

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

КАЛИНОВСЬКИЙ ВІТАЛІЙ ЄВГЕНІЙОВИЧ



УДК [546.57+546.59]:591.16:591.463

**НАНОЧАСТИНКИ ЗОЛОТА ТА СРІБЛА ЯК МОДУЛЯТОРИ КІСПЕПТИН-
ОПОСЕРЕДКОВАНОЇ РЕГУЛЯЦІЇ РЕПРОДУКТИВНОЇ СИСТЕМИ САМЦІВ
ЩУРІВ**

03.00.11 – цитологія, клітинна біологія, гістологія

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ – 2018

Дисертацією є рукопис

Робота виконана на кафедрі цитології, гістології та репродуктивної медицини Навчально-наукового центру «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка МОН України

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор
Держинський Микола Едуардович,
Київський національний університет
імені Тараса Шевченка МОН України
ННЦ «Інститут біології та медицини»
завідувач кафедри цитології, гістології та
репродуктивної медицини

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор
Квітницька-Рижова Тетяна Юріївна,
Державна установа «Інститут геронтології
імені Д.Ф. Чеботарьова НАМН України»,
завідувач лабораторії морфології та цитології;

доктор біологічних наук, професор
Стеченко Людмила Олександрівна,
Національний медичний університет
імені О.О. Богомольця МОЗ України
професор кафедри гістології та ембріології.

Захист відбудеться «28» березня 2018 року о 14⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.001.38 Київського національного університету імені Тараса Шевченка за адресою: м. Київ, проспект Академіка Глушкова, 2, ННЦ «Інститут біології та медицини», ауд. 434.

Поштова адреса: 01601, м. Київ, вул. Володимирська, 64/13, Київський національний університет імені Тараса Шевченка, ННЦ «Інститут біології та медицини», спеціалізована вчена рада Д 26.001.38

З дисертацією можна ознайомитись у Науковій бібліотеці ім. М. Максимовича Київського національного університету імені Тараса Шевченка за адресою: м. Київ, вул. Володимирська, 58, зала 12

Автореферат розісланий “23” лютого 2018 року

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради Д 26.001.38
доктор біологічних наук



Дворщенко К.О.

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Хоча універсального визначення наноматеріалів не існує, найчастіше цим терміном позначають штучні або природні структури, у складі яких є елементи, лінійний розмір яких принаймні в одному вимірі має розміри 1-100 нм [Maunard A., 2011]. При зменшенні розмірів матеріалів до цих величин у них можуть з'являтися нові фізичні і хімічні властивості, які не проявляються при дослідженні звичайних сполук [Lu X., 2013; Zhang X.-F., 2016]. Ці особливості зумовили швидкий розвиток нанотехнологій у XXI столітті, і зараз значна кількість товарів має у своєму складі наноматеріали того чи іншого складу [Vance M., 2015]. Серед великої кількості наноматеріалів, які існують сьогодні, найбільш широко розповсюдженими є наночастинки металів, а серед цієї категорії найактивніше використовують нанорозмірне срібло [Nowack B., 2011]. Наночастинки срібла (НЧС) широко застосовуються при виробництві пластмас, миючих засобів, зубних паст, одягу, взуття, дезодорантів, приладів для очистки води, холодильників [Boudreau M.D., 2016; McGillicuddy E., 2017]. Висока поширеність срібла зумовлена його добре відомими антибактеріальними властивостями, які посилюються при переході до нанорозмірних форм [Сердюк А.М., 2014; Halbus A.F., 2017]. Наночастинки золота (НЧЗ) є значно менш розповсюдженими у якості побутових наноматеріалів, однак вони активно застосовуються в різних галузях медицини. Висока біосумісність та інертність золота дозволяє легко прив'язувати до поверхні частинок різні біологічно активні молекули, що забезпечує активне використання НЧЗ для таргетної доставки різноманітних фармакологічних препаратів, в тому числі протипухлинних [Дыкман Л.А., 2011; Cheng J., 2013; Dreaden E.C., 2012]. Розробляються також підходи щодо застосування нанорозмірного золота як компонента вакцин [Klinman D.M., 2016; Maughan C.N., 2015]. Завдяки специфічним фізико-хімічним властивостям, використання НЧЗ значно підвищує ефективність традиційних підходів променевої медицини [Cui L., 2017; Rosa S., 2017]. Окрім використання разом із іонізуючим випромінюванням, нанорозмірне золото також використовують для фототермальної терапії [Bucharskaya A., 2016]. Оптичні властивості НЧЗ дозволяють використовувати їх у якості біосенсорів, в тому числі і для детекції циркулюючих пухлинних клітин [Bhattacharyya K., 2012; Wilner O.I., 2012].

Широке практичне застосування НЧЗ та НЧС зумовлює появу необхідності у ретельному вивченні їхніх здатностей впливати на різні частини організму. Хоча в останні роки загальне розуміння механізмів цито- та генотоксичної дії наночастинок металів значно розвинулось, конкретні фізіологічні прояви дії наноструктур різного складу залишаються недостатньо дослідженими [Li J., 2014; Sengupta J., 2014]. Саме тому одним із пріоритетних завдань нанотоксикології є дослідження впливу наночастинок на функціонування різних систем організму, в тому числі статевої. Вже зараз відомо про особливості впливу наноматеріалів різного складу на активність гамет [Tiedemann D., 2014], процес запліднення [Yoisungnern T., 2015] та основні етапи ембріонального розвитку [Ema M., 2017], однак системні ефекти при цьому залишаються здебільшого невідомими. Процес дослідження ускладнюється тим, що біологічна дія наночастинок значно залежить від способу введення, форми,

розмірів та функціоналізації поверхні [Глушкова А.В., 2007; Yildrimer L., 2011].

Центральну роль в регуляції роботи статевої системи ссавців відіграє кіссептинергічна система гіпоталамусу. Саме за рахунок регуляції синтезу і секреції кіссептину (КП) та модуляторів його активності запускається та контролюється процес статевого дозрівання, а також підтримується необхідний рівень функціональної активності репродуктивного комплексу за різних умов [Nameed S., 2011; Tena-Sempere M., 2013]. Тому для дослідження впливу екзо- та ендогенних сполук на функціональну активність статевої системи доречним є виявлення особливостей кіссептин-опосередкованої регуляції статевої системи [Matvienko M.G., 2012].

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами темами. Роботу виконано на базі кафедри цитології, гістології та репродуктивної медицини ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка у рамках бюджетної теми «Механізми реалізації адаптаційно-компенсаторних реакцій організму за умови розвитку різних патологій» (№ д/р 0111U004648, 2011 – 2015 роки).

Мета і задачі дослідження. Метою цього дослідження було оцінити морфо-функціональний стан гіпоталамо-гіпофізарно-гонадної системи щурів різного віку за дії наночастинок золота та срібла при активації та блокуванні кіссептинергічної системи.

Для досягнення поставленої мети було сформульовано наступні завдання:

1. З'ясувати вплив наночастинок золота та срібла на морфо-функціональний стан нейронів аркуатного та преоптичного ядер гіпоталамусу за умов активації та пригнічення кіссептинергічної системи щурів 1- та 6-місячного віку.

2. Встановити ефекти наночастинок золота та срібла на морфо-функціональний стан гонадотропоцитів аденогіпофіза за умов активації та пригнічення кіссептинергічної системи щурів 1- та 6-місячного віку.

3. Оцінити результат дії наночастинок золота та срібла на морфо-функціональний стан сім'яників за умов активації та пригнічення кіссептинергічної системи щурів 1- та 6-місячного віку.

4. Встановити особливості впливу наночастинок золота та срібла на морфо-функціональний стан придатку сім'яника за умов активації та пригнічення кіссептинергічної системи щурів 1- та 6-місячного віку.

5. З'ясувати дію наночастинок золота та срібла на морфо-функціональний стан передміхурової залози за умов активації та пригнічення кіссептинергічної системи щурів 1- та 6-місячного віку.

6. Порівняти вплив наночастинок золота та срібла на репродуктивну систему щурів різних вікових груп.

Об'єкт дослідження – нейроендокринна регуляція репродуктивної системи щурів.

Предмет дослідження – морфо-функціональний стан гіпоталамо-гіпофізарно-гонадної системи щурів різного віку за дії наночастинок золота та срібла при одночасній активації чи інгібуванні кіссептинергічної системи.

Методи дослідження: гістологічні, гістохімічні, морфометричні, імунологічні, статистичні.

Наукова новизна отриманих результатів. Вперше встановлено, що наночастинки золота та срібла пригнічують активність не лише периферичних, а й центральних компонентів гіпоталамо-гіпофізарно-гонадної системи. При дії обох видів наночастинок в статевих органах спостерігали розвиток дегенеративних змін різного ступеню тяжкості, а в гіпоталамо-гіпофізарному комплексі – морфологічні ознаки пригнічення активності. Дія наночастинок золота проявлялась у більшому, порівнюючи зі сріблом, пригніченні активності аденогіпофіза, в той час як на периферійні ланки гіпоталамо-гіпофізарно-гонадної системи вплив срібла був більш вираженим. Стимулюючий вплив екзогенного кісспептину в значній мірі нівелювався введенням наночастинок, а в сім'яниках не спостерігався взагалі. Водночас, пригнічення активності кісспептинергічної системи гіпоталамусу призводило до посилення токсичної дії наночастинок на морфо-функціональний стан органів статевої системи. Розширено уявлення про вікові особливості дії наночастинок на морфо-функціональний стан гіпоталамо-гіпофізарно-гонадної системи. Показано, що статевонезрілі тварини є більш чутливими до дії наночастинок, порівняно із дорослими особинами

Практичне значення одержаних результатів. Отримані дані щодо пригнічуючого впливу наночастинок золота та срібла на активність гіпоталамо-гіпофізарно-гонадної системи організмів різного віку можуть бути використані при розробці токсикологічних та санітарно-гігієнічних нормативів щодо вмісту вказаних матеріалів у товарах щоденного вжитку. Можуть бути переглянуті підходи щодо застосування наноматеріалів в різних галузях біологічних та медичних досліджень. Особливо корисними отримані дані стануть при розробці терапевтичних підходів в онкологічній практиці.

Особистий внесок здобувача. Автором самостійно здійснено підбір і опрацювання наукової літератури, проведено гістологічну обробку матеріалу, оцінено морфологічний стан та морфометричні параметри досліджуваних структур, а також проведено статистичний аналіз отриманих даних. Синтез та характеристику фізико-хімічних властивостей наночастинок золота та срібла здійснено співробітниками Інституту фізичної хімії ім. Л.В. Писаржевського НАН України к.х.н. Г.Я. Гродзюк та к.х.н. Н.С. Андрюшиною. Визначення вмісту тестостерону в плазмі крові проведено разом з провідним інженером Н.М. Рословою. Розробка дизайну дослідження та робота з експериментальними тваринами виконувалась разом з к.б.н., доцентом А.С. Пустоваловим. Постановка задач дослідження, підбір експериментальних підходів, аналіз та узагальнення отриманих даних, а також формулювання висновків здійснено разом з науковим керівником.

Апробація результатів дисертації. Результати експериментальних досліджень представлені та апробовані на: об'єднаній конференції Федерації європейських фізіологічних товариств та Французького фізіологічного товариства (Париж, 2016); об'єднаній конференції Американського фізіологічного товариства та Британського фізіологічного товариства «Physiology 2016» (Дублін, 2016); міжнародних науково-практичних конференціях «Нанотехнологія та наноматеріали» НАНО-2015 (Львів, 2015) та НАНО-2016 (Львів, 2016); XI та XII міжнародних наукових конференціях студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології» (Львів, 2015 та 2016).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 12 наукових робіт, з них 6 статей у фахових міжнародних та вітчизняних наукових виданнях, рекомендованих ДАК України (в тому числі 5 статей в журналах, включених до міжнародних наукометричних баз), а також 6 тез доповідей у матеріалах міжнародних наукових конференцій.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота складається зі вступу, 2 розділів огляду літератури, матеріалів і методів дослідження, 3 розділів результатів досліджень, аналізу та узагальнення результатів, висновків і списку використаних джерел (284 найменування, з них кирилицею – 22, латиницею – 262). Роботу викладено на 173 сторінках, проілюстровано 70 рисунками та 1 таблицею.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали та методи дослідження. Дослідження проведено на 132 самцях білих нелінійних щурів *Rattus norvegicus* віком 1 місяць (n=66) та 6 місяців (n=66). Тварин утримували в стандартних умовах віварію, за умов природнього освітлення, з вільним доступом до води та корму. Всі маніпуляції з тваринами були виконані у відповідності до вимог Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986) та Закону України №3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» від 21 лютого 2006 р.

Маніпуляції з лабораторними тваринами проводили впродовж 10 діб. Відповідно до задач дослідження, щурів кожної вікової серії було розподілено на 11 груп. В експерименті тваринам різних груп вводили: фізіологічний розчин (0,9 % ізотонічний розчин хлориду натрію, «Індар», Україна); 0,25 ммоль/л розчин поліфосфату натрію (ПФН, $(\text{NaPO}_3)_n$); водні розчини НЧЗ та НЧС; 10% водний розчин диметилсульфоксиду (ДМСО); кіспептин-10 (КП-10, метастин-(45-54)-амід, Merck KGaA, ФРН) та антагоніст кіспептину пептид-234 (P-234, кіспептин-234-трифлюорацетат, Sigma, США). Фізіологічний розчин, а також розчини ПФН, НЧЗ та НЧС вводили внутрішньоочеревинно протягом 10 діб. ДМСО, КП-10 та P-234 – інтрацеребровентрикулярно на 8-10 добу експерименту (табл. 1). Інтрацеребровентрикулярно препарати вводили у порожнину лівого шлуночка мозку за допомогою спеціально переобладнаного шприца. Місце маніпуляції визначали за допомогою стереотаксичного атласу [Рахінос Г., 2007].

Отримання та характеристика наночастинок. НЧЗ та НЧС синтезовано в Інституті фізичної хімії ім. Л.В. Писаржевського НАН України. Наночастинки отримували відновленням водного розчину тетрахлораурату (III) натрію або аргентум (I) нітрату (для НЧЗ та НЧС відповідно) аскорбіновою кислотою у лужному середовищі з додаванням водного розчину ПФН у якості стабілізатора. Фізико-хімічні властивості отриманих розчинів наночастинок характеризували за допомогою електронномікроскопічних та спектроскопічних досліджень. Було встановлено, що розміри наночастинок у розчинах становили 8-12 нм, а кінцева концентрація – 0,2 г металу/л.

Гістологічні дослідження. Забір зразків проводили на 10 добу експерименту, через 1 годину після останньої ін'єкції. У тварин відбирали сім'яники, придатки

сім'яників, вентральну частину передміхурової залози, гіпофіз та головний мозок для подальших досліджень. Матеріал фіксували у рідині Буена впродовж 72 годин та заливали у парафін за загальноприйнятою методикою [Suvarna K., 2013]. Для подальших досліджень виготовляли зрізи товщиною 5-6 мкм. Зразки всіх тканин, окрім аденогіпофіза, забарвлювали гематоксиліном Бемера та еозином та заключали під покривне скельце у полістирол [Лилли Р., 1969]. Для ідентифікації гонадотропоцитів препарати аденогіпофізів забарвлювали альціановим синім, реактивом Шиффа та оранжем Ж за Herlant [Laura C., 2013; Pasteels J.L., 1962].

Морфометричні дослідження. Забарвлені гістологічні препарати досліджували за допомогою світлового мікроскопа Carl Zeiss Primo Star (Carl Zeiss Microimaging GmbH, ФРН) на збільшеннях x100 та x400. Мікроскоп був обладнаний камерою Tucsen 5.0MP CMOS TCA-5.0C (Tucsen Photonics, КНР). Отримані мікрофотографії аналізували за допомогою програми ImageJ 1.42 (NIH, США). У нейронах вимірювали площу поперечного перерізу ядер клітин; в гонадотропоцитах аденогіпофіза – площу перерізу ядер та цитоплазми клітин, а також ядерно-цитоплазматичне співвідношення (ЯЦС). На препаратах сім'яників визначали діаметр звивистих сім'яних каналців, а також площу поперечного перерізу ядер клітин Лейдіга та клітин Сертолі. В зразках придатків сім'яників вимірювали висоту головних епітеліоцитів, а також площу поперечного перерізу їхніх ядер, а в передміхуровій залозі – відносний об'єм епітелію.

Таблиця 1

Характеристика експериментальних груп тварин

| Група | Назва речовини | Доза | Шлях введення |
|------------------|------------------------------------|--------------------|---------------|
| <i>Контроль</i> | 0,9% NaCl | 0,5 мл/100 г м.т. | в.о. |
| <i>ПФН</i> | 0,25 ммоль/л натрію поліфосфат | 0,5 мл/100 г м.т. | в.о. |
| <i>НЧЗ</i> | 0,2 г/л розчин наночастинок золота | 0,5 мл/100 г м.т. | в.о. |
| <i>НЧС</i> | 0,2 г/л розчин наночастинок срібла | 0,5 мл/100 г м.т. | в.о. |
| <i>ДМСО</i> | 0,9% NaCl | 0,5 мл/100 г м.т. | в.о. |
| | 10% розчин диметилсульфоксиду | 0,01 мл/100 г м.т. | і.ц.в. |
| <i>КП-10</i> | 0,9% NaCl | 0,5 мл/100 г м.т. | в.о. |
| | Кіспептин-10 | 0,1 мкг/100 г м.т. | і.ц.в. |
| <i>P-234</i> | 0,9% NaCl | 0,5 мл/100 г м.т. | в.о. |
| | Пептид-234 | 0,1 мкг/100 г м.т. | і.ц.в. |
| <i>НЧЗ+КП-10</i> | 0,2 г/л розчин наночастинок золота | 0,5 мл/100 г м.т. | в.о. |
| | Кіспептин-10 | 0,1 мкг/100 г м.т. | і.ц.в. |
| <i>НЧЗ+P-234</i> | 0,2 г/л розчин наночастинок золота | 0,5 мл/100 г м.т. | в.о. |
| | Пептид-234 | 0,1 мкг/100 г м.т. | і.ц.в. |
| <i>НЧС+КП-10</i> | 0,2 г/л розчин наночастинок срібла | 0,5 мл/100 г м.т. | в.о. |
| | Кіспептин-10 | 0,1 мкг/100 г м.т. | і.ц.в. |
| <i>НЧС+P-234</i> | 0,2 г/л розчин наночастинок срібла | 0,5 мл/100 г м.т. | в.о. |
| | Пептид-234 | 0,1 мкг/100 г м.т. | і.ц.в. |

Примітка: в.о. – внутрішньоочеревинне введення, і.ц.в. – інтрацеребровентрикулярне.

Визначення вмісту тестостерону. Концентрацію тестостерону визначали в гепаринізованій плазмі крові за допомогою комерційного набору для

імуноферментного аналізу DRG Testosterone ELISA EIA-1559 (DRG Instruments GmbH, ФРН) згідно інструкції виробника.

Статистичний аналіз. Отримані числові дані аналізували методами варіаційної статистики за допомогою програми Statistica 6.0 (StatSoft, США). За допомогою методу Шапіро-Уїлка перевіряли відповідність розподілу вибіркового даних нормальному, а за допомогою тесту Левена – рівність вибіркового дисперсій. Результати груп тварин «ПФН», «НЧЗ», «НЧС», «ДМСО», «КП-10» та «Р-234» порівнювали з відповідними показниками контрольної групи; груп «НЧЗ+КП-10» та «НЧЗ+Р-234» – з групою «НЧЗ»; груп «НЧС+КП-10» та «НЧС+Р-234» – з групою «НЧС». Враховуючи множинність порівнянь, дані, розподілені за нормальним законом, порівнювали за допомогою однофакторного дисперсійного аналізу з апостеріорним тестом Даннетта. Якщо розподіл даних відрізнявся від нормального, використовували Н-критерій Краскела-Уоллеса з апостеріорним U-тестом Манна-Уїтні. Обчислювали середнє значення (M), стандартну похибку середнього (m) медіану (Me), 25-й та 75-й процентилі, а також найменше та найбільше значення. Достовірними вважалися відмінності при рівні значущості $p < 0,05$ [Zar J.H., 2009].

Результати дослідження та їх обговорення

Морфо-функціональна характеристика нейронів аркуатного ядра гіпоталамусу. Відомо, що аркуатне ядро гіпоталамусу є основним місцем продукції КП. Саме нейрони цієї ділянки забезпечують реалізацію негативних зворотних зв'язків в межах гіпоталамо-гіпофізарно-гонадної системи, а також визначають онтогенетичні зміни в активності статевої системи [Goodman R.L., 2013; Shahab M., 2005]. В наших дослідженнях введення розчинів ПФН та ДМСО не призвело до морфологічних та морфометричних змін в обох вікових групах. Введення екзогенного кісспептину спричинило достовірне зменшення площі перерізу ядер нейронів, в той час як блокування КП-опосередкованої сигналізації за допомогою Р-234 мало протилежний ефект. Загальний характер змін був однаковим для молодих та дорослих тварин (рис 1 А, Б). Отримані дані свідчать про нормальну реалізацію негативних зворотних зв'язків. Дія НЧЗ та НЧС на нейрони аркуатного ядра щурів обох вікових груп проявилась у розвитку морфологічних та достовірних морфометричних ознак пригнічення функціональної активності. Водночас, патологічних змін тканини виявлено не було. У тварин 1-місячного віку інтрацеребровентрикулярні ін'єкції КП-10 на тлі дії нанорозмірного золота та срібла призвели до подальшого пригнічення активності нейронів, в той час як введення Р-234 не призвело до достовірних змін. В групах щурів віком 6 місяців спостерігали протилежні ефекти – в групах «НЧЗ+Р-234» та «НЧС+Р-234» зафіксовано достовірне зростання площі перерізу ядер нейронів, в той час як вплив КП-10 був незначним. Підсумовуючи, можна стверджувати, що введення НЧЗ та НЧС призводять до пригнічення функціональної активності нейронів аркуатного ядра з одночасним збереженням загального характеру КП-опосередкованих змін. Ці дані дозволяють припустити опосередкований вплив наночастинок на центральний компонент гіпоталамо-гіпофізарно-гонадної системи.

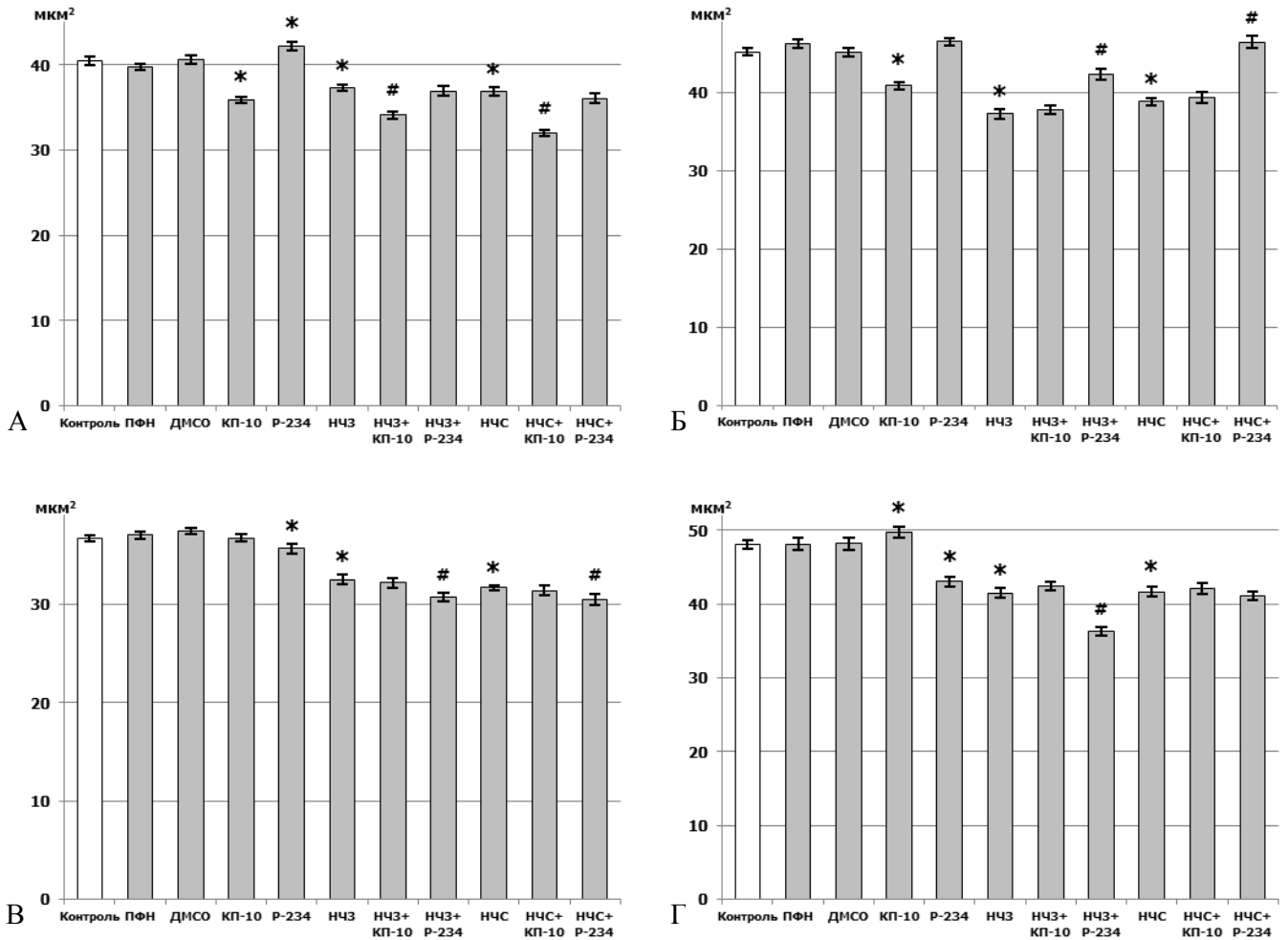


Рисунок 1. Площа поперечного перерізу ядер гіпоталамічних нейронів щурів віком 1 місяць (А,В) та 6 місяців (Б,Г) ($M \pm m$; $n=6$). А,Б – аркуатне ядро; В,Г – преоптичне ядро. * – $p < 0,05$ порівняно з контролем; # – $p < 0,05$ у порівнянні з групою «НЧЗ» або «НЧС» відповідно.

Морфо-функціональна характеристика нейронів преоптичного ядра гіпоталамусу. В преоптичній ділянці розташовані тіла нейронів, які продукують гонадоліберин. Відомо, що синтетична та секреторна активність цих клітин в основному контролюється за допомогою КП-опосередкованої сигналізації [Han S., 2005; Messenger S., 2005]. Аналогічно до результатів, отриманих при аналіз стану нейроцитів аркуатного ядра, введення ПФН та ДМСО в обох вікових групах не призвело до розвитку морфологічних та морфометричних змін. Показники групи «КП-10» 1-місячних тварин відповідали контрольним величинам, в той час як дія Р-234 проявилась у достовірному зменшенні площі перерізу ядер нейронів. Водночас, в аналогічних групах 6-місячних тварин відмічали стимулюючу дію КП-10 на морфо-функціональний стан преоптичних нейроцитів (рис. 1 В, Г). Оскільки чутливість гонадоліберин-продукуючих нейронів до дії КП є різною на різних стадіях онтогенезу, виявлені вікові відмінності можуть бути ознакою незавершеності статевого дозрівання 1-місячних тварин [Hu M.H., 2015; Novaira H.J., 2014]. В обох вікових групах введення НЧЗ та НЧС призвело до зменшення активності нейронів. КП-10 не впливав на морфо-функціональний стан

нейроцитів тварин, яким попередньо вводили наночастинки. Пригнічуюча дія Р-234 зберігалась в обох вікових групах «НЧЗ+Р-234» та групі «НЧС+Р-234» 1-місячних тварин. В усіх експериментальних групах не було відмічено розвитку суттєвих патологічних змін. Таким чином, пригнічуюча дія наночастинок металів на преоптичні нейроцити гіпоталамусу не впливала на характер КП-опосередкованої регуляції їхнього функціонального стану, що підтверджує опосередкований шлях впливу наноматеріалів на активність гіпоталамічних структур.

Морфо-функціональна характеристика гонадотропоцитів аденогіпофіза. Ін'єкції КП-10 тваринам 1-місячного віку призвели до активації гонадотропоцитів, що проявилось у пропорційному збільшенні розмірів клітин та їхніх ядер (табл. 2). Введення антагоністу КП-рецепторів за аналогічних умов не призвело до достовірних морфометричних змін, хоча морфологічно спостерігали зростання частки клітин із видимою макулою. Оскільки в цій ділянці розташовується апарат Гольджі, вказані морфологічні зміни свідчать про зниження секреторної активності клітин [Жураківська О.Я., 2012]. Введення НЧЗ та НЧС молодим тваринам призвело до зменшення площі перерізу цитоплазми, хоча розміри ядер залишились незмінними. При цьому спостерігали збільшення кількості клітин із видимою макулою (рис. 2). Стимуляція та пригнічення КП-опосередкованої сигналізації на тлі введення нанозолота не призвели до розвитку достовірних змін. Водночас, активуючий вплив кіспептину було зафіксовано за сумісної дії з НЧС.

Таблиця 2

Морфометричні параметри гонадотропоцитів аденогіпофіза тварин різного віку ($M \pm m$; $n=6$)

| Група | Тварини 1-місячного віку | | | Тварини 6-місячного віку | | |
|-----------|--|--|--------------------------|--|--|--------------------------|
| | Площа перерізу ядер (мкм^2) | Площа перерізу цитоплазми (мкм^2) | ЯЦС | Площа перерізу ядер (мкм^2) | Площа перерізу цитоплазми (мкм^2) | ЯЦС |
| Контроль | 21,13±0,65 | 95,54±3,45 | 0,248±0,015 | 23,65±0,58 | 95,50±2,96 | 0,290±0,017 |
| ПФН | 21,28±0,72 | 94,18±4,88 | 0,247±0,016 | 23,80±1,05 | 96,38±4,47 | 0,275±0,019 |
| ДМСО | 20,21±0,81 | 96,61±4,82 | 0,233±0,014 | 22,96±0,51 | 95,74±2,96 | 0,273±0,009 |
| КП-10 | 26,09±0,61* | 105,76±2,82* | 0,258±0,008 | 26,57±1,01* | 116,36±4,58* | 0,241±0,015* |
| Р-234 | 20,72±0,48 | 90,96±2,19 | 0,275±0,023 | 23,37±0,61 | 91,75±3,57 | 0,271±0,010 |
| НЧЗ | 20,17±0,47 | 78,85±2,44* | 0,274±0,010* | 20,85±0,51* | 95,20±3,30 | 0,232±0,009* |
| НЧЗ+КП-10 | 20,26±1,11 | 76,00±3,50 | 0,282±0,020 | 25,13±0,59 [#] | 97,61±4,02 | 0,277±0,012 [#] |
| НЧЗ+Р-234 | 19,97±0,50 | 74,52±2,97 | 0,289±0,012 | 21,44±0,48 | 89,78±2,93 | 0,261±0,009 [#] |
| НЧС | 20,14±0,51 | 90,54±2,86* | 0,238±0,010 | 22,79±0,66 | 98,53±4,09 | 0,248±0,011* |
| НЧС+КП-10 | 24,79±0,58 [#] | 85,90±2,55 | 0,318±0,009 [#] | 24,44±0,75 [#] | 110,83±5,11 [#] | 0,245±0,015 |
| НЧС+Р-234 | 20,87±0,64 | 87,71±3,29 | 0,266±0,011 [#] | 22,93±0,55 | 95,10±4,33 | 0,274±0,015 |

Примітка: * – $p < 0,05$ порівняно з контролем; # – $p < 0,05$ у порівнянні з групою «НЧЗ» або «НЧС» відповідно.

Морфо-функціональний стан гонадотропоцитів тварин 6-місячного віку контрольної групи свідчить про високу функціональну активності залози. Екзогенний КП-10 підвищував активність клітин аденогіпофіза, в той час як Р-234 не призводив до достовірних змін. Введення нанометалів призводило до зменшення

ядерно-цитоплазматичного співвідношення, хоча лише в групі «НЧЗ» зафіксовано зменшення площі перерізу ядер. Дія нанозолота послаблювала стимулюючий вплив КП-10 у дорослих тварин, в той час як ін'єкції НЧС таких наслідків не мали.

Показники груп «ПФН» та «ДМСО» не відрізнялись від контрольних значень в усіх вікових групах. Також не було виявлено розвитку патологічних гістологічних змін за дії нанометалів. Дані щодо впливу наночастинок металів на активність гонадотропоцитів є суперечливими: в різних дослідженнях виявлено як відсутність змін рівнів гонадотропних гормонів [Li W.-Q., 2012], так і компенсаторне посилення функції аденогіпофіза [Dziendzikowska K., 2016]. Отримані нами результати підтверджують наявність пригнічуючого впливу наночастинок на активність центральних компонентів гіпоталамо-гіпофізарно-гонадної системи. Водночас, виявлені відмінності у впливі НЧЗ та НЧС дозволяють припустити також безпосередній вплив нанометалів на гонадотропоцити.

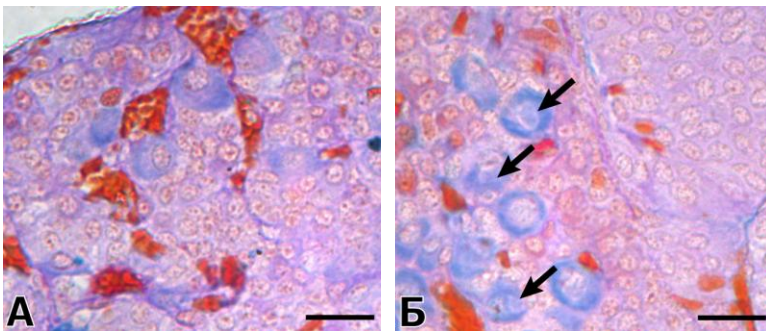


Рисунок 2. Мікрофотографії аденогіпофіза щурів 1-місячного віку контрольної групи (А) та групи «НЧЗ» (Б). Стрілкою позначено макулу. Забарвлення альціановим синім, реактивом Шиффа та оранжем Ж за Herlant. Масштабна лінійка – 20 мкм.

Морфо-функціональна характеристика сім'яників. Нами було продемонстровано відсутність морфологічних та морфометричних змін за дії розчинів ПФН та ДМСО в усіх вікових групах. Стимулюючий вплив кісспептину на функціональну активність сім'яників добре досліджений [Матвієнко М.Г., 2012; Matsui H., 2014]. В нашому досліді спостерігали достовірне зростання всіх вимірних морфометричних параметрів сім'яників тварин 1-місячного віку за дії КП-10. При цьому реєстрували морфологічні ознаки посилення сперматогенної та ендокринної функцій сім'яників. Аналогічні ін'єкції Р-234 призводили до зменшення активності органу. Одночасно в тканині сім'яника виявляли порушення організації та дегенерацію сперматогенного епітелію (рис. 3Б). Введення НЧЗ призвело до зниження активності клітин Лейдіга, та розвитку змін, аналогічних групі «Р-234». Кісспептин у поєднанні із нанозолотом не мав стимулюючого впливу, а Р-234 призвів до подальшого пригнічення активності сім'яників. Водночас збільшувалась кількість патологічно змінених клітинних елементів, відмічали появу велетенських багатоядерних клітин (рис. 3В). Вплив НЧС при поодиноких введеннях був аналогічним дії нанозолота. Комбіновані введення КП-10 та НЧС не призводили до зростання активності сім'яників – відмічали подальше зменшення площі перерізу ядер клітин Лейдіга, а також збільшення кількості каналців зі значною дегенерацією сперматогенного епітелію, що проявлялась у відсутності сперматид та сперматозоїдів з одночасним порушенням гістоархітектури (рис. 3Г). Пригнічуюча дія Р-234 зберігалась при сумісних введеннях з наносріблом та призводила до подальшого зменшення площі перерізу ядер клітин Лейдіга та діаметру звивистих сім'яних каналців.

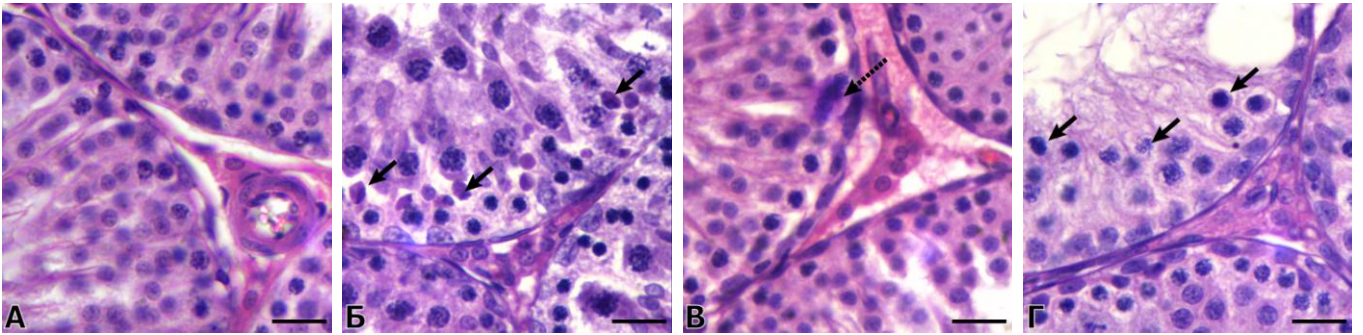


Рисунок 3. Мікрофотографії сім'яників щурів 1-місячного віку. А – контроль, Б – «Р-234», В – «НЧЗ+Р-234», Г – «НЧС+КП-10». Позначено дегенерацію елементів сперматогенного епітелію (→) та багатоядерні клітини (---→). Забарвлення гематоксиліном Бемера та еозином. Масштабна лінійка – 20 мкм.

В сім'яниках щурів 6-місячного віку загальний характер змін був подібним до показників статевонезрілих тварин. На контрольних препаратах відмічали ознаки більшої, порівняно із 1-місячними тваринами, активності органу (рис. 4А). Екзогенний КП-10 призвів до зростання площі перерізу ядер клітин Лейдіга та діаметру звивистих сім'яних канальців, хоча площа перерізу ядер клітин Сертолі не відрізнялась від контролю (рис. 5). Вплив Р-234 був протилежним до КП-10. Водночас, кількість дегенеративних змін була нижчою, порівняно із аналогічною групою тварин 1-місячного віку. Введення НЧЗ призвело до достовірного зменшення всіх вимірних морфометричних параметрів, а морфологія тканини була подібною до групи «Р-234». Сумісні введення КП-10 та НЧЗ не призвели до зростання активності органу. В той же час у деяких канальцях відмічали формування багатоядерних клітин (рис. 4Б). Блокування КП-опосередкованої сигналізації за дії нанозолота призвело до збільшення кількості дегенерованих форм сперматогенних клітин, а також пригнічення ендокринної функції сім'яників. Наносрібло призвело до достовірного зменшення всіх морфометричних параметрів. В звивистих канальцях спостерігали дегенерацію клітин, а також часткову ексфоціацію сперматогенного епітелію (рис. 4В). Аналогічно до нанозолота, введення НЧС блокувало стимулюючий вплив кіссептину. В канальцях виявляли дегенеровані сперматоцити (рис. 4Г). Сумісний вплив Р-234 та НЧС призводив до подальшого пригнічення сперматогенної та ендокринної функції сім'яника.

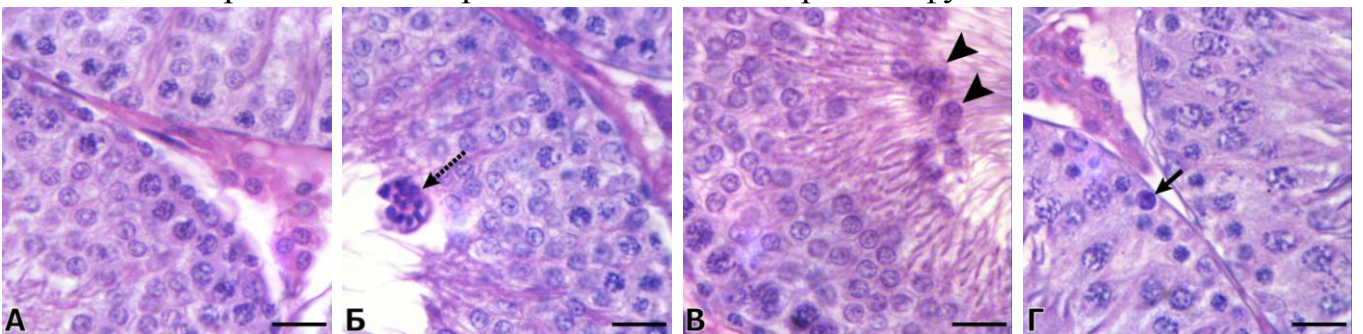


Рисунок 4. Мікрофотографії сім'яників щурів 6-місячного віку. А – контроль, Б – «НЧЗ+КП-10», В – «НЧС», Г – «НЧС+КП-10». Позначено дегенерацію сперматогенного епітелію (→), багатоядерні клітини (---→), відшаровування клітин (→). Забарвлення гематоксиліном Бемера та еозином. Масштабна лінійка – 20 мкм.

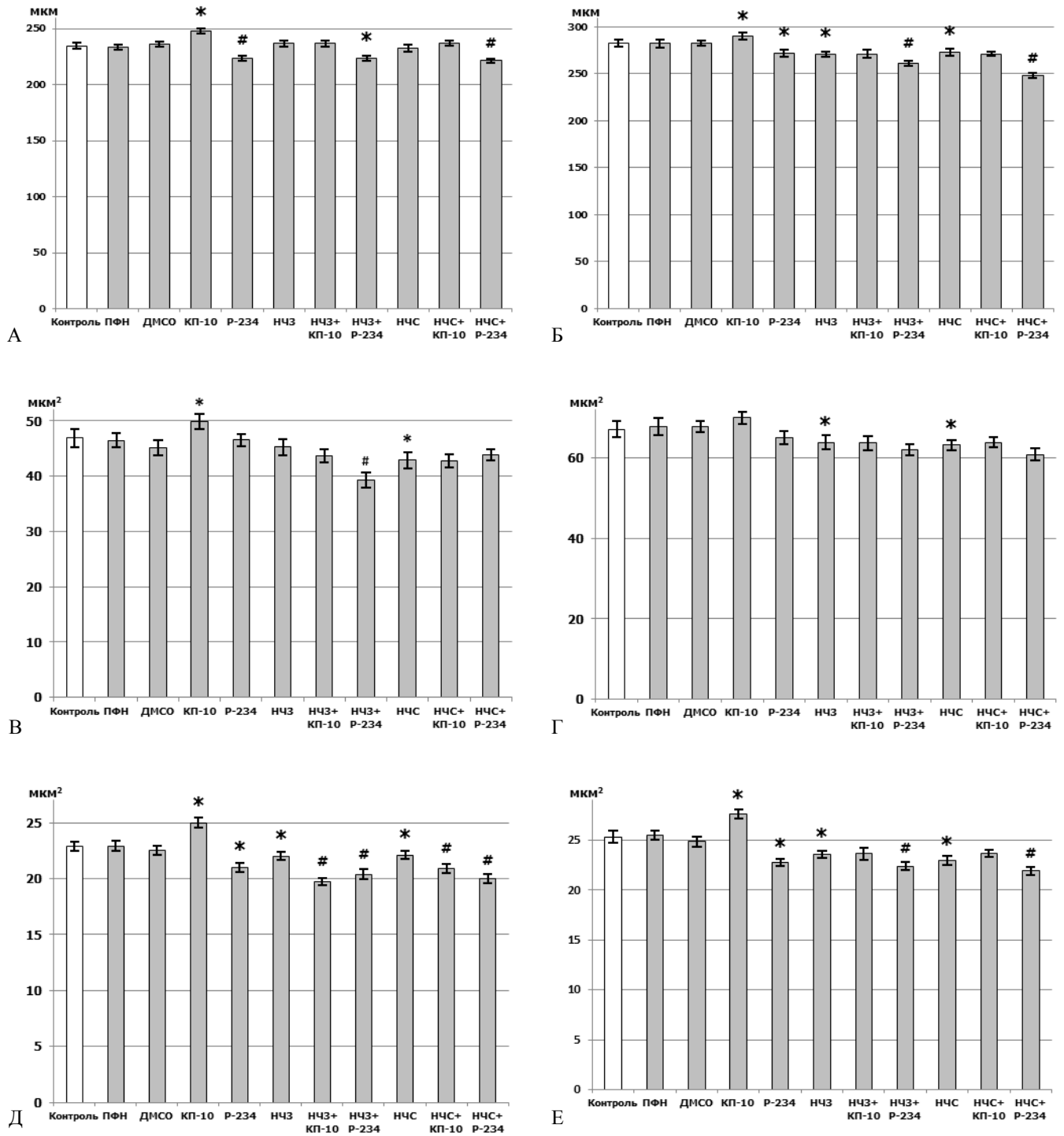


Рис. 5. Морфометричні параметри сім'яників щурів віком 1 місяць (А,В,Д) та 6 місяців (Б,Г,Е) ($M \pm m$; $n=6$). А,Б – діаметр звивистих сім'яних каналців; В,Г – площа поперечного перерізу ядер клітин Сертолі; Д,Е – площа поперечного перерізу ядер клітин Лейдіга. * – $p < 0,05$ порівняно з контролем; # – $p < 0,05$ у порівнянні з групою «НЧЗ» або «НЧС» відповідно.

Отже, отримані нами результати свідчать про розвиток патологічних змін в сім'яниках щурів за дії НЧЗ та НЧС. Окрім розвитку структурних порушень, було відмічено блокування КП-опосередкованої стимуляції, що підтверджує існуючі дані щодо безпосереднього впливу наночастинок на сім'яники [Lafuente D., 2016; Dziendzikowska K., 2016]. Також, у статевонезрілих тварин дія нанометалів

проявлялась у більшому розвитку структурно-функціональних порушень, порівнюючи із дорослими тваринами. Можливою причиною цього явища може бути несформованість регуляторних та компенсаторно-приспосувальних механізмів у молодих тварин.

Концентрація тестостерону в плазмі крові. Відомо, що введення наночастинок металів може призводити до зменшення вмісту тестостерону в крові піддослідних тварин [Kong L., 2014; Vaki M.E., 2014]. Водночас, стимулюючий вплив ін'єкції кіспептину на рівень цього стероїдного гормону також добре описаний [Dhillon W.S., 2005; George J.T., 2013]. В нашому дослідженні інтрацеребровентрикулярні ін'єкції кіспептину призвели до зростання концентрації тестостерону в плазмі крові щурів 1-місячного віку в 2,5 рази. Відповідний показник груп «ПФН», «ДМСО» та «Р-234» не відрізнявся від контрольної величини. Аналогічно, введення нанометалів не призвело до зміни концентрації тестостерону. Блокування КП-опосередкованої сигналізації також не призвело до достовірних змін виміряного параметру. Водночас, ін'єкції КП-10 на тлі введення НЧЗ та НЧС призвели до різкого зростання концентрації тестостерону в плазмі крові в 6,9 та 5 разів відповідно (рис. 6А).

Рівень тестостерону в крові тварин 6-місячного віку не змінювався при дії ПФН та ДМСО. Можна відмітити загалом більш високий, порівняно із 1-місячними тваринами вміст тестостерону, що свідчить про більшу активність тестостерон-продукуючих структур. Вплив КП-10 проявився у двократному зростанні концентрації гормону, в той час як ін'єкції Р-234 призвели до зменшення цього показника в 2,5 рази. За введення нанометалів також спостерігали зменшення вмісту тестостерону в 1,6 рази. Застосування антагоніста КП-рецепторів на тлі ін'єкцій НЧЗ призвело до подальшого зниження концентрації гормону в 2,5 рази, а у випадку групи «НЧС+Р-234» – в 2,7 рази. Стимулюючий ефект КП-10 за сумісних введеннь із нанометалами проявився у 6-кратному збільшенні вмісту гормону в групі «НЧЗ+КП-10» та 5,6-кратному – в групі «НЧС+КП-10» (рис. 6Б).

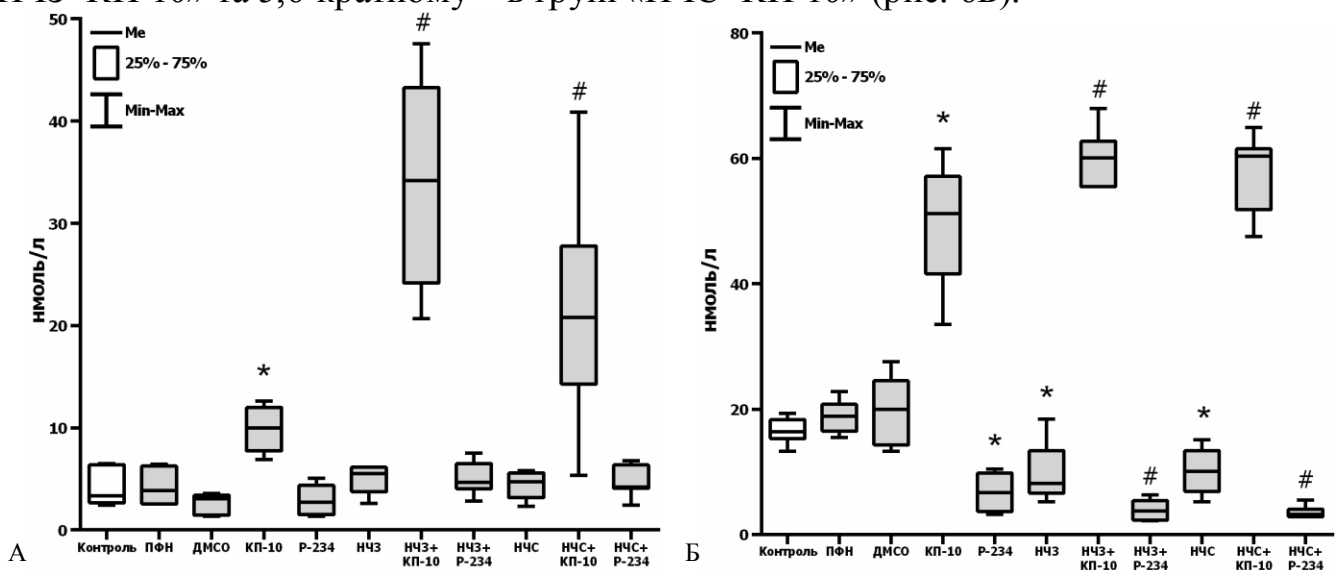


Рис. 6. Концентрація тестостерону в плазмі крові щурів віком 1 місяць (А) та 6 місяців (Б) ($n=6$). * – $p<0,05$ порівняно з контролем; # – $p<0,05$ у порівнянні з групою «НЧЗ» або «НЧС» відповідно.

Таким чином, нами було виявлено, що сумісні введення наночастинок та кіссептину призводять до значного зростання концентрації тестостерону в крові. Водночас, в сім'яниках тварин відповідних груп не було виявлено морфологічних та морфометричних ознак підвищення активності клітин Лейдіга. Отримані дані свідчать, що, не зважаючи на пригнічення активності, клітини Лейдіга зберігають чутливість до дії гонадотропних гормонів аденогіпофіза. Неузгодженість між визначеним рівнем тестостерону та морфологічними ознаками рівня функціональної активності може бути пояснена дією наночастинок. Відомо, що гонадотропні гормони з одного боку короткочасно підвищують активність ензимів, задіяних у біосинтезі тестостерону, а з іншого – активують транскрипцію відповідних генів [Beattie M.C., 2015; Svechnikov K., 2010]. Враховуючи, що наночастинок металів можуть накопичуватись в клітинах Лейдіга та впливати на процеси внутрішньоклітинного метаболізму [Baki M.E., 2014; Komatsu T., 2008], ми припускаємо, що НЧЗ та НЧС блокують довгострокові ефекти гіпофізарних гормонів.

Морфо-функціональна характеристика придатків сім'яників. В додатках сім'яників тварин контрольної групи 1-місячного віку було виявлено присутність у просвіті каналця помірної кількості сперматозоїдів, а також елементів сперматогенного епітелію (рис. 7А). Аналогічну будову мали також і придатки тварин груп «ПФН» та «ДМСО». Ці структурні особливості можуть бути ознакою незавершеності статевого дозрівання [Creasy D., 2012]. Відомо, що активність придатків сім'яників залежить від рівня не тільки тестостерону, а й гонадотропних гормонів аденогіпофіза [Dahlia S.L., 2008]. Відповідно, можна припустити наявність стимулюючого ефекту екзогенного кіссептину. У наших дослідження інтрацеребровентрикулярне введення КП-10 призвело до достовірного зростання всіх виміряних морфометричних параметрів з одночасним розвитком морфологічних ознак підвищення активності епітеліоцитів каналця. Введення антагоніста КП-рецепторів призводило до зменшення площі перерізу ядер епітеліоцитів та збільшення кількості сперматогенних клітин у просвіті (рис. 7Б).

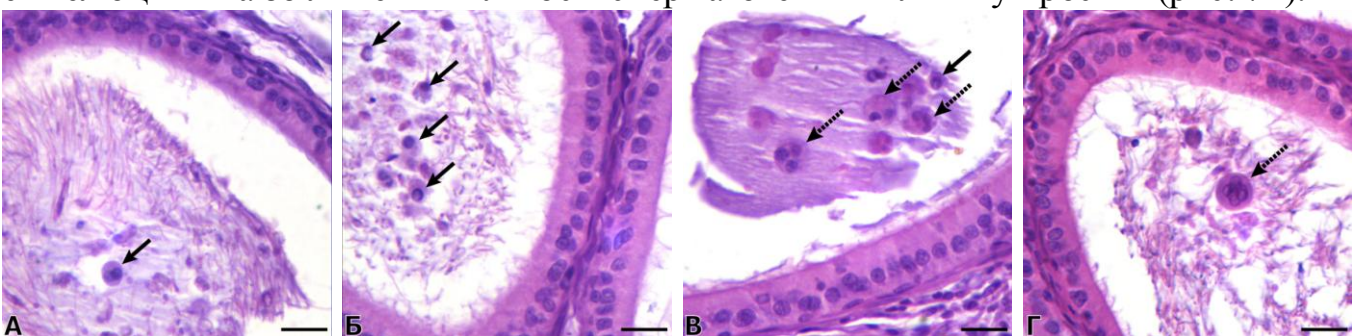


Рисунок 7. Мікрофотографії придатків сім'яників щурів 1-місячного віку. А – контроль, Б – «Р-234», В – «НЧЗ+Р-234», Г – «НЧС+Р-234». Позначено елементи сперматогенного епітелію (—→) та багатоядерні клітини (---→). Забарвлення гематоксилином Бемера та еозином. Масштабна лінійка – 20 мкм.

Дія НЧЗ була подібною до впливу Р-234, хоча відмічали збільшення кількості деформованих ядер епітеліоцитів. Поєднання дії КП-10 та нанозолота призвело до зростання активності епітеліоцитів з одночасним покращенням якості вмісту каналця придатку. Введення Р-234 на тлі ін'єкцій НЧЗ призвело до подальшого

зменшення активності придатку, гіпоспермії, а також появи у просвіті багатоядерних клітин (рис. 7В). Морфо-функціональний стан придатків сім'яників тварин групи «НЧС» були аналогічними до групи «НЧЗ». Натомість, КП-10 не проявив стимулюючого ефекту у поєднанні із наносріблом. Сумісні введення НЧС та Р-234 призвели до зменшення активності придатків, що морфологічно проявилось у значному погіршенні якості вмісту каналцю, а також збільшенням кількості епітеліоцитів із гіперхромними та деформованими ядрами (рис 7Г).

Придатки сім'яників контрольних тварин 6-місячного віку мали ознаки високої функціональної активності. На відміну від 1-місячних щурів, відмічали високу концентрацію сперматозоїдів та майже повну відсутність сперматогенних клітин. Ін'єкції ДМСО та ПФН не викликали розвитку достовірних змін. В придатках сім'яників групи «КП-10» відмічали активацію епітеліоцитів каналцю, що проявлялось у збільшенні всіх досліджених морфометричних параметрів. В той же час в групі «Р-234» спостерігали збільшення кількості сперматогенних клітин в просвіті каналцю та зменшення площі перерізу ядер клітин. Ці дані узгоджуються з результатами відповідних груп 1-місячних тварин (табл. 3).

Таблиця 3

Морфометричні параметри придатків сім'яників тварин різного віку ($M \pm m$; $n=6$)

| Група | Тварини 1-місячного віку | | Тварини 6-місячного віку | |
|------------------|----------------------------|---|----------------------------|--|
| | Висота епітеліоцитів (мкм) | Площа поперечного перерізу ядер епітеліоцитів (мкм ²) | Висота епітеліоцитів (мкм) | Площа поперечного перерізу ядер епітеліоцитів, (мкм ²) |
| <i>Контроль</i> | 17,57±0,41 | 28,86±0,38 | 16,53±0,30 | 32,70±0,48 |
| <i>ПФН</i> | 17,65±0,45 | 29,06±0,32 | 16,94±0,27 | 33,69±0,45 |
| <i>ДМСО</i> | 17,80±0,29 | 28,42±0,28 | 16,94±0,21 | 32,19±0,45 |
| <i>КП-10</i> | 19,00±0,27* | 30,94±0,41* | 19,14±0,28* | 35,76±0,62* |
| <i>Р-234</i> | 17,01±0,30 | 26,67±0,34* | 16,58±0,22 | 27,75±0,35* |
| <i>НЧЗ</i> | 17,49±0,49 | 26,74±0,30* | 16,87±0,24 | 29,90±0,42* |
| <i>НЧЗ+КП-10</i> | 16,99±0,27 | 30,65±0,37 [#] | 16,65±0,22 | 33,17±0,50 [#] |
| <i>НЧЗ+Р-234</i> | 17,65±0,30 | 25,25±0,25 [#] | 16,64±0,24 | 30,34±0,37 |
| <i>НЧС</i> | 17,19±0,40 | 26,31±0,34* | 16,25±0,22 | 29,47±0,43* |
| <i>НЧС+КП-10</i> | 16,89±0,20 | 26,80±0,27 | 16,90±0,25 [#] | 30,78±0,41 [#] |
| <i>НЧС+Р-234</i> | 16,20±0,23 [#] | 26,08±0,28 | 16,16±0,32 | 29,47±0,44 |

Примітка: * – $p < 0,05$ порівняно з контролем; # – $p < 0,05$ у порівнянні з групою «НЧЗ» або «НЧС» відповідно.

Введення НЧЗ призвело до пригнічення активності клітин придатку, а також вакуолізації цитоплазми деяких епітеліоцитів. Сумісна дія НЧЗ та кіссептину проявилась у частковому підвищенні функціональної активності органу, хоча одночасно спостерігали значну морфологічну гетерогенність ядер клітин. Введення Р-234 за аналогічних умов призвело до зростання кількості сперматогенних клітин та розростання сполучнотканинної стромы. Дія НЧС була аналогічної до впливу нанозолота, хоча відмічали наявність більшої кількості сперматогенних клітин. Наносрібло не блокувало стимулюючий вплив кіссептину в групі «НЧС+КП-10».

Сумісна дія НЧС та Р-234 призвела до значного розростання міжканальцевої сполучної тканини, хоча морфометричних змін зафіксовано не було.

Слід зауважити, що в усіх групах тварин 6-місячного віку кількість сперматогенних клітин в просвіті каналця була меншою, ніж в аналогічних групах 1-місячних тварин. Водночас, деякі морфологічні зміни, що розвивались за дії нанометалів (вакуолізація цитоплазми, значне розростання сполучної тканини) були більш вираженими саме у 6-місячних тварин. В обох вікових групах вплив НЧС був асоційований із розвитком тяжчих порушень морфо-функціонального стану.

Морфо-функціональна характеристика передміхурової залози. В передміхуровій залозі тварин 1-місячного віку всіх експериментальних груп було виявлено значну кількість ацинусів, вистелених плоским та кубічним епітелієм (рис. 8А). Це свідчить низький рівень активності залози загалом [Creasy D., 2012]. В зразках тварин груп «Контроль», «ПФН» та «ДМСО» фіксували морфологічні ознаки помірної функціональної активності при відсутності міжгрупових відмінностей у відносному об'ємі епітелію (рис. 9А). Введення КП-10 призвело до збільшення кількості та щільності секрету в ацинусах, а Р-234 – до інгібування секреторної функції простати. Відомо, що наночастинки можуть провокувати розвиток запальних процесів в передміхуровій залозі [Салівоник О.А., 2015]. В нашому дослідженні НЧЗ викликали лише зменшення активності простати, в той час як за впливу НЧС було виявлено осередки лейкоцитарної інфільтрації (рис. 8Б). Ін'єкції КП-10 мали стимулюючий вплив у випадку поєднання із НЧЗ, і відсутність достовірних змін при введеннях НЧС. Р-234 зберігав пригнічуючий вплив за дії обох видів наночастинок.

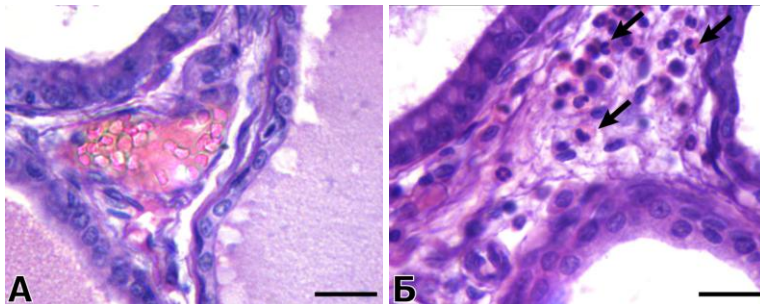


Рисунок 8. Мікрофотографії передміхурової залози щурів 1-місячного віку. А – контроль, Б – «НЧС». Стрілками позначено лейкоцитарну інфільтрацію. Забарвлення гематоксиліном Бемера та еозином. Масштабна лінійка – 20 мкм.

Морфо-функціональний стан передміхурової залози тварин 6-місячного віку свідчив про значну активність органу. Ін'єкції КП-10 призводили до інтенсифікації секреторної активності залози, а введення Р-234 мали протилежний вплив. Вплив нанометалів призводив до зниження активності органу, що підтверджується морфологічними та морфометричними змінами (рис. 9Б). НЧЗ та НЧС не блокували КП-опосередковану стимуляцію простати – в групах «НЧЗ+КП-10» та «НЧС+КП-10» спостерігали покращення стану секреторного епітелію та якості секрету. Водночас, в зразках групи «НЧС+КП-10» відмічали локальну дегенерацію залози, що супроводжувалась накопиченням еозинофільних включень в ацинусах. Це може свідчити про розвиток патологічних процесів [Creasy D., 2012]. Сумісна дія Р-234 та нанометалів призводила до прогресуючого пригнічення активності залози, зменшення кількості секрету та розростання сполучнотканинної стромы органу. Таким чином, наші дані свідчать, що введення НЧЗ та НЧС призводить до

погіршення морфо-функціонального стану простати тварин обох вікових груп. При цьому вплив наносрібла призводить до розвитку тяжчих порушень, а у 1-місячних тварин – блокує стимулюючі ефекти кіссептину.

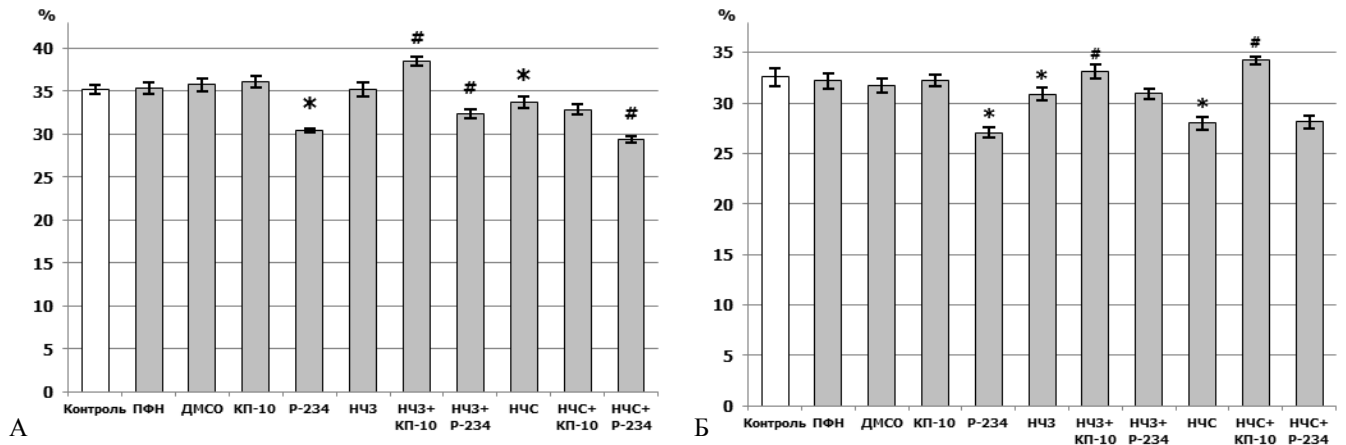


Рисунок 9. Відносний об'єм епітелію передміхурової залози щурів віком 1 місяць (А) та 6 місяців (Б) ($M \pm m$; $n=6$). * – $p < 0,05$ порівняно з контролем; # – $p < 0,05$ у порівнянні з групою «НЧЗ» або «НЧС» відповідно.

ВИСНОВКИ

В результаті проведених нами досліджень було встановлено, що наночастинки золота та срібла справляють пригнічуючий вплив на активність центральної та периферичної ланок гіпоталамо-гіпофізарно-гонадної системи, при цьому нанорозмірне срібло є більш токсичним за нанорозмірне золото:

1. Наночастинки золота та срібла пригнічують активність нейронів преоптичного та аркуатного ядер гіпоталамусу, безпосередньо не впливаючи на процеси кіссептинергічної сигналізації;
2. Активність гонадотропоцитів аденогіпофіза знижувалась за введення наночастинок золота та срібла, при чому введення нанорозмірного золота блокувало кіссептин-індуковану стимуляцію гонадотропоцитів;
3. Виявлено, що ін'єкції наночастинок золота та срібла призводять до порушення процесу сперматогенезу та викликають розвиток гістопатологічних змін в сім'яниках щурів. При цьому стимулюючий вплив кіссептину був короткотерміновим та не впливав на загальний стан тканини;
4. В придатках сім'яника наночастинки металів викликали пригнічення функціонального стану головних епітеліоцитів, при чому дія наночастинок срібла полягала в одночасному пригніченні кіссептин-опосередкованої стимуляції придатків і стимуляції росту строми органу;
5. Встановлено, що дія наночастинок золота на передміхурову залозу полягала у розвитку морфологічних змін при збереженні чутливості до кіссептин-опосередкованої регуляції. Водночас, введення наночастинок срібла призводило до розвитку запальних процесів та зменшення чутливості залози до регуляторних стимулів;
6. Морфо-функціональні зміни в репродуктивній системі статевонезрілих щурів при дії наночастинок були більш вираженими, порівняно із аналогічними показниками дорослих особин.

СПИСОК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Калиновский В.Е. Влияние системного введения наночастиц и растворов солей золота и серебра на размеры ядер нейронов гипоталамуса самцов крыс / В.Е. Калиновский, А.С. Пустовалов, Г.Я. Гродзюк, Н.С. Анрюшина, Н.Э. Держинский // *Нейрофизиология*. – 2016. – Т.48, № 4. – С. 286–290. *(Особистий внесок здобувача – планування експерименту, проведення аналізу морфометричних показників, інтерпретація отриманих результатів, підготовка матеріалів до друку).*
2. Калиновський В.Є. Кіссептин-опосередкована регуляція морфофункціонального стану сім'яників щурів за дії наночастинок золота / В.Є. Калиновський, А.С. Пустовалов, Г.Я. Гродзюк, Н.С. Андрюшина, М.Е. Держинський // *Вісник Дніпропетровського університету. Біологія, екологія*. – 2016. – Т.24, № 2. – С. 359-363. *(Особистий внесок здобувача – підбір та узагальнення літературних даних, дослідження морфологічного стану тканини сім'яників, аналіз та інтерпретація отриманого матеріалу, написання тексту статті).*
3. Калиновський В.Є. Морфофункціональний стан передміхурової залози та придатків сім'яників за дії наночастинок золота та срібла / В.Є. Калиновський, А.С. Пустовалов, Г.Я. Гродзюк, Н.С. Андрюшина, М.Е. Держинський // *Вісник Дніпропетровського університету. Біологія, медицина*. – 2016. – Т.7, № 2. – С. 106-111. *(Особистий внесок здобувача – планування експерименту, аналіз літературних джерел, проведення аналізу морфометричних показників, аналіз та інтерпретація отриманого матеріалу, написання статті).*
4. Калиновський В.Є. Вплив наночастинок та йонів золота на морфофункціональний стан сім'яників статевонезрілих щурів / В.Є. Калиновський, А.С. Пустовалов, Г.Я. Гродзюк, Н.С. Андрюшина, М.Е. Держинський // *Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія: Біологія*. – 2016. – Т.71. – № 1. – С. 23-26. *(Особистий внесок здобувача – дослідження морфологічного стану сім'яників, аналіз літературних джерел та отриманих результатів, написання тексту статті та підготовка матеріалів до друку).*
5. Калиновський В.Є. Вплив наночастинок срібла на кіссептин-опосередковану регуляцію морфофункціонального стану сім'яників щурів / В.Є. Калиновський, А.С. Пустовалов, Г.Я. Гродзюк, Н.С. Андрюшина, М.Е. Держинський // *Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія: Проблеми регуляції фізіологічних функцій*. – 2016. – Т.20, № 1. – С. 8-11. *(Особистий внесок здобувача – планування експерименту, проведення аналізу морфометричних показників, інтерпретація отриманих результатів, підготовка матеріалів до друку).*
6. Наукові доповіді НУБіП України [Електронний ресурс]: Калиновський В.Є. Вікові особливості впливу наночастинок срібла на морфофункціональний стан сім'яників щурів / В.Є. Калиновський, А.С. Пустовалов, Г.Я. Гродзюк, Н.С. Андрюшина, М.Е. Держинський // *Наукові доповіді НУБіП України*. – 2016. – Т.63. – № 6. – Режим доступу: <http://journals.nubip.edu.ua/index.php/Dopovidi/article/view/7536/7251> (дата звернення: 3.10.2017). *(Особистий внесок здобувача – дослідження морфологічного*

стану сім'яників, аналіз літературних джерел та отриманих результатів, написання тексту статті та підготовка матеріалів до друку).

7. Калиновський В. Вплив наночасток золота на морфофункціональний стан сім'яників статевонезрілих щурів / В. Калиновський, А. Пустовалов, Н. Бузинська, М. Держинський // Молодь і поступ біології: збірник тез XI Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів (м. Львів, 20-23 квітня 2015 р.). – Львів: СПОЛОМ, 2015. – С. 462–463.
8. Kalynovskyi V.E. Morphofunctional changes in the reproductive system of juvenile rats following nanosilver administration / V.E. Kalynovskyi, A.S. Pustovalov, M.E. Dzerzhynsky // Abstract Book of participants of the International summer school and International research and practice conference “Nanotechnology and nanomaterials” (NANO-2015), 26-29 August 2015, Lviv. – Lviv: Eurosvit, 2015. – P. 390.
9. Kalynovskyi V. Morpho-functional changes in the rat testes under the effect of gold nanoparticles. / V. Kalynovskyi, A. Pustovalov, G. Grodzyuk, N. Andriushyna, M. Dzerzhynsky // Молодь і поступ біології: збірник тез XII Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів (м. Львів, 19-21 квітня 2016 р.). – Львів, 2016. – С. 317–318.
10. Kalynovskyi V. Silver nanoparticles affect regulation of testicular activity in the young rats / V. Kalynovskyi, A. Pustovalov, G. Grodzyuk, N. Andriushyna, M. Dzerzhynsky // Proceedings of the joint meeting of the American Physiological Society and The Physiological Society, 29-31 July 2016, Dublin. – Dublin, 2016. – P. 171P.
11. Kalynovskyi V. Morphofunctional changes in the testes of juvenile rats after administration of gold nanoparticles / V. Kalynovskyi, A. Pustovalov, G. Grodzyuk, N. Andriushyna, M. Dzerzhynsky // Abstracts of the 25th Anniversary of the FEPS, 168th Anniversary of French Physiological Society, Paris (France), June 29th-July 1st. – Paris, 2016. – P. 120.
12. Kalynovskyi V.Ye. Silver nanoparticles affect testicular function of the rats of different age // V.Ye. Kalynovskyi, A.S. Pustovalov, G.Ya. Grodzyuk, N.S. Andriushyna, M. E. Dzerzhynsky / Abstract book of participants of the International summer school and International research and practice conference “Nanotechnology and nanomaterials” (NANO-2016), 24-27 August 2016, Lviv. – Lviv: Eurosvit, 2016. – P. 471.

АНОТАЦІЯ

Калиновський В.Є. Наночастинки золота та срібла як модулятори кісспептин-опосередкованої регуляції роботи репродуктивної системи самців щурів. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.11 – цитологія, клітинна біологія, гістологія. – Київський національний університет імені Тараса Шевченка МОН України, Київ, 2017.

В дисертації досліджено репродуктивну токсичність наночастинок золота та срібла при поодинокому введенні, а також у поєднанні із центральною стимуляцією чи інгібуванням гіпоталамо-гіпофізарно-гонадної системи самців щурів різного віку. Встановлено, що наночастинки золота та срібла справляють пригнічуючий вплив на морфо-функціональний стан компонентів гіпоталамо-гіпофізарно-гонадної системи. Виявлено, що дія наночастинок направлена водночас на центральні та периферичні

ланки репродуктивної системи. Продемонстровано, що морфо-функціональні зміни в статевій системі статевонезрілих шурів при дії наночастинок були більш вираженими, що може бути пов'язане із недорозвиненістю та недосконалістю регуляторних та компенсаторно-приспосувальних систем.

Ключові слова: наночастинки золота, наночастинки срібла, сім'яник, придаток сім'яника, передміхурова залоза, аденогіпофіз, гіпоталамус, кіссептин.

АННОТАЦІЯ

Калиновский В.Е. Наночастицы золота и серебра как модуляторы кисспептин-зависимой регуляции работы репродуктивной системы самцов крыс. – Рукопись.

Диссертация на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.11 – цитология, клеточная биология, гистология. – Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко МОН Украины, Киев, 2017.

В диссертации исследована репродуктивная токсичность наночастиц золота и серебра при одиночном введении, а также совместно с центральной стимуляцией или подавлением гипоталамо-гипофизарно-гонадной системы самцов крыс разного возраста. Установлено, что наночастицы золота и серебра подавляюще влияют на морфо-функциональное состояние компонентов гипоталамо-гипофизарно-гонадной системы. Выявлено, что действие наночастиц направлено одновременно на центральные и периферические компоненты половой системы. Продемонстрировано, что морфо-функциональные изменения в половой системе неполовозрелых крыс при действии наночастиц были более выраженными, что может быть связано с недоразвитостью и несовершенством регуляторных и компенсаторно-приспособительных систем.

Ключевые слова: наночастицы золота, наночастицы серебра, семенник, придаток семенника, предстательная железа, аденогипофиз, гипоталамус, кисспептин.

ANNOTATION

Kalynovskiy V. Ye. Gold and silver nanoparticles as modulators of kisspeptin-mediated regulation of reproductive system in male rats. – Manuscript.

Thesis for obtaining the Candidate of Sciences degree in Biology, specialty 03.00.11 – cytology, cell biology, histology. – Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ministry of Education and Science of Ukraine, Kyiv, 2017.

This work is devoted to the investigation of reproductive toxicity of gold and silver nanoparticles. To evaluate not only stationary changes, but systemic physiological effects, we additionally up- and downregulated kisspeptinergic hypothalamic system – the main center for the regulation of hypothalamic-pituitary-gonadal axis.

It was shown that intraperitoneal injection of gold and silver nanoparticles resulted in significant decrease in the functional activity, as measured in hypothalamic arcuate neurons. At the same time, 1-month-old animals were still perceptive to the exogenous kisspeptin, while 6-month-old rats responded to the blockage of kisspeptinergic system only. This difference is probably due to the different sensitivity of neurons to nanometals at different stages of ontogenesis.

Pituitary gonadotrophs were also affected by nanoparticles – we observed significant decrease in the size of cytoplasm and secretory activity. Morphological findings included changes in the coloring of cytoplasm from light-blue to blue-purple and the appearance of the macule in the central part of cells. Exogenous kisspeptin had different effects, regarding the chemical nature of the nanoparticles. Nanosilver did not alter stimulatory effects of kisspeptin and inhibitory effects of its antagonist. On the contrary, nanogold attenuated those kisspeptin-related responses. We also found that pituitary toxicity of gold nanoparticles was much more observable in young animals.

We also investigated effects of nanoparticles on the testes. Both kinds of nanoparticles caused the development of structural changes in this organ. The most frequent histopathologic changes included local degeneration of spermatocytes, local desquamation of testicular epithelium, emergence of multinucleated cells of spermatogenic origin and degeneration of the Leydig cells. The same changes were observed in animals which received combinations of nanoparticles with kisspeptin or its antagonist. Supportive investigation of the blood testosterone levels showed surprising results: despite of the fact that exogenous kisspeptin, injected against the background of nanoparticle administration, had not altered morphometric parameters of the Leydig cells; the concentration of testosterone was significantly elevated. It is known that pituitary hormones affect Leydig cells in two ways: the fast one and the slow one. The fast changes are mainly due to the direct regulation of activity of testosterone-producing enzymes. Slow effects include changes in the transcription of specific genes. As a result, we may conclude that nanoparticles blocked the propagation of the long-term stimulation by pituitary hormones. Also, described effects are partially explained by the sensitization of the Leydig cells.

Changes in the epididymis induced by the gold nanoparticles included increase in the number of sperm-producing cells in the lumen of tubules and proliferation of connective tissue. However, these structural changes did not alter the responsiveness of the organ to kisspeptin-related stimuli. Nanosilver injection resulted in karyopyknosis in the main epithelial cells, increase in the number of leukocytes and overall qualitative changes in the content of lumen. Again, kisspeptin-mediated regulation was unaffected by these changes. As a conclusion, we may state that gold and silver nanoparticles inhibit the activity of epididymis by the direct influence on epithelial cells and connective stroma.

Prostate gland also showed signs of degeneration after the nanogold injections. We observed proliferation of connective tissue, decrease in the height of secretory cells and decrease in the amount of prostate secret. Nanosilver additionally caused leukocyte infiltration and severe local degeneration, which was recognized by the presence of large eosinophilic crystals in the lumen of the gland. But still, kisspeptin-mediated regulation was not significantly altered. Therefore, we may conclude that nanoparticles affect prostate gland in a direct way.

To sum up, we found out that gold and silver nanoparticles cause adverse effects to the morpho-functional state of hypothalamic-pituitary-gonadal system. It was shown that nanotoxicity is realized both through the direct cytotoxicity in target organs and indirect effects mediated by changes in other systems. Nanoparticles induced more significant changes in the organs of young animals, comparing to the adults.

Key words: gold nanoparticles, silver nanoparticles, testis, epididymis, prostate gland, anterior pituitary, hypothalamus, kisspeptin.