

Е.И.Сырма<sup>1</sup>  
Т.М.Скобеева<sup>2</sup>  
В.А.Ульянов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Одесский национальный  
медицинский университет

<sup>2</sup>Одесский национальный  
университет имени  
И.И.Мечникова

**Ключевые слова:** наночастицы серебра, кожа, гистогенез.

Надійшла: 07.02.2014

Прийнята: 29.02.2014

УДК 535.343:612.017.4

## МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ КОЖИ ПРИ ВВЕДЕНИИ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА

**Реферат.** Цель работы состояла в определении морфофункциональных изменений тканей кожи, которые возникают при внутрикожном введении наночастиц серебра. Использовались наночастицы серебра сферической формы размером 30 нм, синтезированные цитратным методом. Эксперимент проводился на 140 крысах линии Вистар. После подкожного введения 0,01мл раствора наночастиц серебра эффект оценивался на 1, 3, 7, 14, 21, 30, 45 сутки. Использовались стандартные гистологические методики. Показано, что при введении наночастиц серебра в коже возникает комплекс реактивных изменений, характеризующийся фазностью. Морфофункциональной основой изменений являются закономерные процессы нормального гистогенеза, которые проявляются в месте введения и не затрагивают интактные зоны.

**Morphologia.** – 2014. – Т. 8, № 1. – С. 90-94.

© Е.И.Сырма, Т.М.Скобеева, В.А.Ульянов, 2014

✉ lenasyrma@mail.ru

Syrma O.I., Skobeeva V.M., Ulianov V.O. Morphological changes in the skin after administration of silver nanoparticles.

**ABSTRACT. Background.** Silver nanoparticles are of interest to be used as antimicrobial agents in wound dressings and coatings in medical devices, but potential adverse effects have been reported in the literature. The most pronounced effect of silver nanoparticles and the role of particle size in determining these effects, especially in comparison to silver ions, are largely unknown. **Objective.** To investigate the morphological and functional changes in the skin tissues during intradermal injection of silver nanoparticles. **Methods.** Spherical silver nanoparticles of 30 nm were used. The experiment was performed on 140 Wistar rats. The effect after subcutaneous injection of 0.01 ml of silver nanoparticles solution was examined on the 1<sup>st</sup>, 3<sup>rd</sup>, 7<sup>th</sup>, 14<sup>th</sup>, 21<sup>st</sup>, 30<sup>th</sup>, 45<sup>th</sup> day. Standard histological techniques were used. **Results.** It was shown that after the injection of silver nanoparticles there is a complex of reactive changes in the skin, which is realized in several phases. Immediately after injection the phase of inflammation begins. Later it is replaced with the phase of regenerative histogenesis with the formation of granulation tissue and further is finished in the phase of adaptive remodeling. **Conclusion.** Morphological and functional changes after the intradermal injection of silver nanoparticles are based on the pattern of normal histogenesis that occurs at the site of injection and do not affect the intact zone.

**Keywords:** silver nanoparticles, skin, histogenesis.

### Citation:

Syrma OI, Skobeeva VM, Ulianov VO. [Morphological changes in the skin after administration of silver nanoparticles]. Morphologia. 2014;8(1):90-4. Russian.

### Введение

С развитием нанохимии и усовершенствованием методов получения наночастиц металлов возобновились разработки по применению серебра в медицинских целях. За последние несколько десятилетий наночастицы (НЧ) серебра привлекают большое внимание в связи с возможностью их использования для точечной доставки лекарственных веществ. Кроме того, есть несколько причин для использования НЧ серебра в медицинских и фармацевтических областях.

1. НЧ серебра обладают широким антибактериальным спектром [1].

2. Из-за наличия отрицательного заряда на их поверхности они обладают высокой реакционной способностью, что делает их поверхности модифицируемыми с помощью нескольких биомолекул, что используется в доставке лекарств.

3. Из-за сильного взаимодействия между поверхностью серебра и молекулами, содержащие тиоловые или аминокислотные группы (органические молекулы, ДНК, белки, ферменты, и т.д.), поверхность НЧ серебра могут быть легко изменены [1].

Наиболее распространенным является местное применение соединений серебра, как, например, обработка ран, слизистых, в связи с этим приоритетным является изучение взаимодействия НЧ серебра и кожи [2]. Большинство исследований посвящены внутриклеточным изменениям, возникающим в коже при взаимодействии с НЧ, а морфологических работ, описывающих изменения, происходящие в тканях недостаточно, а их результаты противоречат друг другу.

**Целью** нашей работы являлось исследовать морфо-функциональные изменения тканей кожи, которые возникают при внутрикожном введении

НЧ серебра разного размера.

## Материалы и методы

### 1. Модель эксперимента

Экспериментальные исследования проведены на 140 интактных крысах линии Вистар обоих полов весом 0,18-0,24 кг. Животные содержались в стандартных условиях вивария Одесского национального медицинского университета согласно научно-практическим рекомендациями по содержанию лабораторных животных и работе с ними. Животные были разделены на 4 группы: интактная группа, животные, которым вводились Ag НЧ 30 нм, животные, которым вводился 2 % коллоидный р-р серебра, животные, которым вводился физиологический р-р. Введение 0,01 мл раствора осуществлялось в область холки строго подкожно на глубину 120 мкм с помощью инсулинового шприца. После введения эффект оценивался на 1, 3, 7, 14, 21, 30, 45 суток. Вывод животных из эксперимента проводился методом передозировки эфирного наркоза. Эксперимент выполнялся с соблюдением норм Закона Украины «О защите животных от жестокого обращения», а также общими этическими принципами экспериментов на животных и Этическим кодексом ученого Украины.

### 2. Получение и характеристика Ag НЧ

В данной работе для получения НЧ Ag, был применен цитратный метод, в котором цитрат натрия ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ ) выполняет функции, как восстановителя, так и стабилизатора частиц.

В типичной методике синтеза к раствору нитрата серебра ( $\text{AgNO}_3$ ) определенной концентрации добавляли такой же объем раствора восстановителя (цитрат натрия).

Синтез НЧ Ag проводился при следующих технологических параметрах:

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

Характерно, что при используемых нами параметрах синтеза с применением цитрата натрия были получены НЧ серебра сферической формы (рис. 1).

Для определения среднего размера НЧ серебра нами применялся метод лазерной корреляционной спектроскопии, известный в литературе, как метод динамического рассеяния света [3]. В основе метода лежит экспериментальное определение характерного времени рассеяния исследуемым объектом монохроматического излучения. В случае диффузии взвешенных в однородной среде НЧ, характерные времена рассеянного излучения  $\tau$  определяются при построении корреляционной функции интенсивности монохроматического излучения рассеянного света.

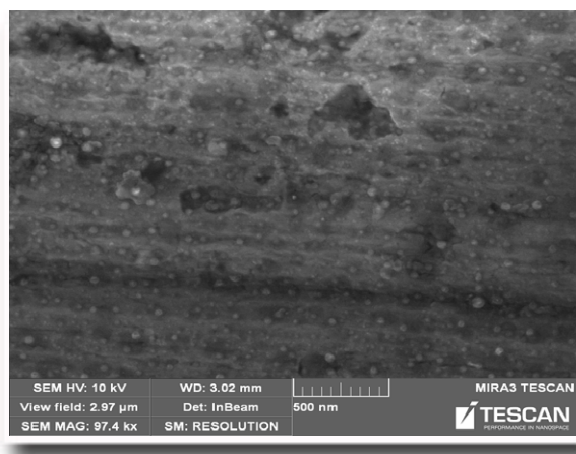


Рис. 1. Изображение НЧ серебра, полученное в растровом электронном микроскопе.

В нашем случае, расчет размера НЧ был произведен путем сравнения корреляционных функций рассеяния коллоидного раствора, содержащего НЧ серебра и раствора с эталонным объектом, которым являлась сильно разбавленная водная взвесь латекса. Диаметр частиц латекса, согласно паспортным данным, был равен  $d_{\text{латекс}} = 0,06$  мкм (погрешность 5%). В этом случае, размер оптических неоднородностей, вызванных наличием рассеивающих объектов определялся по формуле [3]:

$$d_{i\div} = d_{\text{эрн} \ell \text{ен}} \frac{\tau_{i\div}}{\tau_{\text{эрн} \ell \text{ен}}},$$

где  $d_{\text{латекс}}$ ,  $d_{i\div}$  – диаметры частицы латекса и исследуемой НЧ,

$\tau_{\text{латекс}}$  и  $\tau_{i\div}$  – характерные времена рассеяния монохроматического света, полученные на образце сравнения (латекс) и на исследуемых НЧ серебра, равные, соответственно, 180 мксек и 90 мксек.

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

### 3. Методики

Для морфологических исследований забирали кожу спины. Материал фиксировали в 10% нейтральном формалине и заливали гистамиксом (Биовитрум, Россия) согласно общепринятой гистологической методике, готовили постоянные гистологические препараты. Срезы толщиной 5-7 мкм окрашивали гематоксилином-эозином, по Ван-Гизон, резорцином-фуксином и толуидиновым синим для выявления тучных клеток [4].

Постоянные гистологические препараты исследовали методом световой микроскопии, на микроскопе "Zeiss" "AxioStarplus", оборудован-

ном системой видеоанализа изображений. Морфометрические исследования полученных изображений выполняли с использованием программы "ВидеоТест-Мастер Морфология" (ВидеоТест, Россия). Полученные изображения и цифровые данные хранили в архиве созданном с помощью программного обеспечения "ВидеоТест Альбом". Статистическую обработку результатов производили с помощью компьютерной программы «STATISTIKA 6.0» Исследования проводились на базе кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии ОНМедУ.

### Результаты и их обсуждение

#### Эпидермис

В результате проведенных исследований в эпидермисе в 1-3 сутки над местом введения наблюдается разрыхление базального слоя эпителия и значительное расширение межклеточных промежутков. Митотически делящихся клеток практически не встречается. На 7-е нарастает междифферонная гетероморфия эпидермиса за счет гетерокинеза клеток крови. Эпителиоциты базального слоя проходят ускоренную дифференцировку, распластаны по набухшей базальной мембране. Они сохраняют с ней тесный контакт, но при этом межклеточные промежутки значительно расширены (рис. 2).

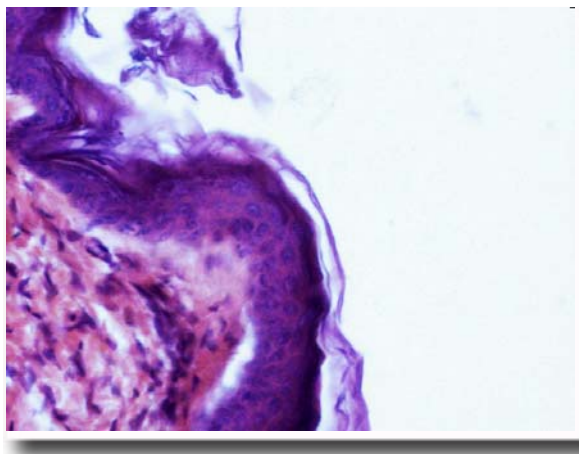


Рис. 2. Эпидермис кожи крысы на 7-е сутки после введения. Окрашивание гематоксилином и эозином. ×300.

Можно предполагать, что изменения связаны с ускоренной дифференцировкой. На 14-е сутки структура эпидермиса сохранена, междифферонная гетероморфия снижается, зато нарастает внутридифферонная среди эпителиоцитов базального слоя. В базальном слое встречаются единичные фигуры митоза и клетки со сморщенными ядрами. На 21-е сутки над очагом в базальном слое эпидермиса появляются многочисленные клетки, в цитоплазме которых за счет внутриклеточного отека имеются крупные вакуоли, которые располагаются перинуклеарно. Иногда вакуоль занимает почти всю цитоплазму, оттесняя ядро к периферии, которое принимает серповидную форму.

Это характерно для вакуольной дистрофии (рис. 3).

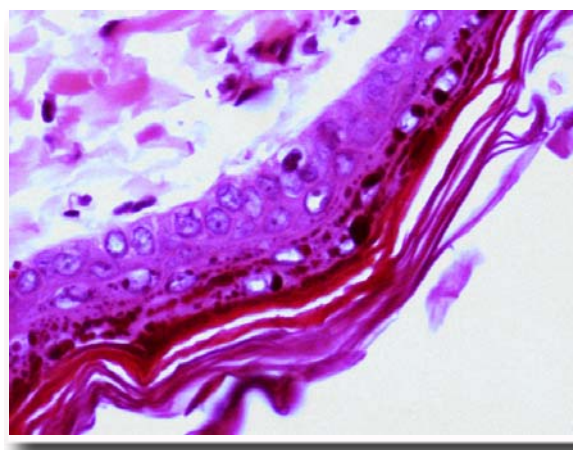


Рис. 3. Эпидермис кожи на 21 сутки после введения. Окрашивание гематоксилином и эозином ×600.

В это же время эпителиальные влагалища волосяных луковиц утолщены, разрыхлены и в них с момента повреждения увеличивается митотическая активность, нарастают размеры и базофилия клеток, гипертрофируется сам пласт. В последующие сроки происходит гипертрофия эпителия преимущественно за счет смещения сюда активно пролиферирующего эпителия наружных волосяных влагалищ. К 45-м суткам опыта регенерация завершается, и в эпидермисе восстанавливается структура ведущего дифферона эпителиоцитов.

#### Дерма

В свою очередь в дерме на 1-е сутки после введения отмечается отек, нарастает количество тучных клеток, появляются единичные нейтрофильные гранулоциты, незначительно возрастает количество макрофагов, остальная часть тканевых элементов – это клетки фибробластического дифферона. Под влиянием секреторных продуктов тканевых базофилов повышается проницаемость кровеносных сосудов, происходит гетерокинез клеток крови. На 3-и сутки междифферонная гетероморфия нарастает за счет клеток крови, преимущественно макрофагов, количество которых увеличивается до 33% и они активно фагоцитотируют. Лейкоцитарная инфильтрация сменяется гистиоцитарной, при этом междифферонная гетероморфия возрастает, и фибробластический дифферон перестает быть доминирующим. Это позволяет констатировать трансформацию клеточного состава первоначального, раннего гистиона фазы воспаления в поздний гистион фазы воспаления, в котором ведущими элементами становятся макрофаги. Таким образом, миграция гематогенных элементов происходит гетерохронно и приводит к возрастанию междифферонной гетероморфии, что характерно для формирования гистиона воспаления.

На 7-е сутки в месте введения начинает форми-

роваться "грануляционная ткань", снижается количество клеток гематогенного происхождения и увеличивается количество клеток фибробластического ряда.

В очаге отмечается нарушение структуры и ориентации коллагеновых волокон: они разволокнены и ориентированы параллельно продольной оси очага. Кровеносные сосуды возле очага расширены, располагаются группами, их количество увеличено (рис. 4).

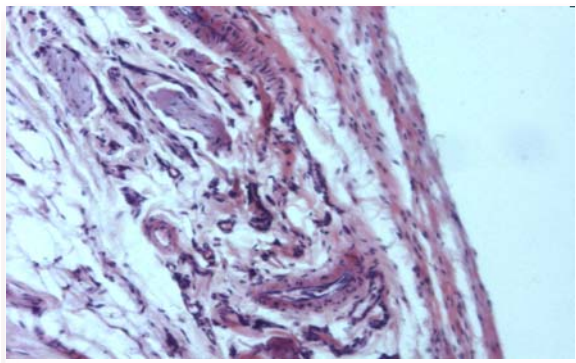


Рис. 4. Дерма кожи на 14 сутки в месте введения. Окраска гематоксилином и эозином.  $\times 300$ .

К 14-м суткам фибробластический дифферон преобладает. Междифферонная гетероморфия несколько снижается, зато нарастает внутридифферонная, т.е. среди фибробластов наблюдается различные по степени зрелости клетки, которые имеют ряд морфологических особенностей в зависимости от степени дифференцировки. Так наблюдается определенная динамика ядерно-цитоплазматического соотношения и градиента ДНК-РНК. На 21 сутки в регенерационном гистионе преобладают дифференцированные фибробласты (рис. 5).

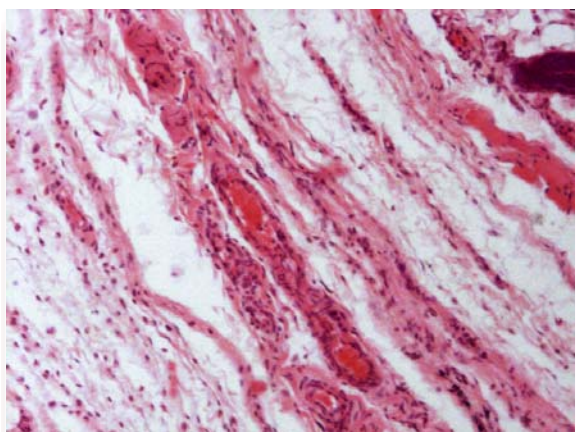


Рис. 5. Дерма кожи на 30 сутки в месте введения. Окраска гематоксилином эозином.  $\times 300$ .

Фаза адаптации заключается в постепенной организации "грануляционной ткани" и формировании соединительнотканного рубца. При этом про-

исходит снижение междифферонной и внутридифферонной гетероморфии макрофагов, тканевых базофилов, фибробластов, эндотелиоцитов, снижается число кровеносных сосудов. Преобладающим клеточным типом в соединительнотканном рубце являются терминальные клетки фибробластического дифферона. "Грануляционная ткань" замещается соединительнотканым рубцом, представленным плотно прилежащими друг к другу пучками коллагеновых волокон и расположенными между ними фиброцитами. Окончательная регенерация кожи происходит на 45 сутки.

В оценке последовательности событий в области введения использована концепция гистионной организации [5], которая уточняет характер складывающихся новых взаимодействий и служит маркером реакции организма на повреждение. Анализируя процесс морфологических изменений ткани кожи в результате введения НЧ серебра, следует отметить наличие последовательно сменяющихся фаз. Сразу после введения наступает фаза воспаления, которая сменяется фазой регенерационного гистогенеза с формированием грануляционной ткани, и завершает процесс фаза адаптивной перестройки, т.е. мы наблюдаем закономерные процессы нормального гистогенеза, возникающие в ответ на альтерацию [5]. Это можно объяснить тем, что ответная реакция организма на повреждение осуществляется с помощью саморегулирующейся системы со стереотипной динамикой, принципиально не зависящей от повреждающего фактора, хотя он и определяет некоторое своеобразие реакции. При этом следует заметить, что полная регенерации кожи крысы в ответ на механическое повреждение заканчивается на 15 сутки [6], тогда как при введении НЧ процесс длится 45 суток. Очевидно, что увеличение продолжительности течения воспалительного и регенерационного процесса вызвано специфическим воздействием НЧ. Механизм этого воздействия, возможно, объясняется незавершенным фагоцитозом, вторичной альтерацией и созреванием «матриксформирующих» макрофагов с выраженной секреторной активностью. Как известно, при регенерации тканей, индуцированной биоматериалами, в межклеточных и стромально-клеточных взаимодействиях основную регулирующую роль играют макрофаги. Характер течения воспалительного процесса и последующих за ним процессов регенерации или дисрегенерации в соединительной ткани определяет разная выраженность макрофагальной стадии [7]. Введение НЧ серебра вызывает активацию только первичного звена иммунитета – макрофагов. При этом создаются условия для полного созревания разных субпопуляций макрофагов, в том числе и «матриксформирующих», отличающихся выраженной секреторной активностью и экзоцитозом. Являясь главным фактором, влияющим на процессы синтеза коллагена фибробластами и структурного оформления регенерата, макрофаги оказывают регуляторное влияние на

формирование структурно адекватного регенерата. Эта гипотеза подтверждается тем, что в нашем эксперименте при введении НЧ фиброархитектоника кожи сначала нарушается, а затем полностью восстанавливается, что соответствует данным литературы и подтверждает положительное влияние НЧ серебра на неоколлагеногенез [8].

#### **Выводы**

1. При введении наночастиц серебра в кожу возникает комплекс реактивных изменений. Процесс характеризуется фазностью. Сразу после введения наступает фаза воспаления, которая сменяется фазой регенерационного гистогенеза с формированием грануляционной ткани, и завершает процесс фаза адаптивной перестройки.

2. В результате введения в камбиальном слое эпидермиса отмечается явления паракератоза, а затем вакуольной дистрофии. Регенерация осуще-

ствляется за счет пролиферации клеток эпителия наружных волосяных влагалищ.

3. В очаге отмечается нарушение фиброархитектоники. Структура и ориентация волокон восстанавливается на 45 сутки.

4. Основные закономерные процессы регенерационного гистогенеза и адаптивной перестройки тканей проявляются в месте введения и не затрагивают интактные зоны.

5. Морфофункциональной основой изменений являются закономерные процессы нормального гистогенеза

#### **Перспективы дальнейших разработок**

В дальнейшем планируется изучение морфометрических особенностей структурной организации клеток кожи в различные сроки экспериментального воздействия.

### **Литературные источники**

#### **References**

1. Chekman IS., Gorchakova NO., Nagorna OO., Nagorna TI. [Nanoparticles: introduction into medical practice]. *Journal of Pharmacology and Pharmacy*. 2010;(10):2-11. Ukrainian.

2. Martínez-Gutiérrez F1, Thi EP, Silverman JM, de Oliveira CC, Svensson SL, VandenHoek A, Sánchez EM, Reiner NE, Gaynor EC, Pryzdial EL, Conway EM, Orrantia E, Ruiz F, Av-Gay Y, Bach H. Antibacterial activity, inflammatory response, coagulation and cytotoxicity effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine*. 2012 Apr;8(3):328-36. doi: 10.1016/j.nano.2011.06.014. Cited in: PubMed; PMID: 21718674/

3. Gotsulskyi VYa, Chechko VE, Zaremba VG. [Correlometer for random pulse signals]. *Pribery i Tekhnika Eksperimenta*. 1997;(2):161-2. Russian

4. Sarkisov DS, Perov Yu L, editors. [Microscopic technique: manual]. Moscow: Meditsina; 1996. 544 p.

Russian.

5. Klishov AA. [Histogenesis and tissue regeneration]. Leningrad: Meditsina; 1984. 232 p. Russian

6. Miadelets OD, Adaskevich VP. [Morphofunctional dermatology]. Moscow: Meditsinskai literatura; 2006. 735 p. Russian

7. Musina LA, Muslumov SA, Lebedev AI, Zykov OV. [The role of macrophages in the regeneration of connective tissue when biomaterials implanted]. *Actual issues of pathology: Healthcare of Bashkortostan*. 2004; (4): 146-9. Russian.

8. Kwan KH, Liu X, To MK, Yeung KW, Ho CM, Wong KK. Modulation of collagen alignment by silver nanoparticles results in better mechanical properties in wound healing. *Nanomedicine*. 2011 Aug;7(4):497-504. doi: 10.1016/j.nano.2011.01.003. Cited in: PubMed; 21272666.

### **Сирма О.І., Скобєєва Т.М., Ульянов В.О. Морфологічні зміни шкіри при введенні наночастинок срібла.**

**Реферат.** Мета роботи полягала у визначенні морфофункціональних змін тканин шкіри, які розвиваються при інтрадермальній ін'єкції наночастинок срібла. Використовувалися наночастинок срібла сферичної форми розміром 30 нм, синтезовані цитратним методом. Експеримент проводився на 140 щурах лінії Вістар. Після підшкірного введення 0,01 мл розчину наночастинок срібла ефект оцінювався на 1, 3, 7, 14, 21, 30, 45 добу. Використовувалися стандартні гістологічні методики. Показано, що при введенні наночастинок срібла в шкірі виникає комплекс реактивних змін, що характеризується фазністю. Морфофункціональною основою змін є закономірності процесів нормального гистогенеза, які проявляються в місці введення і не зачіпають інтактні зони.

**Ключові слова:** наночастинок срібла, шкіра, гистогенез.