

**КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА**

ННЦ «Інститут біології та медицини»
Кафедра цитології, гістології та
репродуктивної медицини

Завідувач кафедри доктор біологічних наук, професор Держинський М.Е.

Протокол №_____ засідання кафедри

від “_____” _____ 2023 р.

**Вплив наночастинок срібла та золота на морфо-
функціональні показники сім'яників дорослих щурів**

Кваліфікаційна робота магістра
денної форми навчання
за спеціальністю 091 Біологія
Павлюк Наталії Сергіївни

Науковий керівник від кафедри
канд. біол. наук, доц. Пустовалов А.С.

Робота виконана у Навчально-науковому центрі «Інститут біології та
медицини»

під керівництвом канд. біол. наук, доц. Пустовалов А.С.

Оцінка захисту роботи _____

Київ – 2023

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АФК	–	активні форми кисню;
ГТБ	–	гемато-тестикулярний бар'єр;
ДКЛ	–	дорослі клітини Лейдіга;
ЗКЛ	–	зрілі клітини Лейдіга;
КЛ	–	клітини Лейдіга;
КПЛ	–	клітини-попередники Лейдіга;
КС	–	клітини Сертолі;
ЛГ	–	лютеїнізуючий гормон;
НКЛ	–	незрілі клітини Лейдіга;
НС	–	наносрібло;
НЧ	–	наночастинки;
НЧЗ	–	наночастинки золота;
НЧС	–	наночастинки срібла;
ПФН	–	поліфосфат натрію;
ССК	–	сперматогоніальні стовбурові клітини;
ФКЛ	–	фетальні клітини Лейдіга;
ФСГ	–	фолікулостимулюючий гормон.

ЗМІСТ

ВСТУП	4
РОЗДІЛ 1. ВПЛИВ НАНОЧАСТИНОК СРІБЛА ТА ЗОЛОТА НА МОРФО- ФУНКЦІОНАЛЬНІ ПОКАЗНИКИ СІМ'ЯНИКІВ ДОРΟΣЛИХ ЩУРІВ	5
1.1. Наночастинки	5
1.2. Структурно-функціональна характеристика клітинного складу яєчка та епідидимісу.....	6
1.3. Біорозподіл наночастинок у організмі щура.....	17
1.4. Вплив наночастинок на репродуктивну систему щурів та сперматогенез	19
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	23
2.1. Отримання та фізико-хімічні властивості наночастинок.....	23
2.2. Тварини, які були задіяні у експерименті	24
2.3. Експериментальний дизайн	25
2.4. Гістологічне дослідження	25
2.5. Оцінка сперматогенезу.....	26
2.6. Морфометричне дослідження.....	27
2.7. Статистичний аналіз	28
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ	29
3.1. Гістологічне дослідження	29
3.2. Морфометричне дослідження.....	35
3.3. Оцінка сперматогенезу.....	39
РОЗДІЛ 4. ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ	40
ВИСНОВКИ	49
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	50

ВСТУП

Наночастинки (НЧ) визначаються як частинки розміром від 1 до 100 нм з унікальними фізико-хімічними властивостями, що залежать від розміру, які роблять їх більш стабільними, розчинними та біологічно ефективними [24].

Широке використання нанорозмірних матеріалів, зокрема наночастинок срібла та золота у промисловості, споживчих товарах та медицині викликає серйозне занепокоєння, щодо впливу наночастинок на живі організми. Було показано, що наночастинки можуть долати біологічні бар'єри, зокрема гемато-тестикулярний бар'єр, тому важливою залишається проблема впливу наночастинок срібла та золота на репродуктивну систему [52].

Мета: оцінити вплив токсичності наночастинок срібла та золота на морфофункціональні показники сім'яників дорослих щурів.

Завдання:

1. Порівняти гістологічні та морфометричні зміни: діаметри сім'яних каналців, площі поперечного перерізу ядер клітин Лейдіга та клітин Сертолі у сім'яниках щурів після впливу наночастинками срібла та золота порівняно з контролем.
2. Оцінити стан сперматогенезу після впливу наночастинками срібла та золота порівняно з контролем.
3. Порівняти гістологічні та морфометричні зміни: висоту головних епітеліоцитів епідидимісу після впливу наночастинками срібла та золота порівняно з контролем.

РОЗДІЛ 1.

ВПЛИВ НАНОЧАСТИНОК СРІБЛА ТА ЗОЛОТА НА МОРФО- ФУНКЦІОНАЛЬНІ ПОКАЗНИКИ СІМ'ЯНИКІВ ДОРΟΣЛИХ ЩУРІВ

1.1. Наночастинки

Стрімкий розвиток галузі нанотехнологій за останні тридцять років призвів до збільшення впливу новосинтезованих наночастинок на організм людини та тварин [22].

Застосування наночастинок, експоненційно зростає у експериментальній та клінічній практиці. НЧ використовують для доставки ліків (сукупність методів, що дозволяють модифікувати фізико-хімічні, фармакологічні властивості за для покращення їх ефективності та безпеки), візуалізації та відстеження клітин. Не зважаючи на значні переваги НЧ у житті людини, існують певні потенційно непередбачувані наслідки впливу НЧ на живі організми, у тому числі і на людину. Тобто, вплив НЧ на нормальну структуру органів та тканин та їх фізіологію. Добре відомо, що токсичність будь-яких речовин, залежить від фізико-хімічних властивостей, зокрема від форми та розмірів НЧ, хімічного складу та поверхневого заряду. Крім фізико-хімічних властивостей НЧ, суттєвими параметрами, від чого буде залежати наночитотоксичність є шлях введення, введена доза та ступінь розподілу у тканинах [55].

Колоїдне срібло, наночастинки срібла та наносрібло – це деякі з назв, які використовують для частинок срібла розміром 1-100 нм [31].

НЧ срібла мають потужні антибактеріальні, антивірусні властивості, а тому успішно використовують у медичних цілях для виготовлення пов'язок просочених сріблом для ран, хірургічні інструменти, засоби контрацепції, кісткові протези. Крім того, НЧ срібла широко використовуються у промисловості. Наночастинки срібла інтегровані в різні матеріали, які призначення для зберігання харчових продуктів. Наприклад, пластик, з якого

виготовляють харчові контейнери, пакети для зберігання харчових продуктів, поверхні холодильників [2].

Основною перевагою використання пластику з наночастинками срібла у побутових цілях є пригнічення росту мікроорганізмів. Іони срібла діють як токсини. У бактерії вони інгібують канали, які забезпечують харчування бактерій, у вірусів – блокування білкових каналів, які відповідають за проникнення та розмноження вірусу в організмі хазяїна. Такий спосіб загибелі бактерій перешкоджає бактеріям адаптуватися та виробити механізми для захисту та їх закріпленню у поколіннях.

Наночастинки золота завдяки їх низької токсичності та біосумісному металевому ядру є ідеальними наноносіями. НЧ золота використовуються як системи-переносники для ліків, особливо хіміотерапевтичних препаратів, вони здатні специфічно націлюватися на ракові клітини, підвищувати ефективність [13].

Для підтримання сталих фізико-хімічних властивостей НЧ використовують стабілізатори. Наприклад, поліфосфат натрію, є стабілізатором (блокувальний агент), який відіграє важливу роль у підтримці розміру та морфології наночастинок, запобігає їх коагуляції та сприяє тривалому зберіганню. У даному випадку, стабілізатори – це поверхнево активні речовини, які на початкових етапах утворення, сорбуються поверхнею НЧ срібла та відповідно перешкоджають агрегації НЧ між собою [21].

Збільшення впливу наночастинок на людину та зниження якості сперми за останні десятиліття привернули увагу науковців до дослідження впливу наночастинок на репродукцію людини, у тому числі, на чоловічу фертильність.

1.2. Структурно-функціональна характеристика клітинного складу яєчка та епідидимісу

Яєчко складається з двох основних відділів: сильно звивистих сім'яних каналців та інтерстиційного простору. Двома основними функціями, які виконує яєчко є утворення сперматозоїдів (сперматогенез) та синтез статевих стероїдних гормонів. Сперматогенез відбувається у сім'яних каналцях, а стероїдогенез здійснюється клітинами Лейдіга, які розташовані у інтерстиції [18].

Сім'яні каналці містять дві різні популяції клітин: статеві клітини, що перебувають на різних етапах розвитку та клітини-годувальниці Сертолі, які підтримують сперматогенні клітини. На периферії сім'яного каналця локалізується базальна мембрана та кілька шарів перитубулярних міоїдних клітин. У проміжках між сім'яними каналцями розташовується строма органу, яка має назву інтерстицій або інтерстиційна тканина. Це основне місце органу, де локалізуються лімфатичні та кровоносні судини і клітини Лейдіга, а також різні імунні клітини макрофаги, тучні клітини, дендритні клітини та лімфоцити [18,27].

Крім того, сім'яносний епітелій поділений на два відділи: базальний та аблюмінальний. Межею, що розділяє ці два відділи є гемато-тестикулярний бар'єр. Сперматогонії та прелептотенні сперматоцити знаходяться в базальному відділі, тоді як інші первинні та вторинні сперматоцити, круглі сперматида та подовжені/видовжені сперматида знаходяться в адлюмінальному відділі. У ході сперматогенезу прелептотенові/лептотенові сперматоцити долають ГТБ та потрапляють в аблюмінальний відділ, як зиготенові сперматоцити. Основними клітинами, що формують ГТБ є клітини КС, а саме, щільні контакти між сусідніми КС. ГТБ відокремлює мітотичні клітини від мейотичних клітин [35].

Сперматогонії є найбільш незрілим типом статевих клітин. Це гетерогенна популяція включає сперматогоніальні стовбурові клітини (ССК), які здатні до самовідновлення для підтримання популяції СК та до проліферації клітин, які здатні до диференціації та мейозу, тобто ті які дають

початок прелептотеновим сперматоцитам. ССК є плюрипотентними та здатні давати початок трьом зародковим листкам. Розвиток сперматогоній є гормон-незалежним, а тому не потребує впливу гонадотропін-рилізінг гормону [39].

Сперматогонії гризунів зазвичай класифікують за їх морфологією та фенотипом на *недиференційовані*, до них відносять $A_{\text{одиначні}}$, $A_{\text{парні}}$, $A_{\text{вишикувані}}$ та на *диференційовані* (A_1 - A_4 , проміжні та тип В). $A_{\text{одиначні}}$ вважають справжніми, адже вони здатні давати початок фактичним ССК, $A_{\text{парні}}$, $A_{\text{вишикувані}}$ є потенційними ССК, оскільки вони беруть участь у проліферації лише за умови втрати фактичних ССК. Сперматогонії типу А демонструють дрібний ядерний хроматин з блідим фарбуванням, а сперматогонії типу В демонструють грубі накопичення хроматину поблизу ядерної мембрани та є більш диференційованими та готовими вступити у мейоз [15, 17, 39].

Мейоз починається, тоді, коли сперматогонії типу А втрачають зв'язок з базальною мембраною та переходять на стадію прелептотенових первинних сперматоцитів. Лептотенові первинні сперматоцити характеризуються наявністю у ядрі тонких ниток, тобто конденсованих хромосом. На стадії зиготени відбувається потовщення хроматид та спарювання гомологічних хромосом. Первинний сперматоцит пахітенової стадії характеризується збільшенням ядра та конденсацією гомологічних пар хромосом (бівалентів), на цій стадії відбувається кросинговер. Під час диплотени, гомологічні хромосоми (складаються з хроматид) трохи розходяться, стають помітними хіазми. Під час анафази хромосоми вишиковуються на веретені та розходяться до різних полюсів, таким чином утворюються нові дочірні клітини – вторинні сперматоцити з гаплоїдним числом хромосом, але диплоїдною ДНК. Круглі сперматиди утворюються після анафази та телофази другого мейотичного поділу. Пізніше круглі сперматиди через етап видовжених сперматид перетворюються на сперматозоїди. Процес перетворення сперматид на сперматозоїди називається сперміогенез. Сперміогенез складається з кількох

етапів: 1) ядерні перебудови (заміна гістонів на протаміни), 2) утворення акросоми, 3) реорганізація цитоплазми та органел, 4) утворення джгутика, 5) сперміація – процес вивільнення сперматозоїдів з КС [39].

Клітини Лейдіга локалізуються у проміжках між сім'яними каналцями та відповідають за вироблення статевих стероїдних гормонів. Стероїдогенна функція клітин Лейдіга (КЛ) суворо контролюється віссю гіпоталамус-гіпофіз-гонади і гіпофізарним гонадотропним лютеїнізуючим гормоном, який виділяється передньою часткою гіпофіза.

Зрілі КЛ ідентифікують як клітини полігональної форми, з еозинофільною цитоплазмою та великим круглим ядром з ядерцем. Цитоплазма клітин містить ліпідні краплинки та добре розвинений гладкий ендоплазматичний ретикулум, мітохондрії з трубчастими кристами та кристали Рейнке (характерно для приматів, морських свинок, але не для гризунів) [4].

Кристали Рейнке – це блідо-забарвлені кристали циліндричної або стрижнеподібної форми, функція яких залишається не відомою. Існує гіпотеза, що кристали Рейнке є побічними продуктами, що виникають у наслідок стероїдогенезу андрогенів, зокрема тестостерону [4,43].

У ссавців виділяють два типи клітин: *фетальні клітини Лейдіга* (ФКЛ), які мають місце на етапі розвитку плоду у організмі матері та *клітини Лейдіга дорослого організму* (ДКЛ) ті, що розвиваються до статевого дозрівання, також інколи виділяють третій тип – неонатальні клітини Лейдіга. Ці типи клітин мають певні відмінності. Було показано, що у гризунів ключовою відмінністю ФКЛ від ДКЛ є наявність великої кількості ліпідних крапель у ФКЛ порівняно з ДКЛ. Хоча в приматів та людини кількість ліпідних крапель зберігається у ДКЛ. Внутрішньоклітинні крапельки ліпідів є місцем зберігання холестеролу, який є субстратом для синтезу стероїдних гормонів. Крім того, ДКЛ експресують декілька генів, які не характерні для ФКЛ. Наприклад, 17 β -гідроксистероїддегідрогеназа типу 3 (ГСД 17 β 3), експресується у ДКЛ, але не у ФКЛ. Тому ДКЛ синтезують стероїдний гормон тестостерон, а ФКЛ

продукують андостендіон, оскільки не мають ферменту, який дозволяє перетворювати андостендіон на тестостерон. Однак існує компенсаторний механізм, коли у внутрішньоутробному періоді нестероїдні клітини Сертолі здатні продукувати фермент ГСД 17β 3 [19,43].

У гризунів після народження популяція ФКЛ регресує, у свою чергу, з пулу стовбурових клітин Лейдіга (СКЛ) утворюються ДКЛ.

Диференціація ДКЛ щурів відбувається у чотири послідовні етапи та пов'язані з морфологічними змінами клітин та їх стероїдогенною здатністю. Спочатку *стовбурові клітини Лейдіга (СКЛ)* диференціюються у веретеноподібні *клітини-попередники Лейдіга (КПЛ)*. Потім КПЛ перетворюються на круглі *незрілі клітини Лейдіга (НКЛ)*. У свою чергу, незрілі КЛ перетворюються на полігонально *зрілі дорослі клітини Лейдіга* [1].

Стовбурові клітини Лейдіга (СКЛ) мають веретеноподібну, фібробластоподібну мезенхімальну морфологію та не експресують специфічних маркерів, таких як рецептор лютеїнізуючого гормону (РЛГ) та стероїдогенних ферментів. Вони локалізуються поблизу сім'яних каналців, основні маркери, за якими можна ідентифікувати СКЛ є CD90 та Pdgfra. Диференціація СКЛ у КПЛ відбувається в присутності ЛГ, інсуліноподібного фактора росту 1 (ІФР1), Pdgfra, desert hedgehog (Dhh) та трийодтрироніну (ТЗ) [19,50].

У гризунів, перші КПЛ розвиваються між 10 та 13 днями після пологів. Ці клітини ідентифікуються за веретеноподібною морфологією, характеризуються обмеженою кількістю цитоплазматичних органел, залучених у виробництво стероїдів, здатні експресувати РЛГ, здатні брати участь у стероїдогенезі та на відміну від ДКЛ синтезують лише андростендіон та андростерон. При переході КПЛ в незрілі КЛ відбувається зниження експресії генів, що є регуляторами клітинного циклу Cell division cycle 25 (Cdc25) та Cdc20 генів, що кодують рецептори факторів росту Pdgfra та рецептор інтерлейкіну 6 [19,50].

На 28 день після пологів щуренят, при переході від КПЛ змінюється клітинна характеристика НКЛ та їх положення у інтерсиції. На цьому етапі, форма клітин змінюється від веретеноподібної до овальної. Ядра клітин стають великими і круглими з конденсованим гетеро хроматином, цитоплазма клітин містить добре розвинений апарат Гольджі, велику кількість тубуловезикулярних мітохондрій та дрібних ліпідних крапель, які зберігають холестерол. Клітини переходять від виробництва андостерону до андростендіону та андростендіолу. НКЛ порівняно з попередником має низьку здатність до поділу [19,50].

На 50 дня після пологів трансформація незрілих КЛ у зрілі ДКЛ у гризунів завершується. Зрілі КЛ збільшуються у розмірі та розташовуються переважно у центрі інтерстицію. Мають овальне або кругле ядро. Мітохондріальні комплекси та апарат Гольджі, також, збільшуються, а цитоплазма клітин має розширену мережу гладкого ендоплазматичного ретикулуму. Суттєвого зменшується кількість ліпідних крапель, як наслідок, зрілі ДКЛ змінюють джерело холестеролу та починають отримувати його з ліпотрофеїнів сироватки або *de novo* з ацетил коферменту А. Інтерстиціальні клітини у дорослому сім'янику мають низький мітотичний потенціал, але не повністю втрачають здатність до проліферації [19,50].

КЛ відіграють важливу роль у сперматогенезі, адже тестостерон який продукується КЛ необхідний для підтримання гемато-тестикулярного бар'єру (ГТБ), мейозу, адгезії між клітина Сертолі та сперматидами і для вивільнення сперми [1].

Роль тестостерону у ремоделюванні ГТБ. Як відомо, сперматогонії та прелептотенові сперматоцити знаходяться поза ГТБ, і для того, щоб подолати цей бар'єр на апікальній стороні сперматоцита мають розчинитися щільні контакти, а на базальній стороні утворитися. Тестостерон здатний впливати на андрогенові рецептори (АР) та сприяти транспорту білків від апікальної частини прелептотенових сперматоцитів до базальної. За відсутності тестостеронового стимулу АР експресія білків, що формують щільні контакти

(оклюдин та клаудин 3,11) зменшується. Отже, тестостерон забезпечує ремоделювання ГТБ та підвищує його динамічність [46].

За відсутності тестостерону мейоз зупиняється, максимально досягаючи стадії галоїдної сперматиди. Дефіцит тестостерону змінює понад 25 білків на рівні експресії та посттрансляційних модифікацій. Ці білки залучені до репарації ДНК, процесингу РНК, крім того, вони приймають участь у окислювальному метаболізмі та апоптозі клітин.

За недостатньої кількості тестостерону стадія подовжених сперматид, адже сперматиди від'єднуються від клітин Сертолі передчасно ще на стадії круглих сперматид. Це пов'язано з тим, що має відбутися перебудова адгезивних контактів на стадії при переході від круглих сперматид до видовжених. Саме на цьому етапі, десмосомні контакти, що існують між клітинами Сертолі та сперматидами замінюються міцним адгезивним комплексом ектоплазматичної спеціалізації. Тому за відсутності андрогенових рецепторів відбувається пригнічення експресія одного з восьми генів, що кодують білки комплексу ектоплазматичної спеціалізації [46].

Низький рівень тестостерону перешкоджає вивільненню сперматозоїдів та активує гени, які експресують білки, що відповідають за адгезію. У наслідок цього відбувається утримання та фагоциткування сперматозоїдів клітинами Сертолі [46].

Клітини Сертолі – це поляризовані епітеліальні клітини сім'яного каналця, які утворюють особливе мікрооточення, щільно охоплюючи статеві клітини та відповідаючи за їх живлення (забезпечення поживними речовинами і факторами росту) та структурну підтримку.

З точки зору морфології, клітини Сертолі є полігональними з кількома ниткоподібними відростками різної довжини, КС простягається від базального до аблюмінального відділу сім'яного каналця, тобто до просвіту каналця, охоплюючи клітини від сперматогоніальних клітин до сперматид. КС мають бліде базально розташоване ядро неправильної форми, особливо це помітно у порівнянні з сперматогоніями, які мають темні чіткі ядра округлої форми.

Нуклеоплазма, як правило, еухроматична і забарвлюється гематоксиліном у світло-блакитний колір через відносно невелику кількість гетерохроматину. КС мають добре помітне трироздільне ядерце (з сателітами), при фарбування гематоксиліном ядерце та його хромоцентри сильно базofilні, однак на більшості гістологічних препаратів помітно лише ядерцеве тіло без сателітів. Цитоплазму ледве впізнати, оскільки вона містить безліч сперматозоїдів та зародкових клітин, які домінують на мікроскопічному зображенні [17, 41, 53].

Дані електронної мікроскопії свідчать про те, що КС мають велику кількість переважно трубчастих мітохондрій, що свідчить про високу метаболічну активність, гладкий ендоплазматичний ретикулум, який відіграє важливу роль у метаболізмі ліпідів або стероїдів, велику кількість ліпідних крапель та комплекси міжклітинного сполучення.

Між КС та статевими клітинами існує ряд міжклітинних контактів: щільні контакти, десмосоми, ектопічна спеціалізація, щілинні контакти. Щільні контакти сформовані з структурних білків оклюдинів, клаудинів (1,5,11), нектинів, JAM-A, JAM-B, апікальна ектопічна спеціалізація складається з мультибілкових комплексів, важливим білком у цьому комплексі являється нектин – Ca^{2+} залежний інтегральний мембранний білок, а також з кадгеринів, катенінів, інтегринів, ламінінів, JAM-C, JAM-B. Зазвичай за допомогою апікальної ектопічної спеціалізації приєднуються подовжені сперматиди. Десмосомні контакти складаються з трансмембранних білків сімейства десмосомальних кадгеринів (десмоглеїн та десмоколін), які з'єднуються з проміжними філаментами через цитоплазматичні білки родин броненосці (плакоглобін, плакофілін) і плакіни (десмоплакін). Щілинні контакти формуються за участі конексинів. Десмосоми, ектопічна спеціалізація та щільні контакти зазнають певних реконструкцій під час сперматогенезу, вони здатні розбиратися та збиратися, такі властивості полегшують рух зародкових клітин. Зазвичай, ремоделювання міжклітинних контактів відбувається під впливом різних цитокінів [17, 21, 41, 48, 53].

Клітини Сертолі займають провідне місце у сперматогенезі, адже виконують ряд важливих функцій. Серед них: 1) Підтримка ССК; 2) Вступ сперматогоніїв у мейоз; 3) Підтримка щільних контактів між сусідніми КС, які формують ГТБ та сприяють нормальному розвитку статевих клітин; 4) виділяти білки та інші біомолекули, які необхідні для розвитку зародкових клітин та їх виживання під час мейозу та сперміогенезу; 5) Полегшують від'єднання сперматозоїдів під час спермації; 6) Фагоцитують залишкові тільця, які залишаються після трансформації сперматозоїдів, 7) Регуляція кількості КЛ [38,41].

1) Підтримка популяції ССК є важливим для підтримання постійного сперматогенезу. ССК зберігаються у спеціальному мікрооточення, яке називається «нішею». ССК розташовуються поруч з базальною мембраною контактуючи з КС та водночас знаходячись у близькому контакті з судинним компонентом, що локалізований у інтерстиції. Підтримка ніші здійснюється як за участі факторів, які виділяються лімфатичними ендотеліальними клітинами, наприклад, фактор FGF, так і КС, які під впливом ФСГ виробляють фактор GDNF, FGF_2 та інгібуючий фактор лейкемії (LIF) [38].

2) Було показано, що ретиноева кислота (РК) сприяє ініціації вступу сперматогоній у мейоз в постнатальному яєчку. Генерація постійних імпульсів секреції РК забезпечується, зокрема, за участі КС [38].

3) Гемато-тестикулярний бар'єр утворений сусідніми епітеліальними КС, що зв'язані між собою щільними контактами, цей молекулярний бар'єр виникає між шаром клітин сперматогоній (мітотичні клітини), які лежать на базальній мембрані та аблюмінальними мейотичними клітинами (сперматоцитами, сперматидами та сперматозоїдами). Однак, Linlin Su повідомляє, що ГТБ більшою-мірою у гризунів, також у приматів, людей складається з співіснуючих спеціалізованих з'єднань між клітинами Сертолі, які включають щільні контакти, десмосомні з'єднання, базальна ектопічна спеціалізація та щілинні контакти. Утворення та функціонування цих з'єднань регулюється ФСГ та тестостероном, що діють через рецептори, які

розташовані у КС. ГТБ перешкоджає міжклітинній дифузії молекул, пропускаючи лише рідину, електроліти та захищаючи клітини від потенційних токсичних речовин, крім того, ГТБ є важливим імунологічним бар'єром, який захищає мейотичні клітини від впливу імунної системи господаря, оскільки мейотичні клітини є фактично антигенами [23,35].

4) КС виробляють понад 60 білків, найважливішими серед них є гормони. Наприклад, антимюллерів гормон відповідає за регресію мюллерових проток внутрішньоутробно. Інгібін пригнічує вироблення фолікулостимулюючого гормону (ФСГ), тоді як активін пригнічує дію інгібіну, обидва виділяються після статевого дозрівання. Фолістатин, який є антагоністом активіну. Крім того, КС виробляють ряд факторів росту, які чинять як аутокринні та і паракринні ефекти. Секретований андрогензв'язуючий білок забезпечує високу концентрацію андрогенів у сім'яних каналцях, необхідних для дозрівання сперматозоїдів. Феритин, який відповідає за транспортування заліза з сироватки до статевих клітин. Клітинні залишки, які залишаються від сперматид при дозрівання сперматозоїдів фагоцитуються клітинами Сертолі. Цікаво, що КС також можуть фагоцитувати та вбивати бактерії [32].

5,6) Вихід сперматозоїдів залежить від виживання та розмноження статевих клітин. Підтримка статевих клітин, зазвичай, забезпечується КС, вони забезпечують метаболізм глюкози до лактату, експресію мРНК та білків, некодуєчих РНК, що необхідні для експресії білка. Оптимальний вихід сперматозоїдів регулюється ФСГ та андрогенами, але статеві клітини не мають рецепторів гормонів, а КС мають. Тому трансдукція сигналів до зародкових клітин передається через КС. Передача сигналів рецепторів андрогенів є необхідною для завершення мейозу. КС виконують контроль якості сперміїв та фагоцитують дефектні сперматиди [38].

7) КС виробляють паракринні фактори, які підтримують попередників ДКЛ та сприяють розвитку достатньої кількості зрілих КЛ [38].

Перитубулярні міоїдні клітини (ПМК) – гладком'язові клітини, які прилягають до базальної мембрани зі сторони інтерстиційної тканини, вони

виявляють скоротливі властивості, які стимулюються передачею сигналів Ca^{2+} . Основні функція ПМК сприяння просування сперматозоїдів з яєчка у сітчасте яєчко. Крім того, ПМК підтримують ССК та під впливом андрогенів синтезують фактори, які необхідні для нормального функціонування КС і статевих клітин [38].

Епідидиміс. Сітка яєчка (Rete testis) є перехідною зоною між яєчком та епідидимісом. Придаток яєчка є сильно звивистою протокою/трубкою, і для більшості видів його можна розділити на окремі анатомічні області: початковий сегмент, голівка, тіло, хвіст. Інтерстиційна тканина, яка оточує протоку, містить кровоносні судини, сполучнотканинні перегородки, які поділяють протоку на менші сегменти, лімфатичні судини, макрофаги та лімфоцити. Епідидимальний епітелій складається з кількох типів клітин, включаючи головні, базальні, апікальні, вузькі, гало та прозорі клітини. З функціональної точки зору, придаток відіграє кілька важливих ролей, включаючи дозрівання сперми, транспортування сперми та її захист, при цьому кожен сегмент придатка відіграє конкретну роль.

Крім того, подібно до сім'яників епідидиміс має гемато-епідидимальний бар'єр (ГЕБ), який важливий у регулювання мікросередовища всередині протоки, щоб забезпечити дозрівання сперми та захистити сперматозоїди від впливу імунної системи. ГЕБ подібно до ГТБ утворений щільними контактами між епітеліальними клітинами придатка яєчка та містить багато білків (клаудини, катеніни, конексини) [34].

У початковому сегменті високостовпчасті головні епітеліоцити відповідають за резорбцію води, також вони поглинають іони та малі органічні молекули. Основні клітини тіла беруть участь у секреції білка, які здатні адсорбуватися на мембрані сперматозоїдів та змінювати її білковий склад. Головні клітини у ділянці хвоста мають велику кількість ліпідів у над ядерній ділянці. Тому вони сприяють модифікації ліпідного компонента плазматичної мембрани сперматозоїдів. У хвостовій ділянці епітелій значно коротший на відміну від голови та тіла, крім того, тут переважають прозорі

клітини. Функція прозорих клітин полягаю у фагоцитозі цитоплазматичних крапель, які відділяються від сперматозоїдів, що досрівають [12].

1.3. Біорозподіл наночастинок у організмі щура

Ряд досліджень показали, що наночастинок, дійсно можуть досягати яєчок. Однак, доступна література з цього питання, стверджує, що яєчко не є найкращим органом для розподілу наночастинок, незалежно від типу частинок, тривалості впливу та застосованої методології [22].

Біорозподіл наночастинок може залежати від багатьох факторів, включаючи використану тваринну модель, фізико-хімічні характеристики частинок (розмір, форма, хімічний склад поверхні, схильність до агломерації, шлях і тривалість впливу, розчинник, який використовується при введенні НЧ. Однак, деякі з цих параметрів не достатньо вивчені. Найкраще вивчено вплив на біорозподіл за розміром, поверхневим зарядом, шляхом та тривалістю впливу. Однозначно, ці параметри відіграють ключову роль [22].

Qin та ін. протягом 28 днів перорально вводили наночастинок срібла, які покриті полівінілпіролідом, було показано, що найбільші концентрації наночастинок срібла локалізувалися у печінці (130 мкг/кг) та нирках (110 мкг/кг), що пов'язано з ключовою роллю цих органів у біологічному клірексі екзогенних речовин. Менші концентрації було виявлено у яєчках (50 мкг/кг) та селезінці (40 мкг/кг) [42].

Внутрішньовенне введення НЧ срібла розміром 14 нм та НЧ золота – 10 нм у концентраціях 10 мкг/кг/добу і 100 мкг/кг/добу протягом 4 тижнів експозиції, що більшість наночастинок золота та срібла розподіляються до печінки та селезінки. Десятинанометрові НЧ золота введені у високій дозі (100 мкг/кг) були присутні у різних органах у наступному порядку: печінка (3563 мкг/кг), селезінка (1866 мкг/кг), легені (183 мкг/кг), нирки (13 мкг/кг) та у дуже низьких концентраціях у мозку (0.2 мкг/кг), яєчках (0.1 мкг/кг) та крові (0.1

мкг/кг). НЧ срібла у низькій дозі розподілялися наступним чином: селезінка (681,9 мкг/кг), печінка (655,9 мкг/кг) , легені (11,6 мкг/кг), нирки (3.6 мкг/кг), мозок (2.5 мкг/кг), яєчка (1.9 мкг/кг) та кров (1.64 мкг/кг) [25].

Кілька досліджень взагалі не виявили наночастинок срібла та золота у яєчках. Nakkala та ін. за допомогою методу атомно-емісійної спектроскопія з зв'язаною плазмою визначали розподіл НС у різних життєво важливих органах: печінка, нирки, селезінка, легені, серце, яєчка та мозку щурів. Спочатку визначали на 29 день перорального введення НС, коли концентрація НС найвища та на 89 день, тобто коли НС повністю елімінують з організму. При концентрації 5 мг/кг маси тіла у жодному з органів не було виявлено НЧ срібла. З іншого боку, при концентрації 10 мг/кг маси тіла НС було виявлено лише у печінці (4,98 мкг/г) та селезінці (5,67 мкг/г). Однак на 89 день, срібло повністю вимивалося з організму. Для дослідження застосовували 32 нм НЧ срібла. Гістопатологічний аналіз не виявив значних змін при 5 та 10 мг/кг маси тіла у вище зазначених органах. Однак, при 10 мг/кг маси тіла НС було виявлено помірний ступінь набряку клітин та вакуолярної дегенерації у печінці, але ці зміни прийшли до норми після періоду виведення [36].

Lee разом з колегами досліджували розподіл наночастинок золота, які покриті аміном, карбоксилем або нейтральним поліетиленгліколем. Після одноразового внутрішньовенного введення 15 нанометрових НЧ золота дорослим мишам у концентрації 1 мг/кг, проводили вимірювання показників через певні проміжки часу починаючи від 30 хв та до 6 місяців. НЧ золота в основному розподілялися в печінці, селезінці та мезентеріальних лімфатичних вузлах, у той час, як у нирках, легенях, серці спостерігалися значно нижчі концентрації, а у яєчках і мозку виявили найнижчі. Наприклад, якщо порівнювати легені та сім'яники, то різниця між кількістю НЧ золота у органах, теж суттєва. Через 24 години після введення НЧ золота у легенях було виявлено 5000 нг на 1 г ваги органу, у той час, як у яєчках 30 нг [26].

Тестикулярний біорозподіл НЧ срібла було виявлено ще у одному дослідженні. Дослідники протягом 60 днів з проміжком кожні два дні вводили

НЧ розміром 80 нм у концентрації від 1.875 до 15 мкг/кг. Біорозподіл у яєчках було виявлено при дозі 7.5 мкг/кг та 15 мкг/кг. Концентрація НЧ срібла у яєчках відповідно становила 3.288 нг/г та 5.450 нг/г [29].

1.4. Вплив наночастинок на репродуктивну систему щурів та сперматогенез

Існуючі дослідження показали, що наночастинок здатні накопичуватися у передміхуровій залозі, придатку та яєчку. Однак, основними місцями у статевій системі, де накопичується значна кількість наночастинок залишається придаток та яєчко [52].

Доступні дослідження з цього питання повідомляють про негативний вплив наночастинок на репродуктивну систему. НЧ здатні впливати на морфологію та вагу сім'яників, рівень статевих гормонів, вони викликають цитотоксичність клітин сім'яного каналця, таким чином впливаючи на сперматогенез. НЧ здатні долати ГТБ та викликати зміни морфології сперматозоїдів, кількість та їх життєздатність. Вважається, що основним механізмом, що індукує репродуктивну токсичність є оксидативний стрес. Активні форми кисню здатні викликати пошкодження клітин та ДНК, змінювати експресію генів. Крім того, НЧ викликають апоптоз, некроз та збільшення розривів ДНК [5, 20, 22, 54].

У дослідженні Sleiman та ін. не було виявлено жодних змін у масі тіла та органів після перорального впливу 60 нанометрових НС срібла у дозах 15 та 50 мкг/кг у самців щурів. Ці дані узгоджуються з дослідженням Gromadzka-Ostrowska та ін., які не виявили зміни маси тіла щурів після внутрішньовенного введення 20 нанометрових НЧ срібла у концентраціях 5 і 10 мг/кг. Однак, нещодавне дослідження проведене Olugbodi та ін. виявило зменшення маси тіла у самців щурів після підшкірного введення НЧ срібла

протягом 28 денного проміжку у концентрації 50 мг/кг, а відносно зменшення маси яєчок і придатку було виявлено після семи днів впливу [16, 40,45].

Пероральний вплив НС срібла покритих полівінілпіролідон (ПВП) НЧ срібла на сім'яники щурів показали збільшення аномалій сперматозоїдів при 100 мг/кг протягом 90 днів. Спостерігалися такі основні аномалія як: бананова голівка, зігнутий хвіст, відокремлена голова. Збільшення аномалій шийки сперматозоїдів виявили при концентрації НЧ 50 мг/кг. При концентрації 200 мг/кг спостерігалася тенденція до зниження життєдіяльності сперматозоїдів. Крім того, було виявлено незначне збільшення десквамації у просвіті сім'яних каналців. У придатку яєчка не було виявлено жодних змін епідимальних проток, вакуолізації епітелію або клітинних змін [24].

Внутрішньовенне введення НЧ золота мишам спричинили значне збільшення морфологічних відхилень сперматозоїдів. Переважаючими аномаліями виявилися деформації голівки, вигини та переломи шийки, зігнуті хвости сперматозоїдів у групах, які отримали 40 та 200 мкг/кг/день протягом 35 днів введення. Крім того, у експериментальній групі було виявлено погіршення якості хроматину: погіршення ремоделювання хроматину, наявність великої кількості гістонів, дефіцит протамінів, як наслідок підвищення нестабільності хроматину та пошкодження ДНК [37].

Fathi та ін. у своєму дослідженні застосували одноразове введення НЧ розміром 60-80 нанометрів у концентраціях 30,125,300 мг/кг дорослим щурам самцям Wistar. Було виявлено значні відмінності у експериментальній групі, яка отримала дозу 300 мг/кг у нормальній морфології та кількості сперматозоїдів, однак, відмінностей у рухливості виявлено не було. Спостерігалосся значне зниження сперматогоній, КС, КЛ при дозах 125 та 300 мг/кг, але кількість сперматоцитів та сперматид між групами не відрізнялися. Крім того, дослідники виявили зменшення діаметра сім'яних каналців та середньої площі сім'яних каналців при дозі 125 мг/кг. Стан хроматину у всіх групах був задовільним, без змін [13].

Токсичність НЧ залежить від дози та часу впливу. Вплив НЧ срібла у низьких (100 мг/кг/день) та високих (1000 мг/кг/день) концентраціях протягом 7 днів викликав застій кровоносних судин, відшарування сперматогенного епітелію від базальної мембрани та ацидофільний вакуолізований гіаліновий матеріал у інтерстиції у дорослих щурів-альбіносів, коли вплив було збільшено до 28 днів, то спостерігалось зменшення товщини зародкового епітелію, що вистилає деякі сім'яні каналці, злуцнення сперматогенних клітин з вакуолізованою цитоплазмою та ацидофільний вакуолізований гіаліновий матеріал [3].

У дослідженні Thakur та ін. було виявлено значні гістопатологічні зміни. У щурів яких годували НЧ срібла протягом 90 днів в концентрації 20 мкг/кг/день спостерігалася дезорганізація нормального вигляду яєчка з різною мірою атрофії сім'яних каналців. Сперматогенні клітини піддавалися дегенерації або апоптозу, особливо вражались сперматоцити і сперматиди, відбувалося відшарування зародкових клітин, у просвітах каналців були дуже низька кількість сперматозоїдів. Фактично, сім'яні каналці більшою мірою містили лише сперматогонії та підтримуючі епітеліальні клітини [51].

Пероральне введення 70 нанометрових НЧ срібла щурам Wistar протягом 45 днів з 12 годинним інтервалом продемонструвало значне зниження кількості клітин Лейдіга при концентрації 25 мг/кг та 50 мг/кг, і ще більш знижену кількість КЛ при 100 мг/кг та 200 мг/кг. Також, було помічено деякі зміни у рівні статевих гормонів. Рівень ФСГ було трохи знижено, але не суттєво. Рівень ЛГ підвищено при 50 мг/кг, 100 мг/кг та максимальний рівень при 200 мг/кг. Достовірно знижувався рівень тестостерону у експериментальній групі при 50 мг/кг, 100 мг/кг, 200 мг/кг [6].

Ще одне дослідження виявило зміни гормонального балансу статевих гормонів. Підшкірно вводили 100 нанометрові НЧ срібла щурам протягом 7 та 28 днів у концентрації 10 та 50 мг/кг маси тіла. Спостерігалось значне зниження рівнів тестостерону, ЛГ та ФСГ, підвищення дози НЧ призводило до ще більшого зниження рівня статевих гормонів [40].

Рівень тестостерону був значно підвищеним у самців щурів, коли НЧ золота вводили внутрішньочеревно у концентраціях 25, 50 та 100 мг/кг. Крім того, через 10 днів після початку введення у самців спостерігалось значне підвищення ЛГ і ФСГ [7].

Проте варто відзначити, що під час препубертатного розвитку самців щурів Wistar рівні ФСГ, ЛГ і тестостерону не змінювалися після щоденного впливу НЧ срібла у дозах 15 і 30 мкг/кг [30].

Отже, не зважаючи на значні переваги використання НЧ у житті людини, важливою залишається проблема впливу НЧ на репродуктивне здоров'я. Тому, поточне дослідження, має на меті оцінити ризики токсичності НЧ на репродуктивну систему тварин.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Отримання та фізико-хімічні властивості наночастинок

Отримання та дослідження фізико-хімічних характеристик наночастинок проводили співробітники Інституту фізичної хімії ім. Писаржевського к.х.н. Андрюшина Н.С та к.х.н Гродзюк Г.Я.

Синтез наночастинок Au проводили у лужному середовищі в присутності стабілізатора натрій поліфосфату, шляхом відновлення розчину тетрахлораурату (III) золота аскорбіновою кислотою. Суть полягала в тому, що до водного розчину NaAuCl_4 , додавали водні розчини натрій поліфосфату, гідроксиду натрію та аскорбінової кислоти у наступних концентраціях: 1 ммоль/л NaAuCl_4 , 0,25 ммоль/л натрій поліфосфату, 0,1 ммоль/л NaOH та 1 ммоль /л аскорбінової кислоти. Кожен з робочих розчинів готували з використанням двічі дистильованої води, при інтенсивному перемішуванні протягом не менше 10 хв.

Синтез наночастинок Ag проводили у лужному середовищі в присутності стабілізатора натрій поліфосфату, шляхом відновлення розчину аргентум (I) нітрату аскорбіновою кислотою. Суть полягала в тому, що у двічі дистильованій воді готували окремо 2 робочі розчини. Один з розчинів готували шляхом змішування 4,6 мл дистильованої води з 0,2 мл водного розчину AgNO_3 концентрацією 0,1 моль/л та 0,025 мл натрій поліфосфату у концентрації 0.1 моль/л. Суміш розчинів інтенсивно перемішували. Інший розчин готували шляхом додавання до 5 мл дистильованої води 0,1 мл аскорбінової кислоти та NaOH концентраціями моль/л. На наступному етапі, отримані два розчини, змішували та продовжували інтенсивно перемішувати.

Оцінку фізико-хімічних властивостей приготовлених розчинів НЧ здійснювали спектроскопічними та електронномікроскопічними методами. Дослідження проводили при напрузі 5-20 кВ з використанням растрової

електронної мікроскопії і мікроскопа LMU Mira 3 (Чеська Республіка), крім того, мікроскоп був оснащений приставкою Oxford X- MAX 80 мм (Oxford Instruments США), який необхідний для енергодисперсійної спектроскопії. Спектрофотометр Specord 210 використовували для реєстрації спектрів поглинання. Дослідження за допомогою методу лазерної фотокореляційної спектроскопії здійснювали при 25 С. на обладнанні Zeta Siver Nano S (Malvern, Великобританія) та лазерного гелій-неонового опромінення при довжині хвилі 633 нм.

У наслідок проведених досліджень, отримали розчин з НЧ срібла та золота у розмірному діапазоні 8-12 нм з ζ –потенціал -19,8 мВ для наночастинок срібла та -30,5 мВ для наночастинок золота.

Таблиця 2.1

Характеристики наночастинок срібла та золота

Тип наночастинок	Діаметр наночастинок, нм	Дзета-потенціал, мВ
НЧ срібла	8-12	-19,8
НЧ золота	8-12	-30,5

2.2. Тварини, які були задіяні у експерименті

У це дослідження було включено 12 здорових, статевозрілих самців щурів *Rattus norvegicus* віком 6 місяців. Тварин утримували у чистих клітках з природнім освітленням та при кімнатній температурі, з вологістю повітря 50-60 %. Самці мали вільний доступ до водопровідної води та гранульованого корму. Поводження з тваринами відповідало відповідним рекомендаціям щодо догляду та використання лабораторних тварин, етичним принципам, згідно до вимог Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для дослідних та інших наукових цілей.

2.3. Експериментальний дизайн

Досліджуваних щурів випадковим чином розподілили на чотири групи (по три тварини у кожній групі), описаних нижче:

1. I група тварин (контрольна): які отримували 0,9 % фізіологічний розчин у дозі 0.5 мл/ 0.1 кг маси тіла протягом 7 днів
2. II група тварин (поліфосфат натрію): які отримували 0,25 ммоль/л водний розчин натрію поліфосфату (NaPO_3)_n у дозі 0.5 мл/ 0.1 кг маси тіла протягом 9 днів.
3. III група тварин (наночастинки срібла): які отримували розчин наночастинок срібла у дозі 0.5 мл/ 0.1 кг маси тіла протягом 9 днів.
4. IV група тварин (наночастинки золота): які отримували розчин наночастинок золота у дозі 0.5 мл/ 0.1 кг маси тіла протягом 9 днів.

Всі розчини, включаючи фізіологічний розчин, поліфосфат натрію, наночастинки срібла та золота вводили внутрішньочеревним шляхом.

2.4. Гістологічне дослідження

Щурів умертвляли на наступний день після останнього введення. Яєчка розсікали одразу після умертвіння. Сім'яники та придаток переносили у фіксатор Буена та витримували протягом 24 год, зневоднювали в зростаючому рівні етанолу (70 %, 80 %, 90 % та 96%), очищали ксилолом та заливали у парафіновий віск, готували шматочки розміром 5 мкм за допомогою роторного мікротома. Депарафіновані зрізи фарбували гематоксиліном Бемера та еозином. Спостереження проводили за допомогою оптичного мікроскопа Olympus BX51 (Olympus, Японія) оснащеного цифровою камерою Camedia C-5050 zoom та програмного забезпечення Olympus DP Soft 3.2. Препарати спочатку спостерігали під 100-кратним збільшенням для спостереження за

загальною архітектонікою органів. Далі під 400-кратним збільшенням для більш детального аналізу архітектури сім'яних каналців.

Для оцінки гістопатологічних змін, готували три скельця для кожної тварини та досліджували на ознаки дегенерації зародкових клітин, включаючи: відокремлення зародкових клітин (поява відриву когорт сперматоцитів від сім'яного епітелію), злушення (вивільнення кластерів зародкових клітин у просвіт сім'явиносних каналців), вакуолізація (поява порожніх просторів у сім'яних каналцях).

Середні відсотки розраховували для кожного зразка шляхом ділення кількості круглих каналців з гістопатологічним індексом (відокремлення, вакуоляризація, злушення) або нормальних каналців у випадковому мікроскопічному полі на загальну кількість круглих каналців у тому самому полі та результат помножений на сто.

2.5. Оцінка сперматогенезу

Зрілість зародкового епітелію оцінювали за допомогою бального методу Джонсона. У цьому методі, кожний каналець отримав оцінку від одного до десяти. Канальці з повною неактивністю оцінювали як 1, а каналці з максимальною активністю отримав 10 балів. Оцінювали 30 каналців на кожне яєчко, і кожному каналцю було присвоєно оцінку від 1 до 10 на основі наявності або відсутності типів зародкових клітин у сім'яних каналцях яєчка, таких як сперматозоїди, сперматиди, сперматогонії, клітини Сертолі [11, 49].

**Гістологічна класифікація поперечних зрізів сім'яних каналців
відповідно до бальної системи Джонсена**

Оцінка	Опис
10	Повний сперматогенез з великою кількістю сперматозоїдів. Зародковий епітелій має рівну товщину, залишаючи відкритий простір.
9	Присутньо багато сперматозоїдів, але зародковий епітелій дезорганізований із помітним злуцненням або облітерацією просвіту.
8	У розрізі присутні лише кілька сперматозоїдів.
7	Сперматозоїдів немає, але є багато сперматид.
6	Сперматозоїдів немає, присутні лише кілька сперматид.
5	Ні сперматозоїдів, ні сперматид, але присутні кілька або багато сперматоцитів.
4	Лише кілька сперматоцитів і відсутні сперматиди або сперматозоїди.
3	Сперматогонії є єдиними наявними статевими клітинами.
2	Немає статевих клітин, але присутні клітини Сертолі.
1	У трубчастому відділі немає клітин

2.6. Морфометричне дослідження

Зрізи забарвлені гематоксиліном Бемера та еозином спостерігали під мікроскопом Carl Zeiss Primo Star (Carl Zeiss Microimaging GmbH, ФРН) оснащеного камерою Tucsен 5.0 MP (Tucsен Photonics, КНР) та програмного забезпечення TSView7 (Fuzhou Tucsен Imaging Technology Co., Ltd). Відповідно було здійснено фотофіксацію мікропрепаратів для подальшого здійснення морфометричних вимірів. Було зроблено мікрофотографії на

збільшенні 100, які дозволили порахувати діаметри сім'яних каналців та висоту головних епітеліоцитів придатку та на збільшенні 400, які дозволили порахувати площі поперечного перерізу клітин Сертолі та клітин Лейдіга. Аналіз лінійної морфометрії сім'яних каналців проводили шляхом визначення діаметра сім'яних каналців (коротший діаметр каналця, що виміряється від базальної мембрани однієї сторони каналця до базальної мембрани протилежної сторони.) Морфометричний аналіз придатку яєчка проводили на зразках тіла епідидимісу, отриманих із 10 випадкових гістологічних поперечних зрізів від кожної тварини (3 щурі в кожній групі). Висоту епітелію придатка вимірювали шляхом спостереження на збільшенні 400.

Вимірювання проводили за допомогою комп'ютерного програмного забезпечення Image J 1.42 (NIH, США)

2.7. Статистичний аналіз

Статистичний аналіз проводили за допомогою програмного забезпечення Statistica 10.0 (StatSoft, США). За допомогою критерію Ліліфора здійснювати перевірку цифрових даних на нормальність розподілу, а за допомогою критерію Левена – рівність вибірових дисперсій. Результати груп тварин II (поліфосфат натрію), III (наночастинки срібла), IV (наночастинки золота) порівнювали з контролем. Оскільки дані підпорядковані нормальному розподілу, а кількість груп становила три, то для оцінки достовірності використовували модифікацію t-критерію Стьюдента критерій Даннета з однофакторним дисперсійним аналізом.

Результати представляли у вигляді середнього арифметичного \pm стандартна похибка середнього арифметичного ($M \pm m$). Достовірність різниці між групами, виявляли при рівні значущості $p \leq 0.05$

РОЗДІЛ 3.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ

3.1. Гістологічне дослідження

На рис. 3.1 показано гістологічне дослідження контрольної групи (рис. 3.1А), паренхіма яєчка представлена нормальними звивистими сім'яними каналцями округлої або овальної форми, які відокремлені від інтерстиційної сполучної тканини (клітини Лейдіга та кровоносні капіляри) базальною мембраною. Сперматогенний епітелій представлений щільно упакованими зародковими клітинами, які перебувають на різних етапах зрілості: сперматогонії, сперматоцити I та II порядку, круглі сперматиди, які огортаються клітинами Сертолі та сперматозоїдами.

Клітини Сертолі виглядали як подовжені клітини з неправильними, слабо вираженими контурами та овальними базальними ядрами. Сперматогонії лежали на базальній мембрані і мали маленькі темні ядра. Сперматоцити виглядали як великі клітини з великими округлими або овальними ядрами. Сперматиди спочатку виглядали округлими з центральними округлими ядрами і поступово вони перетворювалися на подовжені сперматиди, які формували сперматозоїди з характерною для них формою. У проміжках між каналцями присутні скупчення клітин овальної та багатокутної форми та сферичними ядрами, що представляють клітини Лейдіга.

Гістологічна будова сім'яних каналців у групі поліфосфат натрію (рис.3.1Б) була подібною до контрольної групи (рис 3.1А).

У групі НЧС (рис. 3.1В) не виявлено значних гістологічних відмінностей, не спостерігалось вакуоляризації, багатоядерності та злушення статевих клітин.

У групі НЧЗ (рис 3.1Г) не спостерігалось вакуоляризації чи злушення зародкових клітин.

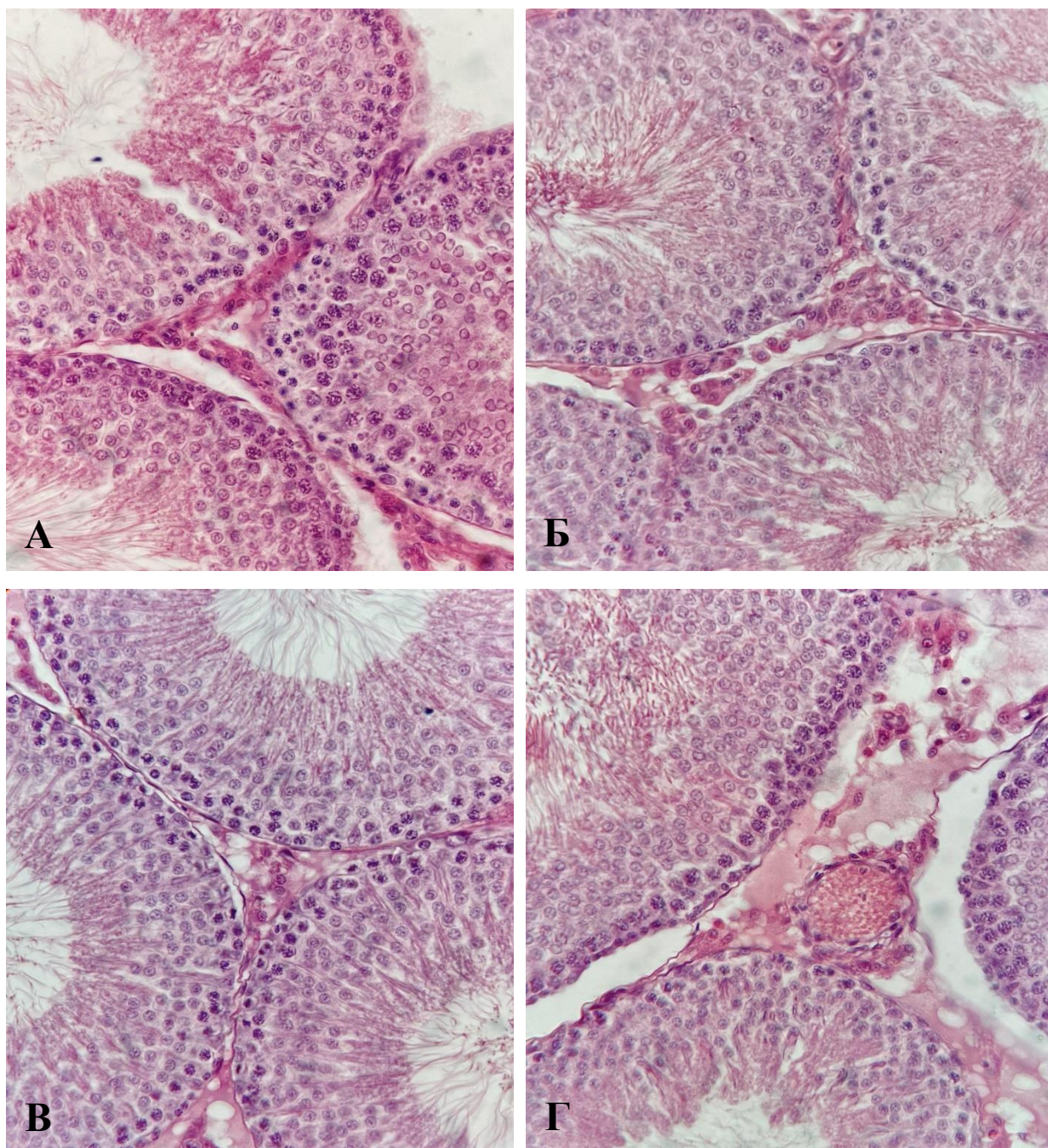


Рис 3.1 Мікрофотографія мікроскопічного вигляду звивистих сім'яних каналців дорослих щурів після введення фізіологічного розчину (А), поліфосфату натрію (Б), наночастинок срібла (В) та наночастинок золота (Г). (зabarвлення гематоксиліном Бемера та еозином, Об. х 40, Ок. х 10)

На рис 3.2 А,Б чорними стрілочками продемонстровані ядра клітин Сертолі. Клітини Сертолі мають бліде базально розташоване ядро овальної та неправильної форми, особливо це помітно у порівнянні з сперматогоніями,

які мають темні чіткі ядра овальної форми. Нуклеоплазма еухроматична і забарвлюється гематоксиліном у світло-блакитний колір через відносно невелику кількість гетерохроматину. КС мають добре помітне базофільне ядро. Цитоплазму ледве впізнати, оскільки вона містить безліч сперматозоїдів та зародкових клітин, які домінують на мікроскопічному зображенні.

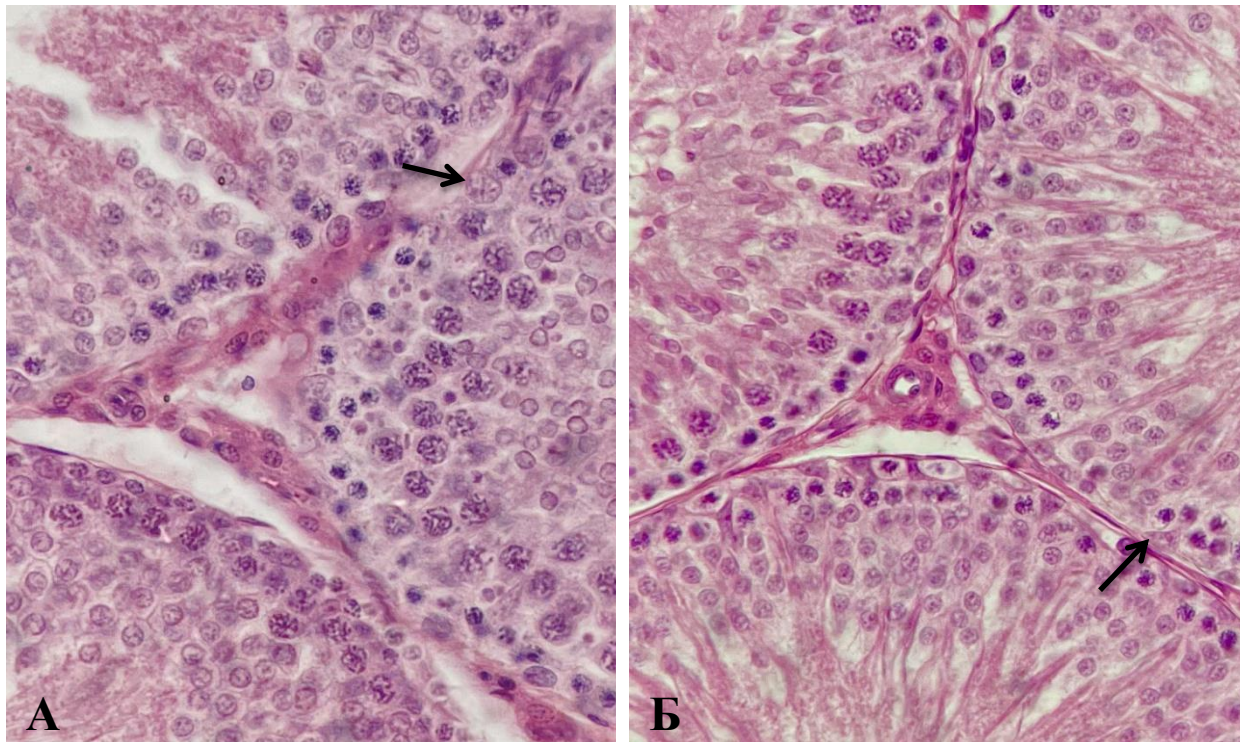


Рис 3.2 Мікрофотографії сперматогенного епітелію звивистих сім'яних каналців дорослих щурів при введенні фізіологічного розчину (А) та наночастинок срібла (Б). Чорні стрілки демонструють ядра клітин Сертолі. (зabarвлення гематоксиліном Бемера та еозином, Об. х 40, Ок. х 10).

На рис. 3.3 А,Б оранжевими стрілочками вказано на ядра клітин Лейдіга, які ідентифікуються як клітини полігональної форми, з еозинофільною цитоплазмою та великим круглим ядром. Візуально, між КЛ контролю та групою НЧ золота, жодних відмінностей не спостерігається.

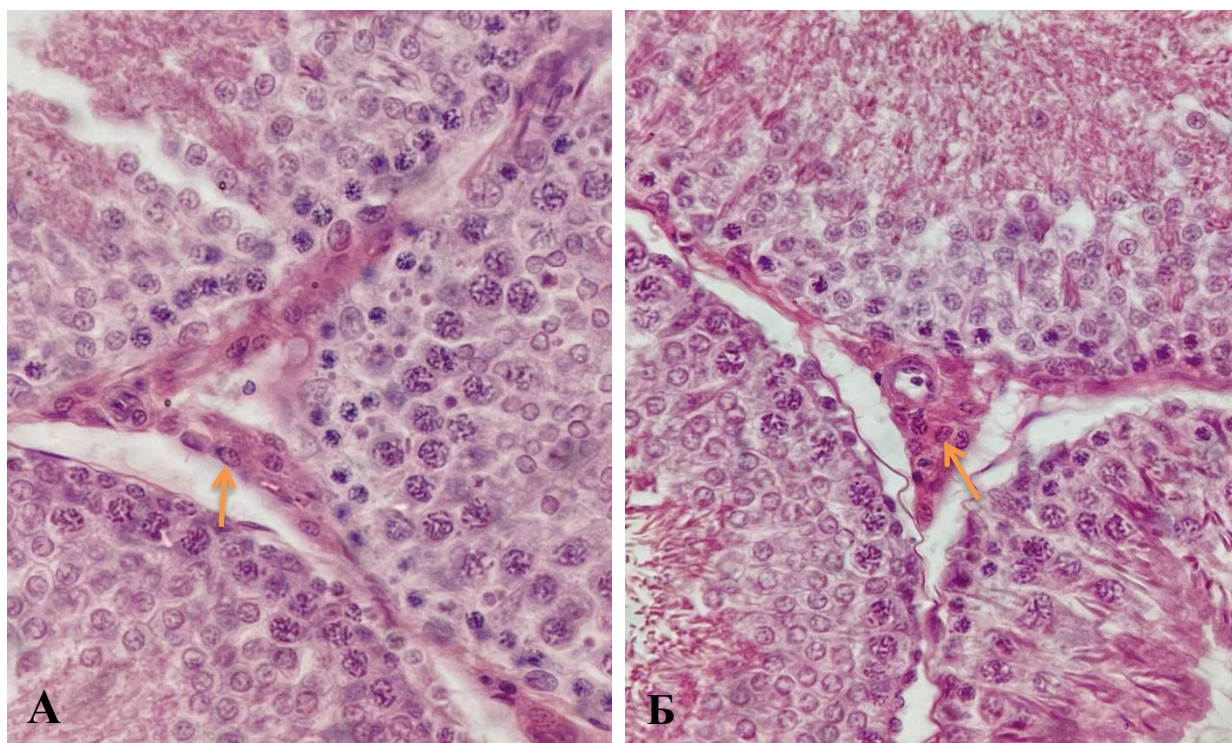


Рис 3.3 Мікрофотографії сперматогенного епітелію звивистих сім'яних каналців дорослих щурів при введенні фізіологічного розчину (А) та наночастинок золота (Б). Оранжеві стрілки демонструють ядра клітин Лейдіга (забарвлення гематоксиліном Бемера та еозином, Об. х 40, Ок. х 10)

На рис. 3.4 та 3.5 представлені мікрофотографії придатка яєчка у ділянці тіла. На рис. 3.4А та 3.5А вказано на контрольну групу. У групі контроль спостерігається нормальний складний багат шаровий епітелій, який представлений, в основному, головними і прозорими клітинами та ін. У просвіті протоки придатку була присутня достатня кількість сперматозоїдів.

Гістопатологічний аналіз після введення НЧС та НЧЗ не виявив суттєвих відмінностей в групах НЧС (рис. 3.4Б) та НЧЗ (рис. 3.5Б). У жодній з груп не було виявлено вакуоляризацію епітелію, дезорганізацію епітелію, наявність клітинного сміття чи злуцнення епітеліальних клітин у просвіт протоки.

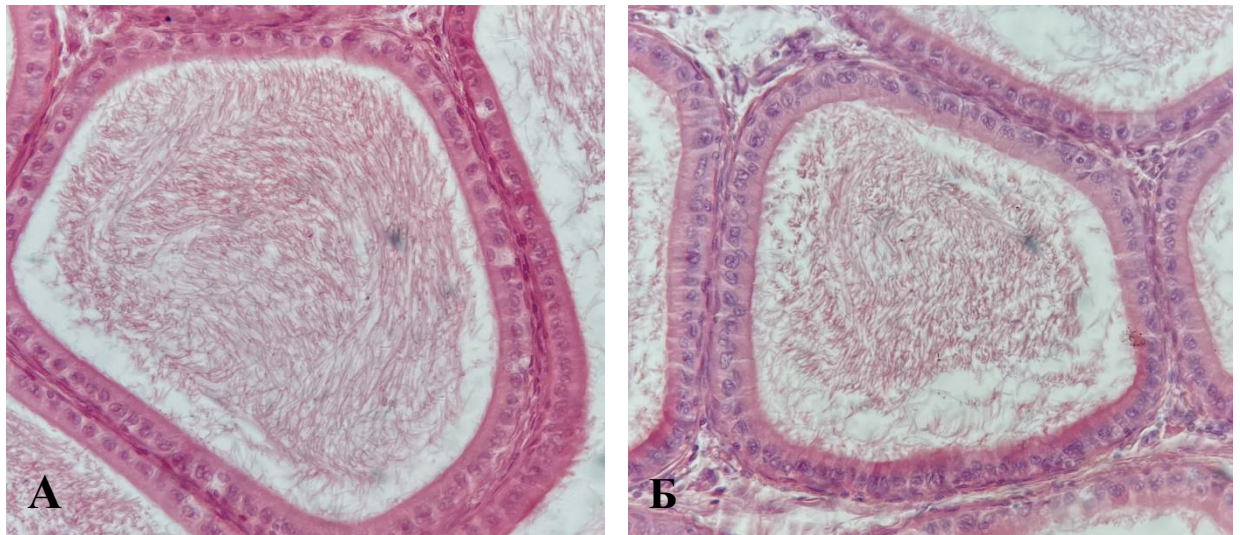


Рис 3.4 Мікрофотографії епітелію придатка сім'яника у ділянці тіла при введенні фізіологічного розчину (А) та наночастинок срібла (Б). Епідимальні протоки з великою кількістю сперматозоїдів у просвіті (зabarвлення гематоксиліном Бемера та еозином, Об. х 40, Ок. х 10)

На рис. 3.5 спостерігається нормальна кількість головних та прозорих клітин. У просвіті протоки велика кількість сперматозоїдів.

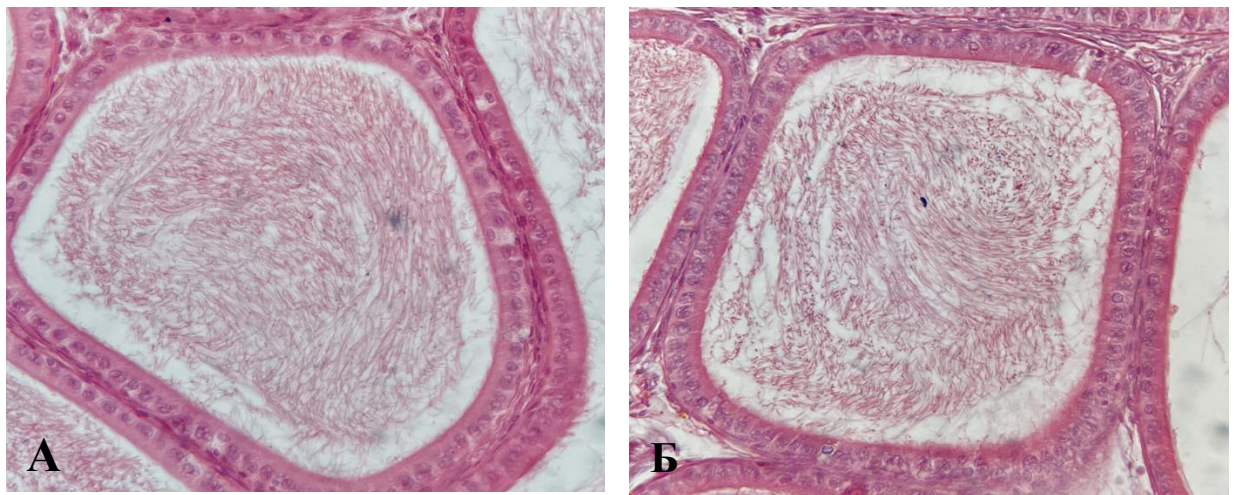


Рис. 3.5 Мікрофотографії епітелію придатка сім'яника у ділянці тіла при введенні фізіологічного розчину (А) та наночастинок золота (Б). (зabarвлення гематоксиліном Бемера та еозином, Об. х 40, Ок. х 10)

Однак, в проміжках між каналцями у інтерстиційній тканині у групах НЧС та НЧЗ було виявлено запальні інфільтрати (рис. 3.6). Зазвичай, запальний інфільтрат, представлений такими імунними клітинами як: нейтрофіли та лімфоцити. Звичне місце утворення запальних інфільтратів інтерстиційна тканина або прилегла жирова тканина у тварини.

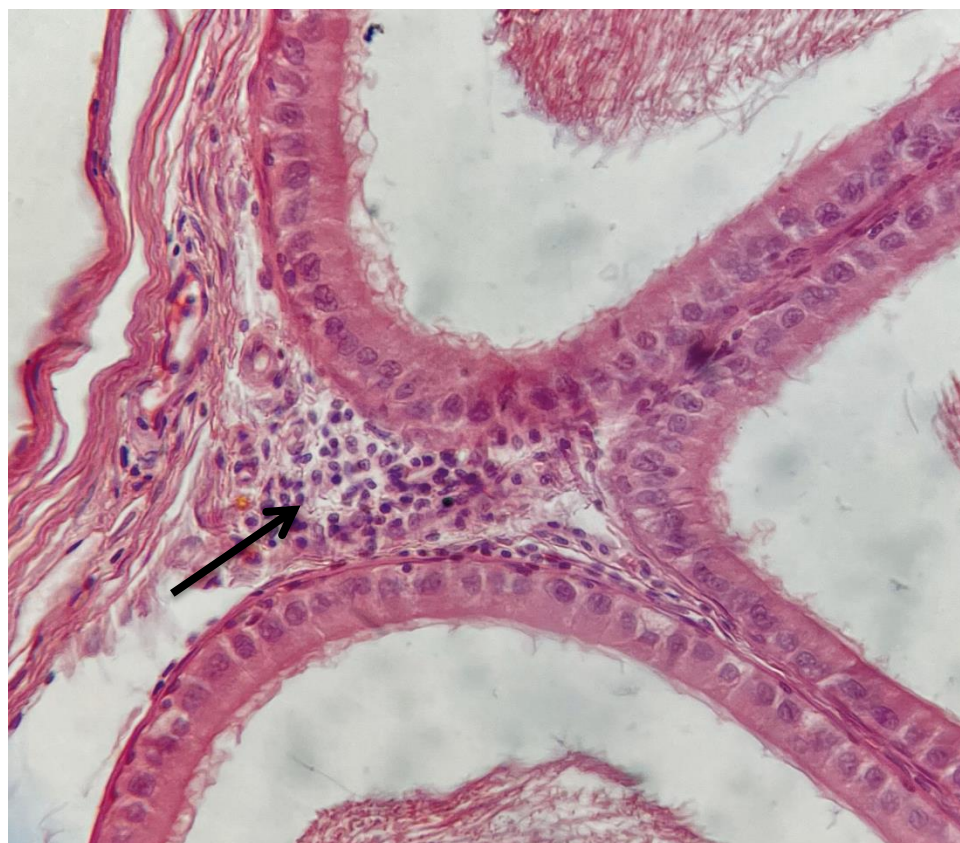


Рис. 3.6 Запальний інфільтрат у інтерстиційній тканині придатка яєчка при введенні наночастинок срібла. (зabarвлення гематоксиліном Бемера та еозином, Об. х 40, Ок. х 10). Чорною стрілочкою позначено запальний інфільтрат.

3.2. Морфометричне дослідження

Статистичний аналіз виявив незначне збільшення діаметра сім'яних каналців у групі «поліфосфат натрію», який використовувався у якості стабілізатора НЧ ($309,38 \pm 2,39$ мкм у групі контроль проти $311,08 \pm 2,26$ мкм у групі ПФН; $p < 0.05$).

Крім того, після введення НЧ срібла та НЧ золота, також, було виявлено не суттєве збільшення діаметра сім'яних каналців ($309,38 \pm 2,39$ мкм у групі контроль проти $312,98 \pm 2,74$ мкм у групі НЧС; $p < 0.05$) та ($309,38 \pm 2,39$ мкм у групі контроль проти $315,19 \pm 2,53$ мкм у групі НЧС;

$p < 0.05$) Однак, статистично значущих відмінностей між всіма групами не спостерігалось.

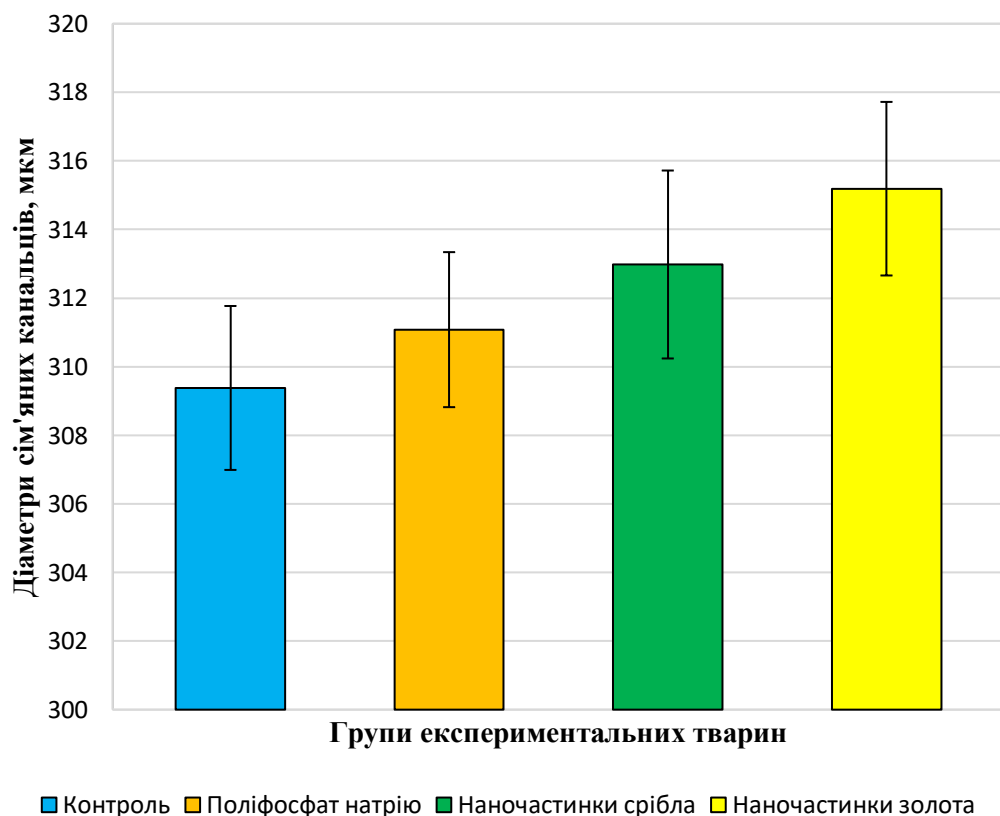


Рис 3.7 Результати статистичного аналізу морфометричних вимірів діаметрів сім'яних каналців. Дані представлені у вигляді середнього арифметичного \pm стандартна похибка середнього арифметичного ($M \pm m$).

Достовірні відмінності між дослідними групами не виявлено, $p > 0.05$

Статистичний аналіз площі поперечних перерізів ядер клітин Лейдіга виявив деякі відмінності. Між групами «контроль» та «ПФН» не було виявлено суттєвих відмінностей ($28,49 \pm 0,35$ мкм у групі «контроль» проти $27,14 \pm 0,33$ мкм у групі ПФН; $p < 0.05$).

Достовірні відмінності спостерігалися між група «контроль» та «НЧС» ($28,49 \pm 0,35$ мкм у групі контроль проти $24,17 \pm 0,39$ * мкм у групі НЧС; $p < 0.05$), «НЧЗ» ($28,49 \pm 0,35$ мкм у групі контроль проти $23,33 \pm 0,39$ *мкм у групі НЧЗ; $p < 0.05$).

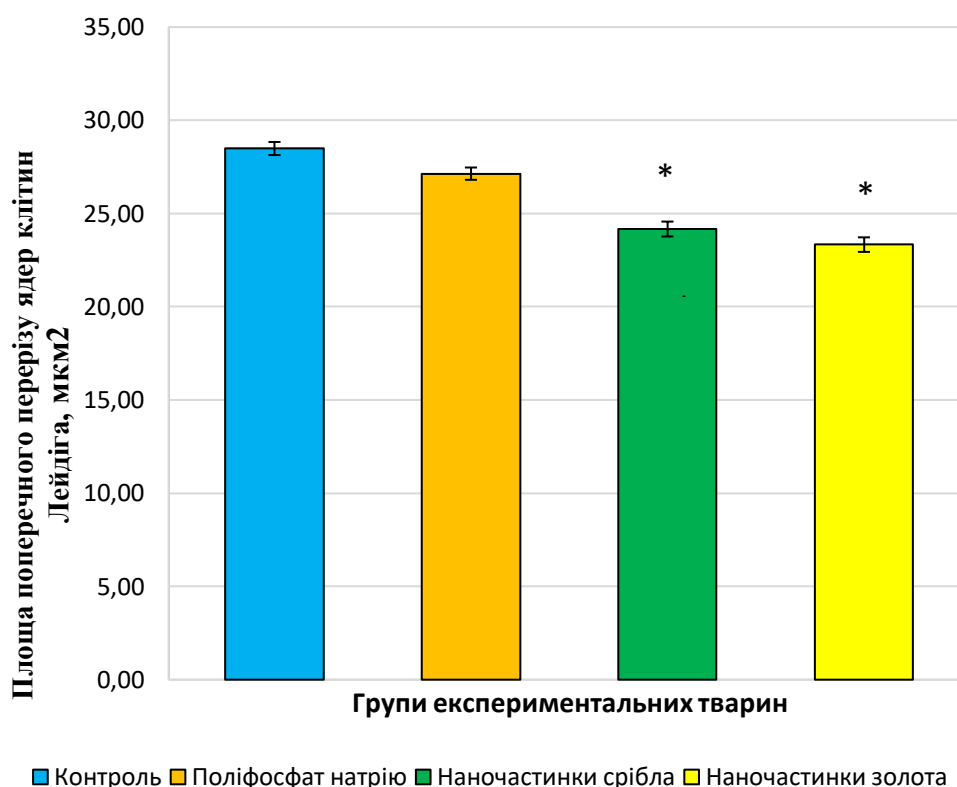


Рис 3.8 Результати статистичного аналізу морфометричних вимірів площі поперечних перерізів ядер клітин Лейдіга. Дані представлені у вигляді середнього арифметичного \pm стандартна похибка середнього арифметичного ($M \pm m$).

* - відмінності достовірні відносно групи «Контроль» при $p < 0.05$

Статистичний аналіз площі поперечних перерізів ядер клітин Сертолі виявив певні відмінності. Між групами «контроль» та «ПФН» спостерігалось не суттєве зменшення площі поперечних перерізів ядер КС ($64,13 \pm 1,07$ мкм у групі «контроль» проти $62,56 \pm 0,91$ мкм у групі ПФН; $p < 0.05$).

Значні достовірні відмінності спостерігалися між групою «контроль» та «НЧС» ($64,13 \pm 1,07$ мкм у групі контроль проти $59,85 \pm 0,91$ * мкм у групі НЧС; $p < 0.05$), «НЧЗ» ($64,13 \pm 1,07$ мкм у групі контроль проти $59,56 \pm 1,02$ * мкм у групі НЧЗ; $p < 0.05$).

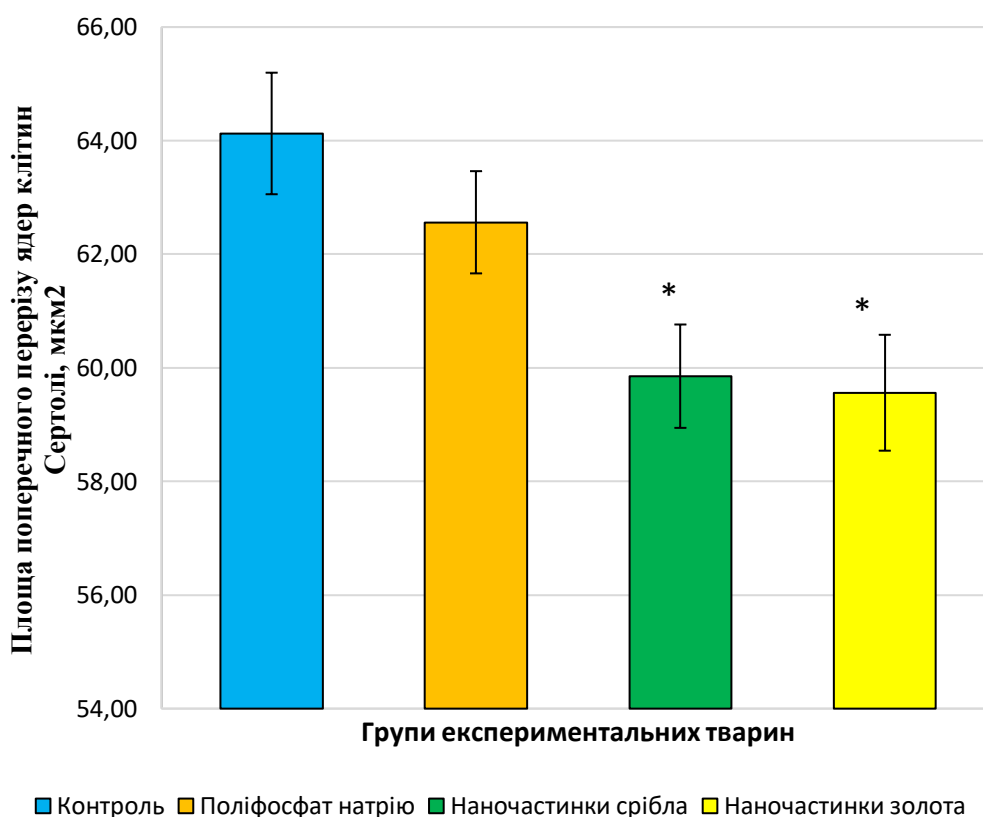


Рис 3.9 Результати статистичного аналізу морфометричних вимірів площі поперечних перерізів ядер клітин Сертолі. Дані представлені у вигляді середнього арифметичного \pm стандартна похибка середнього арифметичного ($M \pm m$).

* - відмінності достовірні відносно групи «Контроль» при $p < 0.05$

Аналіз статистичних даних між експериментальними групами продемонстрував статистично значуще зниження висоти головних епітеліоцитів після введення НЧ срібла ($16,36 \pm 0,35$ мкм у групі контроль проти $13,74 \pm 0,17$ *мкм у групі НЧС; $p < 0.05$) та золота ($16,36 \pm 0,35$ мкм у групі контроль проти $13,57 \pm 0,17$ * мкм у групі НЧЗ; $p < 0.05$).

Між групою «контроль» та «ПФН» достовірної різниці не було виявлено ($16,36 \pm 0,35$ мкм у групі контроль проти $15,87 \pm 0,18$ мкм у групі ПФН; $p < 0.05$).

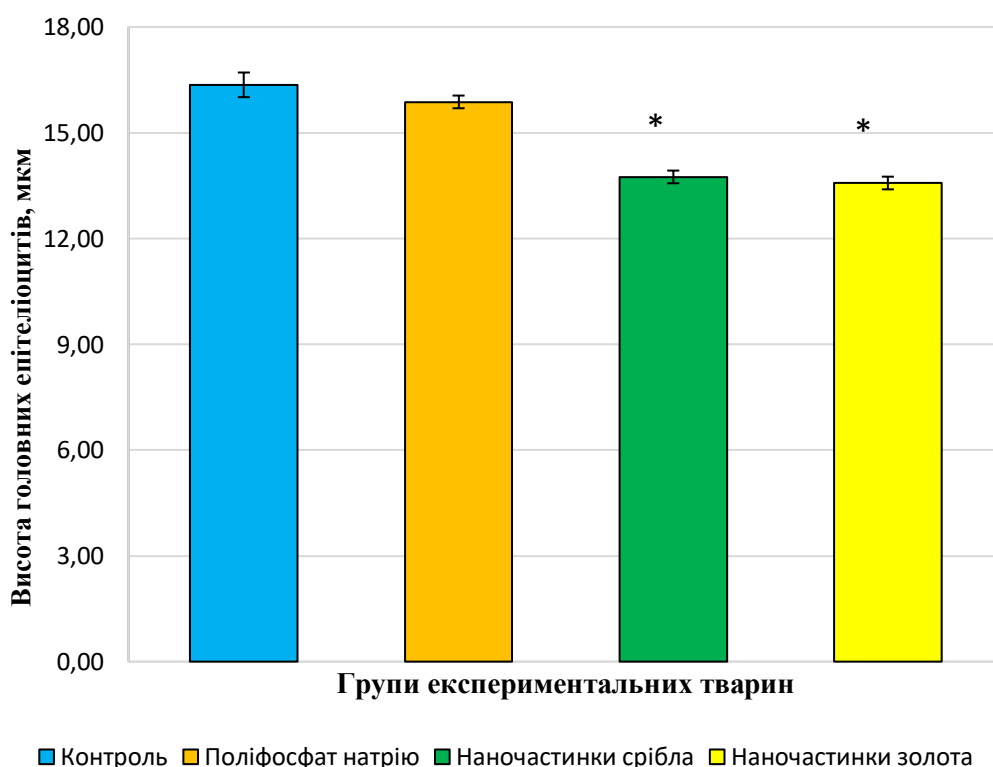


Рис 3.10 Результати статистичного аналізу морфометричних вимірів висоти головних епітеліоцитів придатка яєчка. Дані представлені у вигляді середнього арифметичного \pm стандартна похибка середнього арифметичного ($M \pm m$).

* - відмінності достовірні відносно групи «Контроль» при $p < 0.05$

3.3. Оцінка сперматогенезу

Переважає більшість сім'яних каналців у всіх групах мали повний сперматогенез та велику кількість сперматозоїдів у просвіті, відкритий просвіт, а тому отримували оцінку 10. Незначна кількість каналців мали облітерації просвіту та дезорганізований зародковий епітелій, а тому отримували оцінку 9. Невелика кількість сім'яних каналців у просвіті мали лише кількість сперматозоїдів, а тому отримували оцінку 8. Інших станів сперматогенезу не спостерігалось. Однак, достовірних відмінностей між контрольною та експериментальними групами не було.

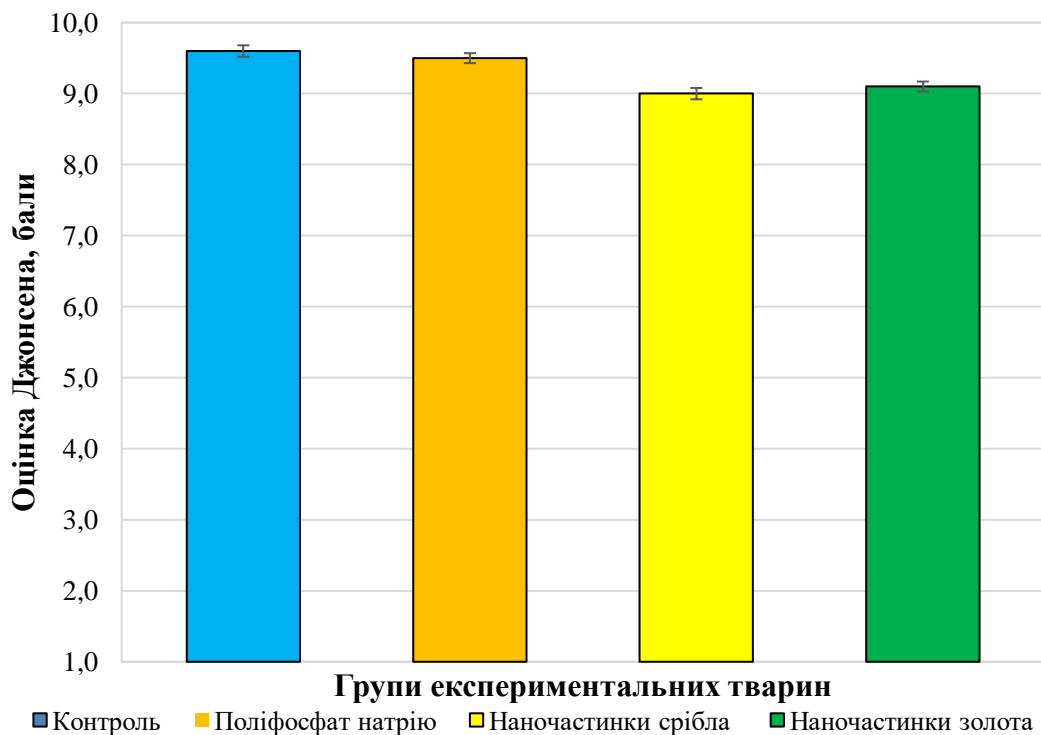


Рис 3.11 Оцінка Джонсена у контрольній та експериментальних групах. Дані представлені у вигляді середнього арифметичного \pm стандартна похибка середнього арифметичного ($M \pm m$).

Достовірні відмінності між дослідними групами не виявлено, $p > 0.05$

РОЗДІЛ 4. ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

НЧ набули суттєвої поширеності у промисловості, біомедичних цілях та споживчих товарах. Популярність НЧ пов'язана з унікальними фізико-хімічними властивостями. Серед фізичних властивостей варто виділити розмір, форму, співвідношення сторін, хімічних – хімічний склад поверхні, стан заряду та агрегація. З'ясували, що завдяки таким властивостям НЧ здатні ефективно долати біологічні бар'єри та проникати до мозку та яєчок. До прикладу, НЧ, які є позитивно зарядженими будуть ефективніше проникати через мембрану клітини, оскільки подвійна клітинна мембрана є негативно зарядженою. Як наслідок, активне поглинання позитивно заряджених НЧ мембраною, викликатиме збільшення рівня пошкодження мембранних фосфоліпідів та компартментів клітини. Тому, незважаючи на значні переваги НЧ у житті людини, різні застосування нанотехнології піддають людей та тварин потенційному токсичному впливу [8].

Більшість досліджень, з приводу впливу наночастинок різних металів на репродуктивну систему щурів, в основному акцентують свою увагу на гістопатологічні зміни у сім'яниках та придатку, рівні статевих гормонів: тестостерону, ЛГ та ФСГ та на оцінку якості сперматозоїдів: їх кількісні показники, морфологічні зміни та життєздатність.

Нами було проведено дане дослідження, у зв'язку з низькою кількістю досліджень або їх відсутністю щодо зміни морфометричних параметрів сім'яних каналців яєчка, придатку та клітинного складу сім'яників після впливу НЧ срібла та золота. Однак, у нашому дослідженні ми не тільки розглянули гістопатологічні зміни, але й морфометричними та статистичними методами оцінили стан сім'яників та придатку після впливу наночастинок срібла та золота.

Характеристика НЧ за допомогою растрової електронної мікроскопії, показала, що було отримано НЧ у діапазоні розміром 8-12 нм.

Деякі характеристики наночастинок, такі як: тип, розмір, дзета-потенціал, стан дисперсії/агломерації, а також потенційна взаємодія з біомолекулами, впливають на токсичність наночастинок, а отже, здатні впливати на живі організми. Зазвичай, розмір (а отже співвідношення поверхня/маса) розглядається як найважливіший фактор токсичності наночастинок. У нашому дослідженні ми спробували використати нанорозмірну частинку срібла та золота для вивчення токсичності.

Chithrani повідомив, що малі розміри наночастинок не обов'язково призводять до підвищення токсичності. Крім того, повідомляється, що хімічний склад поверхні наночастинок впливає на взаємодію між частинками, отже, на розподіл частинок і транспорт через мембрани [9, 47].

Гістопатологічні зміни або їх відсутність, після впливу НЧ срібла та золота можуть варіювати від дослідження до дослідження, оскільки зміни у архітектоніці органів будуть залежати від шляху введення НЧ, від покриття НЧ та їх розміру [24].

Токсичність різних речовин, у тому числі НЧ, може проявлятися у вигляді атрофії/дегенерації сім'яних каналців, що виникає у наслідок виснаження статевих клітин та знижені сперматозоїдів у просвіті каналців. Розширення каналців, тобто збільшення діаметру каналців, теж є одним з негативних наслідків.

У нашому дослідженні ми виявили не суттєве збільшення діаметра сім'яних каналців у групах НЧС та НСЗ. Більшість сім'яних каналців мали повний сперматогенез з великою кількістю сперматозоїдів, рівномірним сперматогенним епітелієм та відкритим просвітом у сім'яних каналцях. Не значна частка звивистих сім'яних каналців мала дезорганізований епітелій та закритий просвіт. Деякі каналці мали низьку кількість сперматозоїдів.

У дослідженні Juliana Lis Mendes de Brito та ін. архітектоніка сім'яних каналців залишалася відносно нормальною після введення НЧ срібла з середнім розміром 22,5 нм протягом семи, чотирнадцяти та двадцяти восьми

днів, лише у деяких каналцях спостерігався дебрис та низька кількість сперматозоїдів.

Однією з основних та найпоширеніших відповідей КС на пошкодження є вакуоляризація. Вакуолі можуть бути великими та дискретними, або ж може спостерігатися мікроезезикуляція поблизу базальної цитоплазми клітин Сертолі. Зазвичай за вакуоляризацією слідує та/або набряком дегенерація зародкових клітин, дезорганізація та злушення, відшарування статевих клітин. Залежно від тяжкості та тривалості пошкодження КС, виснаження зародкових клітин може бути частковим або повним, при цьому КС залишаються практично неушкодженими, вистилаючи порожні або виснажені каналці. Серед всіх клітин сім'яного каналця КС найбільш стійкіші до впливу токсичних речовин та відповідно до загибелі. Крім того, наслідком токсичності може бути порушення сперміації, зокрема фагоцитоз сперматозоїдів КС, а не їх вивільнення у просвіт каналця.

У нашому дослідженні не було виявлено вакуоляризації у цитоплазмі КС, чи виснаження зародкових клітин на всіх етапах зрілості після введення НЧС та НЧЗ після дев'ятиденного впливу 10 нанометровими НЧ срібла та золота. Однак, було виявлено не значне, менше у 10% < каналців, відокремлення сперматоцитів. Крім того, у групі НЧЗ спостерігалось відокремлення епітелію від базальної мембрани [10].

У дослідженні Gromadzka-Ostrowska та співавторів було виявлено гістологічні зміни – ширший міжклітинний простір та вакуоляризацію зародкового епітелію у щурів після внутрішньовенного введення 5 мг/кг НЧ срібла розміром 200 нм, але не було виявлено змін при введенні 20 нм НЧ [16].

Ahmed та ін. повідомляють, що введення НЧ срібла покритих полівініл-піролідом розміром менше 100 нм протягом 7 днів у низьких (100 мг/кг/день) та високих (1000 мг/кг/день) концентраціях викликав застій кровоносних судин, відшарування сперматогенного епітелію від базальної мембрани та ацидофільний вакуолізований гіаліновий матеріал у інтерстиції у дорослих щурів-альбіносів, збільшення часу впливу до 28 днів викликало ті ж

самі ознаки, що й при семиденному впливі, однак, також відбувалося зменшення товщини зародкового епітелію у деяких каналцях, було виявлено зморщені та дезорганізовані каналці та наявність багатоядерних гігантських клітин. Ці результати частково узгоджуються з нашими [3].

Однак, у дослідження Lafuente та його колег, не було виявлено лише незначне збільшення десквамації у просвіті каналця при дозі 200 мг/кг наночастинок покритих полівініл піролідом з середнім розміром 20-30 нм протягом 90 днів у дозі 4 мг/кг [24].

Отже, можна зробити висновок, що вплив 10 нанометровими НЧС та НЧЗ протягом 9 днів не викликає суттєвих змін у морфології КС та зниження кількості сперматозоїдів у просвіті сім'яних каналців.

Сперматогонії, сперматоцити та сперматиди також реагують на токсичний вплив. Основною характерною ознакою, що свідчить про ураження клітин є апоптоз та фагоцитоз клітинами Сертолі, як наслідок, сім'яні каналці стають збіднілими на одне покоління зародкових клітин. І у перспективі стають виснажені. Наявність багатоядерних статевих клітин. Зазвичай, щоб спостерігати порушення фертильності у щурів при загибелі сперматогоній, що спричинена екзогенними впливами, потрібно близько 8-10 тижнів (потрібно, щоб завершення сперматогенез, тих клітин, які не постраждали, та пройшли дозрівання у придатку яєчка) [10].

Ми не виявили масового апоптозу клітин та виснаження каналців після 9-денного введення НЧС та НЧЗ.

Однак, Mansee Thakur та його колеги повідомляють про дезорганізацію зародкового епітелію та апоптозом сперматогенних клітин, особливо сперматоцитів та сперматид після 90-денної експозиції НЧ розміром 5-20 нм у концентрації 20 мкг/кг. Також, було виявлено відокремлення зародкових клітин. У виснажених каналцях спостерігалися лише КС та сперматогонії. Сперматозоїди у просвіті були відсутні. Крім того, у цитоплазмі КС була присутня вакуоляризація [51].

У дослідження Miresmaeili наночастинки розміром 70 нм вводили протягом 48 днів кожні 12 год у концентрації 25, 50, 100, 200 мг/кг/доза. Було виявлено статистично значуще зменшення кількості сперматогоній порівняно з контролем при 200 мг/кг. Також, спостерігалось зменшення кількості первинних сперматоцитів, сперматид та сперматозоїдів при концентраціях 50, 100, 200 мг/кг [33].

Оскільки основною функцією КЛ є стероїдогенез, будь яка речовина, яка перешкоджає цьому, викличе функціональні порушення гормонального балансу. Недостатній рівень тестостерону здатний викликати дегенерацію та виснаження видовжених сперматид уже протягом після першого тижня зниження тестостерону. Крім того, маркером гормонально індукованого пошкодження є дегенерація пахітенових сперматоцитів та круглих сперматид на стадіях VII та VIII. Наслідком зниженого тестостерону є атрофія КЛ, яка проявляється зниженим вмістом цитоплазми.

Внутрішньочеревне введення НЧ розміром 60-80 нм у концентрації 125 та 300 мг/кг після одноразового введення призвело до зниження кількості сперматогоній, КЛ та КС, однак у морфометричних показниках не було виявлено жодних змін [10,13].

Пероральний вплив НЧ золота розміром 10 нм протягом 10 днів у концентраціях 25, 50 та 100 мг/кг не викликало суттєвих помітних змін у інтерстиційних клітинах Лейдіга, сім'яних каналцях. Однак, сім'яники тварин, які отримували НЧ у концентрації 100 мг/кг була виявлена дегенерація сім'яних каналців. Однак, статистичний аналіз продемонстрував зниження рівня тестостерону при 25, 50 мг/кг, а при 100 мг/кг статистично значуще зниження. Крім того, виявлено зниження рівнів ЛГ та ФСГ, особливо при 100 мг/кг.

У дослідженні Liu та ін. експериментальним тваринам внутрішньовенно вводили НЧ золота протягом 14 днів, кожного дня 0,5 мг/кг (сумарно 7 мг/кг). Гістологічна оцінка не виявила значних відмінностей у морфології статевих

клітин та клітин Лейдіга на 14 та 21 дні між експериментальними групами та контролем [28].

Отже, ми не виявили помітних значних відмінностей у морфології КЛ після дев'ятиденного впливу НЧ срібла та золота. Наші результати узгоджуються з результатами інших досліджень.

Пошкодження придатку яєчка, що викликане токсичний впливом речовин. Зазвичай, проявляється у вигляді вакуоляризації в епітелії, злуццям зародкових клітин каналця та наявність клітинного дебрису у просвіті, епітеліального апоптозу, зниження або збільшення прозорих клітин, відсутності або зниження сперматозоїдів у просвіті та запальними інфільтратами [12].

Щодо вакуоляризації, вона є двох типів: мікроевезикуляція та макроевезикуляція. Мікроевезикуляція характеризується невеликими інтрацитоплазматичними вакуолями, що локалізуються на апікальній стороні епітелію. Для макроевезикуляції характерні великі прозорі вакуолі, які локалізуються або всередині епітеліальних клітин, або ж між ними. Такі вакуолі викликають порушення структури епітелію, зміщуючи цитоплазму та ядра на периферію клітин. Часто макроевезикули характерні для проксимального відділу та пов'язані з віковими змінами.

Нормальний просвіт протоки придатку містить не велику кількість відлущених клітин та клітинного сміття. Найбільш поширене джерело клітинних уламків це злуццні зародкові клітини, що виникає у наслідок, порушення у сперматогенному епітелії та при пригніченому синтезі тестостерону.

Запальні інфільтрати зазвичай локалізуються у інтерстиціальній тканині та прилеглій жировій тканині та представлені скупченнями нейтрофілів або лімфоцитів [12].

Крім того можуть виникати решітчасті зміни каналця, які проявляються у гіперпластичності епітелію каналці та формування псевдозалозистих структур [12].

У нашому дослідженні ми виявили запальні інфільтрати у групах НЧС та НЧЗ, що може бути проявом токсичності. Інших морфологічних змін, таких як – вакуоляризація епітелію, злушення епітеліальних клітин, зниження вмісту каналця ми не виявили.

У дослідженні Lafuente та ін. не було виявлено суттєвих змін епідимальних проток, вакуоляризації у епітелії та змін клітин. Для дослідження перорально вводили наночастинки середнім розміром 20-30 нм протягом 90 днів у концентрації 4 мг/кг/доза [24].

Варто зазначити, що дослідження, які вказують на вплив НЧ золота на чоловічу репродуктивну систему, дуже обмежені, більшість досліджень проводилися на наночастинках інших металів, таких як срібло, цинк, селен. Ті дослідження, які були проведені в основному стосуються оцінки параметрів сперми та оцінки якості хроматину.

Наприклад, дослідження Mahsa Nazar та ін. показало статистично значуще зниження прогресивної та непрогресивної моторики сперматозоїдів, збільшення аномальної морфології сперматозоїдів: деформовані голівки, вигини, переломи шийок, згорнуті хвостики у групах, що отримали НЧЗ розміром 10-30 нм у концентрації 40 та 200 мкг/кг/день протягом 7 та 35 днів. Однак, найгірші показники безумовно отримали при максимальній дозі (200 мкг/кг) та хронічному введенню (35 днів). Крім того, погіршувалася якість хроматину (відбувалося зниження кількості протамінів) при максимальній дозі та хронічному впливі [37].

У дослідженні Olugbodi, введення підшкірно 100 нанометрових НЧС у концентрації 10 мг/кг маси тіла протягом 7 днів призвело до помірного збільшення інтерстиційної сполучної тканини, а у концентрації 50 мг/кг маси тіла – високої інфільтрації сполучної тканини запальними клітинами. Збільшення експозиції до 28 днів при 10 мг/кг призвело до помірної кількості запальний інфільтратів та інтерстиційного переповнення, а при 50 мг/кг до зникнення сперматозоїдів у просвіті протоки епідидимісу [40].

Повідомляється, що токсиканти придатку яєчка здатні викликати зменшення кількості сперматозоїдів, яке виникає у наслідок пригнічення синтезу андрогенів, або прямого впливу на андрогенові рецептори у придатку яєчка [12].

Однак, у нашому дослідженні, ми не виявили погіршення кількісних показників у протоці придатку в жодній з експериментальних груп.

Токсичність наносрібла тісно пов'язана з його перетвореннями у біологічному та навколишньому середовищі, включаючи поверхневе окислення, вивільнення іонів срібла та взаємодію з біологічними макромолекулами. НЧ спричиняють токсичність шляхом підвищення рівня внутрішньоклітинних активних форм кисню та/або рівнів прозапальних медіаторів. Наприклад, НЧС здатні проникати до клітини шляхом ендоцитозу та дифузії, що призводить до мітохондріальних дисфункцій, тобто НЧ втручаються у роботу дихального ланцюга, як наслідок, утворення АФК призводить до зниження виробництва АТФ, що у свою чергу викликає пошкодження ДНК. Тобто, АФК пошкоджують білки та нуклеїнові кислоти усередині клітини, тим самим, пригнічуючи клітинну проліферацію. Окислювальний стрес виникає у тому випадку коли, кількість АФК перевищує потужність антиоксидантного захисту клітинної системи. Споріднення срібла до сірки, яка міститься у білках (макромолекула) є важливим механізмом токсичності [8, 31].

Щодо НЧЗ, то на сьогоднішній час, про точний механізм токсичності ще не відомо, однак показано, що НЧ золота може вбудовуватися в головну борозенку ДНК та впливати на ферменти відновлення хромосом. Ймовірно НЧЗ здатні призводити до підвищення АФК [44].

Морфометричний аналіз у нашому дослідженні продемонстрував збільшення діаметру сім'яних каналців, хоча воно було не суттєвим. Також, було виявлено достовірно значуще зменшення площі поперечного перерізу ядер КЛ та КС. Наші результати частково узгоджуються з результатами інших досліджень.

У роботі Gromadzka-Ostrowska та її колег спостерігалось достовірно значуще збільшення діаметра сім'яних каналців через 28-днів після впливу НЧ 200 нм. (322 ± 1 мкм у групі контроль проти 339 ± 5 мкм у групі НЧС при $p \leq 0.05$) [16].

При препубертатному впливі НЧС на морфометричні параметри не було виявлено суттєвих відмінностей після 53-денного та 90-денного впливу НЧ срібла у концентрації 15 мкг/кг та 50 мкг/кг на сім'яники. (488.9 ± 11.7 у групі контроль проти 494.8 ± 10 у групі 50 мкг/кг НЧС протягом 90 днів при $p \leq 0.05$) [45].

Внутрішньовенне ведення 10 нанометрових НЧ срібла, самцям мишей, здійснювали 5 разів, кожні три дні, наслідки впливу оцінювали через 15, 60, 120 днів було виявлено деякі зміни морфометричних показників, не зважаючи на те, що жодних відмінностей у вазі яєчок не було виявлено. Об'єм просвіту та діаметр сім'яних каналців були значно зменшені через 15 та 60 днів, однак ці параметри повернулися до норми на 120 день. Крім того, відсоток апоптичних зародкових клітин був значно збільшений через 15, 60, 120 днів, хоча через 120 днів відсоток був знижений порівняно з 15, 60 днем [14].

Дослідження Miresmaeili не виявило суттєвих відмінностей між контрольною групою та експериментальними групами (тварини отримували НЧС у дозі 25, 50, 100, 200 мг/кг/доза) через 48 днів впливу. Однак, було виявлено вивільнення клітин сперматогоній, сперматоцитів та сперматид у просвіт сім'яного каналця та відділення їх від стінки каналця після введення НЧС у дозі 25, 50, 100, 200 мг/кг [33].

Zhang та співавтори досліджували вплив НЧС на неонатальний розвиток яєчок мишей. Самцям мишей вводили підшкірно розчин з 15 нанометровими НЧС у концентрації 1 та 5 мг/кг/доза сумарно 5 доз з інтервалом кожні 3 дні. Було виявлено зменшення діаметра сім'яних каналців порівняно з контролем на 28 постнатальний день при концентрації 5 мг/кг та статистично значуще зниження діаметра сім'яних каналців при 1 мг/кг. Крім того, достовірні

відмінності було виявлено на 42 постнатальний день при концентрації 1 мг/кг та 5 мг/кг. Жодних змін не спостерігалось на 63 та 100 постнатальні дні [56].

У нашому дослідженні, ми виявили достовірне значуще зниження висоти епітелію придатка у групі НЧС та НЧЗ порівняно з контролем, що може бути наслідком зниження андрогенів.

Різні хімічні речовини здатні зменшувати біосинтез тестостерону КЛ та з часом викликати дефіцит андрогенів у придатку. Як відомо, епідидиміс сильно залежить від андрогенів, які постачаються до придатку рідиною з сім'яника або через судинну систему, яка знаходиться у інтерстиції протоки. Дигідротестостерон та тестостерон беруть участь у дозріванні та транспортуванні сперми. Тому значна депривація андрогенів може призводити до зменшення діаметру проток придатку яєчка та апоптозу епітеліальних клітин. Такі зміни спостерігають, поки не відновиться рівень андрогенів. Поява округлих сперматид в просвіті протоки, теж є наслідком зниженого рівня андрогенів, однак, висновки варто робити лише, якщо у комплексі виявлено зменшення діаметру епідимального каналця, оскільки втрату зародкових клітин можуть спричинити токсичні впливи на КС [12].

Отже, дев'ятиденний вплив НЧС та НЧЗ розміром 8-12 нм. викликає не значні зміни діаметрів сім'яних каналців порівняно з контролем. Серед морфологічних змін спостерігалася наявність запальних інфільтратів у групах НЧС, НЧЗ. Крім того у групах НЧС та НЧЗ виявлено не значне відокремлення зародкових клітин менше 10 %. У групі НЧЗ виявлено відокремлення базальної мембрани. В цілому, сперматогенез був задовільним у всіх дослідних групах.

ВИСНОВКИ

1. Наночастинки срібла та золота спричиняють зменшення площ поперечного перерізу клітин Лейдіга та клітин Сертолі сім'яників дорослих щурів, але при цьому діаметр звивистих сім'яних каналців достовірних змін не зазнавав.
2. Оцінка сперматогенезу за Джонсенем не виявила достовірних змін після введення поліфостату натрію, наночастинок срібла та наночастинок золота.
3. У епідидимісі спостерігалось зниження висоти головних епітеліоцитів після введення наночастинок срібла та золота, крім того, наночастинки срібла спричиняли запальні процеси у епідидимісі.
4. Наночастинки срібла та золота здійснювали пригнічуючий вплив на клітини Лейдіга та клітини Сертолі та на епітеліоцити каналців епідидимісу. Достовірні відмінності між впливом наночастинок золота та срібла на сім'яники дорослих щурів не було виявлено.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Adamczewska, D., Słowikowska-Hilczer, J., & Walczak-Jędrzejowska, R. (2022). The Fate of Leydig Cells in Men with Spermatogenic Failure. *Life (Basel, Switzerland)*, 12(4), 570.
Available at: <https://doi.org/10.3390/life12040570>
2. Ahari, H., Fakhrabadipour, M., Paidari, S., Goksen, G., & Xu, B. (2022). Role of AuNPs in Active Food Packaging Improvement: A Review. *Molecules(Basel,Switzerland)*, 27(22),8027. Available at: <https://doi.org/10.3390/molecules27228027>
3. Ahmed, Samah M.; Abdelrahman, Shaimaa A.; Shalaby, Sally M. (2017). *Evaluating the effect of silver nanoparticles on testes of adult albino rats (histological, immunohistochemical and biochemical study)*. *Journal of Molecular Histology*, 48(1), 9–27. Available at: doi:10.1007/s10735-016-9701-4
4. Aladamat N, Tadi P. Histology, Leydig Cells. [Updated 2022 Nov 14]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan- Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK556007/>
5. Assar, D. H., Mokhbatly, A. A., ELazab, M. F. A., Ghazy, E. W., Gaber, A. A., Elbially, Z. I., Hassan, A. A., Nabil, A., & Asa, S. A. (2023). Silver nanoparticles induced testicular damage targeting NQO1 and APE1 dysregulation, apoptosis via Bax/Bcl-2 pathway, fibrosis via TGF- β / α -SMA upregulation in rats. *Environmental science and pollution research international*, 30(10), 26308–26326.
Available at: <https://doi.org/10.1007/s11356-022-23876-y>.
6. Baki, M. E., Miresmaili, S. M., Pouretezari, M., Amraii, E., Yousefi, V., Spenani, H. R., Talebi, A. R., Anvari, M., Fazilati, M., Fallah, A. A., & Mangoli, E. (2014). Effects of silver nano-particles on sperm parameters, number of Leydig cells and sex hormones in rats. *Iranian journal of reproductive medicine*, 12(2), 139–144.

7. Behnammorshedi, M., Nazem, H., & Moghadam, M. S. (2015). The effect of gold nanoparticle on luteinizing hormone, follicle stimulating hormone, testosterone and testis in male rat. *Biomedical Research*, 26(2), 348-352.
8. Brohi, R. D., Wang, L., Talpur, H. S., Wu, D., Khan, F. A., Bhattarai, D., Rehman, Z. U., Farmanullah, F., & Huo, L. J. (2017). Toxicity of Nanoparticles on the Reproductive System in Animal Models: A Review. *Frontiers in pharmacology*, 8, 606.
Available at: <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00606>
9. Chithrani, B. D., Ghazani, A. A., & Chan, W. C. (2006). Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells. *Nano letters*, 6(4), 662–668. <https://doi.org/10.1021/nl052396o>
10. Creasy, Dianne M. (2001). *Pathogenesis of Male Reproductive Toxicity*. *Toxicologic Pathology*, 29(1), 64–76. doi:10.1080/019262301301418865
11. Dang-Cong, T., & Nguyen-Thanh, T. (2022). Testicular Histopathology and Spermatogenesis in Mice with Scrotal Heat Stress. IntechOpen.
Available at: doi: 10.5772/intechopen.99814
12. De Grava Kempinas, W., & Klinefelter, G. R. (2015). Interpreting histopathology in the epididymis. *Spermatogenesis*, 4(2), e979114. Available at: <https://doi.org/10.4161/21565562.2014.979114>
13. Fathi, N., Hoseinipanah, S. M., Alizadeh, Z., Assari, M. J., Moghimbeigi, A., Mortazavi, M., Hosseini, M. H., & Bahmanzadeh, M. (2019). The effect of silver nanoparticles on the reproductive system of adult male rats: A morphological, histological and DNA integrity study. *Advances in clinical and experimental medicine : official organ Wroclaw Medical University*, 28(3), 299–305.
Available at: <https://doi.org/10.17219/acem/81607>
14. Garcia, T. X., Costa, G. M., França, L. R., & Hofmann, M. C. (2014). Sub-acute intravenous administration of silver nanoparticles in male mice alters Leydig cell function and testosterone levels. *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)*, 45, 59–70.

- Available at: <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2014.01.006>
15. Griswold M. D. (2016). Spermatogenesis: The Commitment to Meiosis.
 16. Gromadzka-Ostrowska, J., Dziendzikowska, K., Lankoff, A., Dobrzyńska, M., Instanes, C., Brunborg, G., Gajowik, A., Radzikowska, J., Wojewódzka, M., & Kruszewski, M. (2012). Silver nanoparticles effects on epididymal sperminrats. *Toxicology letters*, 214(3), 251–258.
Available at: <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2012.08.028>
 17. Hai, Yanan; Hou, Jingmei; Liu, Yun; Liu, Yang; Yang, Hao; Li, Zheng; He, Zuping (2014). *The roles and regulation of Sertoli cells in fate determinations of spermatogonial stem cells and spermatogenesis. Seminars in Cell & Developmental Biology*, 29(), 6675.
Available at: [doi:10.1016/j.semcd.2014.04.007](https://doi.org/10.1016/j.semcd.2014.04.007)
 18. Houda, A., Nyaz, S., Mohamed Sobhy, B., Hussein Bosilah, A., Romeo, M., Peter Michael, J., & Mohamad Eid, H. (2022). Seminiferous Tubules and Spermatogenesis. *Male Reproductive Anatomy*.
Available at: [doi: 10.5772/intechopen.98917](https://doi.org/10.5772/intechopen.98917)
 19. Huhtaniemi, Ilpo (2018). *Encyclopedia of Reproduction // Leydig Cells*. , (), 30–38. Available at: [doi:10.1016/B978-0-12-801238-3.64558-0](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.64558-0)
 20. Iftikhar, M., Noureen, A., Uzair, M., Jabeen, F., Abdel Daim, M., & Cappello, T. (2021). Perspectives of Nanoparticles in Male Infertility: Evidence for Induced Abnormalities in Sperm Production. *International journal of environmental research and public health*, 18(4), 1758. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijerph18041758>
 21. Kang, Hyunho; Buchman, Joseph T.; Rodriguez, Rebeca S.; Ring, Hattie L.; He, Jiayi; Bantz, Kyle C.; Haynes, Christy L. (2018). *Stabilization of Silver and Gold Nanoparticles: Preservation and Improvement of Plasmonic Functionalities. Chemical Reviews*, (), [acs.chemrev.8b00341](https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00341)–. Available at: [doi:10.1021/acs.chemrev.8b00341](https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00341)
 22. Klein, J. P., Mery, L., Boudard, D., Ravel, C., Cottier, M., & Bitounis, D. (2022). Impact of Nanoparticles on Male Fertility: What Do We Really

- Know? A Systematic Review. *International journal of molecular sciences*, 24(1), 576. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms24010576>
23. Kopera, Ilona A et al. "Sertoli-germ cell junctions in the testis: a review of recent data." *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* vol. 365,1546 (2010): 1593-605. Available at: doi:10.1098/rstb.2009.0251
24. Lafuente, D., Garcia, T., Blanco, J., Sánchez, D. J., Sirvent, J. J., Domingo, J. L., & Gómez, M. (2016). Effects of oral exposure to silver nanoparticles on the sperm of rats. *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)*, 60, 133–139. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2016.02.007>
25. Lee, J. H., Sung, J. H., Ryu, H. R., Song, K. S., Song, N. W., Park, H. M., Shin, B. S., Ahn, K., Gulumian, M., Faustman, E. M., & Yu, I. J. (2018). Tissue distribution of gold and silver after subacute intravenous injection of co-administered gold and silver nanoparticles of similar sizes. *Archives of toxicology*, 92(4), 1393–1405. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00204-018-2173-4>
26. Lee, Jong Kwon; Kim, Tae Sung; Bae, Ji Young; Jung, A. Young; Lee, Sang Min; Seok, Ji Hyun; Roh, Hang Sik; Song, Chi Won; Choi, Mi Jin; Jeong, Jinyoung; Chung, Bong Hyun; Lee, Yun-Geon; Jeong, Jayoung; Cho, Wan-Seob (2015). *Organ-specific distribution of gold nanoparticles by their surface functionalization. Journal of Applied Toxicology*, 35(6), 573–580. Available at: doi:10.1002/jat.3075
27. Li, N., Wang, T., & Han, D. (2012). Structural, cellular and molecular aspects of immune privilege in the testis. *Frontiers in immunology*, 3, 152. Available at: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00152>
28. Liu, Y., Li, X., Xiao, S., Liu, X., Chen, X., Xia, Q., Lei, S., Li, H., Zhong, Z., & Xiao, K. (2020). The Effects of Gold Nanoparticles on Leydig Cells and Male Reproductive Function in Mice. *International journal of nanomedicine*, 15, 9499–9514. Available at: <https://doi.org/10.2147/IJN.S276606>

29. Lopes, Ingra Monique Duarte; Oliveira, Isabela Medeiros de; Bargi-Souza, Paula; Cavallin, Monica Degraf; Kolc, Christiane Schineider Machado; Khalil, Najeh Maissar; Quináia, Sueli Pércio; Romano, Marco Aurelio; Marino Romano, Renata (2019). *The effects of silver nanoparticles exposure on the testicular antioxidant system during pre-pubertal rat stage*. *Chemical Research in Toxicology*, (), *acs.chemrestox.8b00281*–. Available at: doi:10.1021/acs.chemrestox.8b00281
30. Mathias, F. T., Romano, R. M., Kizys, M. M., Kasamatsu, T., Giannocco, G., Chiamolera, M. I., Dias-da-Silva, M. R., & Romano, M. A. (2015). Daily exposure to silver nanoparticles during prepubertal development decreases adult sperm and reproductive parameters. *Nanotoxicology*, 9(1), 64–70. Available at: <https://doi.org/10.3109/17435390.2014.889237>
31. McShan, D., Ray, P. C., & Yu, H. (2014). Molecular toxicity mechanism of nanosilver. *Journal of food and drug analysis*, 22(1), 116–127. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2014.01.010>
32. Mikuz G. (2019). Die Multitasking-Sertoli-Zelle [The multitasking Sertoli cell]. *Der Pathologe*, 40(Suppl 3), 318–324. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00292-019-00711-9>
33. Miresmaeili, S. M., Halvaei, I., Fesahat, F., Fallah, A., Nikonahad, N., & Taherinejad, M. (2013). Evaluating the role of silver nanoparticles on acrosomal reaction and spermatogenic cells in rat. *Iranian journal of reproductive medicine*, 11(5), 423–430.
34. Mital, Payal et al. “The blood-testis and blood-epididymis barriers are more than just their tight junctions.” *Biology of reproduction* vol. 84,5 (2011): 851-8. Available at: doi:10.1095/biolreprod.110.087452
35. Mruk, D. D., & Cheng, C. Y. (2015). The Mammalian Blood-Testis Barrier: Its Biology and Regulation. *Endocrine reviews*, 36(5), 564–591. Available at: <https://doi.org/10.1210/er.2014-1101>
36. Nakkala, J. R., Mata, R., Raja, K., Khub Chandra, V., & Sadras, S. R. (2018). Green synthesized silver nanoparticles: Catalytic dye degradation, in vitro

- anticancer activity and in vivo toxicity in rats. *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications*, 91, 372–381. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.05.048>
37. Nazar, M., Talebi, A. R., Hosseini Sharifabad, M., Abbasi, A., Khoradmehr, A., & Danafar, A. H. (2016). Acute and chronic effects of gold nanoparticles on sperm parameters and chromatin structure in Mice. *International journal of reproductive biomedicine*, 14(10), 637–642.
38. O'Donnell, L., Smith, L. B., & Rebourcet, D. (2022). Sertoli cells as key drivers of testis function. *Seminars in cell & developmental biology*, 121, 2–9. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2021.06.016>
39. O'Donnell, L., Stanton, P., & de Kretser, D. M. (2017). Endocrinology of the Male Reproductive System and Spermatogenesis. In K. R. Feingold (Eds.) et al., *Endotext*. MDText.com, Inc.
40. Olugbodi, J. O., David, O., Oketa, E. N., Lawal, B., Okoli, B. J., & Mtunzi, F. (2020). Silver Nanoparticles Stimulates Spermatogenesis Impairments and Hematological Alterations in Testis and Epididymis of Male Rats. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(5), 1063. Available at: <https://doi.org/10.3390/molecules25051063>
41. Piprek, Rafal P. (2016). [*Results and Problems in Cell Differentiation*] *Molecular Mechanisms of Cell Differentiation in Gonad Development Volume 58 // Biology of the Sertoli Cell in the Fetal, Pubertal, and Adult Mammalian Testis.* , 10.1007/978-3-319-31973-5(Chapter 9), 225–251. Available at: doi:10.1007/978-3-319-31973-5_9
42. Qin, G., Tang, S., Li, S., Lu, H., Wang, Y., Zhao, P., Li, B., Zhang, J., & Peng, L. (2017). Toxicological evaluation of silver nanoparticles and silver nitrate in rats following 28 days of repeated oral exposure. *Environmental toxicology*, 32(2), 609–618. Available at: <https://doi.org/10.1002/tox.22263>
43. Shima Y. (2019). Development of fetal and adult Leydig cells. *Reproductive medicine and biology*, 18(4), 323–330. Available at: <https://doi.org/10.1002/rmb2.12287>

44. Skuridin, S. G., Dubinskaya, V. A., Rudoy, V. M., Dement'eva, O. V., Zakhidov, S. T., Marshak, T. L., Kuz'min, V. A., Popenko, V. I., & Evdokimov, Y. M. (2010). Effect of gold nanoparticles on DNA package in model systems. *Doklady. Biochemistry and biophysics*, 432, 141–143. Available at: <https://doi.org/10.1134/s1607672910030130>
45. Sleiman, Hanan Khaled; Romano, Renata Marino; Oliveira, Claudio Alvarenga de; Romano, Marco Aurelio (2013). *Effects of Prepubertal Exposure to Silver Nanoparticles on Reproductive Parameters in Adult Male Wistar Rats*. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 76(17), 1023–1032. Available at: doi:10.1080/15287394.2013.831723
46. Smith, L. B., & Walker, W. H. (2014). The regulation of spermatogenesis by androgens. *Seminars in cell & developmental biology*, 30, 2–13. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2014.02.012>
47. Stobiecka, M., & Hepel, M. (2011). Double-shell gold nanoparticle-based DNA-carriers with poly-L-lysine binding surface. *Biomaterials*, 32(12), 3312–3321. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.12.064>
48. Su, Linlin et al. “Drug transporters, the blood-testis barrier, and spermatogenesis.” *The Journal of endocrinology* vol. 208,3 (2011): 207-23. Available at: doi:10.1677/JOE-10-0363
49. Talebi, A. R., Khorsandi, L., & Moridian, M. (2013). The effect of zinc oxide nanoparticles on mouse spermatogenesis. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 30(9), 1203–1209. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10815-013-0078-y>
50. Teerds, K. J., & Huhtaniemi, I. T. (2015). Morphological and functional maturation of Leydig cells: from rodent models to primates. *Human reproduction update*, 21(3), 310–328. Available at: <https://doi.org/10.1093/humupd/dmv008>
51. Thakur, M., Gupta, H., Singh, D., Mohanty, I. R., Maheswari, U., Vanage, G., & Joshi, D. S. (2014). Histopathological and ultra structural effects of nanoparticles on rat testis following 90 days (Chronic study) of repeated oral

- administration. *Journal of nanobiotechnology*, 12,42. Available at:
<https://doi.org/10.1186/s12951-014-0042-8>
52. Wang, R., Song, B., Wu, J., Zhang, Y., Chen, A., & Shao, L. (2018). Potential adverse effects of nanoparticles on the reproductive system. *International journal of nanomedicine*, 13, 8487–8506. Available at:
<https://doi.org/10.2147/IJN.S170723>
53. Wong, W. J., & Khan, Y. S. (2022). Histology, Sertoli Cell. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
54. Wu, Tianshu; Tang, Meng (2017). *Review of the effects of manufactured nanoparticles on mammalian target organs. Journal of Applied Toxicology*, (), -. Available at: doi:10.1002/jat.3499
55. Yildirimer, L., Thanh, N. T., Loizidou, M., & Seifalian, A. M. (2011). Toxicology and clinical potential of nanoparticles. *Nano today*, 6(6), 585–607. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2011.10.001>
56. Zhang, X. F., Gurunathan, S., & Kim, J. H. (2015). Effects of silver nanoparticles on neonatal testis development in mice. *International journal of nanomedicine*, 10, 6243–6256.
Available at: <https://doi.org/10.2147/IJN.S90733>