

УДК 615.281:577.1, 616.71, 611.018.4:616-003.9-07-085:546/.57-022.513.2
УКПП
№ держреєстрації № 0121U100471
Інв. №

Міністерство освіти і науки України
Сумський державний університет (СумДУ)
40007, м. Суми, вул. Римського-Корсакова, 2
тел. (0542) 33-35-39 факс. (0542) 33-40-58
e-mail: info@sci.sumdu.edu.ua

ЗАТВЕРДЖУЮ
Проректор з наукової роботи
д-р фіз.-мат. наук, професор
_____ А.М. Черноус

ЗВІТ
ПРО НАУКОВО-ДОСЛІДНУ РОБОТУ

Стан мінералізованих тканин при застосуванні нових композитів з
наночастинками Ag^+ та Cu^{2+}

**СИНТЕЗ ТА ОЦІНКА КОМПОЗИТНОГО МАТЕРІАЛУ
З НАНОЧАСТИНКАМИ
(проміжний)**

Науковий керівник
доц., д.мед наук.

Р.А. Москаленко

2021

Рукопис закінчено 25 грудня 2021 р.

Результати роботи розглянуто науковою радою СумДУ, протокол від 23 грудня 2021 р.№7

СПИСОК АВТОРІВ

Керівник НДР, гол. наук. співроб., д.мед. наук	<hr/> (17.12.2020)	Р.А. Москаленко (реферат, вступ, висновки, розділи 1, 2, 3)
Відповідальний виконавець наук.співроб.	<hr/> (17.12.2020)	Є.В. Гусак (розділи 1, 2, 3)
Ст. наук співроб., к.мед.наук	<hr/> (17.12.2020)	Ю.В. Москаленко (розділ 1, 2, 3)
Мол.наук. співроб.	<hr/> (17.12.2020)	О.О. Коломієць (розділ 3)
Молодший наук. співроб.	<hr/> (17.12.2020)	Ю.М. Шабельник
Мол. наук співроб.	<hr/> (17.12.2020)	В.В. Буранич
Лаборант	<hr/> (17.12.2020)	Н.В. Казбан
Лаборант	<hr/> (17.12.2020)	Р.А. Чижма (розділ 2)
Лаборант	<hr/> (17.12.2020)	А.П. Денисенко (розділ 1)
Лаборант	<hr/> (17.12.2020)	А.П. Николенко (розділ 1)

РЕФЕРАТ

Звіт про НДР: 46 с., 11 рис., 54 джерела.

АОРТА, ГІСТОЛОГІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ, КІСТКОВА СИСТЕМА,
МІДЬ, МІНЕРАЛІЗОВАНІ ТКАНИНИ, НАНОЧАСТИНКИ, СРІБЛО

Об'єкт дослідження – мінералізовані тканини.

Предмет досліджень – зміни метаболізму мінералізованих тканин при використанні остеопластичних матеріалів з структурно-інтегрованими наночасточками срібла та міді.

Мета роботи – визначити особливості метаболізму мінералізованих тканин при використанні остеопластичних матеріалів з наночасточками міді та срібла.

Для досягнення поставленої мети були визначені такі завдання:

- Синтез наночасточок металів (Cu, Ag), в тому числі з використанням технології «зеленого синтезу» та вивчення їх фізико-хімічних характеристик (розміри, форма, розчинність, агрегація);
- Структурування остеопластичних матеріалів на основі кальцій-фосфатів новими наночасточками;

Методи дослідження - аналіз закордонних та вітчизняних джерел щодо складу наночастинок та властивостей іонів-ефекторів, гістологічне та гістохімічне дослідження (забарвлення гематоксилином та еозином), сканувальна електронна мікроскопія з мікроаналізом, рентгенівська дифракція мінералізованих тканин в нормі та патології. Також застосовані методи «green chemistry» з метою отримання безпечного продукту та зменшення хімічних відходів при проведенні синтезу. математичні методи.

ЗМІСТ

ВСТУП.....	5
1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ ТА АНАЛІЗ ПРОБЛЕМ ЗАСТОСУВАННЯ СРІБЛА В МЕДИЦИНІ	7
1.1 Сучасні уявлення про наночастинки срібла та їх застосування.....	7
1.2 Ревелантна інформація про токсичність іонів срібла для людини ..	9
2 СИНТЕЗ, ДОСЛІДЖЕННЯ ОСОБЛИВОСТЕЙ ФІЗИКО-ХІМІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ НАНОЧАСТИНОК СРІБЛА ТА КІНЕТИКИ ВИХОДУ ІОНІВ	12
2.1 Поліольний метод отримання наночастинок срібла та визначення їх фізико-хімічних властивостей	12
2.2 Кінетика виходу іонів срібла з наночастинок та вплив ультразвуку на них	13
3 МОРФОЛОГІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ МІНЕРАЛІЗОВАНИХ ТКАНИН ..	20
3.1 Морфологічне дослідження тканини мінералізованої аорти за умов атеросклерозу	20
4 УЗАГАЛЬНЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ.....	35
ВИСНОВКИ.....	39
ПЕРЕЛІК ДЖЕРЕЛ ПОСИЛАННЯ.....	41

ВСТУП

Остеопластичні матеріали широко використовуються для лікування дефектів кісткової тканини після трав, пухлинних процесів тощо. У зв'язку з особливостями будови кісткової тканини кальцій-фосфатні композитні матеріали є найбільш уживаними та демонструють високу ефективність. Також сьогодні відбувається зростання числа інфекційних ускладнень після операції, що обумовлене ростом антибіотико-резистентних штамів мікроорганізмів. Комбінації остеопластичних матеріалів з антибіотиками не продемонстрували клінічних переваг, що викликає необхідність розробки альтернативної стратегії. В той же час, наночастинки металів показали високу ефективність відносно полірезистентних штамів мікроорганізмів, проте їх безпечне застосування все ще знаходиться під питанням. Доведена відсутність цитотоксичності на модельних системах клітин для деяких наночастинок міді та срібла, проте реакція кісткової тканини на їх використання не до кінця вивчена. Результати дослідження вперше продемонструють зміни мінералізованих тканин при використанні різних концентрацій наночастинок срібла та міді з остеопластичним кальцій-фосфатним матеріалом, буде визначена межа їх безпеки та надані рекомендації щодо клінічного дослідження.

Оскільки у травматології та ортопедії існує проблема інфекційних ускладнень та відторгнення остеоімплантів та ендопротезів, то детальне дослідження фундаментальних основ процесів ремінералізації та репарації кісткової тканини, її взаємодії з чужорідною речовиною у вигляді імпланту чи ендопротезу є надзвичайно актуальним і затребуваним продуктом для практичної медицини. Зростання тривалості життя та загальне старіння людської популяції є надзвичайно актуальною проблемою системи охорони здоров'я у всьому світі. Обумовлені віком переломи кісток, значна кількість складних травматичних уражень опорно-кісткового апарату внаслідок військових травм у людей молодого і зрілого віку – особливо актуально для

нашої України, знижує якість життя великої кількості людей і приносить значні соціально-економічні втрати для держави. Це обумовлює швидке зростання потреби в ендопротезуванні, остеоімплантах та спеціальних цементних сумішах для потреб ортопедії. Наявність численної супутньої патології (остеоартроз, цукровий діабет, ревматоїдний артрит, тощо) спричинює значну кількість запальних ускладнень, знижує і навіть нівелює ефективність лікування.

Проблемою світового рівня є розвиток механізмів стійкості до антибіотиків патогенними мікроорганізмами. Механізми полірезистентності, зумовлені декількома ферментативними та генетичними мутації патогенів, закликав дослідників розробити нові протимікробні засоби. Наночастинки металу - ефективний спосіб контролю багато патогенних та стійких до антибіотиків мікроорганізмів. Дослідження стану мінералізованих тканин при застосуванні нових композитів з наночастинками Ag^+ та Cu_2 дозволить створити новітні остеопластичні матеріали для оптимізації лікування захворювань і складних травм опорно-рухового апарату організму людини.

1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ ТА АНАЛІЗ ПРОБЛЕМ ЗАСТОСУВАННЯ СРІБЛА В МЕДИЦИНІ

1.1 Сучасні уявлення про наночастинки срібла та їх застосування

Сполуки срібла та міді мають історію використання довжиною в кілька тисячоліть, але їх застосування у вигляді наночастинок (НЧ) є новим розділом у лікуванні бактеріальних інфекцій та послідуєчого запалення. Наприклад, про застосування срібла відомо з часів Гіппократа [1]. Ще з позаминулого століття срібло у вигляді порошку, солей (хлорид, нітрат), оксидів застосовувалося для боротьби з бактеріальною інфекцією [2]. Застосування срібла у вигляді колоїдного розчину було навіть схвалено Управлінням з контролю за продуктами та ліками в США ще в 1920-х роках. Все припинилося з впровадженням у медичну практику перших антибіотиків [3].

НЧ срібла та міді мають ряд гіпотетичних механізмів антибактеріальної дії [4, 5]:

- 1) зміна проникності та пошкодження мембрани і лізис мембрани;
- 2) порушення клітинної стінки;
- 3) руйнування пептидоглікану;
- 4) цитоплазматичний витік;
- 5) переривання ланцюга транспорту електронів; 6) окислювальний стрес;
- 7) деградація ДНК - перешкода реплікації;
- 8) білкова денатурація;
- 9) інактивація ферментів;
- 10) мітохондріальна дисфункція;
- 11) деструкція рибосоми з інгібуванням синтезу білка.

Головною проблемою застосування НЧ металів є їх стійкість не тільки у організмі, але і навколишньому середовищі. Діючі речовини НЧ не біодеградують, можуть накопичуватися, що веде до ризику ушкодження багатьох органів і тканин. Таким чином, незважаючи на позитивний результат,

існує ряд застережних повідомлень, які показують потенційну цитотоксичність та пригнічення остеоінтеграції.

Шляхом до зменшення або нівелювання токсичності є виважений підбір концентрації, розміру, форми та фізико-хімічних властивостей НЧ.

Зміни метаболізму мінералізованих тканин у віддалені терміни після клінічного застосування срібло-вмісних остеопластичних матеріалів досліджені недостатньо. До того ж, ще не була проведена оцінка змін у регенератах кісток після їх експериментальної аплікації.

Відновлення широкого інтересу до препаратів металів було інспіровано ростом резистентності мікроорганізмів до найпоширеніших антибіотиків та достатнім прогресом у нанотехнологій взагалі та конкретно синтезі та дослідженні властивостей різних НЧ [6].

Перевагами НЧ над іншими лікувальними засобами є велике співвідношення активної поверхні/площі, що веде до збільшення хімічного потенціалу і високої проникаючої здатності та адсорбційної активності [7]. Фізико-хімічні властивості НЧ ведуть до широкої взаємодії іонів срібла з мікроорганізмами, компактна форма НЧ дозволяє реалізувати іони металів у тканинах та органах, які були раніше недоступні для інших лікувальних засобів і форм [8].

Існує залежність між протимікробною ефективністю та фізичними параметрами НЧ: чим менший розмір, тим більша ефективність, так як дрібніші НЧ мають більшу активну площу поверхні, що веде до кращого прямого контакту з мікробами [9]. Цікаво, що НЧ виявляють ефект не тільки проти бактерій чи грибів, але і вірусів [4].

НЧ міді та срібла уже застосовуються у виготовленні ортопедичних покриттів, попередні результати показують їх здатність боротися з нозокоміальною інфекцією. Непрямо цей факт отримав підтвердження у дослідженні, де проводилося порівняння впливу НЧ металів на Грам- та Грам+ бактерії. Останні є більш стійкими до НЧ металів завдяки особливостям будови клітинної стінки. Це пояснюється тим, що клітинна стінка Грам+

бактерій негативно заряджена завдяки більшій кількості муреїну та пептидоглікану. Це призводить до абсорбції катіонів срібла (або іншого позитивно-зарядженого металу у складі НЧ) і попередженню їх проникненню у клітину бактерії [10].

Як і слід було очікувати, протимікробна активність НЧ срібла покращується при зростанні концентрації їх розчину та експозиції на мікроорганізм [8, 9]. Проте важливим засобом захисту бактерій від різних лікарських засобів є утворення біоплівки. Тому висока ефективність НЧ металів також обумовлена перешкоджанням утворення біоплівки [11].

Як уже було згадано вище, НЧ мають протигрибкову активність [4]. Фунгіцидна активність НЧ срібла та інших металів спостерігається *Cladosporium cladosporioides*, *Aspergillus niger*, *Fusarium spp.*, *Aspergillus spp.* та *Alternaria Alternata* [12].

Цікаві дані були отримані при одночасному застосуванні НЧ та екстракту евкаліпта. Препарати посилювали антимікробну дію один одного при впливі на культуру бактерій *E. coli* [13]. Синергічний ефект застосування срібла у вигляді НЧ та антибіотичних засобів пеніцилінового ряду був доведений для грампозитивних та грамнегативних бактерій [14].

Огляд літературних джерел представляє НЧ металів як перспективний інноваційний протимікробний засіб. Проте є певні застереження щодо їх застосування в медицині з-за необхідності оцінки можливої токсичності НЧ таких металів як срібло і мідь.

1.2 Ревелантна інформація про токсичність іонів срібла для людини

Несприятливий вплив іонів металів, у даному випадку срібла, зумовлюється прямим дозозалежним ефектом (чим більше іонів, тим сильніше інтоксикація), а також уразливістю таргетних органів та тканин [15]. Токсикологічні дослідження свідчать, що основним механізмом впливу іонів металів *in vivo* є конкуренція за місце кофермента у ряді численних

ензимів. [16]. Основними шляхами потрапляння іонів аргентуму в організм є шкіра (контактний спосіб), дихальні шляхи та парентеральний шлях [15].

Токсикологічні дослідження виявили, що черезшкірний шлях поступлення срібла в організм самостійного клінічного значення немає з-за високих бар'єрних властивостей шкірних покривів людини [17]. Найбільш небезпечний шлях поступання аргентуму в людський організм є дихальні шляхи. Це найчастіше трапляється на промисловому виробництві [18].

Найбільш небезпечний вид експозиції відбувається у формі оксидів чи нітратів срібла у вигляді пилових осаджень. Незважаючи на хімічну інертність солей срібла сірчастої та селенової кислоти, вони можуть викликати ураження органу зору та шкірних покривів [19]. У групі ризику знаходяться робітники, які тривалий час працюють на шкідливому щодо ризику аргірії, виробництві. У дослідженні, в якому визначали рівень аргентуму у сироватці крові працівників, що мали відповідну виробничу шкідливість, було виявлено кількість срібла у проміжках від 0,1 до 23,0 мкг/л [20]. В іншому дослідженні було виявлено, що у групі добровольців-робітників (37 чоловік), які мали виробничу шкідливість у плавильному цеху, середні концентрації срібла в крові становили 11 мкг/л [21].

В той же час, регулярне застосування препаратів металевого аргентуму у косметології та дерматології призводить лише до незначного накопичення іонів срібла в сироватці крові та шкірних покривах. Так, перкутанна абсорбція срібла у організм guinea pig впродовж 5 годин становила 1% [22].

Основним шляхом виділення сполук срібла з організму і тканин людини є десквамація епітелію та відторгнення відмерлих тканин, що було показано у експерименті [23]. Цікаво, що срібло у відновленому стані (Ag_0) безпечно для організму людини, оскільки не вступає у реакції. Однак в умовах вологості, у біологічних рідинах та виділеннях організму відбувається його іонізація. Іони аргентуму виявляють значний афінитет до сульфгідрильних груп та інших аніонних лігандів білків [24].

На сторожі гомеостазу крові стоять спеціальні білки металотіоніни (I та II типів), які ефективно нейтралізують незначні концентрації іонів аргентуму. Саме від їх кількості, а також зв'язувальної здатності альбумінів та макроглобулінів, залежить т.з. буферна ємність сироватки крові для іонів срібла [1]. Загалом у організмі людини може міститися до 1 мг срібла, а його рівень у крові пересічної людини може становити до 10 мкг/л [25].

Висновки до першого розділу

Огляд літературних джерел представляє НЧ металів як перспективний інноваційний протимікробний засіб. Проте є певні застереження щодо їх застосування в медицині з-за необхідності оцінки можливої токсичності НЧ таких металів як срібло і мідь.

Загалом, фізіологічна роль срібла в організмі не встановлена і його вміст в людських тканинах дуже низький. Токсичність срібла не висока і проявляється в основному за умов інгаляційного або парентерального введення в організм. Також токсичність залежить від розчинності сполуки, до складу якої входять іони срібла та буферних властивостей індивідуального організму.

2 СИНТЕЗ, ДОСЛІДЖЕННЯ ОСОБЛИВОСТЕЙ ФІЗИКО-ХІМІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ НАНОЧАСТИНОК СРІБЛА ТА КІНЕТИКИ ВИХОДУ ІОНІВ

2.1. Поліольний метод отримання наночастинок срібла

Спосіб синтезу наночастинок срібла був розроблений на базі модифікованого поліольного методу [26]. Послідовність дій викладена у протоколі синтезу наночастинок срібла. Всі вихідні реагенти повинні бути високої чистоти (не нижче рівня «чисті для аналізу»).

Протокол синтезу наночастинок срібла

1. Співвідношення вихідних реагентів наступне: на 10 мл етиленгліколю приходиться 1,5 г полівінілпірролідону (ПВП). Зазначену суміш нагрівають на олійній бані до температури 160°C, поки розчин не стане світло-жовтим.

2. Паралельно готується інший розчин зі наступним співвідношенням: 10 мл етиленгліколю відповідають 0,17 г нітрату срібла. Отриманий розчин повільно, по краплях додається у нагрітий розчин ПВП в етиленгліколі (отриманий на попередньому етапі). Отриману суміш тримають при температурі 160°C впродовж 4 годин за умов перемішування.

3. Розчин срібла і ПВП у етиленгліколі поступово охолоджували до кімнатної температури та змішували з ацетоном у кількості, яка дозволяла випасти преципітату бурого кольору.

4. Бурий осад, який утворився, центрифугували при 8000 об/хв впродовж 30 хвилин.

5. Центрифугат промивали у чистому ацетоні тричі.

6. Утворені НЧ срібла висушували впродовж 5 год у вакуумній сушці при температурі 40°C.

7. Потім НЧ срібла розчиняли у бідистильованій воді та обробляли в ультразвуковій ванні (УЗДН-А, «СЕЛМІ», Україна) з частотою $22 \pm 1,65$ кГц впродовж 1 хв.

8. Отриманий колоїд срібла фільтрували за допомогою мембрани зворотного осмосу (Osmotec M300-O) з тиском у діапазоні від 2,8 до 3 бар до отримання концентрації срібла 3 г/л.

2.2 Кінетика виходу іонів срібла з наночастинок та вплив ультразвуку на них

Вивільнення іонів залежить від різних факторів, таких як розмір наночастинок, стабілізація агентів і форма. Кінетика вивільнення іонів недостатньо добре описана і вимагала більш детального дослідження.

Є деякі дані, що вказують на залежність антимікробного впливу наночастинок на різні фактори (розмір, форму, склад середовища) та на здатність до утворення активних Ag^+ іонів у розчині [26]. Але, складно розрізнити частку AgNPs від Ag^+ через їх спільну присутність. Деякі автори [27] продемонстрували токсичність Ag^+ іонів порівняно з комерційно доступним AgNP ($35,4 \pm 5,1$ нм, покриті аморфним вуглецем). Це дослідження показало, що в анаеробних умовах AgNPs були в 20 разів менш токсичний для *E.coli*, ніж Ag^+ іони (EC_{50} : $2,04 \pm 0,07$ проти $0,10 \pm 0,01$ мг/л), однак токсичність AgNP зростає 2,3 рази після дії на повітрі протягом 0,5 год (EC_{50} : $0,87 \pm 0,03$ мг / L), що сприяло вивільненню Ag (+). Інші дослідження [28] демонструють, що мінімальна інгібуюча концентрація (МІК) і мінімальна бактерицидна концентрація (МБК) для AgNP є $1,406\text{--}5,625$ мкг/мл і $2,813\text{--}5,625$ мкг/мл для Ag (+), відповідно.

Стабільність наночастинок срібла забезпечується не тільки поліольними компонентами дисперсійного середовища, а також за досить високим вмістом AgNP в комерційних розчинах - від 3 до 5 г/л наночастинок. Такі розчини повинні бути перед використанням розведені водою і лише потім використані як антимікробний розчин. Однак при розведенні AgNP, а також під час їх подальшого зберігання, можливі процеси агрегації наночастинок та зміни структури дифузійного шару колоїда [29]. Процеси, пов'язані з укрупненням

наночастинок можуть призвести до зміни вмісту іонів срібла розчину і до зниження антибактеріального ефекту. Метою роботи було вивчення стабільності розведеного розчину наночастинок срібла при зберіганні, а також кінетика виділення іонів срібла.

А. Синтез і характеристика матеріалу

Початковий AgNP, виготовлений, як описано вище у протоколі. Реакцію проводили при інтенсивному перемішуванні протягом 4 годин. На наступному кроці отриманий колоїд срібла фільтрували за допомогою мембрани зворотного осмосу (Osmotec M300-O) з тиском у діапазоні від 2,8 до 3 бар до отримання концентрації срібла 3 г/л. Наночастинки використовували без додаткового очищення. Морфологію та хімічні закономірності НЧ оцінено в SEM (JOEL JSM-7800F) оснащеним рентгенівським енергетичним диспергатором та спектроскопічним (EDX) аналізатором.

Б. Вивільнення іонів срібла

Для приготування розчину наночастинок використовували вихідний розчин розведений дистильованою водою до 60 мкг/мл. Його досліджували протягом 7 днів для визначення вивільнення іонів срібла у розчин. Для цього 10 мл розчину що містить 60 мкг/мл AgNPs центрифугували зі швидкістю 8000 об/хв. протягом 10 хв. Вміст іонів срібла визначали в фільтраті. Щоб оцінити вплив ультразвуку на виділення срібла, перед цим розчин витримували 30 хв в ультразвуковій ванні центрифугування. Рисунок 1 демонструє, що наночастинки після центрифугування осідають на дно; отже, над осадом містяться переважно іони срібла.

Визначення іонів срібла в розчинах проводили за методом атомно-абсорбційної спектроскопії за допомогою С-115 М1 спектрофотометра. Параметри аналізу були такими: лампа з порожнистим катодом для срібла з довжиною хвилі 328,1 нм. Для розпилення використовували окисне полум'я та використовувалася суміш газів пропан-бутан-повітря.

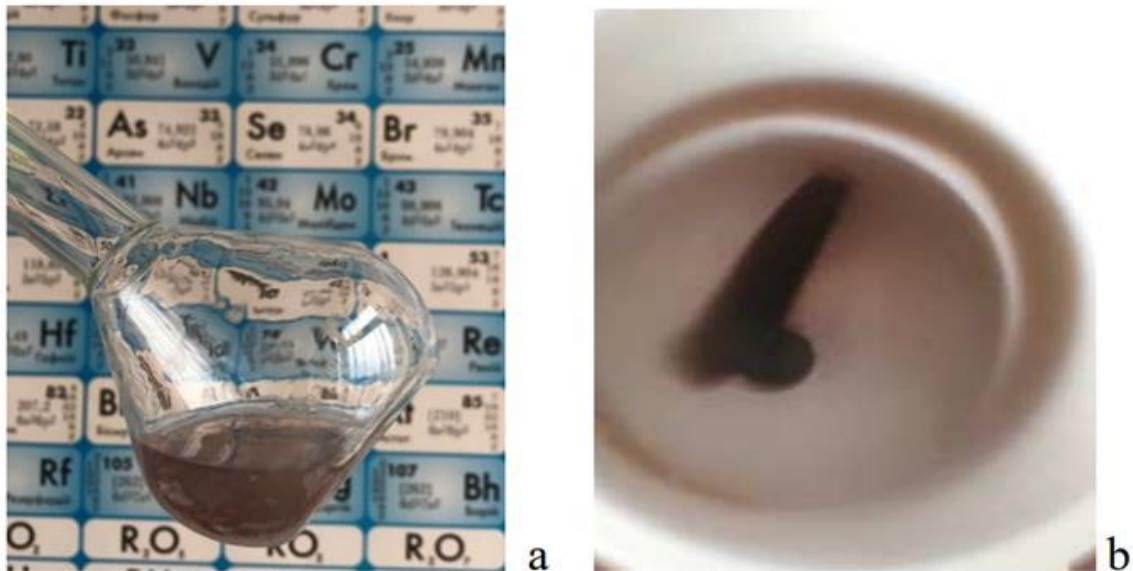


Рисунок 1 – Загальний вигляд робочого розчину наночастинок срібла і той же розчин після центрифугування: а) колоїдний розчин наночастинок срібла 60 мкг /мл; б) розчин після центрифугування (осад наночастинок срібла)

Вивчення виділення іонів срібла з наночастинок також була здійснена методом центрифугування. Після центрифугування робочого розчину наночастинок, верхня частина фільтрату була злита і досліджена на вміст іонів, а решту осаду наночастинок розбавляли водою до вихідного об'єму. Цю операцію повторювали 4 рази. Базовий розчин AgNP містив 4,5 г/л AgNP. При розведенні робочий приготований розчин з антимікробними властивостями, містить 90 мкг/мл наночастинок.

В. Характеристика AgNPs

Виготовлені наночастинок мають кубічну форму розміром від 80 нм до 800 нм. Менші наночастинок срібла з розмірами порядку кількох десятків нм і сферичної форми також може бути спостерігається на стінках куба (рис. 2). Спектри EDX (рис.2) показують наявність срібла. Атоми вуглецю, кисню і азоту походять з полівінілпіролідону (кінцева кришка). Наявність кристалів хлориду натрію обумовлені перетворенням гіпохлориту натрію в хлорид натрію під час синтезу. Сигнали хрому і заліза походять з диска із зразками під час вимірювання.

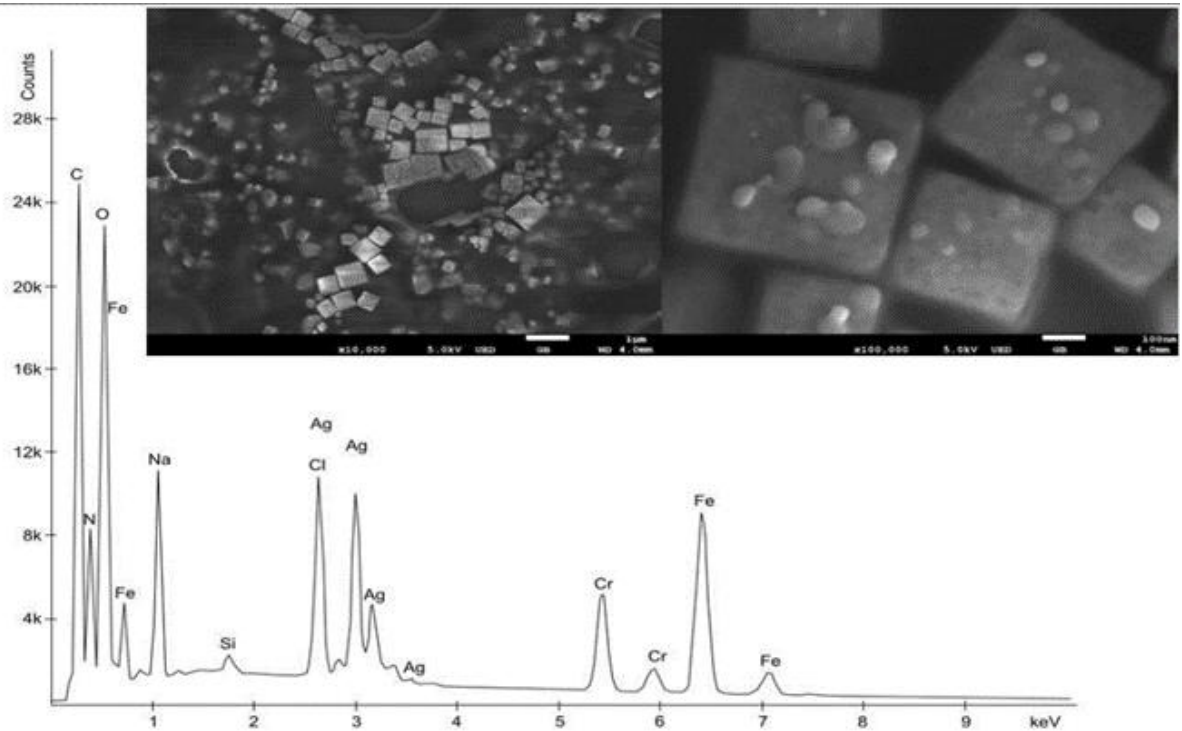


Рисунок 2 – EDX-спектри наночастинок срібла за допомогою скануючої електронної мікроскопії (вставка)

Г. Вивільнення іонів срібла

Результати виділення іонів срібла наведені в таблиці 1.

Таблиця 1 – Вихід іонів срібла у фільтрат після центрифугування розчину з наночастинками срібла

Зразок	Кількість наночастинок срібла в розчині мкг/мл	Час контакту, години	Ультразвуковий вплив, 30 хв	Кількість іонів срібла у фільтраті, мкг/мл
1	60	1	-	4.05
2	60	24	-	4.04
3	60	24	+	4.84
4	60	72	-	4.30
5	60	72	+	8.05
6	60	144	-	4.06
7	60	144	+	9.26

Вивільнення іонів срібла з наночастинок у розчин спостерігається як у перші години спостережень, так і після 7 днів (рис. 3).

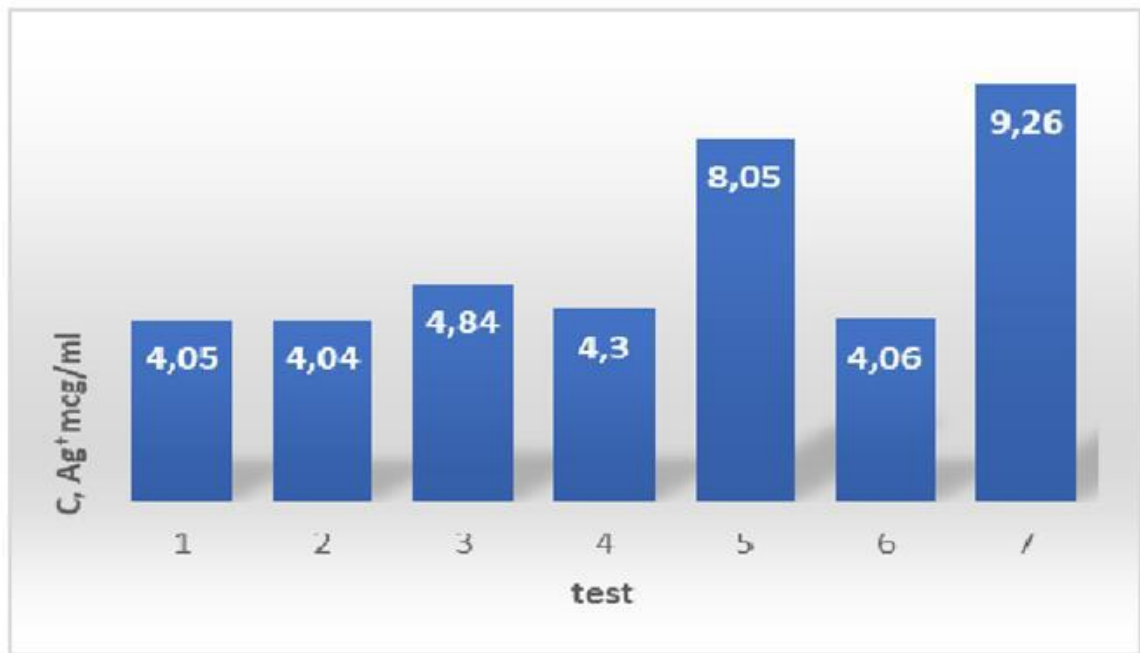


Рисунок 3 – Кількість іонів срібла мкг/мл у фільтраті після центрифугування

Спільна присутність іонів срібла і певної кількості наночастинок в розчині після центрифугування можливо. Слід зазначити, що швидкість вивільнення постійна протягом 7 днів експерименту. Ультразвукова обробка збільшує виділення іонів приблизно 2 рази на 5 і 7 дні (зразок 5 і 7). Ми можемо зробити висновок, що час зберігання робочого розчину з антимікробними властивостями істотно не впливає на вміст іонів у розчині. В результаті послідовних операцій центрифугування - збір фільтрату і подальшого розведення до початкового об'єму (50 мл), результати представлені в таблиці 2 і на рис. 4

Дослідження виділення іонів срібла з розчину демонструють, що вивільнення Ag^+ від наночастинок виникає постійно. Під час обстеження того ж розчину наночастинок, кількість виявлених іонів срібла після центрифугування злегка зменшується з кожним наступним зразком, на 0,7-1,1 мкг/мл, що дає можливість передбачити пролонговану дію наночастинок у

порівнянні з дією іонів срібла, отриманих з розчинів солей. Після попередньої обробки розчин, що містить наночастинки в ультразвуковій ванні виділення іонів срібла в розчин дещо збільшується (зразки 3, 5, 7 – табл. 1).

Таблиця 2 – Кінетика виходу іонів срібла у фільтрат після послідовного центрифугування того ж перехідного розчину наночастинок срібла

Зразок	Кількість наночастинок срібла в розчині мкг\мл	Час контакту, години	Кількість іонів срібла у фільтраті, мкг/мл	Перерахунок до початкової концентрації (90 мкг/мл)
1	90	0	22.37	22.4
2	85	10	17.76	21.3
3	82	20	15.13	20.4
4	79	30	8.46	19.6

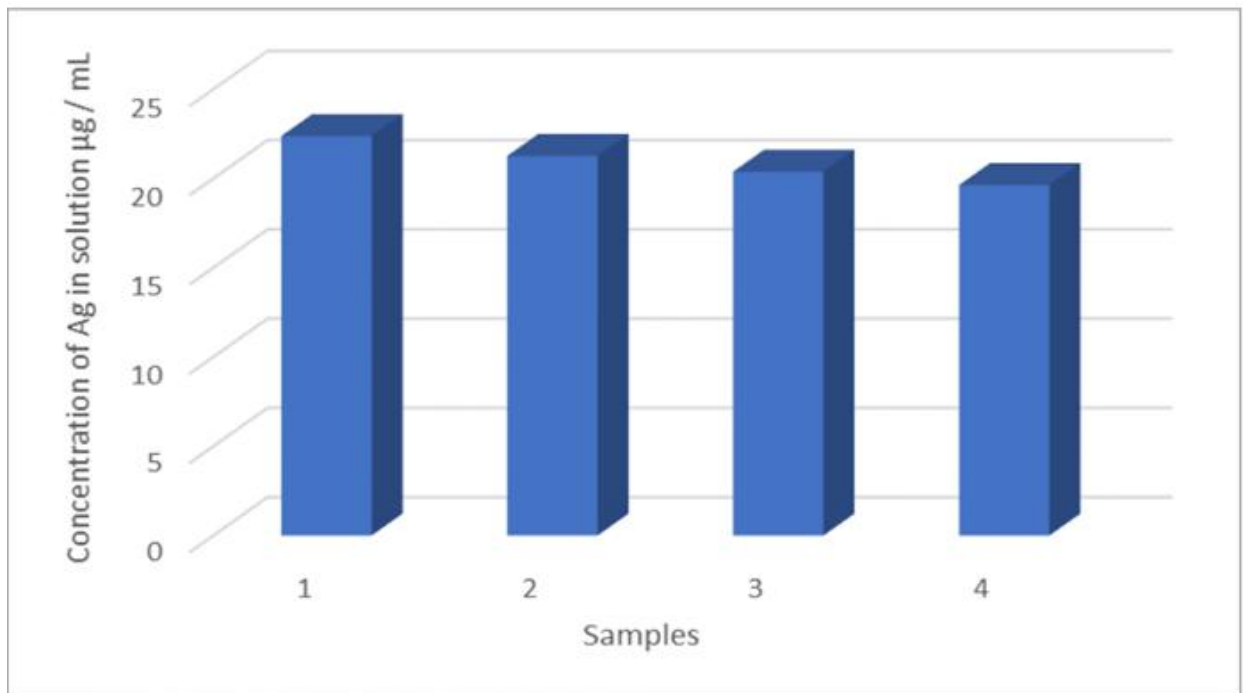


Рисунок 4 – Поетапне виділення іонів срібла мкг/мл у фільтрат після центрифугування того ж розчину наночастинок срібла

Як описано раніше, наночастинки можуть забезпечити антибактеріальний ефект завдяки прямій взаємодії з бактеріальною стінкою [30]. Цей механізм може бути реалізований для розробки

антибактеріальної поверхні для стоматологічних і ортопедичних імплантів, а також для медичних антибактеріальних поверхонь. У наших попередніх дослідженнях ми продемонстрували високий рівень ефективності покриттів, що містять AgNPs, проти різних бактерій, а також чудову біосумісність [31]. Пригнічення бактерій, що супроводжується високою біосумісністю через низький контакт з еукаріотичними клітинами, що продемонстровано в численних дослідженнях [32, 33]. Навпаки, вивільнення іонів срібла може забезпечити більш цільову антибактеріальну активність далеко від розміщення і може використовуватися для лікування інфікованих ран [34, 35]. При цьому іони можуть забезпечити значущу клітинну токсичність, що обмежувала їх застосування в клініці через надмірне вивільнення з НЧ [35]. У нашому дослідженні ми продемонстрували повільне, але постійне вивільнення іонів срібла з НЧ які можуть контролювати токсичність.

Наночастинки Ag, виготовлені в УФ-реакторі, мають кубічну форму розміром від 80 до 800 нм із залишками Cl і Na. Інкубація AgNP демонструє повільне вивільнення Ag⁺ що не перевищує 5 мкг/мл за 24 години. Обробка ультразвуком збільшує вивільнення іонів, які можна використовувати в комбінованому лікуванні інфікованих ран.

3 МОРФОЛОГІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ТКАНИНИ МІНЕРАЛІЗОВАНИХ ТКАНИН

3.1 Морфологічне дослідження тканини мінералізованої аорти за умов атеросклерозу

Ектопічна кальцифікація або патологічна біомінералізація судин має сильний позитивний зв'язок з захворюваністю та смертністю від серцево-судинних захворювань [37]. У великих судинах еластичного і м'язово-еластичного типу ектопічна кальцифікація локалізується у середній оболонці (*tunica media*) та внутрішній оболонці (*intima*). Кальцифікація середньої оболонки (за типом *Mönckeberg's arteriosclerosis*) ніколи не досягає внутрішньої оболонки, частіше спостерігається у пацієнтів похилого віку, як правило тих, які мають цукровий діабет та/або хронічні захворювання нирок [38]. Патологічна біомінералізація інтими у переважній більшості випадків є проявом кальцифікації бляшок при атеросклерозі артеріальних судин (атеросклерозний тип). Біомеханічні властивості тканини аорти прямо залежить від наявності кальцифікатів у м'яких тканинах аорти. Втрата біомеханічної злагодженості тканини серцево-судинної системи призводить до гострих або хронічних несприятливих ускладнень, таких як порушення цілісності та деформації стінок судин і серця, клапанного апарату, інфарктів [39]. За даними ряду робіт можна виділити два типи кардіоваскулярної біомінералізації: мікро- і макрокальцифікація [40]. Мікро- та макрокальцифікація у людській атеросклеротичній аорті також описуються як сфероїдальна та масивна кальцифікація [41, 42, 43]. Хіміко-кристалічний склад мікро- (сфероїдальної) та макро (масивної) кальцифікації нині є предметом дискусії [41, 44]. Різниця у морфології та кристалохімічному складі макро- та мікрокальцифікатів аорти показує на їх різний механізм та умови росту та розвитку. Це може бути важливим для розуміння регуляції патологічної біомінералізації, що є багатообіцяючим підходом для зниження захворюваності і смертності від серцево-судинних хвороб.

Всього було досліджено матеріал з 60 секційних випадків, з них у 30 пацієнтів були прояви патологічної біомінералізації (група М) у м'яких тканинах стінки аорти та 30 контрольних зразків тканин аорти з ознаками атеросклерозу, але без відкладення біомінеральних депозитів (група С). Середній вік померлих з проявами біомінералізації аорти становив $62,53 \pm 2,01$ роки. При вивченні розподілу пацієнтів за статтю у групі з біомінералізацією аорти значущої (достовірної) різниці між віком померлих (чоловіки – $61,67 \pm 3,13$ року та жінки $63,4 \pm 2,62$ року), не спостерігалось ($p > 0,05$).

Група М1 характеризувалася значним потовщенням стінки судини, яка була ригідною, зберігала свою форму під час дослідження. На внутрішній поверхні аорти була присутня значна кількість жирових плям, смужок, фіброзних бляшок, в тому числі з ознаками їх виразкування. Окремі бляшки з ознаками ушкодження слугували місцем прикріплення пристінкових тромбів. Під час повздовжнього розтину аорти відмічалось відкладення біомінералізованого матеріалу у вигляді пластів різної товщини та розміру, що різалися зі значним зусиллям (рис. 5А). Більшість препаратів мали великі ділянки затверділої тканини, які часто зливалися між собою, утворюючи гладку сірувато-жовтувату поверхню інтими з численними мікротріщинами. Така тканина легко відділяється від інших шарів аорти у вигляді пластини. Інші зразки при візуальному обстеженні не мали явних ознак біомінералізації, проте розрізалися з характерним хрустом (звуком).

При макроскопічному дослідженні аорт М2 групи уражені сегменти судин були помірно потовщені, мали нерівний ландшафт інтими за рахунок атеросклеротичних бляшок розмірами від 0,2 до 1,0 см. Інтима мала жовтуватий або сіруватий колір з жовтими відтінками. На внутрішній поверхні судин відмічалися поодинокі дефекти у вигляді тріщин та розривів, що відповідали локалізації атеросклеротичних бляшок та мікроскопічних кальцифікатів (рис 5В).

У групі С середній вік пацієнтів складав $54,37 \pm 2,68$ років. Вони характеризувалися гладенькою неушкодженою внутрішньою оболонкою

переважно жовтуватого кольору з поодинокими підвищеннями поверхні світло-сірого кольору, не були потовщеними (рис. 5 С). Належність зразків тканини до кожної з груп підтверджувалася проведенням гістологічного дослідження.

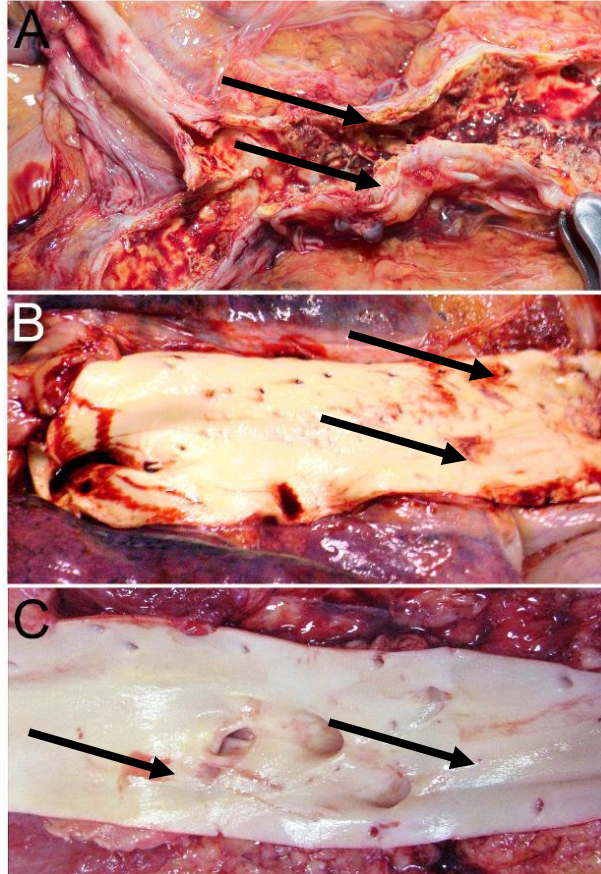


Рисунок 5 – Макроскопічне дослідження тканини аорти: А – тканина аорти з атеросклеротичними змінами та макроскопічними кальцифікатами (вказано стрілкою); В – тканина аорти з мікроскопічними кальцифікатами, атеросклеротичні бляшки вказані стрілками); С – тканина атеросклеротично зміненої аорти без патологічної біомінералізації з присутністю жовтих смужок та плям (вказано стрілкою).

Гістологічне дослідження

Гістологічне дослідження тканини аорти групи М1 виявило присутність у її внутрішньому шарі атеросклеротичних бляшок з формуванням детриту, сполучної тканини, масивних депозитів мінеральної речовини. Також відмічалася хронічна запальна інфільтрація у ділянці формування кальцифікатів у вигляді фіолетових або темно-синіх відкладень (рис.6А зі

вставкою). Переважним місцем локалізації біомінеральних агрегатів була внутрішня та середня оболонки аорти. При забарвленні препаратів аорти методом фон Косса помітно, що кальцифікати були ко-локалізовані із атеросклеротичними бляшками та їх вмістом, супроводжувалися вираженим навколишнім фіброзом, продовжувалися у стромальний каркас стінки судини (рис.6В зі вставкою). Ступінь виразності атеросклеротичного процесу в аорті варіює, але в її уражених компонентах виявляється потовщення фіброзного шару та еластичних волокон, вогнищеве відкладення ліпідів, холестеринові кісти, явища набряку. У ході виготовлення мікропрепаратів даної групи значна частина макрокальцифікатів була механічно пошкоджена (руйнація/пошкодження мікротомним ножом).

У зразках тканини аорти групи М2 визначалися явища фіброзу, відкладення ліпідів у внутрішній оболонці судини, була присутні помірна запальна інфільтрація та набряк, що переважно відповідали місцям локалізації атеросклеротичних вражень. Мінеральні депозити у стінці аорти виявлялися як правильні округлі, різні за розміром дрібні утворення у вигляді грудочок, сферолітів чи аморфної маси. Вони накопичувалися у вигляді «піщинок» між волокнами стінки аорти (рис. 6А). Застосування забарвлення тканини аорти методом фон Косса показало, що скупчення округлих (сфероїдальних) мінеральних частинок мікронних розмірів між еластичними волокнами стінки судини було поєднане з їх механічним розволокненням у стінці аорти (рис 6В).

Гістологічне дослідження тканини аорт контрольної групи С показало помірні зміни інтими. Вони полягали у наявності фібробластів та молодій сполучної тканини, накопиченні ксантомних клітин, помірній запальній інфільтрації. У медії та адвентиції аорти спостерігалися ознаки набряку тканин (рис.8А). При застосуванні забарвлення за фон Коссом у тканині аорти біомінеральні депозити не виявлялися (рис. 8В).

Імуногістохімічне дослідження

Імуногістохімічне дослідження зразків тканини аорт групи М1 антитілами проти ОПН показало помітну присутність цього білку у тканинах

судини (рис. 6С, дивись вставку). Найбільше накопичення білку спостерігається на самому кальцифікаті та в оточуючих тканинах. Серед клітин найбільше накопичення ОПН відбувається у макрофагах, судинних гладеньких міоцитах (СГМ) та фібробластах. Також спостерігався підвищений рівень фонового забарвлення хромогеном (ДАБ), очевидно пов'язаний з осіданням значної кількості дрібних кальцій-фосфатних фрагментів та уламків біомінеральних утворень на тканинах аорти в процесі імуногістохімічного дослідження.

Імуногістохімічне забарвлення аорти групи М2 антитілами проти остеопонтину виявило помірне накопичення цього білка на поверхні біомінеральних депозитів та у оточуючій їх тканині (рис. 7С). ОПН накопичувався у цитоплазмі макрофагів, СГМ, фібробластів та забарвлював волокна стінки аорти. Фонове забарвлення діамінобензидином знаходиться на низькому рівні.

Контрольна група С зразків аорти показує мінімальний рівень присутності ОПН у тканинах. Виявляються поодинокі ОПН-позитивні макрофаги та фібробласти (рис. 8С). Фонове забарвлення діамінобензидином відсутнє.

Сканувальна електронна мікроскопія та просвічуюча електронна мікроскопія

СЕМ дослідження зразків аорт групи М1 виявило присутність яскравих об'єктів біло-сірого кольору у вигляді брил та пластинок, що локалізувалися в межах стінки аорти (рис. 11D). Мінеральні депозити не мали виразних геометричних ознак та обрамляли нещільну область стінки аорти, у перерізі були від кількох десятків до сотні мікрометрів. Великі біомінеральні утворення мають ознаки руйнування та фрагментації, що виникають внаслідок пошкодження зразків при виготовленні мікротомних зрізів. Біомінеральна частина інкрустована в гістологічну структуру стінки аорти та тісно пов'язана зі сполучнотканинним компонентом судини.

ПЕМ показує наявність у стінці аорти варіабельних за розміром та формою мікроезерикул, які мають вигляд яскраво-світлих плям, мають тенденцію до злиття (рис. 6D)

При дослідженні зразків аорт групи M2 методом СЕМ більшість мікроскопічних кальцифікатів мали вигляд округлих грудок, дрібних порошкоподібних частинок чи піщинок, тобто мали сфероїдну форму (рис. 7D). Інші мікрокальцифікати у тканині аорти виглядали як дрібні мінеральні об'єкти у вигляді зірочок, кристалів або об'єктів неправильної форми, які глибоко інкорпоровалися у сполучнотканинний каркас. В окремих місцях локалізації сфероїдних мікрокальцифікатів та спостерігалось розшарування еластичних і сполучнотканинних волокон.

ПЕМ вказує на присутність множинних дрібних (до 2 мкм) мікроезерикул яскраво-світлого кольору, що розташовані дискретно.

Скануюча електронна мікроскопія та ПЕМ зразків стінки аорт контрольної групи ознак відкладення біомінералів не виявила (рис. 8D, I, J, K, L).

Рентгенівський мікроаналіз кальцифікатів

За даними СЕМ можна виділити два відмінні морфологічні типи мінеральних депозитів аорти: тип 1 - «скам'яніла бахрома/fringe», що обрамляє нещільну (пустотну/порожнисту) ділянку стінки аорти (рис.6E), характерний для групи M1; і тип 2 - скупчення округлих/сфероїдальних частинок, які частково заповнюють нещільні/порожнисті локації у стінці аорти (рис.7E), характерний для групи M2.

За даними карт розподілу елементів та співвідношенням Ca/P, отриманим зі спектрів РМА в вибраних точках (Рис.6E-Н), мінерал депозиту є кальцій-фосфатом апатитного складу. Значний вміст кисню в місцях локалізації кальцифікованих частинок (за картами розподілу) пояснюється наявністю фосфатної групи апатиту (PO₄). Розподіл натрію і калію по полю сканування (*карти відсутні у даному документі; див. додатки*) не має видимих ознак збагачення місць локалізації мінералізованих частинок, що

свідчить про присутність цих мажорних елементів і в сполучних м'яких, і в кальцифікованих тканинах стінки аорти.

За даними *EDX* аналізу макрокальцифікатів (тип *M 1*) у чотирьох вказаних на рис.2 I точках, співвідношення Ca/P більш відповідає кальцію гідроксиапатиту (ГА), ніж трикальційфосфату (ТСП) навіть без врахування можливих заміщень Ca на Mg і Na у гратці апатиту (таблиця 3). Концентрації Na та Mg становлять приблизно 0,87 і 0,3 ваг.%, відповідно. Всі обрані для *EDX* аналізу точки характеризуються високим рівнем мінералізації, за винятком точки (спектру) №20, де низьке співвідношення Ca/P і високий рівень кисню вказують на наявність значної частки органічної речовини.

Таблиця 3 – Результати *EDX* аналізу *typical specimen* макрокальцифікатів (тип *M 1*) у чотирьох вказаних на рис.2 I точках

№ спектра	Ca/P	(Ca+Na+Mg)/P	P/O	Ca/O
17 (17')	1,854	1,8995	0,308	0,5536
18 (18')	1,697	1,743	0,244	0,3967
19 (19')	1,788	1,91	0,164	0,286
20 (20')	1,323	1,50	0,151	0,1887
av.	1,67	1,637	0,217	0,356

Дослідження зразків аорт групи M2 виявило мінеральні відкладення, що за морфологічними ознаками відповідають сфероподібним частинкам (2-5 мкм) з чіткою грануляцією, не консолідованими з навколишніми/оточуючими м'якими тканинами стінки аорти (тип 2 «зерна в кишені»). За даними карт розподілу елементів та співвідношенням Ca/P (у вказаних на рис. 7I точках) визначено, що мінерал депозиту є кальцій-фосфатом. Підвищений вміст кисню в місцях локалізації кальцифікованих частинок (за картами розподілу) пояснюється наявністю фосфатної групи (PO₄), а його деякий надлишок може бути ознакою органічної компоненти у мікрочастинках та гідратної оболонки на їх поверхні. Тобто, округлі кальцифіковані частинки можуть бути не суто кальцій-фосфатним мінералом, а скоріше за все, являють собою мінерал-органічні композитні утворення.

Досить рівномірний розподіл магнію по полю сканування (*карта відсутня у даному документі*) без видимих ознак збагачення місць локалізації мінералізованих частинок, як і для макрокальцифікатів М1, свідчить про присутність цього мажорного елементу і в сполучних м'яких, і в кальцифікованих тканинах стінки аорти.

За даними *EDX* аналізу у трьох вказаних на рис.7І точках (Таблиця 4), співвідношення Ca/P більш відповідає ТСП, ніж ГА. Проте, враховуючи можливість присутності Mg і Na у позиціях Ca апатитної решітки, округлі/сфероїдальні частинки типу 2 можуть бути як «чистим» ТСП, так і Mg-Na-заміщеним ГА. Na~0,64 ваг.%, Mg~0,3 ваг.%.

Таблиця 4 – Результати *EDX* аналізу *typical specimen* мікрокальцифікатів (типу 2) у трьох вказаних на рис.3 І точках

№ спектра (от 22.01)	Ca/P	(Ca+Na+Mg)/P	P/O	Ca/O
21 (21')	1,66	1,708	0,205	0,327
22 (22')	1,508	1,567	0,127	0,179
23 (23')	1,58	1,636	0,143	0,218
av.	1,58	1,637	0,158	0,241

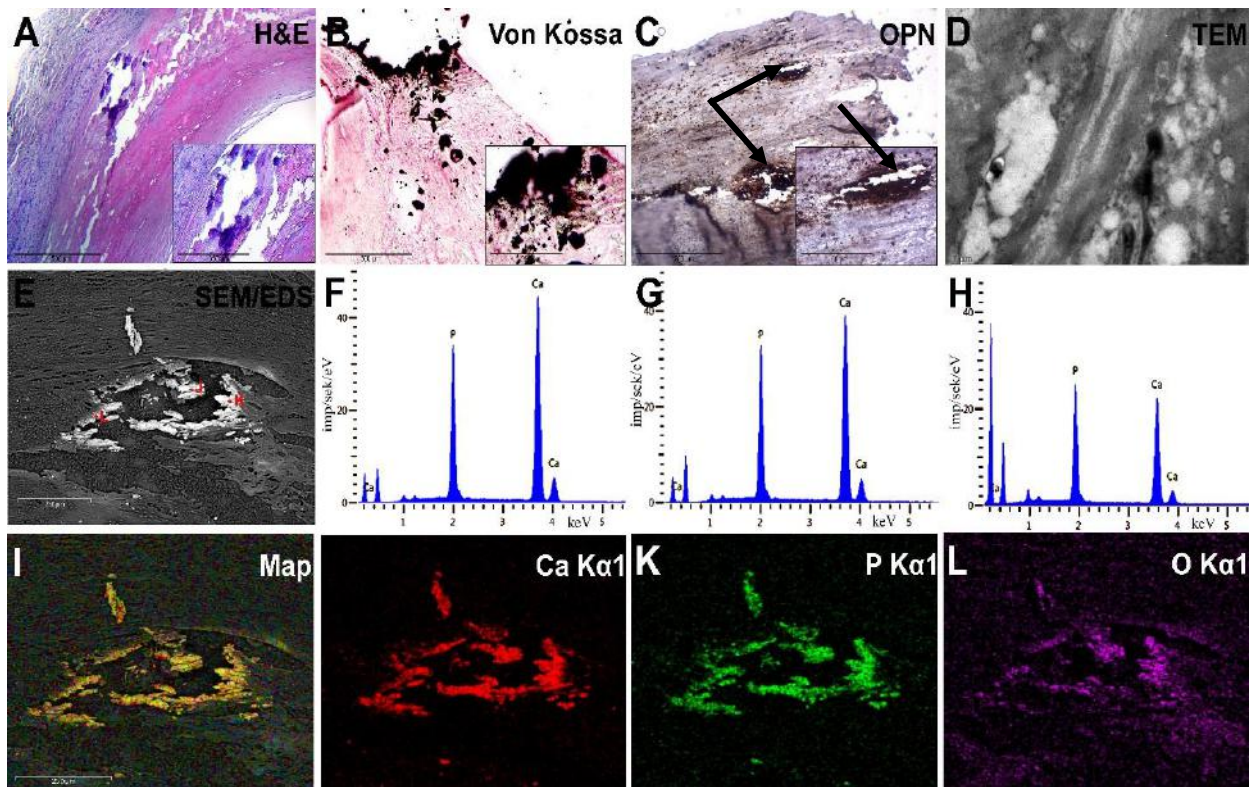


Рисунок 6 – Дослідження тканини аорти з макрокальцифікатами (групи M1):

A – гістологічне дослідження стінки аорти (зabarвлення гематоксилін-еозином),

B – гістохімічне забарвлення кальцифікатів аорти за допомогою методу фон Косса,

C – імуногістохімічне дослідження стінки аорти з антитілами проти остеопонтину.

Залишки макроскопічного кальцифікату марковані чорними стрілками. Рисунки у вставках A-C відповідають збільшеній ділянці цього препарату. D – ПЕМ кальцифікованої стінки аорти. E - дослідження кальцифікованої стінки аорти за допомогою методу СЕМ. J,

K, L – ЕДС спектри, що відповідають точкам вимірювання аналізу на рисунку E. I – фізико-хімічне дослідження кальцифікату аорти групи M1 за допомогою ЕДС-картування мінералізованої стінки аорти: червоним позначено іони кальцію (J), зеленим – фосфору (K), фіолетовим – кисню (L). Збільшення препаратів вказано у лівому нижньому куті зображення у вигляді маркера

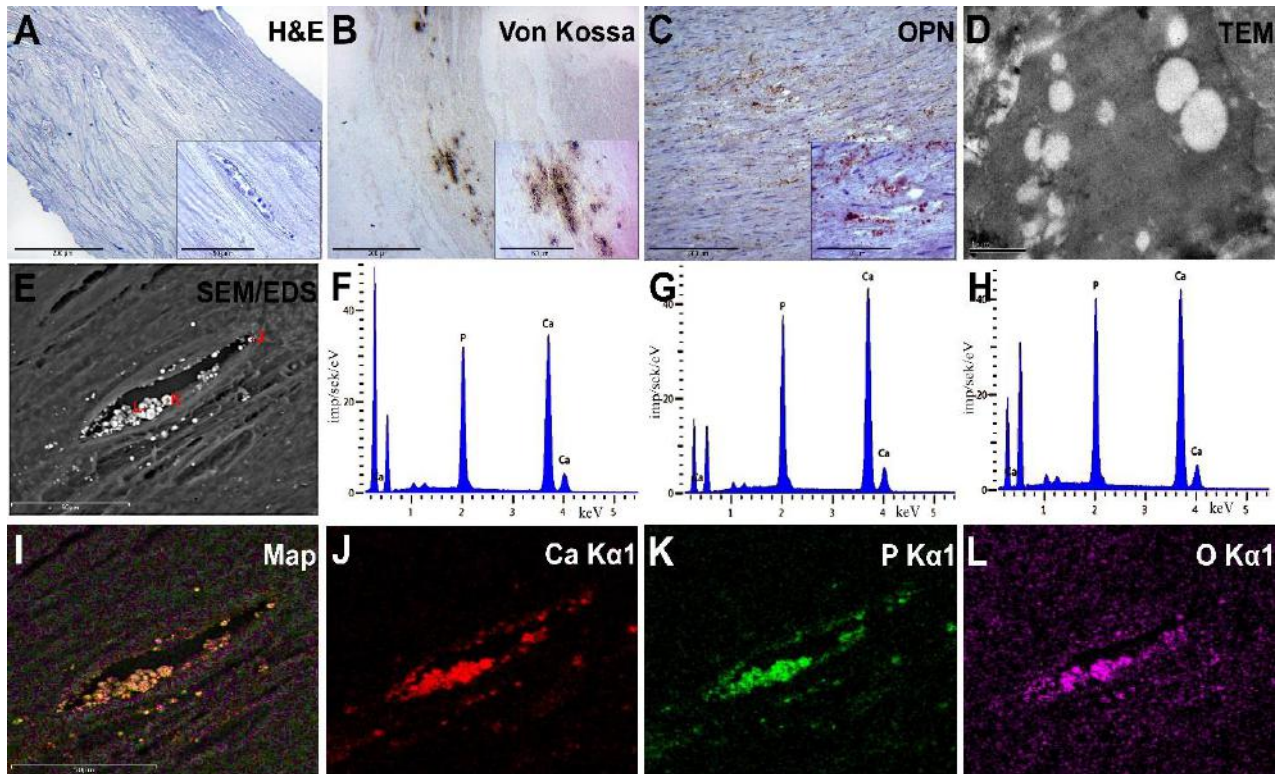


Рисунок 7 – Дослідження тканини аорти з мікрокальцифікатами (групи M2):

А – гістологічне дослідження стінки аорти (забарвлення гематоксилін-еозином), В – гістохімічне забарвлення кальцифікатів аорти за допомогою методу фон Косса, С – імуногістохімічне дослідження стінки аорти з антитілами проти остеопонтину. Рисунки у вставках А-С відповідають збільшеній ділянці цього препарату. D – ПЕМ кальцифікованої стінки аорти. Е – Н - дослідження кальцифікованої стінки аорти за допомогою методу СЕМ з ЕДС спектрами. Спектри F, G, H відповідають точкам вимірювання на рисунку Е. I – L – фізико-хімічне дослідження кальцифікату аорти групи M1 за допомогою ЕДС-картування мінералізованої стінки аорти: червоним позначено іони кальцію (J), зеленим – фосфору (K), жовтим – кисню (L). Збільшення препаратів вказано у лівому нижньому куті зображення у вигляді маркера

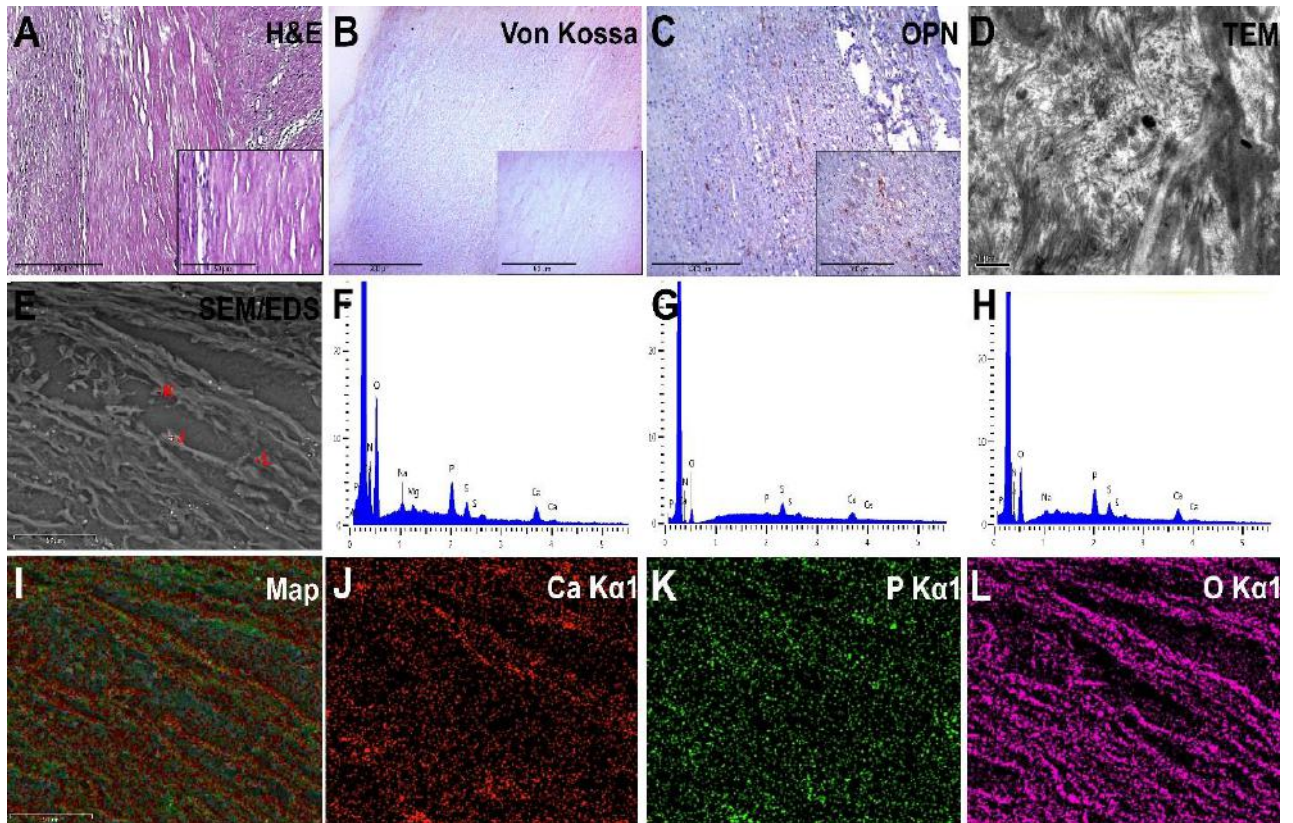


Рисунок 8 – Дослідження тканини аорти без кальцифікації (групи С):

А – гістологічне дослідження стінки аорти (забарвлення гематоксилін-еозином), В – гістохімічне забарвлення кальцифікатів аорти за допомогою методу фон Косса, С – імуногістохімічне дослідження стінки аорти з антитілами проти остеопонтину. Рисунки у вставках А-С відповідають збільшеній ділянці цього препарату. D – ПЕМ кальцифікованої стінки аорти. Е – Н - дослідження кальцифікованої стінки аорти за допомогою методу SEM з ЕДС спектрами. Спектри F, G, H відповідають точкам вимірювання на рисунку Е. I – L – фізико-хімічне дослідження кальцифікату аорти групи С за допомогою ЕДС-картування мінералізованої стінки аорти: червоним позначено іони кальцію (J), зеленим – фосфору (K), жовтим – кисню (L). Збільшення препаратів вказано у лівому нижньому куті зображення у вигляді маркера

Загальний механізм, який приводить до розвитку біомінералізації у судинах сьогодні активно досліджується, але повністю ще не зовсім зрозумілий. Атеросклеротичне ураження у серцево-судинній системі з присутністю кальцифікації у патології вважається проявом ускладненого атеросклерозу, але мікрокальцифікати починають зароджуватися ще на ліпідній стадії [45]. Очевидно, що відкладення мінералів кальцію фосфату у

стінці аорт, уражених атеросклеротичним процесом, потребує певного часу з моменту виникнення основного захворювання. У цьому дослідженні це підтверджується при порівнянні середнього віку пацієнтів у між групами М і групою контролю $62,53 \pm 2,01$ та $54,37 \pm 2,68$ років ($p < 0,05$) відповідно.

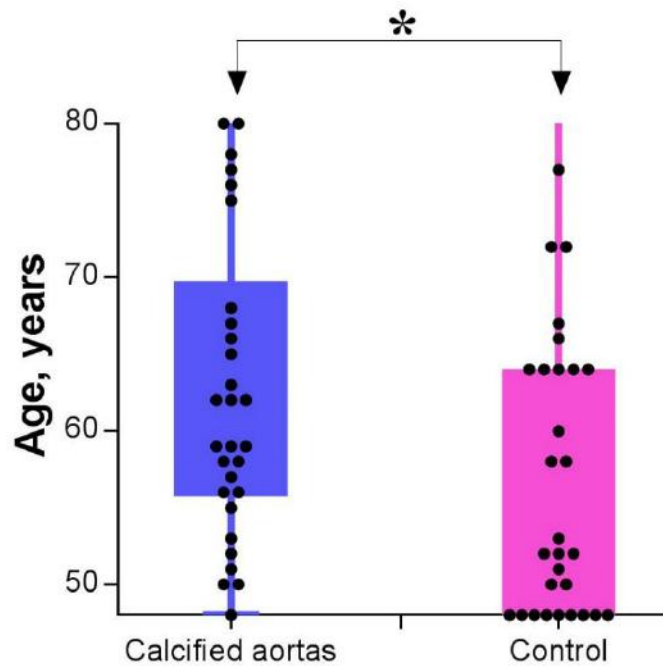


Рисунок 9 – Середній вік пацієнтів у групах М та С

При макроскопічному дослідженні тканини аорти з біомінералізацією було виявлено, що на фоні атеросклеротичного ураження сполуки кальцію відкладалися у ділянці внутрішньої оболонки судини, у випадках виразних ступенів розвитку патологічного процесу кальцифікація поширювалася і на середню оболонку (рис 7А, 8А). Гістологічне дослідження показало типовий перелік патологічних змін у стінці аорти: вогнищеве відкладення ліпідів з формуванням холестеринових кіст, склеротичні зміни з потовщенням колагенових та еластичних волокон, явища набряку, відкладення депозитів кальцію різної морфології та величини, хронічна запальна інфільтрація. Патогістологічні ознаки атеросклерозу мали більш значну виразність у групі М1.

Запалення може виникати як реакція на атероматозний детрит та біомінералізацію. Серед дослідників серцево-судинної біомінералізації поширена думка, що переважання прозапальних стимулів при розвитку атеросклеротичного процесу призводить до розвитку сфероїдної (мікро)кальцифікації, а у випадку переважання протизапальних стимулів виникає макрокальцифікація, яка сприяє стабілізації атеросклеротичної бляшки [37].

Остеопонтин – невеликий за масою білок, який бере активну участь у розвитку та формоутворенні кісток та процесах патологічної біомінералізації судин [46]. Він має негативний заряд і електростатично взаємодіє з кальцій-фосфатними мінералами (типу гідроксиапатиту), прилипаючи до них. Звідси основна функція остеопонтину як антимінералізаційного фактора – він обмежує ріст кристалів мінералів кальцій-фосфату [47]. З огляду цієї функціональної особливості, ОПН завжди можна виявити у вогнищах (фокусах) кальцифікації, цей білок є чітким і раннім маркером біомінералізаційних процесів.

Імуногістохімічне дослідження тканин аорти з макро- і мікрокальцифікацією та зразків групи контролю показало достовірно вищий рівень присутності ОПН у кальцифікованих тканинах (рис. 10). При чому високий рівень експресії ОПН був характерний для як для групи M1, так і M2, з невеликою кількісною перевагою показників зразків аорти з макрокальцифікацією. Проте, достовірної різниці кількісної присутності ОПН між групами макро- (M1 – $48,76 \pm 4,67$) та мікрокальцифікації (M2 – $41,65 \pm 5,07$) аорти виявлено не було ($p > 0,05$). Присутність ОПН у тканинах аорти контрольної групи відповідала $21,91 \pm 1,53$ клітин і це було достовірно менше, ніж у групах M1 ($p < 0,001$) та M2 ($p < 0,001$).

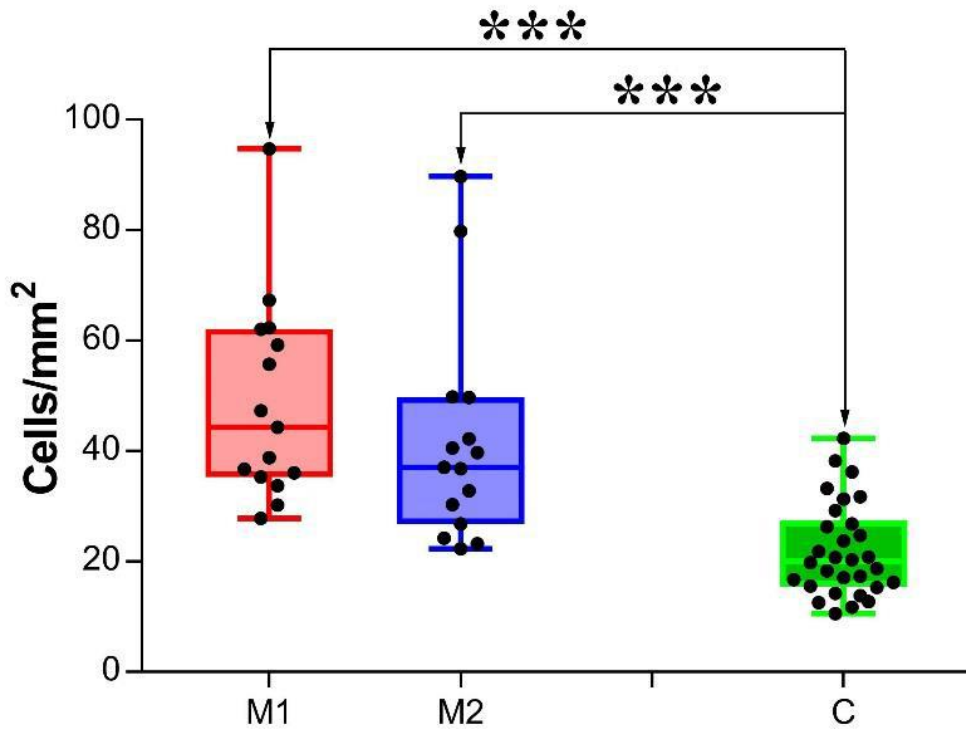


Рисунок 10 – Результати імуногістохімічного дослідження тканини аорти антитілами проти остеопонтину: M1 – група зразків з макрокальцифікацією, M2 – зразки аорти з мікрокальцифікацією, C – контрольна група.

ОПН забарвлює як цитоплазму клітин (в основному, виробників (продуцентів, джерел) цього білка), так і позаклітинних структур – поверхні кальцифікатів, волокон, місць формування біомінералів. У ході отримання результатів ІГХ дослідження ОПН виникали додаткові складності у вигляді значного «шуму», який створювався невеликими забарвленими фрагментами макрокальцифікатів та власне мікрокальцифікатами. Кальцифіковані зразки мали помітний рівень фонового забарвлення у зв'язку з руйнуванням біомінеральних утворень та забрудненням навколишньої тканини дрібними кальцій-фосфатними фрагментами і осіданням цих сполук у тканинах аорти.

Загалом, результати ІГХ дослідження тканини кальцифікованих аорт збігається з численними свідчення про безпосередню участь ОПН у процесах формування і розвитку патологічної біомінералізації [44-46]. Але, як ми тут

бачимо, очевидної ролі ОПН у диференціюванні макро- і мікрокальцифікатів атеросклеротичної аорти не виявлено.

4 УЗАГАЛЬНЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ

Склалася загальноприйнята точка зору, що кардіоваскулярна кальцифікація поділяється на макро- та мікрокальцифікацію [38]. Макрокальцифікація передбачає наявність у тканинах дифузних кальцифікатів (фрагменти безперервного кальцифікованого матеріалу більше ≥ 5 мм) та фрагментовані кальцифікати (розмірами від 2 до 5 мм). Масивні кальцифікати, розташовані, як правило, у вигляді листів (sheet-like calcification), визначаються як прояв макрокальцифікації. Вважається, що макрокальцифікація стабілізує атеросклеротичну бляшку і слугує бар'єром на шляху запалення [38, 43, 47]. Масивна або макрокальцифікація виявляється у вигляді утворення пластів або кальцифікованих мас у атеросклеротичних бляшках або ділянок мінералізованої інтими аорти. Дуже часто макрокальцифікація поширюється на середній еластичний шар судини. Масивні кальцифікати мають тісний зв'язок з оточуючими тканинами, що вочевидь і є основою «стабілізаційного» ефекту.

Поняття «мікрокальцифікація» включає в себе крапчасту кальцифікацію (біомінеральні депозити ≤ 2 мм) та мікрокальцифікати розмірами від 0,5 до 15 мкм [47]. Загалом, для мікрокальцифікації характерний гранулярний паттерн. Мікрокальцифікати розмірами 0,5-15 мкм є радіографічно негативними – не можуть бути виявленими за допомогою стандартних методів, у тому числі комп'ютерної томографії [48].

У 1983 році Андерсоном і співавторами за допомогою електронної мікроскопії відкрили і при атеросклеротичній кальцифікації екстрацелюлярні везикули (ЕВ), подібні до мікровезикул кісткової тканини [49]. Подальший розвиток мікроскопії з високою роздільною здатністю дозволив встановити, що ці структури фенотипично відрізняються від їх аналогів у кістках. Загалом, ЕВ мають різні форми/підвиди: мікровезикули (МВ), ЕВ, апоптотичні тільця та мікрочастинки, що мають різні форми і розміри [50]. У нашому дослідженні зразки аорти групи М1 містили більш крупні форми ЕВ з нерегулярними

контурами (неправильною формою) у вигляді 2 тисн мікровезикул та апоптотичних тілець (рис. 11D). В той же час, зразки аорти з мікрокальцифікатами містили округлі або овальні ЕВ у вигляді екзосом та мікро- або наночастинок близько 1 мкм (рис. 12D). Ряд досліджень свідчить, що саме ці утворення дають початок процесам кальцифікації у серцево-судинній системі [48, 47, 49]. Найперші мікрокальцифікати утворюються на ранніх стадіях атеросклерозу – при утворенні пізньої фіброатероми (LFA) [47]. Найдрібніші, радіографічно-негативні мікрокальцифікати (РНМК) описані як сфероїдні утворення, які мають ядро та оболонку [41]. Аналогічні утворення описуються у нашому дослідженні у зразках групи М2, РНМК були виявлені у вигляді округлих сфероподібних утворень у еластичному каркасі середньої оболонки та у внутрішній оболонці аорти (рис. 12 А-С,Е). Переважна частина зразків групи М2 нашого дослідження становлять пацієнти з неускладненим (раннім) атеросклерозом помірної виразності гістологічних змін. Радіографічно-негативні мікрокальцифікати (РНМК) є проявом ранньої кальцифікації і виявляються у вигляді штрихів дрібного розміру серед ліпідного детриту у [47]. Звичайно, такі мікрокальцифікати не можливо виявити за допомогою стандартних неінвазивних діагностичних процедур [48].

Необхідно відмітити, що у дослідженнях, які виявляють сфероїдні мікрокальцифікати, відсутня термічна пробопідготовка або вона дуже шадна [41, 42].

Повертаючись до мікрокальцифікатів крапчастого виду та іррегулярної форми треба сказати, що також вони виявляються у зразках з макрокальцифікатами. Можливо вони є фрагментами при руйнуванні масивної кальцифікації (наприклад у ході виготовлення мікропрепаратів або пробопідготовки для електронної мікроскопії). При порівнянні структурованих (сфероїдних) та неструктурованих (іррегулярні) мікрокальцифікатів примітний факт, що перші розміщуються вільно (в «карманах», детриті, між волокнами), а другі – частіше мають тісний зв'язок з

оточуючими тканинами. Мікрокальцифікації відводиться негативна роль дестабілізатора атеросклеротичних бляшок та ризикового фактора розриву стінки аорти [38]. Наскільки мікрокальцифікати можуть бути небезпечними для стабільності атеросклеротичної тканини аорти є питанням дискусійним і таким, що потребує подальших досліджень.

При проведенні аналізу рентгенівських спектрів мікро і макрокальцифікатів досліджуваних груп, необхідно зазначити їх різну ступінь зрілості (оформленості). Мікрокальцифікати округлої та овальної форми (РНМК) за співвідношенням Са/Р (і наявності слідів органічної речовини за результатами елементного картування) складаються з аморфного апатиту. Ця фаза гідроксиapatиту є ще незрілою, що може вказувати на те, що РНМК слід відокремлювати від мікрокальцифікатів за рядом клініко-діагностичних (відсутність очевидної шкоди для тканини, невидимість для радіологічної діагностики), кристало-хімічних (фаза біомінералу) та прогностичних (перспективний ранній симптом) ознак та за біологічною поведінкою. Загалом, ранжування кальцифікатів аорти приведене на рис.11.

Макрокальцифікати за фазовим складом відповідають більш зрілому апатитному мінералу з карбонатними заміщеннями.

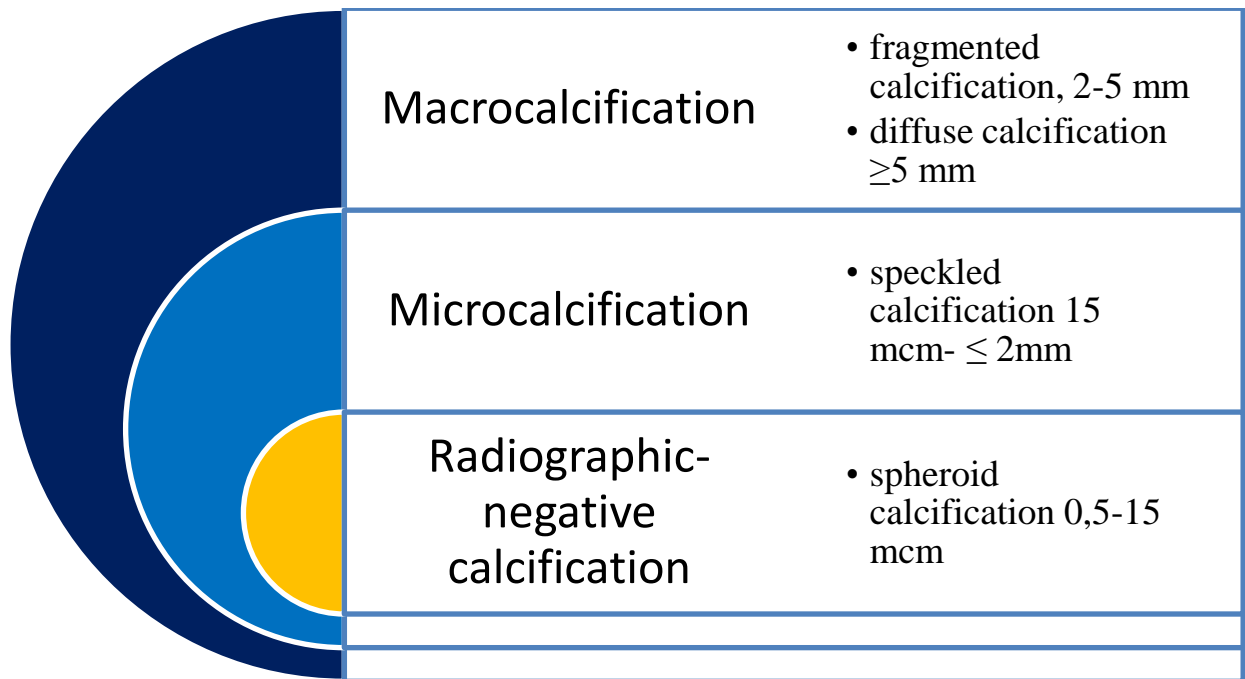


Рисунок 11 – Схема кальцифікатів аорти

СЕМ із рентгенівським мікроаналізом підтвердила, що біомінеральна частина зразків аорт групи М1 складається переважно з гідроксиапатитів, що також узгоджується з попередніми дослідженнями матеріалознавчого спрямування [40, 41, 43]. Натомість у групі М2 співвідношення Са/Р менше, ніж у групі М1, і це свідчить на користь того, що мікрокальцифікати можуть бути сформовані більш дефектним (незрілим) гідроксиапатитом, або навіть неструктурованою сумішшю фаз з переважно меншим, ніж у гідроксиапатиту співвідношенням Са/Р. Залишається неясним питання про можливість переростання (переродження/дозрівання) кальцифікатів групи М2 у кальцифікати групи М1.

ВИСНОВКИ

1. Огляд літературних джерел представляє НЧ металів як перспективний інноваційний протимікробний засіб. Проте є певні застереження щодо їх застосування в медицині з-за необхідності оцінки можливої токсичності НЧ таких металів як срібло і мідь.

Загалом, фізіологічна роль срібла в організмі не встановлена і його вміст в людських тканинах дуже низький. Токсичність срібла не висока і проявляється в основному за умов інгаляційного або парентерального введення в організм. Також токсичність залежить від розчинності сполуки, до складу якої входять іони срібла та буферних властивостей індивідуального організму.

2. Наночастинки Ag, виготовлені в УФ-реакторі, мають кубічну форму розміром від 80 до 800 нм із залишками Cl і Na. Інкубація AgNP демонструє повільне вивільнення Ag⁺ що не перевищує 5 мкг/мл за 24 години. Обробка ультразвуком збільшує вивільнення іонів, які можна використовувати в комбінованому лікуванні інфікованих ран.

3. Морфологічне дослідження стінки аорти за умов макро- і мікрокальцифікації показує типовий перелік патологічних змін: вогнищеве відкладення ліпідів з формуванням холестеринових кіст, склеротичні зміни з потовщенням колагенових та еластичних волокон, явища набряку, відкладення депозитів кальцію різної морфології та величини, хронічна запальна інфільтрація.

Середній вік групи пацієнтів з патологічною біомінералізацією аорти достовірно переважає середній вік контрольної групи - 62,53±2,01 (М) та 54,37±2,68 (С) років ($p < 0,05$), що відповідає уявленням про часові проміжки розвитку ускладненого атеросклерозу.

Результати ІГХ дослідження тканини кальцифікованих аорт показують участь ОПН у процесах формування і розвитку патологічної біомінералізації, але, очевидної ролі ОПН у диференціюванні макро- і мікрокальцифікатів

атеросклеротичної аорти не виявлено. СЕМ із рентгенівським мікроаналізом підтвердила, що біомінеральна частина зразків аорт групи M1 складається переважно з гідроксиapatитів, що також узгоджується з попередніми дослідженнями матеріалознавчого спрямування, а у групі M2 співвідношення Ca/P менше, ніж у групі M1, і це свідчить на користь того, що мікрокальцифікати можуть бути сформовані більш дефектним (незрілим) гідроксиapatитом. Це дає підстави припустити, що патологічна кальцифікація в аорті розвивається послідовно від апоптозних тілець та мікроезерикул через сфероїдні РНМК і крапчасті МК до масивної макрокальцифікації.

ПЕРЕЛІК ДЖЕРЕЛ ПОСИЛАННЯ

1. Савинова ЕП. Бактерицидная и дезинфицирующая активность препаратов кластерного серебра. Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии. 2014;1(11):44–8.
2. Siddiqi KS, Husen A, Rao RAK. A review on biosynthesis of silver nanoparticles and their biocidal properties. *J Nanobiotechnology*. 2018 Feb 16;16(1):14.
3. Demling RH, DeSanti L. Effects of silver on wound management. *Wounds*. 2001;13 suppl.A(1):4.
4. Lee Y.J., Kim J., J. Oh, et al. Ion-release kinetics and ecotoxicity effects of silver nanoparticles. *Environ. Toxicol. Chem.*, vol. 31, no. 1, pp. 155-159, 2012.
5. Kędziora M A., Speruda E, Krzyżewska, Rybka J., A, Łukowiak G. Bugla-Płoskońska. Similarities and Differences between Silver Ions and Silver in Nanoforms as Antibacterial Agents. *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 19, no. 2, p. 444, Feb. 2018.
6. Lee SH, Jun BH. Silver Nanoparticles: Synthesis and Application for Nanomedicine. *Int J Mol Sci*. 2019 Feb 17;20(4):865.
7. Xiu Z.-M, Ma J., Alvarez P.J.J. Differential effect of common ligands and molecular oxygen on antimicrobial activity of silver nanoparticles versus silver ions. *Environ. Sci. Technol.*, vol. 45, pp. 9003-9008, 2011.
8. Hembram KC, Kumar R, Kandha L, Parhi PK, Kundu CN, Bindhani BK. Therapeutic prospective of plant-induced silver nanoparticles: application as antimicrobial and anticancer agent. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*. 2018;46(sup3): S38-S51.
9. Ayala-Núñez NV, Lara HH, Ixtepan L, Rodríguez C. Silver nanoparticles toxicity and bactericidal effect against methicillinresistant *Staphylococcus aureus*: Nanoscale does matter. *Nanobiotechnology*. 2009;5:2-9.
10. Dror-Ehre A, Mamane H, Belenkova T, Markovich G, Adin A. Silver nanoparticle-E. coli colloidal interaction in water and effect on E. coli survival. *J Colloid Interface Sci*. 2009 Nov 15;339(2):521-6.

11. Guo J, Qin S, Wei Y, Liu S, Peng H, Li Q, et al. Silver nanoparticles exert concentration-dependent influences on biofilm development and architecture. *Cell Prolif*. 2019 Jul;52(4):e12616.
12. Gao C, Xu Y, Xu C. In vitro activity of nano-silver against ocular pathogenic fungi. *Life Science Journal*. 2012;9(4):750-753.
13. Naghsh N, Ghiasian M, Soleymani S, Torkan S. Investigation of Eucalyptus and nanosilver as a new nanomixture for growth inhibition of E.coli. *International Journal of Molecular and Clinical Microbiology*. 2012;2(1):138-140.
14. Zhang XF, Liu ZG, Shen W, Gurunathan S. Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Properties, Applications, and Therapeutic Approaches. *Int J Mol Sci*. 2016 Sep 13;17(9):1534.
15. Lansdown AB. Silver in health care: antimicrobial effects and safety in use. *Curr Probl Dermatol*. 2006;33:17-34.
16. Lansdown AB, Sampson B, Rowe A. Experimental observations in the rat on the influence of cadmium on skin wound repair. *Int J Exp Pathol*. 2001 Feb;82(1):35-41.
17. Hostýnek JJ, Hinz RS, Lorence CR, Price M, Guy RH. Metals and the skin. *Crit Rev Toxicol*. 1993;23(2):171-235.
18. Bleehen SS, Gould DJ, Harrington CI, Durrant TE, Slater DN, Underwood JC. Occupational argyria; light and electron microscopic studies and X-ray microanalysis. *Br J Dermatol*. 1981 Jan;104(1):19-26.
19. Fung MC, Bowen DL. Silver products for medical indications: risk-benefit assessment. *J Toxicol Clin Toxicol*. 1996;34(1):119-26.
20. Armitage SA, White MA, Wilson HK. The determination of silver in whole blood and its application to biological monitoring of occupationally exposed groups. *Ann Occup Hyg*. 1996 Jun;40(3):331-8.
21. Di Vincenzo GD, Giordano CJ, Schriever LS. Biologic monitoring of workers exposed to silver. *Int Arch Occup Environ Health*. 1985;56(3):207-15.

22. Larese FF, D'Agostin F, Crosera M, Adami G, Renzi N, Bovenzi M, et al. Human skin penetration of silver nanoparticles through intact and damaged skin. *Toxicology*. 2009 Jan 8;255(1-2):33-7.
23. Armitage SA, White MA, Wilson HK. The determination of silver in whole blood and its application to biological monitoring of occupationally exposed groups. *Ann Occup Hyg*. 1996 Jun;40(3):331-8.
24. Burrell RE. A scientific perspective on the use of topical silver preparations. *Ostomy Wound Manage*. 2003 May; 49(5A Suppl):19-24.
25. Perrelli G, Piolatto G. Tentative reference values for gold, silver and platinum: literature data analysis. *Sci Total Environ*. 1992 Jun 9;120(1-2):93-6.
26. Yanovska A., Kuznetsov V., Stanislavov A., Husak E., M. Pogorielov, V. Starikov, S. Bolshanina, S. Danilchenko. Synthesis and characterization of hydroxyapatite-gelatine composite materials for orthopaedic application. *Materials Chemistry and Physics*, vol. 183, pp. 93-100, 2016.
27. Kędziora A., Speruda M., Krzyżewska E., Rybka J., Łukowiak A, Bugła-Płoskońska G. Similarities and Differences between Silver Ions and Silver in Nanoforms as Antibacterial Agents. *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 19, no. 2, p. 444, Feb. 2018.
28. Xiu Z.-M., Ma J., Alvarez P.J.J. Differential effect of common ligands and molecular oxygen on antimicrobial activity of silver nanoparticles versus silver ions. *Environ. Sci. Technol.*, vol. 45, pp. 9003-9008, 2011.
29. Liao S., Zhang Y., Pan X., Zhu F., Jiang C., Liu Q., Cheng Z., Dai G., Wu G., Wang L., Chen L. Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Nanomedicine*, vol. 14, pp. 1469-1487, 2019.
30. González-Fernández S., Lozano-Iturbe V., García B. et al. Antibacterial effect of silver nanorings. *BMC Microbiol.*, vol. 20, no. 1, 2020.
31. Myakinin A., Turlybekuly A., Pogrebnjak A. et al. In vitro evaluation of electrochemically bioactivated Ti6Al4V 3D porous scaffolds. *Mater. Sci. Eng. C.*, vol. 121, 2021.

32. A.W. Jatoi, I.S. Kim, H. Ogasawara, Q.Q. Ni, "Characterizations and application of CA/ZnO/AgNP composite nanofibers for sustained antibacterial properties," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 105, 2019.
33. A.W. Jatoi, I.S. Kim, H. Ogasawara, Q.Q. Ni, "Characterizations and application of CA/ZnO/AgNP composite nanofibers for sustained antibacterial properties," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 105, p. 110077, 2019.
34. G.C. Porter, D.R. Schwass, G.R. Tompkins, S.K.R. Bobbala, N.J. Medlicott, C.J. Meledandri, "AgNP/Alginate Nanocomposite hydrogel for antimicrobial and antibiofilm applications," *Carbohydr. Polym.*, vol. 251, p. 117017, 2021.
35. Y.M. Long, L.G. Hu, X.T. Yan, et al., "Surface ligand controls silver ion release of nanosilver and its antibacterial activity against *Escherichia coli*," *International Journal Nanomedicine*, vol. 12, pp. 3193-3206, 2017.
36. N. Hadrup, H.R. Lam, "Oral toxicity of silver ions, silver nanoparticles and colloidal silver. A review," *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, vol. 68, no. 1, pp. 1-7, 2014.
37. van der Toorn JE, Rueda-Ochoa OL, van der Schaft N, Vernooij MW, Ikram MA, Bos D, Kavousi M. Arterial calcification at multiple sites: sex-specific cardiovascular risk profiles and mortality risk-the Rotterdam Study. *BMC Med.* 2020 Sep 24;18(1):263. doi: 10.1186/s12916-020-01722-7. PMID: 32967688; PMCID: PMC7513304.
38. Rocha-Singh KJ, Zeller T, Jaff MR. Peripheral arterial calcification: prevalence, mechanism, detection, and clinical implications. *Catheter Cardiovasc Interv.* 2014 May 1;83(6):E212-20. doi: 10.1002/ccd.25387. Epub 2014 Feb 10. PMID: 24402839; PMCID: PMC4262070.
39. Brown AJ, Teng Z, Evans PC, Gillard JH, Samady H, Bennett MR. Role of biomechanical forces in the natural history of coronary atherosclerosis. *Nat Rev Cardiol.* 2016 Apr;13(4):210-20. doi: 10.1038/nrcardio.2015.203. Epub 2016 Jan 29. PMID: 26822720.
40. Pugliese G, Iacobini C, Blasetti Fantauzzi C, Menini S. The dark and bright side of atherosclerotic calcification. *Atherosclerosis.* 2015 Feb;238(2):220-30. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2014.12.011. Epub 2014 Dec 12. PMID: 25528431.

41. Bertazzo S., Gentleman E., Cloyd K.I., Chester A.H., Yacoub M.H. and Stevens M.M. Nano-analytical electron microscopy reveals fundamental insights into human cardiovascular tissue calcification. *Nature Materials*. 2013. 12 (6), p. 576.
42. Curtze S.C., Kratz M., Steinert M and Vogt S. Step-down vascular calcification analysis using state-of-art nanoanalysis techniques. *Scientific reports*. 2016; 6:23285.
43. Li Yuan., Wang Chang Qiu., Lu An-Huai., Li Kang ... Ding Hong-Rui. A comparative study of pathological nanomineral aggregates with distinct morphology in human aortic atherosclerotic plaques. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2020; 20:1-8.
44. Danilchenko S.N., Kuznetsov V.N., Stanislavov A.S., Kalinkevich A.N., Starikov V.V, Moskalenko R.A. [et al]. The mineral component of human cardiovascular deposits: morphological, structural and crystal-chemical characterization. *Crystal research and technology*. 2013; 48 (3):153-62.
45. Menini S, Iacobini C, Ricci C, Blasetti Fantauzzi C, Salvi L, Pesce CM, Relucenti M, Familiari G, Taurino M, Pugliese G. The galectin-3/RAGE dyad modulates vascular osteogenesis in atherosclerosis. *Cardiovasc Res*. 2013 Dec 1;100(3):472-80. doi: 10.1093/cvr/cvt206. Epub 2013 Aug 23. PMID: 23975852.
46. Moskalenko R, Romaniuk A, Iashchichyn I et al. Involvement of proinflammatory S100A8/S100A9 in the atherocalcinosis of aortic valve. *Patologia*. 2017; 14 (1): 49-56.
47. Lok Z.S.Y, Lyle A. Osteopontin in vascular disease: friend or foe? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2019;39:613-622. DOI: 10.1161/ATVBAHA.118.311577.
48. Steiz S. A, Speer M.Y, McKee M.D, Liaw L, Almeida M, Yang H, Giachelli C.M. Osteopontin inhibits mineral deposition and promotes regression of ectopic calcification. *Am J of Pathology*. 2002; 161 (6):2035-2046.
49. Hutcheson JD, Goettsch C, Bertazzo S, Maldonado N, Ruiz JL, Goh W, et al. Genesis and growth extracellular vesicle-derived microcalcification in atherosclerotic plaques. *Nat Mater*. 2016; 15:335-43. doi:10.1038/nmat4519.

50. Otsuka F, Sakakura K, Yahaki K, Joner M, Virmani R. Has our understanding of calcification in human coronary atherosclerosis progressed? *Arterioscl Thromb Vasc Biol.* 2014; 34: 724-736.
51. Shioi A, Ikari Y. Plaque calcification during atherosclerosis progression and regression. *J Atheroscler Thromb.* 2018; 25:294-303. Doi:10.5551/jat.RV17020.
52. Bakhshian Nik A, Hutcheson JD, Aikawa E. Extracellular vesicles as mediators of cardiovascular calcification. *Frontiers in Cardiovascular Medicine.* 2017; 4 (78): 1-7. Doi:10.3389/fcvm.2017.00078.
53. Hutcheson JD, Goettsch C, Pham T, Iwashita M, Aikawa M, Singh SA et al. Enrichment of calcifying extracellular vesicles using density-based ultracentrifugation protocol. *J Extracell Vesicles.* 2014; 3:25129. doi:10.3402/jev.v3.25129.
54. Danilchenko S.N., Kalinkevich A.N., Moskalenko R.A., Kuznetsov V.N., Kochenko A.V., Husak E.V., Starikov V.V., Fuyan Liu, Junhu Meng, Jinjun Lu. Structural and crystal-chemical characteristics of the apatite deposits from human aortic walls. *Interventional Medicine & Applied Science.* 2018; Vol. 10 (2), pp. 110–119.