібробластів в експериментальній групі тварин 3.1, починаючи з 21-ї доби була вищою, ніж

в 2-ій групі, тоді як кількість фіброцитів вища в групі, що отримувала іони.

Порівняно з групою тварин 3.1, що отримувала НЧ срібла 20 нм, теж спостерігалась більш виражена макрофагальна реакція, збільшення кількості фібробластів, та зменшення кількості фіброцитів. Так, максимальні розбіжності спостерігали на 3-ю добу експерименту, коли за умов впливу НЧ срібла розміром 30 нм, частка макрофагів в дермі перевищувала показники щурів, що отримували НЧ срібла розміром 20 нм на 59,0 %. Статистично достовірні відмінності між зазначеними групами зберігались до 30-ї доби спостереження включно. Частка тканинних базофілів на початкових етапах експерименту була більшою за умов впливу НЧ срібла розміром 30 нм ніж 20 нм. Максимальні відмінності спостерігали на першу добу експерименту, коли за умов впливу НЧ срібла розміром 30 нм спостерігали на 20,2 % більшу відносну кількість тканинних базофілів в дермі поміж інших клітин, ніж при введенні НЧ срібла розміром 20 нм. Але, починаючи з 21-ї доби експерименту і до 45-ї частка тканинних базофілів в дермі щурів, які отримували НЧ срібла розміром 20 нм була вищою. Напрямок змін частки гранулоцитів в дермі був однаковий за умов впливу НЧ срібла розміром 20 і 30 нм, але в період з 1-ї по 7-му добу експерименту включно кількісно частка гранулоцитів була більшою в дермі щурів, які отримували НЧ срібла розміром 30 нм.

Крім міждиферонної гетероморфії за умов впливу НЧ срібла наростала і внутрідиферонна гетероморфія фібробластів. Залежно від ступеня зрілості і функціональної активності розрізняли 3 види фібробластів: малодиференційовані, диференціюючі і зрілі. Найбільш достовірною морфометричною диференціальною ознакою є ЯЦІ, крім того відмічалась різна кількість органел, відповідальних за синтез. За умов впливу НЧ срібла 30 нм відзначалось збільшення вмісту малодиференційованих і фібробластів в стані диференціювання, максимальна кількість яких визначалась на 14-ту добу при формуванні грануляційної тканини (табл. 4.6).

Порівняно з зазначеними показниками в групах тварин 2 і 3.1, за умов впливу НЧ 30 нм спостерігалось збільшення кількості молодих форм, тоді як

кількість зрілих клітин в групі 3.2 нижча, порівняно з іншими групами. Тобто, відмічалось не тільки збільшення абсолютної кількості фібробластів, але й перерозподіл їх в групі.

Таблиця 4.6

Розподіл клітин фібробластичного диферона за ступенем зрілості за умов впливу НЧ Ag 30нм (M±m, n=6, %)

Доба	Малодиференційовані	В стані диференційювання	Зрілі фібробласти
Інтактні	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±0,1 ^{#*}	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 ^{#**}	11,5±0,1 ^{#*}	80,4±0,5 ^{#*}

Примітки:

1. * – $p < 0,05$ порівняно з попереднім терміном спостереження;
2. # – $p < 0,05$ порівняно з контрольною групою;
3. ** – $p < 0,05$ порівняно з групою 2, що отримувала іони.

Популяція макрофагів також зазнавала змін. Відмічався перерозподіл різних типів в бік збільшення кількості макрофагів секретуючого типу, яка досягала максимуму на 21-шу добу (рис 4.28). Порівняно з показниками, отриманими в групах тварин 2 і 3.1 динаміка змін співвідношення макрофагів достовірно відрізнялась в групі 3.2 з 21-ї доби за рахунок збільшеною кількості макрофагів секретуючого типу.

Зміни складу фібробластичного диферона та популяції макрофагів, а

саме збільшення кількості макрофагів секретуючого типу, призводило до змін характеристик міжклітинної речовини і волокон.

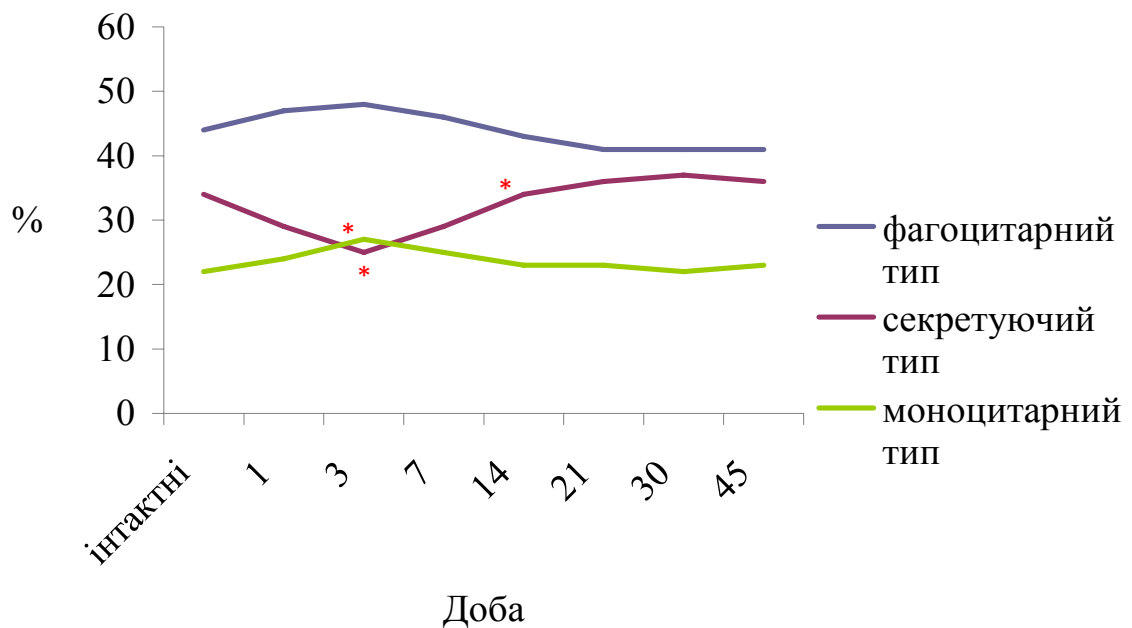


Рис. 4.28. Динаміка змін співвідношення різних функціональних типів макрофагів за умов впливу НЧ срібла 30 нм. * – $p < 0,05$ порівняно з попереднім терміном спостереження.

Крім зміни структури волокон, які описані вище, відмічалися зміни їх кількості. На графіку (рис. 4.29) відображена питома площа колагенових волокон, де відмічалось зростання кількості колагенових волокон, яке починалось на 14-ту добу і досягало максимуму на 30-ту добу, але потім кількість волокон все одно залишалась підвищеною на 12,3 %. В порівнянні з групами тварин 2, 3.1 спостерігалось достовірне збільшення кількості колагенових волокон за умов впливу НЧ срібла 30 нм після 14-ї доби, тоді як в інших групах визначалось зниження їх кількості протягом всього експерименту.

Вивільнення вмісту гранул тучних клітин стало першим пусковим механізмом, що розпочинало запальний процес. Тому морфофункціональна оцінка стану тучних клітин стала важливим критерієм реакції сполучної

тканини на подразнення. Незважаючи на те, що найбільша функціональна активність відмічалась на 3-ю добу, але при цьому в цей час була найменшою кількістю клітин, тоді як найбільша кількість медіаторів вивільнялась в першу добу. При цьому слід зазначити, що в наступні терміни зниження функціональної активності було незначним, але кількість клітин відновлювалась, тобто сукупна кількість медіаторів запалення змінювалась мало (табл. 4.7).

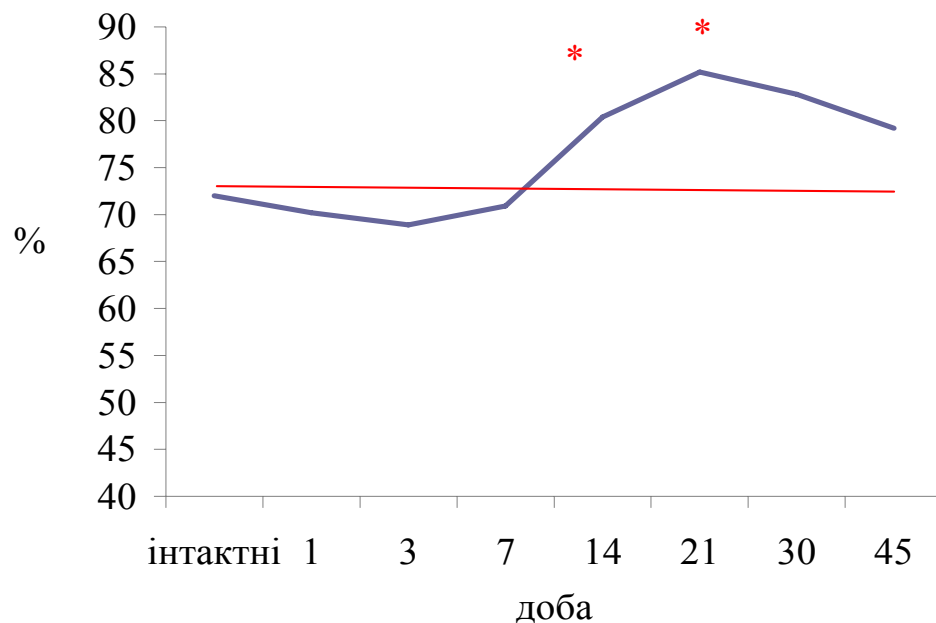


Рис. 4.29. Динаміка змін кількості колагенових волокон дерми за умов впливу НЧ срібла 30 нм. * – $p < 0,05$ порівняно з попереднім терміном спостереження.

При порівнянні з групами тварин 2 і 3.1 спостерігалась подібна динаміка змін морфофункціонального стану тканинних базофілів в усіх групах, достовірної різниці морфометричних показників не виявлялась. Через добу після внутрішньошкірного введення НЧ срібла 30 нм відзначалось збільшення діаметра всіх судинних сплетень шкіри в осередку ураження, за рахунок активації тучних клітин і їх дегрануляції. На третю добу експерименту тенденція до вазодилатації зберігалась. На сьому добу судини субпапілярного сплетення залишались ділятованими, досягнувши максимуму

на 14-ту добу, тоді як судини гіподермального і субдермальних сплетень починали поступово повертатися до вихідних розмірів. Крім того, відмічалось збільшення кількості судин, вони лежали групами, мали тонкі стінки.

Таблиця 4.7

Морфофункціональний стан тучних клітин шкіри за умов впливу Ag НЧ 30нм (M±m, n=6,кл/0,01мм², %)

Строк	Кількість клітин	Індекс
Норма	14,3±0,4	0,06±0,007
1	18,7±0,2 [#]	0,63±0,02* [#]
3	8,1±0,8* [#]	0,89±0,06* [#]
7	12,9±0,2* [#]	0,67±0,04* [#]
14	13,9±0,1*	0,41±0,05* [#]

Примітки:

1. * – $p < 0,05$ порівняно з попереднім терміном спостереження.
2. [#] – $p < 0,05$ порівняно з контрольною групою.

На 21-шу добу експерименту в місці введення судини субпапілярного сплетення були значно розширені, кількість судин на одиницю площі підвищено, тоді як розміри судин інших сплетень практично повернулися до своїх нормальних показників. Практично повне відновлення морфометричних показників всіх судинних сплетень відбувалось на 45-ту добу (табл. 4.8).

При цьому, якщо оцінити питому площу поверхні субпапілярного сплетення (рис. 4.30), то вона залишалась підвищеною навіть на 45-ту добу. До того ж відмічалось непропорційне збільшення питомої площі порівняно до діаметру, що могло свідчити про збільшення кількості судин, та підтверджувати утворення нових судин.

Діаметр судин субпапілярного кровоносного сплетення щура за умов впливу Ag НЧ 30 нм (M±m, n=6, мкм)

Доба	AgНЧ 30 нм		
	Артеріоли	капіляри	Венули
Інтактні	13,6±0,5	6,1±0,1	54,8±0,4
1	15,8±0,8*	6,9±0,2	57,8±0,3*
3	18,2±0,5*#	7,5±0,1*#	60,3±0,2*#
7	20,2±0,4*#	8,1±0,1*#	63,5±0,5*#
14	22,5±0,2*#	8,0±0,5*	74,8±0,3*#
21	21,7±0,2*#	7,4±0,3*	68,2±0,4*#
30	16,1±0,1*#	6,2±0,3#	61,1±0,3*#
45	14,2±0,1#	6,1±0,2	57,8±0,3*#

Примітки:

- * – $p < 0,05$ порівняно з контрольною групою;
- # – $p < 0,05$ порівняно з попереднім терміном спостереження.

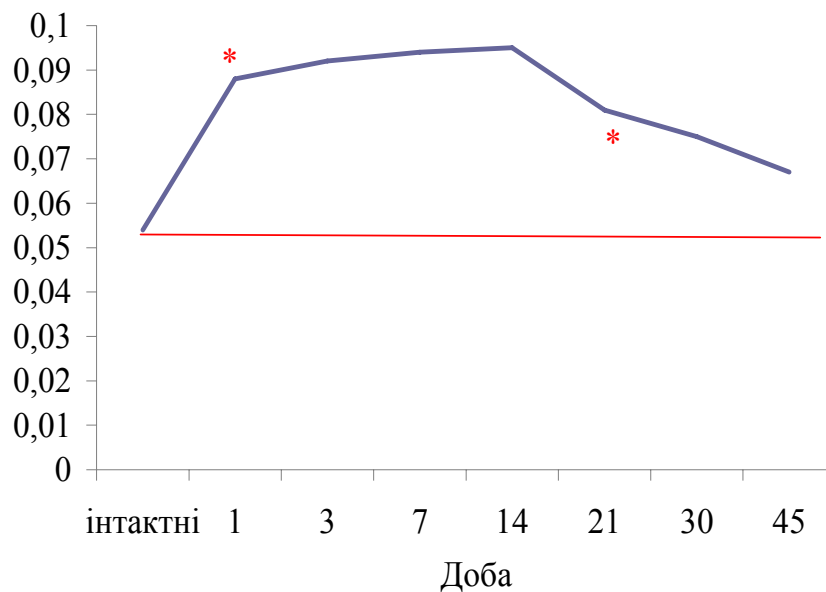


Рис. 4.30. Питома площа поверхні петель субпапілярного сплетення шкіри за умов впливу НЧ срібла 30нм. * – $p < 0,05$ порівняно з попереднім терміном спостереження.

Таким чином, за умов впливу НЧ срібла розміром 30 нм спостерігались зміни структури та функціональної активності епідермісу, а саме: підвищення кількості клітин базального шару з явищами вакуольної дистрофії на 22,4 % ($p < 0,05$); значне підвищення мітотичної активності клітин епідермісу, максимальне підвищення на 16,5 % ($p < 0,05$) відмічалось на 21-шу добу, на 45-ту добу мітотичний індекс залишався підвищеним на 9,9 % ($p < 0,05$); зміни структури базальної мембрани носили зворотній характер, і вона повністю відновлювалась на 21-шу добу. В дермі відмічались зміни гетероморфії за рахунок збільшення кількості макрофагів на 71,2 % ($p < 0,05$) максимально на 7-му добу, та тучних клітин на 30,7 % ($p < 0,05$) максимально на 3-ю добу. Міждиферонна гетероморфія поверталась до норми протягом 45 діб, а міждиферонна залишалась зміненою, насамперед у фібробластичному дифероні, де збільшувалась кількість функціонально активних фібробластів на 44,5 % ($p < 0,05$), що призводило до збільшення кількості колагенових волокон на 12,3 % ($p < 0,05$). Зміни мікроциркуляторного русла дерми характеризувались незворотнім збільшенням питомої площі поверхні петель субпапілярного сплетення на 24,3 % ($p < 0,05$).

4.3. Морфофункціональна характеристика шкіри за умов впливу наночастинок срібла розміром 70 нм

4.3.1. Морфофункціональна характеристика епідермісу. На першу добу після введення НЧ срібла розміром 70 нм архітектоніка епідермісу зберігалась. Він утворювався базальним, шипуватим, зернистим і роговим шарами, товщина епідермісу складала $32,3 \pm 1,2$ мкм. Клітини базального шару мали ознаки набряку, міжклітинні проміжки розширювались, але при цьому всі клітини зберігали зв'язок з базальною мембраною за допомогою напівдесмосом, а між собою вони з'єднувались десмосомами. В округлої форми ядрі переважав еухроматин. Цитоплазма містила велику кількість рибосом і полісом, Гранулярна

ендоплазматична сітка була розвинена слабо і представлена окремими короткими каналцями. Структурні компоненти комплексу Гольджі зустрічались рідко. Мітохондрії в невеликій кількості локалізувались поблизу ядра. В шипуватому шарі також відзначались явища міжклітинного набряку, міжклітинні проміжки розширювались, але міжклітинні контакти зберігались. Зернистий і роговий шари не зазнавали змін. Структура базальної мембрани зберігалась.

На 3-ю добу після введення НЧ срібла розміром 70 нм епідерміс зберігав свою архітектоніку, був представлений чотирма шарами. Проте міжклітинний набряк зберігався. Безперервний шар базальних клітин лежав на базальній мембрані. Клітини мали прямокутну форму зі світлою зернистою цитоплазмою. Органели, відповідальні за синтез, зустрічались рідко. Органели опори і руху не змінювались. Крім епідермоцитів в базальному шарі спостерігались внутрішньоепідермальні макрофаги. Шари шипуватих епітеліоцитів зберігали міжклітинні контакти, хоча міжклітинні проміжки значно потовщені. Зернистий і роговий шар не зазнавали змін. Базальна мембрана була потовщена, місцями гомогенна.

На 7-му добу загальна структура епідермісу не порушувалась, він був утворений базальним, шипуватим зернистим і роговим шаром. Наростала міждиферонна гетероморфія епідермісу за рахунок внутрішньоепідермальних макрофагів, які зустрічались значно частіше. Плазмолемма цих клітин нерівна, десмосом не утворювала. Ядро мало округлі контури, в ньому переважав еухроматин. В цитоплазмі знаходилось багато мітохондрій з численними кристами, велика кількість лізосом і аутофагосом.

Шар базальних клітин епідермісу був безперервний. Базальні клітини містили округле ядро, часто з 1-2 ядерцями. Ядерна оболонка була чітко контурована. Цитоплазма помірної електронної щільності містила велику кількість мікрофіламентів. В цитоплазмі також був знижений вміст компонентів гранулярної ендоплазматичної сітки, вільних рибосом, полісом, мітохондрій. Плазмолемма базальних клітин прикріплювалась до базальної мембрани за допомогою напівдесмосом. Базальна мембрана була потовщеною (рис. 4.31).

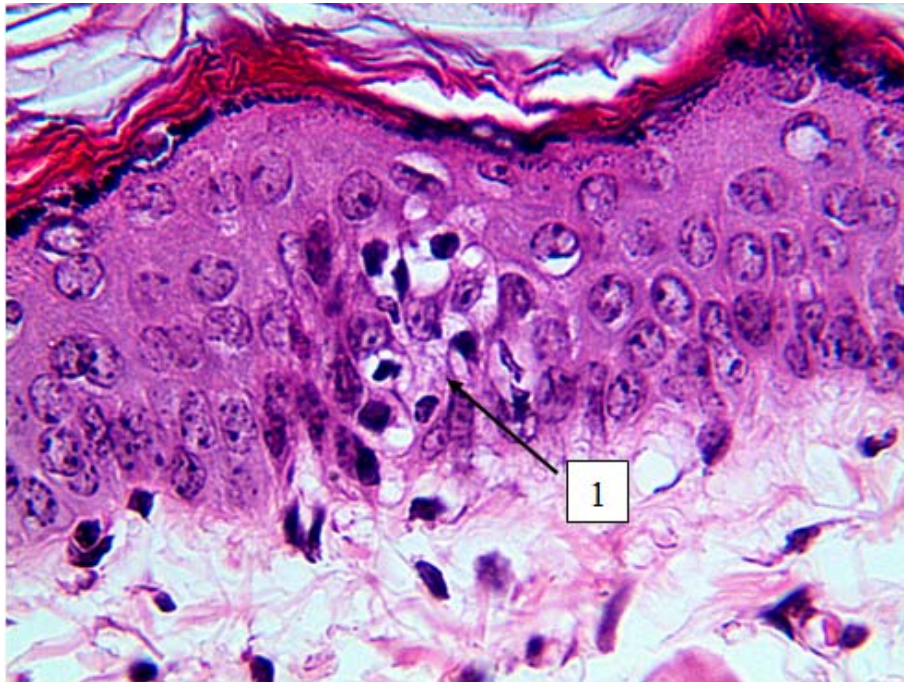


Рис. 4.31. Мікроскопічні зміни шкіри щура через 7 днів після введення наночастинок срібла 70 нм. Зabarвлення гематоксилін – еозином. $\times 400$.

1 – локальне пошкодження епідермісу.

В епідермісі були наявні ділянки де базальні і остисті клітини зазнавали змін як ядра, так і цитоплазматичні структури. Кількість мітозів значно знижувалась. В одиничних клітинах шипуватого шару зустрічались ознаки перинуклеарного набряку. В цих клітинах містились невеликі ядра. Епітеліоцити зернистого шару включали значну кількість грудок кератогіаліну.

На 14-ту добу архітектоніка шарів епідермісу не порушувалась, наростала внутрішньодиферонна гетероморфія серед епітеліоцитів базального шару. В базальному шарі зустрічались поодинокі клітини з пікнотичними ядрами. Клітини базального шару тісно контактували за допомогою десмосом. Частина клітин містила великі овальні ядра з еухроматином. Каріолема мала багато ядерних пор (рис. 4.32).

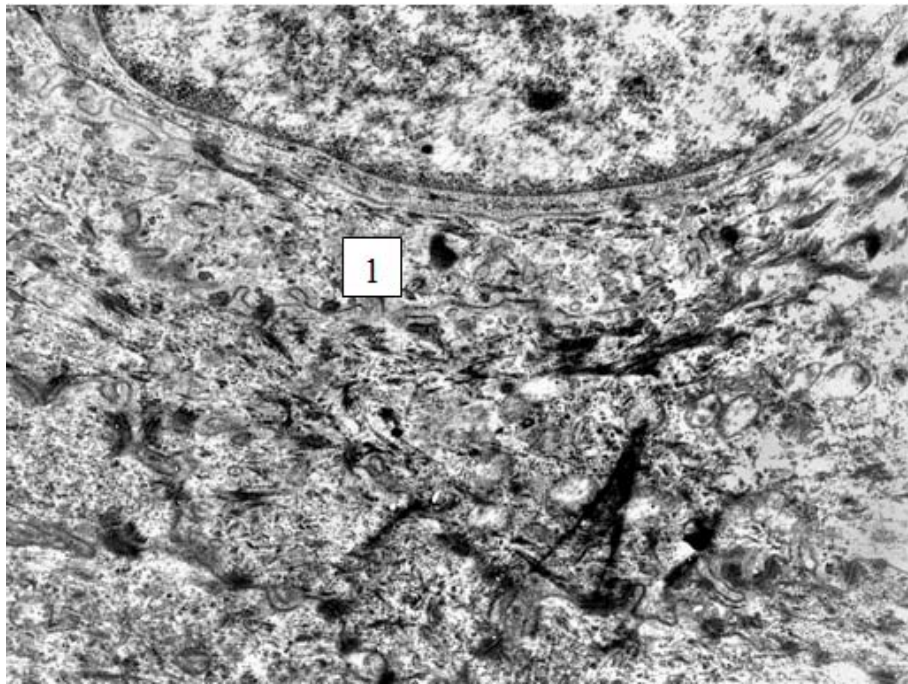


Рис. 4.32. Ультраструктура епідермиса щура через 14 днів після введення наночастинок срібла 70 нм. Трансмісійна електронна мікроскопія. $\times 8000$:

1 – базальна клітина з чисельними порами у каріолемі.

Цитоплазма містила пучки тонких мікрофіламентів. Частина мітохондрій була пошкоджена. Канальці ендоплазматичної сітки і комплекс Гольджі слабо розвинені. Стан внутрішньоклітинних органел і стан ядер базальних клітин підтверджував зниження рівня синтетичної активності. Плазмолема базальних клітин прикріплювалась до гомогенної базальної мембрани. Внутрішньоепідермальні макрофаги зустрічались рідко.

На 21-шу добу архітектоніка шарів епідермису зберігалась, але товщина значно зменшувалась до $(18,4 \pm 1,4)$ мкм. Пласт був безперервним, над осередком введення в базальному і шипуватому шарах епідермису з'являлись численні клітини з явищами вакуольної дистрофії. При цьому вони зберігали плазмолемму, яка з'єднувалась за допомогою полудесмосом з двохшаровою базальною мембраною, але її структура була близькою до нормальної (рис. 4.33).

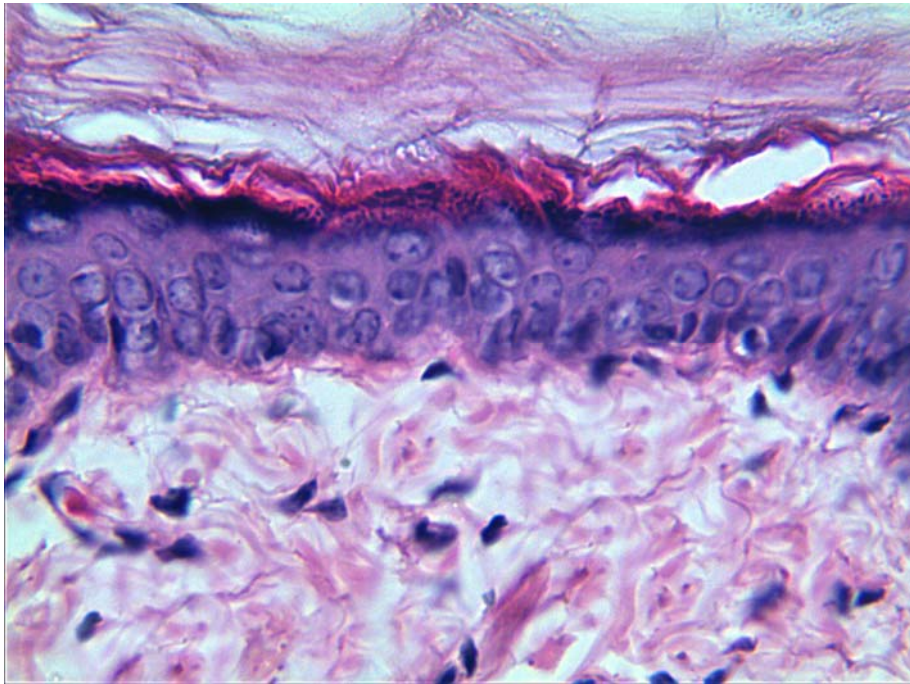


Рис. 4.33. Епідерміс шкіри щура через 21 добу після введення наночасточок срібла 70 нм. Зтоншення всіх шарів епідермісу. Забарвлення гематоксилін – еозином. $\times 400$.

Клітини базального шару містили світле ядро, в каріоплазмі якого наявні 1-2 ядерця. Визначалась світла, зерниста цитоплазма, тонкі мікрофіламенти, комплекс Гольджі і гранулярна ендоплазматична сітка зустрічались рідко, кількість мітохондрій невисока. Мітохондрії містили світлий матрикс, кількість крист зменшувалась. Епітеліоцити зернистого шару характеризувались подовгастою формою, цитолемма їх виглядала потовщеною. Грудок кератогіаліну було помірна кількість. Роговий шар представлений подовгастими роговими лусочками, які розташовані рихло. У проміжках між ними містилась мілко зерниста міжклітинна речовина. Вміст поверхневих епітеліоцитів виглядав гомогенним.

На 30-ту добу експерименту продовжувалось зниження міждиферонної і внутрішньодиферонної гетероморфії. Архітектоніка епідермісу зберігалась. В базальному шарі збільшувалось кількість мітозів, міжклітинні проміжки

були незначними, макрофаги практично не зустрічались. Клітини шипуватого шару мали невеликі чіткі міжклітинні контакти. В зернистому шарі добре виявлялись гранул кератогіаліну. Роговий шар був розпушеним і потовщеним. Структурна організація базальної мембрани не порушена.

Повне відновлення структури епідермісу і відновлення його клітинного складу відбувалось на 45-ту добу експерименту.

Відновлювалась мітотична активність клітин епідермісу, яка була низькою у попередні терміни досліду і досягла мінімуму на 7-му добу, коли відмічалось зниження індексу на 36,2 % (рис 4.34). Зростання МІ починалось з 21-ї доби, що співпадало з терміном відновлення структури базальної мембрани епідермісу, тоді як в групі тварин 3.2. зростання МІ спостерігалось з 14-ї доби. При цьому МІ не досягав показників інтактних тварин.

Епітеліальні піхви волосяних цибулин зазнавали змін. Уже на 7-му добу спостерігалось потовщення, розпушення епітелію зовнішніх піхов, мітотична активність наростала, збільшувались розміри і базофілія клітин. Незважаючи на зріст мітотичної активності волосяних піхов після 30 доби, вона не перевищувала показника норми, носила адаптивний характер, і була значно нижче, ніж за умов введення НЧ розміром 30 нм.

Таким чином, за умов впливу НЧ срібла розміром 70 нм спостерігались зміни морфофункціонального стану епідермісу, а саме: збільшення кількості клітин базального шару з явищами вакуольної дистрофії на 36,4 % ($p < 0,05$); зниження мітотичної активності клітин епідермісу, максимальне зниження на 36,2 % ($p < 0,05$) відмічалось на 7-му добу, підвищення МІ спостерігалось після 21 доби, зміни структури базальної мембрани, а саме її гомогенізація та фрагментація носили зворотній характер, структура базальної мембрани відновлювалась після 21 доби.

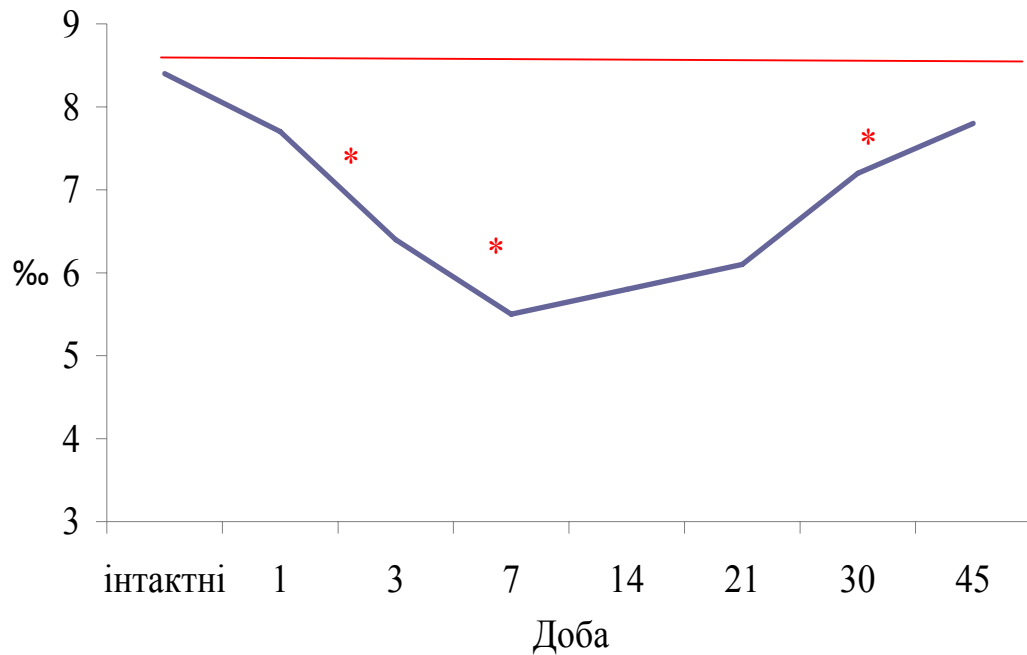


Рис. 4.34. Динаміка змін мітотичного індексу епідермісу за умов впливу НЧ срібла 70 нм, * - $p < 0,05$ порівняно з попереднім терміном спостереження.

4.3.2. Морфофункціональна характеристика дерми. Після введення НЧ срібла розміром 70 нм на межі сосочкового і сітчастого шарів формувалось вогнище розміром $(267,5 \pm 6,5)$ мкм. Морфофункціональні зміни дерми відбувались лише у осередку введення, у віддалених ділянках шкіри наявні незначні зміни, які були статистично недостовірними. Мікроскопічні дослідження через добу після введення НЧ срібла розміром 70 нм показали, що структура дерми порушувалась, сосочки були згладжені за рахунок набряку сосочкового шару, в зв'язку з чим він мав просвітлений вигляд.

Під впливом виведених секреторних продуктів тканинних базофілів підвищувалась проникність стінки кровоносних судин, відбувався гетерокінез клітин системи крові. Просвіти судин всіх сплетень розширювались, були повнокровними, стінки їх потовщувались. Спостерігався периваскулярний набряк та лейкоцитарна інфільтрація, відзначались поодинокі скупчення макрофагів. У місці введення наростала кількість тучних клітин з'являлись поодинокі нейтрофільні гранулоцити, зростала кількість макрофагів. У пухкій

сполучній тканині колагенові волокна виглядали потовщеними, набряклими.

На 3-ю добу в місці введення міждиферонна гетероморфія наростала за рахунок клітин крові, переважно макрофагів, кількість яких наростала. Фіброархітектоніка сосочкового шару дерми порушувалась. У сітчастому шарі біля місця введення визначались набряклі, місцями гомогенізовані, колагенові волокна. При фарбуванні за Ван Гізоном вони характеризувались тільки осередковою пікрінофілією (рис. 4.35).

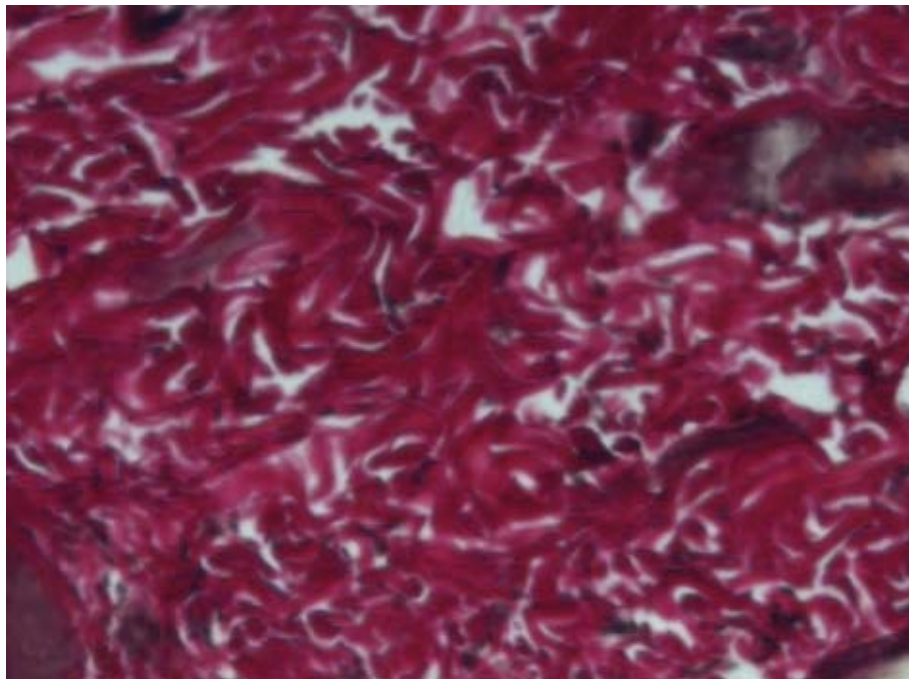


Рис. 4.35. Дерма шкіри щура через 3 доби після введення НЧ срібла 70 нм. Набряк колагенових волокон. Забарвлення за Ван Гізоном. $\times 200$.

Визначалась нечітка межа між сосочковим і сітчастим шаром дерми, в останньому були виражені ознаки внутрішньодермального набряку.

На 7-му добу в місці введення починала формуватися "грануляційна тканина", знижувалась кількість клітин гематогенного походження і збільшувалась кількість клітин фібробластичного ряду. В ділянці введення наночастинок відзначалось порушення структури і орієнтації колагенових волокон: відмічалось їх розволокнення. Пучки колагенових фібрил

розташовувались часто на різному видаленні один від одного, розділялись електронно-прозорими ділянками аморфного компоненту міжклітинної речовини (рис.4.36).

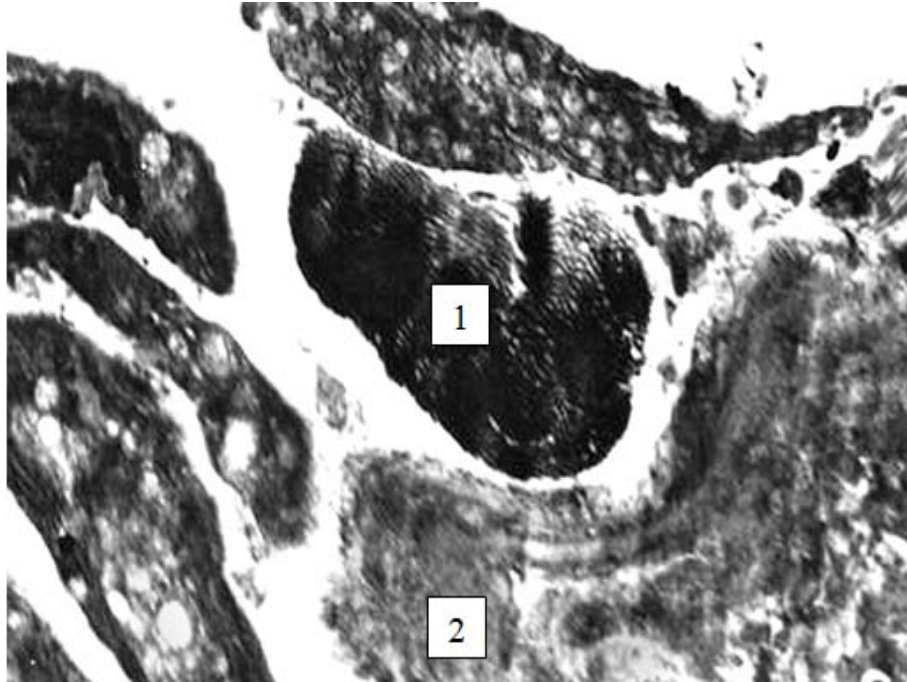


Рис. 4.36. Ультраструктура дерми шкіри щура через 7 діб після введення НЧ срібла 70 нм. Трансмісійна електронна мікроскопія. $\times 8000$:

- 1 – пучки колагенових фібрил;
- 2 – набряк міжклітинної речовини.

Розширені, повнокровні судини сітчастого шару розташовувались групами, їх стінки потовщувались. Архітектоніка тканини дерми порушувалась. Зустрічались товсті колагенові пучки, що складались з досить однорідних колагенових фібрил, водночас поряд розташовувались менш організовані пучки. Незначна частина фібробластів містила велике ядро і ядерце. Основна, менш активна частина фібробластів містила звичайне округло овальне ядро і органели загального призначення в цитоплазмі.

Мікроскопічні дослідження дерми на 14-ту добу після введення НЧ срібла 70 нм показали, що переважав фібробластичний диферон. Частина фібробластів

містила різну кількість органел, що приймали участь у синтетичних процесах, тобто знаходились на різних стадіях активності: від вираженої активації ультраструктур до їх низької активності, що підтверджувало наростання внутрішньодиферонної гетероморфії. Структура дерми була більш організованою. Структуровані колагенові волокна розташовувались поздовжньо, зустрічались й незрілі, дезорганізовані (рис. 4.37).

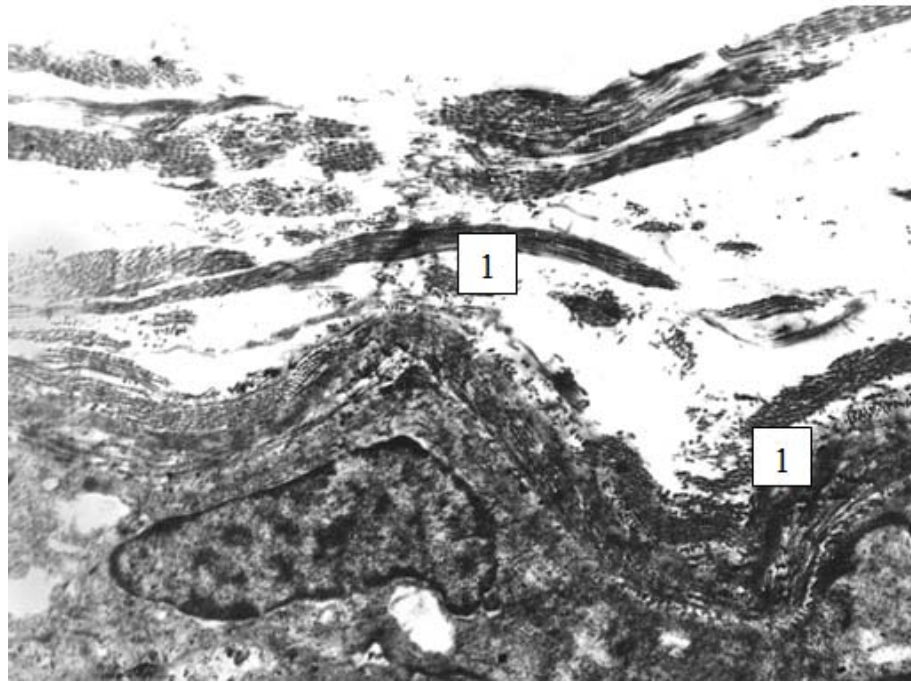


Рис. 4.37. Ультраструктура дерми шкіри щура через 14 діб після введення НЧ 70 нм. Трансмійна електронна мікроскопія. $\times 5000$:

1 – ділянка дезорганізації колагенових волокон.

Судини сплетень були розширеними, розташовані групами, кількість їх збільшувалась.

На 21-шу добу експерименту встановлено, що внаслідок регенерації в гістіоні переважали диференційовані фібробласти. Основним типом у ділянці введення наночастинок ставали зрілі фібробласти. Вони містили цитоплазму зі збільшеним вмістом органел, що забезпечують синтетичні процеси, такі як ЗЕС, комплекс Гольджі, рибосоми.

Грануляційна тканина заміщувалась сполучнотканинним рубцем, що

був представлений щільно прилеглими один до одного пучками колагенових волокон і розташованими між ними фіброцитами (рис 4.38).

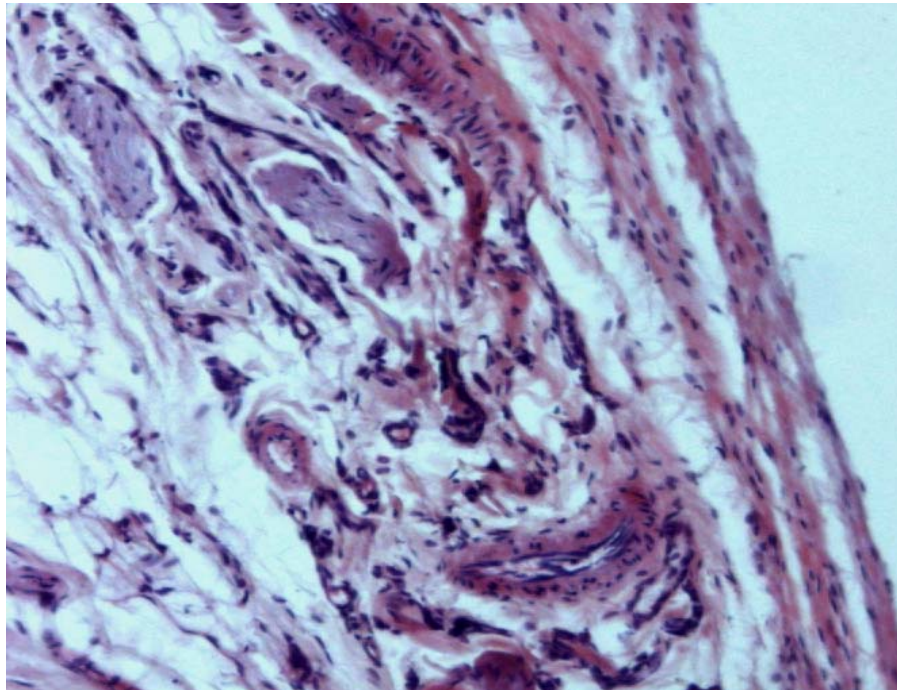


Рис. 4.38. Дерма шкіри щура через 21 добу після введення НЧ 70 нм. Порушення фіброархітекτονіки в місті введення. Забарвлення гематокси-ліном – еозином. $\times 200$.

В цей термін дослідю зменшувалось розширення просвітів кровоносних судин, але кількість їх залишалась збільшеною. Регенераційні процеси в дермі шкіри завершувались на 45-ту добу і вона була за структурною організацією наближена до шкіри тварин інтактної групи.

Міждиферонна гетероморфія оцінювалась за допомогою змін процентного співвідношення різних клітин тканини. За умов впливу НЧ срібла розміром 70 нм через добу змінювалась кількість тучних клітин, вона збільшувалась протягом 3-7-ї доби і поверталась до норми з 14-ї доби. В той же час збільшувалась кількість макрофагів, яка продовжувала зростати до 7-ї доби і залишалась підвищеною до 30-ї доби, але була меншою, ніж за умов впливу НЧ 30 нм.

Зміни співвідношення клітин сосочкового шару дерми залежно від терміну експерименту представлені в таблиці 4.9.

Таблиця 4.9

**Динаміка змін клітинного складу дерми шкіри щурів
при введенні НЧ Ag 70 нм (M±m, n=6, %)**

Доба	Фібро бласти	Фіброци ти	Тканинні базофіли	Макро фаги	Грануло цити	Лімфоци ти
Інтакт ні	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	65,4±3,8	7,5±0,8	8,5±0,4 [#]	15,9±0,3 [#]	3,6±0,4 [#]	1,8±0,5
3	66,4±2,8	6,3±0,6	6,2±0,3 ^{*#}	26,6±1,6 ^{* #}	2,8±0,9	1,9±0,5
7	68,9±5,4	6,1±0,4	5,2±0,6	23,5±2,6 [#]	2,2±0,1	1,7±0,5
14	68,9±9,3	5,9±0,4 [#]	4,4±0,3	18,7±2,3 [#]	0,7±0,02 ^{* #}	2,1±0,1
21	74,8±2,5	6,5±0,6	2,3±0,2 ^{*#}	14,6±1,9 [#]	0,2±0,05 ^{**}	2,2±0,5
30	76,6±2,4	6,9±0,6	2,0±0,2 [#]	12,3±0,3 [#]	0,3±0,06 [#]	1,1±0,2
45	77,4±4,6	7,5±0,8	3,8±0,3 [*]	7,4±0,5 ^{*#}	0,4±0,06 [#]	0,6±0,5 ^{*#}

Примітки:

1. * – $p < 0,05$ порівняно з попереднім терміном спостереження;
2. # – $p < 0,05$ порівняно з контрольною групою;
3. ** – $p < 0,05$ порівняно з групою 2, що отримувала іони.

Фібробластичний диферон, який домінував в дермі інтактних тварин, за умов впливу НЧ 70 нм втрачав своє домінантне положення, мінімум кількості фібробластів відмічалось на третю добу. Відносне зниження кількості фібробластів було пов'язане з гетерокінезом клітин гематогенного

походження та носило адаптивний характер. При цьому кількість фіброцитів залишалась майже незмінною. Порівняно з показниками тварин групи 3.2, де відмічалось зростання кількості фібробластів, за умов впливу НЧ 70 нм збільшення кількості фібробластів було незначним.

Крім междиферонної гетероморфії під впливом НЧ срібла наростала і внутрішньодиферонна гетероморфія фібробластів. При введенні НЧ срібла 70 нм відзначалось збільшення вмісту малодиференційованих і диференційованих фібробластів (табл. 4.10).

Таблиця 4.10

Розподіл клітин фібробластичного диферона за ступенем зрілості при введенні НЧ Ag 70 нм (M±m, n=6, %)

Доба експерименту	Малодиференційовані	В стані диференціювання	Зрілі фібробласти
Інтактні	5,7±0,3	9,8±0,7	85,3±0,5
1	7,3±0,4 [#]	8,1±0,6	86,1±0,7
3	10,2±0,5 ^{#*}	15,8±0,7 ^{#*}	75,4±0,6 ^{#*}
7	13,6±0,6 ^{#*}	23,6±0,2 ^{#*}	66,5±0,9 ^{#*}
14	15,9±1,1 [#]	30,1±0,9 ^{#*}	59,5±0,1 ^{#*}
21	16,3±0,1 [#]	28,5±0,7 [#]	54,5±0,3 ^{#*}
30	12,5±0,8 ^{#*}	19,0±0,5 ^{#*}	69,3±0,2 ^{#*}
45	9,2±0,6 ^{#*}	11,7±0,2 ^{#*}	78,4±0,5 ^{#*}

Примітки:

1. * – $p < 0,05$ порівняно з попереднім терміном спостереження;
2. # – $p < 0,05$ порівняно з контрольною групою.

Порівняно з групою тварин 3.2, за умов впливу НЧ срібла 70 нм спостерігалось менш виражене збільшення фібробластів в стані диференціювання, особливо на 21-шу добу. Порушення спостерігались і в популяції

макрофагів. Найбільших змін зазнавала кількість клітин секретуючого типу, яка знижувалась, починаючи з 3-ї доби і залишалась зниженою до кінця експерименту, лише на 45-ту добу їх кількість починала відновлюватись. Натомість, кількість клітин фагоцитарного типу підвищувалась протягом усього експерименту. Кількість макрофагів моноцитарного типу також підвищувалась протягом усього експерименту (рис 4.39).

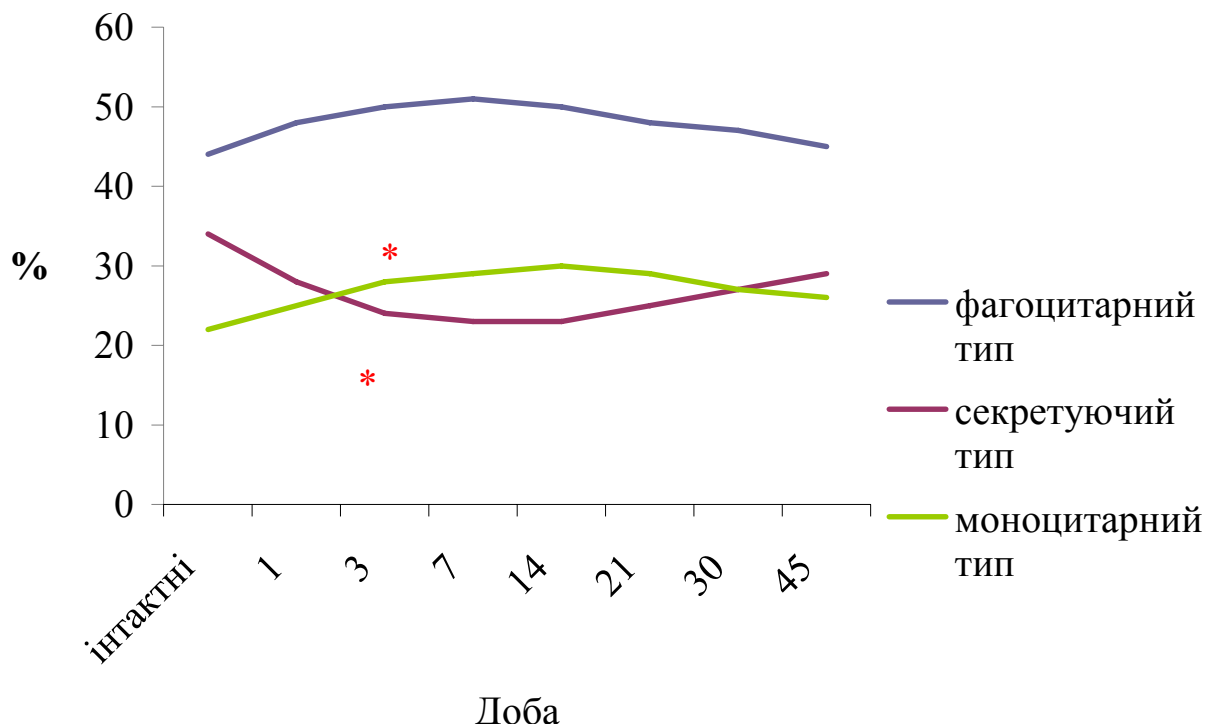


Рис. 4.39. Динаміка змін співвідношення різних функціональних типів макрофагів за умов впливу НЧ срібла 70 нм. * – $p < 0,05$ порівняно з попереднім терміном спостереження.

Завдяки змінам в кількості та ступені зрілості фібробластів, зменшення кількості секреторних макрофагів, які приймали участь в утворенні волокон міжклітинної речовини, кількість колагенових волокон змінювалось (рис. 4.40). Як видно з графіка, за умов впливу НЧ 70 нм відмічалось зниження кількості колагенових волокон максимально на 21-шу добу на 11,3 %. Порівняно з групою 3.2, за умов впливу НЧ 70 нм кількість колагенових волокон знижувалась. Порівняно з показниками груп 2, 3.1

відзначалось менше зниження кількості колагенових волокон в групі 3.3, ніж в інших групах.

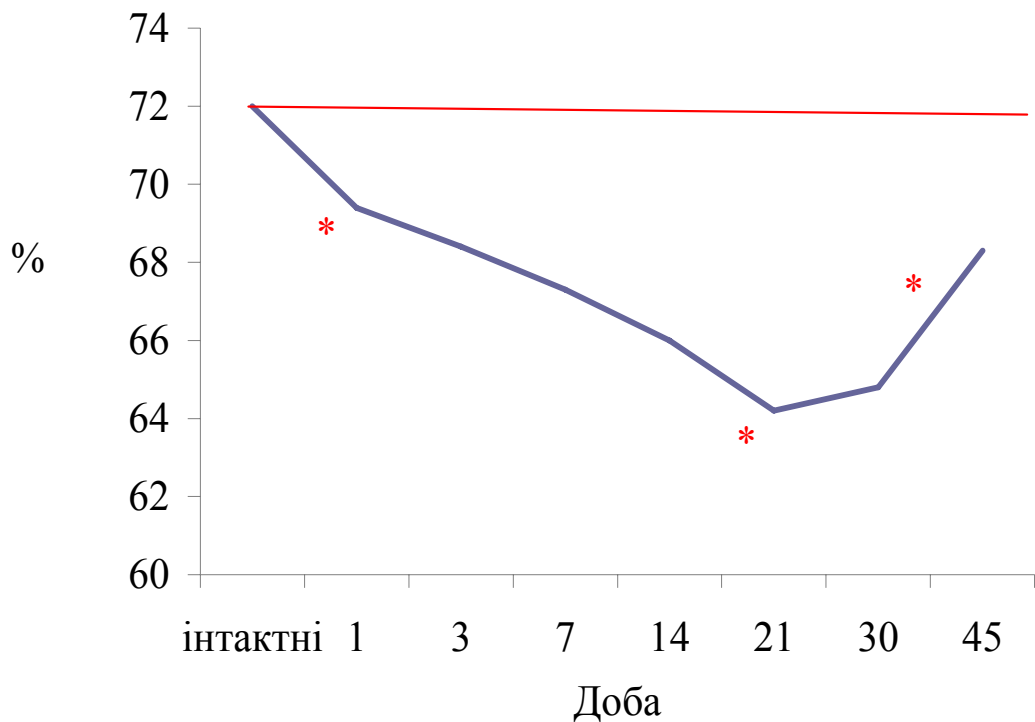


Рис. 4.40. Динаміка кількості колагенових волокон дерми за умов впливу НЧ срібла 70 нм. * - $p < 0,05$ порівняно з попереднім терміном спостереження.

Для оцінки морфофункціонального стану тучних клітин використовувалися: кількість клітин на одиницю площі ($0,01 \text{ мм}^2$) і індекс дегрануляції, який свідчив про секреторну активність тканинних базофілів (табл. 4.11).

Порівняно з іншими експериментальними групами, за умов впливу НЧ срібла 70 нм спостерігалось найбільше підвищення кількості та індексу дегрануляції.

Через добу після внутрішньошкірного введення НЧ срібла 70 нм відзначалось збільшення діаметра всіх судинних сплетьєнь шкіри в осередку ураження, за рахунок активації тучних клітин і їх дегрануляції.

На 3-ю добу експерименту тенденція до вазодилатації зберігалась. На 7-у добу судини субпапілярного сплетьєння залишались ділятованими,

досягнувши максимуму на 14-ту добу, тоді як судини гіподермального і субдермальних сплетень починали поступово повертатися до вихідних розмірів. Крім того, відмічалось збільшення кількості судин, які лежали групами та мали тонкі стінки.

Таблиця 4.11

**Морфофункціональний стан тучних клітин шкіри при введенні
Ag НЧ 70нм ($M \pm m$, $n=6$, Кл/0,01мм², %)**

Доба	Кількість клітин	Індекс
Норма	14,3±0,4	0,06±0,007
1	20,2±0,3#	0,71±0,05*#
3	6,7±0,2*#	0,92±0,02*#
7	9,3±0,5*#	0,45±0,03*#
14	11,3±0,4*#	0,32±0,07#

Примітки:

- * - $p < 0,05$ порівняно з попереднім терміном спостереження;
- # - $p < 0,05$ порівняно з контрольною групою.

На 21-шу добу експерименту в місці введення судини субпапілярного сплетення розширювались, кількість судинних петель на одиницю площі підвищувались, тоді як судини інших сплетень практично повернулися до своїх нормальних розмірів. Практично повне відновлення морфометричних параметрів всіх судинних сплетень відбувалось на 45-ту добу (табл. 4.12).

При аналізі питомої площі поверхні петель субпапілярного сплетення, спостерігалась подібна до змін діаметру судин динаміка. (рис. 4.41).

При порівнянні з тваринами груп 2 і 3.1 спостерігалась подібна динаміка змін морфометричних показників мікроциркуляторного русла в усіх групах, достовірної різниці морфометричних показників не виявлялось.

Таблиця 4.12

**Динаміка змін діаметру судин субпапілярного кровоносного сплетення
щура за умов впливу AgНЧ 70 нм (M±m, n=6, мкм)**

Доба	Артеріоли	Капіляри	Венули
Інтактні	13,6±0,5	6,1±0,1	54,8±0,4
1	16,2±0,4*	6,8±0,2*	56,5±0,2*
3	18,5±0,3*#	7,3±0,1*	61,4±0,2*#
7	19,8±0,4*#	7,7±0,2*	63,9±0,3*#
14	21,3±0,3*#	7,6±0,3*	73,6±0,2*#
21	20,5±0,2*#	7,0±0,2*	67,1±0,4*#
30	15,8±0,1*#	6,1±0,1#	60,3±0,2*#
45	13,9±0,2	6,0±0,2	56,4±0,3*#

Примітки:

1. * - $p < 0,05$ порівняно з контрольною групою;
2. # - $p < 0,05$ порівняно з попереднім терміном спостереження.

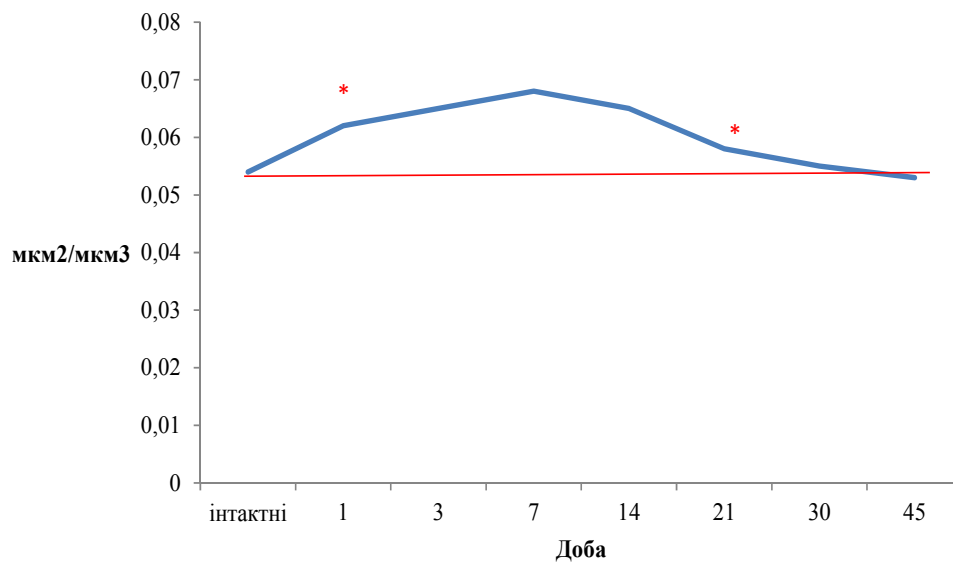


Рис. 4.41. Питома площа поверхні петель субпапілярного сплетення шкіри під впливом НЧ срібла 70нм, мкм²/мкм³, * - $p < 0,05$ між попереднім терміном спостереження.

Таким чином, за умов впливу НЧ срібла розміром 70 нм спостерігались зміни структури та функціональної активності епідермісу, а саме: збільшення кількості клітин базального шару з явищами вакуольної дистрофії на 36,4 % ($p < 0,05$); значне зниження мітотичної активності клітин епідермісу, максимальне зниження на 36,2 % ($p < 0,05$) відмічалось на 7 добу, значні зміни структури базальної мембрани, а саме її гомогенізація та фрагментація носили зворотній характер.

У дермі відмічались зміни гетероморфії за рахунок збільшення кількості макрофагів на 55,2 % ($p < 0,05$) максимально на 7-му добу, та тучних клітин на 30,7 % ($p < 0,05$) максимально на 3-ю добу. Міждиферонна гетероморфія поверталась до норми протягом 45 діб, а внутрішньодиферонна залишалась зміненою, насамперед у фібробластичному дифероні, де збільшувалась кількість функціонально активних фібробластів на 27,5 % ($p < 0,05$), що не призводило до збільшення кількості колагенових волокон. Зміни мікроциркуляторного русла дерми характеризувались зворотнім збільшенням діаметру судин субпапілярного сплетення максимально на 7-му добу.

Таким чином, при внутрішньодермальному введенні колоїдного розчину сферичних НЧ срібла розмірами 20, 30 та 70 нм, в шкірі виникала реакція, що характеризувалась наявністю послідовно змінюваних фаз, інтенсивність яких відрізнялась залежно від розміру наночастинок. Морфофункціональні зміни структур епідермісу і дерми за умов впливу НЧ срібла представлена на рисунку 4.42.

Так, при взаємодії шкіри з НЧ срібла 20 нм провідним було порушення будови базальної мембрани, дистрофічні зміни клітин і доведене зниження білок синтезуючої функції фібробластів, а при введенні НЧ 70 нм, незважаючи на незначне порушення будови базальної мембрани і слабо виражені дистрофічні зміни, також відзначалось зниження білок синтезуючої функції клітин.

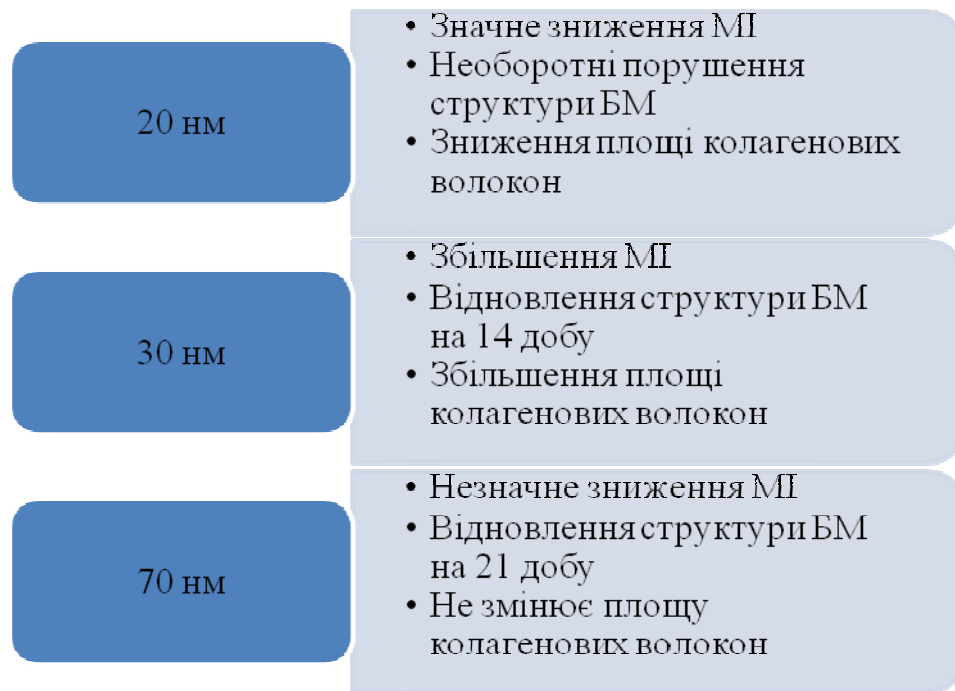


Рис. 4.42. Морфофункціональні зміни структур епідермісу та дерми за умов внутрішньошкірного введення наночастинок срібла різних розмірів.

У результаті введення НЧ 30 нм після помірних ушкоджень структурних компонентів шкіри відбувалось посилення регенераційних і синтетичних процесів.

Результати та підсумки, що викладені у даному розділі роботи, оприлюднені в таких публікаціях: [197-205].

РОЗДІЛ 5

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Активне використання НЧ срібла в косметології та засобах побутової хімії створило умови для повсякденного контакту шкіри з НЧ і зумовило необхідність детального вивчення особливостей такої взаємодії. При цьому більшість досліджень проводились на культурах клітин, а даних літератури про морфофункціональні зміни тканин шкіри за умов впливу НЧ срібла різних розмірів недостатньо. Тому в роботі наведені результати дослідження, в якому встановлені особливості послідовних реактивних змін структури дерми, епідермісу та базальної мембрани в різні терміни після внутрішньо-шкірного введення НЧ срібла різного розміру.

Комплекс морфофункціональних змін, які виникали за умов впливу 2%-ного колоїдного розчину іонізованого срібла в епідермісі, характеризувалися необоротними порушеннями структури базальної мембрани, а саме її гомогенізацією та розшаруванням, збільшенням кількості клітин з перинуклеарною вакуолізацією в базальному шарі; зниженням МІ епідермісу. Тобто в клітинах епідермісу, які безпосередньо не контактували з іонами срібла, виникали дистрофічні зміни. Порушення в дермі характеризувалися зміною міждиферонної гетероморфії за рахунок гетерокінезу тканинних базофілів і макрофагів, зниженням внутрішньодиферонної гетероморфії фіброblastів, а саме зниженням кількості фіброblastів зі збільшеним вмістом органел синтезу, що супроводжувалось зменшенням кількості та порушенням структури колагенових волокон. Перебіг зазначеного процесу відбувався синхронно з розвитком клітинної інфільтрації в осередку введення та порушенням структури базальної мембрани.

Механізм біологічної дії срібла, вивчення якого було започатковане Карлом Негелі у 1875 році, продовжене Боткіним С.С. у 1910 році та Кульським Л.А. у подальшому, який вивчав біологічні ефекти металів на культурах клітин [206], має кілька пояснень. Основний механізм впливу іонів

срібла на біологічні тканини пов'язаний з денатурацією білка та руйнуванням клітинних мембран внаслідок генерації вільного кисню та порушення осмотичної рівноваги. До того ж, доведена властивість іонів срібла роз'єднувати процеси окиснення та фосфорилювання, які призводять до мітохондріальної дисфункції та руйнування клітин. Ушкодження базальної мембрани пояснюється двома можливими механізмами: безпосередньою токсичною дією іонів срібла на клітини та їх здатністю порушувати структуру білка. Імовірно, токсичний вплив на фібробласти призводив до порушення синтезу основної речовини і колагенових волокон, у тому числі 4-го типу, що входять до складу базальної мембрани [207]. Дистрофічні явища, що виникали в клітинах базального шару епідермісу та зниження мітотичної активності, найімовірніше, спричинені порушенням транспорту через ушкоджену базальну мембрану.

Порушення міждиферонної гетероморфії, а саме послідовне збільшення тучних клітин та макрофагів можна пояснити взаємодією з іонами срібла, яка призводила до руйнування клітинних мембран й апоптозу за рахунок мітохондріальної дисфункції, що доведено на культурах клітин [206]. Тобто, при введенні в дерму 2%-ного колоїдного розчину іонізованого срібла виникала альтерація, внаслідок якої відбувались адаптивні порушення в клітинному складі дерми.

Зміни кількості та порушення структури колагенових волокон також можна пояснити впливом іонів срібла на структуру білка. При цьому зниження кількості органел синтезу в фібробластах, яке спостерігали у дослідних тварин, також могло призвести до зміни кількості та структури колагенових волокон. На користь цього припущення свідчили дані електронної мікроскопії. Порушення структури колагену могли бути викликаними і впливом іонів срібла на посттрансляційні модифікації колагену в позаклітинному матриксі при формуванні волокон. Тобто дані про зниження функції білкового синтезу в фібробластах дерми шкіри щура, одержані нами, не суперечать результатам відомих досліджень, проведених на культурах

клітин.

Таким чином, нами одержані нові дані стосовно порушення структури базальної мембрани за умов впливу колоїдного розчину іонів срібла на тканинному рівні організації. Підтверджена токсична дія іонів срібла та їх здатність порушувати структуру білка, чинити токсичний вплив на фібробласти, які відповідальні за синтез основної речовини і колагенових волокон 4-го типу базальної мембрани. Зниження кількості фібробластів з високою синтетичною активністю спричиняло зменшення кількості колагенових волокон дерми.

За умов впливу НЧ срібла розміром 20 нм у шкірі спостерігалися морфофункціональні зміни, які характеризувалися порушенням структури епідермісу, а саме збільшенням кількості клітин базального шару з явищами перинуклеарної вакуолізації; значне зниження мітотичної активності клітин епідермісу; необоротні зміни структури базальної мембрани, а саме її гомогенізація з явищами фібринозного некрозу. Тобто, в епідермісі за умов впливу НЧ срібла розміром 20 нм виникали зміни, подібні до тих, що спостерігалися за умов впливу 2%-ного колоїдного розчину іонізованого срібла. Як і в попередній групі, зміни клітин епідермісу виникали при відсутності їх контакту з НЧ. Ймовірно, дистрофічні явища та зниження мітотичної активності клітин епідермісу зумовлені ушкодженням структури базальної мембрани, і, як наслідок, порушенням транспорту речовин. Тобто, введення НЧ срібла розміром 20 нм викликало гомогенізацію та потовщення базальної мембрани, яка не відновлювалась протягом усього експерименту. Вищезазначені зміни можна пов'язати з токсичною дією НЧ срібла розміром 20 нм, яка доведена експериментально на культурах клітин [143, 164, 208, 209].

У дермі також відмічалися зміни, подібні до тих, що виникали за умов впливу 2%-ного колоїдного розчину іонізованого срібла, а саме порушення міждиферонної гетероморфії за рахунок гетерокінезу тканинних базофілів і макрофагів, зниження внутрішньодиферонної гетероморфії фібробластів, а саме зменшенням кількості фібробластів зі збільшеним вмістом органел

синтезу, зменшенням кількості та розпушення колагенових волокон, що тривали до 30-ї доби. Динаміка та терміни змін міждиферонної гетероморфії подібні до таких при введенні 2%-ного колоїдного розчину іонізованого срібла, але при цьому відмічалось незначне зниження цих показників за умов введення НЧ розміром 20 нм.

Основним механізмом токсичності НЧ срібла є активація вільних форм кисню та мітохондріальна дисфункція [75, 138], яка призводить до апоптозу [148]. Дослідження впливу НЧ срібла на шкіру тварин методом аплікації, які проводив Samberg M. E. зі співавторами [159], довели наявність порушення базальної мембрани та безпосередню токсичну дію на кератиноцити. Тобто, в наших дослідженнях, використовуючи інший метод введення НЧ срібла в шкіру, одержано подібні результати, а саме необоротні порушення структури базальної мембрани, які призводили до дистрофічних змін у базальних клітинах епідермісу та зниження їх мітотичної активності за рахунок описаних механізмів.

Зважаючи на доведену токсичну дію НЧ срібла розміром 20 нм, можна припустити, що зміни міждиферонної гетероморфії є адаптивною реакцією на альтерацію, яка викликана НЧ. Різницю між показниками кількості тучних клітин та макрофагів порівняно з попередньою групою можна пояснити здатністю НЧ знижувати рівень медіаторів запалення [175, 176], тим самим зменшуючи рівень запальної реакції.

Вплив НЧ срібла розміром 20 нм на дермальні фібробласти досліджений на культурах клітин, при цьому визначений токсичний вплив НЧ на культуру фібробластів, пригнічення їх білок-синтезувальної функції [208]. Зменшення кількості органел синтезу фібробластів, виявлене в результаті наших досліджень за умов внутрішньошкірного введення НЧ срібла розміром 20 нм, не суперечить науковим результатам, одержаним на культурах клітин [208]. Тобто зниження синтетичної активності фібробластів за умов впливу НЧ срібла розміром 20 нм спостерігалось як у культурі клітин, так і в експерименті *in vivo* на тканинному рівні організації [208].

Можна припустити, що реакція судин мікроциркуляторного русла дерми була пов'язана з дегрануляцією тучних клітин, яка показана в нашій роботі, та, можливо, зі зміною цитокінового профілю, викликаного НЧ, що описано в дослідженні про вплив НЧ 20 нм на рівень прозапальних цитокінів [176].

Таким чином, нами показано, що за умов впливу НЧ срібла розміром 20 нм виникали зміни, подібні до таких за умов впливу колоїдного розчину іонів срібла, а саме необоротне порушення структури базальної мембрани, зниження кількості фібробластів з високою синтетичною активністю, внаслідок чого відмічалось зменшення кількості колагенових волокон на 35,6 % ($p < 0,05$), що могло бути викликано токсичною дією НЧ срібла розміром 20 нм на фібробласти.

Морфофункціональні зміни, що виникали в тканинах шкіри за умов впливу НЧ срібла розміром 30 нм, відрізнялись від результатів у попередніх групах. Відмічались осередкове розшарування та набряк базальної мембрани, явища перинуклеарної вакуолізації в поодиноких клітинах базального шару та зниження мітотичної активності епідермісу. Проте вже на 14-ту добу структура базальної мембрани відновлювалася, після чого підвищувалася мітотична активність, яка перевищувала показники інтактних тварин і на 45-ту добу експерименту. Вищенаведені зрушення можна пояснити відновленням структури базальної мембрани у термін з 14-ї до 21-ї доби експерименту, з подальшим відновленням метаболізму в епідермісі та його репаративним відновленням.

Хоча НЧ срібла розміром 30 нм, за даними літератури, не токсичні для культур клітин [69, 210], але при взаємодії з тканинами вони викликали оборотне порушення структури базальної мембрани, з подальшим її відновленням, що свідчило про можливість повної регенерації за умов впливу НЧ срібла розміром 30 нм. Подібні результати одержані при дослідженні впливу НЧ розміром 30 нм на загоєння ран, у якому доведено, що НЧ підвищують швидкість регенераторних процесів [129, 171].

У дермі тварин, яким вводили НЧ срібла розміром 30 нм, так само, як і в попередніх групах, відмічалися зміни гетероморфії за рахунок збільшення

кількості макрофагів з максимумом змін на 7-му добу експерименту та тучних клітин максимально на 3-тю добу. Ймовірним механізмом зазначених зрушень може бути вплив НЧ срібла на рівень прозапальних цитокінів, при цьому спостерігалися розмірозалежні ефекти НЧ [176]. Аналогічні висновки одержані в іншому науковому дослідженні, де показана залежність змін рівня інтерлейкінів і цитокінів від розміру НЧ срібла [164].

Внутрішньодиферонна гетероморфія змінювалась, насамперед, у фібробластичному дифероні, де збільшувалась кількість фібробластів з високим рівнем синтетичної активності (у середньому на 44,5 %), що призводило до збільшення кількості колагенових волокон. Наявність стимулювальної дії НЧ розміром 30 на дермальні фіброласти висвітлене в дослідженні [129], де показані підвищення рівня факторів росту, зокрема, TGF β , та стимуляція фібробластів при загоєнні ран за умов впливу НЧ срібла розміром 30 нм. У цьому дослідженні НЧ використовувались методом аплікації на поверхню рани, тоді як в нашому експерименті НЧ вводились внутрішньошкірно. Тобто, незважаючи на шлях надходження НЧ срібла 30 нм в шкіру, доведена їх стимулювальна дія на фіброласти.

Таким чином, за умов впливу НЧ срібла розміром 30 нм нами показане зворотне порушення структури базальної мембрани, підвищення синтетичної активності фібробластів та збільшення кількості колагенових волокон дерми.

За умов впливу НЧ срібла розміром 70 нм спостерігались морфофункціональні зміни, які схожі на зміни в попередніх групах, за винятком деяких деталей. В епідермісі, який не контактував з НЧ, відмічались збільшення кількості клітин базального шару з явищами вакуольної дистрофії, зниження мітотичної активності клітин епідермісу, значні зміни структури базальної мембрани, а саме її гомогенізація та фрагментація. Структура базальної мембрани відновлювалась на 30-ту добу, після чого відмічались зниження дистрофічних явищ і підвищення мітотичної активності епідермісу.

У дермі спостерігалися зміни міждиферонної гетероморфії за рахунок збільшення кількості макрофагів максимально на 7-му добу, та тучних клітин максимально на 3-ю добу експерименту. Тобто 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. Кількість фібробластів зі збільшеною кількістю органел синтезу практично не змінювалась, а кількість колагенових волокон незначно знижувалася.

Зміни мікроциркуляторного русла дерми характеризувались оборотним збільшенням питомої площі поверхні петель субпапілярного сплетення максимально на 7-му добу, що мало таку ж саму періодичність, як і за умов впливу інших частинок.

Наночастинки срібла розміром 70 нм, згідно з даними літератури, не є токсичними для культур клітин [145, 164]. Імовірно, що токсичність НЧ срібла розміром 70 нм залежить від шляху введення. Так, внутрішньошкірне введення викликало порушення структури базальної мембрани. Її відновлення за умов впливу НЧ розміром 70 нм відбувалось повільніше (на 21-шу добу), ніж при введенні НЧ розміром 30 нм (на 14-ту добу експерименту). Тобто незважаючи на порушення структури базальної мембрани, регенераторна функція тканин шкіри зберігалась, але швидкість відновлення залежала від розміру НЧ.

Аналізуючи процес морфологічних змін тканини шкіри в результаті введення НЧ срібла, слід відзначити, що незалежно від речовини, яка вводилася, чи це НЧ срібла різних розмірів або 2%-ний колоїдний розчин іонізованого срібла, у тканинах шкіри виникали зміни з певною послідовністю (рис. 5.1).

В епідермісі провідним було порушення структури базальної мембрани, що призводило до зміни транспорту та розвитку дистрофічних процесів у базальних клітинах епідермісу та зниженню їх мітотичної активності. Як видно, зміни структури базальної мембрани, а саме її

гомогенізація, виникали за умов впливу як іонів, так і НЧ срібла усіх досліджуваних розмірів, тобто ця реакція не є розмірозалежною.

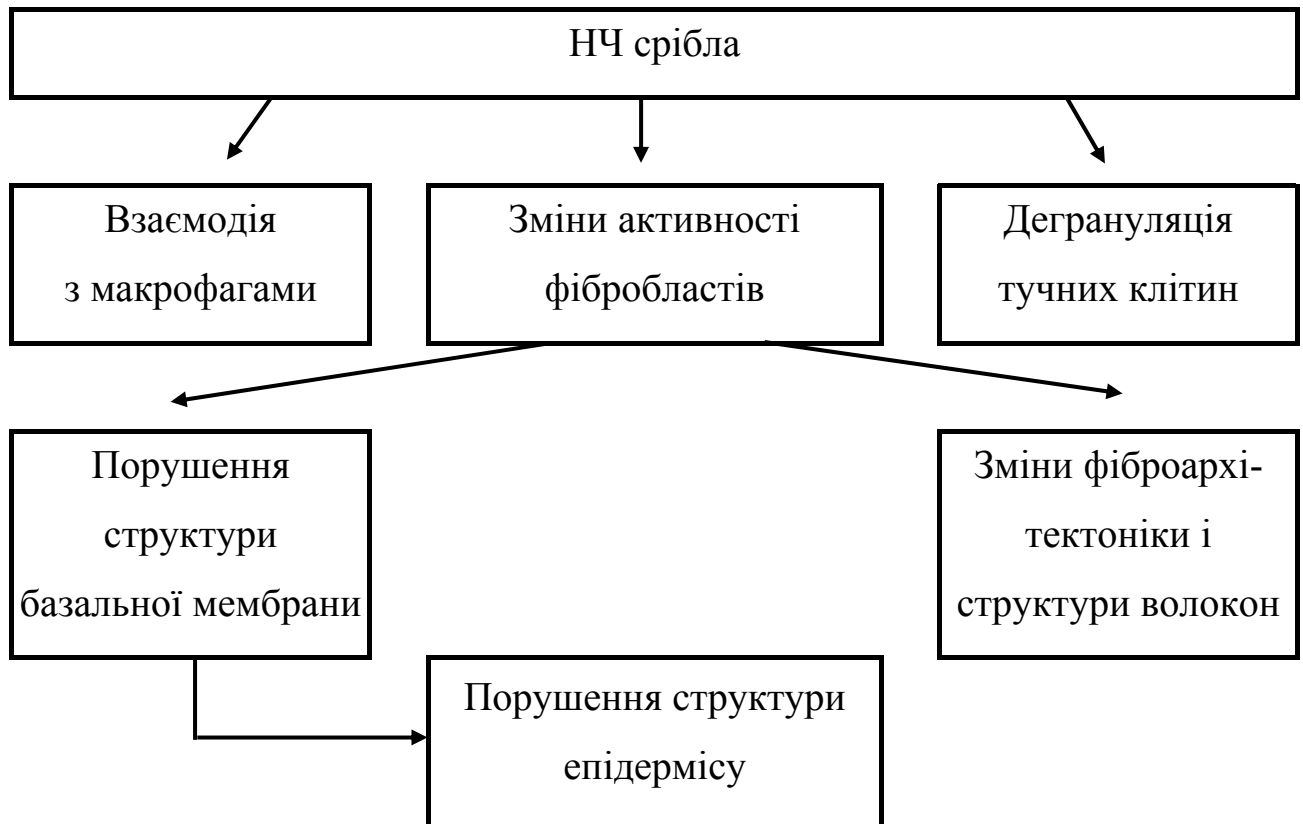


Рис. 5.1 Шляхи взаємодії НЧ зі структурними компонентами тканин шкіри

Залежно від розміру змінювались лише терміни відновлення структури базальної мембрани. Так, за умов впливу НЧ розмірами 30 та 70 нм структура базальної мембрани відновлювалась, а за умов впливу НЧ розміром 20 нм та іонів срібла структура не відновлювалась протягом усього експерименту. При чому при введенні НЧ розміром 30 нм відновлення базальної мембрани відбувалося швидше, ніж за умов впливу НЧ розміром 70 нм.

Відсутність відновлення структури базальної мембрани пояснювалася доведеною токсичністю іонів срібла та НЧ розміром 20 нм, при відсутності токсичності у НЧ розмірами 30 та 70 нм. Тобто спостерігалась залежність швидкості репаративних процесів в залежності від розміру НЧ. Подібні

результати одержані в дослідженні, в якому доведена залежність темпів загоєння ран від розміру НЧ [164].

Відновлення мітотичної активності та зменшення вираженості дистрофічних явищ у клітинах базального шару епідермісу, яке відмічалось за умов впливу НЧ срібла розмірами 30 та 70 нм, імовірно, не було пов'язаним з дією НЧ, а пояснювалося відновленням структури базальної мембрани. Це підтверджувалося збігом термінів відновлення структури мембрани та відновлення мітотичної активності. Проте є дослідження, які підтверджують вплив НЧ на проліферативну активність кератиноцитів [162] завдяки впливу на фактори росту епітелію.

Морфофункціональні зміни дерми, описані нами в експерименті при внутрішньошкірному введенні НЧ срібла різних розмірів, подібні до тих, що виникають у дермі шкіри за умов асептичного запалення, викликаного імплантацією чужорідного тіла [211]. Динаміка співвідношення клітин дерми в осередку введення, а саме послідовне збільшення кількості тучних клітин та макрофагів, подібна з даними, одержаними в дослідженнях Мусіної Л. А. і співавт. (2007) при внутрішньошкірному введенні біоматеріалів [211, 212]. Автори досліджували реакцію тканин шкіри на введення ксеногенних та алогенних біоматеріалів і отримали кількісні зміни клітинного складу дерми, які подібні до змін, отриманих нами. При цьому динаміка змін кількості макрофагів була подібною до такої за умов введення алогенного біоматеріалу. Це дає нам змогу припустити, що введення НЧ срібла в шкіру викликає подібну реакцію, що і введення алогенного біоматеріалу та призводить до схожих змін клітинного складу. При цьому найбільших зрушень зазнає кількість макрофагів. Це підтверджувало дані, про основну регулювальну роль макрофагів при регенерації тканин, в міжклітинних і стромально-клітинних взаємодіях, які вказували на те, що характер перебігу запального процесу і наступних за ним процесів регенерації або дизрегенерації в сполучній тканині визначає різна вираженість макрофагальної стадії, яка залежала від характеристик введеного матеріалу [192, 211, 212].

До того ж є дані, які свідчать про взаємодію НЧ з toll-like рецепторами макрофагів [141, 167]. Дослідження Kim A.S. з співавторами довели, що первинна взаємодія тканини з НЧ здійснюється макрофагами через toll-like рецептори [141]. Достовірна різниця зміни кількості макрофагів при введенні різних за розміром НЧ, яка показана нами (найвище при введенні НЧ розміром 30 нм), могла вказувати на наявність залежності макрофагальної реакції від розміру НЧ. Подібні результати одержані в дослідженні Park J. зі співавторами, які довели наявність залежності макрофагальної реакції та вираженості запалення від розміру НЧ [167], при цьому НЧ срібла спрвляють протизапальну дію через зменшення рівня інтерлейкінів та цитокінів, а саме ІЛ-8, ІЛ-1, ІЛ-6 [129]. У цій роботі використовувались НЧ срібла інших розмірів та використовували інші методи дослідження, тому, для теоретичного обґрунтування дії НЧ срібла, які застосовувались нами при внутрішньошкірному введенні, потрібні подальші імуногістохімічні дослідження.

Заслуговує на увагу вплив НЧ срібла на дегрануляцію тучних клітин. Подібні дослідження проводились Tian J. зі співавторами, в яких показано вплив НЧ на рановий процес [129]. Проте в зазначеній роботі спостерігалось послаблення дегрануляції тучних клітин за умов впливу НЧ срібла, тимчасом як ми одержали зниження індексу дегрануляції лише за умов впливу НЧ розмірами 20 і 30 нм порівняно з впливом іонів срібла. Розбіжності в одержаних даних може пояснюватись використанням різних за розміром НЧ срібла, що потребує подальшої розробки доказової бази теоретичного обґрунтування дії НЧ срібла різних розмірів та їх впливу на клітинні компоненти дерми.

При введенні НЧ, незалежно від розміру знижувалась кількість функціонально активних фібробластів, крім випадку введення НЧ розміром 30 нм, коли їх кількість збільшувалась. Це призводило до змін основної речовини дерми, а саме зниження кількості колагенових волокон, при цьому лише за умов впливу НЧ розміром 30 нм кількість колагенових волокон збільшувалася, що, можливо, було пов'язане з наявністю стимулювальної дії НЧ розміром 30 нм на дермальні фібробласти. Подібні дані одержані в

дослідженні Gunasekaran T. зі співавторами, які довели посилення колагеногенезу в ранах за умов впливу НЧ срібла [171]. З другого боку, Asharani P.V. зі співавторами, довели негативний вплив НЧ срібла на дермальні фібробласти, при цьому використовувались частинки розмірами 5 нм [174], що подібне до даних, одержаних в нашій роботі, в якій показане зниження синтезу білка фібробластами дерми за умов впливу НЧ розмірами 20 і 70 нм. Одержані дані підтверджували наявність розмірозалежного впливу НЧ срібла на функцію фібробластів.

Аналізуючи ефекти, що виникали при взаємодії тканин шкіри з НЧ срібла різних розмірів, незважаючи на різницю в морфометричних показниках, активності клітин, можна відзначити наявність характерної послідовності змін, вказаних вище. Ці дані наводять на думку про однаковий механізм впливу на тканини шкіри НЧ срібла різних розмірів та іонів срібла. Ця гіпотеза знаходить підтвердження в дослідженнях Xiu Z. зі співавторами [213], який порівнював антибактеріальну дію іонів срібла та НЧ різних розмірів. За даними Xiu Z., механізм антибактеріальної дії НЧ срібла ідентичний до дії іонізованого срібла і зумовлений вивільненням іонів срібла з поверхні НЧ. При цьому розмірозалежні ефекти зумовлені різною кількістю вивільнених іонів срібла. Припущення про подібність молекулярних механізмів дії НЧ та іонів срібла доведено в роботі Novo M. з співавторами [214]. За допомогою цієї теорії можна пояснити вищезазначені зміни, одержані нами за умов впливу різних за розміром НЧ.

Підсумовуючи вищевикладене, можна зробити підсумок, що за умов впливу НЧ срібла в шкірі, незважаючи на розмір частинки, виникала певна послідовність ушкоджень. В першу чергу, відмічалися 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. Але при цьому спостерігали розмірозалежні ефекти НЧ срібла стосовно вираженості виявлених ушкоджень.

Отримані дані дозволили описати нелінійну залежність інтенсивності клітинних реакцій від розміру НЧ срібла. Так, найбільшою здатністю спричиняти дистрофічні зміни в базальних клітинах епідермісу, а також порушувати їх мітотичну активність за умов внутрішньошкірного введення володіють НЧ срібла розміром 20 нм, а найменшою 30 нм. Аналіз отриманих даних дозволяє дійти висновку про те, що НЧ срібла розміром 30 нм за умов внутрішньошкірного введення спричиняють максимальне підвищення функціональної активності фібробластів, а НЧ срібла розміром 20 нм мінімально впливають на зазначений показник.

Залежно від розміру НЧ срібла відрізнялися швидкість відновлення структури базальної мембрани (найшвидше за умов впливу НЧ срібла розмірами 30 нм) і активність білкового синтезу в клітинах дерми (найвища за умов впливу НЧ срібла розміром 30 нм). Тобто, за здатністю впливати на більшість досліджуваних показників Нч срібла можна розташувати в послідовності: 20 нм→70 нм→30 нм. Але, при цьому здатність змінювати кількість макрофагів зростала в ряду 70 нм→20 нм→30 нм, а здатність впливати на дегрануляцію тучних клітин зростала в ряду 20 нм→30 нм→70 нм. Отримані послідовності свідчать з одного боку про розмірозалежність ефектів впливу НЧ срібла, з іншого боку про нелінійність цієї залежності. Виявлені особливості реакції макрофагів, тучних клітин, фібробластів на НЧ срібла різних розмірів можуть свідчити про відмінні механізми взаємодії НЧ з рецепторами на поверхні мембрани зазначених клітин. У сукупності виявлені розмірозалежні ефекти НЧ срібла, в першу чергу здатність впливати на міждиферонну та внутрішньодиферонну гетероморфію клітин, створюють основу для розробки нових методів оцінки біологічних ефектів НЧ металів, зокрема срібла.

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 базофілів 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 достовірне 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 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 воло-

кон (найбільше за умов впливу наночастинок срібла розміром 30 нм), різної швидкості відновлення структури базальної мембрани (найшвидше за умов впливу наночастинок срібла розміром 30 нм).

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Doyle, J. Medical nanotechnology and nanomedicine (perspectives in nanotechnology) / J. Doyle // *Anesthesia and analgesia*. – 2013. – № 117. – P. 1265–1269.
2. Mehlich, J. Nanomedicine: visions, risk, potential / J. Mehlich, F. Thiele // *European journal of nanomedicine*. – 2014. – № 1. – P. 47–53.
3. Біологічні аспекти наномедицини / І. С. Чекман, В. Ф. Шаторна, О. О. Савенкова [та ін.] // *Вісник проблем біології і медицини*. – 2011. – № 4. – С. 31–36.
4. Краснополина, И. Г. Нанотехнологии в медицине / И. Г. Краснополина // *Наука и здоровье*. – 2014. – № 6. – С. 18–22.
5. Наночастицы металлов в медицине и фармации / Б. Х. Мусабаева, К. Б. Мурзагулова, Л. К. Оразжанова [и др.] // *Наука и здоровье*. – 2012. – № 5. – С. 2–11.
6. A nanostructured conductive hydrogels-based biosensor platform for human metabolite detection / L. Li, Y. Wang, L. Pan [et al.] // *Nano letters*. – 2015. – № 15. – P. 1146–1151.
7. Чекман, І. С. Нанотехнології у розробці систем доставки лікарських засобів / І. С. Чекман, А. О. Прискока // *Український медичний часопис*. – 2010. – № 1. – С. 14–18.
8. Ульберг, З. Р. Нанофармакологія: міждисциплінарний аспект наукових досліджень / З. Р. Ульберг, І. С. Чекман // *Сучасні проблеми токсикології*. – 2013. – № 1. – С. 32–37.
9. Caputo, F. Pharmacological potential of bioactive engineered nanomaterials / F. Caputo, M. De Nicola, L. Ghibelli // *Biochemical pharmacology*. – 2014. – № 3–4. – С. 104–109.
10. Non-invasive nanoparticle imaging technologies for cosmetic and skin care products / L. L. Lin, K. L. Nufer, S. Tomihara [et al.] // *Cosmetics*. – 2015. – № 2. – С. 196–210.

11. Nasir, A. Nanotechnology and dermatology: Part I – potential of nanotechnology / A. Nasir // *Clinics in Dermatology*. – 2011. – № 28. – P. 458–466.
12. Ahamed, M. Silver nanoparticle applications and human health / M. Ahamed, M. Alsalhi, M. Siddiqui // *Clinica chimica acta*. – 2011. – № 411. – P. 1841–1848.
13. Murashov, V. Safety assessment for nanotechnology and nanomedicine: concepts of nanotoxicology / V. Murashov, S. Engel, K. Savolainen // *Journal of internal medicine*. – 2010. – № 267. – P. 89–105.
14. Donaldson, K. Nanotoxicity: challenging the myth of nano-specific toxicity / K. Donaldson, C. Poland // *Current opinion in biotechnology*. – 2013. – № 24. – P. 724–734.
15. Nanomaterial toxicity testing in the 21st century: use of a predictive toxicological approach and high-throughput screening. / A. Nel, T. Xia, H. Meng [et al.] // *Accounts of chemical research*. – 2013. – № 3. – C. 607–621.
16. Nano-bio effects: interaction of nanomaterials with cells / L. C. Cheng, X. Jiang, J. Wang [et al.] // *Nanoscale*. – 2013. – № 9. – P. 3547–3569.
17. Klaessig, F. Current perspectives in nanotechnology terminology and nomenclature / F. Klaessig, M. Marrapese, A. Shuji // *Nanotechnology standards. Nanostructure science and technology*. – 2011. – № 5. – P. 21–52.
18. Occupational safety and health regulations (OSHA Standards). In toxic and hazardous substances. – Washington, DC: Occupational Safety and Health Administration, 2006. – 34 p. – (National standard USA).
19. The scientific aspects of the existing and proposed definitions relating to products of nanoscience and nanotechnologies. – Brussels, 2007. – 22 p. – (European Commission, Health and Consumer Protection DG. Manual).
20. International organization of standardization: nanotechnologies – terminology and definitions for nano-objects (ISO/TS 27687:2008). – Geneva, Switzerland, 2008. – 48 p.
21. Approaches to safe nanotechnology: managing the health and safety

concerns associated with engineered nanomaterials. – Washington: DC, 2009. – 104 p. – (Department of Health and Human Services. Manual).

22. A matter of size: triennial review of the National Nanotechnology Initiative. – National Academies Press. – Washington: DC, 2009. –56 p. – (National Research Council. Manual).

23. Жоаким, К. Нанонауки. Невидимая революция / К. Жоаким, Л. Плевер. – М. : КоЛибри, 2009. – 240 с.

24. Гочжун, Ц. Наноструктуры и наноматериалы. Синтез, свойства и применение / Ц. Гочжун, И. Ван. – М. : Научный мир, 2012. – 520 с.

25. Рамбиди, Н. Г. Нанотехнологии и молекулярные компьютеры / Н. Г. Рамбиди. – М. : Физматлит, 2007. – 256 с.

26. Волков, С. В. Нанохімія. Наносистеми. Наноматеріали / С. В. Волков, С. П. Ковальчук, В. М. Генко. – К. : Наукова думка, 2008. – 422 с.

27. Гусев, А. И. Наноматериалы, наноструктуры, нанотехнологии / А. И. Гусев. – М. : Физматлит, 2007. – 416 с.

28. Андриевский, Р. А. Наноструктурные материалы / Р. А. Андриевский, А. В. Рагуля – М. : Академия, 2005. – 187с.

29. Сажин, В. Б. Основы материаловедения / В. Б. Сажин. – М. : Теис, 2005. – 155с.

30. Сергеев, Г. Б. Нанохимия / Г. Б. Сергеев. – М. : Изд-во МГУ, 2003. – 288 с.

31. Уильямс, Л. Нанотехнологии без тайн / Л. Уильямс, У. Адамс: пер. з англ. – М. : Эксмо, 2010. – 368 с.

32. Елисеев, А. А. Функциональные наноматериалы / А. А. Елисеев, А. В. Лукашин. – М. : Физматлит, 2010. – 456 с.

33. Заячук, Д. М. Нанотехнології і наноструктури / Д. М. Заячук. – Л. : Вид-во Нац. ун-ту „Львівська політехніка”, 2009. – 580 с.

34. Русанов, А. И. Удивительный мир наноструктур / А. И. Русанов // Журнал общей химии. – 2012. – Т. 72. – № 4. – С. 532–549.

35. Наноматеріали в біології. Основи нановетеринарії / В. Б. Борисевич

[та ін.]. – К. : ВД «Авіцена», 2010. – 416 с.

36. Yukuyama, M. N. Nanoemulsion: process selection and application in cosmetics / M. N. Yukuyama, D. Ghisleni, T. Pinto // *International journal of cosmetic science*. – 2015. – № 5. – С. 1442–1447.

37. Influence of surface effects on size-dependent instability of nanoactuators in the presence of quantum vacuum fluctuations / A. Koochi, A. Kazemi, F. Khandani [et al.] // *Physica scripta*. – 2012. – № 3. – P 538–541.

38. Супотницький, М. В. Нанооб'єкти як нова біологічна загроза / М. В. Супотницький // *Нанотехнології і охорона здоров'я*. – 2013. – № 4. – С. 22–41.

39. Kim, W. Y. Application of quantum chemistry to nanotechnology: electron and spin transport in molecular devices / W. Y. Kim, Y. C. Choi, S. K. Min // *Chemical society reviews*. – 2009. – № 5. – P. 2319–2333.

40. Kahk, J. M. Electron transfer kinetics at single nanoparticles / J. M. Kahk, N. R. Rees, J. Pillay // *Nano Today*. – 2012. – № 3. – P. 153–222.

41. Localized surface plasmon resonance biosensing: current challenges and approaches / S. Unser, I. Bruzas, J. He [et al.] // *Sensors (Basel)*. – 2015. – № 7. – С. 684–716.

42. Оптичні сенсоры на основе поверхностного плазмонного резонанса для высокочувствительного біохімічного аналізу / Д. А. Мамичев, И. А. Кузнецов, Н. Е. Маслова [и др.] // *Молекулярная медицина*. – 2012. – № 6. – С. 141–149.

43. Климов, В. В. Наноплазмоника / В. В. Климов. – М. : Физматлит, 2010. – 480 с.

44. Alharbi, K. K. Role and implications of nanodiagnosics in the changing trends of clinical diagnosis / K. K. Alharbi, Y. A. Al-sheikh // *Saudi journal of biological sciences*. – 2014. – № 21. – P. 109–117.

45. Никифоров, В. Н. Медицинские применения магнитных наночастиц / В. Н. Никифоров // *Известия АИН им. А. М. Прохорова*. – 2013. – № 1. – С. 23–34.

46. Петров, В. И. Нанофармакология: проблемы и перспективы / В. И. Петров // Биотехнологии, медицина, фармацевтика. – 2011. – № 4. – С. 86–89.

47. Nanomaterials in medicine and pharmaceuticals: nanoscale materials developed with less toxicity and more efficacy / S. Chen, Q. Zhang, Y. Hou [et al.] // *European journal of nanomedicine*. – 2013. – № 5. – P. 61–79.

48. Нанометали: стан та перспективи наукових досліджень у морфології / О. О. Савенкова, В. Ф. Шаторна, І. С. Чекман [та ін.] // *Вісник ЛНУ імені Тараса Шевченка*. – 2011. – № 18. – С. 151–160.

49. Чекман, І. С. Нанонаука, нанобіологія, нанофармація: монографія / І. С. Чекман, З. Р. Ульберг, В. О. Маланчук. – К. : Поліграф плюс, 2012. – 328 с.

50. Ульберг, З. Р. Коллоидно-биохимический механизм взаимодействия клетки с микро- и наночастицами / З. Р. Ульберг, Т. Г. Грузина, А. С. Духин // *Наносистемы, наноматериалы, нанотехнологии*. – 2014. – № 3. – С. 417–450.

51. Геник, С. М. Нанозолото і наносрібло: перспективи застосування в медицині / С. М. Геник, О. П. Трофимчук // *Галицький лікарняний вісник*. – 2014. – № 2. – С. 124–126.

52. Nanotoxicology – a pathologist's perspective / A. F. Hubbs, R. R. Mercer, S. A. Benkovic [et al.] // *Toxicologic pathology*. – 2011. – № 2. – P. 301–324.

53. Boverhof, D. R. Nanomaterial characterization: considerations and needs for hazard assessment and safety evaluation / D. R. Boverhof, R. M. David // *Analytical bioanalytical chemistry*. – 2011. – № 396. – P 953–961.

54. Rivera, G. P. Correlating physicochemical with toxicological properties of nanoparticles: the present and the future / G. P. Rivera, G. Oberdorster, A. Elder // *ACS Nano*. – 2011. – № 4 – P. 5527–5531.

55. Maynard, A. The new toxicology of sophisticated materials: nanotoxicology and beyond / A. Maynard, D. Warheit, M. Philbert // *Toxicological*

sciences. – 2011. – № 1. – P. 109-129

56. Чекман, І.С. «Зелені» нанотехнології й нанопродукти: досягнення та перспективи досліджень / І. С. Чекман // Наука та інновації. – 2011. – Т. 7, № 1. – С. 26–32.

57. Elsaesser, A. Howard toxicology of nanoparticles / A. Elsaesser, V. C. Howard // *Advanced drug delivery reviews*. – 2012. – № 64. – P. 129–137.

58. Oberdörster, G. Nanotoxicology: in vitro-in vivo dosimetry / G. Oberdörster // *Nanotoxicology*. – 2012. – № 1. – P. 2–25.

59. Risk assessment principle for engineered nanotechnology in food and drug / M. Hwang, E. J. Lee, S. Y. Kweon [et al.] // *Toxicological results*. – 2012. – № 2. – P. 73–79.

60. Akbari, B. Particle size characterization of nanoparticles – a practical approach / B. Akbari, M. P. Tavandashti, M. Zandrahimi // *Iranian journal of materials science*. – 2011. – № 2. – P. 48–56.

61. Interaction of stable colloidal nanoparticles with cellular membranes / M. Mahmoudia, J. Mengc, X. Xue [et al.] // *Biotechnology advances*. – 2014. – № 4. – P. 679–692.

62. Hao, Y. Exploring the cell uptake mechanism of phospholipid and polyethylene glycol coated gold nanoparticles / Y. Hao, X. Yang, S. Song // *Nanotechnology*. – 2012. – № 12. – P. 278–294.

63. Chen, K. L. Nanoparticles meet cell membranes: probing nonspecific interactions using model membranes / K. L. Chen, G. D. Bothun // *Environ. Sci. Technol.* – 2014. – № 2. – P. 873–880.

64. Nanomaterial properties: size and shape dependencies / G. Guisbiers, S. Mejía-Rosales, F. L. Deepak [et al.] // *Journal of nanomaterials*. – 2012. – № 5. – P. 191–194.

65. Toxicology of engineered nanomaterials: focus on biocompatibility, biodistribution and biodegradation / A. Kunzmann, B. Andersson, T. Thurnherr [et al.] // *Biochimica biophysica acta*. – 2011. – № 3. – P. 361–373.

66. Myllynen, P. Nanotoxicology: damaging DNA from a distance /

P. Myllynen // *Nature nanotechnology*. – 2010. – № 4. – P. 795–796.

67. Stoehr, L. Shape matters: effects of silver nanospheres and wires on human epithelial cells / L. Stoehr, E. Gonzalez, A. Stampfl // *Particle and fibre toxicology*. – 2011. – № 4. – P. 81–86.

68. Murashov, V. Risks to health care workers from nano-enabled medical products / V. Murashov, J. Howard // *Journal of occupational and environmental hygiene*. – 2015. – № 6. – P. 75–85.

69. Yildirimer, L. Toxicological considerations of clinically applicable nanoparticles / L. Yildirimer, N. Thanh, M. Loizidou // *Nano Today*. – 2011. – № 6. – P. 585–607.

70. Size dependent surface charge properties of silica nanoparticles / M. Barisik, S. Atalay, A. Beskok [et al.] // *Journal of physical chemistry*. – 2014. – № 18. – P. 1836–1842.

71. Liu, Y. Intracellular dynamics of cationic and anionic polystyrene nanoparticles without direct interaction with mitotic spindle and chromosomes / Y. Liu, W. Li, F. Lao // *Biomaterials*. – 2011. – № 32. – P. 8291–8303.

72. The role of NADPH oxidase in multi-walled carbon nanotubes-induced oxidative stress and cytotoxicity in human macrophages / S. Ye, Y. Wang, F. Jiao [et al.] // *Journal of nanoscience nanotechnology*. – 2011. – № 11. – P. 3773–3781.

73. Oxidative stress and inflammation response after nanoparticle exposure: differences between human lung cell monocultures and an advanced three-dimensional model of the human epithelial airways / L. Muller, M. Riediker, P. Wick [et al.] // *Interface*. – 2010. – № 7. – P. 27–40.

74. Li, N. The role of oxidative stress in ambient particulate matter-induced lung diseases and its implications in the toxicity of engineered nanoparticles / N. Li, T. Xia, A. Nel // *Free radical biology and medicine*. – 2010. – № 4. – P. 1689–1699.

75. Induction of oxidative stress and apoptosis by silver nanoparticles in the liver of adult zebra fish / J. E. Choi, S. Kim, J. H. Ahn [et al.] // *Aquat toxicology*. – 2011. – № 100. – P. 151–159.

76. Marano, F. Nanoparticles: molecular targets and cell signalling / F. Marano, S. Hussain, F. Rodrigues-Lima // *Archives of toxicology*. – 2011. – № 85. – P. 733–741.
77. Stoccoro, A. Genetic effect of nano-sized materials / A. Stoccoro, H. Karlsson, F. Coppedè // *Toxicology*. – 2013. – № 7. – P. 356–368.
78. Genotoxicity of nanomaterials: refining strategies and tests for hazard identification / S. Pfuhler, R. Elespuru, M. Aardema [et al.] // *Environmental and molecular mutagenesis*. – 2013. – № 4. – P. 229–239.
79. Kam, N. W. S. Nanotube molecular transporters: internalization of carbon nanotube-protein conjugates into mammalian cells / N. W. S. Kam, T. C. Jessop, P. A. Wender // *Journal of the american chemical society*. – 2014. – № 126. – P. 6850–6851.
80. Wang, F. A statistics-guided approach to precise characterization of nanowire morphology / F. Wang, Y. Hwang, P. Z. Qian, // *ACS Nano*. – 2010. – № 4. – P. 855–862.
81. Doak, S. H. In vitro genotoxicity testing strategy for nanomaterials and the adaptation of current OECD guidelines / S. H. Doak, B. Manshian // *Mutation research*. – 2012. – № 2. – P. 104–111.
82. Uptake of gold nanoparticles in primary human endothelial cells / H. Klingberg, L. B. Oddershede, K. Loeschner [et al] // *Toxicology research*. – 2015. – № 4. – P. 655–666.
83. Voigta, J. Differential uptake of nanoparticles by endothelial cells through polyelectrolytes with affinity for caveolae / J. Voigta, J. Christensen // *PNAS*. – 2014. – № 8. – P. 42–47.
84. Developmental neurotoxicity of engineered nanomaterials: identifying research needs to support human health risk assessment / C. M. Powers, A. S. Bale, A. D. Kraft [et al.] // *Toxicological sciences*. – 2013. – № 32. – P. 1122–1129.
85. Jang, J. The impact of nanomaterials in immune system / J. Jang, D. H. Lim, I. H. Choi // *Immune network*. – 2011. – № 10. – P. 85–91.
86. Amino acid-dependent attenuation of toll-like receptor signaling by

peptide-gold nanoparticle hybrids / H. Yang, S. Fung, S. Xu [et al.] // ACS Nano. – 2015. – № 39. – P. 421–438.

87. Hoet, P. Do nanomedicines require novel safety assessments to ensure their safety for long-term use? / P. Hoet, B. Legiest, J. Geys // Drug safe. – 2009. – № 32. – P. 625–636

88. Nanomaterial categorization for assessing risk potential to facilitate regulatory decision-making / H. Godwin, C. Nameth, D. Avery [et al.] // ACS Nano. – 2015. – № 4. – P. 3409–3417.

89. Ершов, Б. Г. Наночастицы металлов в водных растворах: электронные, оптические и каталитические свойства / Б. Г. Ершов // Рос. хим. журн. – 2011. – № 45. – С. 20–30.

90. Хлебцов, Н. Г. Золотые наноструктуры с плазмонным резонансом для биомедицинских исследований / Н. Г. Хлебцов, В. А. Богатырев, Л. А. Дыкман // Российские нанотехнологии. – 2011. – № 2. – С. 69–86.

91. Yamada, M. Therapeutic gold, silver, and platinum nanoparticles / M. Yamada, M. Foote, T. Prow // Nanomedicine nanobiotechnology. – 2015. – № 3. – P. 428–445.

92. Novel molecular and nanosensors for in vivo sensing / M. A. Eckert, P. Q. Vu, K. Zhang [et al.] // Theranostics. – 2013. – № 8. – P. 583–594.

93. Бычковский, П. М. Золотые наночастицы: синтез, свойства, биомедицинское применение / П. М. Бычковский, А. А. Кладиев, С. О. Соломевич // Российский биотерапевтический журнал. – 2011. – № 3. – С. 37–46.

94. Thirumurugan, G. Novel biogenic metal nanoparticles for pharmaceutical applications / G. Thirumurugan, M. D. Dhanaraju // Advanced science letters. – 2011. – № 4. – P. 339–348.

95. Nanofibers based antibacterial drug design, delivery and applications / K. Ulubayram, S. Calamak, R. Shahbazi [et al.] // Curr pharmacology design. – 2015. – № 15. – P. 1930–1943.

96. Hsina, Y. H. The apoptotic effect of nanosilver is mediated by a ROS- and JNK-dependent mechanism involving the mitochondrial pathway in NIH3T3

cells / Y. H. Hsina, C. F. Chena, S. Huanga // *Toxicology letters*. – 2008. – № 179. – P. 130–139.

97. Dawson, K. A. Nanotoxicology: nanoparticles reconstruct lipids / K. A. Dawson, A. Salvati, I. Lynch // *Nature nanotechnology*. – 2009. – № 4. – P. 84–85.

98. Pan, Y. Gold nanoparticles of diameter 1.4 nm trigger necrosis by oxidative stress and mitochondrial damage / A. Pan, A. Leifert, D. Ruau // *Small*. – 2009. – № 5. – P. 2067–2076.

99. Gerber, A. Gold nanoparticles: recent aspects for human toxicology / A. Gerber, M. Bundschuh, D. Klingelhofer // *Journal of occupational medicine and toxicology*. – 2013. – № 8. – P. 2313–2333.

100. Toxicity of gold nanoparticles on somatic and reproductive cells / U. Taylor, A. Barchanski, W. Garrels [et al.] // *Advances in experimental medicine and biology*. – 2012. – № 3. – P. 125–133.

101. Rippel, R. A. Gold revolution--gold nanoparticles for modern medicine and surgery / R. A. Rippel, A. M. Seifalian // *Journal of nanoscience nanotechnology*. – 2011. – № 5. – С. 3740–3748.

102. Резниченко, Л. С. Биохимические эффекты влияния наночастиц золота на прокариотические и эукариотические клетки: автореф. дис. ... канд. биол. наук / Резниченко Л. С. ; – К., 2011. – 20 с.

103. Wilson, C. G. Polyelectrolyte-coated gold nanorods and their interactions with type I collagen / C. G. Wilson, P. Sisco, F. A. Gadala-Maria // *Biomaterials*. – 2011. – № 2. – P.5639–5648.

104. Coradeghini, R. Size-dependent toxicity and cell interaction mechanisms of gold nanoparticles on mouse fibroblasts / R. Coradeghini, S. Gioria, C. P. García // *Toxicology letters*. – 2013. – № 3. – P. 578–592.

105. Qu, Y. Proteomic analysis of molecular biocompatibility of gold nanoparticles to human dermal fibroblasts–fetal / Y. Qu, Y. Huang, X. Lü // *Journal of biomedical nanotechnology*. – 2013. – № 9. – P. 40–52.

106. Pavlovich, E. V. Influence of gold nanoparticles on human fibroblast

before and after cryopreservation / E. V. Pavlovich, N. A. Volkova // *Small*. – 2015. – № 2. – P. 413–420.

107. Selective cell targeting with light-absorbing microparticles and nanoparticles / C. M. Pitsillides, E. K. Joe, X. Wei [et al.] // *Biophysical journal*. – 2008. – № 6. – P. 4023–4025.

108. Raghuwanshi, D. A simple approach for enhanced immune response using engineered dendritic cell targeted nanoparticles / D. Raghuwanshi, V. Mishra, M. Suresh // *Vaccine*. – 2012. – № 30. – P. 7292–7299.

109. Larregina, A. T. Direct transfection and activation of human cutaneous dendritic cells / A. T. Larregina, S. C. Watkins, G. Erdos // *Gene Therapy*. – 2011. – № 8. – P. 608–617.

110. Зеленин, А. В. Генная терапия на границе третьего тысячелетия / А. В. Зеленин // *Вестник РАН*. – 2011. – № 71. – С. 387–395.

111. Arvizo, R. R. Mechanism of anti-angiogenic property of gold nanoparticles: role of nanoparticle size and surface charge / R. R. Arvizo, S. Rana, O. R. Miranda // *Nanomedicine: nanotechnology, biology and medicine*. – 2011. – № 7. – P. 580–587.

112. De Jong, W. H. Particle size-dependent organ distribution of gold nanoparticles after intravenous administration / W. H. De Jong, W. I. Hagens, P. Krystek // *Biomaterials*. – 2011. – № 29. – P. 1912–1919.

113. Li, Y. Shape effect in cellular uptake of PEGylated nanoparticles: comparison between sphere, rod, cube and disk. / Y. Li, M. Kröger, W. K. Liu // *Nanoscale*. – 2015. – № 4. – P. 1120–1137.

114. Shape and surface chemistry effects on the cytotoxicity and cellular uptake of metallic nanorods and nanospheres. / P. M. Favi, M. M. Valencia, P. R. Elliott [et al.] // *Journal of biomedical material research*. – 2015. – № 5. – P. 1553–1561.

115. Biological and environmental transformations of copper-based nanomaterials / Z. Wang, A. Bussche, P. K. Kabadi [et al.] // *ACS Nano*. – 2013. – № 7. – P. 715–727.

116. Rao, M. C. Development of ZnO nanoparticles for clinical applications / M. C. Rao, K. Ravindranadh, T. Rose Mary // *Journal of chemical, biological and physical sciences*. – 2013. – № 4. – P. 469–473.
117. Bogutska, K. I. Zinc and zinc nanoparticles: biological role and application in biomedicine / K. I. Bogutska, Yu. P. Sklyarov, Yu. I. Prylutsky // *Ukrainica bioorganica acta*. – 2013. – № 1. – P. 9–16.
118. Meyer, K. ZnO nanoparticles induce apoptosis in human dermal fibroblasts via p53 and p38 pathways / K. Meyer, P. Rajanahalli, M. Ahamed // *Toxicology in vitro*. – 2011. – № 25. – P. 1721–1726.
119. Titanium nanostructures for biomedical applications / M. Kulkarni, A. Mazare, E. Gongadze [et al.] // *Nanotechnology*. – 2015. – № 26. – P. 1–19.
120. In vitro phototoxicity and hazard identification of nano-scale titanium dioxide / K. Sanders, L. L. Degen, W. R. Mundy [et al.] // *Toxicology applies in pharmacology*. – 2011. – № 258. – P. 226–236.
121. Aqueous processing CdSe/tga quantum dots for potential bio-medical applications / R. Feliciano-Crespoa, J. A. Rodriguez-Gonzalez, C. Zhong [et al.] // *MRS Proceedings*. – 2015. – № 117. – P. 637–648.
122. Biohybrid nanostructured iron oxide nanoparticles and *satureja hortensis* to prevent fungal biofilm development / I. Anghel, A. M. Grumezescu, A. M. Holban [et al.] // *International journal of molecular sciences*. – 2014. – № 9. – C. 348–349.
123. Nanotechnology-based therapies for skin wound regeneration / I. Tocco, B. Zavan, F. Bassetto [et al.] // *Journal of nanomaterials*. – 2012. – № 12. – C. 543–554.
124. Recent advances in multifunctional magnetic nanoparticles and applications to biomedical diagnosis and treatment / K. Yan, P. Li, H. Zhu [et al.] // *RSC Advances*. – 2013. – № 3. – P. 598–618.
125. Kim, J. K. Therapeutic application of metallic nanoparticles combined with particle-induced x-ray emission effect / J. K. Kim, S. J. Seo, K. H. Kim // *Nanotechnology*. – 2010. – № 42. – P. 678–689.

126. Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging / S. Parveen, R. Misra, S. Sahoo [et al.] // *Nanomedicine: nanotechnology, biology and medicine*. – 2012. – № 11. – P. 1587–1591.

127. Ansari, M. A. Evaluation of antibacterial activity of silver nanoparticles against MSSA and MRSA on isolates form skin infections / M. A. Ansari, H. M. Khan, A. A. Khan // *Biology and medicine*. – 2011. – № 3. – P. 141–146.

128. Mussel-inspired electrospun nanofibers functionalized with size-controlled silver nanoparticles for wound dressing application / A. Ghavaminejad, A. Rajan, A. Ramachandra [et al.] // *ACS Materials and interfaces*. – 2015. – № 7. – P. 176–183.

129. Topical delivery of silver nanoparticles promotes wound healing / J. Tian, K. K. Wong, C. M. Ho [et al.] // *ChemMedChem*. – 2007. – № 2. – P. 129–136.

130. Huang, L. Synergistic combination of chitosan acetate with nanoparticle silver as a topical antimicrobial: efficacy against bacterial burn infections / L. Huang, T. Dai, Y. Xuan // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2011. – № 7. – P. 297–306.

131. Synergistic effects between silver nanoparticles and antibiotics and the mechanisms involved / I. Hwang, J. H. Hwang, H. Choi [et al.] // *Journal of medical microbiology*. – 2012. – № 61. – P. 19–26.

132. Agarwal, A. Surfaces modified with nanometer-thick silver-impregnated polymeric films that kill bacteria but support growth of mammalian cells / A. Agarwal, T. L. Weis, M. Schurr // *Biomaterials*. – 2010. – № 31. – P. 680–690.

133. Guzman, M. Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles against gram-positive and gram-negative bacteria / M. Guzman, J. Dille, S. Godet // *Nanomedicine: nanotechnology, biology, and medicine*. – 2012. – № 8. – P. 37–45.

134. Lin, J. J. The cellular responses and antibacterial activities of silver nanoparticles stabilized by different polymers / J. J. Lin, W. C. Lin, R. X. Dong // *Nanotechnology*. – 2012. – № 23. – P. 25–34.

135. Martínez–Gutierrez, F. Antibacterial activity, inflammatory response, coagulation and cytotoxicity effects of silver nanoparticles / F. Martínez–Gutierrez, E. P. Thi, J. M. Silverman // *Nanomedicine: nanotechnology, biology, and medicine*. – 2012. – № 8. – P. 328–336.
136. Silver nanoparticles as potential antibacterial agents / G. Franci, A. Falanga, S. Galdiero [et al.] // *Molecules*. – 2015. – № 20. – P. 8856–8875.
137. The bactericidal effect of silver nanoparticles / J. R. Morones, J. L. Elechiguerra, A. Camacho [et al.] // *Nanotechnology*. – 2014. – № 16. – P. 2346–2353.
138. Applications and toxicity of silver nanoparticles: a recent review / S. Marin, G. M. Vlasceanu, R. E. Tiplea [et al.] // *Curr Top Med Chem*. – 2015. – № 16. – P. 1596–1609.
139. Comparison of the anti-bacterial activity on the nanosilver shapes: nanoparticles, nanorods and nanoplates / B. Sadeghia, F. S. Garmaroudib, M. Hashem [et al.] // *Advanced powder technology*. – 2012. – № 1. – P. 22–26.
140. Martínez–Castañón, G. A. Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles with different sizes / G. A. Martínez–Castañón, N. Niño–Martínez, F. Martínez–Gutierrez // *Journal of nanoparticle research*. – 2011. – № 10. – P. 1343–1348.
141. Kim, A. S. Silver nanoparticles induce apoptosis through the Toll–like receptor 2 pathway / A. S. Kim, C. Chae, J. Kim // *Oral and maxillofacial pathology*. – 2012. – № 6. – P. 789–799.
142. Park, E. J. Silver nanoparticles induce cytotoxicity by a Trojan–horse type mechanism / E. J. Park, J. Yi, Y. Kim // *Toxicology in vitro*. – 2010. – № 24. – P. 872–878.
143. Arora, S. Interactions of silver nanoparticles with primary mouse fibroblasts and liver cells / S. Arora, J. Jain, J. Rajwade // *Toxicology and applied pharmacology*. – 2009. – № 236. – P. 310–318.
144. Oxidative stress–dependent toxicity of silver nanoparticles in human hepatoma cells / S. Kim, J. E. Choi, J. Choi [et al.] // *Toxicology in vitro*. – 2009. –

№ 23. – P. 1076–1084.

145. Asharani, P. V. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells / P. V. Asharani, G. Mun, M. P. Hande // *ACS Nano*. – 2009. – № 3. – P. 279–290.

146. Kim, Y. J. Cytotoxicity and genotoxicity of nano–silver in mammalian cell lines / Y. J. Kim, S. I. Yang, J. C. Ryu // *Molecular cell toxicology*. – 2010. – № 6. – P. 119–125.

147. Arora, S. Cellular responses induced by silver nanoparticles: in vitro studies / S. Arora, J. Jain, J. Rajwade // *Toxicology letters*. – 2008. – № 179. – P. 93–100.

148. Silver nanoparticles induce oxidative cell damage in human liver cells through inhibition of reduced glutathione and induction of mitochondria–involved apoptosis / M. J. Piao, K. A. Kang, I. K. Lee [et al.] // *Toxicology letters*. – 2011. – № 201. – P. 92–100.

149. Rahman, M. F. Expression of genes related to oxidative stress in the mouse after exposure to silver–25 nanoparticles / M. F. Rahman, J. Wang, T. A. Patterson // *Toxicology letters*. – 2009. – № 187. – P. 15–21.

150. Piao, M. J. Silver nanoparticles down–regulate Nrf2–mediated 8–oxoguanine DNA glycosylase 1 through inactivation of extracellular regulated kinase and protein kinase B in human liver cells / M. J. Piao, K. C. Kim, J. Y. Choi // *Toxicology letters*. – 2011. – № 207. – P. 143–148.

151. McShan, D. Molecular toxicity mechanism of nanosilver / D. McShan, P. C. Ray, H. Yu // *Journal of food and drug analysis*. – 2014. – № 22. – P. 116–127.

152. Kang, S. J. Silver nanoparticles–mediated G2/M cycle arrest of renal epithelial cells is associated with NRF2–GSH signaling / S. J. Kang, Y. J. Lee, E. K. Lee // *Toxicology letters*. – 2012. – № 211. – P. 334–341.

153. Zon, V. B. Photo–induced growth of DNA–capped silver nanoparticles / V. B. Zon, G. A. Burley, U. Rant // *Nanotechnology*. – 2011. – № 11. – P. 45–46.

154. Мяделец, О. Д. Морфофункциональная дерматология / О. Д. Мяделец, В. П. Адаскевич. – М. : Медицинская литература, 2006. – 735 с.
155. Wang, L. Skin penetration of inorganic and metallic nanoparticles / L. Wang, J. Wang // *Journal of Shanghai jiaotong university (Science)*. – 2014. – № 6. – P. 691–697.
156. Fazlollahi, F. Nanoparticle translocation across mouse alveolar epithelial cell monolayers: Species-specific mechanisms / F. Fazlollahi, Y. Kim, A. Sipos // *Nanomedicine: nanotechnology, biology, and medicine*. – 2013. – № 9. – P. 786–794.
157. The human stratum corneum prevents small gold nanoparticle penetration and their potential toxic metabolic consequences / D. C. Liu, A. P. Raphael, D. Sundh [et al.] // *Journal of nanomaterials*. – 2012. – № 1. – P. 2779–2787.
158. Mortensen, L. J. Near-IR fluorescence and reflectance confocal microscopy for imaging of quantum dots in mammalian skin / L. J. Mortensen, C. E. Glazowski, J. M. Zavislan // *Biomedical optics express*. – 2011. – № 2. – P. 1610–1625.
159. Samberg, M. E. Evaluation of silver nanoparticle toxicity in skin in vivo and keratinocytes in vitro / M. E. Samberg, N. A. Oldenburg, S. J. Monteiro-Riviere // *Environmental health perspectives*. – 2010. – № 118. – P. 407–413.
160. Mortensen, L. J. Progress and challenges in quantifying skin permeability to nanoparticles using a quantum dot model / L. J. Mortensen, S. Ravichandran, H. Zheng // *Biomedical nanotechnology*. – 2010. – № 6. – P. 596–604.
161. Nadworny, P. L. Anti-inflammatory activity of nanocrystalline silver-derived solutions in porcine contact dermatitis / P. L. Nadworny, J. F. Wang, E. E. Tredget // *Journal of inflammation*. – 2010. – № 6. – P. 7–13.
162. Lee, P. Y. Silver nanoparticles mediate differential responses in keratinocytes and fibroblasts during skin wound healing / P. Y. Lee, C. M. Ho, V. Lui // *ChemMedChem*. – 2010. – № 5. – P. 468–475.

163. A review of the in vivo and in vitro toxicity of silver and gold particulates: particle attributes and biological mechanisms responsible for the observed toxicity / H. J. Johnston, G. Hutchison, F. M. Christensen [et al.] // *Critical review of toxicology*. – 2010. – № 40. – P. 328–346

164. Park, M. V. The effect of particle size on the cytotoxicity, inflammation, developmental toxicity and genotoxicity of silver nanoparticles / M. V. Park, A. M. Neigh, J. P. Vermeulen // *Biomaterials*. – 2011. – № 32. – P. 9810–9817.

165. Effect of curcumin caged silver nanoparticle on collagen stabilization for biomedical applications / K. V. Srivatsan, N. Duraipandy, S. Begum [et al.] // *International journal of biological macromolecules*. – 2015 – № 75. – P. 306–315.

166. Kwan, K. H. Modulation of collagen alignment by silver nanoparticles results in better mechanical properties in wound healing / K. H. Kwan, X. Liu, K. T. Michael // *Nanomedicine: nanotechnology, biology, and medicine*. – 2011. – № 7. – P. 497–504.

167. Size dependent macrophage responses and toxicological effects of Ag nanoparticles / J. Park, D. H. Lim, H. J. Lim [et al.] // *Chemical Communications*. – 2011. – № 47. – P. 4382–4384.

168. 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 // *Biomaterials*. – 2012. – № 33. – P. 4690–4699.

169. Chowdhury, S. Influence of silver nanoparticles on post-surgical wound healing following topical application / S. Chowdhury, M. De, R. Guha // *European journal of nanomedicine*. – 2014. – № 6. – P. 237–249.

170. McShan, D. Molecular toxicity mechanism of nanosilver / D. McShan, P. C. Ray, H. Yu // *Journal of food drug analytics*. – 2014. – № 1. – P. 116–127.

171. Gunasekaran, T. Silver nanoparticles as real topical bullets for wound healing / T. Gunasekaran, T. Nigusse, M. D. Dhanaraju // *Journal of the American*

college of clinical wound specialists. – 2012. – № 3. – P. 82–96.

172. Côté-Maurais, G. Silver and fullerene nanoparticles effect on interleukin-2-dependent proliferation of CD4 (+) T cells / G. Côté-Maurais, J. Bernier // *Journal of toxicological environmental health*. – 2014. – № 28. – P. 1474–1482.

173. Acute and subchronic dermal toxicity of nanosilver in guinea pig / M. Korani, S. M. Rezayat, K. Gilani [et al.] // *International journal of nanomedicine*. – 2011. – № 4. – P. 855–862.

174. Asharani, P. V. Anti-proliferative activity of silver nanoparticles / P. V. Asharani, M. P. Hande, S. Valiyaveetil // *BMC Cell Biology*. – 2009. – № 10. – P. 65–69.

175. Nanomedicine strategies for targeting skin inflammation / M. Abdel-Mottale, C. Try, Y. Pellequer [et al.] // *Nanomedicine*. – 2014. – № 9. – P. 1727–1737.

176. Wong, K. K. Further evidence of the anti-inflammatory effects of silver nanoparticles / K. K. Wong, S. O. Cheung, L. Huang // *ChemMedChem*. – 2009. – № 4. – P. 1129–1135.

177. Effects of TLC-Ag dressings on skin inflammation / J. Bisson, S. Hidalgo-Lucas, M. Bouschbacher [et al.] // *The journal of dermatology*. – 2013. – № 40. – P. 857–873.

178. Chitosan-PVP-nano silver oxide wound dressing: in vitro and in vivo evaluation / D. Archana, B. Singh, J. Dutta [et al.] // *International journal of biological macromolecules*. – 2015. – № 7. – P. 49–57.

179. Braydich-Stolle, L. In vitro cytotoxicity of nanoparticles in mammalian germline stem cells / L. Braydich-Stolle, S. Hussain, J. J. Schlager // *Toxicology sciences*. – 2014. – № 88. – P. 412–419.

180. Gurunathan, S. Antiangiogenic properties of silver nanoparticles / S. Gurunathan, K. J. Lee, K. Kalishwaralal // *Biomaterials*. – 2009. – № 30. – P. 6341–6350.

181. Silver nanoparticles inhibit VEGF induced cell proliferation and

migration in bovine retinal endothelial cells / K. Kalishwaralal, E. Banumathi, S. Pandian [et al.] // *Colloids and surfaces B: biointerfaces*. – 2009. – № 73. – P. 51–57.

182. Vascular tube formation and angiogenesis induced by polyvinylpyrrolidone-coated silver nanoparticles / K. Kang, D. H. Lim, I. H. Choi [et al.] // *Toxicology letters*. – 2011. – № 205. – P. 227–234.

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

184. Мішалов, В. Д. Про правові, законодавчі та етичні норми і вимоги при виконанні наукових досліджень / В. Д. Мішалов, Ю. Б. Чайковський, І. В. Твердохліб // *Морфологія*. – 2007 – № 2. – С. 108–115.

185. Микроскопическая техника: Руководство / под ред. Д. С. Саркисова, Ю. Л. Перова. – М. : Медицина, 1996. – 544 с.

186. Автандилов, Г. Г. Медицинская морфометрия: руководство / Г. Г. Автандилов. – М. : Медицина, 1990. – 283 с.

187. Алексеева, Н. Т. Роль клеток фибробластического дифферона в процессе заживления ран / Н. Т. Алексеева, А. А. Глухов, А. П. Остроушко // *Вестник экспериментальной и клинической хирургии*. – 2012. – № 3. – С. 601–607.

188. Борис, Р. Я. Морфологічні особливості судинного русла шкіри щурів / Р. Я. Борис // *Клінічна анатомія та оперативна хірургія*. – 2008. – № 4. – С. 11–15.

189. Дісковський, І. С. Морфометричний аналіз кровоносних сплеть шкіри в нормі та за умов репаративного процесу в експерименті / І. С. Дісковський // *Український журнал клінічної та лабораторної медицини*. – 2013. – № 3. – С. 201–204.

190. Reynoldes, E. S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy / E. S. Reynoldes // *Journal of cell biology*. – 1963. – № 17. – P. 208–212.

191. Данилов, Р. К. Количественные методы исследования функциональной активности клеток и тканей / Р. К. Данилов, В. В. Сперанский. – Уфа. : Изд-во БГМИ, 1988. – 33 с.
192. Мусина, Л. А. Роль макрофагов в регенерации соединительной ткани при имплантации биоматериалов / Л. А. Мусина, С. А. Муслимов, А. И. Лебедева // Актуальные вопросы патологии. – 2004. – № 4. – С. 146-149.
193. Гоцульский, В. Я. Коррелометр для случайных импульсных сигналов / В. Я. Гоцульский, В. Е. Чечко, В. Г. Заремба // ПТЭ. – 1997. – № 2. – С. 161–162.
194. Гланц, С. Медико-биологическая статистика / Гланц С. – М. : Практика, 1998. – 459 с.
195. Сырма, Е. И. Морфологические изменения кожи при введении наночастиц серебра / Е. И. Сырма, В. М. Скобеева, В. А. Ульянов // Морфологія. – 2014. – № 1. – С. 90–95.
196. Сырма, Е. И. Морфометрическая характеристика кожи интактных крыс / Е. И. Сырма // Морфологічні основи наукових досліджень у медицині: наук.- пр. конф., присв. 110 – річчю з дня народження М. І. Зазибіна, 24-27 жовтня 2013 р., Київ : тези доп. – Київ, 2013. – С. 71.
197. Сырма, Е. И. Морфологические изменения кожи при введении наночастиц серебра / Е. И. Сырма, В. М. Скобеева, В. А. Ульянов // Морфологія. – 2014. – № 1. – С. 90–95.
198. 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.
199. Сырма, Е. И. Морфофункциональная характеристика дермы кожи крыс при введении наночастиц серебра / Е. И. Сырма, В. М. Скобеева, В. А. Ульянов // Вісник морфології. – 2014. – № 2. – С. 245–248.
200. 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.

201. Ультраструктурные изменения кожи при введении наночастиц серебра / Е. И. Сырма, Н. Е. Думброва, Н. И. Молчанюк [и др.] // Світ медицини та біології. – 2014. – № 3. – С. 150–154.

202. Сравнительная характеристика морфофункциональных изменений кожи крыс при введении наночастиц серебра разных размеров / Е. И. Сырма, В. А. Ульянов, Н. Е. Думброва [и др.] // Світ медицини та біології. – 2015. – № 2. – С. 137–141.

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

204. 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, 27–28 травня 2014 р., Київ : тези доп. – Київ, 2014. – С.96.

205. 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, 21 листопада 2014 р., Полтава : тези доп. – Полтава, 2014. – С. 36.

206. Кульский, Л. А. Серебряная вода / Л. А. Кульский. – [9-е изд.]. – К. : Наукова думка, 1987. – 136 с.

207. Иммунопатология кожи и гемосорбция / Л. В. Белецкая, А. А. Дмитриев, Г. Н. Петрова [и др.] // Вести дерматологии. – 1985. – № 5. – С. 15–18.

208. Cytotoxicity of silver nanoparticles in human embryonic stem cell-derived fibroblasts and an L-929 cell line / H. Peng, X. Zhang, Y. Wei [et al] // Journal of nanomaterials. – 2012. – № 2. – P. 456-463.

209. Терещенко, В. П. Медико–биологические эффекты наночастиц: реалии и прогнозы: Монография. / В. П. Терещенко, Н. Т. Картель. – К. : Наукова думка, 2010. – 240 с.
210. In vitro 30 nm silver nanoparticles promote chondrogenesis of human mesenchymal stem cells / W. He, A. Kienzle, X. Liu [et al] // RSC Advances. – 2015. – № 5. – P. 809-818.
211. Мусина, Л. А. Ультраструктура макрофагов, выявляемых при имплантации аллогенного биоматериала Аллоплант / Л. А. Мусина, С. А. Муслимов, А. И. Лебедева. // Морфология. – 2006. – № 1. – С. 53–56.
212. Мусина, Л. А. Функциональная морфология макрофагов при регенерации тканей, индуцированной аллогенными биоматериалами.: автореф. дис. ... д–ра биол. наук : 03.00.25 / Мусина Л. А. ; – Саранск, 2007. – 49 с.
213. Negligible particle–specific antibacterial activity of silver nanoparticles / Z. Xiu, Q. Zhang, H. Puppala [et al.] // Nano letters. – 2012. – № 12. – P. 4271–4275.
214. Different routes, same pathways: molecular mechanisms under silver ion and nanoparticle exposures in the soil sentinel *Eisenia fetida* / M. Novo, E. Lahive, M. Díez-Ortiz // Environmental pollution. – 2015. – № 4. – P. 385–393.