

Київський національний університет імені Тараса Шевченка  
Міністерство освіти і науки України  
Київський національний університет імені Тараса Шевченка  
Міністерство освіти і науки України

Кваліфікаційна наукова  
праця на правах рукопису

**КАЛИНОВСЬКИЙ ВІТАЛІЙ ЄВГЕНІЙОВИЧ**

УДК [546.57+546.59]:591.16:591.463

**ДИСЕРТАЦІЯ**

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

03.00.11 – цитологія, клітинна біологія, гістологія

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

В.Є. Калиновський

Науковий керівник: Держинський Микола Едуардович, доктор біологічних наук, професор.

Київ – 2017

## АНОТАЦІЯ

Калиновський В.Є. Наночастинки золота та срібла як модулятори кіссептин-опосередкованої регуляції роботи репродуктивної системи самців щурів. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

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.

Київський національний університет імені Тараса Шевченка МОН України, Київ, 2017.

Робота присвячена дослідженню репродуктивної токсичності 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 введення розчинів наночастинок золота та срібла призводить до пригнічення функціональної активності нейронів аркуатного ядра гіпоталамусу. При цьому нейрони тварин 1-місячного віку зберігали здатність реагувати на стимуляцію екзогенним кіссептином, а нейрони 6-місячних тварин – на пригнічення активності кіссептинергічної системи. Таку різницю у характері відповіді було інтерпретовано як більшу чутливість нейроцитів аркуатного ядра до дії наночастинок металів у молодих тварин.

Виявлені нами морфо-функціональні зміни нейроцитів преоптичного ядра гіпоталамусу корелювали із результатами нейронів аркуатного ядра – введення наночастинок також призвело до зменшення виміряних нами морфометричних параметрів. Водночас, було відмічено втрату здатності нейронів преоптичного ядра відповідати на кіссептин-опосередковану стимуляцію, в той час як ефекти блокування кіссептинергічних шляхів не змінювались. Оскільки в тканині гіпоталамусу при дії наночастинок не відмічали розвиток гістопатологічних змін, отримані нами результати дозволяють припустити, що вплив наночастинок золота

та срібла на нейрони був не прямим, а опосередкованим позагіпоталамічною зміною рівнів гормонів або метаболітів.

При дослідженні морфо-функціонального стану гонадотропоцитів аденогіпофіза було встановлено, що дія наночастинок золота та срібла проявлялась у зменшенні об'єму цитоплазми та накопиченні секрету. При цьому спостерігали зміну кольору цитоплазми на темно-синьо-фіолетову та появу чітко окресленої макули. Характер кісспептин-опосередкованої стимуляції при цьому відрізнявся, залежно від складу наночастинок. При дії наночастинок срібла стимулююча дія кісспептину зберігалась, хоча була значно меншою. На противагу, за дії наночастинок золота ін'єкції кісспептину майже не викликали позитивних морфо-функціональних змін в тканині аденогіпофіза. Також було виявлено, що негативні ефекти наночастинок золота щодо гонадотропоцитів молодих тварин були більшими, ніж у тварин 6-місячного віку.

Введення наночастинок золота та срібла призводили до появи суттєвих морфо-функціональних змін в сім'яниках тварин обох вікових груп. При цьому спостерігали зменшення морфометричних параметрів, а також появу різних порушень гістологічної будови органу. Ці ж гістопатологічні зміни розвивались і при комбінованих введеннях. Дія наночастинок золота та срібла проявлялась також у нівелюванні стимулюючого впливу кісспептину. Дослідження концентрації тестостерону в плазмі крові продемонструвало, що, хоча комбінація введень нанометалів та кісспептину не призводила до зростання площі перерізу ядер клітин Лейдіга, при цьому спостерігали значне зростання вмісту тестостерону. Оскільки стимулююча дія тропних гормонів на гормон-продукуючу функцію клітин Лейдіга проявляється і в активізації транскрипції відповідних генів, і в стимуляції активності тестостерон-продукуючих ферментів, нами було зроблено висновок, що введення наночастинок золота та срібла блокує довготривалі стимулюючі ефекти. Оскільки одночасно при цьому зменшувалась активність центральних компонентів гіпоталамо-гіпофізарно-гонадної осі, спостерігається сенсibiliзація клітин Лейдіга до гонадотропних гормонів.

Вплив наночастинок золота на морфо-функціональний стан каналців придатків сім'яника проявлявся у збільшенні кількості сперматогенних клітин в просвіті каналця, а також локальному розростанні сполучнотканинної стромы. Також у деяких тварин було виявлено відкладення агломератів металів в оболонці органу. Введення нанозолота не впливало на характер кіссептин-опосередкованої регуляції стану придатків. Натомість, нанорозмірне срібло призводило до розвитку тяжчих дегенеративних процесів. Спостерігали значне розростання стромы органу, збільшення кількості пікнотичних ядер в головних епітеліюцитах та погіршення якісного складу вмісту каналців придатків. Водночас, загальний характер кіссептин-опосередкованих змін не залежав від введень розчинів наночастинок металів. Виявлені нами патологічні зміни були подібними у молодих та дорослих тварин. Враховуючи отримані дані, можна зробити висновок про безпосередній пригнічуючий вплив наночастинок золота та срібла на морфо-функціональний стан придатків сім'яників внаслідок їхньої дії як на епітеліюцити каналців, так і сполучнотканинні елементи.

В тканині передміхурової залози тварин обох вікових груп також було виявлено розвиток дегенеративних змін при дії нанорозмірного золота. Спостерігали розростання стромы органу, зменшення висоти епітеліальної вистилки ацинусів залози, а також зменшення кількості та розрідження секрету. Введення наночастинок срібла призводило до розвитку тяжчих гістопатологічних порушень: окрім тих же змін, які реєстрували при дії нанозолота, виявляли лейкоцитарну інфільтрацію в строму органу, а також локальну дегенерацію залози, яка проявлялась у появі еозинофільних кристалічних включень в просвіті ацинусів. Не зважаючи на це, загальний характер відповіді на зміну активності кіссептин-опосередкованих сигнальних шляхів зберігався. Тому було зроблено висновок про переважно безпосередній токсичний вплив наночастинок на передміхурову залозу.

Таким чином, в ході проведених нами досліджень було встановлено, що наночастинки золота та срібла справляють пригнічуючий вплив на морфо-функціональний стан компонентів гіпоталамо-гіпофізарно-гонадної системи.

Виявлено, що токсичні впливи наночастинок золота та срібла пов'язані як з безпосереднім токсичним впливом в статевих органах, так і зі зміною системних показників, що свідчить про одночасно центральний та периферійний рівні дії наночастинок. Серед досліджених нами типів наночастинок металів, срібло володіло найбільшою токсичністю. Найімовірніше, такий ефект пов'язаний із впливом йонів срібла, які за нормальних умов можуть виділятися частинками. Також в ході наших експериментів продемонстровано, що статевонезрілі особини є значно більш чутливими до дії нанометалів, що може бути пов'язане із недорозвиненістю та недосконалістю регуляторних та компенсаторно-приспосувальних систем.

**Ключові слова:** наночастинок золота, наночастинок срібла, сім'яник, придаток сім'яника, передміхурова залоза, аденогіпофіз, гіпоталамус, кісспептин

## ANNOTATION

Kalynovskyi V. Ye. Gold and silver nanoparticles as modulators of kisspeptin-mediated regulation of reproductive system in male rats. – Qualification scientific work on the rights of manuscript.

The thesis for a Cand. Sci. degree in biological sciences in specialty 03.00.11 – cytology, cell biology, histology. Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ministry of Education and Science of Ukraine, Kyiv, 2017.

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 may have arisen from the differential sensitivity of neurons to nanometals at various stages of ontogenesis.

The major morpho-functional changes in the neurons of preoptic nuclei correlated with the corresponding results of arcuate neurocytes. Just as in that case, preoptic neurons in nanoparticle-treated animals had significantly smaller nuclei, comparing to control group. However, these neurons lost their ability to respond to kisspeptin-mediated stimulation, while blockage of the kisspeptinergic system still resulted in significant changes. Regarding the fact that no histopathologic changes were observed in the tissue, we may conclude that gold and silver nanoparticles affect the activity of hypothalamic arcuate and preoptic neurons in an indirect way – through the systemic changes in the concentrations of some mediators or metabolites.

Pituitary gonadotrophs were also affected by nanoparticles – we observed significant decrease in the size of cytoplasm and secretory activity. Morphological findings included the changes in the coloring of cytoplasm from light-blue to blue-purple and the appearance of macule in the center of the 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 contrary, nanogold attenuated those kisspeptin-related responses. We also found that pituitary toxicity of gold nanoparticles was much more observable in young animals.

Additionally we investigated effects of nanoparticles on the testes of experimental animals. Both kinds of nanoparticles caused the development of different structural changes in these organs. 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, hadn't altered morphometric parameters of the Leydig cells, the levels of testosterone were significantly elevated. It is known that pituitary hormones affect Leydig cells in two ways: the fast and the slow. The fast changes are due to the direct regulation of

testosterone-producing enzymes. Slow effects include changes in the transcription of specific genes. As a result, we may conclude that gold and silver nanoparticles blocked the propagation of the long-term slow stimulation by pituitary hormones. Also, as pituitary activity was also inhibited by nanoparticles, the observed effects are partially explained by the sensitization of Leydig cells.

Epididymal changes induced by gold nanoparticles included the increase in number of spermatogenic cells in the lumen of tubules and proliferation of connective tissue. Also, black agglomerates, presumably gold aggregates, were observed in the capsule of epididymis in some animals. However, these structural changes did not alter the responsiveness of the organ to kisspeptin-related stimuli. Nanosilver injection resulted in more altered state of the tissue. Besides the changes that were similar to those from “Nanogold” group, we have also observed karyopyknosis in main epithelial cells, increase in number of leukocytes and overall qualitative changes in the content of lumen. Again, kisspeptin-mediated regulation was unaffected by these changes. The results in different age groups were also similar. 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 the 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 cluster degeneration, which was recognized as 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 the 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. Also, nanosilver appeared to be more toxic, comparing to nanogold. This difference may be due to the release of toxic silver ions from the surface of nanoparticles. And, at last, we found out that young

animals are more perceptive to the gold and silver nanoparticles, comparing to the adults.

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

#### Список публікацій здобувача

1. Калиновский ВЕ, Пустовалов АС, Гродзюк ГЯ, Андрюшина НС, Держинский НЭ. Влияние системного введения наночастиц и растворов солей золота и серебра на размеры ядер нейронов гипоталамуса самцов крыс. *Нейрофизиология*. 2016;48(4):289–90.
2. Калиновський ВС, Пустовалов АС, Гродзюк ГЯ, Андрюшина НС, Держинський МЕ. Кіссептин-опосередкована регуляція морфофункціонального стану сім'яників щурів за дії наночастинок золота. *Вісник Дніпропетровського університету. Біологія, екологія*. 2016;24(2):359–63.
3. Калиновський ВС, Пустовалов АС, Гродзюк ГЯ, Андрюшина НС, Держинський МЕ. Морфо-функціональний стан передміхурової залози та придатків сім'яників за дії наночастинок золота та срібла. *Вісник Дніпропетровського університету. Біологія, медицина*. 2016;7(2):106–11.
4. Калиновський ВС, Пустовалов АС, Гродзюк ГЯ, Андрюшина НС, Держинський МЕ. Вплив наночастинок та йонів золота на морфо-функціональний стан сім'яників статевонезрілих щурів. *Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія: Біологія*. 2016;71(1):23–6.
5. Калиновський ВС, Пустовалов АС, Гродзюк ГЯ, Андрюшина НС, Держинський МЕ. Вплив наночастинок срібла на кіссептин-опосередковану регуляцію морфо-функціонального стану сім'яників щурів. *Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія: Проблеми регуляції фізіологічних функцій*. 2016;20(1):8–11.

6. Калиновський ВЄ, Пустовалов АС, Гродзюк ГЯ, Андрюшина НС, Держинський МЕ. Вікові особливості впливу наночастинок срібла на морфофункціональний стан сім'яників щурів. Наукові доповіді НУБіП України. [Інтернет]. 2016. [цитовано 2017 Лип 15];63. Доступно на: <http://journals.nubip.edu.ua/index.php/Dopovidi/article/view/7536>
7. Калиновський В, Пустовалов А, Бузинська Н, Держинський М. Вплив наночастинок золота на морфофункціональний стан сім'яників статевонезрілих щурів. В: Молодь і поступ біології: збірник тез XI Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів; 2015 квіт. 20-23; Львів. Львів: СПОЛОМ; 2015. с. 462–3.
8. Kalynovskyi VE, Pustovalov AS, Dzerzhynsky ME. Morphofunctional changes in the reproductive system of juvenile rats following nanosilver administration. In: Abstract book of participants of the international summer school and international research and practice conference “NANO-2015”; 2015 Aug 26-29; Lviv. Lviv: Eurosvit; 2015. p. 390.
9. Kalynovskyi V, Pustovalov A, Grodzyuk G, Andryushina N, Dzerzhynskyi M. Morpho-functional changes in the rat testes under the effect of gold nanoparticles. В: Молодь і поступ біології: збірник тез XII Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів; 2016 квіт. 19-21; Львів. Львів: СПОЛОМ; 2016. с. 317–8.
10. Kalynovskyi V, Pustovalov A, Grodzyuk G, Andriushyna N, Dzerzhynsky M. Silver nanoparticles affect regulation of testicular activity in the young rats. In: Proceedings of the joint meeting of the american physiological society and the physiological society; 2016 Jul 29-3; Dublin. Dublin; 2016. p. 171P.
11. Kalynovskyi V, Pustovalov A, Grodzyuk G, Andryushina N, Dzerzhynsky M. Morphofunctional changes in the testes of juvenile rats after administration of gold nanoparticles. In: Abstracts of the 25th Anniversary of the FEPS , 168th Anniversary of French Physiological Society; 2016 June 29th – July 1st; Paris. Paris;2016. p. 120.

12. Kalynovskyi VY, Pustovalov AS, Grodzyuk GY, N.S. A, Dzerzhynsky ME. Silver nanoparticles affect testicular function of the rats of different age. In: Abstract Book of participants of the International Summer School and International research and practice conference “NANO-2016”; 2016 Aug; Lviv. Lviv: Eurosvit; 2016. p. 471.

## ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	14
ВСТУП.....	15
РОЗДІЛ 1. БІОЛОГІЧНІ ЕФЕКТИ НАНОЧАСТИНОК ЗОЛОТА ТА СРІБЛА.....	21
1.1. Шляхи надходження наночастинок в організм та їхній біорозподіл .....	21
1.2. Цитотоксичність наночастинок.....	26
1.3. Репродуктивна токсичність наночастинок золота та срібла .....	29
РОЗДІЛ 2. РОЛЬ КІСПЕПТИНУ В РЕГУЛЯЦІЇ РОБОТИ ГІПОТАЛАМО-ГІПОФІЗАРНО-ГОНАДНОЇ СИСТЕМИ ССАВЦІВ .....	34
2.1. Загальна характеристика кіспептинів та їхніх рецепторів .....	34
2.2. Гістоархітектоніка кіспептинергічної системи гіпоталамусу .....	36
2.3. Кіспептин як ключовий компонент регуляторного комплексу статевої системи ссавців .....	38
РОЗДІЛ 3. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	43
3.1. Тварини, використані у експерименті .....	43
3.2. Отримання та характеристика використаних наночастинок .....	43
3.3. Схема експерименту.....	45
3.4. Методика проведення інтрацеребровентрикулярних ін'єкцій.....	46
3.5. Гістологічні дослідження.....	48
3.6. Гістохімічне виявлення гонадотропоцитів аденогіпофіза .....	48
3.7. Морфометричні дослідження .....	49
3.8. Визначення вмісту тестостерону в плазмі крові.....	49
3.9. Статистичний аналіз .....	50
РОЗДІЛ 4. ВПЛИВ НАНОЧАСТИНОК ЗОЛОТА ТА СРІБЛА НА СТАН ГІПОТАЛАМО-ГІПОФІЗАРНОГО КОМПЛЕКСУ ЩУРІВ РІЗНОГО ВІКУ.....	51

4.1. Морфо-функціональна характеристика нейронів аркуатного ядра гіпоталамусу тварин 1-місячного віку різних експериментальних груп.....	51
4.2. Морфо-функціональна характеристика нейронів аркуатного ядра гіпоталамусу тварин 6-місячного віку різних експериментальних груп.....	54
4.3. Морфо-функціональна характеристика нейронів преоптичного ядра гіпоталамусу тварин 1-місячного віку різних експериментальних груп.....	57
4.4. Морфо-функціональна характеристика нейронів преоптичного ядра гіпоталамусу тварин 6-місячного віку різних експериментальних груп.....	60
4.5. Морфо-функціональна характеристика гонадотропоцитів аденогіпофіза щурів 1-місячного віку різних експериментальних груп .....	63
4.6. Морфо-функціональна характеристика гонадотропоцитів аденогіпофіза щурів 6-місячного віку різних експериментальних груп .....	69
<b>РОЗДІЛ 5. ВПЛИВ НАНОЧАСТИНОК ЗОЛОТА ТА СРІБЛА НА МОРФО-ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН СІМ'ЯНИКІВ ТВАРИН РІЗНОГО ВІКУ.....</b>	<b>76</b>
5.1. Морфо-функціональна характеристика сім'яників тварин 1-місячного віку різних експериментальних груп.....	76
5.2. Морфо-функціональна характеристика сім'яників тварин 6-місячного віку різних експериментальних груп.....	87
5.3. Вміст тестостерону в плазмі крові тварин 1-місячного віку різних експериментальних груп .....	97
5.4. Вміст тестостерону в плазмі крові тварин 6-місячного віку різних експериментальних груп .....	99
<b>РОЗДІЛ 6. ВПЛИВ НАНОЧАСТИНОК ЗОЛОТА ТА СРІБЛА НА МОРФО-ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН ПРИДАТКІВ СІМ'ЯНИКІВ І ПЕРЕДМІХУРОВОЇ ЗАЛОЗИ ТВАРИН РІЗНОГО ВІКУ .....</b>	<b>102</b>
6.1. Морфо-функціональна характеристика придатків сім'яників тварин 1-місячного віку різних експериментальних груп.....	102

6.2. Морфо-функціональна характеристика придатків сім'яників тварин 6-місячного віку різних експериментальних груп.....	109
6.3. Морфо-функціональна характеристика передміхурової залози тварин 1-місячного віку різних експериментальних груп.....	117
6.4. Морфо-функціональна характеристика передміхурової залози тварин 6-місячного віку різних експериментальних груп.....	122
РОЗДІЛ 7. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ....	129
ВИСНОВКИ.....	141
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ .....	142
ДОДАТКИ.....	171

**ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ**

АВПВ	–	антеровентральне перивентрикулярне ядро
АФК	–	активні форми кисню
АЯ	–	аркуатне ядро
ВМЯ	–	вентромедіальне ядро
ГГГС	–	гіпоталамо-гіпофізарно-гонадна система
ГЕБ	–	гемато-енцефалічний бар'єр
ГнРГ	–	гонадоліберин
ГТБ	–	гемато-тестикулярний бар'єр
ДМСО	–	диметилсульфоксид
ДМЯ	–	дорзомедіальне ядро
ЛГ	–	лютеїнізуючий гормон
м.т.	–	маса тіла
НЧ	–	наночастинки
НЧЗ	–	наночастинки золота
НЧС	–	наночастинки срібла
КП	–	кісспептин
ПОЯ	–	преоптичне ядро
ПВЯ	–	паравентрикулярне ядро
СП	–	серединне підвищення
ТС	–	тестостерон
ФСГ	–	фолікулостимулюючий гормон
ЯЦС	–	ядерно-цитоплазматичне співвідношення
GPCR	–	рецептор, асоційований з G-білком
P-234	–	пептид-234

## ВСТУП

**Обґрунтування вибору теми дисертації.** 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 [1]. При зменшенні розмірів матеріалів до цих величин у них можуть з'являтися нові фізичні і хімічні властивості, які не проявляються при дослідженні звичайних сполук [2–4]. Ці особливості зумовили швидкий розвиток нанотехнологій у XXI столітті і зараз значна кількість товарів має у своєму складі наноматеріали того чи іншого складу. За даними всесвітньої бази даних Woodrow Wilson, кількість побутових товарів, у складі яких є наноматеріали, зросла з 54 у 2005 році до 1814 у 2015 [5]. За даними ж європейської бази даних The Nanodatabase, на сьогодні налічується близько 3 тисяч таких продуктів [6]. Більшість із описаних товарів призначені для догляду за станом здоров'я або є побутовими чи автомобільними мийними засобами [7]. Слід зауважити, що основна частина подібних баз даних охоплюють лише побутові товари, а тому поза увагою залишається величезний спектр речовин, які активно використовуються в різних галузях медицини.

Серед усього розмаїття наноматеріалів, які існують сьогодні, найбільш широко є розповсюдженими наночастинки (НЧ) металів, а серед цієї категорії найбільш широкого вжитку набуло нанорозмірне срібло [7,8]. Наночастинки срібла (НЧС) широко застосовуються при виробництві пластмас, миючих засобів, зубних паст, одягу, взуття, дезодорантів, приладів для очистки води, холодильників [3,9–11]. Щорічно в світі виробляється близько 55 тон срібловмісних наноматеріалів [12]. Висока поширеність срібла зумовлена його добре відомими антибактеріальними властивостями, які посилюються при переході до нанорозмірних форм [13,14]. Окрім того, НЧС пропонується використовувати у якості компонентів противірусних засобів (в тому числі проти вірусу імунодефіциту людини) [15–17], штучних клапанів серця [18], перев'язувальних матеріалів та засобів біовізуалізації [3].

Наночастинки золота (НЧЗ) є значно менш розповсюдженими у якості побутових наноматеріалів, однак вони вкрай активно застосовуються в різних галузях медицини. Фізико-хімічні властивості золота дозволяють легко створювати частинки різних форм (палички, сфери, «зірки», кулі) та розмірів [19,20]. Висока біосумісність та інертність золота дозволяє легко прив'язувати до поверхні частинок різні біологічно активні молекули («функціоналізувати») та вводити їх безпосередньо в організм [21–23]. За рахунок таких властивостей НЧЗ активно використовуються для таргетної доставки різноманітних фармакологічних препаратів, в тому числі протипухлинних [24,25]. Оскільки здатність НЧЗ проникати у різні тканини та клітини організму, а також здатність викликати імунну відповідь залежать від форми і розмірів частинки, то нанорозмірне золото знаходить активне застосування у розробці різноманітних вакцин [26–29]. Іншою сферою практичного застосування НЧЗ у медицині є їхнє використання для підвищення ефективності променевої терапії. Після поглинання квантів іонізуючого опромінювання НЧЗ здатні з високою ефективністю продукувати різноманітні радикали, в першу чергу активні форми кисню (АФК). Ці молекули здатні неспецифічно впливати на різноманітні клітинні мішені, але оскільки НЧЗ можна функціонально локалізувати у певних клітинах або субклітинних компартментах, руйнівна дія АФК також буде локальною. Загалом, використання НЧЗ значно підвищує ефективність традиційних підходів променевої медицини [30–33]. Окрім використання разом із іонізуючим випромінюванням, нанорозмірне золото також використовують для фототермальної терапії. Специфічні фізико-хімічні властивості НЧЗ зумовлюють розсіювання ними великої кількості тепла при поглинанні хвилі певної довжини. Оскільки цей ефект, так само як і здатність частинок вибірково накопичуватись у певних ділянках тканин та органів, залежить від форми, розміру та складу поверхневого шару НЧ, можливим є персоналізований синтез НЧЗ для мінімізації побічних ефектів та підвищення ефективності терапії в цілому [34,35]. Оптичні властивості НЧЗ також дозволяють використовувати їх у якості біосенсорів, в тому числі і для детекції циркулюючих пухлинних клітин [4,22,36–38].

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 НЧ різного складу все ще залишаються недостатньо дослідженими [2,39,40]. Саме тому одним із пріоритетних завдань нанотоксикології є дослідження впливу наночастинок на функціонування різних компонентів статевої системи. Вже зараз відомо про особливості впливу НЧ різного складу на активність гамет [41], процес запліднення [42,43] та основні етапи ембріонального розвитку [44,45], однак системні ефекти при цьому залишаються здебільшого невідомими. Процес дослідження ускладнюється тим, що біологічні ефекти НЧ значно залежать від способу введення, форми, розмірів та функціоналізації поверхні [46–48].

Центральну роль в регуляції роботи статевої системи ссавців відіграє кісспептинергічна система гіпоталамусу. Саме за рахунок регуляції синтезу і секреції кісспептину та модуляторів його активності запускається та контролюється процес статевого дозрівання, а також підтримується необхідний рівень функціональної активності репродуктивного комплексу за різних умов [49–52]. Тому для дослідження впливу екзо- та ендогенних сполук на функціональну активність статевої системи доречним є виявлення особливостей кісспептин-опосередкованої регуляції репродуктивного комплексу [53,54].

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами темами.** Дисертаційна робота була виконувалась на базі кафедри цитології, гістології та біології розвитку 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 завдання 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 кісспептинергічної 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 кісспептинергічної 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 кісспептинергічної 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 кісспептинергічної 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 кісспептинергічної 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 кісспептинергічної 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 кісспептинергічної системи.

**Методи дослідження.** Гістологічні (світлова мікроскопія), гістохімічні (для ідентифікації гонадотропоцитів аденогіпофіза), морфометричні (для кількісної оцінки морфологічних параметрів досліджуваних органів), імунологічні (визначення концентрації тестостерону в плазмі крові), статистичні (для оцінки відмінностей досліджуваних параметрів).

**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 кіссептину в значній мірі нівелювався введенням наночастинок, а в сім'яниках не спостерігався взагалі. Водночас, пригнічення активності кіссептинергічної системи гіпоталамусу призводило до посилення токсичної дії наночастинок на морфо-функціональний стан органів статевої 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 характеристика 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 виконувались 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.

## РОЗДІЛ 1

### БІОЛОГІЧНІ ЕФЕКТИ НАНОЧАСТИНОК ЗОЛОТА ТА СРІБЛА

#### 1.1. Шляхи надходження наночастинок в організм та їхній біорозподіл

Нанорозмірні метали є компонентами значної кількості різних побутових товарів. НЧ як компоненти готового продукту можуть виконувати різні функції, а тому можуть розташовуватися як всередині матеріалів, так і на різноманітних поверхнях, що забезпечує можливість реалізації різних шляхів надходження НЧ в організм. Окрім того, на здатність НЧ виділятися із наноматеріалів впливають фізичні характеристики та особливості складу частинок [5,8].

НЧ можуть надходити в організм людини як прямо – безпосередньо із того чи іншого продукту, – так і опосередковано через воду, ґрунт та повітря, які були попередньо забруднені наноструктурами. Відповідно, основними шляхами надходження НЧ різного складу є трансдермальний, пероральний, інгаляційний та комбінований [55]. Прямо надходять в організм в першу чергу частинки матеріалів, призначених для безпосереднього контакту зі шкірою людини – різні види медичних та косметичних засобів, одягу та взуття. Іншим варіантом прямого контакту є особливості організації робочого процесу певних професій – в першу чергу робітників, які працюють на виробництві фарб, лаків, каталізаторів та полімерів [56].

Пасивне виділення НЧ із наноматеріалів значно відрізняється, залежно від типу матеріалу та особливостей просторової організації субстанції. Так, НЧ на основі діоксиду титану є одними із найрозповсюдженіших в сучасній промисловості і активно використовуються у якості барвника в кулінарії та текстильній промисловості, а також в сонцезахисних засобах [57]. Таке широке застосування призводить до прямого надходження в організм до 112 мг нанорозмірного титану в день [58]. Окрім того, під час прання  $\text{TiO}_2$ -оброблених тканин, за один цикл прання у воду виділяється до 3,5% всього металу, при цьому активно формуються наночастинки розміром від 60 нм [59].

НЧС активно додають до тканин різного складу для пригнічення розвитку мікроорганізмів, і таким чином, стимуляції загоєння ран, покращення стану шкіри та позбавлення запаху. Водночас, під час звичайного використання срібло може активно вивільнятися в оточуюче середовище. В одному із ранніх досліджень лабільності НЧС було встановлено, що в різних видах шкарпеток з додаванням срібла міститься до 1 мг металу на грам тканини. Після імітації звичайного циклу прання виявилось, що концентрація срібла у відпрацьованій воді становила близько 1 мг/л. Електронномікроскопічне дослідження підтвердило наявність наночастинок розміром від 10 нм [60]. У повторному дослідженні різних засобів індивідуального захисту та одягу було встановлено, що при початковому вмісті срібла до 250 мг/г тканини, після імітації прання у відпрацьованій воді можна виявити до 3 мг/л срібла, в тому числі і у вигляді наночастинок [61].

В дослідженнях, проведених Quadros та співавт. було оцінено кількість срібла, яка здатна виділятися із дитячих товарів: іграшок, посуду, ємностей для молока та ін. Виявилось, що хоча внаслідок звичайного миття вивільняється порівняно мало Ag, при контакті зі штучними потом та сечею до 40% срібла переходить у розчин, що може становити серйозну небезпеку, враховуючи вразливість організму немовлят до ксенобіотиків [62].

Окрім трансдермального та перорального впливу, нанорозмірне срібло може також потрапляти в організм інгаляційним шляхом. Було продемонстровано, що внаслідок роботи зволожувачів повітря, ємності для води у яких складаються зі срібловмісного пластику, в повітря виділяється близько 60 мкг Ag/год [61]. Також НЧС можуть потрапляти в легені після використання дезодорантів та оральних антисептиків у формі спрею. Під час кожного застосування цих засобів вивільняється до 50 нг Ag, і, хоча безпосередньо в аерозолі більшість срібла утворює частинки розміром 1-2 мкм, електронномікроскопічні дослідження підтверджують наявність НЧС [63].

Після потрапляння в організм тим чи іншим шляхом, НЧ металів здатні потрапити у всі тканини організму, при цьому фармакокінетика НЧ сильно залежить від форми, розмірів та функціоналізації поверхні частинок [64,65].

При дослідженні розподілу НЧ оксиду церію після надходження через легені було показано, що, окрім власне легень, високі концентрації НЧ спостерігались також і в печінці, селезінці, нирках, а при введенні впродовж 20 діб – і в сім'яниках та їхніх придатках. Водночас, розподіл частинок не залежав від їхнього розміру, що може пояснюватись утворенням агрегатів при контакті із сурфактантом легень [66]. Проведення аналогічних досліджень за допомогою флуоресцентних магнітних НЧ також показало можливість потрапляння частинок у всі тканини після потрапляння аерозолу в легені [64].

НЧ, що потрапляють в організм перорально, також здатні потрапляти в кров і розповсюджуватись по організму. Двадцятивосьмиденне пероральне введення НЧС розміром 15 нм продемонструвало підвищення концентрації срібла в різних периферичних тканинах. В той же час, накопичення Ag було значно менш інтенсивним, ніж при введенні розчину нітрату срібла замість НЧ, що може бути пояснене значно більшою агрегацією НЧ в калових масах [67]. Подібні дослідження з введенням 10 нм та 25 нм НЧС в концентрації 100-500 мг/кг маси тіла продемонстрували здатність нанорозмірного срібла акумулюватись у всіх органах, при чому очищення тканин спостерігається не раніше, ніж через 2 місяці, хоча мозок та сім'яники мали порівняно високий вміст НЧС і через 4 місяці після введення [68]. Аналогічні результати було отримано при дослідженні особливостей фармакокінетики НЧ оксиду титану після короткотермінового перорального введення [69,70].

Дослідження динаміки змін концентрації срібла у внутрішніх органах після однократного внутрішньовенного введення НЧС продемонструвало лінійне зменшення кількості Ag в периферичних тканинах із одночасним підвищенням його кількості в сечі та калі. При цьому НЧС були виявлені, окрім інших органів, також в тканині мозку [71].

Залежність особливостей розподілу НЧ в тканинах від розміру частинок було продемонстровано в ряді досліджень. Так, через 24 години після внутрішньовенного введення НЧС розміром 10 нм, золото можна було виявити у всіх тканинах організму. Після введення 50 нм НЧС частинок не виявляли в мозку,

тимусі та сім'яниках, а 100-нм НЧ виявляли лише в печінці та селезінці [72]. Аналогічно, після внутрішньом'язового введення нанорозмірного Si-Au комплексу, золото виявляли в тканині сім'яника, але лише за межами звивистих сім'яних каналців [73]. В інших дослідженнях було продемонстровано появу золота та срібла в грудному молоці після перорального та парентерального введення НЧЗ та НЧС. Концентрація металів при цьому збільшувалась при зменшенні розмірів НЧ [74]. Подібні результати було отримано при дослідженні здатності НЧЗ діаметром 1,4 нм, 18 нм та 80 нм проникати через плаценту [75].

У досліджах, проведених Balasubramanian та співавт. [76], було продемонстровано можливість нелінійних змін концентрації НЧ в різних органах. Після однократного внутрішньовенного введення щурам НЧЗ діаметром 20 нм концентрація золота в різних органах з часом змінювалась по-різному. Так, вже на першу добу після ін'єкції найвищі концентрації золота відзначали в печінці та селезінці, що пов'язано із особливостями функціонування капілярної мережі в цих органах. Накопичення НЧ в легенях припинилось майже одразу, і протягом 1 тижня після введення золото майже повністю вивелось з органу. Присутність НЧЗ в нирках та сім'яниках на початку експерименту була незначною, але через один місяць після ін'єкції концентрація золота в цих тканинах значно зросла. Одночасно спостерігали збільшення вмісту золота в крові та зменшення – в сечі та калі. Динамічні зміни вмісту НЧЗ супроводжувались змінами в експресії генів, відповідальних за клітинний метаболізм, антиоксидантну систему та циркадні ритми [76]. Проведене дослідження вказує на складний характер розподілу НЧ в організмі.

Однією із особливостей НЧ є їхня здатність проходити через біологічні бар'єри, наприклад, гемато-енцефалічний (ГЕБ), гемато-тестикулярний (ГТБ) чи плацентарний [65,77].

Здатність НЧ проходити через плаценту підтверджена у багатьох дослідженнях [45,78–80]. Проникнення НЧ різного складу пов'язують в першу чергу з трансцитозом наноструктур, на поверхні яких здатні агрегувати різні білки. З іншого боку, деякі НЧ, особливо малого розміру, можуть пасивно

проходити через плазмолему [81]. Загалом вважається, що плацента є значно більш вразливою до дії ксенобіотиків на ранніх етапах вагітності, а тому вплив НЧ в цей час матиме найнесприятливіші для плоду наслідки. З іншого боку, токсичні ефекти НЧ можуть бути пов'язані не з переходом в тканини плоду, а з пошкодженням власне плаценти за рахунок розвитку запальних процесів. У цьому випадку більш вразливою є пізня плацента, з добре розвиненим синцитіотрофобластом [82,83]. Здатність проникати через плаценту показана як для НЧЗ, так і для НЧС [75,78].

При дослідженні проникності ГЕБ для НЧ було продемонстровано, що здатність нанорозмірних металів накопичуватись в тканині мозку залежить не лише від розміру частинок, а й від шляху введення. Так, хоча при внутрішньовенних введеннях чітко прослідковується залежність проникності від розміру, при надходженні НЧ пероральним або інгаляційним шляхом, часто навіть малі частинки не вдається виявити в тканинах головного мозку. З одного боку, це може бути проявом нездатності НЧ проникнути через стінку кишечника чи альвеол, а з іншого, при проходженні цих бар'єрів може суттєво модифікуватись поверхня НЧ, що призводить до зміни характеру взаємодій з елементами ГЕБ [84–86]. В той же час, іноді навіть при вдиханні НЧ можуть ефективно проникати в головний мозок – при цьому наноструктури проходять повз ГЕБ, через нюховий тракт [87].

Проходженням ГТБ є необхідною умовою безпосереднього впливу НЧ на сперматоцити та більш диференційовані клітини сперматогенного ряду. Функціонування ГТБ забезпечується наявністю великої кількості ізолюючих та механічних контактів між клітинами Сертолі та сперматогенним епітелієм [88–90]. Тому вважається, що здатність НЧ різного складу проникати всередину звивистих сім'яних каналців зумовлена локальним руйнуванням вказаних міжклітинних контактів внаслідок розвитку НЧ-викликаного запалення [77,91].

## 1.2. Цитотоксичність наночастинок

Одразу після попадання в кров, тканинну рідину чи інші біологічні рідини НЧ можуть зв'язуватись з різноманітними білками. Оскільки нанорозмірні метали мають високий рівень вільної енергії на поверхні частинки, зв'язування з різними макромолекулами є енергетично вигідним [92]. Так, було виявлено, що на поверхні різних нанорозмірних структур можуть адгезуватись альбуміни, фібриноген, імуноглобуліни та ліпопротеїди. Слід зауважити, що після зв'язування, білки можуть як втрачати, так і зберігати свої функції. Міцність та тривалість такого зв'язку залежить в першу чергу від хімічного складу НЧ [93].

Утворення такої білкової «корони» може ефективно екранувати НЧ від навколишнього середовища, перешкоджаючи їхній взаємодії з клітинними та позаклітинними структурами. Наприклад, НЧЗ у формі паличок, які *in vitro* можуть приєднуватись до біологічних мембран, пошкоджуючи їхню структуру, в присутності сироватки крові втрачають цю здатність [94]. Окрім того, зв'язані білки можуть змінювати свою конформацію, що інколи призводить до розвитку аутоімунних та запальних процесів [95]. З іншого боку, зв'язування з білками плазми значно полегшує інтерналізацію НЧ за рахунок активації клатрин-залежного ендоцитозу.

Окрім зв'язування з розчинними білками, НЧ можуть взаємодіяти з різноманітними трансмембранними рецепторами, впливаючи, таким чином, на ефективність міжклітинної сигналізації. Наприклад, НЧС можуть стимулювати синтез прозапальних інтерлейкінів та призводити до смерті клітини за рахунок активації NF-κB-сигнального шляху [96], а вуглецеві НЧ можуть зв'язуватись з рецептором до білку морфогенезу кісток, стимулюючи диференціацію міобластів у міоцити [97]. Також деякі металеві НЧ можуть безпосередньо впливати на роботу мембранних йонних каналів та насосів. Наприклад, CdSe-квантові точки можуть впливати на функціональну активність натрієвих та кальцієвих каналів гіпокампальних нейронів, призводячи до порушення синаптичної передачі та загибелі клітин [98].

Проникнення наночастинок через біологічні мембрани можливо за допомогою декількох механізмів. По-перше, НЧ можуть безпосередньо взаємодіяти із ліпідами плазмолемі, призводячи до їхнього окиснення. В результаті підвищується проникність мембран і НЧ малого діаметру можуть пасивно зайти в цитозоль [99,100].

По-друге, вкриті білковою «корonoю» НЧ здатні зв'язуватись з мембранними рецепторами та стимулювати процес рецептор-опосередкованого ендоцитозу. В результаті НЧ опиняється в ендосомі чи лізосомі, де розщеплюються білки на її поверхні. В залежності від складу «корони» НЧ при цьому може спостерігатись значне збільшення розміру «корони», збільшення осмотичного тиску всередині лізосоми чи безпосереднє руйнування мембрани лізосоми компонентами ядра НЧ [39,101]. В результаті НЧ опиняються в цитозолі, де можуть вільно взаємодіяти з різними компонентами клітини.

Одним із головних механізмів токсичності НЧ є генерація ними АФК [102]. В ряді досліджень було продемонстровано, що НЧ різного складу здатні стимулювати розвиток оксидативного стресу в клітинах. Це проявлялось як у підвищенні кількості окиснених метаболітів (продукти перекисного окиснення ліпідів, карбонільні групи білків та ін.), так і у підвищенні активності систем антиоксидантного захисту [103,104].

Підвищення кількості АФК в клітинах внаслідок впливу НЧ може бути проявом як безпосереднього утворення вільних радикалів наноструктурами, так і наслідком порушення роботи різних компонентів антиоксидантної системи клітини.

Спонтанна генерація АФК безпосередньо наночастинок полягає у передачі високоенергетичних електронів з поверхні частинки на молекулу води чи кисню, що призводить до виникнення гідроксил-радикалу чи супероксид-аніону. В подальшому утворені АФК можуть взаємодіяти з різними компонентами клітини, активуючи різні сигнальні шляхи та пошкоджуючи органели та макромолекули. Встановлено, що здатність НЧ безпосередньо утворювати АФК залежить як від розміру наноструктур (найбільш активними є частинки діаметром

<10 нм), так і від хімічного складу наноматеріалу (НЧ, які складаються з оксиду заліза чи титану, менш схильні до утворення АФК) [105].

Іншим шляхом підвищення вмісту АФК в клітині є стимуляція роботи власних АФК-продукуючих систем. Наприклад, при встановленні цитотоксичності НЧ на основі церію було показано, що після обробки цими наноматеріалами 3T3-культури мишачих фібробластів спостерігалось значне зростання активності НАДФН-оксидази. Подібні результати було отримані і в дослідженнях, проведених на макрофагах [106]. Порушення роботи НАДФН-оксидаз внаслідок дії наночастинок також можуть призводити до порушення роботи систем довготривалої пам'яті [107].

Одним із внутрішньоклітинних джерел АФК, навіть за нормальних умов, є мітохондрії. При роботі електронно-транспортного ланцюгу частина високоенергетичних електронів завжди «витікає» на атоми кисню води чи кисню, що призводить до утворення АФК. За нормальних умов ці АФК, окрім іншого, використовуються клітиною для міжклітинної комунікації [102]. НЧ різного складу, порушуючи стабільність мембран мітохондрій, призводять до зменшення ефективності роботи елементів дихального ланцюга, що веде до оксидативного стресу. З іншого боку, при руйнуванні мембран в цитозоль може виходити мітохондріальний цитохром С, що запускає процес апоптозу [108,109].

Деякі НЧ, окрім власне стимуляції утворення АФК, можуть додатково пригнічувати активність внутрішньоклітинних антиоксидантних систем. Наприклад, введення НЧ оксиду титану чи карбонових НЧ призводить до зменшення супероксиддисмутазної та каталазної активностей [107].

На додаток до загальних цитотоксичних ефектів, НЧ можуть мати також і генотоксичний вплив. Відомо, що малі нанорозмірні структури можуть пасивно проходити через ядерно-порові комплекси. Агрегати з частинок або більші за розміром НЧ можуть заходити в ядро, будучи кон'югованими з білками, що мають у своєму складі послідовність ядерної локалізації [110].

В ядрі, окрім пошкодження генетичного матеріалу за рахунок утворення АФК, НЧ здатні безпосередньо взаємодіяти з ДНК, хоча природа цієї взаємодії

залишається недостатньо дослідженою. Наприклад, вважається, що НЧЗ можуть взаємодіяти з ДНК за рахунок особливої просторової конфігурації атомів золота на поверхні частинки. В результаті таких взаємодій змінюється активність транскрипції, порушуються процеси компактизації хроматину, змінюються епігенетичні патерни, виникають різноманітні генні та хромосомні мутації [111–113].

Окрім цитотоксичних ефектів, які проявляються внаслідок специфічного розміру та форми НЧ, під час існування в клітині НЧ може вивільнювати йони атомів, які входять до її складу. Наприклад, вважається що одним із головних механізмів цитотоксичної дії НЧС є вивільнення  $Ag^+$ . Йони срібла здатні зв'язуватися з різноманітними функціональними групами білків, в першу чергу сульфгідрильними, порушуючи їхню просторову організацію та функціональну активність. Оскільки високий вміст таких білків спостерігається в мітохондріях, то й пригнічення внутрішньоклітинного метаболізму є одним із основних ефектів НЧС. Окрім того,  $Ag^+$  здатні необоротно зв'язуватись з біомембранами та нуклеїновими кислотами [114].

Окрім того, що НЧ можуть різними шляхами потрапляти всередину клітин, існують також механізми зменшення внутрішньоклітинної концентрації НЧ. Не зважаючи на те, що деякі НЧ можуть потрапляти в клітину шляхом пасивного транспорту, вважається що пасивний вихід наноструктур з клітин є малоімовірним, що пояснюють фізико-хімічними особливостями цитозоллю [115]. Оскільки більшість НЧ після інтерналізації потрапляють в ендосоми та лізосоми, то і виведення їх можливе за рахунок лізосомального екзоцитозу. Виведення НЧ, що потрапили до цитозоллю, є можливим переважно за допомогою утворення екзосом [116,117].

### **1.3. Репродуктивна токсичність наночастинок золота та срібла**

Дослідження токсичного впливу НЧ на органи жіночої статеві системи проводяться переважно для наноструктур на основі Cd та Ti, оскільки токсичний

вплив цих елементів є добре відомим. Наприклад, для CdS-НЧ було продемонстровано можливість накопичуватись в тканинах матки та плаценти, без впливу на ембріон [118]. Також було виявлено здатність НЧ оксиду титану накопичуватись в яєчниках в умовах хронічного експерименту. При цьому спостерігали розвиток дегенеративних змін, збільшення кількості атретичних фолікулів та розвиток запальних процесів [119].

Вплив НЧС на морфо-функціональний стан ооцитів в умовах *in vitro* було досліджено в праці Сирватки та співавт. [120]. Було показано пригнічуючий вплив НЧС на функціональний стан клітин гранульози, хоча достовірних змін в ооцитах виявлено не було. Дослідження ж НЧЗ проводяться переважно на лініях трансформованих клітин яєчників [121]. Нещодавнє дослідження перорального впливу НЧЗ на стан яєчників риб продемонструвало, що частинки були здатні накопичуватись в статевих залозах, викликаючи порушення гістоархітектури тканини, а також різні ультраструктурні порушення в ооцитах [122].

Ембріотоксичність НЧ є значно більш дослідженою. Відомо, що ймовірність потрапляння НЧ в тканини плоду залежить в першу чергу від розмірів частинок, а також від їхньої функціоналізації [44,81,123,124].

В дослідженнях, проведених на ембріонах *Danio rerio* було продемонстровано, що, хоча загальна токсичність НЧС була нижчою, ніж у йонів срібла, вплив обох сполук проявлявся у розвитку різних патологій морфогенезу та загибелі ембріонів [125]. Водночас, дослідження, проведені на ембріонах *Gallus domesticus* показали, що дія як НЧС так і НЧЗ не призводила до достовірних відхилень розвитку. За умов експерименту НЧС збільшували інтенсивність метаболізму ембріонів, що, однак, не призвело до швидшого набору маси [126–128].

Відомості щодо впливу НЧ різного складу на ембріони ссавців, водночас, є значно обмеженішими. Продемонстровано, що вплив НЧ на основі оксиду титану та карбону на вагітних самиць щурів призвів до появи гістопатологічних та біохімічних порушень у нервовій системі плоду, а також розвитку різних судинних, імунологічних та репродуктивних патологій [45]. Описано також вплив

НЧЗ та НЧС на проліферацію та диференціацію ембріональних клітин-попередників нейронів людини. Виявилось, що обидва типи частинок впливають на проліферацію стовбурових клітин, однак НЧС також інтенсифікують апоптичні процеси. Отримані дані вказують на потенційну ембріональну нейротоксичність НЧ різного складу [129].

Вплив НЧ на основі металів на органи чоловічої статевої системи є однією із найактуальніших тем сучасної нанотоксикології. Відомо, що НЧ на основі нікелю призводять до розвитку дегенеративних явищ в сім'яниках і зменшення рівня статевих гормонів [130], кобальту – до появи морфологічних та функціональних порушень в сперматозоїдах [131], оксиду титану – до пригнічення проліферації клітин Лейдіга [132], а свинцю – до системного пригнічення сперматогенезу [133].

НЧЗ впливають на функціональну активність репродуктивного комплексу самців багатьма шляхами. *In vitro* дослідження продемонстрували, що НЧЗ достовірно пригнічують рухливість сперматозоїдів з одночасним зростанням кількості патологічних форм [134]. Можливим поясненням такого впливу є порушення цілісності плазмолем та модифікація її білків, оскільки було продемонстровано можливість розвитку патологічних змін навіть за адсорбції НЧЗ на мембрані без надходження в цитозоль [135]. В той же час, в інших дослідженнях не було підтверджено вказаний вплив НЧЗ та НЧС на сперматозоїди [41,79].

В дослідженнях *in vivo* було встановлено, що, хоча НЧЗ здатні накопичуватись в просвіті звивистих сім'яних каналців, порушуючи таким чином цілісність ГТБ, в клітинах сперматогенного епітелію не було виявлено геномних та хромосомних аномалій [136]. Проліферативна активність та рівень апоптозу також не зазнавали змін за даних умов [137].

Вплив НЧЗ на ендокринну частину сім'яника був менш однозначним. Було показано, що за дії функціоналізованих поліетиленгліколем НЧЗ спостерігається достовірне зростання концентрації тестостерону (ТС) в плазмі крові щурів. Водночас компенсаторних змін рівнів фолікулостимулюючого (ФСГ) та

лютеїнізуючого (ЛГ) гормонів виявлено не було. Так само не було виявлено достовірних змін в гістоархітектурі сім'яника [138]. Зникнення компенсаторних змін в ендокринній системі може свідчити про потенціальне значення НЧЗ як ендокринних дизрапторів [139].

Дослідження дії НЧЗ на передміхурову залозу та придаток сім'яника показало, що НЧЗ не призводять до появи достовірних змін у вказаних тканинах, хоча в певних ділянках передміхурової залози спостерігали появу осередків запалення [140].

Слід зауважити, що дослідження репродуктивних ефектів НЧЗ додатково ускладнюється недостатньою вивченістю йонів золота, що знаходяться у складі органічних та неорганічних сполук. Хоча золото традиційно вважається біологічно інертним металом, було продемонстровано, що підшкірне введення розчину тетрахлораурату (III) призводило до зростання рівня тестостерону в крові, а також прискорення статевого дозрівання. Автори пояснюють це явище впливом золота на активність тестикулярних дегідрогеназ [141].

Токсична дія НЧС на компоненти статевої системи ссавців досить добре досліджена [44]. Встановлено, що внутрішньовенне введення НЧС призводить до появи генотоксичних змін в сперматозоїдах, хоча змін в кількості патологічних форм не спостерігалось [142]. Подібні результати було отримано також при дослідженні перорально введених НЧС, функціоналізованих полівінілпіролідом [143]. Ретельні ультрамікроскопічні дослідження показали, що НЧС, після потрапляння в сперматозоїди, здатні знижувати життєздатність клітин, пригнічувати акросомальну реакцію, та збільшувати кількість мітохондрій. Описані явища призводять до загального зниження якості сперми і здатності до запліднення [43,144]. Подібні цито- та генотоксичні зміни було зафіксовано і при використанні інших клітин сім'яників у якості об'єкту [145]. Окрім загальної цитотоксичності, було виявлено здатність НЧС пригнічувати проліферативну активність сперматогоній, а також їхню здатність до диференціації, що пов'язано із порушенням роботи внутрішньоклітинних сигнальних шляхів [146].

Хронічне системне введення НЧС призводило до появи різноманітних структурно-функціональних порушень в звивистих сім'яних канальцях: спостерігалась загальна дегенерація сперматогенного епітелію, вакуолізація сперматоцитів, формування гігантських багатоядерних клітин, ексфоціація незрілих клітин в просвіт канальця, збільшення проміжків між клітинами Сертолі та розвиток некротичних явищ [147,148].

Дія НЧС на молодий організм також є руйнівною. При підшкірному введенні новонародженим мишам НЧС виявилось, що під час статевого дозрівання в сім'янику спостерігались ознаки пригнічення сперматогенезу, а також порушення роботи генів, відповідальних за формування ГТБ [149]. Подібні дослідження на щурах продемонстрували здатність НЧС викликати затримку статевого дозрівання, зменшення кількості та якості сперми, а також появу значних морфологічних змін в сім'яниках [150].

Ендокринна частина сім'яника, так само як і сперматогенна, також зазнає деструктивних змін за дії НЧС. На відміну від дії НЧЗ, пригнічення стероїдогенезу в сім'яниках супроводжувалось зростанням концентрації ФСГ та ЛГ в плазмі крові. Паралельно спостерігали зменшення кількості острівців інтерстиціальної тканини і клітин Лейдіга [151,152].

## РОЗДІЛ 2

### РОЛЬ КІССПЕПТИНУ В РЕГУЛЯЦІЇ РОБОТИ ГІПОТАЛАМО-ГІПОФІЗАРНО-ГОНАДНОЇ СИСТЕМИ ССАВЦІВ

У 1996 році при дослідженні особливостей регуляції метастазування однієї з ліній клітин меланоми було відкрито ген, білковий продукт якого було названо «метастіном», враховуючи його здатність ефективно пригнічувати міграцію клітин. Сам же ген було названо KiSS-1, на знак пошани місцю, де було зроблено відкриття (місто Hershey (США) відоме своїми цукерками «chocolate kisses») [153].

У 2001 році трьома групами дослідників було незалежно встановлено, що білковий продукт KiSS-1 водночас є лігандом орфанного рецептора GPR54 [154–156]. В подальшому виявилось, що структурно-функціональні порушення кіссептинів (як було названо родину білкових продуктів KISS-генів) та їхніх рецепторів призводять до порушення процесів статевого дозрівання та розвитку дисрегуляторних змін [157,158].

На сьогодні вважається, що за допомогою кіссептинів реалізуються взаємодії на найвищих регуляторних рівнях статевої системи ссавців [51,159,160].

#### 2.1. Загальна характеристика кіссептинів та їхніх рецепторів

Кіссептини (КП) присутні у гіпоталамічній ділянці усіх хребетних, окрім птахів. Окрім того, на додачу до гену *Kiss1* та *Gpr54-1*, які кодують основні форми КП та рецептору до нього відповідно, у ананій додатково присутні паралоги цих генів – *Kiss2* та *Gpr54-2*, які також задіяні в регуляції статевої функції [161–163].

Як і у випадку більшості нейромедіаторів, при трансляції *Kiss1*-генів утворюється єдиний пре-про-білок. Наприклад, у людини така пре-форма складається зі 145 амінокислот (КП-145). Після цього білок піддається протеолізу на N-кінці з одночасним амідуванням C-кінця за рахунок роботи термінальної карбоксипептидази. В результаті на N-кінці утворюється консервативна RF-NH<sub>2</sub>

послідовність, тому кісспептини, подібно до гонадостатинів, відносять до родини RF-амідних білків [164–166].

Відомо, що в результаті протеолізу можуть утворюватися різні за розміром ізоформи, серед яких основними є КП-54, КП-13 та КП-10. Хоча фармакодинамічні здатності цих ізоформ трохи відрізняються, вважається, що мінімальною ізоформою, яка здатне зв'язатись з відповідним рецептором та активувати його, є КП-10. В експериментах *in vivo* було встановлено, що коротші ізоформи КП є більш короткоживучими і, як правило, справляють сильніший ефект. За подібним же механізмом транскрибуються продукти *Kiss2*-генів, хоча замість КП-13 утворюється 12-амінокислотний пептид [160,164].

Рецептор до кісспептину KISS1R (до відкриття власне кісспептинів мав назву GPR54) відноситься до родини G-білок зв'язаних рецепторів (GPCR). Як і інші GPCR, KISS1R має 7 трансмембранних доменів, з цитозольним С-кінцем та позаклітинним N-кінцем [167,168]. В переважній більшості випадків KISS1R асоційований з Gq/11 білком [169]. Після зв'язування КП зі своїм рецептором, відбувається активація G-білку, який дисоціює на  $G\alpha$  та  $G\beta\gamma$  субодиниці. Дифундуючи в підмембранному шарі,  $G\alpha$  стимулює активність фосфоліпази  $C\beta$ , яка гідролізує фосфатидилінозитол-4,5-біфосфат до діацилгліцеролу та інозитол-1,4,5-трифосфату. Вільний цитозольний інозитол-1,4,5-трифосфат відкриває кальцієві канали цистерн ендоплазматичного ретикулуму, спричиняючи підвищення концентрації цитоплазматичного  $Ca^{2+}$ , який з одного боку активує різноманітні кальцій-залежні сигнальні шляхи, а з іншого, стимулює екзоцитоз специфічних везикул. Мембранозв'язаний діацилгліцерол стимулює роботу протеїнкінази C, що послідовно активує про-мітотичні кінази [170–172].

Як і для інших GPCR, для KISS1R характерна часо- та дозозалежна десенсibilізація, що підтверджується дослідями *in vivo* та *in vitro*. Зменшення чутливості клітин до ізоформ КП відбувається за рахунок інтерналізації рецептора з поверхні клітини за рахунок  $\beta$ -арестин-опосередкованого механізму [169,173,174]. В той же час, хоча після інтерналізації GPCR типово направляються до ендо- та лізосом та піддаються протеолізу, лізосомальне розщеплення KISS1R

не вдалось зафіксувати [175]. Це свідчить про високі рівні рециркуляції рецептора та функціональну лабільність клітин-мішеней КП.

## 2.2. Гістоархітектоніка кісспептинергічної системи гіпоталамусу

Дослідження нейроанатомії кісспептинергічної системи проводились на мишах, щурах, вівцях, козах, кролях, мавпах та людях. Хоча вдалось встановити загальні закономірності розташування КП-продукуючих та КП-чутливих нейронів, існує багато видоспецифічних особливостей організації цієї нейрональної мережі [176].

В гіпоталамічній ділянці ссавців встановлено наявність двох основних популяцій КП-продукуючих нейронів. Перша, найбільша, представлена нейронами аркуатного ядра (АЯ), при чому якщо у гризунів КП-синтезуючі нейрони розташовані в усіх ділянках цієї області, то у мавп вони сконцентровані переважно в середній та каудальній ділянці. Друга популяція нейронів знаходиться в області преоптичного ядра (ПОЯ), причому у гризунів ці нейрони сконцентровані в ростральних перивентрикулярних ділянках – антеровентральному перивентрикулярному ядрі (АВПВ) та перивентрикулярній преоптичній ділянці. Встановлено, що загальна кількість КП-синтезуючих клітин в АЯ є в 2-4 рази більшою, ніж в передньому гіпоталамусі [177].

Окрім двох основних ядер, у різних ссавців можна виявити додаткові субпопуляції КП-нейронів. Такими є, наприклад, ділянка серединного підвищення (СП) у мавп [178], вентромедіальне ядро (ВМЯ) щурів та дорзомедіальне ядро (ДМЯ) мишей [179]. Також синтез КП було зафіксовано в мигдалині гризунів де, як припускають, він бере участь в регуляції статевої поведінки [180].

КП-продукуючі нейронні популяції переднього та медіального гіпоталамусу відрізняються не тільки локалізацією, а й особливостями секреції. Для нейронів АЯ було зафіксовано високий рівень колокалізації КП, нейрокініну В та динорфіну, тому ці клітини зараз називають «KNDу-нейрони» [181,182]. Вважається, що нейрокінін та динорфін виступають в ролі регуляторів активності

власне КП-продукуючих нейронів: дія нейрокініну В на клітини-мішені є синергічною із впливом КП, а секреція динорфіну сприяє зменшенню вивільнення КП за ауто- та паракринними механізмами [183]. Окрім того, вважається що нейрокінін В відіграє провідну роль у процесі статевого дозрівання, оскільки ауто- та паракринна стимуляція ним КП-продукуючих нейронів призводить до поступового зростання їхньої активності та стимуляції пульсаторної секреції КП [184,185].

При дослідженні зв'язків КП-продукуючих клітин з іншими ділянками гіпоталамусу було показано, що аксони KNDy-нейронів АЯ йдуть, в першу чергу, у внутрішню ділянку СП та, в меншій мірі, в преоптичне та перивентрикулярне ядра переднього гіпоталамусу. Для гризунів та людини було продемонстровано наявність еферентних закінчень у ДМЯ та паравентрикулярному ядрі (ПВЯ), і лише для гризунів відомі контралатеральні зв'язки між протилежними АЯ. Окрім того, важливу роль відіграють реципрокні зв'язки між KNDy-нейронами [177].

KNDy-нейрони в передньому гіпоталамусі виявлено не було. В той же час, у гризунів деякі КП-продукуючі нейрони також проявляють тирозин-гідроксилазну активність, що свідчить про синтез ними дофаміну [186]. Також для деяких з цих нейронів було продемонстровано колокалізацію з мет-енкефаліном [187]. Про зв'язки КП-продукуючих нейронів переднього гіпоталамусу з іншими ділянками проміжного мозку відомо порівняно небагато. Основна частина їхніх еферентних закінчень прямує до різних ділянок ПОЯ та, меншою мірою, в ПВЯ та ДМЯ. Таким чином, в переважній більшості випадків спостерігається колокалізація еферентних закінчень КП-продукуючих нейронів обох основних ділянок. Втім, деякі зв'язки, наприклад, між АЯ та латеральними гіпоталамічними ділянками чи між АВПВ та латеральною зоною, не дублюються [176,177].

На відміну від порівняно добре встановленого поширення КП-синтезуючих нейронів, гіпоталамічна розповсюдженість KISS1R є менш дослідженою. Достовірно підтверджена наявність цього білку в ділянці АЯ та СП, однак дані щодо експресії в ПВЯ є суперечливими [177,188]. Головним же місцем синтезу даного рецептору є ПОЯ гіпоталамусу, де розташовані тіла нейронів, які

секретують гонадоліберин (ГнРГ) в портальну систему [189]. Зв'язки між КП- та ГнРГ-нейронами реалізуються на різних рівнях. Так, основна частина КП-нейронів АВПВ гризунів утворює синапси з тілами ГнРГ нейронів. В той же час, лише невелика частина нейроцитів АЯ утворює аксо-соматичні синапси: значно більшою мірою реалізуються аксо-аксональні контакти в ділянці СП. Також є свідчення про існування реципрокних зв'язків між ГнРГ- та КП-синтезуючими нейронами. Вважається, що такі зв'язки дозволять тонко регулювати пульсаторну секрецію ГнРГ [190–192].

Враховуючи, що КП відіграє провідну роль в регуляції роботи статеві системи, не дивно, що в організації кісспептинергічної мережі гіпоталамусу прослідковується статевий диморфізм. Так показано, що у жінок спостерігається вища щільність еферентних волокон КП-нейронів в передньому та середньому гіпоталамусі. Також значно відрізняється кількість даних клітин. Продемонстровано, що у самок гризунів в ділянці АВПВ міститься в 10 разів більше КП-позитивних клітин, ніж у самців [193]. Подібні результати отримано також і для преоптичної гіпоталамічної ділянки людей [194].

### **2.3. Кісспептин як ключовий компонент регуляторного комплексу статеві системи ссавців**

Активність органів статеві системи у ссавців контролюється гормонами базофілів аденогіпофіза: ФСГ та ЛГ. В свою чергу, секреція ФСГ та ЛГ стимулюється у відповідь на виділення гіпоталамусом ГнРГ. Оскільки функціональна активність вказаних структур пов'язана значною кількістю позитивних та негативних зворотних зв'язків, говорять про наявність єдиної гіпоталамо-гіпофізарно-гонадної системи (ГГГС).

Регуляція роботи ГнРГ-продукуючих нейронів впродовж довгого часу залишалась відкритим питанням, оскільки, незважаючи на доведений негативний регуляторний вплив естрогенів на секрецію ГнРГ, рецепторів до естрогенів в тілах цих нейронів виявлено не було [160]. Втім виявилось, що ці рецептори

присутні у великій кількості в КП-продукуючих нейронах, що стало першим кроком до визнання КП центральним регулятором ГГГС.

У численних дослідженнях на гризунах та людях було продемонстровано, що введення екзогенного КП призводить до швидкого зростання рівня ЛГ та ТС в плазмі крові, при чому стимулюючий вплив на синтез та секрецію ФСГ був значно менш вираженим [195–197]. В подальшому було продемонстровано, що вплив КП на ГнРГ-продукуючі нейрони призводить до значного підвищення рівнів як відповідної мРНК, так і власне ГнРГ [198,199]. Окрім того, на дослідах з використанням різних антагоністів КП-залежної сигналізації було показано, що в разі блокування Kiss1r в ділянці СП спостерігається зниження амплітуди та частоти секреції ГнРГ [165]. При введенні ж блокатора в ділянку ПОЯ, де власне і розташовані тіла ГнРГ-нейронів, змін пульсації не спостерігалось [200].

Слід зазначити, що реакція на КП-опосередковану стимуляцію з боку ГнРГ-нейронів відрізняється у чоловіків та жінок. Введення навіть невеликих кількостей КП чоловікам, причому як КП-10, так і КП-54, призводило до достовірного підвищення рівнів ЛГ і ТС [201,202]. В той же час гормональні зміни у жінок сильно залежали від фази циклу та загального гормонального статусу. Продемонстровано, що жінки, які приймають оральні контрацептиви, є майже нечутливим до екзогенного КП [203]. Окрім того, в деяких дослідженнях продемонстровано більший стимулюючий ефект на жінок при дії КП-54, порівняно з КП-10, що може бути пов'язано із меншим періодом напіввиведення останнього [195,202].

Також є повідомлення щодо безпосередньої стимулюючої дії КП на гонадотропоцити аденогіпофіза. Показано, що певні кількості КП можуть виділятися в портальну систему і, зв'язуючись з рецепторами на поверхні базофілів, стимулювати синтез та секрецію ФСГ та ЛГ. Втім, значення цього шляху в загальній регуляції роботи ГГГС все ще залишається недостатньо встановленим [204,205].

Окрім прямого стимулюючого впливу КП-синтезуючих нейронів, вони також забезпечують реалізацію позитивних та негативних зворотних зв'язків в

межах ГГГС. В дослідженнях, проведених на гризунах, було продемонстровано, що вплив естрогенів на нейрони АЯ призводить до значного зменшення секреції КП. І навпаки, при інтрацеребровентрикулярному введенні антагоністів КП кастрованим тваринами не спостерігається компенсаторного підвищення рівнів ЛГ [182]. Одночасно із зменшенням секреції КП в нейронах АЯ спостерігалось пригнічення синтезу нейрокініну В, хоча рівні динорфіну залишаються майже без змін. Слід зазначити, що реалізація подібного зворотного зв'язку за рахунок КП-продукуючих нейронів переднього гіпоталамусу є недоведеною [206–208].

На додачу до звичного для ендокринної системи негативного зворотного зв'язку, в межах ГГГС реалізується також позитивний зворотний зв'язок. Його фізіологічне значення полягає у стимуляції секреції ЛГ естрогенами, які синтезуються ендокринними клітинами теки під час дозрівання фолікулів у яєчнику. У гризунів при підвищенні вмісту естрогенів підвищується активність КП-продукуючих нейронів АВПВ. Додатково ці нейрони мають аферентні зв'язки з нейронами супрахізматичного ядра, що свідчить про роль АВПВ як центру забезпечення овуляторного викиду ЛГ [209,210]. У людини місцем реалізації позитивного зворотного зв'язку є, найімовірніше, KNDу-нейрони АЯ [207].

Окрім підтримання функціонування ГГГС у дорослому віці, КП відіграє провідну роль в ініціації та регуляції процесу статевого дозрівання [50,157,211]. Власне, роль КП як центрального регулятора ГГГС було виявлено при дослідженні випадків гіпогонадотропного гіпогонадізму. Виявилось, що розвиток цього захворювання пов'язаний із утворенням мутантних форм KISS1R [212–214]. Навпаки, при наявності мутацій, що призводять до гіперактивації елементів КП-опосередкованої сигналізації, спостерігається передчасне статеве дозрівання [51,215,216]. Вважається, що до початку статевого дозрівання секреція КП забезпечує виділення невеликої кількості ГнРГ, який необхідний для підтримання базального рівня статевих гормонів. При ініціації статевого дозрівання спостерігається стимуляція роботи КП-продукуючих нейронів як з боку статевих гормонів, так і за аутокринним механізмом. В результаті спостерігається зростання частоти та амплітуди викидів ГнРГ, що призводить до відповідних

морфо-функціональних змін в різних системах організму [217–219]. Забезпечення зміни чутливості КП-нейронів до регуляторних факторів відбувається, найімовірніше, за рахунок дозрівання та реорганізації нейрональної мережі гіпоталамуса загалом, оскільки відомо, що робота цих клітин регулюється також за рахунок глутаматергічних, адренергічних, ГАМК-ергічних та інших взаємодій [53,220–223].

Ще однією важливою функцією КП-нейронів є інтеграція різноманітних стимулів для забезпечення координації роботи ГГГС в системі внутрішньоорганізменних ендокринних взаємодій. Продемонстровано, що порушення в роботі рецепторів до лептину в гіпоталамусі призводять до розвитку гіпогонадізму. В той же час ГнРГ-нейрони не мають рецепторів до цього пептиду [52]. Показано, що на зміни в концентрації лептинів відповідають в першу чергу КП-позитивні нейрони АЯ. Більш того, ці ж нейрони задіяні у розвитку порушень статевої функції за умов розвитку ожиріння чи діабету. За даних умов відбувається гіперактивація КП-нейронів, що призводить до різкого зростання рівня статевих гормонів, що в свою чергу, веде до стабільної десенсибілізації як центральних, так і периферичних компонентів ГГГС [52,224,225]. За аналогічним принципом реалізується зв'язок між стрес-регуляторними системами (в тому числі гіпоталамо-гіпофізарно-адреналовою) та ГГГС. Продемонстровано, що активність КП-позитивних нейронів регулюється як за рахунок зміни рівнів кортизолу та адренкортикотропного гормону, так і завдяки безпосередній адренергічній іннервації. Наявність подібних функціональних зв'язків зумовлює реалізацію пригнічення активності статевої системи під час розвитку стрес-реакцій [226–229].

Підсумовуючи, можна зазначити, що кісспептинергічна система гіпоталамусу є головним інтегративним центром ГГГС. Саме КП-продукуючі нейрони відповідають за ініціацію та стимуляцію статевого дозрівання. Також завдяки їхній активності реалізується координація репродуктивної системи з іншими компонентами організму в різні періоди індивідуального розвитку. Тому

дослідження особливостей КП-опосередкованої регуляції за різних умов дозволяє спрогнозувати та вчасно скоригувати шкідливий вплив численних факторів. Одним із таких чинників, який знаходить все більше поширення в сучасному світі, є наночастинки благородних металів, які широко використовуються в різних галузях промисловості та медицини. Не зважаючи на численні переваги використання наноматеріалів, їхній вплив на функціонування систем організму, в тому числі й статевої, є недостатньо дослідженим. Саме тому встановлення особливостей кісспептин-опосередкованої регуляції роботи репродуктивної системи за дії наночастинок є актуальною проблемою сучасної науки.

## РОЗДІЛ 3 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

### 3.1. Тварини, використані у експерименті

Відповідно до завдань та мети дослідження, експерименти було проведено на 132 самцях білих нелінійних щурів *Rattus norvegicus* віком 1 місяць ( $n=66$ ) та 6 місяців ( $n=66$ ), оскільки такі вікові групи представлені статевонезрілими та статевозрілими тваринами відповідно [230]. 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 [231].

### 3.2. Отримання та характеристика використаних наночастинок

Синтез та дослідження фізико-хімічних властивостей наночастинок було проведено співробітниками Інституту фізичної хімії ім. Писаржевського к.х.н. Гродзюк Г.Я. та к.х.н. Андрюшиною Н.С.

Наночастинки золота отримували шляхом відновлення розчину тетрахлораурату(III) золота аскорбіновою кислотою у лужному середовищі з додаванням натрію поліфосфату (ПФН) у якості стабілізатора. Для цього у водний розчин  $\text{NaAuCl}_4$  додавали, при інтенсивному перемішуванні, водні розчини аскорбінової кислоти, гідроксиду натрію та ПФН до кінцевих концентрацій 1 ммоль/л  $\text{NaAuCl}_4$ , 1 ммоль/л аскорбінової кислоти, 0,1 ммоль/л  $\text{NaOH}$  та 0,25 ммоль/л ПФН. Всі робочі розчини готували на бідистильованій воді. Перемішування продовжували не менше 10 хв.

Наночастинки срібла отримували шляхом відновлення розчину аргентум (I) нітрату аскорбіновою кислотою у лужному середовищі та у присутності ПФН у якості стабілізатора. Для цього окремо готували два робочі розчини, які готували

на бідистильованій воді. Перший розчин готували шляхом додавання до 4,6 мл води 0,2 мл 0,1 моль/л водного розчину  $\text{AgNO}_3$  та 0,025 мл 0,1 моль/л розчину ПФН з одночасним перемішуванням. Другий розчин готували змішуючи 5 мл води та по 0,1 мл 0,1 моль/л водних розчинів гідроксиду натрію та аскорбінової кислоти. Надалі два розчини зливали при інтенсивному перемішуванні.

Фізико-хімічні властивості отриманих розчинів наночастинок характеризували за допомогою електронномікроскопічних та спектроскопічних досліджень. Дослідження шляхом растрової електронної мікроскопії проводили за допомогою мікроскопа LMU Mira3 Tescan (Tescan a.s., Чеська Республіка) при напрузі прискорення 5-20 кВ. Додатково мікроскоп був обладнаний приставкою Oxford X-MAX 80 мм (Oxford Instruments, США) для енергодисперсійної спектроскопії. Спектри поглинання розчинів реєстрували за допомогою спектрофотометру Specord 210 (Analytik Jena AG, ФРН). Дослідження проводилось у кварцевих кюветах товщиною 1 або 10 мм з використанням чистого розчинника в кюветі порівняння.

Дослідження методом лазерної фотокореляційної спектроскопії здійснювали на приладі Zeta Sizer Nano S (Malvern, Великобританія) при температурі 25 С. Розчини опромінювали гелій-неоновим лазером з довжиною хвилі 633 нм, розсіяне світло реєстрували під кутом  $173^\circ$ .

Типові записи електронномікроскопічних та спектроскопічних досліджень наведено на рис. 3.1.

В результаті проведених досліджень було встановлено, що розміри частинок золота та срібла у розчинах становили 8-12 нм, а їхній  $\zeta$ -потенціал – -30,5 мВ (НЧЗ) та -19,8 мВ (НЧС). Кінцева концентрація наночастинок становила 0,2 г металу/л. Отримані розчини зберігали при температурі  $4^\circ\text{C}$  без доступу сонячних променів.

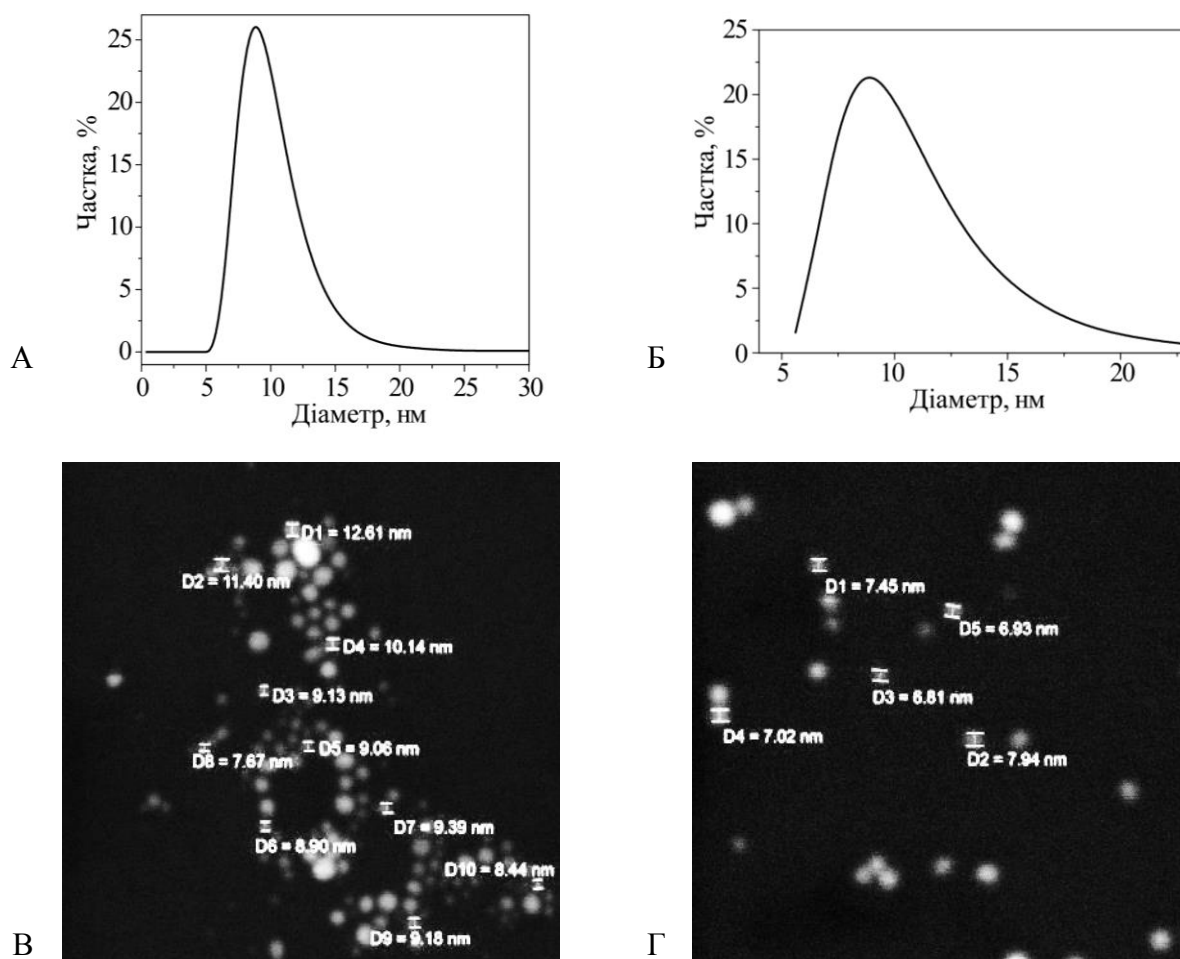


Рис. 3.1. Гідродинамічні діаметри (А,Б) та електронні мікрофотографії (В,Г) наночастинок. А,В – НЧС, Б,Г – НЧЗ. Електронні мікрофотографії отримано без додаткового контрастування при напрузі прискорення 20 кВ, збільшення –  $\times 571000$  (В) та  $\times 924000$  (Г).

### 3.3. Схема експерименту

Експеримент тривав 10 діб. Відповідно до задач дослідження, тварин кожного віку було випадково розподілено на 11 груп. Тварини кожної групи утримувались в окремих клітках. Щурам різних експериментальних груп вводили:

1. Фізіологічний розчин – 0,9% ізотонічний розчин NaCl («Індар», Україна) в дозі 0,5 мл/100 г м.т.;
2. 0,25 ммоль/л водний розчин натрію поліфосфату  $(\text{NaPO}_3)_n$  в дозі 0,5 мл/100 г м.т.;

3. Розчин наночастинок золота в дозі 0,5 мл/100 г м.т.;
4. Розчин наночастинок золота в дозі 0,5 мл/100 г м.т.;
5. 10% водний розчин диметилсульфоксиду (ДМСО) в дозі 0,01 мл/100 г м.т.;
6. Кіссептин-10 (КП-10) – метастин-(45-54)-амід (Merck KGaA, ФРН), агоніст рецепторів GPR54, в дозі 0,1 мкг/100 г м.т. [232];
7. Пептид-234 (Р-234) – кіссептин-234-трифлюорацетат (Sigma, США), антагоніст рецепторів GPR54, в дозі 0,1 мкг/100 г м.т.

Фізіологічний розчин, а також розчини ПФН, НЧЗ та НЧС вводили внутрішньоочеревинно протягом 10 діб. ДМСО, КП-10 та Р-234 вводили інтрацеребровентрикулярно на 8-10 добу експерименту (табл. 3.1).

#### **3.4. Методика проведення інтрацеребровентрикулярних ін'єкцій**

Для уникнення периферичних впливів агоністів та антагоністів рецепторів до кіссептину, КП-10 та Р-234 вводили безпосередньо у порожнину лівого шлуночка мозку. Для цього тварин вводили у хірургічний наркоз, після чого на потиличній частині голови робили надріз довжиною 2 см. М'які тканини відділяли від черепа таким чином, щоб очистити поверхню тім'яних кісток. Надалі щурів фіксували у стереотаксичному приладі СЭЖ-3 («Медэкспорт», СРСР) та за допомогою портативної бормащини БЭРП-10 (ВЗМО, СРСР) робили в лівій тім'яній кістці отвір діаметром 2 мм. Місце трепанації визначали за допомогою стереотаксичного атласу [233]. В експерименті тваринам робили отвір на 4 мм каудальніше брегми та на 5 мм латеральніше сагітального шву. Після видалення крові, спеціально переобладнаний шприц вводили на глибину 4,5 мм та повільно вводили необхідну кількість розчину.

Робочі розчини КП-10 та Р-234 готували шляхом розчинення відповідної кількості ліофілізованого пептиду у 10% розчині ДМСО, приготованому на бідистильованій воді.

Після введення шприц залишали в мозку на 1 хв для запобігання витoku робочих розчинів через трепанаційний отвір. Після маніпуляцій на шкіру голови накладали простий безперервний шов та обробляли антисептиком.

Таблиця 3.1.

## Характеристика експериментальних груп тварин

№ п/п	Назва групи	Назва речовини	Доза	Шлях введення
1	Контроль	0,9% NaCl	0,5 мл/100 г м.т.	в.о.
2	ПФН	0,25 ммоль/л натрію поліфосфат	0,5 мл/100 г м.т.	в.о.
3	НЧЗ	0,2 г/л розчин наночастинок золота	0,5 мл/100 г м.т.	в.о.
4	НЧС	0,2 г/л розчин наночастинок срібла	0,5 мл/100 г м.т.	в.о.
5	ДМСО	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.
6	КП-10	0,9% NaCl	0,5 мл/100 г м.т.	в.о.
		Кіссептин-10	0,1 мкг/100 г м.т.	і.ц.в.
7	Р-234	0,9% NaCl	0,5 мл/100 г м.т.	в.о.
		Пептид-234	0,1 мкг/100 г м.т.	і.ц.в.
8	НЧЗ+КП-10	0,2 г/л розчин наночастинок золота	0,5 мл/100 г м.т.	в.о.
		Кіссептин-10	0,1 мкг/100 г м.т.	і.ц.в.
9	НЧЗ+Р-234	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.
10	НЧС+КП-10	0,2 г/л розчин наночастинок срібла	0,5 мл/100 г м.т.	в.о.
		Кіссептин-10	0,1 мкг/100 г м.т.	і.ц.в.
11	НЧС+Р-234	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.

### 3.5. Гістологічні дослідження

На 10 добу експерименту, через 1 годину після останнього введення відповідних розчинів, тварин декапітували та 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 [234].

На санному мікроскопі МС-2 («Медэкспорт», СРСР) виготовляли зрізи товщиною 5-6 мкм та переносили їх на предметні скельця, попередньо оброблені сумішшю яєчного білку та гліцерину 1:1. Після висихання зрізи всіх тканин, окрім гіпофіза, забарвлювали гематоксиліном Бемера та еозином та заключали під покривне скельце у полістирол [234,235].

### 3.6. Гістохімічне виявлення гонадотропоцитів аденогіпофіза

Для ідентифікації гонадотропоцитів тканину аденогіпофіза забарвлювали альціановим синім, реактивом Шиффа та оранжем Ж за Herlant [236–238]. Для цього парафінові зрізи після депарафінізації окислювали в суміші 0,25% калію перманганату та 0,3% сірчаної кислоти 1:1 впродовж 2 хв. Після відмивки у 1% розчині тіосульфату натрію та дистильованій воді (по 2 хв) зрізи протягом 20 хв забарвлювали 1% розчином альціанового синього у 2М сірчаній кислоті (рН=0,2). Надалі зрізи осушували фільтрувальним папером та окислювали у 1% розчині йодної кислоти (10 хв) з наступним відмиванням у дистильованій воді (10 хв). Окиснені зрізи переносили у реактив Шиффа, в темряву, на 20 хв, після чого відмивали у водопровідній воді впродовж 5 хв. Наостанок, препарати дозбарвлювали 1% розчином оранжу Ж у 2,5% фосфорновольфрамівій кислоті (15 с), швидко зневоднювали та заключали під покривне скельце у полістирол. В результаті гонадотропоцити ідентифікували як округлі чи овальні клітини, з ексцентрично розташованим ядром та темно-синьою цитоплазмою, в якій часто спостерігали макулу.

### 3.7. 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). На отриманих мікрофотографіях за допомогою програми ImageJ 1.42 (NIH, США) вимірювали:

1. В сім'яниках – діаметр звивистих сім'яних канальців, площу поперечного перерізу ядер клітин Сертолі та площу поперечного перерізу ядер клітин Лейдіга.
2. В придатках сім'яника – висоту головних епітеліоцитів та площу поперечного перерізу їхніх ядер;
3. В передміхуровій залозі – відносний об'єм епітелію:

$$V(\%) = \frac{S_E}{S_T} \times 100\%, \text{ де} \quad (3.1)$$

$S_E$  – площа епітеліального шару на зрізі,  $S_T$  – загальна площа зрізу.

4. В аденогіпофізі – площу поперечного перерізу ядер та цитоплазми гонадотропоцитів, а також ядерно-цитоплазматичне співвідношення (ЯЦС):

$$\text{ЯЦС} = \frac{S_{\text{я}}}{S_{\text{ц}}}, \text{ де} \quad (3.2)$$

$S_{\text{я}}$  – площа перерізу ядра гонадотропоцита,  $S_{\text{ц}}$  – площа перерізу цитоплазми гонадотропоцита.

5. В гіпоталамусі – площу поперечного перерізу ядер нейронів аркуатного та преоптичного ядер.

### 3.8. Визначення вмісту тестостерону в плазмі крові

Одразу після декапітації 5 мл крові за допомогою скляної воронки відбирали в пробірки з попередньо внесеним 3% розчином гепарину («Новофарм-

біосинтез», Україна), з розрахунку 50 МО гепарину на 1 мл цільної крові. Надалі пробірки центрифугували при 1500 об/хв впродовж 15 хвилин. Після центрифугування супернатант відбирали у чисті мікропробірки та заморожували до проведення подальших досліджень.

Концентрацію тестостерону в плазмі визначали за допомогою набору для імуноферментного аналізу DRG Testosterone ELISA EIA-1559 (DRG Instruments GmbH, ФРН) згідно інструкції виробника. Проміжні відмивання планшету виконували за допомогою вошера BioTek ELx50 (BioTek Instruments, США). Спектрофотометричний аналіз результату імуноферментної реакції проводили за допомогою спектрофотометра BioTek ELx800 (BioTek Instruments, США). Отримані числові дані інтерпретували за допомогою 4-параметричної логістичної моделі, яку обчислювали програмою KC junior (BioTek Instruments, США).

### 3.9. 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 вибірових даних нормальному, а за допомогою тесту Левена – рівність вибірових 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. Для цих груп додатково обчислювали медіану, 25-й та 75-й процентилі, а також найменше та найбільше значення.

Результати представляли як середнє  $\pm$  стандартна похибка середнього ( $M \pm m$ ). Достовірними вважалися відмінності при рівні значущості  $p < 0,05$  [239].

## РОЗДІЛ 4

### ВПЛИВ НАНОЧАСТИНОК ЗОЛОТА ТА СРІБЛА НА СТАН ГІПОТАЛАМО-ГІПОФІЗАРНОГО КОМПЛЕКСУ ЩУРІВ РІЗНОГО ВІКУ

#### 4.1. Морфо-функціональна характеристика нейронів аркуатного ядра гіпоталамусу тварин 1-місячного віку різних експериментальних груп

При морфологічному дослідженні ділянки АЯ 1-місячних тварин контрольної групи було встановлено, що більшість ядер нейронів даної області мали округлу або овальну форму, з помірною кількістю гетерохроматину. Водночас популяція нейроцитів була гетерогенною: були присутні як клітини з малими темними ядрами, так і клітини з більшими і світліше забарвленими ядрами. У деяких нейронів спостерігали базофільну цитоплазму, хоча межі більшості клітин були слабо помітні. Клітини мали овальну або веретеноподібну форму. Міжклітинна речовина порівняно слабо забарвлювалась, що пов'язано із великою кількістю нервових волокон, що проходять у даній ділянці (рис. 4.1).

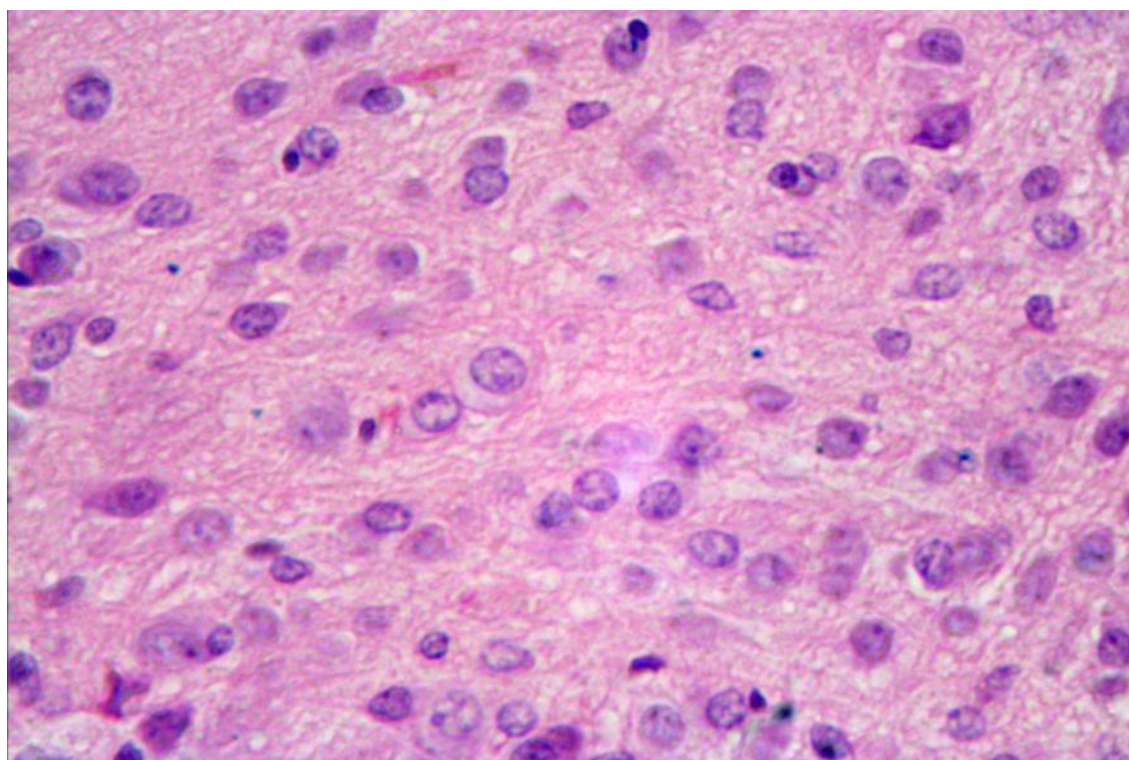


Рис. 4.1. Мікрофотографія аркуатного ядра гіпоталамусу 1-місячних щурів контрольної групи. Забарвлення гематоксилином Бемера та еозином, зб.  $\times 400$ .

Площа поперечного перерізу ядер нейроцитів цієї групи становила  $40,46 \pm 0,48$  мкм<sup>2</sup>. Введення піддослідним тваринам ПФН не призвело до достовірних морфологічних та морфометричних змін: загальні особливості будови тканини відповідали контрольній групі, а площа перерізу ядер нейронів становила  $39,75 \pm 0,36$  мкм<sup>2</sup>. Аналогічний стан АЯ спостерігали за умови введення 10% ДМСО у бічний шлуночок мозку. Площа перерізу ядер становила  $40,55 \pm 0,49$  мкм<sup>2</sup>, що також не відрізняється від аналогічного показника контрольної групи.

Інтрацеребровентрикулярне введення КП-10 на фоні внутрішньо-очеревинних ін'єкції фізіологічного розчину призвело до достовірного зменшення площі перерізу ядер до  $35,84 \pm 0,40$  мкм<sup>2</sup>. При цьому морфологічно спостерігали збільшення частки малих темних ядер та загальне підвищення вмісту гетерохроматину, що свідчить про зниження функціональної активності досліджуваних клітин (рис. 4.2) [240,241].

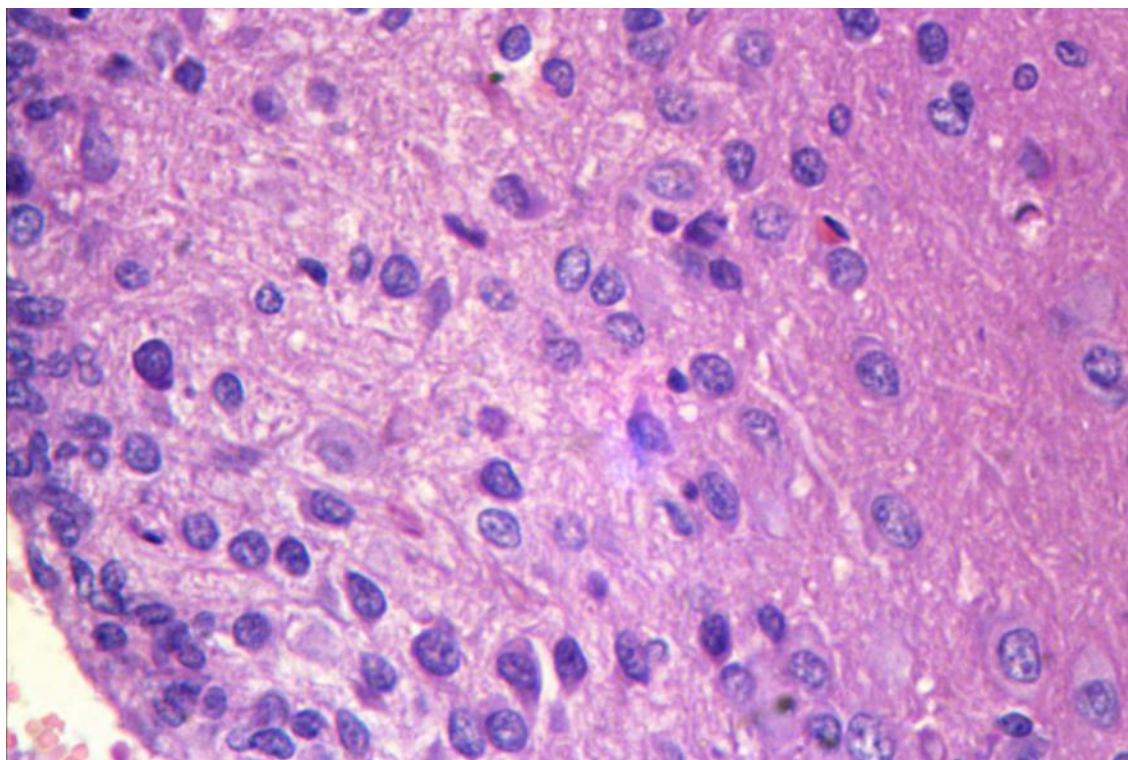


Рис. 4.2. Мікрофотографія нейронів аркуатного ядра гіпоталамусу щурів 1-місячного віку групи «КП-10». Забарвлення гематоксилином Бемера та еозином, зб.  $\times 400$ .

Аналогічні ін'єкції Р-234 призвели до протилежних ефектів – збільшувалась частка великих світлих ядер, з чітко окресленим ядерцем, а площа перерізу достовірно збільшилась до  $42,21 \pm 0,51$  мкм<sup>2</sup> (рис. 4.3), що свідчить про зростання функціональної активності.

Внутрішньоочеревинні ін'єкції НЧЗ впродовж 10 діб щурам одномісячного віку призвели до достовірного зменшення виміряного нами морфометричного параметру нейронів АЯ до  $37,26 \pm 0,36$  мкм<sup>2</sup>. Морфологічно не спостерігали розвиток патологічних процесів в тканині, однак відмічали візуальні ознаки зменшення функціональної активності нейронів, аналогічні групі «КП-10».

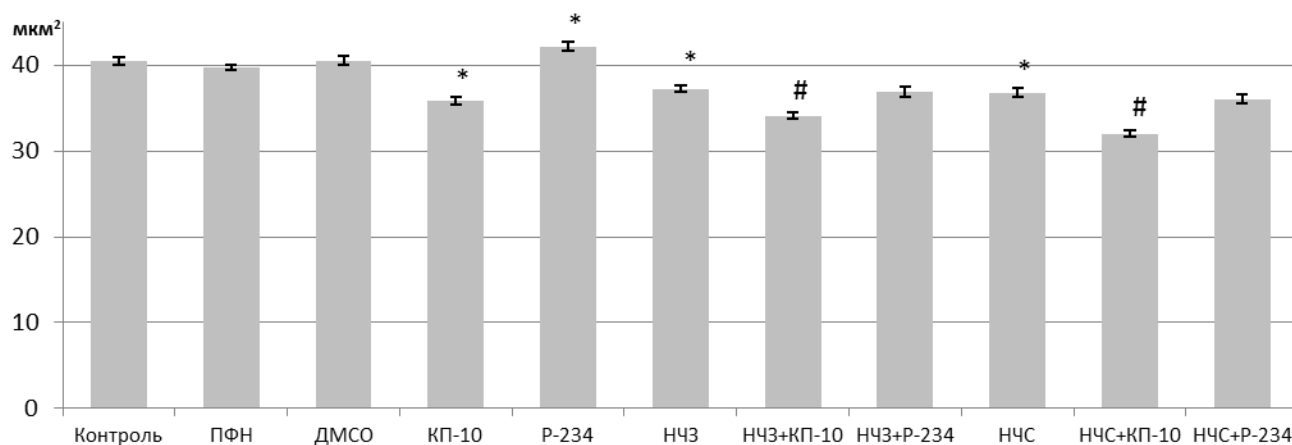


Рис. 4.3. Площа поперечного перерізу ядер нейронів аркуатного ядра гіпоталамусу щурів віком 1 місяць.

Примітка: \* – різниця між контрольною та дослідною групою достовірна при  $p < 0,05$ ; # – різниця між групами «НЧЗ+КП-10», «НЧЗ+Р-234», «НЧС+КП-10», «НЧС+Р-234» та відповідною групою з введенням лише НЧЗ чи НЧС достовірна при  $p < 0,05$ .

Введення КП на фоні ін'єкцій НЧЗ призвело до подальшого зменшення площі перерізу ядер нейронів до  $34,10 \pm 0,40$  мкм<sup>2</sup>. Цей показник є достовірно нижчим, ніж у групі «НЧЗ». Введення піддослідним тваринам антагоніста KISS1R на тлі впливу нанорозмірного золота не призвело до достовірних морфологічних та морфометричних змін. Площа поперечного перерізу ядер становила  $36,91 \pm 0,55$  мкм<sup>2</sup>.

Стимуляція роботи кісспептинергічної системи за рахунок КП-10 при одночасному системному введенні НЧС призвела до достовірного зменшення площі перерізу ядер нейронів до  $32,04 \pm 0,25$  мкм<sup>2</sup>. При цьому за умови введення Р-234 не виявляли достовірних змін площі перерізу ядер ( $36,08 \pm 0,52$  мкм<sup>2</sup>). В тваринах обох груп не було виявлено розвитку патоморфологічних процесів в ділянці АЯ.

#### 4.2. Морфо-функціональна характеристика нейронів аркуатного ядра гіпоталамусу тварин 6-місячного віку різних експериментальних груп

При оцінці морфо-функціонального стану нейронів АЯ статевозрілих тварин контрольної групи відмічали загальну подібність тканини до показників 1-місячних щурів. Водночас відмічали більшу кількість округлих світлих ядер, з тонкими нитками гетерохроматину та чітко окресленим ядерцем. Площа перерізу ядер нейронів у тварин цієї групи становила  $45,21 \pm 0,46$  мкм<sup>2</sup> (рис 4.4).

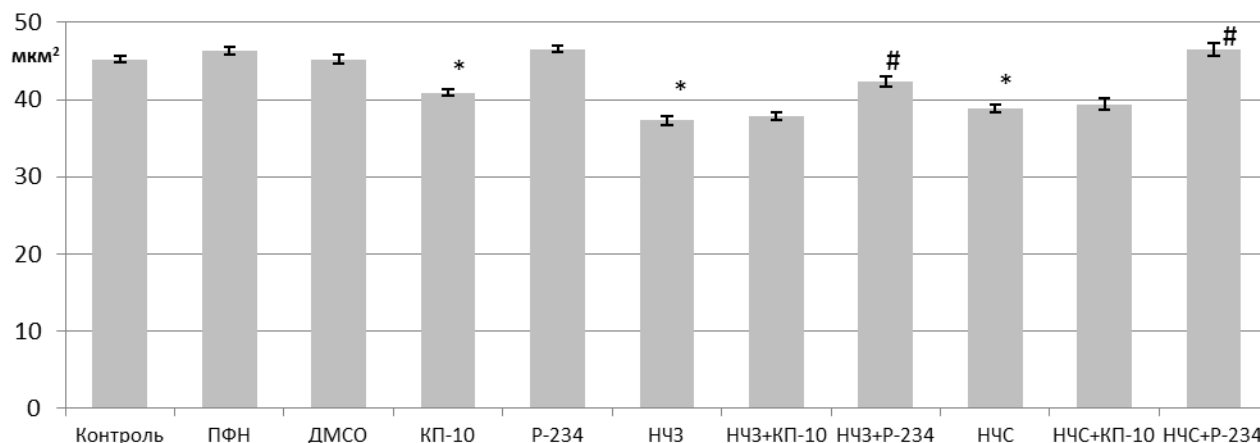


Рис. 4.4. Площа поперечного перерізу ядер нейронів аркуатного ядра гіпоталамусу щурів віком 6 місяців.

Примітка: \* – різниця між контрольною та дослідною групою достовірна при  $p < 0,05$ ; # – різниця між групами «НЧЗ+КП-10», «НЧЗ+Р-234», «НЧС+КП-10», «НЧС+Р-234» та відповідною групою з введенням лише НЧЗ чи НЧС достовірна при  $p < 0,05$ .

Морфологічна картина АЯ гіпоталамусу тварин, яким вводили розчин ПФН впродовж 10 діб, не відрізнялась від контрольної (рис 4.5). Переріз ядер сягав  $46,27 \pm 0,50 \text{ мкм}^2$ . Внутрішньошлуночкові ін'єкції ДМСО не призвели до появи морфо-функціональних змін в АЯ. Площа перерізу нейронів становила  $45,21 \pm 0,55 \text{ мкм}^2$ , що не відрізняється від контрольних показників.

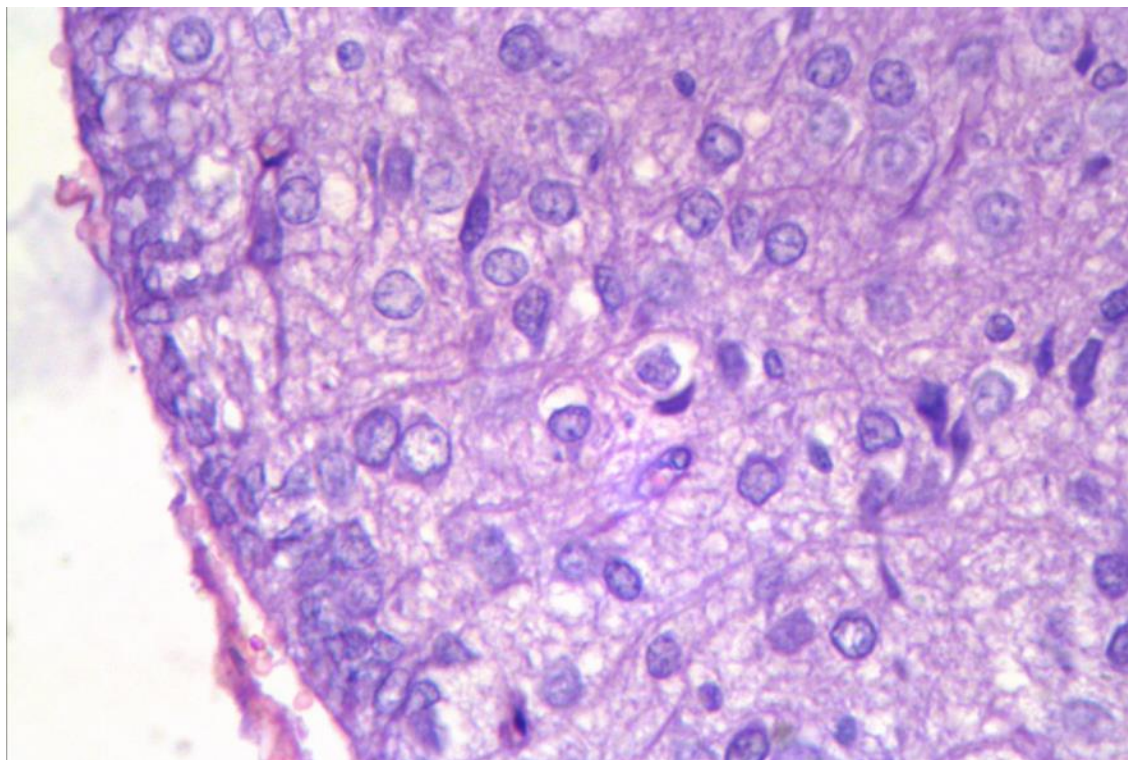


Рис. 4.5. Мікрофотографія нейронів аркуатного ядра гіпоталамусу щурів 6-місячного віку групи «ПФН». Забарвлення гематоксилином Бемера та еозином, зб.  $\times 400$ .

Дія КП-10 на морфо-функціональний стан нейронів АЯ проявилась у пригніченні активності цих клітин. Площа перерізу ядер достовірно зменшилась до  $40,91 \pm 0,48 \text{ мкм}^2$ . Водночас спостерігали збільшення вмісту дрібних темних ядер овальної форми з високим вмістом гетерохроматину. Крупніші ядра були здебільшого деформованими. Натомість, у тварин групи «Р-234» не спостерігали появи морфологічних відмінностей від контрольної групи. Площа перерізу ядер нейронів мала тенденцію до зростання –  $46,41 \pm 0,41 \text{ мкм}^2$  ( $p=0,065$ ), хоча достовірних відмінностей зафіксовано не було.

При дії НЧЗ на статевозрілих тварин спостерігали появу в ділянці АЯ клітин з деформованими ядрами. В деяких клітинах спостерігали зростання кількості пристінкового гетерохроматину. В той же час були присутні і нейрони з нормальною морфологією. Площа перерізу ядер становила  $37,30 \pm 0,59$  мкм<sup>2</sup>, що достовірно менше за контрольні значення. Додатковий вплив КП-10 не змінив загальний стан тканини – виміряний нами морфометричний параметр в групі «НЧЗ+КП-10» становив  $37,85 \pm 0,51$  мкм<sup>2</sup>. Водночас дія блокатора рецепторів до КП призвела до зменшення пригнічуючого впливу нанорозмірного золота – площа перерізів ядер достовірна збільшилась до  $42,35 \pm 0,72$  мкм<sup>2</sup>.

Морфологічні ознаки зменшення функціональної активності нейронів АЯ спостерігали також і в групі «НЧС» (рис 4.6). При цьому, водночас із появою невеликих овальних ядер, достовірно зменшилась площа поперечного перерізу ядер нейронів – до  $38,86 \pm 0,47$  мкм<sup>2</sup>.

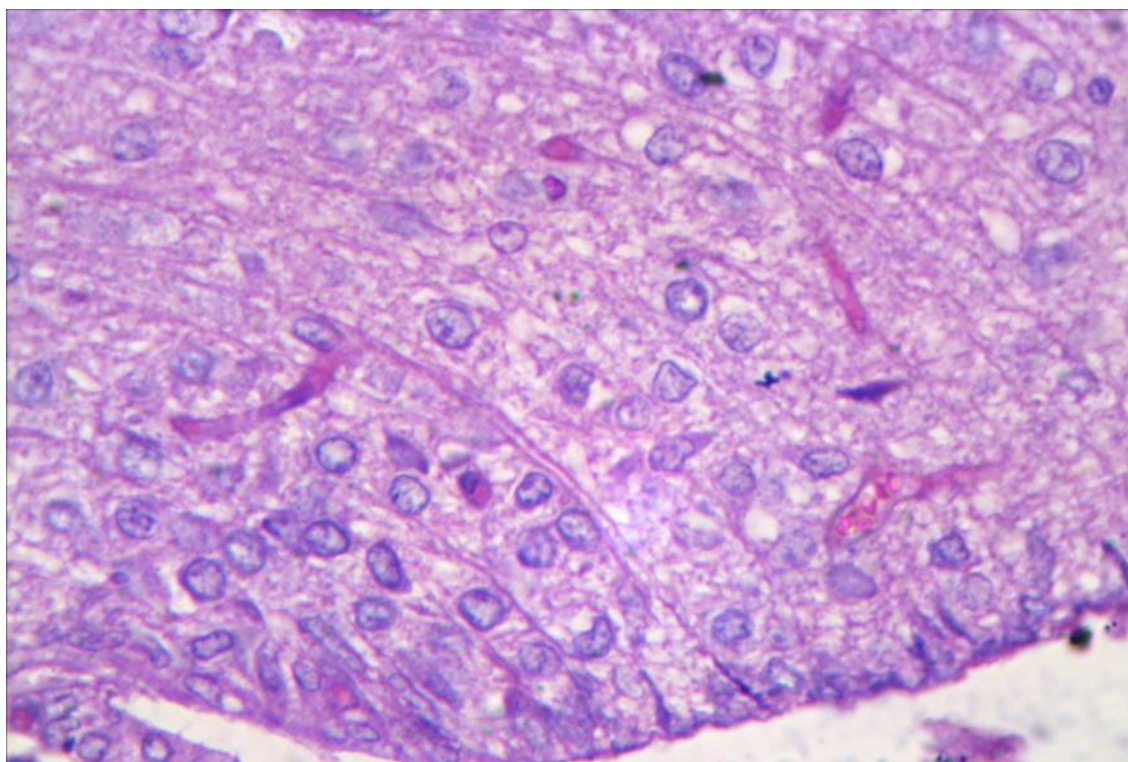


Рис. 4.6. Мікрофотографія аркуатного ядра гіпоталамусу щурів віком 6 місяців групи «НЧС». Забарвлення гематоксиліном Бемера та еозином, зб.  $\times 400$ .

Аналогічно до експериментальних груп, яким вводили НЧЗ, при сумісній дії нанорозмірного срібла та КП-10 не спостерігали достовірних морфологічних та

морфометричних змін (площа перерізу ядер –  $39,41 \pm 0,71$  мкм<sup>2</sup>), в той час як дія Р-234 призвела до достовірного зростання площі перерізу ядер нейронів ( $46,48 \pm 0,84$  мкм<sup>2</sup>), що відповідає контрольним значенням.

### **4.3. Морфо-функціональна характеристика нейронів преоптичного ядра гіпоталамусу тварин 1-місячного віку різних експериментальних груп**

Ділянка ПОЯ гіпоталамусу щурів контрольної групи віком 1 місяць представлена великою кількістю дрібних нейронів, які не утворюють чітких скупчень. Винятком є лише крупноклітинне медіальне преоптичне ядро, яке на зрізах представлено невеликою кількістю (до 10) нейронів з великим світлим ядром і великою кількістю базофільної чи хромофобної цитоплазми. Це ядро розташоване приблизно посередині ПОЯ, ближче до порожнини III шлуночка. Всі інші нейрони ПОЯ більш-менш рівномірно розподілені по його площі і представлені дрібними клітинами з овальним чи неправильної форми ядром. Цитоплазми мало або її непомітно. Форма клітин здебільшого веретеноподібна (рис. 4.7). Площа поперечного перерізу ядер нейронів становила  $36,70 \pm 0,32$  мкм<sup>2</sup>.

Нейрони ПОЯ тварин 1-місячного віку груп «ПФН» та «ДМСО» мали вигляд, подібний до контрольних. Кількість нейронів з деформованими ядрами відповідала контрольній групі. Площа перерізу ядер нейронів становила  $37,00 \pm 0,37$  мкм<sup>2</sup> в групі «ПФН» та  $37,38 \pm 0,33$  мкм<sup>2</sup> в групі «ДМСО». Обидва показники не відрізняються від контролю.

Центральне введення КП-10 на тлі ін'єкцій фізіологічного розчину також не призвело до появи морфо-функціональних змін в тканині ПОЯ гіпоталамусу. Площа поперечного перерізу ядер нейронів становила  $36,72 \pm 0,41$  мкм<sup>2</sup>. В той же час, при дії пептиду-антагоністу спостерігали пригнічення функціональної активності нейроцитів, що проявилось у достовірному зменшенні площі перерізу ядер до  $35,62 \pm 0,45$  мкм<sup>2</sup>. Слід зауважити, що хоча зменшення морфометричного параметру є достовірним, амплітуда змін є порівняно малою. Патогістологічних порушень у тварин 1-місячного віку групи «Р-234» не було виявлено.

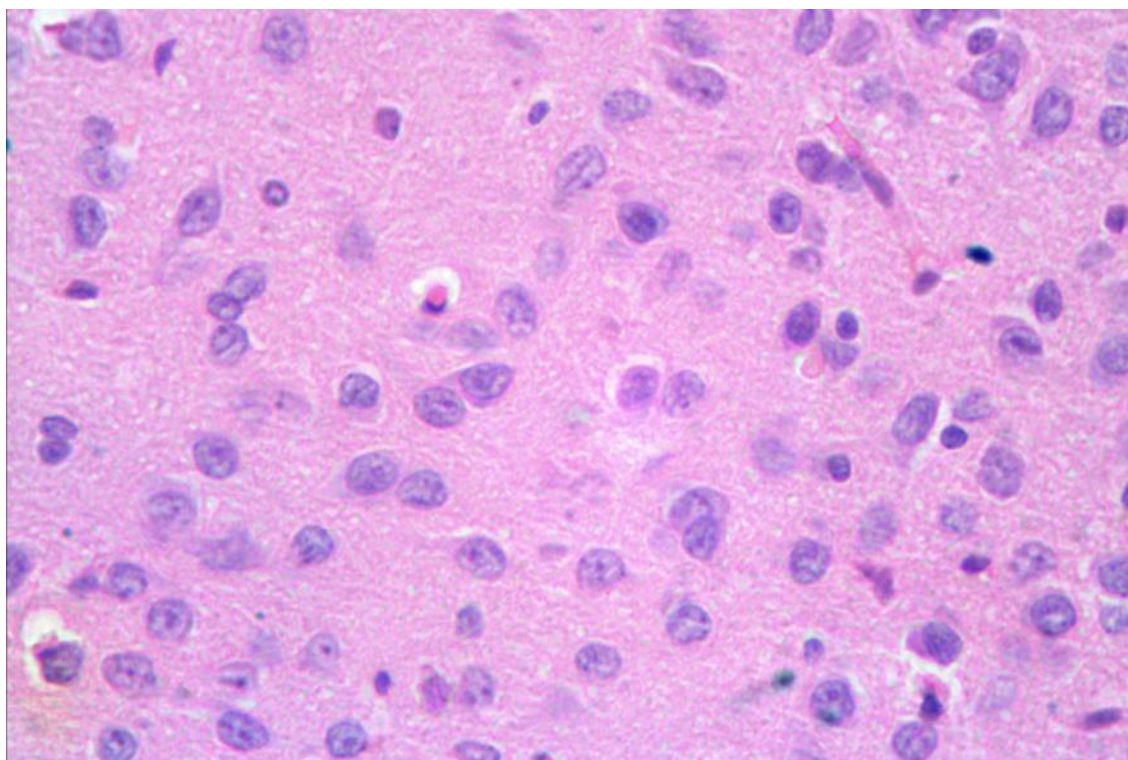


Рис. 4.7. Мікрофотографія преоптичного ядра гіпоталамусу щурів віком 1 місяць контрольної групи. Забарвлення гематоксилином Бемера та еозином, зб.  $\times 400$ .

Ін'єкції розчину НЧЗ в черевну порожнину призвели до достовірного зменшення площі поперечного перерізу ядер нейронів ПОЯ до  $32,46 \pm 0,51 \text{ мкм}^2$ . На зрізах при цьому спостерігали збільшення кількості овальних або деформованих ядер. Деякі з ядер були інтенсивно базофільними, в них не вдавалось диференціювати пристінковий гетерохроматин. Клітини переважно веретеновидної форми, з невеликою кількістю перинуклеарної цитоплазми. Всі ці ознаки свідчать про пригнічення функціональної активності клітин. Інтрацеребровентрикулярні ін'єкції КП-10 на тлі дії нанорозмірного золота не призвели до достовірних змін в нейронах ПОЯ. Морфологічний стан був подібним до групи «НЧЗ», а площа перерізу ядер нейронів становила  $32,14 \pm 0,46 \text{ мкм}^2$ . Блокування кісспептин-опосередкованої сигналізації при введенні НЧЗ призвело до достовірного зменшення площі перерізу нейронів до  $30,77 \pm 0,43 \text{ мкм}^2$ , водночас суттєвих морфологічних відмінностей виявлено не було.

Вплив НЧС в цілому був подібний до дії НЧЗ. Також відмічали появу більшої кількості нейронів з ядрами неправильної форми. Площа перерізу ядер становила  $31,66 \pm 0,28$  мкм<sup>2</sup> (рис. 4.8), що достовірно менше за аналогічний показник контрольної групи.

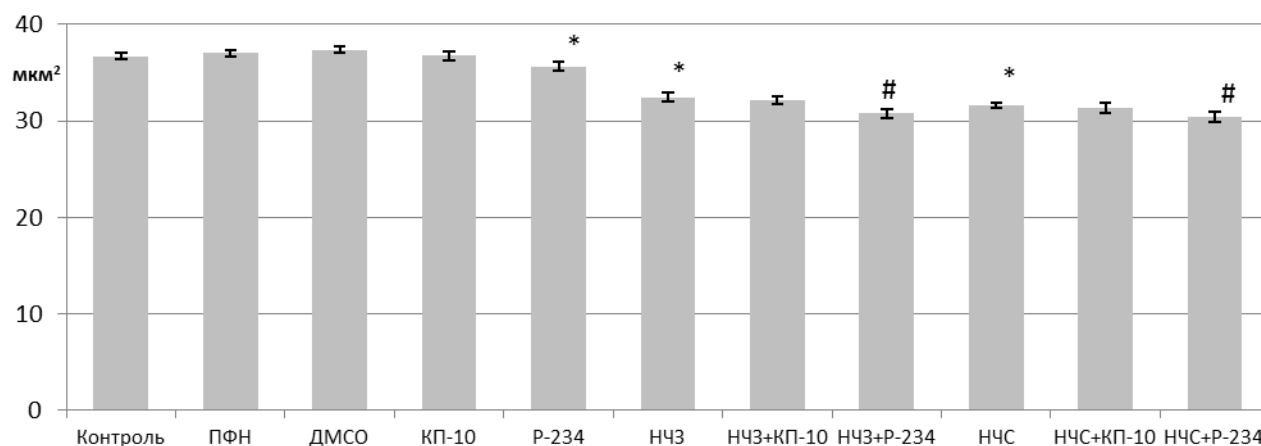


Рис. 4.8. Площа поперечного перерізу ядер нейронів преоптичного ядра гіпоталамусу щурів віком 1 місяць.

Примітка: \* – різниця між контрольною та дослідною групою достовірна при  $p < 0,05$ ; # – різниця між групами «НЧЗ+КП-10», «НЧЗ+P-234», «НЧС+КП-10», «НЧС+P-234» та відповідною групою з введенням лише НЧЗ чи НЧС достовірна при  $p < 0,05$ .

Введення КП-10 на тлі ін'єкцій нанорозмірного срібла не призвело до появи достовірних морфологічних та морфометричних змін. Площа поперечного перерізу ядер нейронів становила  $31,37 \pm 0,52$  мкм<sup>2</sup>, що не відрізняється від показників групи «НЧС». В тканині також відмічали наявність клітин з темними овальним ядрами. В окремих нейронах прослідковувалось збільшення кількості пристінкового гетерохроматину (рис. 4.9). Інгібування кісспептин-залежних сигнальних шляхів введенням P-234 при одночасному застосуванні розчину нанорозмірного золота призвело до достовірного, порівняно з групою «НЧС», зменшення площі перерізу ядер нейронів – до  $30,44 \pm 0,54$  мкм<sup>2</sup>.

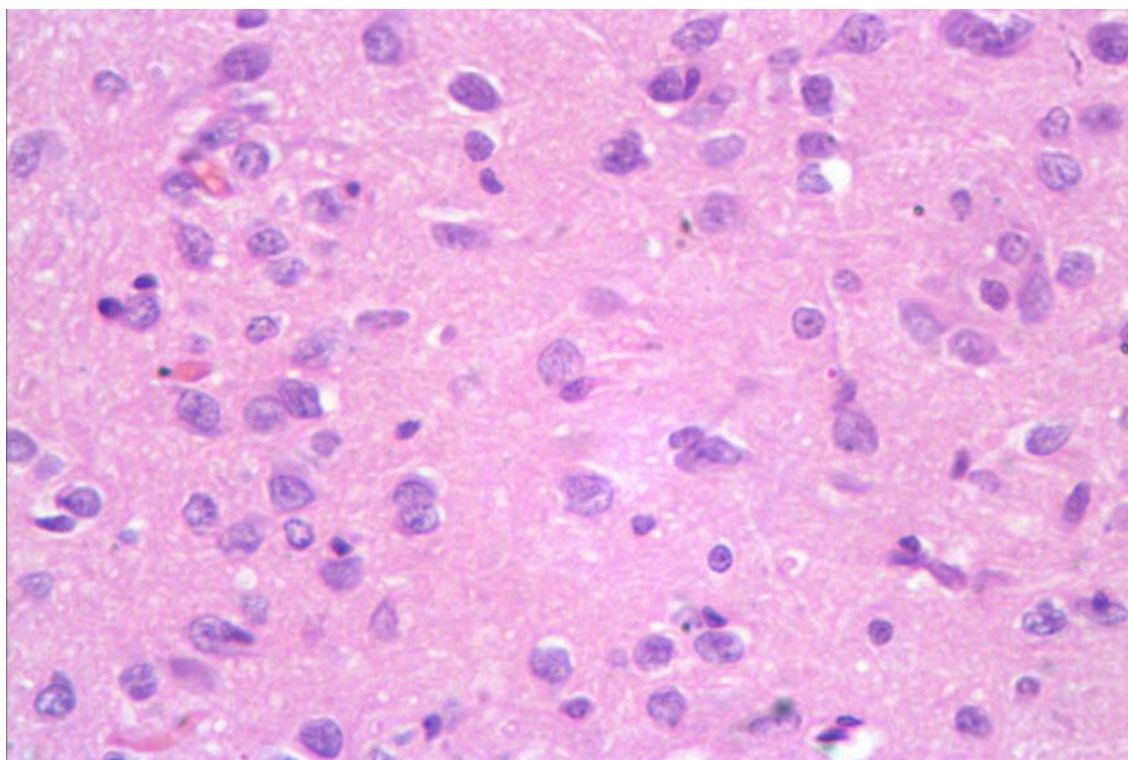


Рис. 4.9. Мікрофотографія преоптичного ядра гіпоталамусу щурів віком 1 місяць групи «НЧС+КП-10». Забарвлення гематоксиліном Бемера та еозином, зб.  $\times 400$ .

#### **4.4. Морфо-функціональна характеристика нейронів преоптичного ядра гіпоталамусу тварин 6-місячного віку різних експериментальних груп**

Організація ПОЯ щурів віком 6 місяців контрольної групи загалом не відрізнялась від будови цього ядра у молодих тварин. Втім, морфологічно виявляли наявність більших за розміром клітин, з округлими світлими ядрами, в яких прослідковувалось виразно окреслене ядереце та порівняно невелика кількість гетерохроматину (рис. 4.10). Площа перетину ядер нейронів в цій ділянці становила  $48,06 \pm 0,65 \text{ мкм}^2$ .

Таку ж будову мали ПОЯ тварин, які отримували внутрішньоочеревинні ін'єкції ПФН чи інтрацеребровентрикулярні – ДМСО. Площа перерізу ядер нейронів цих груп становила  $48,13 \pm 0,82 \text{ мкм}^2$  та  $48,17 \pm 0,78 \text{ мкм}^2$  відповідно. Обидва значення не відрізняються від аналогічного показника контрольної групи.

Введення КП-10 на тлі ін'єкцій фізіологічного розчину призводило до достовірного, але малого за амплітудою зростання площі перерізу ядер – до  $49,68 \pm 0,77$  мкм<sup>2</sup>. В той же час морфологічних відмінностей від контролю в будові тканини виявлено не було.

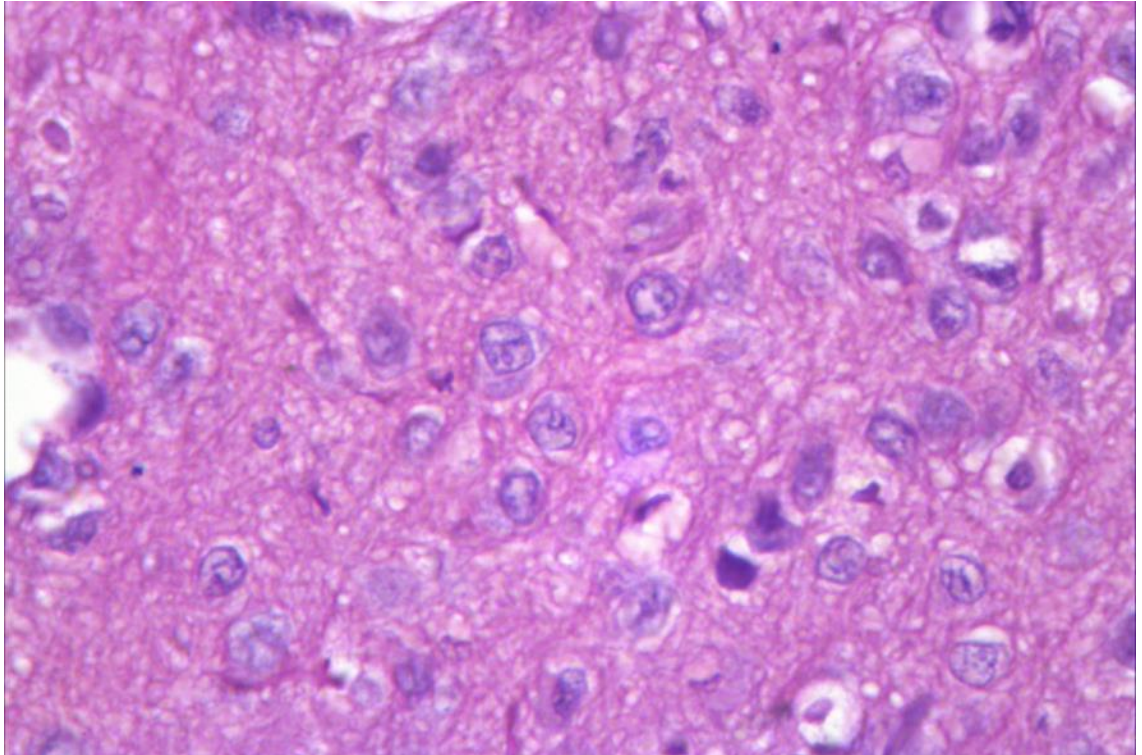


Рис. 4.10. Мікрофотографія преоптичного ядра гіпоталамусу щурів віком 6 місяців контрольної групи. Забарвлення гематоксилином Бемера та еозином, зб.  $\times 400$ .

У тварин групи «Р-234» площа перерізу ядер нейронів ПОЯ становила  $43,02 \pm 0,62$  мкм<sup>2</sup>, що достовірно менше за площу ядер нейронів в контрольній групі. Морфологічно спостерігали збільшення частки клітин з невеликими ядрами та зменшення площі цитоплазми в нейронах.

Десятиденне введення НЧЗ призвело до розвитку ознак пригнічення функціонування нейронів ПОЯ. Так, зросла кількість клітин з ядрами неправильної форми, в багатьох ядрах було важко ідентифікувати ядерце, збільшилась кількість гетерохроматину в ядрах. Ядра деяких нейронів, зберігаючи нормальну морфологію, були значно меншими за ядра сусідніх клітин (рис. 4.11).

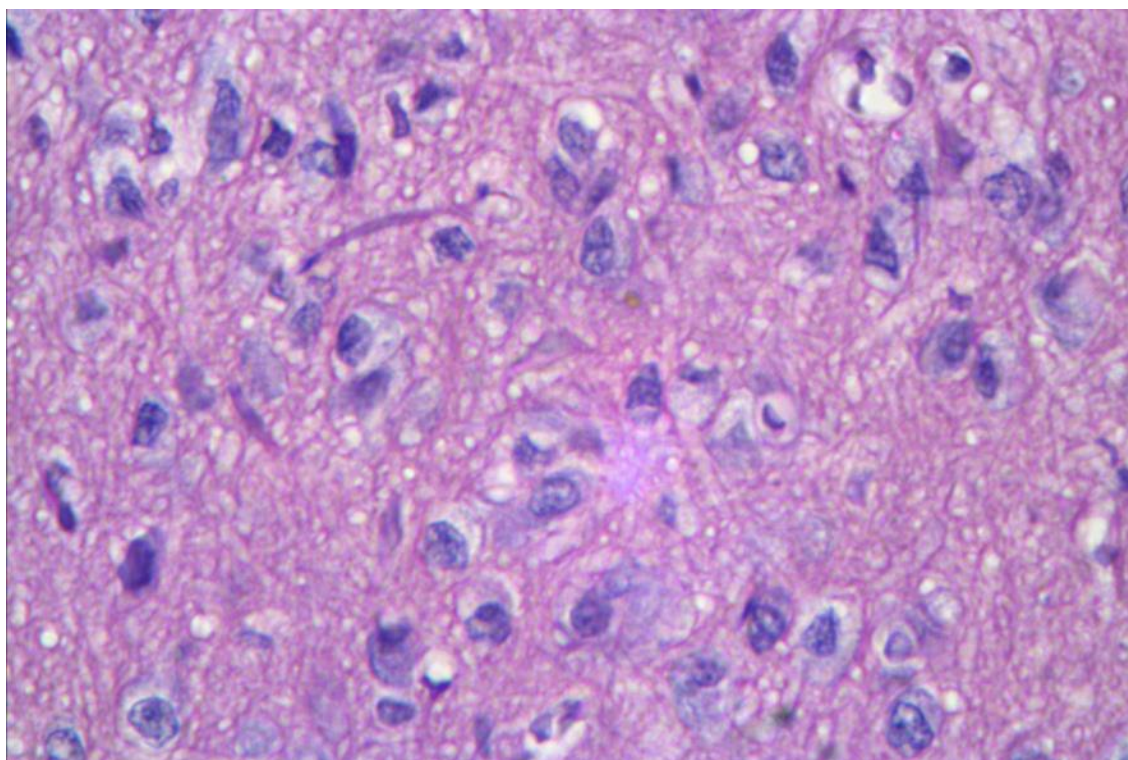


Рис. 4.11. Мікрофотографія преоптичного ядра гіпоталамусу щурів віком 6 місяців групи «НЧЗ». Забарвлення гематоксилином Бемера та еозином, зб.  $\times 400$ .

Площа перерізу ядер нейронів в даній групі була достовірно меншою за контрольні значення і становила  $41,46 \pm 0,67$  мкм<sup>2</sup>. При поєднанні впливів НЧЗ та КП-10 не спостерігали морфологічних та морфометричних відмінностей, порівнюючи з групою «НЧЗ». Площа перерізу ядер становила  $42,41 \pm 0,61$  мкм<sup>2</sup>. Натомість, при введенні Р-234 в шлуночки головного мозку за аналогічних умов відмічали достовірне пригнічення функціональної активності клітин, що проявлялось у зменшення площі перетину ядер до  $36,35 \pm 0,61$  мкм<sup>2</sup>. При цьому велика кількість ядер мала високий вміст гетерохроматину, а кількість дрібних нейронів з округлими світлими ядрами була незначною.

Вплив НЧС був подібний до дії нанорозмірного золота. Так само відмічали збільшення кількості невеликих та деформованих ядер. Площа перетину ядер була достовірно меншою за показники групи «Контроль» і становила  $41,67 \pm 0,70$  мкм<sup>2</sup>. Водночас, вплив і КП-10, і Р-234 на тлі дії НЧС не призвів до появи достовірних морфологічних та морфометричних відмінностей. Загальні особливості будови нейронів були аналогічні групі «НЧС», а площа поперечного

перетину ядер нейроцитів становила  $42,10 \pm 0,78 \text{ мкм}^2$  та  $41,08 \pm 0,62 \text{ мкм}^2$  відповідно (рис. 4.12).

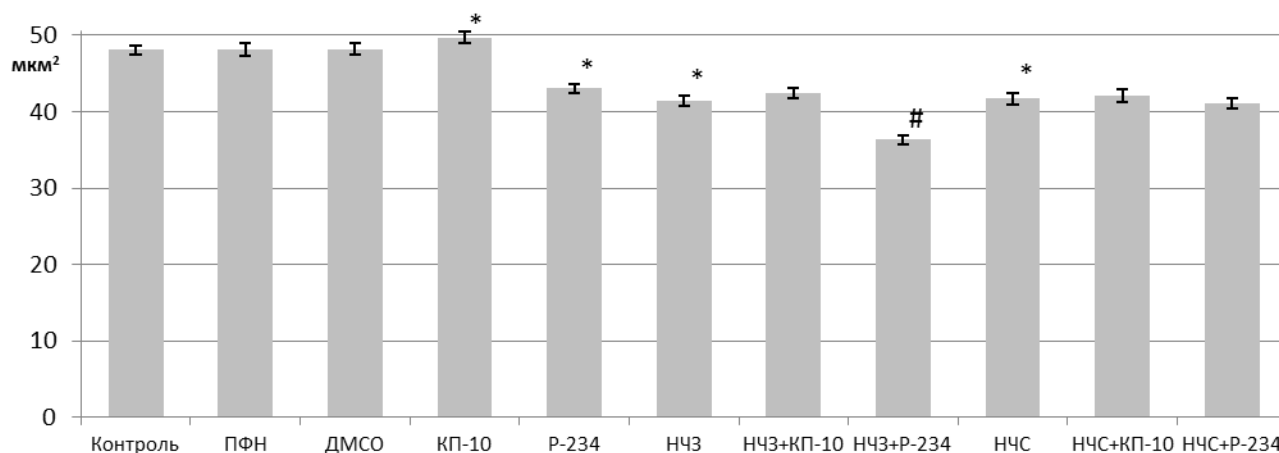


Рис. 4.12. Площа поперечного перерізу ядер нейронів преоптичного ядра гіпоталамусу щурів віком 6 місяців.

Примітка: \* – різниця між контрольною та дослідною групою достовірна при  $p < 0,05$ ; # – різниця між групами «НЧЗ+КП-10», «НЧЗ+P-234», «НЧС+КП-10», «НЧС+P-234» та відповідною групою з введенням лише НЧЗ чи НЧС достовірна при  $p < 0,05$ .

#### 4.5. Морфо-функціональна характеристика гонадотропоцитів аденогіпофіза щурів 1-місячного віку різних експериментальних груп

При дослідженні аденогіпофіза щурів віком 1 місяць контрольної групи виявили помірну кількість гонадотропоцитів. Візуально їх ідентифікували як овальні, рідше круглі, клітини з ексцентрично розташованим круглим чи овальним ядром. Цитоплазма клітин забарвлена у відтінки синього кольору: від блакитного до темно-синього, ядра – в рожевий чи оранжевий. У поодиноких клітин візуально спостерігали макулу, яка виглядала як ділянка просвітлення цитоплазми, в якій знаходився аморфний матеріал, забарвлений у синій чи фіолетовий колір. Як правило, макула розташовувалась в центрі клітини. Гонадотропоцити диференціювали від тиротропоцитів, цитоплазма яких була також була забарвлена у блакитний чи синій колір, але самі клітини мали

видовжену, відростчасту чи полігональну форму. Гонадотропні базофіли розташовувались переважно у периферичних частинах аденогіпофіза та часто утворювали скупчення навколо капілярів (рис. 4.13).

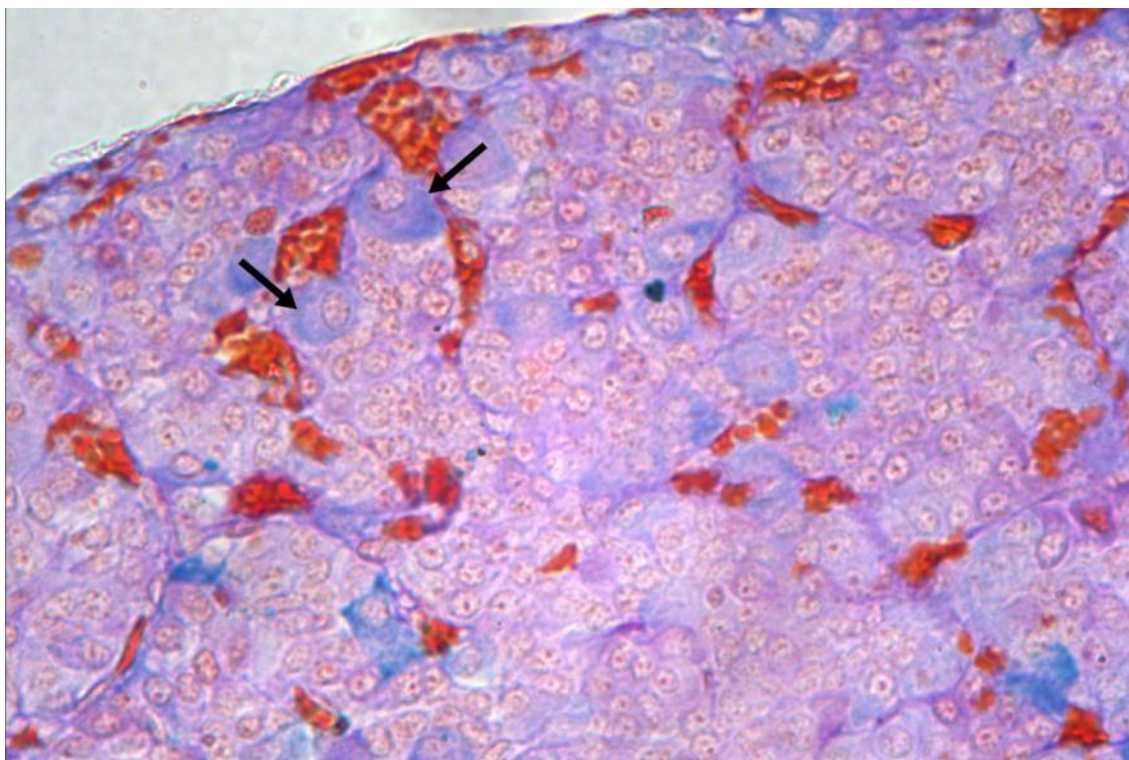


Рис. 4.13. Мікрофотографія аденогіпофіза щурів віком 1 місяць контрольної групи. Гонадотропоцити позначено стрілкою. Забарвлення альціановим синім, реактивом Шиффа та оранжем Ж за Herlant, зб.  $\times 400$ .

Середня площа перерізу ядра гонадотропоцитів цієї групи становила  $21,13 \pm 0,65 \text{ мкм}^2$ , а цитоплазми –  $95,54 \pm 3,45 \text{ мкм}^2$ . ЯЦС складало  $0,248 \pm 0,015$ .

Аденогіпофізи тварин груп «ПФН» та «ДМСО» морфологічно не відрізнялись від контрольних зразків. Площа перерізу ядер клітин групи «ПФН» становила  $21,28 \pm 0,65 \text{ мкм}^2$ , цитоплазми –  $94,18 \pm 4,88 \text{ мкм}^2$  (рис. 4.14). ЯЦС становило  $0,247 \pm 0,015$ . Аналогічні показники для групи «ДМСО» становили  $20,21 \pm 0,81 \text{ мкм}^2$ ,  $96,61 \pm 4,82 \text{ мкм}^2$  та  $0,233 \pm 0,014 \text{ мкм}^2$  відповідно. Всі вищеназвані морфометричні параметри не відрізнялись від контрольних значень.

Гонадотропоцити піддослідних тварин, яким вводили Р-234 з одночасними ін'єкціями фізіологічного розчину, морфологічно були більш округлими та компактними, забарвлення цитоплазми було більш інтенсивне, ніж в контрольних

зразках. Також зросла частка клітин з видимою макулою. Оскільки в цій ділянці розташовується апарат Гольджі, її візуалізація може свідчити про сповільнення секреторних процесів [242]. Достовірних відмінностей в площі поперечного перерізу ядер клітин та цитозолу виявлено не було ( $20,72 \pm 4,88 \text{ мкм}^2$  та  $90,96 \pm 2,19 \text{ мкм}^2$  відповідно). ЯЦС складало  $0,275 \pm 0,023$ , що також не відрізняється від показників контрольної групи.

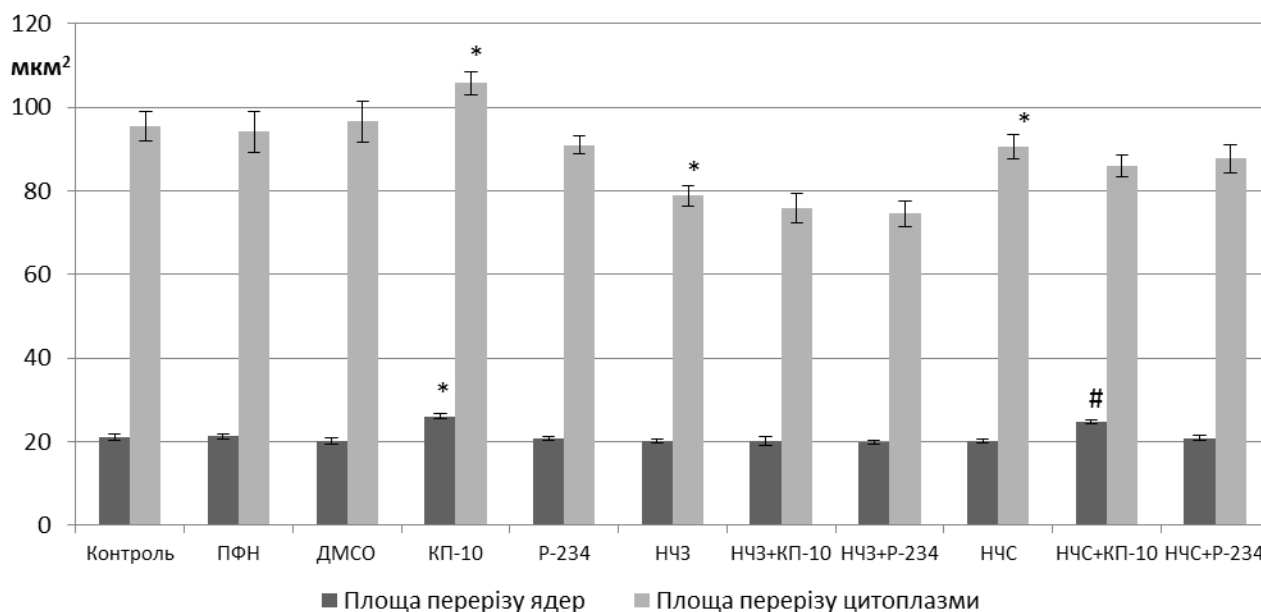


Рис. 4.14. Площа поперечного перерізу ядер та цитоплазми гонадотропоцитів аденогіпофіза щурів віком 1 місяць.

Примітка: \* – різниця між контрольною та дослідною групою достовірна при  $p < 0,05$ ; # – різниця між групами «НЧЗ+КП-10», «НЧЗ+P-234», «НЧС+КП-10», «НЧС+P-234» та відповідною групою з введенням лише НЧЗ чи НЧС достовірна при  $p < 0,05$ .

В ділянках переднього гіпофізу тварин групи «КП-10» було виявлено зростання кількості овальних гонадотропоцитів. Ці клітини мали порівняно слабо забарвлену цитоплазму, здебільшого світло-блакитного кольору. Ядро було витіснене на периферію, та мало форму овалу чи напівмісяця. Макула була помітною рідко (рис. 4.15). Площа поперечного перерізу ядра гонадотропних базофілів даної групи складала  $26,09 \pm 0,61 \text{ мкм}^2$ , в той час як цитозолу –

$105,76 \pm 2,82$  мкм<sup>2</sup>. Обидва показники достовірно вищі за контрольні значення. ЯЦС становило  $0,258 \pm 0,008$  мкм<sup>2</sup>, що не відрізняється від контролю.

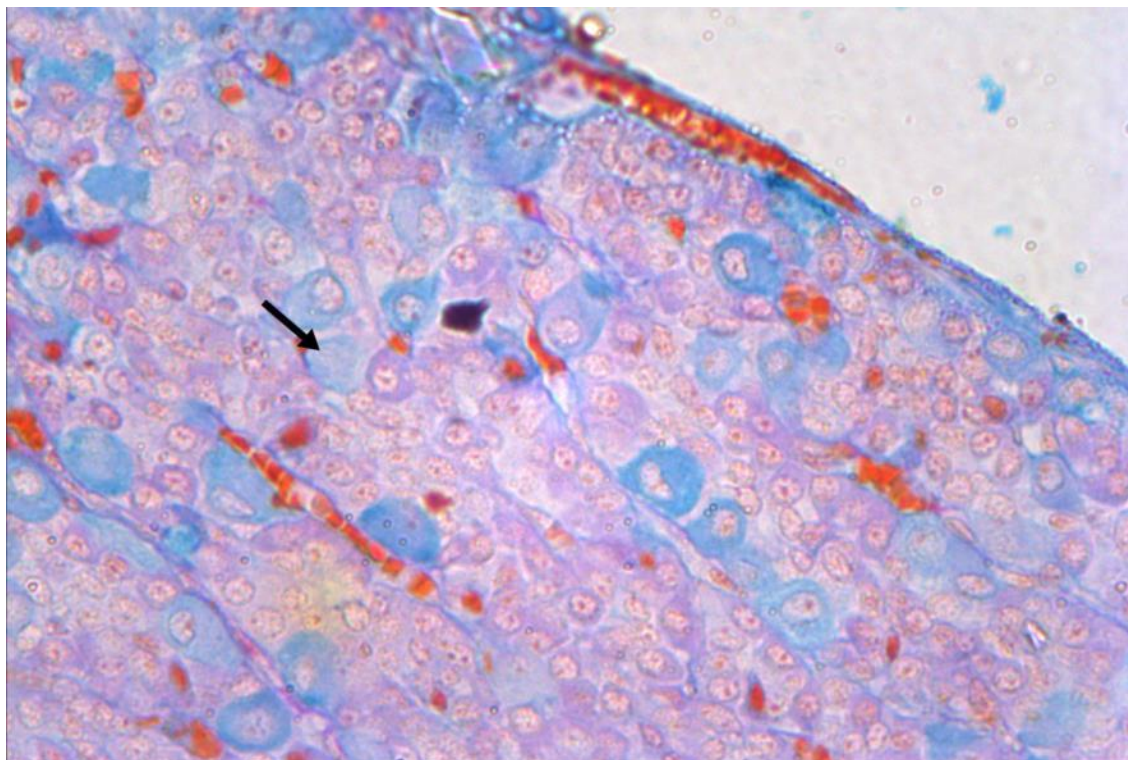


Рис. 4.15. Мікрофотографія аденогіпофіза щурів віком 1 місяць групи «КП-10». Макулу позначено стрілкою. Забарвлення альціановим синім, реактивом Шиффа та оранжем Ж за Herlant, зб.  $\times 400$ .

Десятиденне внутрішньоочеревинне введення НЧС призвело до розвитку морфологічних та морфометричних змін в аденогіпофізі. Так, гонадотропоцити були представлені в основному округлими клітинами, з інтенсивно забарвленою цитоплазмою темно-синього чи синьо-фіолетового кольору. У більшості клітин можна було побачити макулу. Ядро округле чи овальне, візуально займає значну частку клітини (рис. 4.16). Площа поперечного перерізу ядер даних клітин складала  $20,17 \pm 0,47$  мкм<sup>2</sup>, що відповідає контрольним значенням. В той же час площа перерізу цитоплазми складала  $78,85 \pm 2,44$  мкм<sup>2</sup>, що достовірно нижче за показники групи «Контроль». ЯЦС складало  $0,274 \pm 0,010$ , що достовірно більше за контроль.

Інтарцеребровентрикулярні ін'єкції як КП-10, так і Р-234 на тлі дії нанорозмірного золота не призвели до розвитку морфологічних відмінностей.

Загальна морфологія гонадотропних базофілів представників цих двох груп відповідала показниками групи «НЧЗ». В групі «НЧЗ+КП-10» площа перерізу ядра складала  $20,26 \pm 1,11 \text{ мкм}^2$ , цитозоль –  $76,00 \pm 3,50 \text{ мкм}^2$ , а ЯЦС знаходилось на рівні  $0,282 \pm 0,020$ . Для групи «НЧЗ+Р-234» ці величини становили  $19,97 \pm 0,50 \text{ мкм}^2$ ,  $74,52 \pm 2,97 \text{ мкм}^2$  та  $0,289 \pm 0,012$  відповідно. Достовірних відмінностей від морфометричних параметрів групи «НЧЗ» не виявлено.

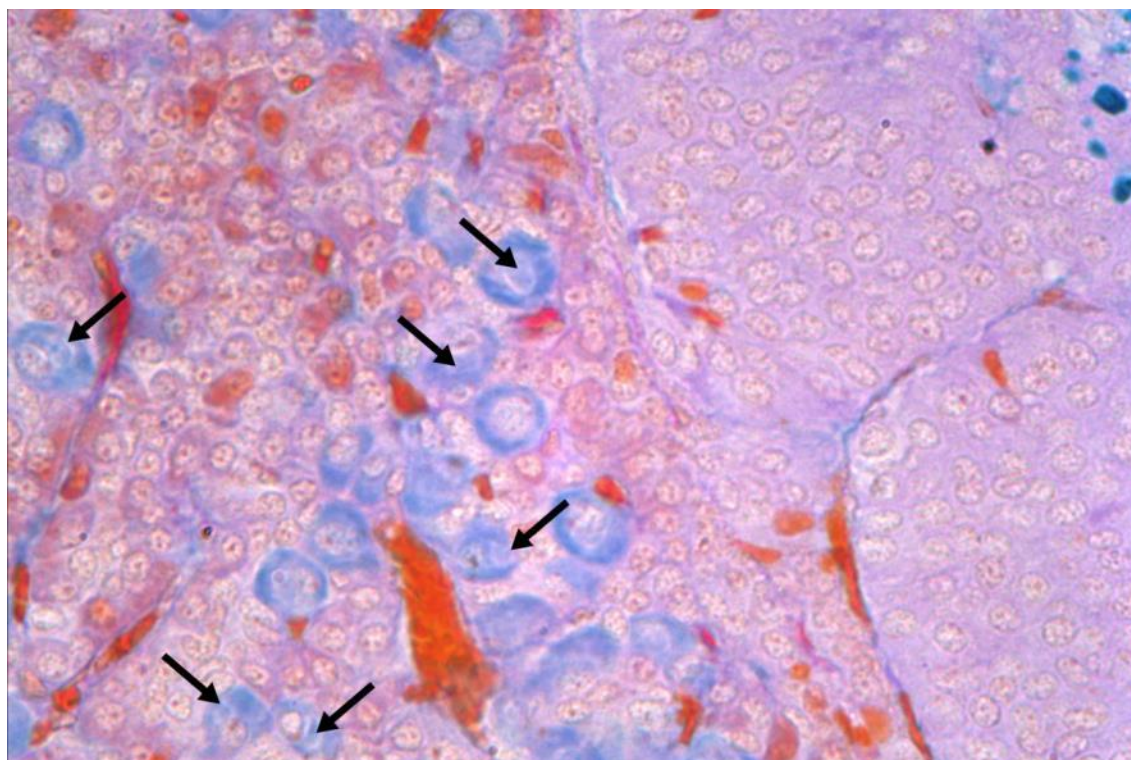


Рис. 4.16. Мікрофотографія аденогіпофіза щурів віком 1 місяць групи «НЧЗ». Макулу позначено стрілкою. Забарвлення альціановим синім, реактивом Шиффа та оранжем Ж за Herlant, зб.  $\times 400$ .

Дія НЧС на аденогіпофіз проявлялась розвитком значно менших морфологічних змін, порівнюючи з НЧЗ. Більшість гонадотропоцитів мали цитоплазму, забарвлену в інтенсивно-синій колір та ядро овальної форми відтіснене на периферію. В той же час в деяких клітинах було чітко помітно макулу. Як правило, в таких випадках цитоплазма була синьо-фіолетовою, а сама клітина округлою. Площа перерізу ядра складала  $20,14 \pm 0,51 \text{ мкм}^2$  (відповідає контрольному значенню), а цитоплазми –  $90,54 \pm 2,86 \text{ мкм}^2$  (достовірно менше за

показник групи «Контроль»). ЯЦС становило  $0,238 \pm 0,010$ , достовірної різниці з контрольними показниками не виявлено (рис. 4.17).

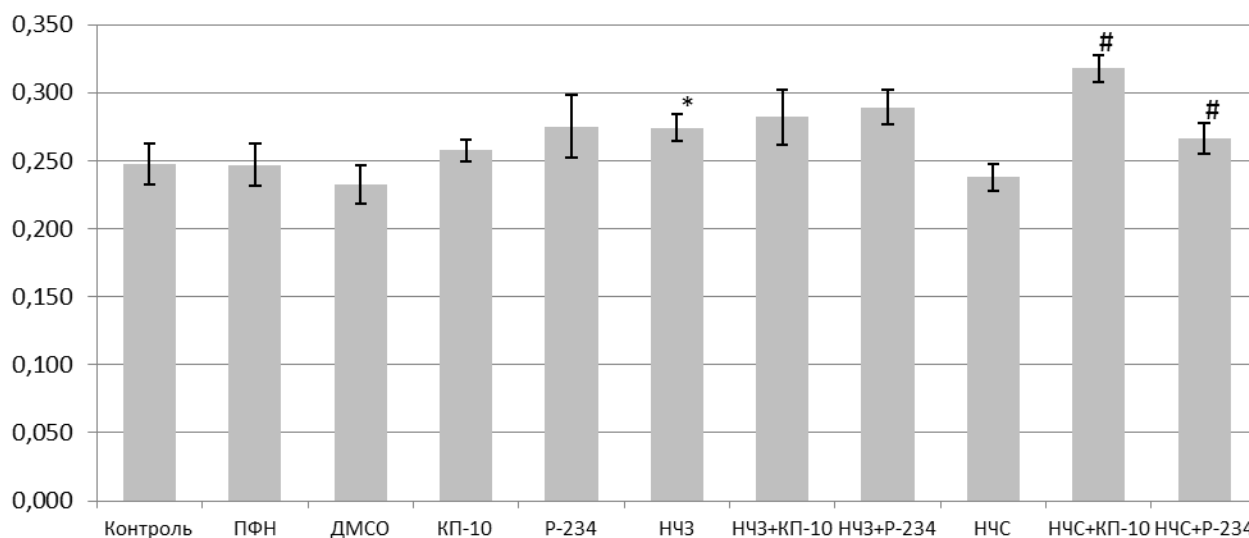


Рис. 4.17. Ядерно-цитоплазматичне співвідношення гонадотропоцитів аденогіпофіза щурів віком 1 місяць.

Примітка: \* – різниця між контрольною та дослідною групою достовірна при  $p < 0,05$ ; # – різниця між групами «НЧЗ+КП-10», «НЧЗ+P-234», «НЧС+КП-10», «НЧС+P-234» та відповідною групою з введенням лише НЧЗ чи НЧС достовірна при  $p < 0,05$ .

Аденогіпофізи тварин групи «НЧС+КП-10» та «НЧС+P-234» були дуже подібними до групи «НЧС». Так само, популяція гонадотропоцитів була гетерогенною і морфологія більшості клітин відповідала контрольним зразкам. Площа перерізу ядер клітин групи «НЧС+КП-10» була достовірно більшою за відповідний показник групи «НЧС» і становила  $24,79 \pm 0,58 \text{ мкм}^2$ . В той же час достовірних відмінностей в площі перерізу цитоплазми виявлено не було – вона складала  $85,90 \pm 2,55 \text{ мкм}^2$ . Відповідні показники групи «НЧС+P-234» становили  $20,87 \pm 0,64 \text{ мкм}^2$  та  $87,71 \pm 3,29 \text{ мкм}^2$ . Різниця між вказаними величинами і показниками групи «НЧС» є недостовірною.

ЯЦС клітин групи «НЧС+КП-10» склав  $0,318 \pm 0,009$ , групи «НЧС+P-234» –  $0,266 \pm 0,011$ . Ці параметри достовірно більші, порівнюючи з клітинами тварин, яким вводили лише розчин нанорозмірного срібла.

#### 4.6. Морфо-функціональна характеристика гонадотропоцитів аденогіпофіза щурів 6-місячного віку різних експериментальних груп

Порівняно зі статевонезрілими щурами, в аденогіпофізі тварин віком 6 місяців спостерігали зростання кількості клітин з забарвленою в синій колір цитоплазмою. Форма клітин була переважно овальна, ядро відтінене на периферію і іноді в ньому були помітні глибокі інвагінації. Цитоплазма була забарвлена переважно в світлі відтінки синього кольору. Макулу можна було помітити рідко, лише в поодиноких клітинах. Гонадотропоцити знаходились переважно на периферії залози, а також в ділянці, яка прилягала до проміжної частки гіпофізу. Також відмічали кровонаповненість периферичних кровоносних судин (рис. 4.18).

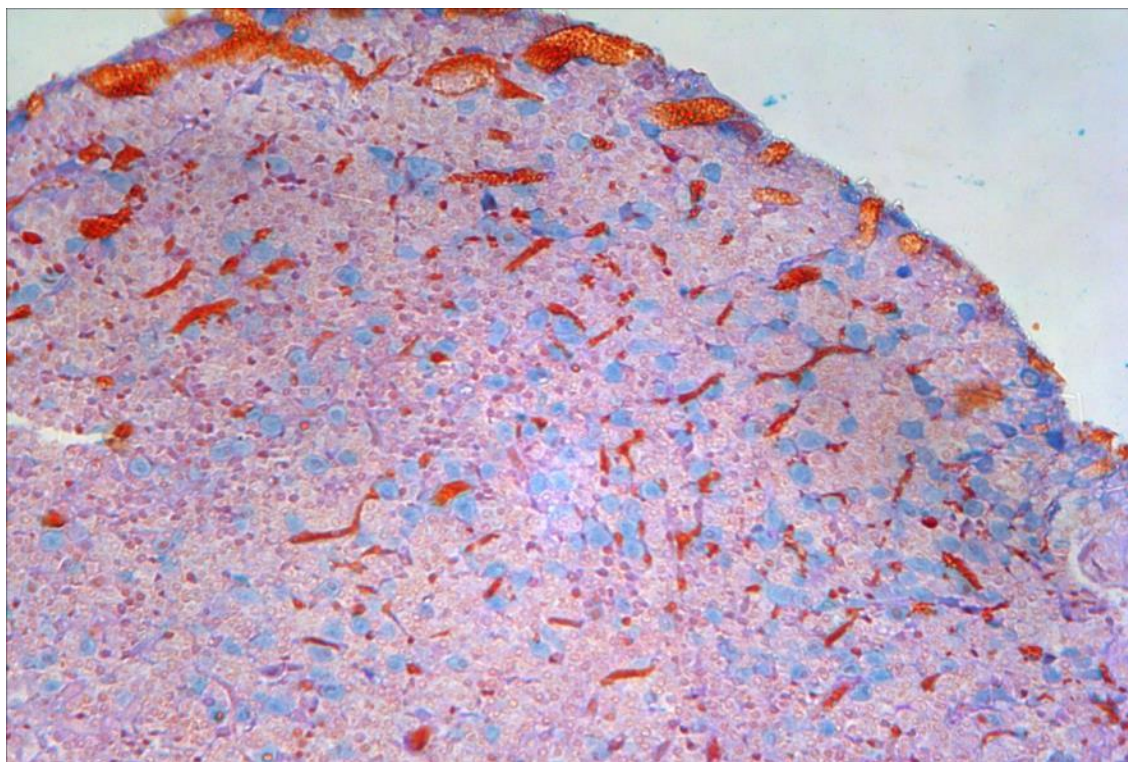


Рис. 4.18. Мікрофотографія аденогіпофіза щурів віком 6 місяців контрольної групи. Забарвлення альціановим синім, реактивом Шиффа та оранжем Ж за Herlant, зб.  $\times 100$ .

Площа поперечного перерізу ядер клітин цієї групи становила  $23,65 \pm 0,58 \text{ мкм}^2$ , а цитоплазми –  $95,50 \pm 2,96 \text{ мкм}^2$  (рис. 4.19). ЯЦС складало  $0,290 \pm 0,017$ .

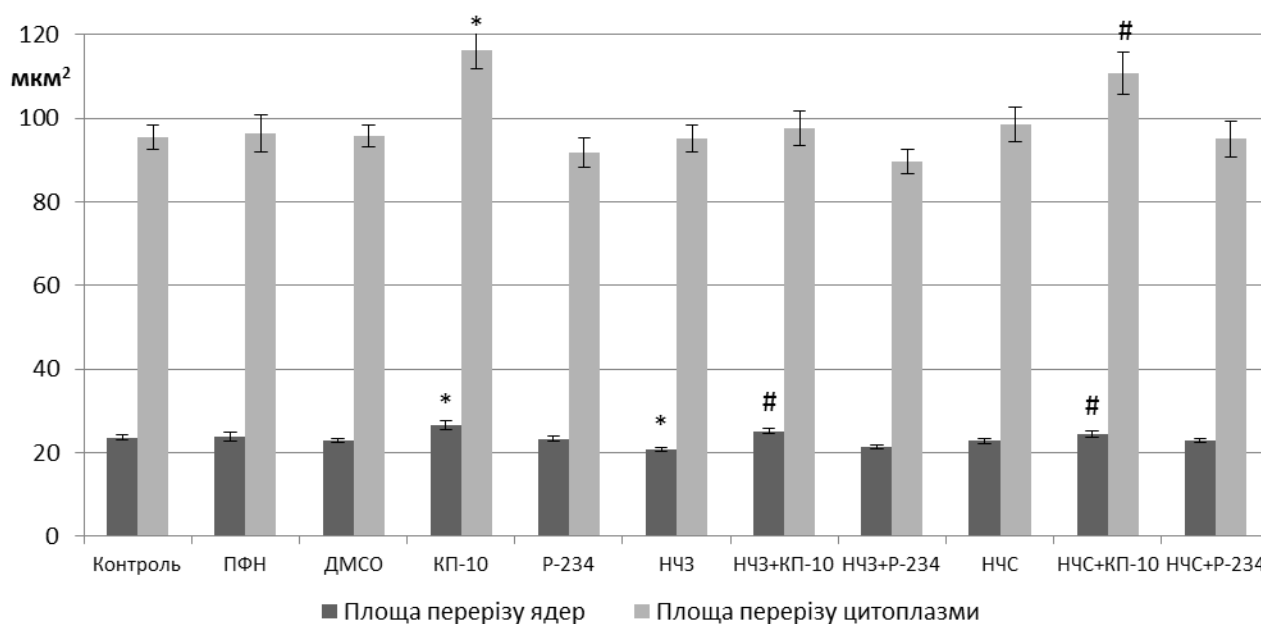


Рис. 4.19. Площа поперечного перерізу ядер та цитоплазми гонадотропоцитів аденогіпофіза щурів віком 6 місяців.

Примітка: \* – різниця між контрольною та дослідною групою достовірна при  $p < 0,05$ ; # – різниця між групами «НЧЗ+КП-10», «НЧЗ+P-234», «НЧС+КП-10», «НЧС+P-234» та відповідною групою з введенням лише НЧЗ чи НЧС достовірна при  $p < 0,05$ .

Передні частки гіпофіза тварин груп «ПФН» та «ДМСО» не відрізнялись від контрольних зразків. Морфологія окремих гонадотропоцитів та їхнє розташування також залишились без змін. Виміряні нами морфометричні параметри становили: площа поперечного перерізу ядра –  $23,80 \pm 1,05 \text{ мкм}^2$  і  $22,96 \pm 0,51 \text{ мкм}^2$ ; площа перерізу цитоплазми –  $96,38 \pm 4,47 \text{ мкм}^2$  та  $95,74 \pm 2,69 \text{ мкм}^2$ , ЯЦС –  $0,275 \pm 0,019$  та  $0,273 \pm 0,009$  в групах «ПФН» та «ДМСО» відповідно. Всі названі показники не відрізняються від аналогічних величин контрольної групи.

Гонадотропоцити тварин, які отримували одночасні ін'єкції фізіологічного розчину та КП-10 були овальними, з світло-блакитною цитоплазмою. Ядро відтіснене на периферію, велике та світле, переважно округлої форми. Клітини з чітко окресленою макулою були поодинокими (рис. 4.20). Площа перерізу ядер в даній групі становила  $26,57 \pm 1,01 \text{ мкм}^2$ , а цитоплазми –  $116,36 \pm 4,58 \text{ мкм}^2$ . Обидва показники достовірно перевищують контрольні значення. Водночас спостерігали достовірне зменшення ЯЦС до  $0,241 \pm 0,015$ .

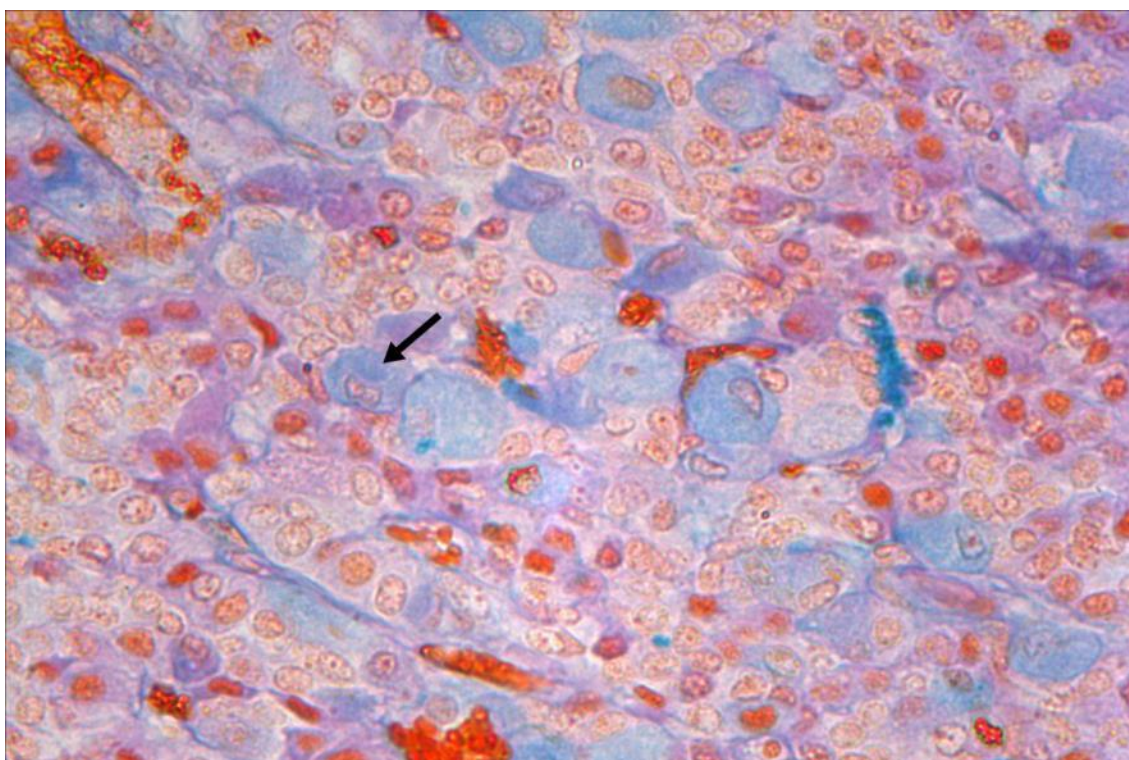


Рис. 4.20. Мікрофотографія аденогіпофіза щурів віком 6 місяців групи «КП-10». Макулу позначено стрілкою. Забарвлення альціановим синім, реактивом Шиффа та оранжем Ж за Herlant, зб.  $\times 100$ .

Введення Р-234 за аналогічних умов не призвело до розвитку морфологічних змін. Гонадотропоцити мали блідо забарвлену цитоплазму та ексцентрично розташоване овальне ядро. Площа перерізу ядра становила  $23,37 \pm 0,61 \text{ мкм}^2$ , а цитоплазми –  $91,75 \pm 3,57 \text{ мкм}^2$ . ЯЦС складало  $0,271 \pm 0,010$ .

Гонадотропні базофіли аденогіпофіза тварин, яким впродовж 10 діб вводили розчин нанорозмірного золота виглядали аналогічно до контрольних зразків. Втім, хоча основна частина клітин мали світлу цитоплазму та великі ядра,

відмічали появу гонадотропоцитів з темно-синьою чи фіолетовою цитоплазмою, а також невеликими округлими ядрами. Хоча чіткої макули в таких клітинах помітно не було, цитозоль був просвітленим в центральній частині клітини. Морфометрично спостерігали зменшення площі перерізу ядер до  $20,85 \pm 0,51 \text{ мкм}^2$ , при незмінній площі цитоплазми –  $95,20 \pm 3,30 \text{ мкм}^2$ . ЯЦС також був достовірно меншим за контроль і становив  $0,232 \pm 0,009$ .

Комбіновані ін'єкції НЧЗ та КП-10 призвели до достовірно, порівняно з групою «НЧЗ» зростання площі перерізу ядра до  $25,13 \pm 0,59 \text{ мкм}^2$ , хоча площа перетину цитоплазми залишилась незмінною –  $97,61 \pm 4,02 \text{ мкм}^2$ . Візуально при цьому спостерігали збереження морфологічної гетерогенності гонадотропоцитів, хоча форма ядра змінилась до овальної і зросла кількість світлих ядер. ЯЦС складало  $0,277 \pm 0,012$ , що достовірно перевищує ЯЦС групи «НЧЗ» (рис. 4.21).

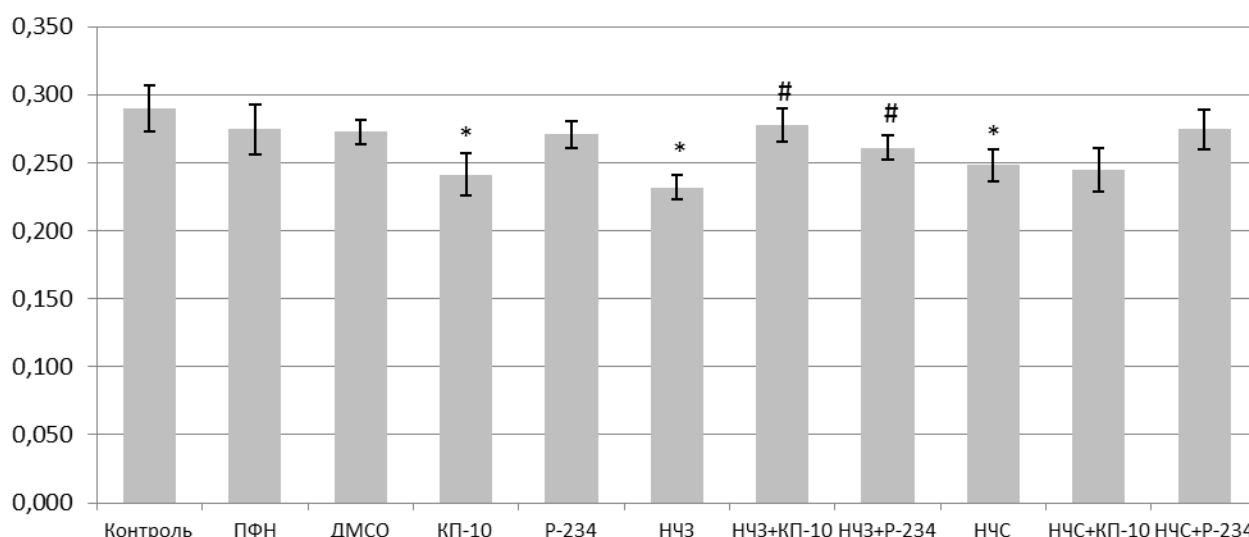


Рис. 4.21. Ядерно-цитоплазматичне співвідношення гонадотропоцитів аденогіпофіза щурів віком 6 місяців.

Примітка: \* – різниця між контрольною та дослідною групою достовірна при  $p < 0,05$ ; # – різниця між групами «НЧЗ+КП-10», «НЧЗ+Р-234», «НЧС+КП-10», «НЧС+Р-234» та відповідною групою з введенням лише НЧЗ чи НЧС достовірна при  $p < 0,05$ .

При дослідженні будови аденогіпофіза тварин групи «НЧЗ+Р-234» було відмічено зростання кількості клітин з цитоплазмою темно-синього чи синьо-

фіолетового кольору. В таких клітинах ядро було невеликим та округлим, часто розташовувалось різко ексцентрично. Цитоплазма центральної частини клітини як правило була більш світла, хоча чітко окреслену макулу спостерігали рідко (рис. 4.22). Площа перерізу ядер становила  $21,44 \pm 0,48 \text{ мкм}^2$ , що не відрізняється від групи «НЧЗ». В той же час спостерігали тенденцію до зменшення площі перерізу цитоплазми (до  $89,78 \pm 2,93 \text{ мкм}^2$ ), хоча достовірної різниці зафіксовано не було ( $p=0,068$ ). ЯЦС складало  $0,261 \pm 0,009$ , що достовірно перевищує показник групи «НЧЗ».

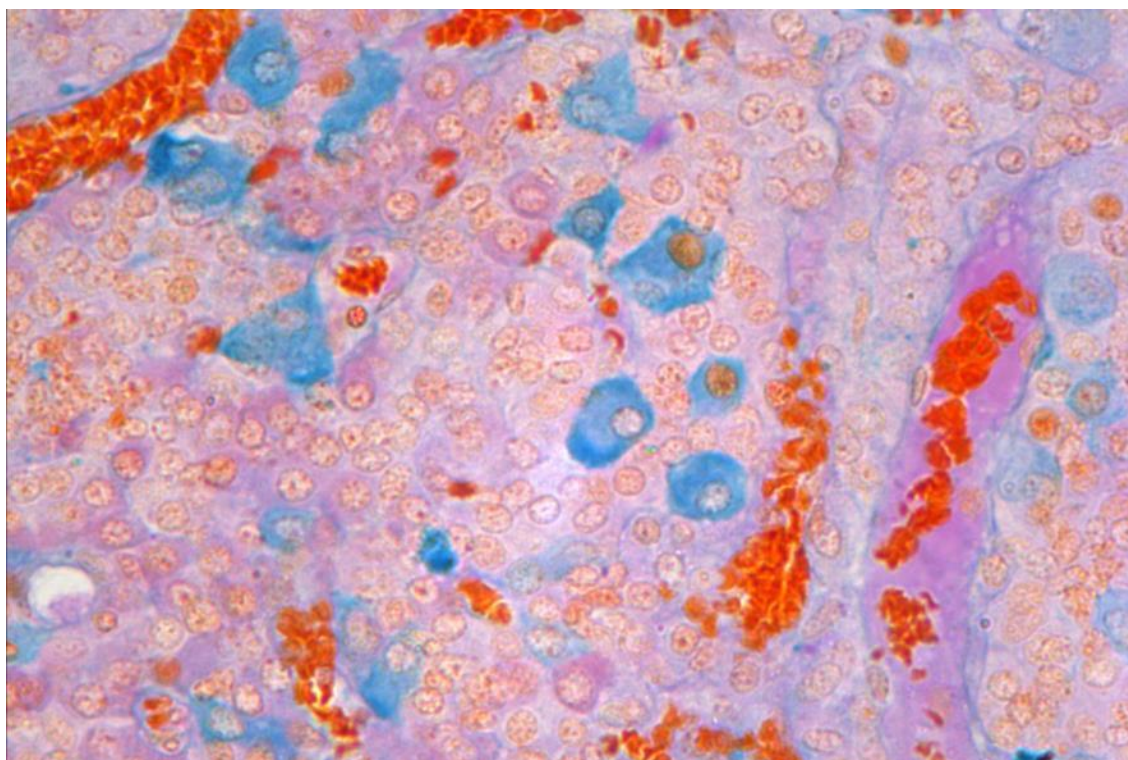


Рис. 4.22. Мікрофотографія аденогіпофіза щурів віком 6 місяців групи «НЧЗ+Р-234». Забарвлення альціановим синім, реактивом Шиффа та оранжем Ж за Herlant, зб.  $\times 100$ .

Введення НЧС не призвело до розвитку суттєвих морфологічних відмінностей. Гонадотропоцити були переважно овальними, з блакитною чи синьою цитоплазмою та овальними чи округлими ядрами. Площа перерізу ядер становила  $22,79 \pm 0,66 \text{ мкм}^2$ , а цитоплазми –  $98,53 \pm 4,09 \text{ мкм}^2$ . Обидва показники не відрізняються від контролю. Водночас було зафіксовано зменшення ЯЦС до  $0,248 \pm 0,011 \text{ мкм}^2$  ( $p=0,0499$ ).

Одночасні ін'єкції НЧС та КП-10 призвели до достовірного зростання площі перерізу ядра ( $24,44 \pm 0,75 \text{ мкм}^2$ ) та цитозолу ( $110,83 \pm 5,11 \text{ мкм}^2$ ) порівняно з групою «НЧС». Морфологічно спостерігали появу великих овальних клітин зі світло-блакитною цитоплазмою та великими світлими ядрами. Загальна будова тканини була схожою на зразки групи «КП-10». ЯЦС складало  $0,245 \pm 0,015$ , що відповідає показниками тварин, яким вводили лише НЧС.

Введення Р-234 на тлі впливу нанорозмірного срібла не призвело до розвитку морфологічних та морфометричних змін. Площа перерізу ядра складала  $22,93 \pm 0,55 \text{ мкм}^2$ , а цитоплазми –  $95,10 \pm 4,33 \text{ мкм}^2$ . ЯЦС становило  $0,274 \pm 0,015$ . Всі показники не відрізняються від аналогічних параметрів групи «НЧС».

Підсумовуючи, можна зазначити, що морфо-функціональний стан усіх досліджених складових гіпоталамо-гіпофізарного комплексу у тварин 6-місячного віку свідчить про вищу активність центральних компонентів репродуктивної системи, порівнюючи із 1-місячними тваринами. Введення екзогенного КП моделювало активацію гіпоталамо-гіпофізарно-гонадної системи, оскільки було відмічено появу ознак підвищення функціональної активності клітин в ділянці ПОЯ та аденогіпофізі з одночасним пригніченням нейронів АЯ. Введення Р-234 мало протилежний ефект. Такий характер взаємодій відповідає сучасним уявленням про функціонування кіспептинергічної мережі гіпоталамусу [183,197].

Введення НЧЗ та НЧС не призвело до розвитку патологічних змін в тканині гіпоталамусу. Окрім того, загальний характер відповіді на КП-опосередковану стимуляцію відповідав нормі. Такі результати можуть свідчити про опосередкований вплив досліджуваних наноматеріалів на активність нейронів гіпоталамічних ядер. Слід зауважити, що амплітуда змін морфометричних досліджених показників за дії НЧС загалом була більшою, порівняно із НЧЗ.

Ін'єкції НЧ також призвели до пригнічення активності гонадотропоцитів, що проявлялось у першу чергу у зменшенні обсягу цитоплазми та появі ознак зниження секреторної активності (поява макули). Здатність відповідати на КП-

опосередковану стимуляцію була більш вираженою за дії НЧС, в той час як за впливу НЧЗ вона була нівельована (особливо у тварин 1-місячного віку). Враховуючи неузгодженість таких змін із результатами, отриманими при дослідженні гіпоталамічних нейроцитів, можна припустити наявність прямого впливу НЧ на активність гонадотропоцитів.

## РОЗДІЛ 5

### ВПЛИВ НАНОЧАСТИНОК ЗОЛОТА ТА СРІБЛА НА МОРФО- ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН СІМ'ЯНИКІВ ТВАРИН РІЗНОГО ВІКУ

#### 5.1. Морфо-функціональна характеристика сім'яників тварин 1-місячного віку різних експериментальних груп

Макроскопічно сім'яники щурів віком 1 місяць контрольної групи мали нормальний розмір, були світло-бежевого кольору та нормально розвинену судинну мережу. Мікроскопічно відмічали, що звивисті сім'яні канальці були округлими чи овальними на перерізі, з інтактною оболонкою та середнього розміру порожниною в центрі. Стінка складалась з 4-5 шарів клітин з малопомітними межами, серед яких були помітні всі елементи сперматогенного епітелію. У просвіті деяких канальців відмічали наявність морфологічно нормальних сперматозоїдів (рис. 5.1). Діаметр канальців складав  $234,77 \pm 3,06$  мкм.

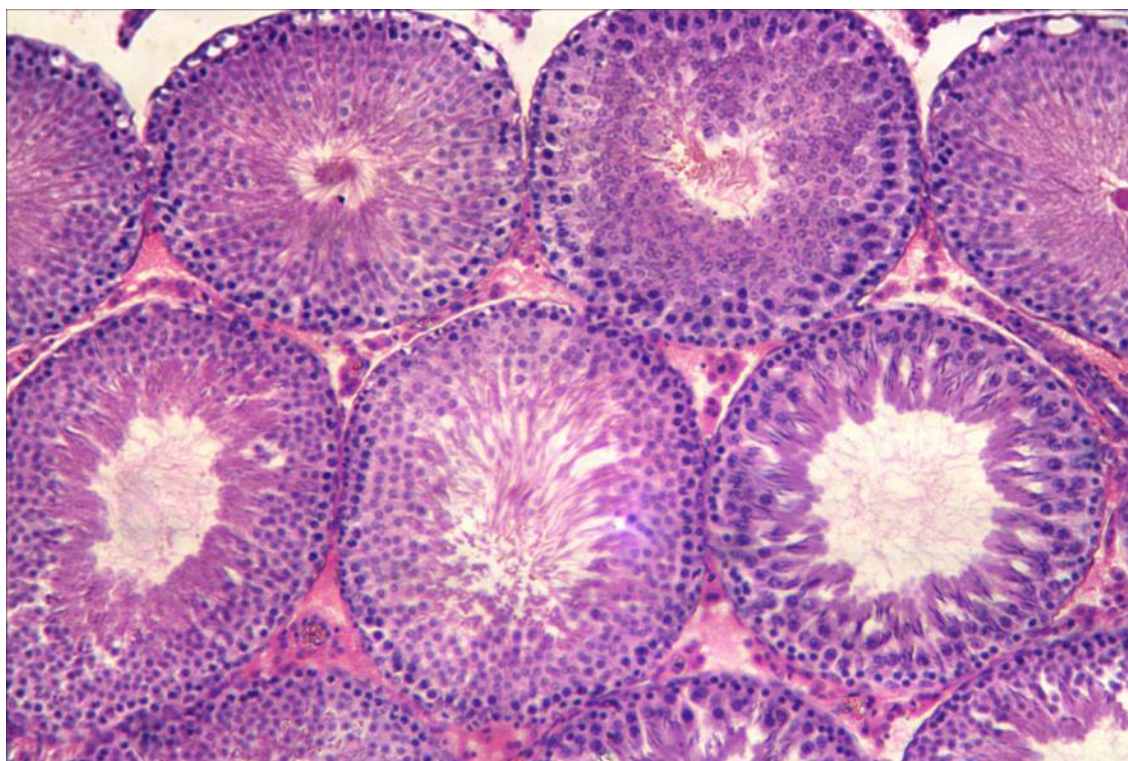


Рис. 5.1. Мікрофотографія сім'яника тварини віком 1 місяць контрольної групи. Забарвлення гематоксиліном Бемера та еозином, зб.  $\times 100$ .

Ядра клітин Сертолі розташовувались в базальній частині канальця, мали трикутну чи округлу форму. Було помітно невелику кількість гетерохроматину, а також, як правило, 1 ядерце. Площа перерізу ядер цих клітин становила  $46,85 \pm 1,56 \text{ мкм}^2$ .

Між звивистими канальцями розташовувались острівки інтерстиціальної тканини, де проходили кровоносні судини, а також розташовувались клітини Лейдіга. Ці клітини мали помірно оксифільну цитоплазму, межі між окремими клітинами часто були непомітні. Ядра клітин Лейдіга були овальної форми, заповнені невеликими глибокими гетерохроматину (рис. 5.2). Площа перерізу ядер цих клітин становила  $22,87 \pm 0,41 \text{ мкм}^2$ .

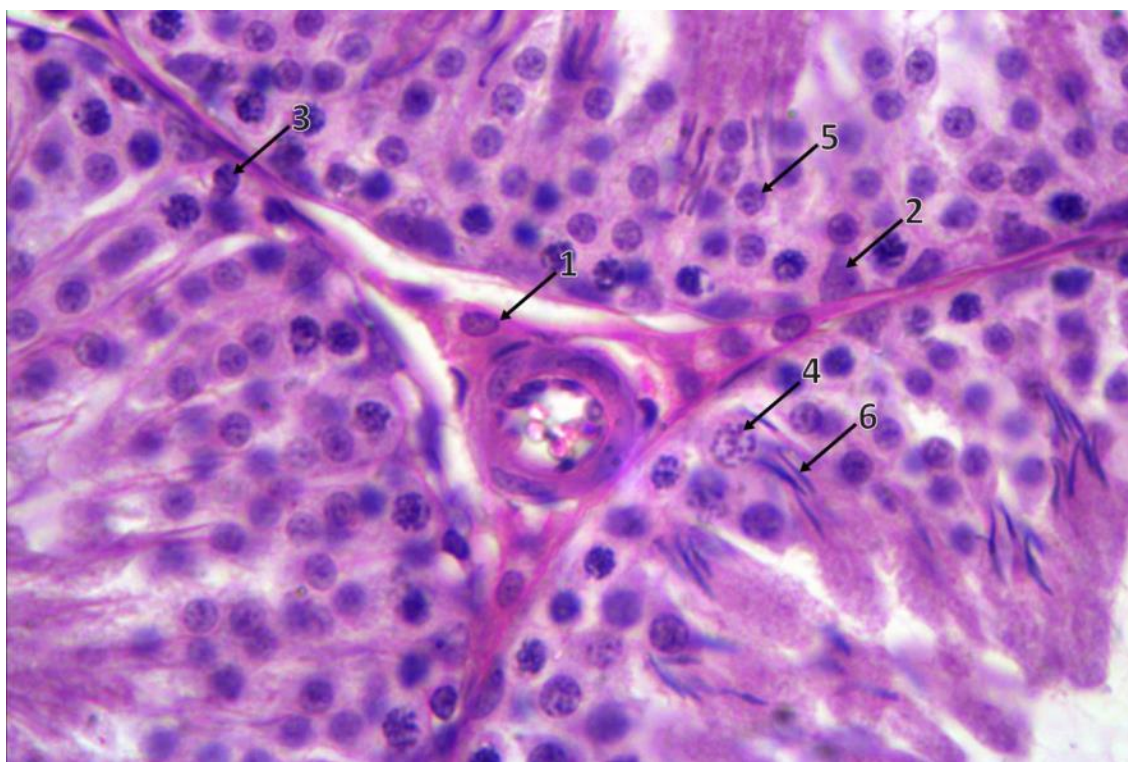


Рис. 5.2. Мікрофотографія сім'яника тварини віком 1 місяць контрольної групи. 1 – клітини Лейдіга, 2 – клітина Сертолі, 3 – сперматогонії, 4 – сперматоцити I порядку, 5 – круглі сперматиди, 6 – видовжені сперматиди. Забарвлення гематоксилином Бемера та еозином, зб.  $\times 100$ .

Ін'єкції розчину ПФН не призвели до появи в тканині гістопатологічних змін. Форма та організація звивистих сім'яних канальців залишались подібними до контрольних значень. Діаметр канальців становив  $233,75 \pm 2,32 \text{ мкм}$  (рис. 5.3).

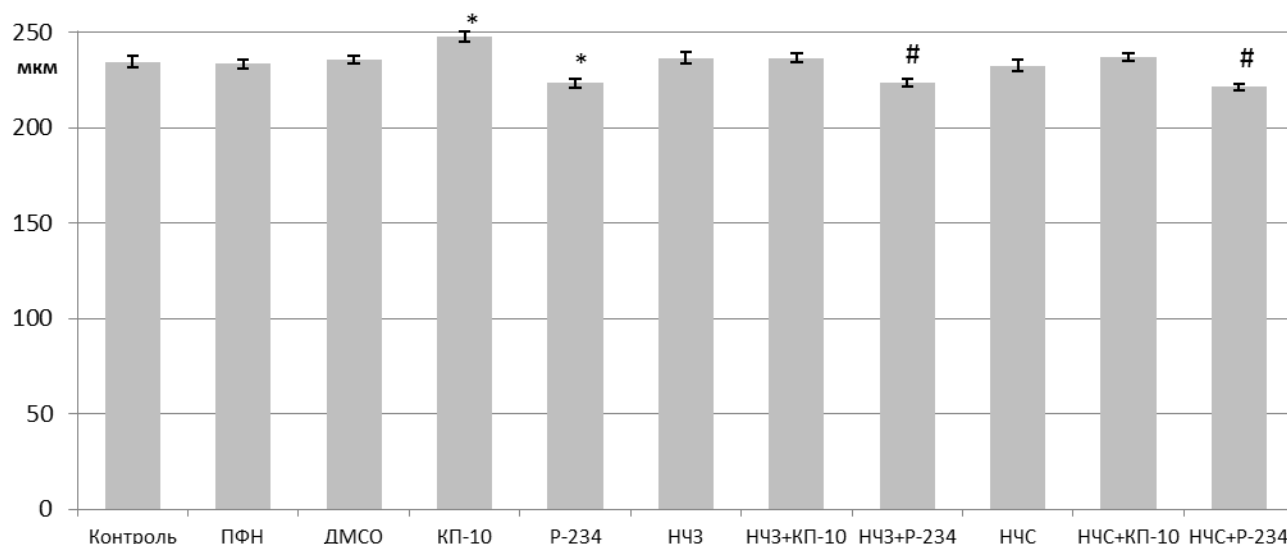


Рис. 5.3. Діаметр звивистих сім'яних каналців щурів віком 1 місяць.

Примітка: \* – різниця між контрольною та дослідною групою достовірна при  $p < 0,05$ ; # – різниця між групами «НЧЗ+КП-10», «НЧЗ+P-234», «НЧС+КП-10», «НЧС+P-234» та відповідною групою з введенням лише НЧЗ чи НЧС достовірна при  $p < 0,05$ .

Клітини Сертолі малі світлі ядра та форму, близьку до трикутної. Площа поперечного перерізу цих клітин становила  $46,43 \pm 1,30 \text{ мкм}^2$ . Організація інтерстиціальної тканини також була нормальною. В клітинах Лейдіга відмічали овальні ядра з одним ядерцем та рівномірно розподіленим гетерохроматином. Площа перерізу ядер цих клітин становила  $22,91 \pm 0,44 \text{ мкм}^2$ . Всі морфометричні показники групи «ПФН» не відрізняються від контрольних величин.

Макро- та мікроскопічна будова сім'яників тварин групи «ДМСО» відповідає контрольним значенням. Діаметр звивистих сім'яних каналців в даній групі становив  $235,82 \pm 2,34 \text{ мкм}^2$ . Не відрізнялась і будова стінки каналців, а також загальна морфологія клітин Сертолі, площа перерізу ядер яких становила  $45,20 \pm 1,36 \text{ мкм}^2$ . В інтерстиціальній тканині спостерігали нормальне розташування кровоносних судин та клітини Лейдіга з помірно оксифільною цитоплазмою. Площа перерізу ядер цих клітин становила  $22,53 \pm 0,42 \text{ мкм}^2$ . Таким чином, сім'яники тварин даної групи за всіма параметрами відповідають контрольним зразкам.

Звивисті сім'яні канальці тварин групи «КП-10» були округлої чи овальної форми. Хоча кількість шарів клітин в стінці канальця відповідала контрольним показникам, візуально спостерігали збільшення інтратубулярного просвіту. Діаметр канальців даної групи становив  $247,91 \pm 2,54$  мкм, що достовірно вище за контрольні значення.

В клітинах Лейдіга відмічали зменшення оксифільності цитоплазми – в деяких клітинах цитоплазма була неоднорідною, з наявністю невеликих світлих зон. Зросла кількість клітин з округлими світлими ядрами, в яких містилось по 1-2 ядерця. Зменшилась кількість пристінкового гетерохроматину (рис. 5.4). Площа перерізу ядер клітин Лейдіга становила  $24,96 \pm 0,46$  мкм<sup>2</sup>, що достовірно перевищує показники групи «Контроль».

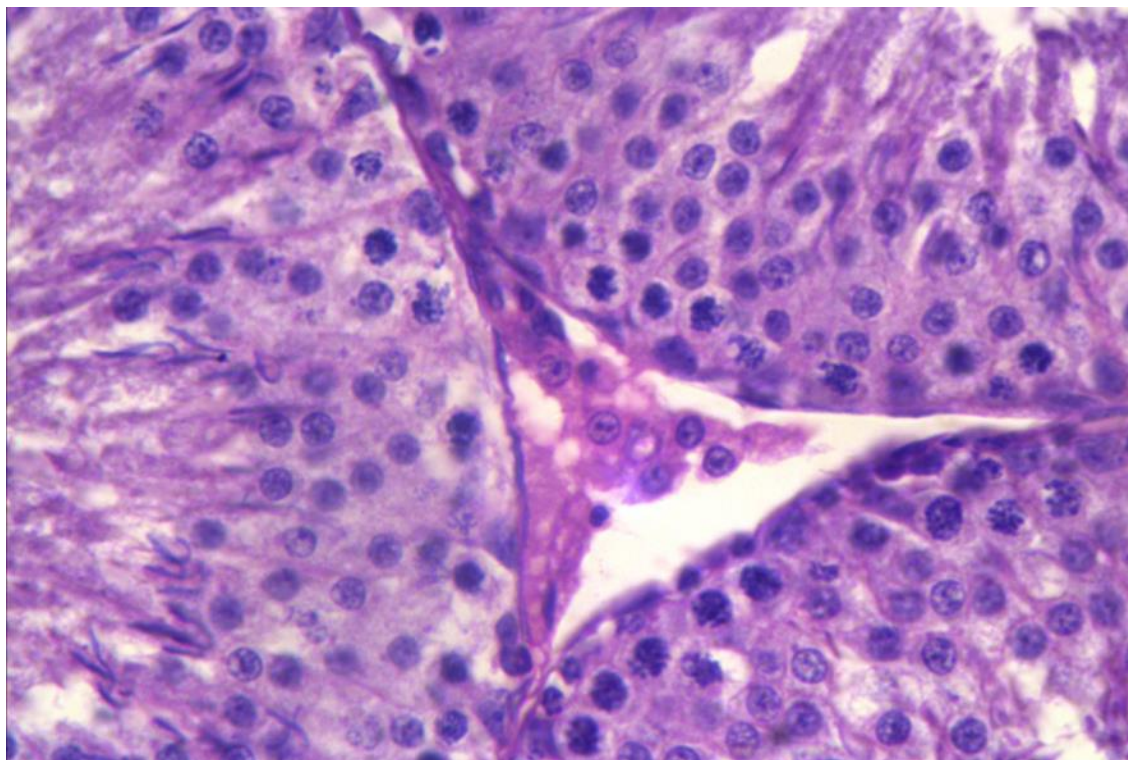


Рис. 5.4. Мікрофотографія сім'яника тварини віком 1 місяць групи «КП-10». Забарвлення гематоксиліном Бемера та еозином, зб.  $\times 400$ .

Клітини Сертолі мали більш виражено трикутні ядра, з чітко окресленим ядерцем. Хоча вказані ядра були широкими в базальній частині, апікальна частина ядра знаходилась вище, ніж в контрольних зразках. Площа перерізу ядер клітин

Сертолі становила  $49,96 \pm 1,37 \text{ мкм}^2$ , що достовірно більше за відповідний параметр контрольної групи.

Наведені особливості морфології у поєднанні із даними морфометричного аналізу свідчать про підвищення функціональної активності сім'яників 1-місячних тварин за дії КП-10.

При аналізі будови сім'яників щурів 1-місячного віку, які отримували ін'єкції Р-234 одночасно із введенням фізіологічного розчину, було встановлено, що звивисті сім'яні канальці були переважно круглими, з помірним просвітом. Діаметр канальців складав  $223,52 \pm 2,46 \text{ мкм}$ , що достовірно менше за контрольні значення. Водночас, було помічено розвиток змін в будові стінки канальців. Так, подекуди порушувався порядок розташування клітин – інколи пахітентні сперматоцити I порядку розташовувались над видовженими сперматидами. Водночас, в базальних та середніх частинах стінки з'являлись дегенеруючі сперматоцити та сперматиди, які мали вигляд інтенсивно базофільних тілець округлої чи неправильної форми. В деяких з них було помітно залишки пікнотичного ядра (рис. 5.5). Наведені ознаки часто спостерігаються при зниженні рівня тестостерону в сім'яниках [243].

В інтерстиціальній тканині відмічали ущільнення цитоплазми клітин Лейдіга. Зростала кількість клітин з деформованими та пікнотичними ядрами. Більшість ядер клітин Лейдіга мали овальну форму та були помірно базофільно забарвлені. Площа перерізу даних структур становила  $21,01 \pm 0,40 \text{ мкм}^2$ , що достовірно менше за результат контрольної групи.

Апікальна частина ядер клітин Сертолі була округлою, а самі вони були ширшими. Зростала кількість гетерохроматину. Площа перерізу цих ядер становила  $46,50 \pm 1,15 \text{ мкм}^2$ , що не відрізняється від аналогічного параметру групи «Контроль».

Звивисті сім'яні канальці тварин групи «НЧЗ» були округлими, з середнього розміру просвітом. Окрім канальців нормальної будови, виявляли також поодинокі зморщені, в яких був повністю відсутній просвіт. Середній діаметр

каналъців складав  $236,77 \pm 2,79$  мкм, що відповідає результатам контрольної групи. В сім'яниках також виявляли дегенерацію сперматоцитів.

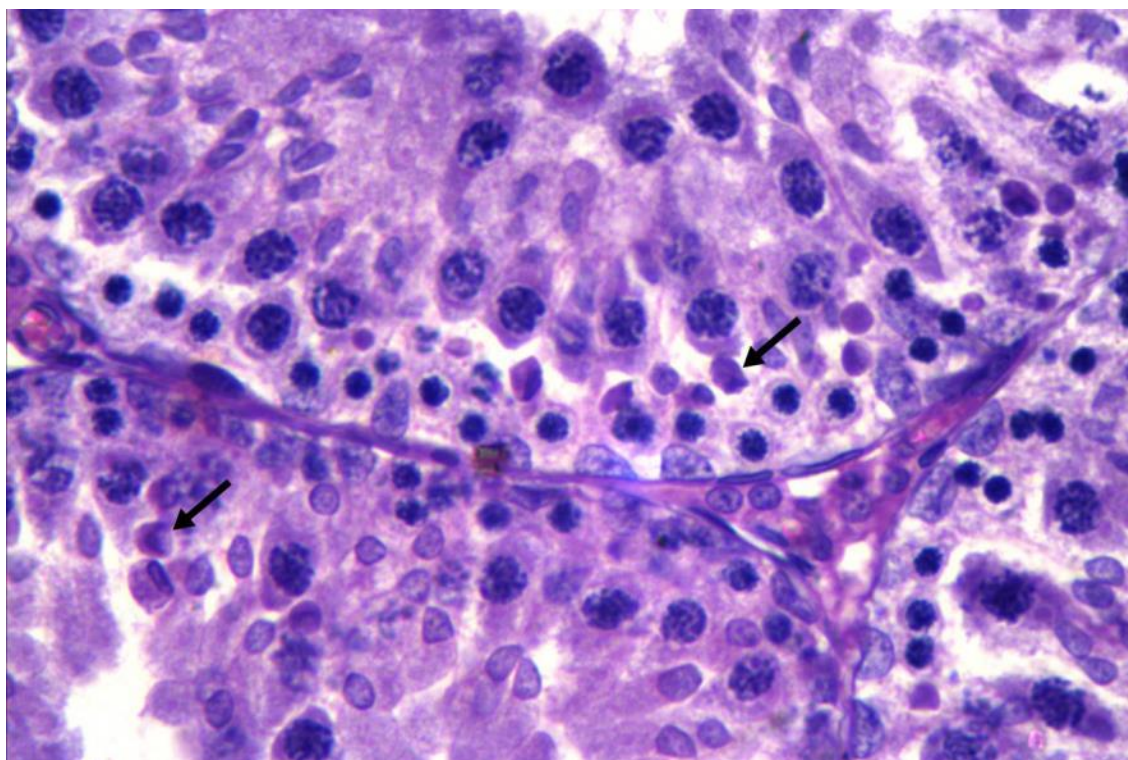


Рис. 5.5. Мікрофотографія сім'яника тварини віком 1 місяць групи «Р-234». Стрілкою позначено дегенеровані елементи сперматогенного епітелію. Забарвлення гематоксилином Бемера та еозином, зб.  $\times 400$ .

Ядра клітини Сертолі розташовувались близько до базальної мембрани, були переважно округлими, рідше трикутними з округлою апікальною частиною. Одне ядерце було помітно у більшості ядер. Площа поперечного перерізу становила  $45,24 \pm 1,40$  мкм<sup>2</sup>, що не відрізняється від показників контролю.

В інтерстиціальній тканині спостерігали зростання гетерогенності клітин Лейдіга – були присутні як клітини з округлими світлими ядрами, так і з темними овальними зменшеними. Цитоплазма була помірно оксифільною. Площа перерізу ядер цих клітин становила  $21,98 \pm 0,35$  мкм<sup>2</sup>, що достовірно менше за контрольне значення (рис. 5.6).

Будова звивистих сім'яних каналъців тварин групи «НЧЗ+КП-10» загалом відповідала гістологічній організації тварин, які отримували лише ін'єкції нанорозмірного золота. Більшість каналъців мали нормальну будову, хоча

спостерігали й поодинокі зморщені. В стінці окремих каналців виявляли дегенеруючі сперматиди та сперматоцити. Діаметр каналців становив  $236,71 \pm 2,43$  мкм, що не відрізняється від групи «НЧЗ».

Ядра клітин Сертолі були округлими, помірно базофільними з одним ядерцем та дифузно розподіленими глибокими гетерохроматину. Площа їхнього поперечного перерізу становила  $43,67 \pm 1,26$  мкм<sup>2</sup>, що відповідає показникам групи «НЧЗ».

Клітини Лейдіга мали помірно оксифільну цитоплазму. В деяких острівцях спостерігали переважання клітин з круглими світлими ядрами, в той час як в інших знаходились переважно клітини Лейдіга з темними овальними ядрами. Площа перерізу ядер становила  $19,74 \pm 0,33$  мкм<sup>2</sup>, що достовірно менше за відповідний параметр тварин, які отримували лише ін'єкції НЧЗ.

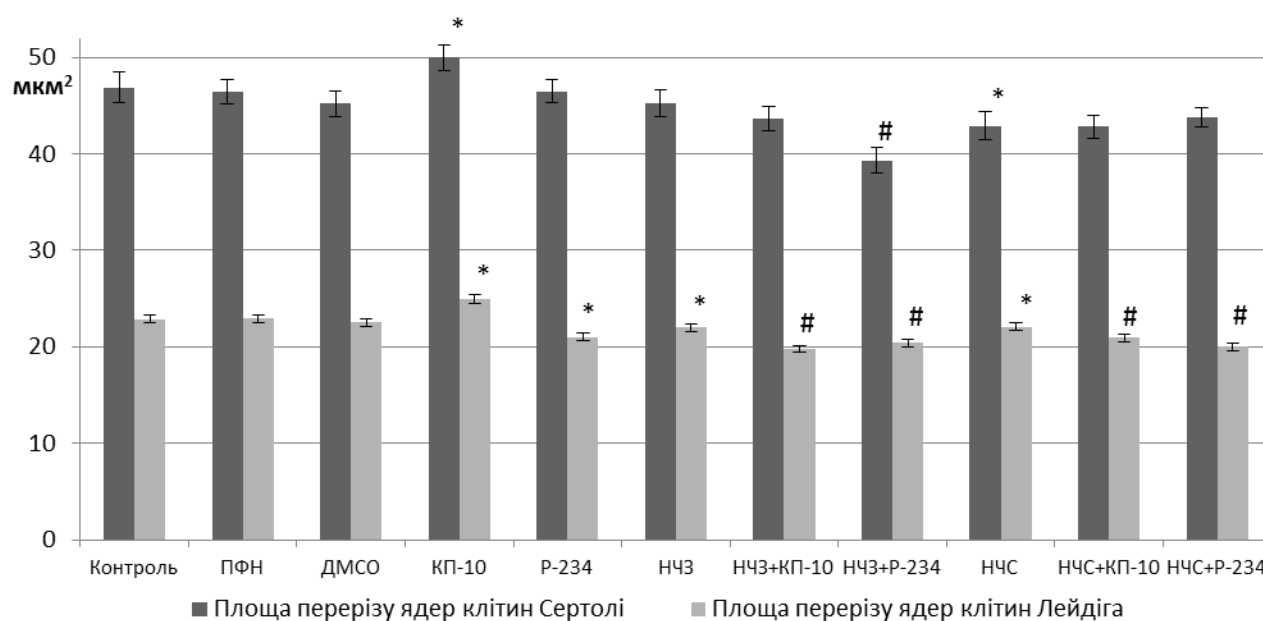


Рис. 5.6. Площа поперечного перерізу ядер клітин Сертолі та клітин Лейдіга щурів віком 1 місяць.

Примітка: \* – різниця між контрольною та дослідною групою достовірна при  $p < 0,05$ ; # – різниця між групами «НЧЗ+КП-10», «НЧЗ+Р-234», «НЧС+КП-10», «НЧС+Р-234» та відповідною групою з введенням лише НЧЗ чи НЧС достовірна при  $p < 0,05$ .

В сім'яниках тварин, яким одночасно вводили НЧЗ та Р-234 спостерігали наявність округлих звивистих сім'яних каналців, серед яких знаходились поодинокі зморщені. В стінці каналців відмічали наявність дегенерованих сперматоцитів та сперматид. Окрім того, як в просвіті, так і в базальній частині деяких каналців спостерігали злиття окремих круглих сперматид в гігантські багатоядерні клітини (рис. 5.7). Присутність цих клітин свідчить про різноманітні порушення ходу сперматогенезу [243]. Діаметр каналців становив  $223,51 \pm 2,11$  мкм, що достовірно менше за показник групи «НЧЗ».

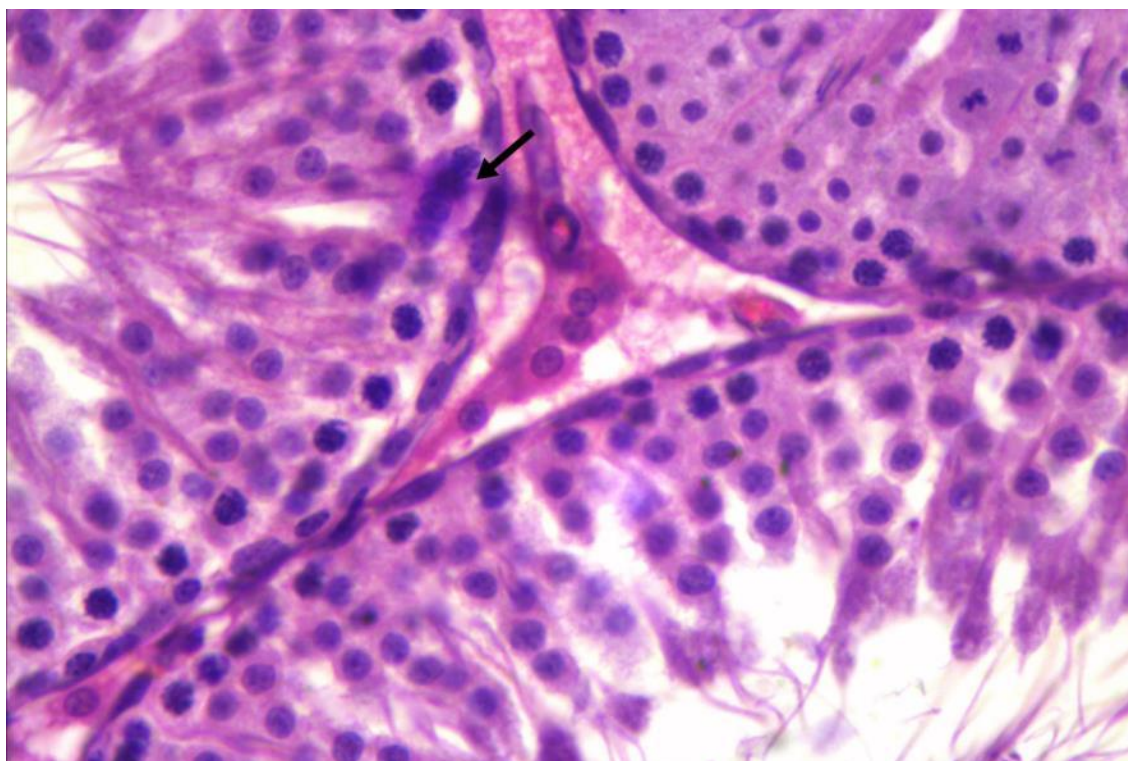


Рис. 5.7. Мікрофотографія сім'яника тварини віком 1 місяць групи «НЧЗ+Р-234». Стрілкою позначено гігантську багатоядерну клітину. Забарвлення гематоксилином Бемера та еозином, зб.  $\times 400$ .

Ядра клітин Сертолі були овальними, майже плоскими, інтенсивно забарвленими, темними. Площа перетину цих ядер становила  $39,33 \pm 1,33$  мкм<sup>2</sup>, що достовірно менше від аналогічного показника тварин, які отримували лише ін'єкції розчину нанорозмірного золота.

В інтерстиціальній тканині спостерігали компактизацію цитоплазми клітин Лейдіга. Їхні ядра були порівняно невеликими, переважно овальними, з 1-2

ядерцями. Площа перерізу ядер клітин Лейдіга становила  $20,38 \pm 0,44$  мкм<sup>2</sup>, що достовірно менше за показник групи «НЧЗ».

Гістологічна будова тварин групи «НЧС» була подібною до результатів групи «НЧЗ». Серед нормальних округлих каналців, з невеликим просвітом, зустрічались поодинокі зморщені. В стінці подекуди виявляли дегенерацію сперматоцитів. Діаметр каналців становив  $232,66 \pm 2,97$  мкм, що не відрізняється від контрольних величин.

Ядра клітин Сертолі були овальними, сплющеними, інтенсивно забарвленими. В деяких ядрах ядерця були слабо помітні. Площа перерізу ядер цих клітин становила  $42,89 \pm 1,49$  мкм<sup>2</sup>, що достовірно менше за контрольні показники.

В інтерстиціальній тканині спостерігали морфологічну гетерогенність клітин Лейдіга. Відмічали відносне зростання кількості клітин з деформованими, гіперхромними та пікнотичними ядрами. Також відмічали достовірне зменшення площі перерізу ядер клітин Лейдіга – до  $22,09 \pm 0,36$  мкм<sup>2</sup>.

Звивисті сім'яні каналці тварин, які отримували ін'єкції КП-10 при одночасних внутрішньоочеревинних введеннях НЧС були переважно округлими, з невеликим просвітом. Водночас, окрім каналців нормальної будови та поодиноких зморщених, в тканині сім'яника спостерігали локальну дегенерацію сперматогенного епітелію. В таких каналцях фіксували наявність лише клітин Сертолі, сперматогоній, сперматоцитів та поодиноких сперматид. В цих клітинних елементах (в першу чергу сперматоцитах) також реєстрували дегенеративні зміни (рис 5.8). Діаметр каналців цієї групи складав  $236,97 \pm 2,00$  мкм, що не відрізняється від аналогічного показнику в групі тварин, яким вводили лише розчин нанорозмірного срібла.

Ядра клітин Сертолі були переважно овальними, зрідка округлими. Іноді вони мали зморшкуватий вигляд. Забарвлювались ці ядра інтенсивно базофільно. Площа їхнього поперечного перерізу становила  $42,80 \pm 1,15$  мкм<sup>2</sup>, що не відрізняється від групи «НЧС».

В інтерстиціальній тканині спостерігали водночас як клітини з округлими, порівняно світлими ядрами, так і численні зморщені, пікнотичні чи просто зменшені ядра. В деяких ядрах спостерігали компактизацію гетерохроматину. Площа перерізу ядер клітин Лейдіга становила  $20,91 \pm 0,39 \text{ мкм}^2$ , що достовірно менше за показник групи «НЧС».

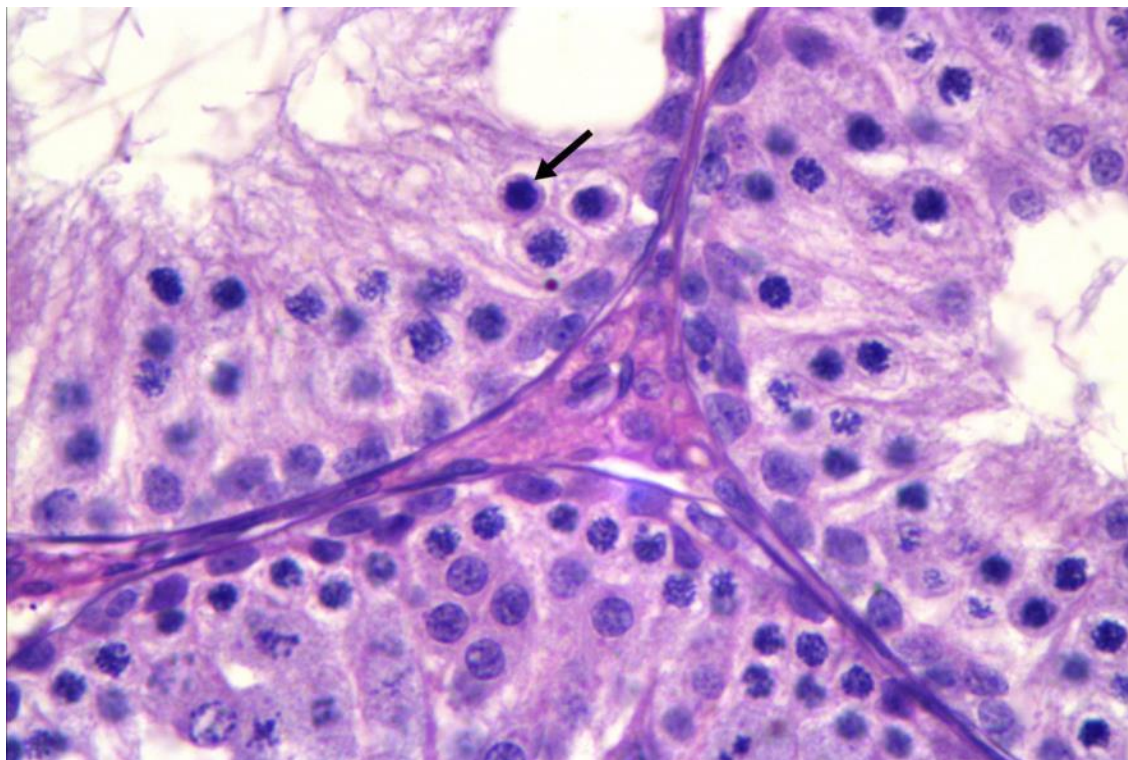


Рис. 5.8. Мікрофотографія сім'яника тварини віком 1 місяць групи «НЧС+КП-10». У верхньому та правому каналцях спостерігається дегенерація сперматогенного епітелію. Стрілкою позначено дегенеровані сперматоцити. Забарвлення гематоксиліном Бемера та еозином, зб.  $\times 400$ .

В сім'яниках тварин групи «НЧС+Р-234» виявляли як округлі каналці нормальної будови, так і поодинокі зморшкуваті. В стінці деяких каналців відмічали наявність як дегенерованих сперматоцитів I порядку, так і патологічно змінених сперматид. Ядра цих клітин, на відміну від нормальних круглих, були деформованими, зморшкуватими, гіперхромними. Часто не вдавалось розрізнити ядрце чи окремі глибоки гетерохроматину (рис. 5.9). Діаметр каналців даної групи становив  $221,95 \pm 1,62 \text{ мкм}$ , що достовірно менше за відповідний морфометричний параметр групи «НЧС».

Ядра клітин Сертолі були гіперхромними, часто без вираженого ядерця. Ядра були переважно овальної форми, сильно сплюснені. Площа їхнього поперечного перерізу становила  $43,81 \pm 0,98 \text{ мкм}^2$ , що не відрізняється від групи «НЧС».

В інтерстиціальній тканині, так само як і в інших групах з внутрішньоочеревинним введенням нанорозмірного срібла, відмічали наявність морфологічної гетерогенності будови клітин Лейдіга. Так само частина клітин мала зменшені овальні гіперхромні ядра та інтенсивно забарвлену цитоплазму. Площа перерізу ядер клітин Лейдіга цієї групи становила  $19,98 \pm 0,40 \text{ мкм}^2$ , що достовірно менше, ніж в групі «НЧС».

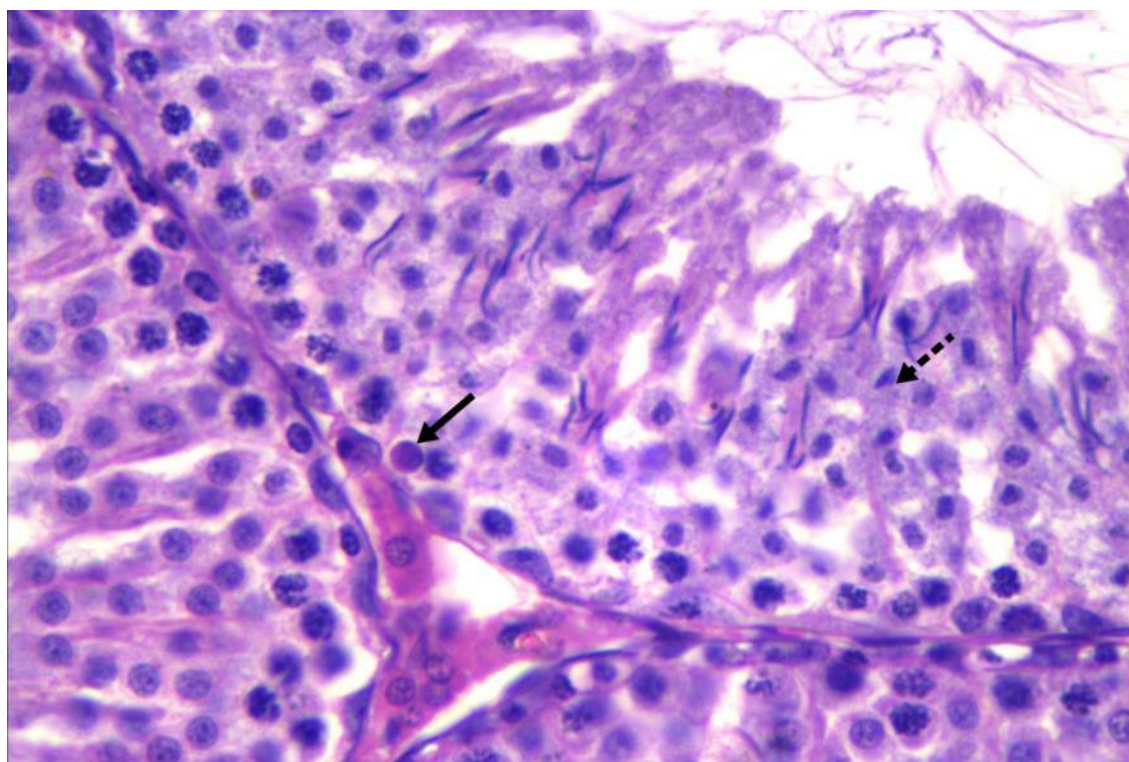


Рис. 5.9. Мікрофотографія сім'яника тварини віком 1 місяць групи «НЧС+Р-234». Дегенеровані сперматоцити позначено звичайною стрілкою, сперматиди – пунктирною. Забарвлення гематоксилином Бемера та еозином, зб.  $\times 400$ .

## 5.2. Морфо-функціональна характеристика сім'яників тварин 6-місячного віку різних експериментальних груп

Сім'яники щурів віком 6 місяців всіх експериментальних груп були нормального розміру, світло-бежевого кольору. Ушкоджень чи новоутворень виявлено не було.

Звивисті сім'яні канальці тварин контрольної групи були круглими чи овальними, з добре розвиненим інтратубулярним простором. Стінка канальців складалась з 4-5 шарів клітин, а всередині багатьох з них було виявлено морфологічно нормальні сперматозоїди (рис. 5.10). Діаметр звивистих сім'яних канальців становив  $282,83 \pm 3,84$  мкм.

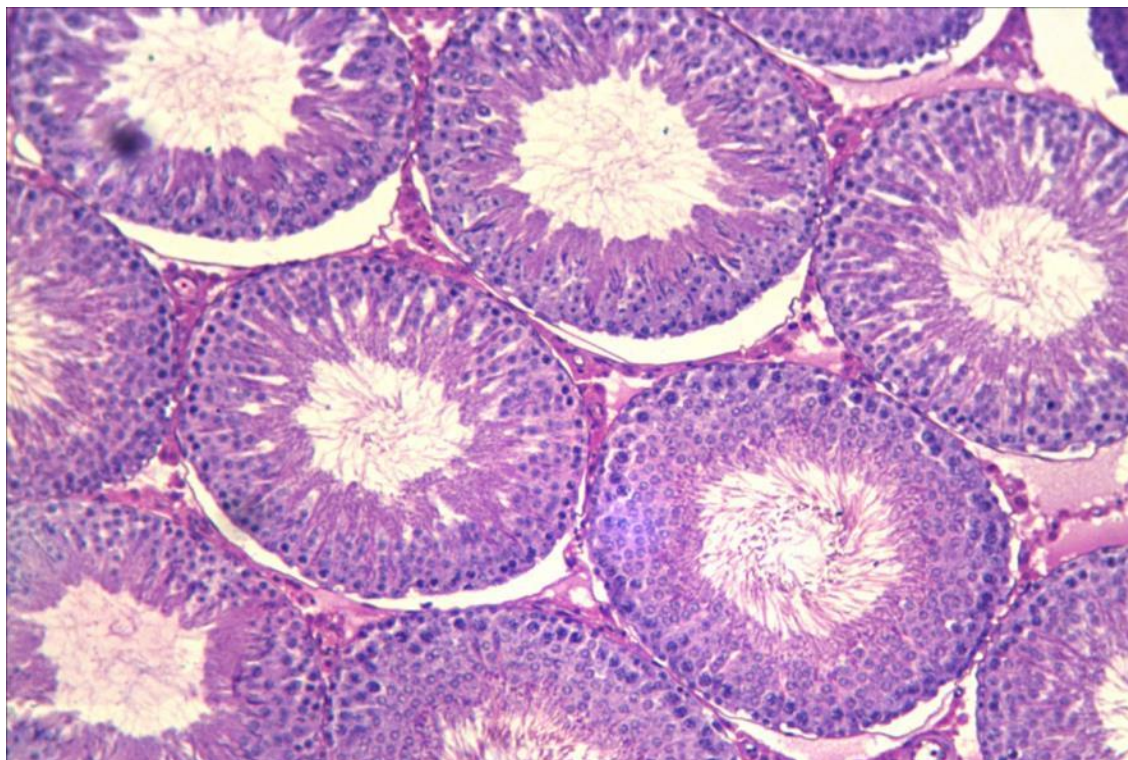


Рис. 5.10. Мікрофотографія сім'яника тварини віком 6 місяців контрольної групи. Забарвлення гематоксиліном Бемера та еозином, зб.  $\times 100$ .

Ядра клітин Сертолі мали трикутну форму з чітко окресленим ядрцем (рис. 5.11). Деякі з ядер були овальними і розташовувались своєю довгою віссю перпендикулярно до стінки канальця. Площа поперечного перерізу ядер клітин Сертолі становила  $67,17 \pm 1,94$  мкм<sup>2</sup>.

Інтерстиціальна тканина була представлена численними клітинами Лейдіга, які мало помірно чи слабко оксифільну цитоплазму та переважно круглі ядра з одним-двома ядерцями. Ці клітини розташовувались навколо кровоносних судин нормальної будови, в порожнині яких було помітно невелику кількість еритроцитів. Площа поперечного перерізу ядер клітин Лейдіга становила  $25,34 \pm 0,64 \text{ мкм}^2$ .

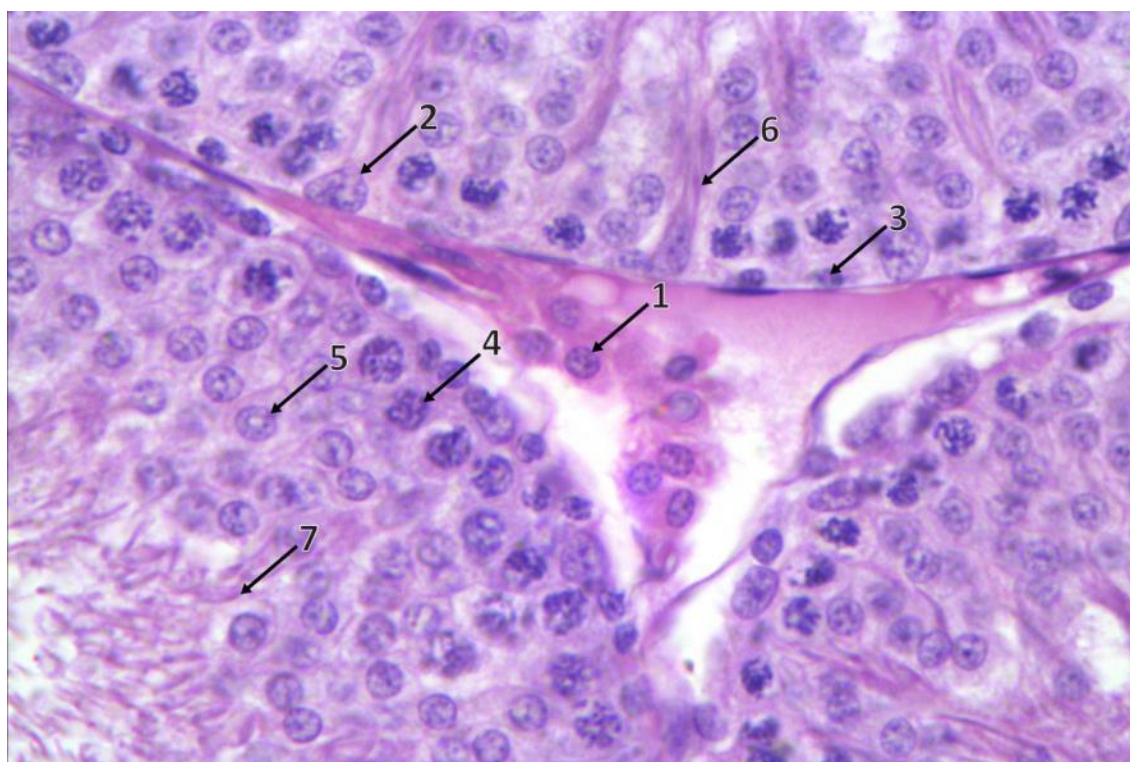


Рис. 5.11. Мікрофотографія сім'яника тварини віком 1 місяць контрольної групи. 1 – клітини Лейдіга, 2 – клітини Сертолі, 3 – сперматогонії, 4 – сперматоцити I порядку, 5 – круглі сперматиди, 6 – видовжені сперматиди, 7 – сперматозоїди. Забарвлення гематоксиліном Бемера та еозином, зб.  $\times 100$ .

Будова звивистих сім'яних канальців щурів, яким впродовж 10 діб внутрішньоочеревинно вводили ПФН, була аналогічною до контролю. Канальці на перерізі були округлими, з нормальної будови сперматозоїдами. Патологічних змін в організації сперматогенного епітелію виявлено не було. Діаметр канальців становив  $282,13 \pm 3,97 \text{ мкм}$ , що не відрізняється від контрольних значень.

Ядра клітин Сертолі були трикутними чи полігональними. В середині ядер ідентифікували помірну кількість гетерохроматину та одне ядерце (рис. 5.12).

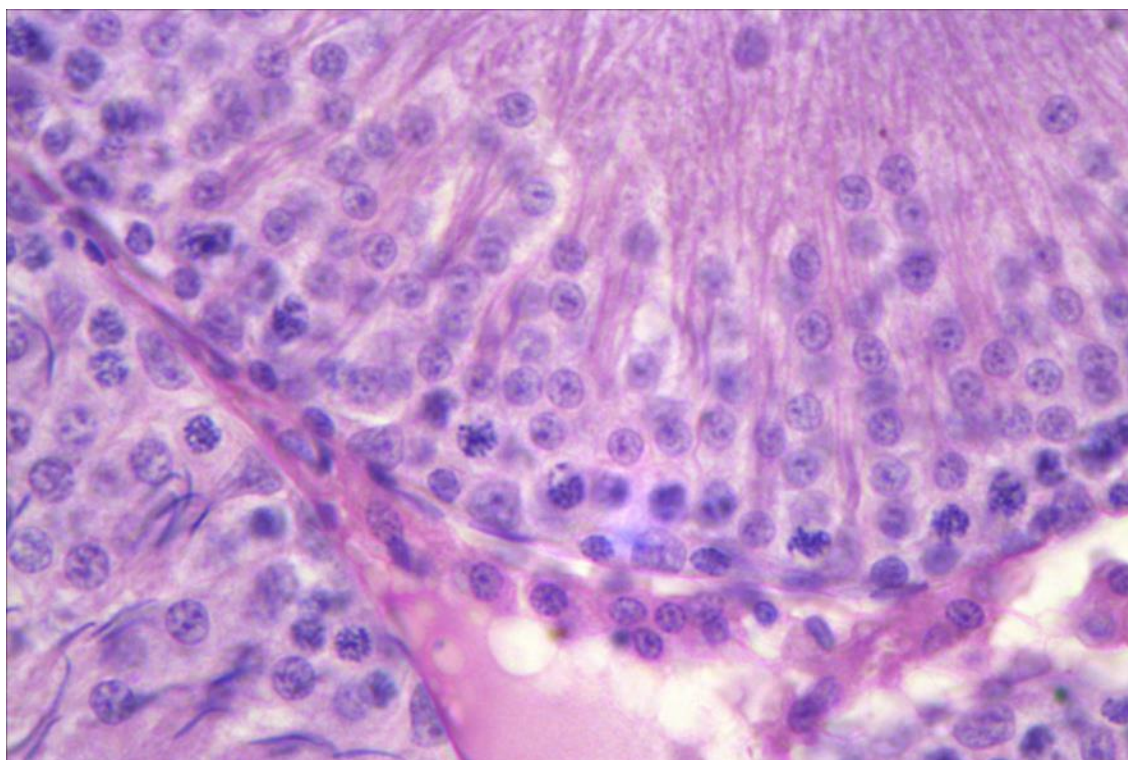


Рис. 5.12. Мікрофотографія сім'яника тварини віком 6 місяців групи «ПФН». Забарвлення гематоксиліном Бемера та еозином, зб.  $\times 400$ .

Площа поперечного перерізу ядер клітин Сертолі становила  $67,84 \pm 2,06 \text{ мкм}^2$ , що також відповідає контрольним показникам.

Острівці інтерстиціальної тканини були представлені клітинами Лейдіга з оксифільною цитоплазмою та округлими ядрами. В ядрах глибокими розташовувався гетерохроматин та часто спостерігали невелике ядерце. площа перерізу цих ядер становила  $25,45 \pm 0,46 \text{ мкм}^2$ .

Будова сім'яників тварин групи «ДМСО» була подібною до контрольних зразків. Звивисті сім'яні канальці переважно круглі, з добре вираженим люменом. Діаметр канальців складав  $282,46 \pm 2,95 \text{ мкм}$ , що не відрізняється від показників групи «Контроль» (рис. 5.13). Мікроскопічна організація стінки канальців відповідала нормі, без наявності патологічних змін.

Клітини Сертолі мали переважно трикутні ядра, з невеликою кількістю пристінкового гетерохроматину та великим чітким ядерцем. Площа перерізу ядер клітин Сертолі становила  $67,75 \pm 1,37 \text{ мкм}^2$ , що не відрізняється від контрольної величини.

Клітини Лейдига загалом також були схожими на аналогічні клітини контрольної групи. Ядра круглі чи овальні, як правило з 1 ядерцем. Цитоплазма помірно оксифільна. Площа перерізу ядер складала  $24,87 \pm 0,52 \text{ мкм}^2$ . Достовірних відмінностей від контролю не зафіксовано.

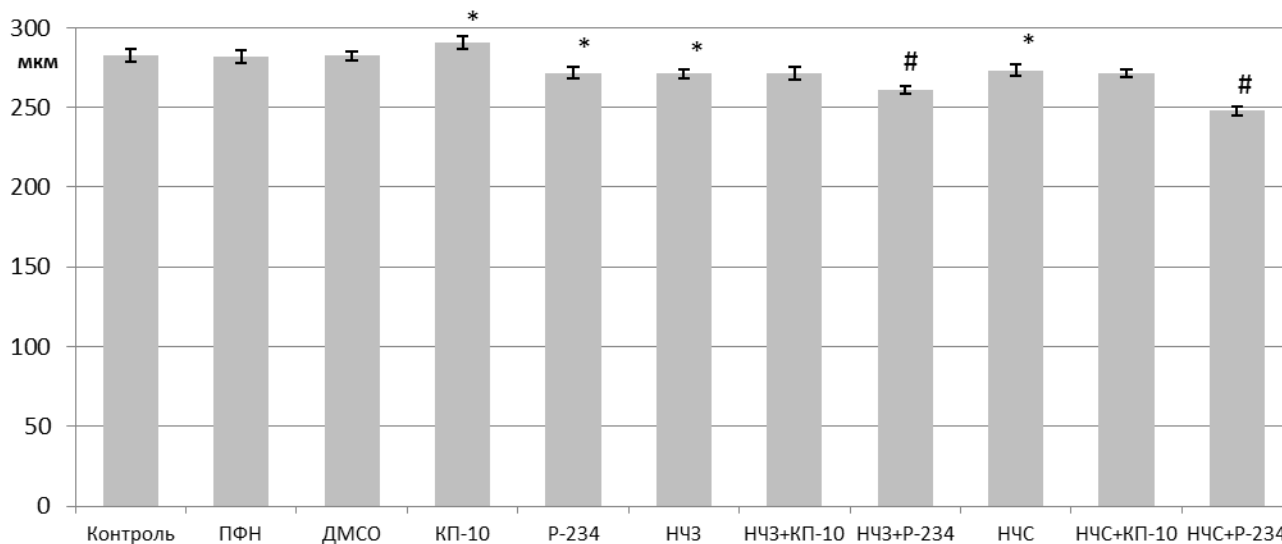


Рис. 5.13. Діаметр звивистих сім'яних канальців щурів віком 6 місяців.

Примітка: \* – різниця між контрольною та дослідною групою достовірна при  $p < 0,05$ ; # – різниця між групами «НЧЗ+КП-10», «НЧЗ+P-234», «НЧС+КП-10», «НЧС+P-234» та відповідною групою з введенням лише НЧЗ чи НЧС достовірна при  $p < 0,05$ .

Ін'єкції КП-10 на тлі введення фізіологічного розчину призвели до достовірного збільшення діаметру звивистих сім'яних канальців до  $290,48 \pm 3,89 \text{ мкм}^2$ . При цьому морфологічно канальці виглядали світлішими, збільшувались проміжки між клітинами в центральних шарах видовжених сперматид. Патологічних змін сперматогенного епітелію виявлено не було.

Клітини Сертолі виглядали подібно до контрольних. Втім, збільшилась кількість овальних ядер з вузькою базальною «осною», які розташовувались перпендикулярно до стінки канальця. Ядра виглядали світлими, з невеликою кількістю гетерохроматину та чітким ядерцем. Однак достовірних відмінностей в площі поперечного перерізу ядер ( $69,96 \pm 1,56 \text{ мкм}^2$ ) виявлено не було (рис. 5.14).

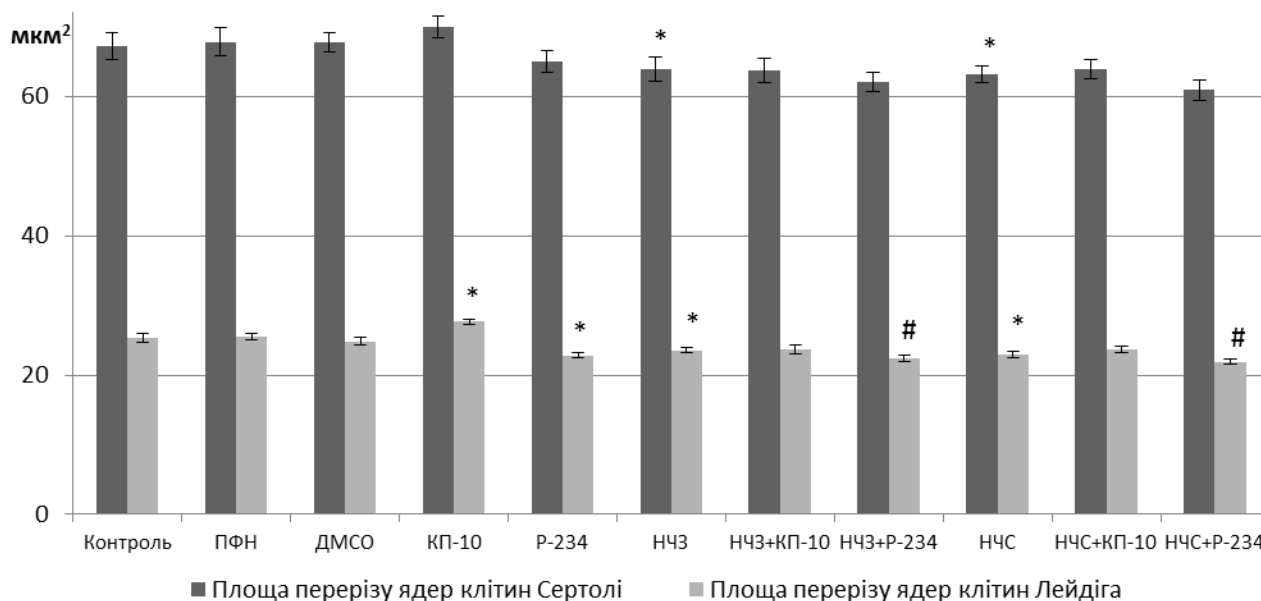


Рис. 5.14. Площа поперечного перерізу ядер клітин Сертолі та клітин Лейдіга щурів віком 6 місяців.

Примітка: \* – різниця між контрольною та дослідною групою достовірна при  $p < 0,05$ ; # – різниця між групами «НЧЗ+КП-10», «НЧЗ+P-234», «НЧС+КП-10», «НЧС+P-234» та відповідною групою з введенням лише НЧЗ чи НЧС достовірна при  $p < 0,05$ .

Серед клітин Лейдіга зрослі частка клітин з округлими світлими ядрами. Клітини з овальними ядрами та глибоким гетерохроматином також були присутні, хоча й в меншій кількості. Цитоплазма багатьох клітин була слабко оксифільною. Площа поперечного перерізу ядер клітин Лейдіга достовірно збільшилась до  $27,64 \pm 0,44$  мкм<sup>2</sup>.

Звивисті сім'яні канальці тварин групи «P-234» були достовірно вужчими, ніж у контролі – діаметр складав  $271,76 \pm 3,47$  мкм. При цьому форма канальців залишалась округлою, але серед сперматогенних клітин було відмічено появу ознак дегенерації сперматоцитів. Морфологія інших клітин цього диферону залишалась в межах норми.

Ядра клітин Сертолі в цій групі були округлими або полігональними. Загалом ядра були нижчими, ніж у контрольних зразках, і витягувались вздовж

оболонки каналця. Площа перетину ядер складала  $65,05 \pm 1,55 \text{ мкм}^2$ , що не відрізняється від величини контролю.

В острівках інтерстиціальної тканини спостерігали зростання гетерогенності морфології ядер клітин Лейдіга – зростала кількість клітин з маленькими гіперхромними ядрами та однорідною оксифільною цитоплазмою. Середня площа перерізу ядер складала  $22,76 \pm 0,36 \text{ мкм}^2$ , що достовірно нижче за контроль.

Морфологічні особливості сім'яників щурів 6-місячного віку групи «НЧЗ» були подібними до зразків групи «Р-234». Так само спостерігали нормальної форми звивисті каналці, в яких, однак, були присутні дегенеровані сперматоцити I та II порядків, рідше – круглі сперматиди. Відмінностей в інших сперматогенних клітинах не було виявлено. Діаметр каналців в цій групі складав  $271,12 \pm 2,78 \text{ мкм}$ , що достовірно менше за контрольні значення.

Ядра клітин Сертолі містили помірну кількість гетерохроматину, який розташовувався по всьому об'єму ядра. Деякі ядра були деформованими, а ядерця в них – слабо вираженими. площа поперечного перерізу ядер складала  $63,88 \pm 1,67 \text{ мкм}^2$ , що достовірно менше аналогічного параметру контрольної групи.

В інтерстиціальній тканині спостерігали зростання кількості клітин з пікнотичними чи деформованими ядрами. У більшості клітин ядерце було слабо виражене, а кількість гетерохроматину, в тому числі пристінкового, зростала. Ядра клітин Лейдіга були достовірно меншими, аніж в контролі – площа перерізу складала  $23,57 \pm 0,38 \text{ мкм}^2$ .

Сім'яні каналці тварин, які отримували одночасні ін'єкції НЧЗ та КП-10 за загальними особливостями будови були схожі на зразки групи НЧЗ. Так, в каналцях було виявлено поодинокі дегенеровані сперматоцити та сперматиди. Також в просвіті деяких каналців фіксували появу велетенських багатоядерних клітин (рис. 5.15). Діаметр звивистих сім'яних каналців даної групи становив  $271,32 \pm 4,26 \text{ мкм}$ , що не відрізняється від показників групи «НЧЗ».

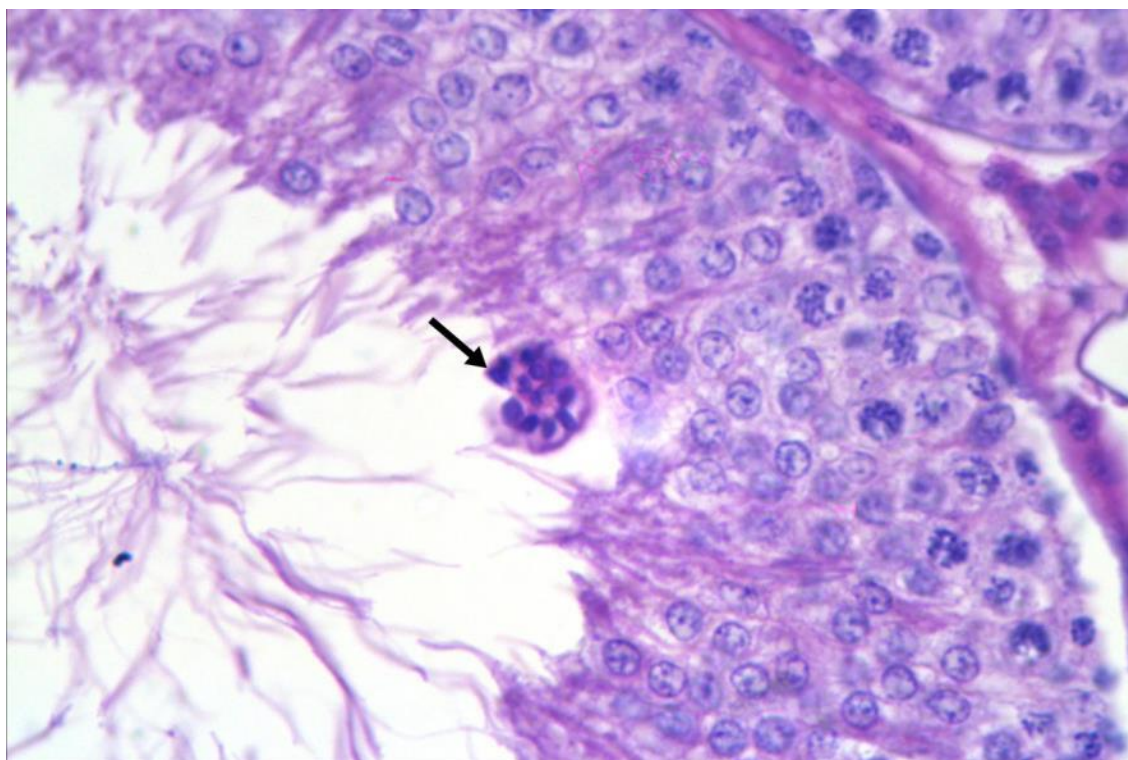


Рис. 5.15. Мікрофотографія сім'яника тварини віком 6 місяців групи «НЧЗ+КП-10». Стрілкою позначено багатоядерну клітину. Забарвлення гематоксилином Бемера та еозином, зб.  $\times 400$ .

Ядра клітин Сертолі були трикутними чи полігональними. Ядерце часто не було помітно, або воно було слабо виражене. Деякі з ядер були деформованими, мали численні інвагінації ядерної мембрани. Площа перерізу ядер становила  $63,72 \pm 1,70 \text{ мкм}^2$ , що не відрізняється від групи «НЧЗ».

В інтерстиціальній тканині спостерігали наявність як типових клітин Лейдіга, так і клітин з деформованими, гіперхромними чи просто малими ядрами. При цьому в деяких клітинах спостерігали неоднорідне забарвлення цитозолу, що проявлялось у наявності слабо та помірно оксифільних клітин. Площа поперечного перерізу складала  $23,66 \pm 0,62 \text{ мкм}^2$ , що не відрізняється від аналогічного показнику групи «НЧЗ».

Гістологічна організація сім'яників тварин групи «НЧЗ+Р-234» була аналогічною до інших груп з введенням нанорозмірного золота (рис. 5.16). В частині каналців виявляли дегенеруючі елементи сперматогенного епітелію. подекуди порушувався порядок розташування клітин – поодинокі сперматоцити I

порядку розташовувались ближче до просвіту каналця, аніж сперматиди. Діаметр звивистих сім'яних каналців складав  $260,96 \pm 2,41$  мкм, що достовірно менше за аналогічний параметр в групі тварин, які отримували ін'єкції НЧЗ.

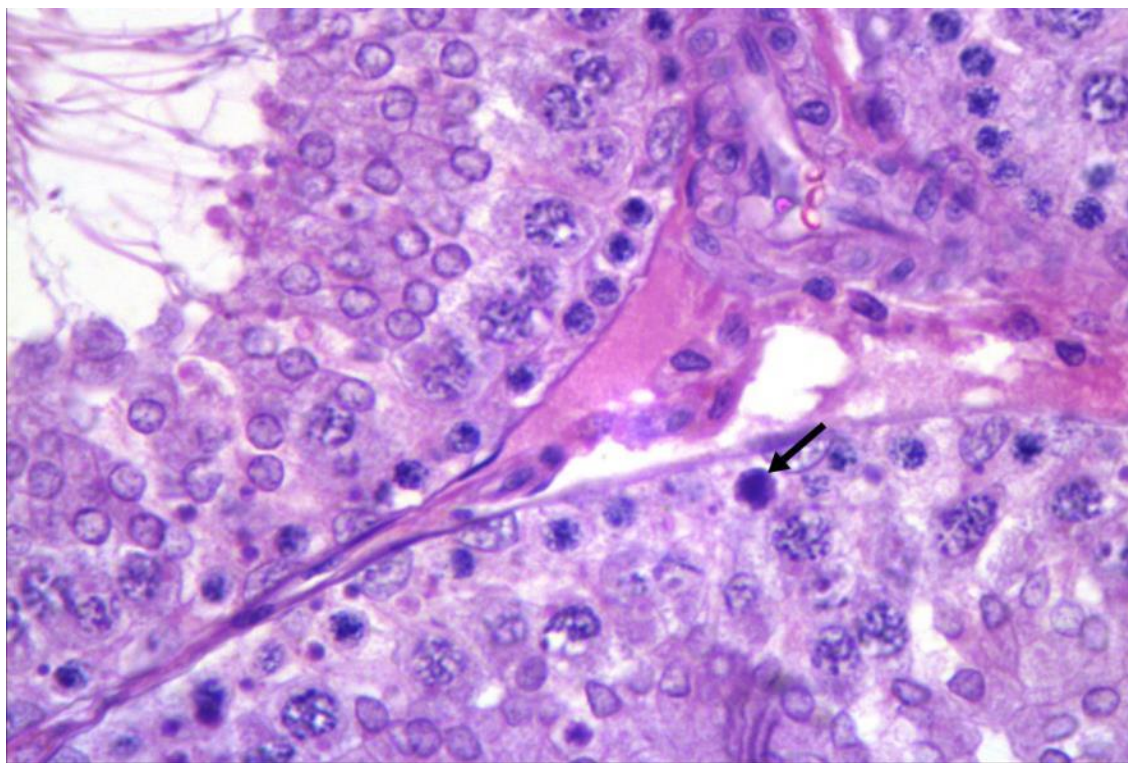


Рис. 5.16. Мікрофотографія сім'яника тварини віком 6 місяців групи «НЧЗ+Р-234». Стрілкою позначено дегенерований сперматоцит. Забарвлення гематоксиліном Бемера та еозином, зб.  $\times 400$ .

Ядра клітин Сертолі були трикутними чи полігональними, темними, з дифузно розподіленим гетерохроматином. Часто не було помітно ядрце. Площа перерізу ядер становила  $61,98 \pm 1,39$  мкм<sup>2</sup>, що не відрізняється від результату групи «НЧЗ».

Багато острівців інтерстиціальної тканини були представлені лише клітинами Лейдіга з патологічно зміненими ядрами: різко зменшеними, гіперхромними чи пікнотичними. Цитоплазма клітин була як правило рівномірно оксифільна. Площа поперечного перерізу ядер складала  $22,38 \pm 0,39$  мкм<sup>2</sup>, достовірно менше за аналогічну величину групи «НЧЗ».

Звивисті сім'яні каналці тварин групи «НЧС» були достовірно меншими за контрольні – діаметр складав  $273,17 \pm 3,56$  мкм. Самі каналці при цьому були

округлими, з помірного розміру просвітом. В стінці деяких каналців ідентифікували дегенеруючі сперматоцити. Також епізодично фіксували часткову ексфоціацію круглих сперматид (рис. 5.17).

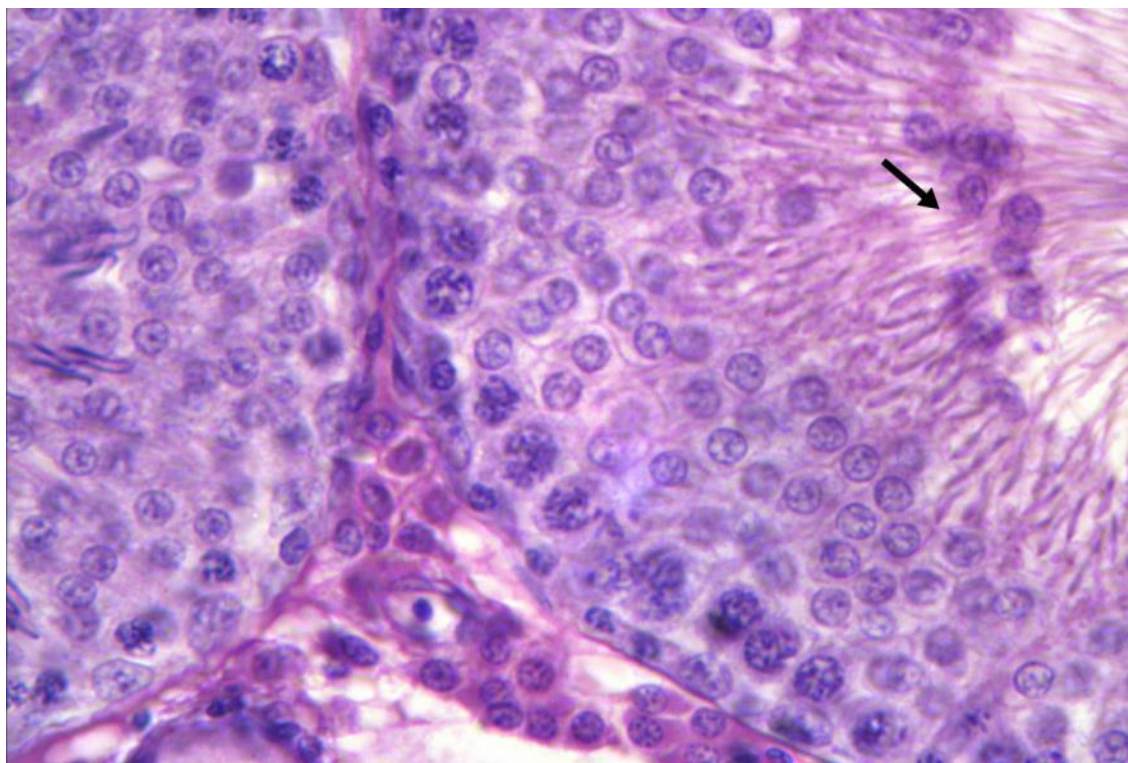


Рис. 5.17. Мікрофотографія сім'яника тварини віком 6 місяців групи «НЧС». Стрілкою відмічено круглі сперматида в просвіті каналця. Забарвлення гематоксиліном Бемера та еозином, зб.  $\times 400$ .

Ядра клітин Сертолі були переважно полігональні або трикутні зі згладженою верхівкою. В деяких ядрах спостерігалась концентрування гетерохроматину, в інших він був розподілений дифузно. Площа поперечного перерізу складала  $63,18 \pm 1,20 \text{ мкм}^2$ , що достовірно менше за контроль.

Клітини Лейдіга мали переважно однорідно оксифільну цитоплазму. Ядра були як правило овальними, з розподіленими по всьому об'єму глибками гетерохроматину. Площа перерізу ядер складала  $22,95 \pm 0,42 \text{ мкм}^2$ , що достовірно менше контрольних значень.

Інтрацеребровентрикулярні ін'єкції КП-10 на тлі внутрішньоочеревинних введень НЧС не призвели до розвитку достовірних морфологічних змін. В стінці звивистих сім'яних каналців були присутні дегенеративні форми сперматоцитів,

в той час як випадків ексфоціації сперматогенного епітелію зафіксовано не було (рис. 5.18). Діаметр каналців становив  $271,33 \pm 2,48$  мкм, що не відрізняється від аналогічного параметру групи «НЧС».

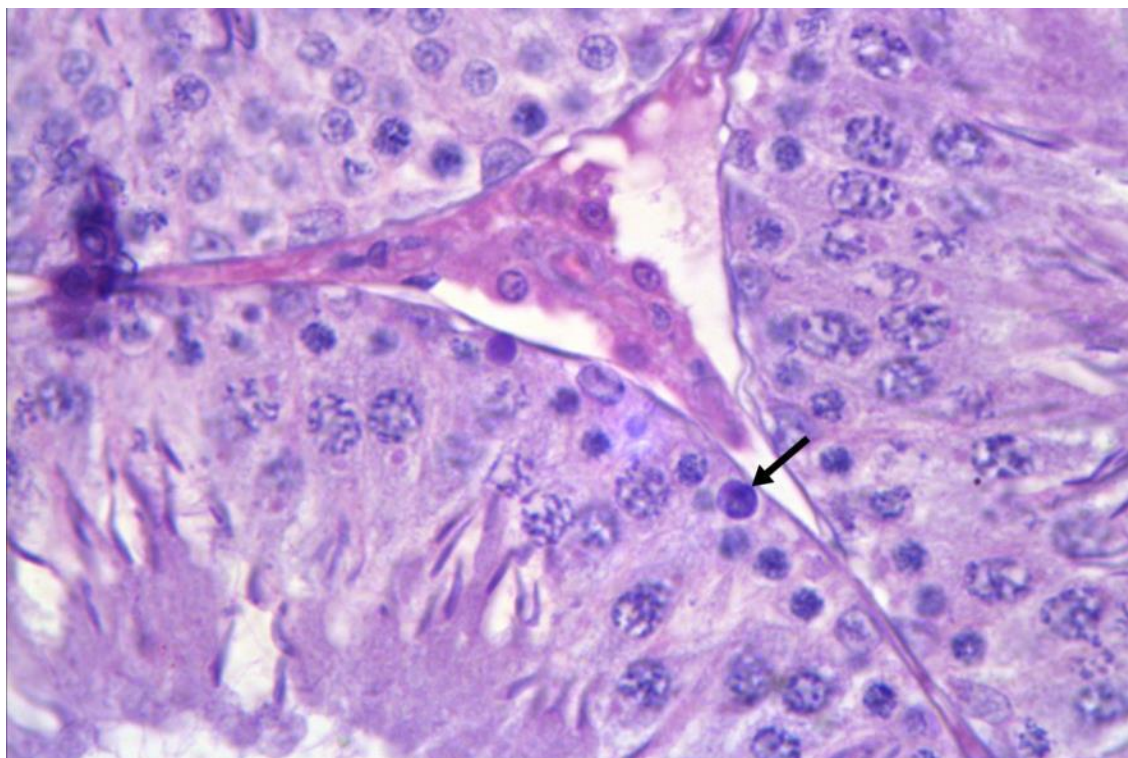


Рис. 5.18. Мікрофотографія сім'яника тварини віком 6 місяців групи «НЧС+КП-10». Стрілкою позначено дегенерований сперматоцит. Забарвлення гематоксилином Бемера та еозином, зб.  $\times 400$ .

Клітини Сертолі мали полігональні чи округлі ядра, з погано окресленим ядерцем. Ядра розташовувались близько до стінки каналця та були порівняно низькими. Площа перерізу ядер становила  $63,90 \pm 1,32$  мкм<sup>2</sup>, що не відрізняється від групи «НЧС».

Клітини Лейдіга мали переважно рівномірно оксифільну цитоплазму, хоча спостерігали також слабко забарвлені клітини. Ядра були овальної форми, часто темні. Достовірних відмінностей від групи «НЧС» в площі перерізу ядер, яка становила  $23,67 \pm 0,40$  мкм<sup>2</sup>, не виявлено.

Звивисті сім'яні каналці щурів групи «НЧС+Р-234» були округлими, з невеликим просвітом в центрі. В стінці каналців як дегенеративні зміни сперматогенних клітин, так і порушення порядку розташування клітинних

елементів. Діаметр каналців становив  $247,93 \pm 2,80$  мкм, що достовірно менше значень групи «НЧС».

Ядра клітин Сертолі були округлими чи овальними, заповнені гетерохроматином. Ядра були порівняно низькими та з погано видимим ядерцем. Площа перерізу ядер клітин Сертолі становила  $60,90 \pm 1,46$  мкм<sup>2</sup>, що не відрізняється від аналогічного параметру групи тварин, які отримували ін'єкції лише нанорозмірного срібла.

Клітини Лейдіга мали однорідну оксифільну цитоплазму. Їхні ядра були овальними, з великою кількістю гетерохроматину та нечітко вираженим ядерцем. Часто спостерігали наявність патологічно змінених ядер. Площа перерізу ядер клітин Лейдіга становила  $21,91 \pm 0,41$  мкм<sup>2</sup>, що достовірно нижче відповідного значення групи «НЧС».

### **5.3. Вміст тестостерону в плазмі крові тварин 1-місячного віку різних експериментальних груп**

Концентрація тестостерону в плазмі крові щурів віком 1 місяць знаходилась на рівні  $4,13 \pm 0,62$  нмоль/л. У тварин груп «ПФН» та «ДМСО» цей параметр становив  $4,22 \pm 0,58$  нмоль/л та  $5,07 \pm 0,32$  нмоль/л відповідно. Обидві величини не відрізняються від контрольного значення (рис. 5.19).

Ін'єкції КП-10 на тлі введень фізіологічного розчину призвели до зростання концентрації ТС на 138% – до  $9,87 \pm 0,70$  нмоль/л. Водночас, ін'єкції Р-234 за аналогічних умов не призвели до достовірних змін – концентрація ТС становила  $2,94 \pm 0,47$  нмоль/л.

Тварини 1-місячного віку, яким внутрішньоочеревинно вводили розчин НЧЗ мали концентрацію ТС в плазмі крові на рівні контрольної групи –  $4,95 \pm 0,44$  нмоль/л. На такому ж рівні залишився рівень гормону і після комбінованих введень Р-234 та НЧЗ ( $5,72 \pm 0,72$  нмоль/л). В той же час, введення КП-10 при одночасних ін'єкціях розчину нанорозмірного золота призвело до

достовірного зростання концентрації ТС на 586% ( $33,97 \pm 20,80$  нмоль/л), порівняно з групою «НЧЗ».

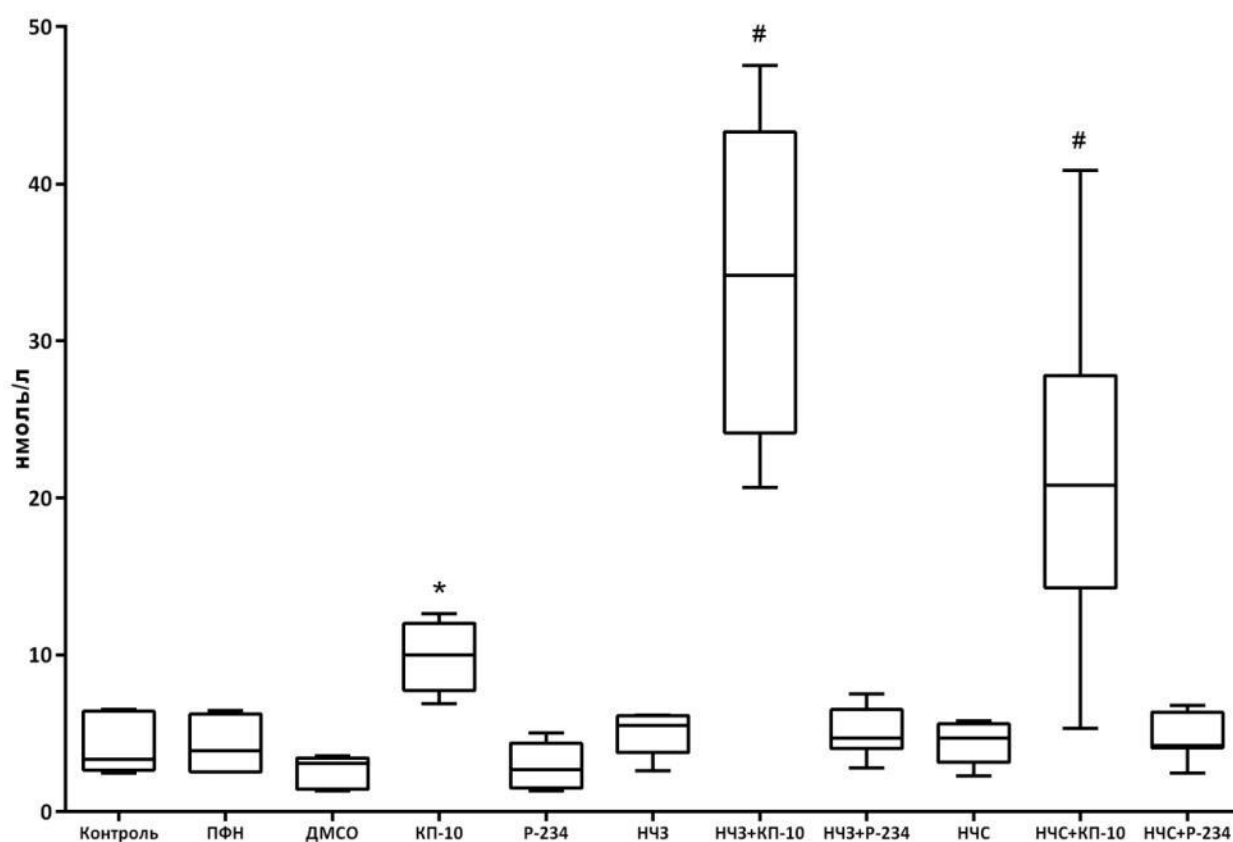


Рис. 5.19. Вміст тестостерону в плазмі крові щурів віком 1 місяць.

Примітка: \* – різниця між контрольною та дослідною групою достовірна при  $p < 0,05$ ; # – різниця між групами «НЧЗ+КП-10», «НЧЗ+Р-234», «НЧС+КП-10», «НЧС+Р-234» та відповідною групою з введенням лише НЧЗ чи НЧС достовірна при  $p < 0,05$ .

Системні десятиденні введення НЧС не призвели до зміни рівня ТС, порівняно з контролем – в даній групі цей параметр становив  $4,38 \pm 0,43$  нмоль/л. Результат групи «НЧС+Р-234» не відрізнявся від групи «НЧС» ( $4,77 \pm 0,42$  нмоль/л). Проте дія КП-10 на тлі дії НЧС призвело до зростання вмісту ТС в плазмі крові на 398% до  $21,82 \pm 3,24$  нмоль/л, що достовірно вище за відповідний параметр групи «НЧС».

#### 5.4. Вміст тестостерону в плазмі крові тварин 6-місячного віку різних експериментальних груп

В плазмі крові щурів віком 6 місяців контрольної групи вміст ТС складав  $16,71 \pm 0,48$  нмоль/л. У тварин, яким впродовж 10 діб внутрішньоочеревинно вводили розчин ПФН, цей параметр становив  $18,75 \pm 0,66$  нмоль/л. В той же час рівень досліджуваного гормону в групі «ДМСО» становив  $20,31 \pm 2,21$  нмоль/л. Обидва вказані параметри не відрізняються від контрольної величини (рис. 5.20).

Введення КП-10 в порожнину лівого шлуночка мозку тваринам, які отримували ін'єкції фізіологічного розчину, призвело до зростання концентрації ТС в плазмі на 195% до  $49,38 \pm 3,13$  нмоль/л. Водночас, дія Р-234 за аналогічних умов призвела до зменшення вмісту ТС на 60% до  $6,77 \pm 0,95$  нмоль/л. Результат обох груп достовірно відрізняється від контрольного значення.

Десятиденна дія НЧЗ проявилась у достовірному зменшенні вмісту ТС в плазмі крові на 40% до  $10,02 \pm 1,55$  нмоль/л. Порівнюючи з цим показником, введення КП-10 при одночасній дії НЧЗ призвело до достовірного зростання виміряного нами параметра на 502% до  $60,35 \pm 1,27$  нмоль/л. Вплив Р-234 за аналогічних умов був протилежним – концентрація ТС достовірно зменшилась на 60% до рівня  $4,06 \pm 0,44$  нмоль/л.

Достовірно меншою за контрольне значення була також і концентрація ТС в плазмі крові щурів групи «НЧС»: вміст гормону зменшився на 40% до  $10,17 \pm 1,14$  нмоль/л. Інтрацеребровентрикулярний вплив КП-10 при одночасному системному введенні НЧС проявився у достовірному зростанні рівня ТС на 462% (порівняно з групою «НЧС») до  $57,23 \pm 1,73$  нмоль/л. Введення Р-234 на тлі ін'єкцій НЧС призвело до достовірного зменшення концентрації ТС на 63% (порівняно з групою «НЧС») до  $3,73 \pm 0,27$  нмоль/л.

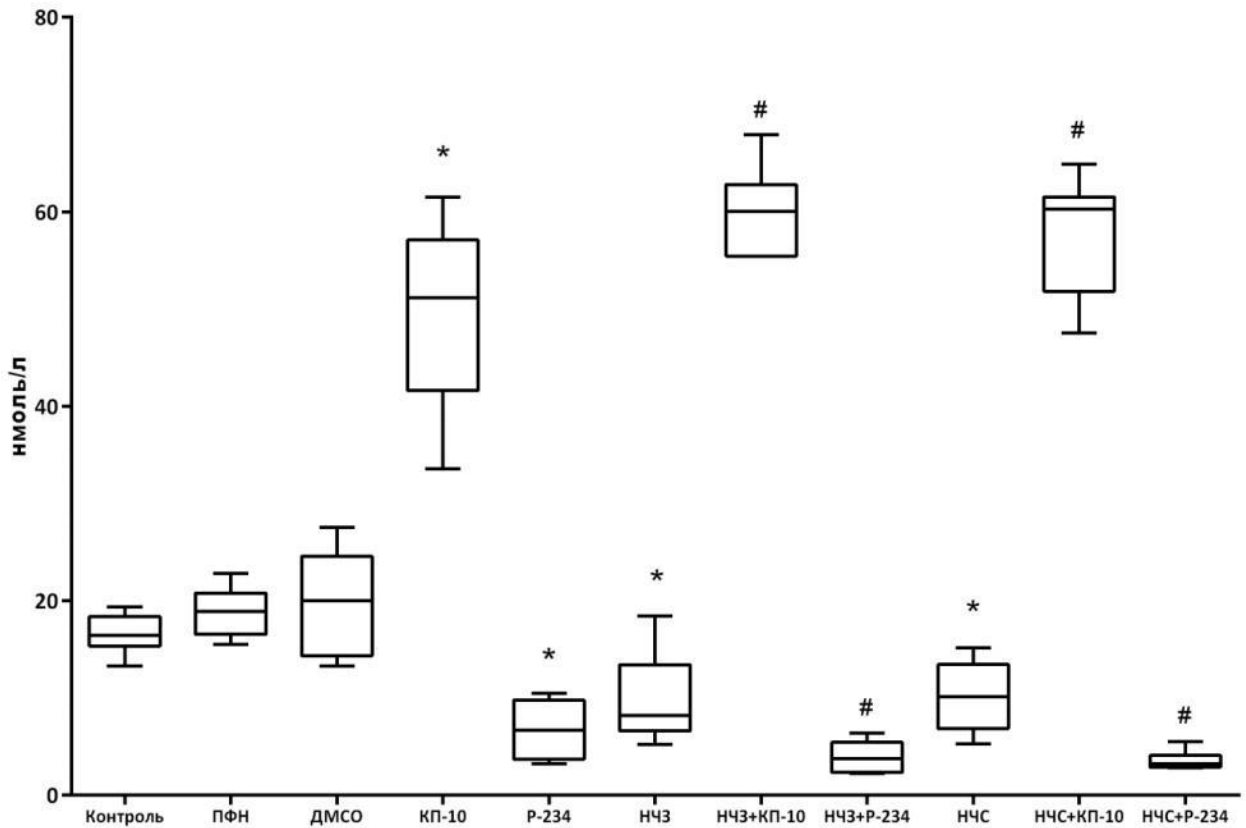


Рис. 5.20. Вміст тестостерону в плазмі крові щурів віком 6 місяців.

Примітка: \* – різниця між контрольною та дослідною групою достовірна при  $p < 0,05$ ; # – різниця між групами «НЧЗ+КП-10», «НЧЗ+P-234», «НЧС+КП-10», «НЧС+P-234» та відповідною групою з введенням лише НЧЗ чи НЧС достовірна при  $p < 0,05$ .

Морфологічні та морфометричні особливості будови сім'яників тварин контрольних груп вказують на вищу активність цього органу у 6-місячних тварин, порівняно із 1-місячними. Додатково це припущення підтверджується наявністю вищої концентрації ТС в крові дорослих тварин. Введення КП-10 стимулювало активність гормон-продукуючої та сперматогенної частин сім'яника в обох вікових групах, в той час як пригнічуючий ефект P-234 був більш вираженим для 6-місячних тварин, що може бути пов'язано з початково низьким рівнем функціональної активності сім'яників статевонезрілих тварин.

Дія НЧ в обох вікових групах призводила до появи дегенеративних змін в тканині сім'яників, при чому ці зміни посилювались при введенні P-234. Дія КП-

10 на тлі введення НЧ була подвійною. З одного боку, морфологічно та морфометрично не спостерігали суттєвих змін, порівняно з групами «НЧС» та «НЧЗ», а з іншого – відмічали значне зростання вмісту ТС в крові. Такі розбіжності між морфометричними та імунологічними показниками можуть бути пояснені наявністю одночасної центральної та периферичної пригнічуючої дії НЧ.

За таких умов при зниженні рівнів тропних гормонів спостерігатиметься сенситизація сім'яника до ФСГ та ЛГ, рівень яких підвищується після введення КП [196,197]. Водночас, в клітинах-мішенях (наприклад, клітинах Лейдіга), дія НЧ перешкоджатиме розвитку довгострокових стимуляторних ефектів, а тому виявлене нами різке зростання концентрації ТС найімовірніше є короткочасним явищем.

## РОЗДІЛ 6

### ВПЛИВ НАНОЧАСТИНОК ЗОЛОТА ТА СРІБЛА НА МОРФО- ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН ПРИДАТКІВ СІМ'ЯНИКІВ І ПЕРЕДМІХУРОВОЇ ЗАЛОЗИ ТВАРИН РІЗНОГО ВІКУ

#### 6.1. Морфо-функціональна характеристика придатків сім'яників тварин 1-місячного віку різних експериментальних груп

Дослідження придатків сім'яників щурів віком 1 місяць продемонструвало, що основна частина органу представлена численними перерізами каналців округлої чи овальної форми. Всередині каналцю виявляли помірну кількість сперматозоїдів, серед яких також знаходився клітинний детрит, який був представлений різними компонентами сперматогенного епітелію (рис. 6.1).

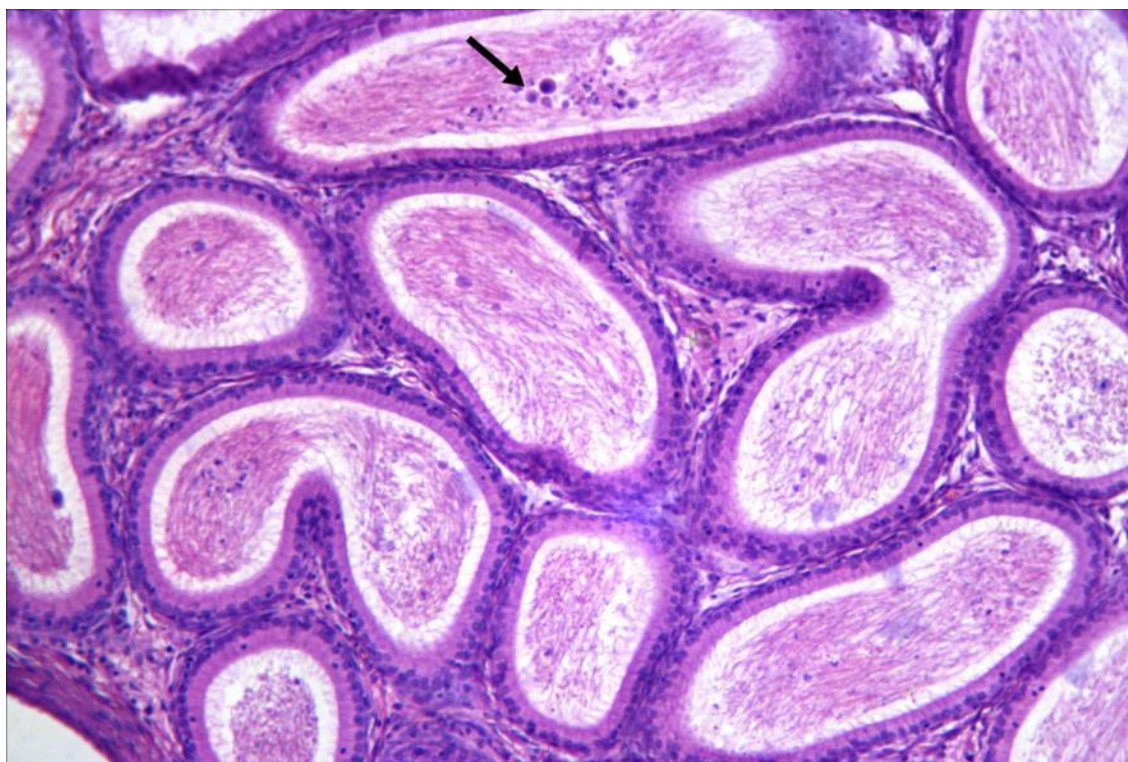


Рис. 6.1. Мікрофотографія придатку сім'яника тварини віком 1 місяць контрольної групи. Стрілкою позначено елементи сперматогенного епітелію в просвіті каналцю. Забарвлення гематоксиліном Бемера та еозином, зб.  $\times 100$ .

Стінка каналъцю представлена циліндричним епітелієм. Основна частина епітеліоцитів мала овальні ядра, розташовані в базальній частині клітини, помірно оксифільну цитоплазму, а також цитоплазматичні вирости на апікальній поверхні.

Ззовні каналець був оточений помірно розвиненою пухкою сполучною тканиною. На поверхні органу також відмічали наявність капсули, що складалась з щільної сполучної тканини. Висота епітеліоцитів в контрольній групі становила  $17,57 \pm 0,41$  мкм, а площа поперечного перерізу їхніх ядер –  $28,86 \pm 0,38$  мкм<sup>2</sup>.

Введення розчину ПФН не призвело до розвитку морфологічних та морфометричних змін в тканині придатку. Епітеліоцити каналъцю мали нормальну будову, без розвитку патологічних змін. Ядра епітеліоцитів були помірно базофільними, з одним ядерцем. В поодиноких клітинах спостерігали каріомегалію, що також було характерним і для контролю. В просвіті каналъців виявляли як нормальної будови сперматозоїди, так і клітинний детрит. Епітеліоцити були  $17,65 \pm 0,45$  мкм висотою, що не відрізняється від контролю (рис. 6.2). Площа поперечного перерізу ядер клітин становила –  $29,06 \pm 0,32$  мкм<sup>2</sup>, що також відповідає контрольним показникам.

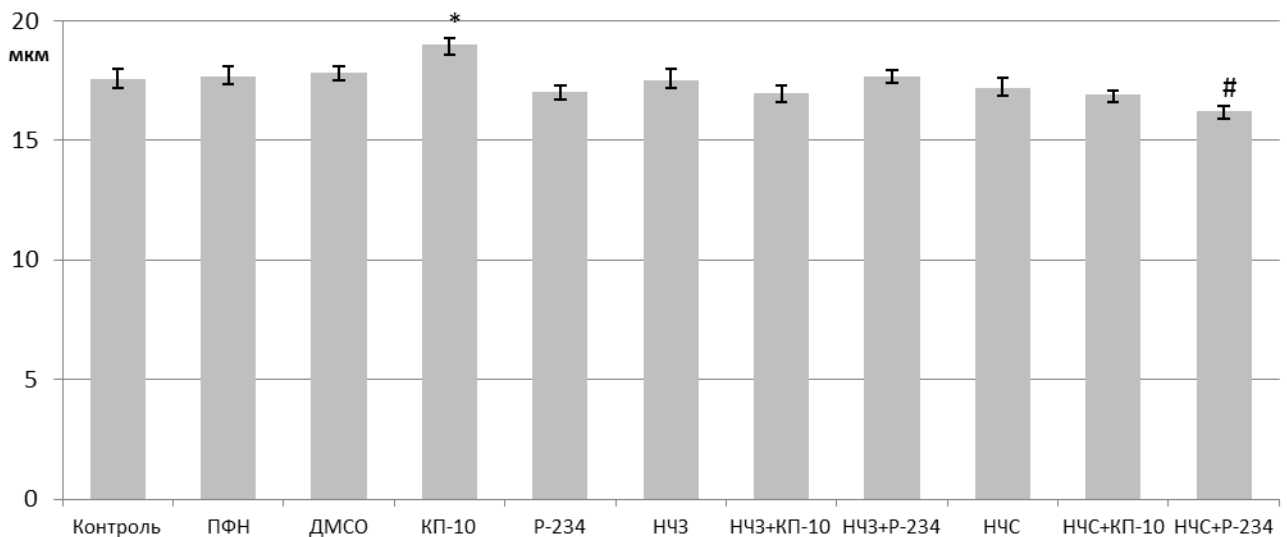


Рис. 6.2. Висота епітеліоцитів придатку сім'яника щурів віком 1 місяць.

Примітка: \* – різниця між контрольною та дослідною групою достовірна при  $p < 0,05$ ; # – різниця між групами «НЧЗ+КП-10», «НЧЗ+P-234», «НЧС+КП-10», «НЧС+P-234» та відповідною групою з введенням лише НЧЗ чи НЧС достовірна при  $p < 0,05$ .

Інтрацеребровентрикулярні введення 10% розчину ДМСО також не вплинули на мікро- та макроскопічну організацію придатку сім'яника. Форма каналців, будова стінки, морфологія ядер окремих клітин, розвиток міжканалцевої сполучної тканини та вміст сторонніх клітинних елементів відповідав контролю. Висота епітеліальних клітин складала  $17,80 \pm 0,29$  мкм, а площа поперечного перерізу їхніх ядер –  $28,42 \pm 0,28$  мкм<sup>2</sup>. Обидва параметри не відрізняються від аналогічного показнику групи «Контроль».

Дія КП-10 на тлі ін'єкцій фізіологічного розчину проявилась у достовірному зростанні висоти стінки каналців до  $19,00 \pm 0,27$  мкм, та площі перерізу ядер клітин до  $30,94 \pm 0,41$  мкм<sup>2</sup>. Морфологічно епітеліоцити були більш циліндричними, часто спостерігали круглі світлі ядра з чіткими 1-2 ядерцями. Водночас зменшувалась відносна кількість міжканалцевої сполучної тканини (рис. 6.3). Також відмічали зменшення кількості сторонніх клітин в просвіті каналця – вони розташовувались поодинокі, не утворюючи скупчень.

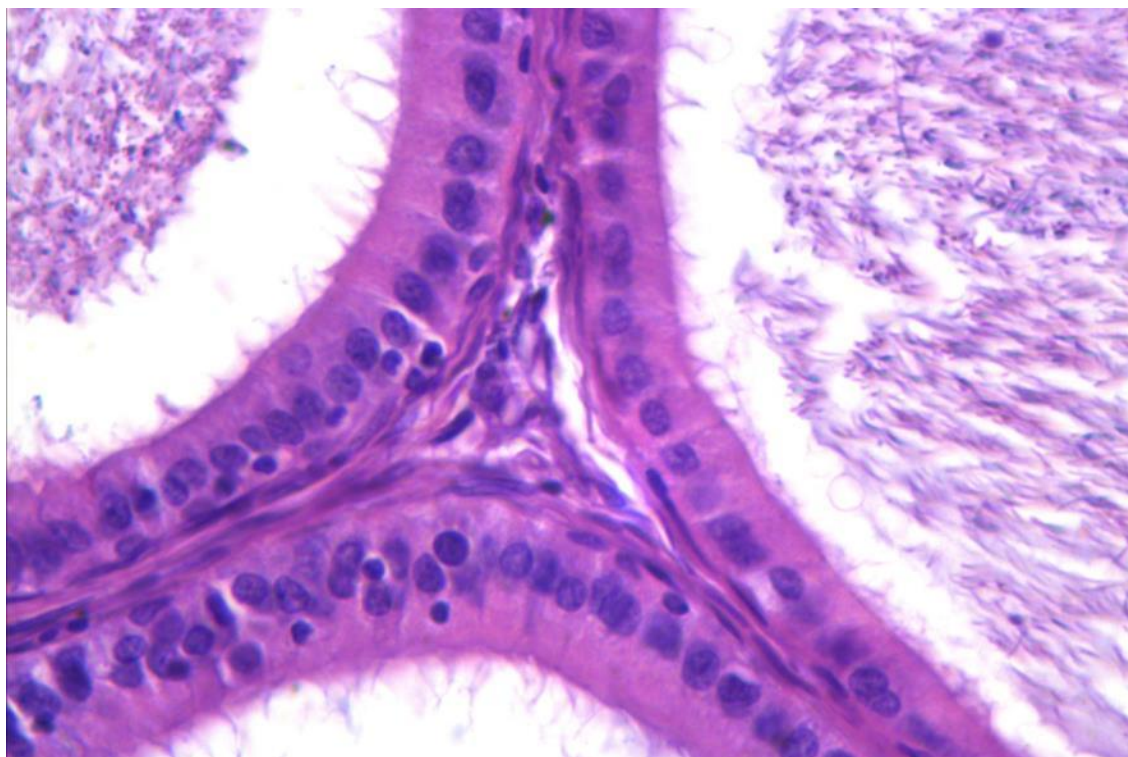


Рис. 6.3. Мікрофотографія придатку сім'яника тварини віком 1 місяць групи «КП-10». Забарвлення гематоксилином Бемера та еозином, зб.  $\times 400$ .

Введення Р-234 в шлуночок мозку призвело до протилежних ефектів. Спостерігали збільшення кількості сперматогенних клітин, в першу чергу сперматид, в просвіті каналця з одночасним зменшенням кількості нормальних сперматозоїдів (рис. 6.4). Розвиток сполучної тканини приблизно відповідав контрольним зразкам. Зростала кількість овальних та полігональних ядер епітеліоцитів, в яких відмічали збільшення кількості гетерохроматину. Висота головних клітин стінки каналців становила  $17,01 \pm 0,30$  мкм, що не відрізняється від контролю, а площа перерізу ядер складала  $26,67 \pm 0,34$  мкм<sup>2</sup>, що достовірно менше за відповідну контрольну величину.

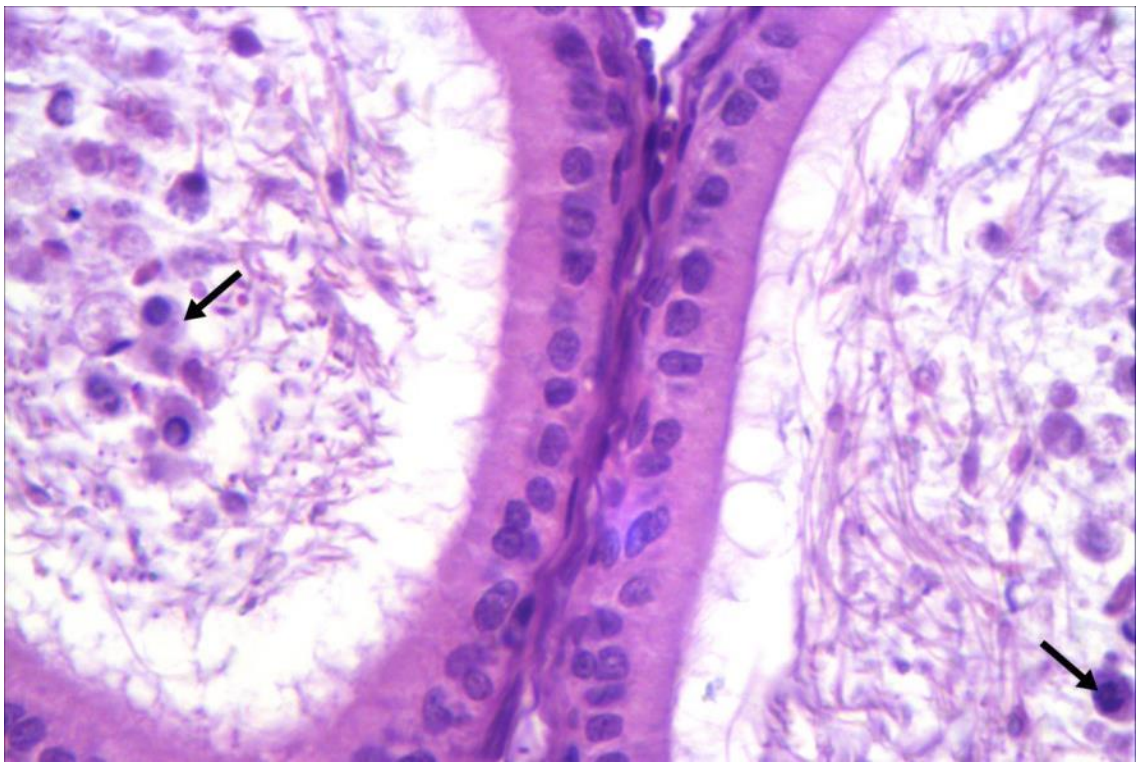


Рис. 6.4. Мікрофотографія придатку сім'яника тварини віком 1 місяць групи «Р-234». Стрілкою позначено сперматогенні клітини в просвіті каналця. Забарвлення гематоксилином Бемера та еозином, зб.  $\times 400$ .

Введення НЧЗ призвело до розвитку морфологічних змін, аналогічних групі «Р-234». Так само спостерігали збільшення кількості сперматогенних елементів в просвіті каналця, а також деформацію та гіперхроматизацію ядер епітеліоцитів при збереженні форми та розмірів власне каналця. Кількість сперматозоїдів була помірною. Висота епітеліальних клітин становила  $17,49 \pm 0,49$  мкм, що відповідає

контрольному показнику. В той же час, площа поперечного перерізу ядер епітеліоцитів складала  $26,74 \pm 0,30 \text{ мкм}^2$ , що достовірно менше за контроль.

Сумісні ін'єкції КП-10 та НЧЗ призвели до різносторонніх змін. З одного боку, відмічали зменшення кількості сторонніх клітинних елементів в просвіті каналця з одночасним збільшенням щільності розташування сперматозоїдів. Візуально реєстрували зменшення об'єму міжканальцевої сполучної тканини. В той же час відмічали посилення розвитку сполучнотканинної капсули органу, а в одному із зразків було виявлено відкладення аморфної чорної субстанції у зовнішній оболонці придатку. В цій ділянці спостерігали значне збільшення товщини сполучнотканинного шару (рис. 6.5). Враховуючи розташування та вигляд утворення, найімовірніше воно являє собою конгломерат НЧЗ. Висота епітеліальних клітин даної групи становила  $16,99 \pm 0,27 \text{ мкм}$ , що відповідає значенням групи «НЧЗ». Натомість, реєстрували достовірно зростання площі поперечного перерізу ядер епітеліоцитів до  $30,65 \pm 0,37 \text{ мкм}^2$ .

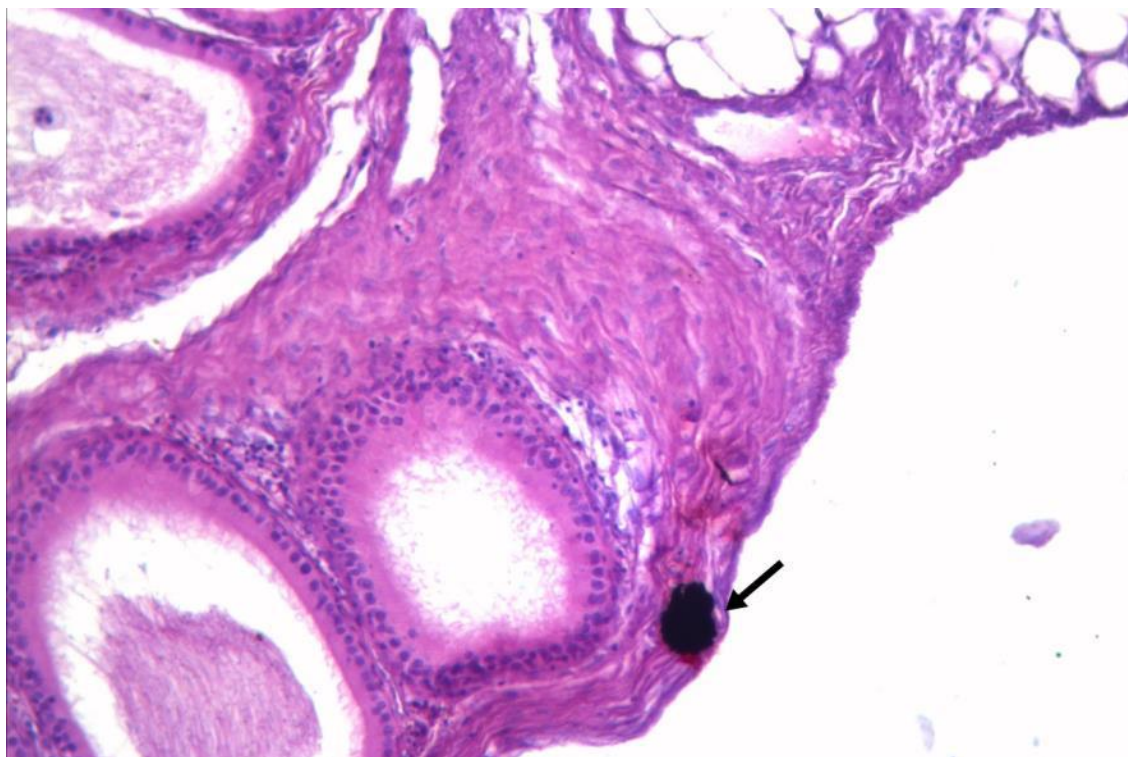


Рис. 6.5. Мікрофотографія придатку сім'яника тварини віком 1 місяць групи «НЧЗ+КП-10». Стрілкою позначено включення в зовнішній сполучнотканинній оболонці органу. Забарвлення гематоксиліном Бемера та еозином, зб.  $\times 100$ .

Інтрацеребровентрикулярні ін'єкції Р-234 сумісно з внутрішньоочеревинними введеннями НЧЗ призвели до розвитку значної гіоспермії. При цьому каналці або було повністю порожніми, або всередині зберігалась невелика кількість агрегованих сперматозоїдів та/або аморфного секрету. В просвіті також були присутні велетенські багатоядерні клітини, поодинокі лейкоцити та різні компоненти сперматогенного епітелію (рис. 6.6). Будова епітеліальної вистилки каналця загалом відповідала нормі. Клітини мали призматичну форму, рівномірно оксифільну цитоплазму, та овальні чи полігональні ядра із значним вмістом гетерохроматину. Висота клітин не відрізнялась від групи «НЧЗ» і становила  $17,65 \pm 0,30$  мкм, в той час як площа перерізу ядер достовірно зменшилась до  $25,25 \pm 0,25$  мкм<sup>2</sup>.

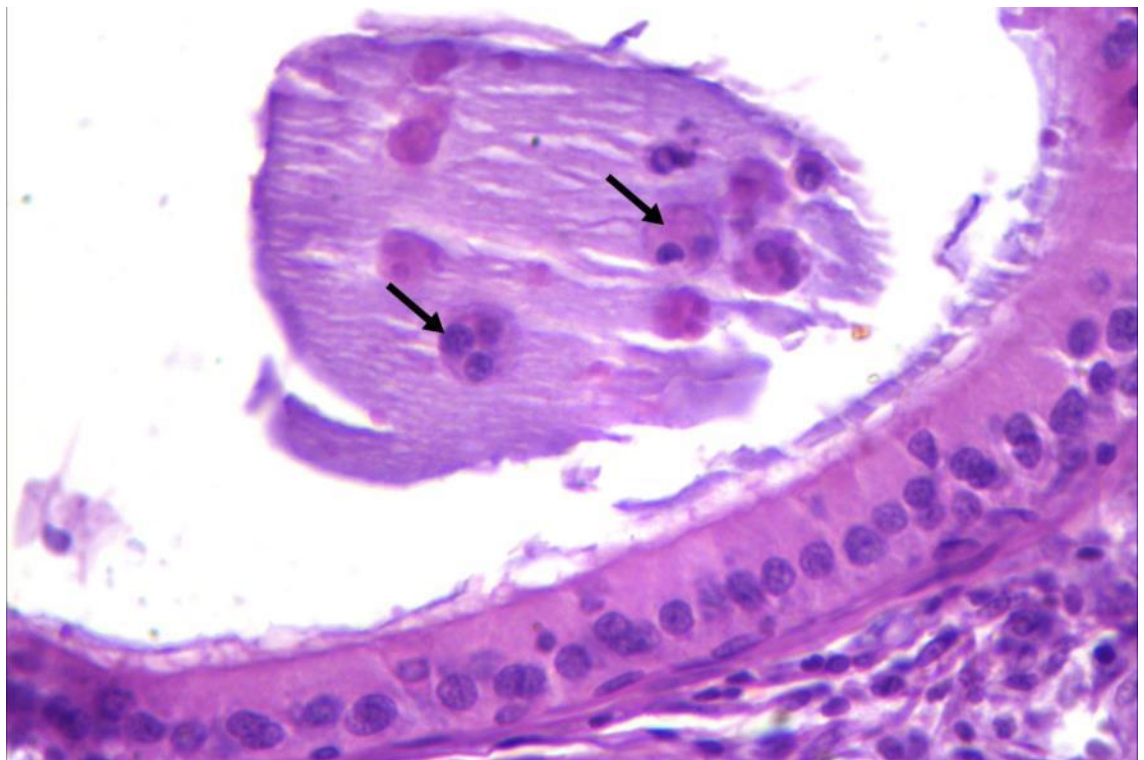


Рис. 6.6. Мікрофотографія придатку сім'яника тварини віком 1 місяць групи «НЧЗ+Р-234». Стрілкою позначено сперматогенні клітини в просвіті каналця. Забарвлення гематоксилином Бемера та еозином, зб.  $\times 400$ .

Дія НЧС на морфо-функціональний стан придатку сім'яника тварин 1-місячного віку проявилась у збільшенні кількості круглих сперматид та інших клітин в просвіті каналця. Водночас, кількість сперматозоїдів залишалась

помірною. Канальці мали округлу форму та були оточені нормальною кількістю пухкої сполучної тканини. Епітеліюцити мали призматичну форму, рівномірно забарвлену цитоплазму та здебільшого овальні ті помірно базофільні. В багатьох ядрах спостерігали збільшення вмісту гетерохроматину. Висота клітин не відрізнялась від контролю і становила  $17,19 \pm 0,40$  мкм<sup>2</sup>, хоча площа перерізу ядер була достовірно меншою –  $26,31 \pm 0,34$  мкм<sup>2</sup> (рис. 6.7).

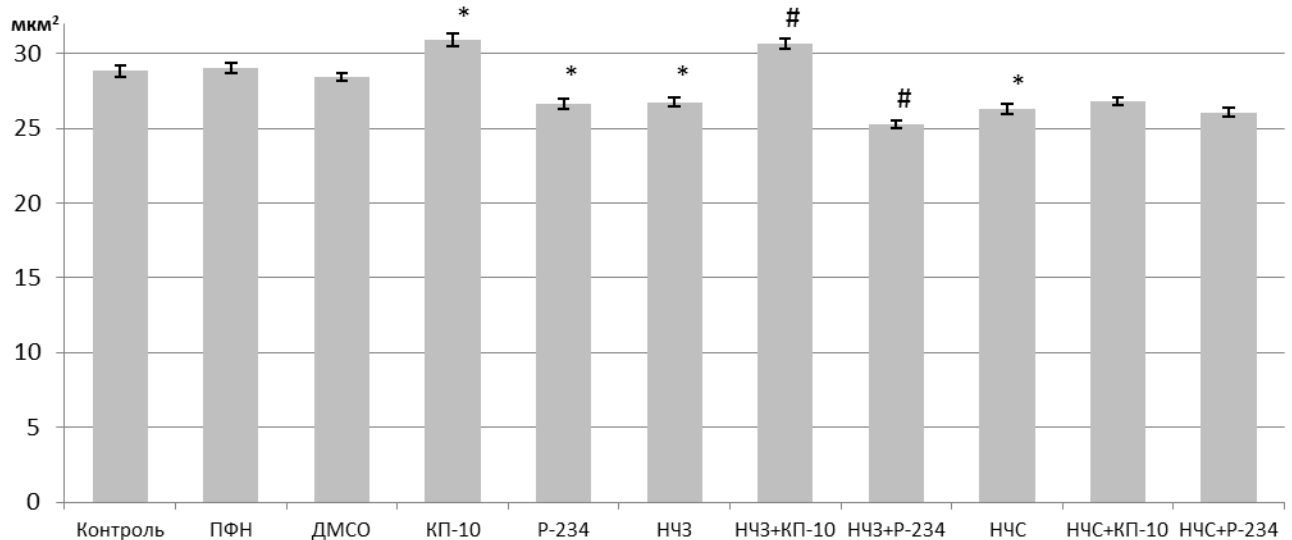


Рис. 6.7. Площа поперечного перерізу ядер епітеліальних клітин придатку сім'яника щурів віком 1 місяць.

Примітка: \* – різниця між контрольною та дослідною групою достовірна при  $p < 0,05$ ; # – різниця між групами «НЧЗ+КП-10», «НЧЗ+Р-234», «НЧС+КП-10», «НЧС+Р-234» та відповідною групою з введенням лише НЧЗ чи НЧС достовірна при  $p < 0,05$ .

Введення КП-10 при одночасній дії НЧС не призвело до достовірних морфологічних та морфометричних змін. Форма та розміри канальців, кількість сперматозоїдів та сперматогенних клітин, ступінь розвитку сполучної тканини відповідав аналогічним показникам групи «НЧС». Висота епітеліюцитів становила  $16,89 \pm 0,20$  мкм, а площа поперечного перерізу їхніх ядер –  $26,80 \pm 0,27$  мкм<sup>2</sup>. Обидві величини не відрізняються від аналогічних показників групи «НЧС».

Ін'єкції Р-234 на тлі введення НЧС призвели до якісного погіршення вмісту канальців. Спостерігали розвиток гіоспермії з одночасним зростанням кількості

велетенських багатоядерних клітин (рис. 6.8). Також відмічали підвищення вмісту лейкоцитів та сперматид. Додатково реєстрували наближення форми епітеліальних клітин до кубічної з одночасним зменшенням довжини цитоплазматичних виростів на їхній апікальній поверхні. Висота клітин становила  $16,20 \pm 0,23$  мкм, що достовірно менше за відповідний параметр групи «НЧС». Ядра були овальними чи полігональними, з порівняно високим вмістом гетерохроматину. Площа перерізу ядер складала  $26,08 \pm 0,28$  мкм<sup>2</sup>, що не відрізняється від аналогічного показники групи тварин, які отримували лише ін'єкції нанорозмірного срібла.

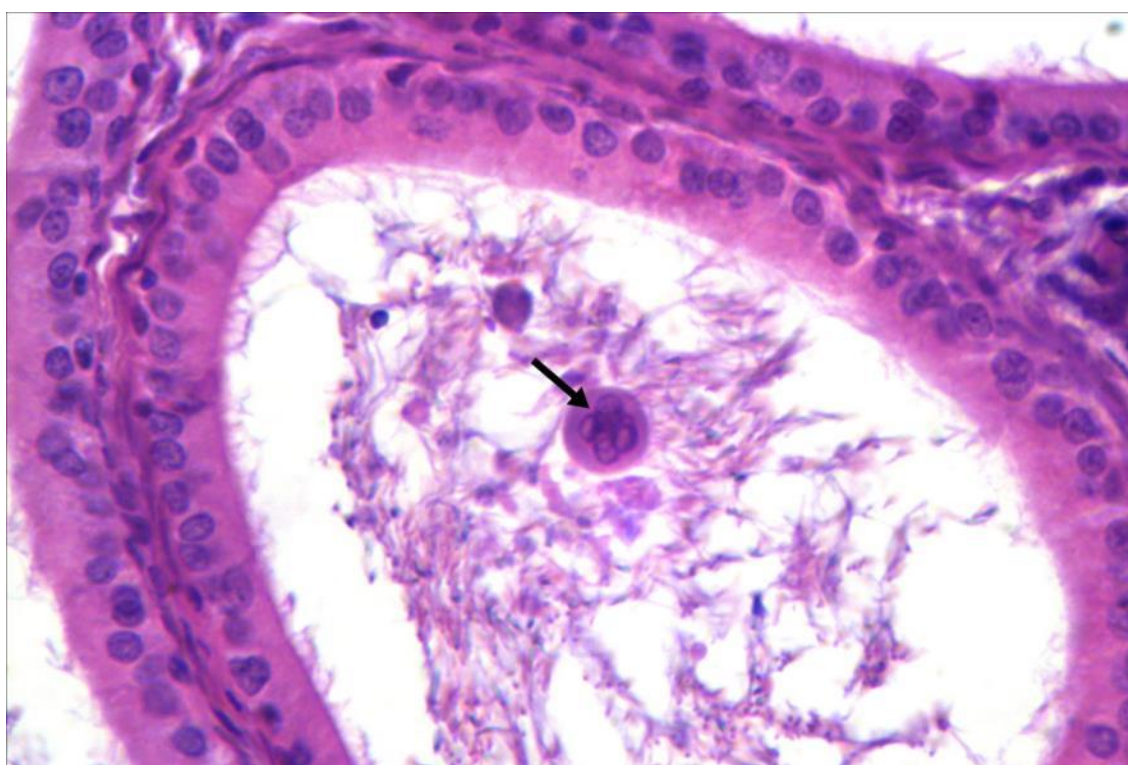


Рис. 6.8. Мікрофотографія придатку сім'яника тварини віком 1 місяць групи «НЧС+Р-234». Стрілкою позначено велетенську багатоядерну клітину. Забарвлення гематоксилином Бемера та еозином, зб.  $\times 400$ .

## **6.2. Морфо-функціональна характеристика придатків сім'яників тварин 6-місячного віку різних експериментальних груп**

При дослідженні зрізів придатків сім'яників щурів віком 6 місяців контрольної групи було виявлено, що основну частину придатку складає

розширений каналець, заповнений численними сперматозоїдами. Сторонні клітинні елементи в просвіті були поодинокими (1 клітина на декілька перерізів каналця). Стінка каналця представлена в основному призматичними клітинами зі світлою оксифільною цитоплазмою та світлими овальними чи округлими ядрами, що розташовувались в базальній частині клітини. Також відмічали більшу, порівняно з 1-місячними тваринами, кількість клітин з слабко оксифільною чи хромофобною цитоплазмою. Стінка каналця була оточена невеликою кількістю пухкої сполучної тканини, а ззовні придаток був обмежений сполучнотканинною капсулою (рис. 6.9). Висота головних епітеліальних клітин стінки каналця становила  $16,53 \pm 0,30$  мкм, а площа перерізу їхніх ядер –  $32,70 \pm 0,48$  мкм<sup>2</sup>.

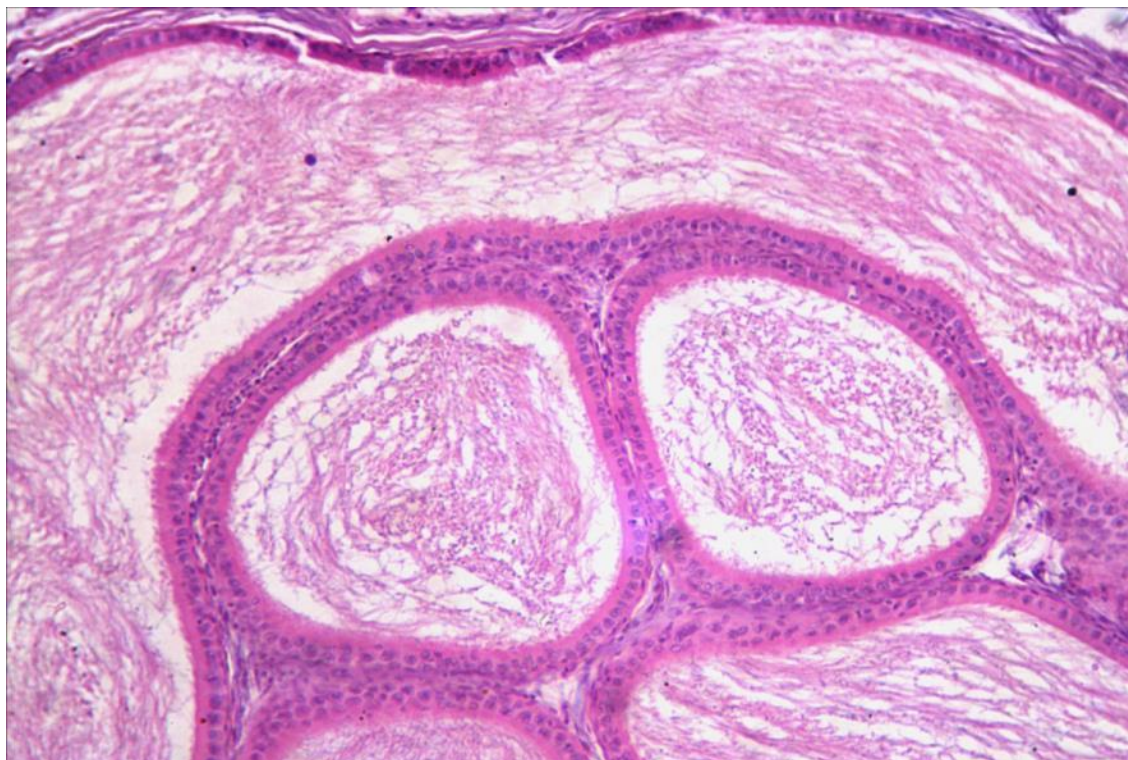


Рис. 6.9. Мікрофотографія придатку сім'яника тварини віком 6 місяців контрольної групи. Забарвлення гематоксилином Бемера та еозином, зб.  $\times 100$ .

Придатки сім'яників тварин груп «ПФН» за будовою не відрізнялись від контрольних зразків. Просвіт каналців був заповнений сперматозоїдами, зростання кількості сторонніх клітин не спостерігали. Розвиток сполучної тканини відповідав контролю. Висота епітеліальних клітин становила

16,94±0,27 мкм (рис. 6.10), а площа перерізу ядер – 33,69±0,45 мкм<sup>2</sup>. Обидва морфометричні параметри не відрізняються від аналогічних показників контрольної групи.

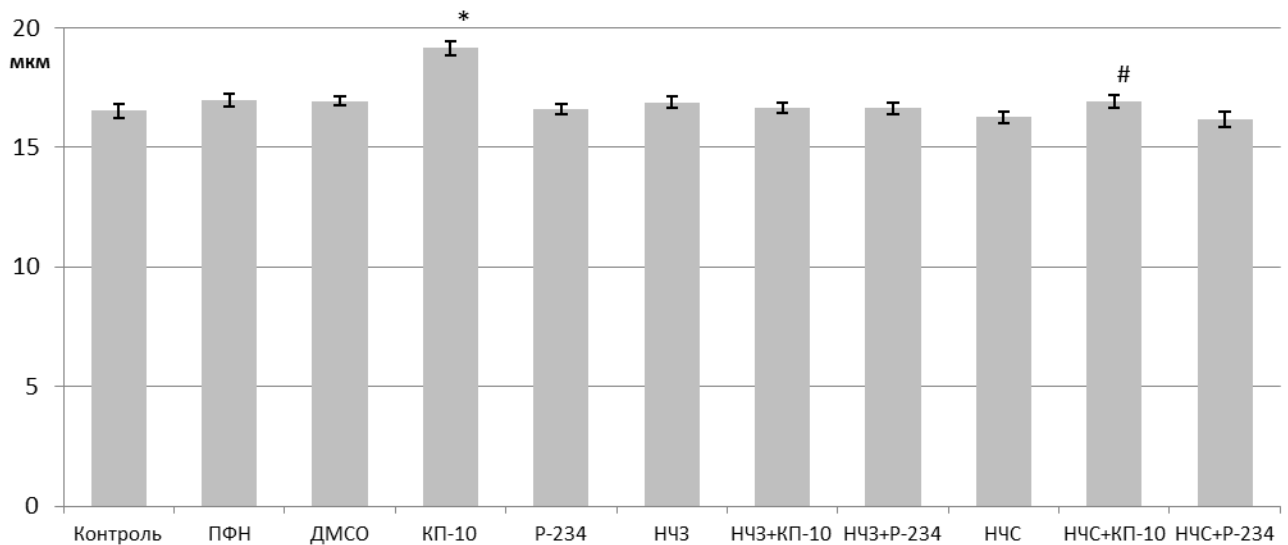


Рис. 6.10. Висота епітеліоцитів придатку сім'яника щурів віком 6 місяців.

Примітка: \* – різниця між контрольною та дослідною групою достовірна при  $p < 0,05$ ; # – різниця між групами «НЧЗ+КП-10», «НЧЗ+Р-234», «НЧС+КП-10», «НЧС+Р-234» та відповідною групою з введенням лише НЧЗ чи НЧС достовірна при  $p < 0,05$ .

Інтрацеребровентрикулярні ін'єкції 10% розчину ДМСО також не призвели до розвитку морфологічних та морфометричних змін. Канальці були заповнені щільно розташованими сперматозоїдами. Сперматогенні клітини розташовувались поодинокі. Розвиток пухкої сполучної тканини, а також сполучнотканинної капсули не відрізнявся від контрольних зразків. Епітеліоцити мали рівномірно забарвлену оксифільну цитоплазму та овальне базально розташоване ядро з помірною кількістю гетерохроматину. Висота епітеліоцитів складала 16,94±0,21 мкм, площа перерізу ядер – 32,19±0,45 мкм<sup>2</sup>, що не відрізняється від контролю.

В придатках сім'яників тварин, яким вводили КП-10 при одночасних ін'єкціях фізіологічного розчину спостерігали достовірне зростання висоти епітеліоцитів до 19,14±0,28 мкм та площі перерізу ядер до 35,76±0,62 мкм<sup>2</sup>.

Морфологічно при цьому спостерігали зменшення об'єму міжканальцевої сполучної тканини та видовження епітеліальних клітин (рис. 6.11). В більшості епітеліоцитів ядра були овальними чи округлими, з помірною кількістю гетерохроматину. Також спостерігали окремі світлі ядра з чітко вираженими ядерцями.

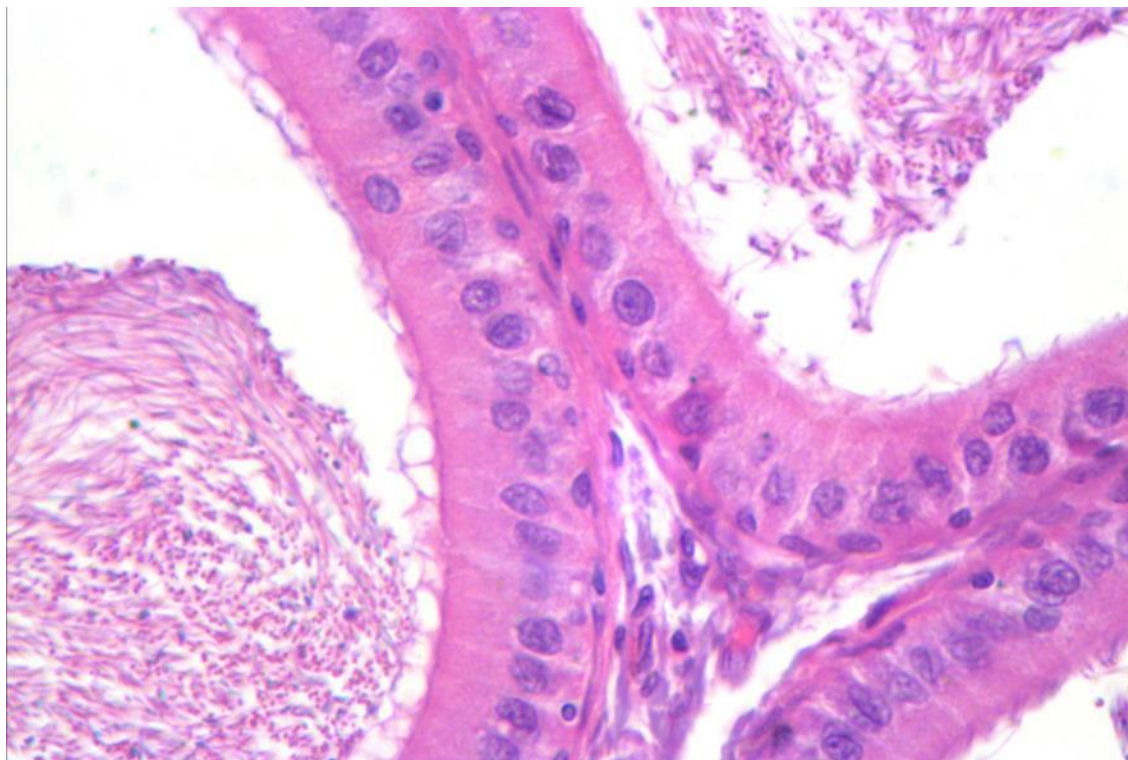


Рис. 6.11. Мікрофотографія придатку сім'яника тварини віком 6 місяців групи «КП-10». Забарвлення гематоксиліном Бемера та еозином, зб.  $\times 400$ .

Інтрацеребровентрикулярне введення Р-234 при внутрішньоочеревинних ін'єкціях фізіологічного розчину призвело до зростання кількості сперматогенних клітин в просвіті каналця. Розвиток сполучної тканини, а також форма та розміри перерізів каналцю відповідали контрольним зразкам. Висота головних епітеліоцитів складала  $16,58 \pm 0,22$  мкм, що не відрізняється від контролю. Водночас відмічали зростання кількості овальних гіперхромних ядер зі слабо помітним ядерцем. Площа перерізу ядер головних клітин стінки каналцю придатку сім'яника становила  $27,75 \pm 0,35$  мкм<sup>2</sup>, що достовірно менше за відповідний показник групи «Контроль».

В придатках сім'яників тварин, яким вводили НЧЗ, спостерігали збереження загальної морфології тканини. Кількість сперматозоїдів була помірною, зростала кількість сперматогенних клітин в просвіті каналця. В той же час в стінці багатьох каналців спостерігали вакуолізацію епітеліального шару (рис. 6.12).

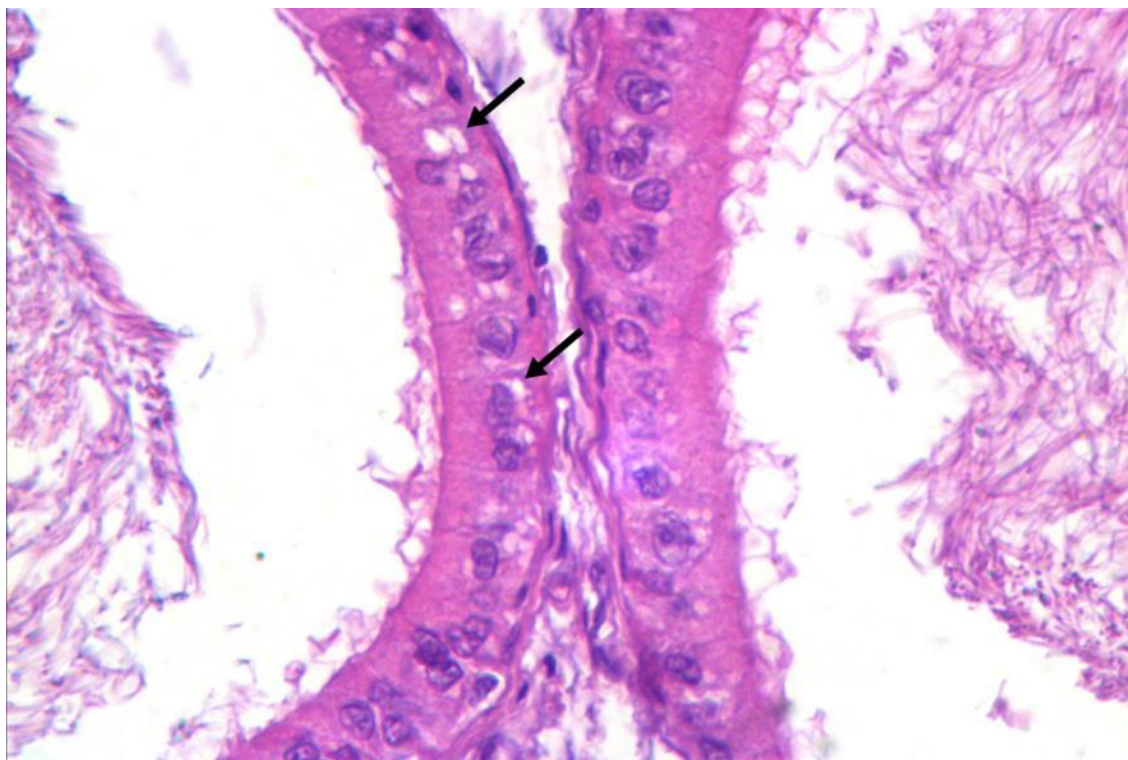


Рис. 6.12. Мікрофотографія придатку сім'яника тварини віком 6 місяців групи «НЧЗ». Стрілкою позначено ділянки вакуолізації цитоплазми епітеліальних клітин. Забарвлення гематоксилином Бемера та еозином, зб.  $\times 400$ .

Середня висота епітеліальних клітин відповідала контрольним показникам –  $16,87 \pm 0,24$  мкм. Серед ядер же помічали зростання кількості деформованих та гіперхромних, що відобразилось у достовірному зменшенні площі перетину ядер до  $29,90 \pm 0,42$  мкм<sup>2</sup>.

Дія КП-10 при одночасному введенні НЧЗ проявилась у достовірному зростанні площі перетину ядер до  $33,17 \pm 0,50$  мкм<sup>2</sup>, порівняно з групою «НЧЗ». Водночас виявляли зростання рівня морфологічної гетерогенності ядер епітеліоцитів – в багатьох клітинах виявляли зморщені, деформовані ядра із високим вмістом гетерохроматину (рис. 6.13). Висота клітин при цьому не відрізнялась від групи НЧЗ і складала  $16,65 \pm 0,22$  мкм. В просвіті каналців

подекуди виявляли елементи сперматогенного епітелію та спостерігали помірну щільність розташування сперматозоїдів.

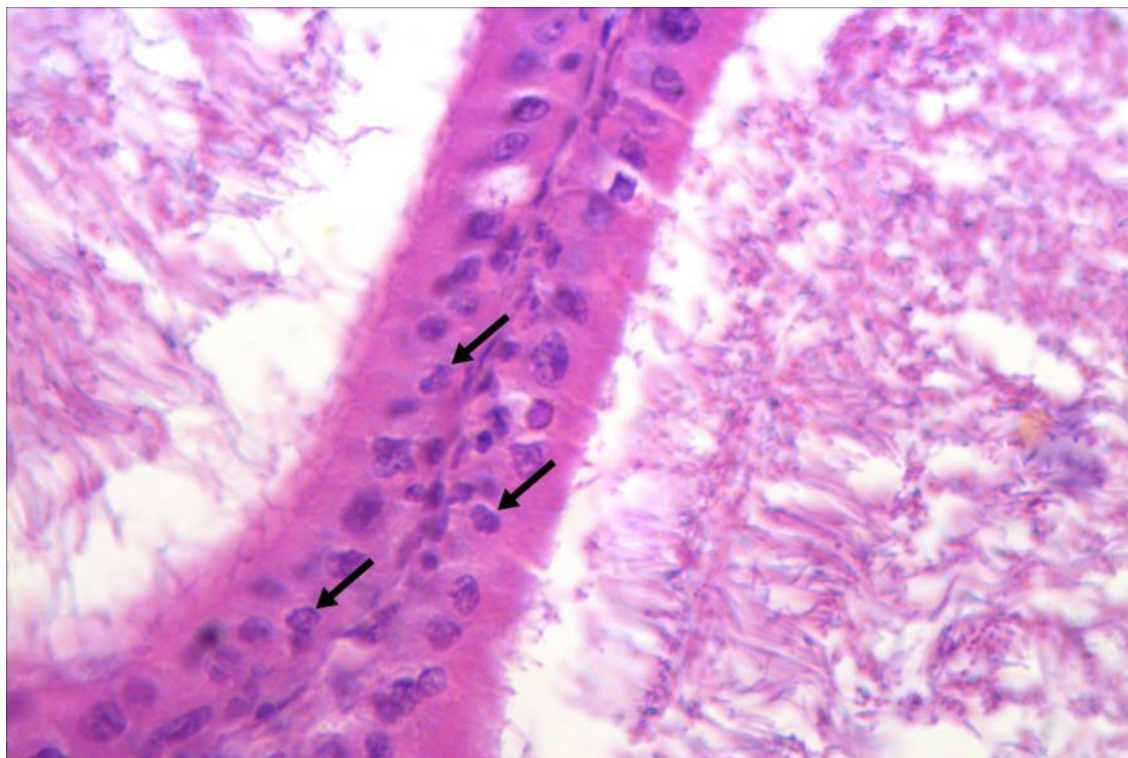


Рис. 6.13. Мікрофотографія придатку сім'яника тварини віком 6 місяців групи «НЧЗ+КП-10». Стрілкою позначено деформовані ядра епітеліоцитів. Забарвлення гематоксилином Бемера та еозином, зб.  $\times 400$ .

В просвіті каналця придатку сім'яника тварин групи «НЧЗ+Р-234» виявляли зростання кількості сторонніх клітинних елементів. Окрім того, відмічали збільшення об'єму міжканалцевої пухкої сполучної тканини. Загальна морфологія епітеліоцитів була подібною до зразків групи «НЧЗ». Висота епітеліальних клітин становила  $16,64 \pm 0,24$  мкм, а площа поперечного перерізу їхніх ядер –  $30,34 \pm 0,37$  мкм<sup>2</sup>. Обидва параметри не відрізняються від результатів групи «НЧЗ».

Дія НЧС на морфо-функціональний стан придатків 6-місячних щурів проявилась у зростанні кількості сперматогенних клітин, лейкоцитів та клітинного детриту у просвіті каналцю з одночасним зменшенням кількості сперматозоїдів (рис 6.14). Форма каналців при цьому залишалась без змін. Також спостерігали збільшення розвитку міжканалцевої сполучної тканини при

збереженні будови сполучнотканинної капсули. Епітеліюцити були рівномірно оксифільними та мали висоту  $16,25 \pm 0,22$  мкм, що не відрізняється від контролю. Водночас спостерігали збільшенні кількості деформованих та гіперхромних ядер, що зумовило достовірне зменшення площі перетину ядер епітеліюцитів до  $29,47 \pm 0,43$  мкм<sup>2</sup>.

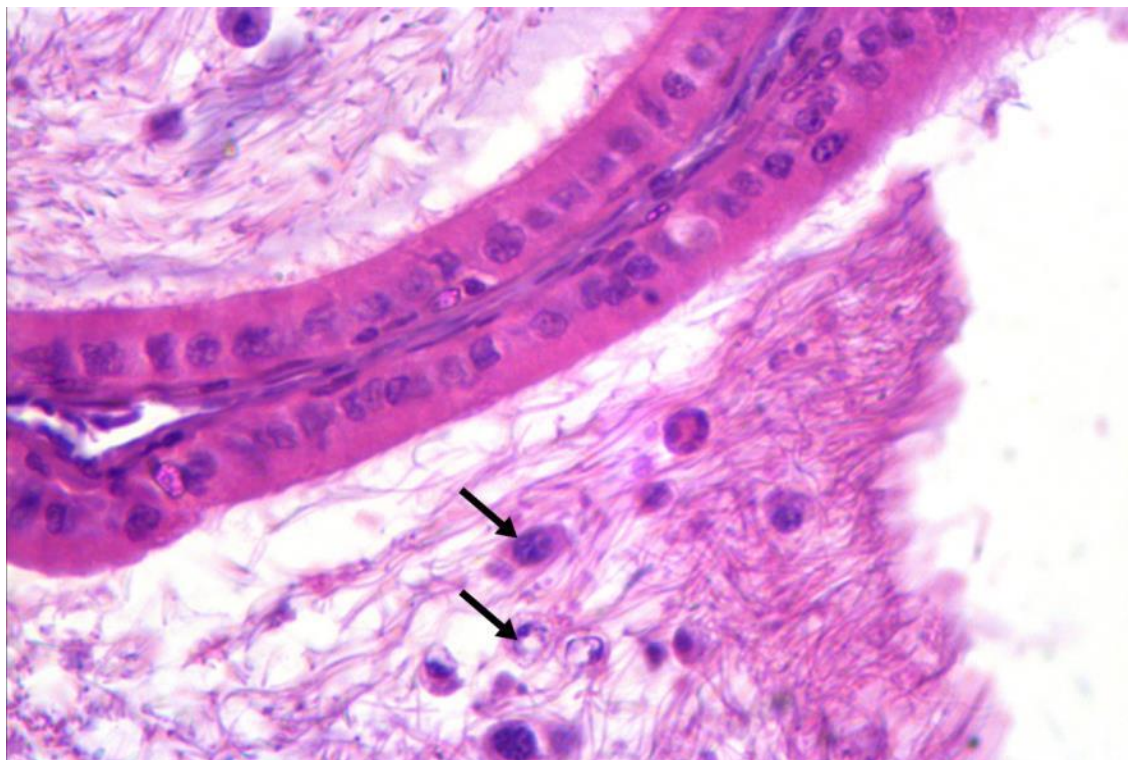


Рис. 6.14. Мікрофотографія придатку сім'яника тварини віком 6 місяців групи «НЧС». Стрілкою позначено сперматогенні клітини. Забарвлення гематоксиліном Бемера та еозином, зб.  $\times 400$ .

Ін'єкції КП-10 в порожнину лівого шлуночка мозку на тлі внутрішньоочеревинних введень НЧС призвели до невеликого, але достовірного, порівняно з групою «НЧС», зростання величини виміряних нами морфометричних параметрів: висота епітеліюцитів складала  $16,90 \pm 0,25$  мкм, а площа поперечного перерізу їхніх ядер –  $30,78 \pm 0,41$  мкм<sup>2</sup> (рис. 6.15). Водночас, спостерігали ознаки покращення якісного стану вмісту канальцю придатку. Так, відмічали зменшення кількості сторонніх клітин в просвіті канальця разом зі збільшенням кількості сперматозоїдів. Форма канальцю та загальна морфологічна організація тканини придатку відповідали нормальним показникам. Епітеліюцити

були призматичної форми, з рівномірно забарвленою еозинофільною цитоплазмою. Більшість клітин мала овальні або округлі ядра, розташовані в базальній частині, з невеликою кількістю гетерохроматину та 1 ядерцем. В той же час реєстрували також наявність клітин зі зморщеними полігональними чи овальними ядрами.

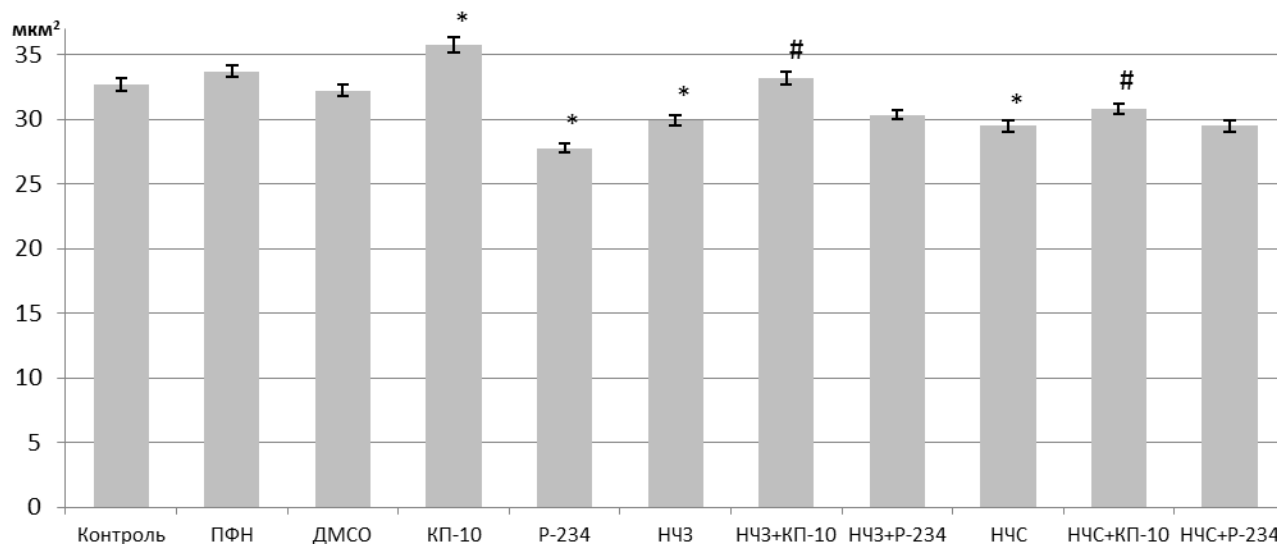


Рис. 6.15. Площа поперечного перерізу ядер епітеліальних клітин придатку сім'яника щурів віком 6 місяців.

Примітка: \* – різниця між контрольною та дослідною групою достовірна при  $p < 0,05$ ; # – різниця між групами «НЧЗ+КП-10», «НЧЗ+P-234», «НЧС+КП-10», «НЧС+P-234» та відповідною групою з введенням лише НЧЗ чи НЧС достовірна при  $p < 0,05$ .

Морфометричні параметри групи «НЧС+P-234» не відрізнялись від результатів групи «НЧС» і становили  $16,16 \pm 0,32$  мкм (висота епітеліоцитів) та  $29,47 \pm 0,44$  мкм<sup>2</sup> (площа перерізу ядер клітин). Водночас, в тканині придатку спостерігали значне збільшення об'єму пухкої сполучної тканини разом з одночасним зменшенням розмірів каналцю (рис. 6.16). В просвіті каналцю значно зменшувалась кількість сперматозоїдів, хоча кількість сперматогенних клітин зростала незначно. Хоча висота епітеліоцитів та щільність їхнього цитозолу залишалась без змін, в багатьох клітинах виявляли пікнотичні або зморщені гіперхромні ядра.

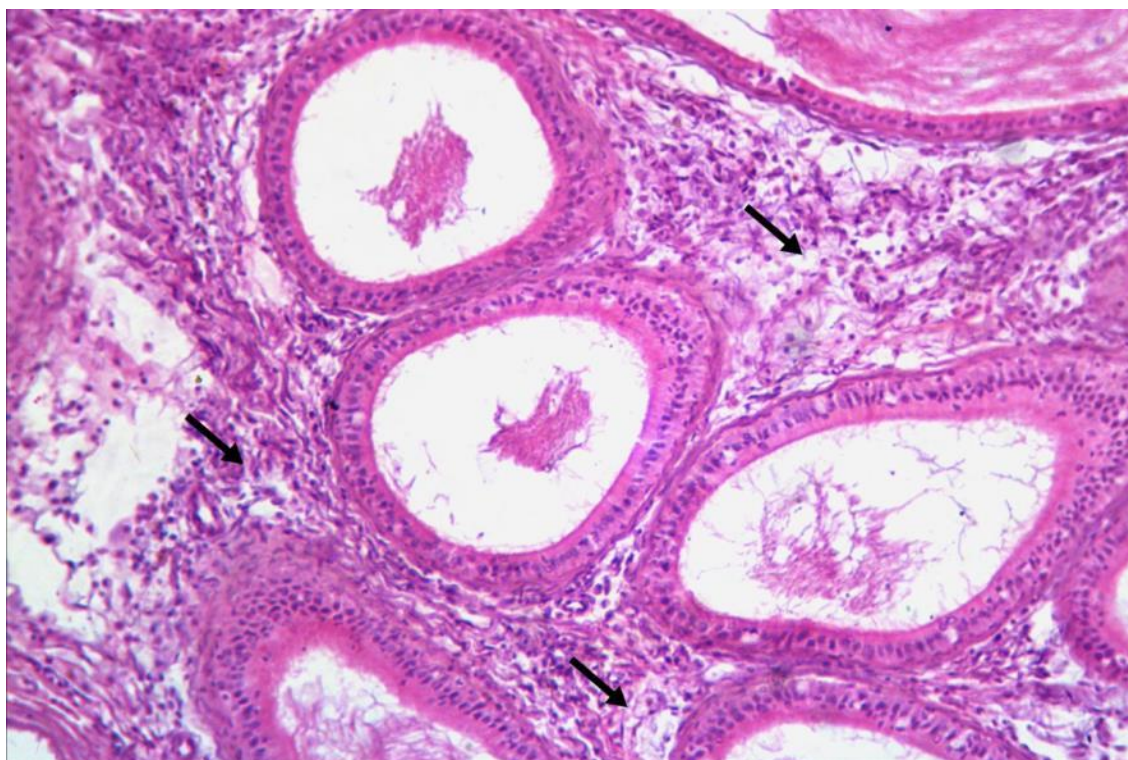


Рис. 6.16. Мікрофотографія придатку сім'яника тварини віком 6 місяців групи «НЧС+Р-234». Стрілкою позначено ділянки розростання сполучної тканини. Забарвлення гематоксилином Бемера та еозином, зб.  $\times 100$ .

### **6.3. Морфо-функціональна характеристика передміхурової залози тварин 1-місячного віку різних експериментальних груп**

Передміхурова залоза тварин віком 1 місяць контрольної групи складалась із ацинусів округлої чи полігональної форми, які були вистелені епітелієм різної висоти – від плоского до низького циліндричного (рис. 6.17). Цитоплазма секреторних епітеліоцитів була інтенсивно базофільною, а в апікальній частині клітини розміщувалась просвітлена ділянка. Ядра клітин були різної форми: від вузьких овальних до округлих, – залежно від форми клітини. В середині ацинусів містився аморфний пухкий еозинофільний секрет, а також невелика кількість краплин секрету, оточених плазмолемою. В епітеліальному шарі деяких секреторних відділів спостерігали утворення складчастості, хоча розмір та кількість складок були незначними. Зовнішньосекреторні частини залози були оточені пухкою сполучною тканиною, в якій проходили середнього розміру

помірно кровонаповнені кровоносні судини. Відносний об'єм епітелію в контрольній групі складав  $35,18 \pm 0,54$  %.

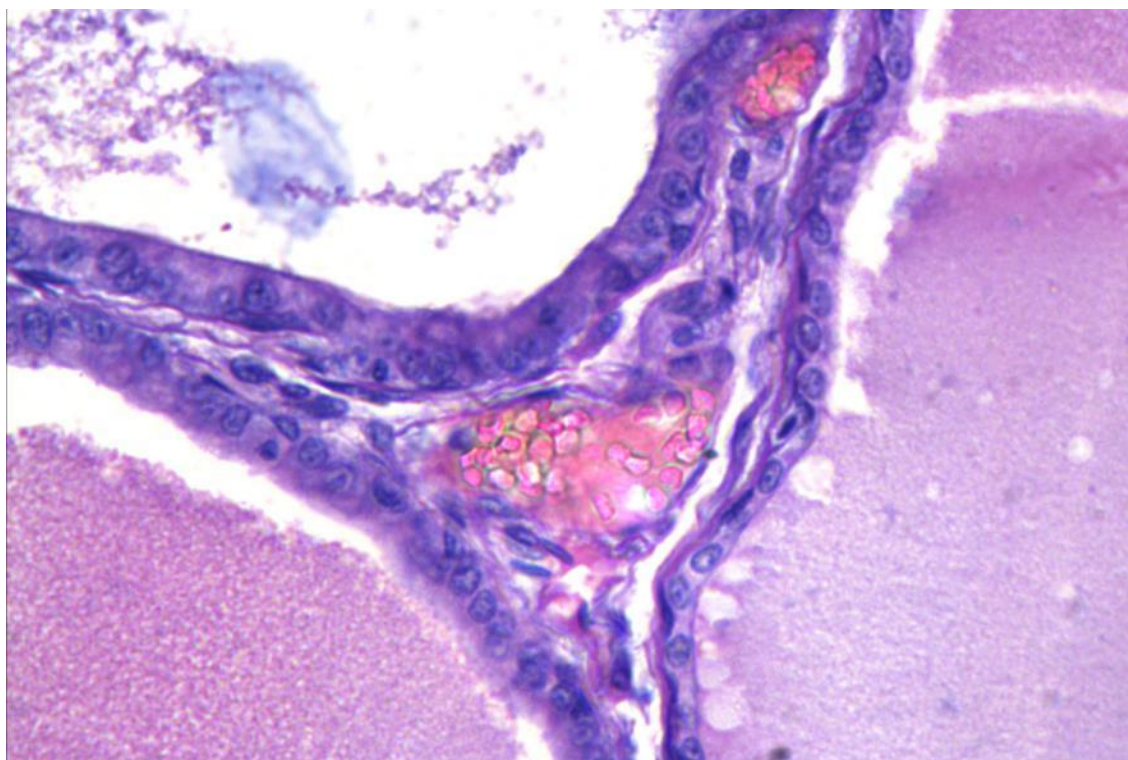


Рис. 6.17. Мікрофотографія вентральної передміхурової залози тварини віком 1 місяць контрольної групи. Забарвлення гематоксином Бемера та еозином, зб.  $\times 400$ .

Введення розчинів ПФН та ДМСО не призвело до розвитку морфологічних змін в тканині залози. Більшість ацинусів були вистелені кубічним або невисоким циліндричним епітелієм, хоча також зустрічались локальні ділянки переважання плоского епітелію. Відносний об'єм епітелію становив  $35,31 \pm 0,62$  % та  $35,73 \pm 0,75$  % в групах ПФН та ДМСО відповідно. Обидва показники не відрізняються від контрольних значень.

Ін'єкції розчину КП-10 при одночасних введеннях фізіологічного розчину призвели до збільшення частки ацинусів, які вистелені призматичним епітелієм. В таких епітеліюцитах була чітко виражена апікальна світла зона. Спостерігали зростання кількості епітеліальних гребнів. В значній частині ацинусів відбувалось ущільнення еозинофільного секрету. Відносний об'єм епітелію передміхурової

залози становив  $36,07 \pm 0,70$  %, що не відрізняється від аналогічного показника контрольної групи (рис. 6.18).

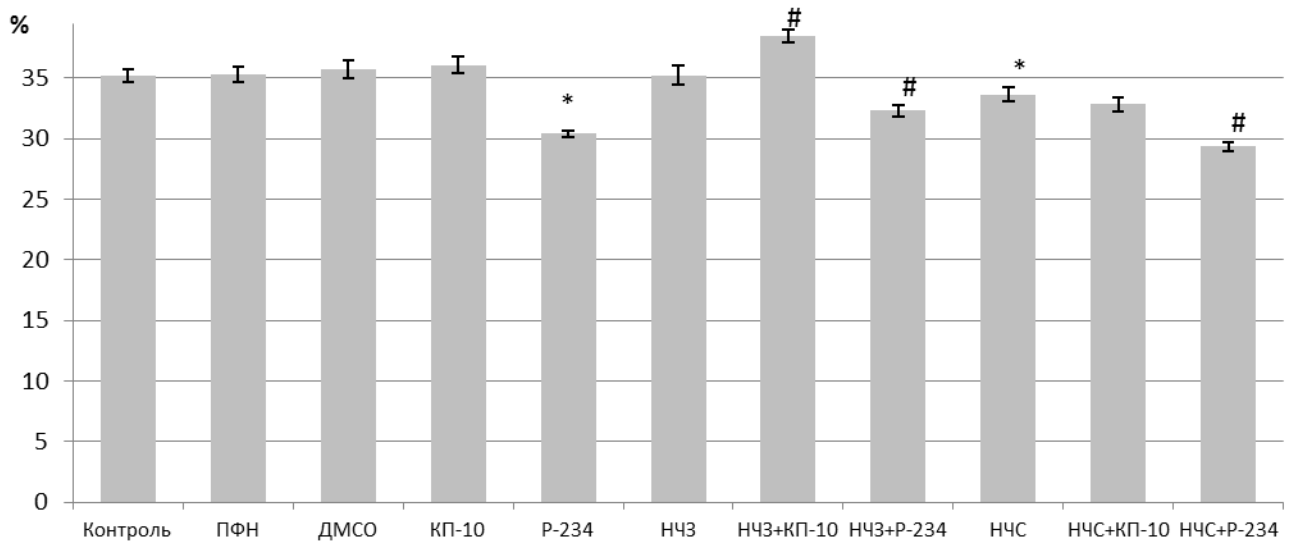


Рис. 6.18. Відносний об'єм епітелію вентральної частини передміхурової залози щурів віком 1 місяць.

Примітка: \* – різниця між контрольною та дослідною групою достовірна при  $p < 0,05$ ; # – різниця між групами «НЧЗ+КП-10», «НЧЗ+P-234», «НЧС+КП-10», «НЧС+P-234» та відповідною групою з введенням лише НЧЗ чи НЧС достовірна при  $p < 0,05$ .

В передміхуровій залозі тварин групи «P-234» спостерігали збільшення частки секреторних відділів, що вистелені плоским чи кубічним епітелієм. В середині ацинусів спостерігали розрідження еозинофільного секрету, а також зменшувалась його абсолютна кількість. Також збільшувалась частка пухкої сполучної тканини, яка оточувала окремі секреторні відділи. Відносний об'єм епітеліального шару складав  $30,41 \pm 0,30$  %, що достовірно менше за контрольні значення.

Введення розчину НЧЗ не призвело до зміни відносного об'єму епітелію, який складав  $35,24 \pm 0,83$  %. Водночас, в тканині залози спостерігали появу ацинусів з невеликою кількістю розрідженого секрету або взагалі без такого. Строма органу була помірно розвинена. Не зважаючи на наявність секреторних відділів, вистелених високим призматичним епітелієм з добре видимою зоною

просвітлення в апікальній частині клітини, в значній кількості випадків епітеліоцити були плоскими чи кубічними (рис. 6.19).

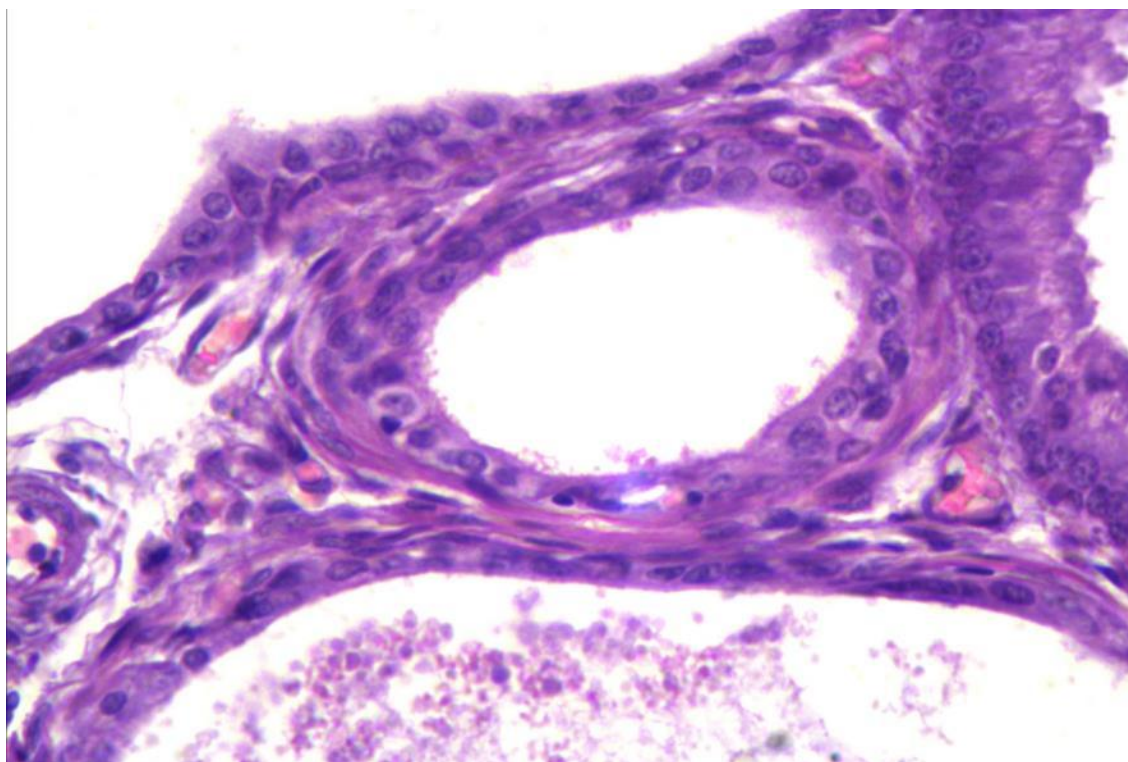


Рис. 6.19. Мікрофотографія передміхурової залози тварини віком 1 місяць групи «НЧЗ». Забарвлення гематоксилином Бемера та еозином, зб.  $\times 400$ .

Ін'єкції КП-10 в порожнину лівого шлуночка мозку на тлі введень розчину НЧЗ у черевну порожнину щурів призвели до зростання частки секреторних відділів, вистелених високим призматичним епітелієм. В таких ацинусах спостерігалась тенденція до утворення епітеліальних гребнів, а їхній вміст був представлений порівняно щільним еозинофільним секретом. Кількість сполучної тканини в залозі відповідала групі «НЧЗ». Відносний об'єм епітелію вентральної простати становив  $38,49 \pm 0,51$  %, що достовірно більше за відповідний показник групи тварин, які отримували лише ін'єкції нанорозмірного золота.

Введення Р-234 за аналогічних умов призвело до достовірного зменшення (порівняно з групою «НЧЗ») відносного об'єму епітелію вентральної частини передміхурової залози до  $32,32 \pm 0,48$  %. Візуально при цьому спостерігали збільшення частки ацинусів, вистелених плоским епітелієм, а також зменшення

кількості секрету в їхніх просвітах (рис. 6.20). Також збільшувалась кількість пухкої сполучної тканини між окремими секреторними відділами.

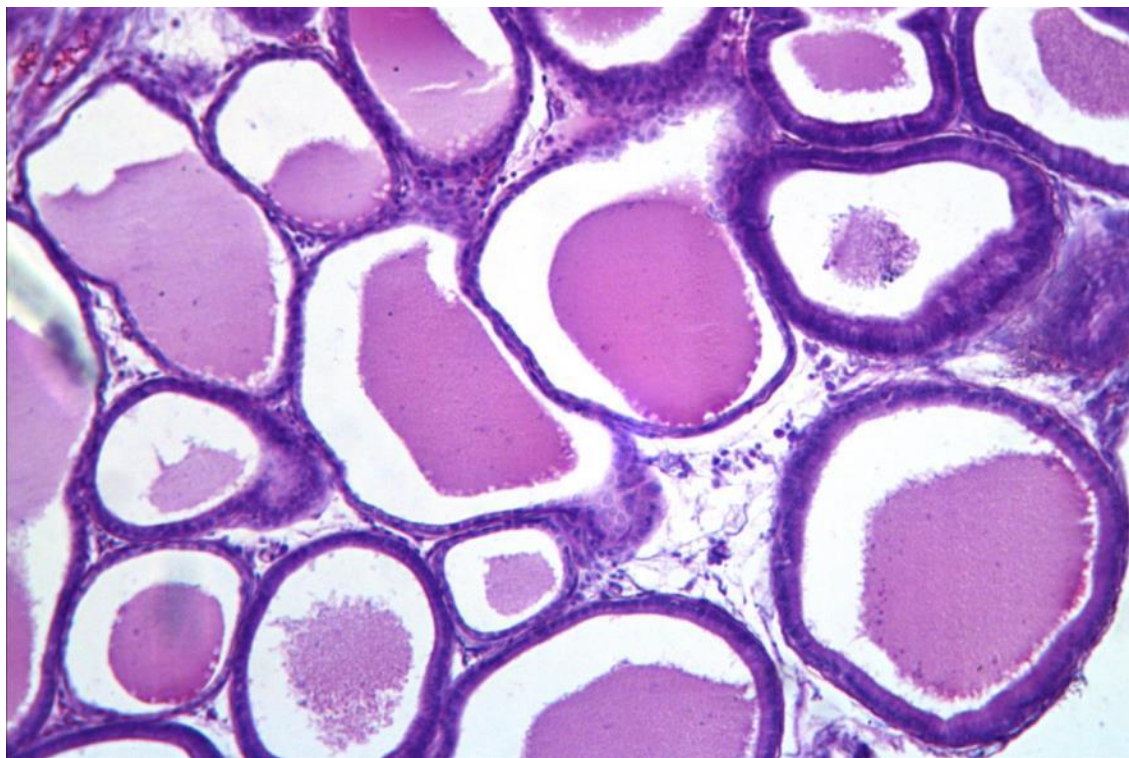


Рис. 6.20. Мікрофотографія вентральної передміхурової залози тварини віком 1 місяць групи «НЧЗ+Р-234». Забарвлення гематоксиліном Бемера та еозином, зб.  $\times 100$ .

В стромі передміхурової залози тварин групи «НЧС» було виявлено осередки моноцитарної інфільтрації (рис. 6.21), що супроводжувалось загальним збільшенням об'єму сполучної тканини. Секреторний епітелій залози був переважно плоским та кубічним, втім зустрічались ацинуси, вистелені призматичним епітелієм. Всередині секреторних відділів містився переважно пухкий розріджений секрет, його кількість була нижчою, ніж в контрольній групі. Відносний об'єм епітелію становив  $33,67 \pm 0,62\%$ , що достовірно менше за контрольну величину.

Сумісний вплив КП-10 та НЧС не призвів до розвитку морфологічних та морфометричних змін, порівняно з групою тварин, які отримували лише ін'єкції нанорозмірного срібла. Співвідношення між різними типами епітеліоцитів, вміст пухкої сполучної тканини та стан секрету також відповідали групі «НЧС».

Відносний об'єм епітелію становив  $32,84 \pm 0,57\%$ , що не відрізняється від аналогічного параметру групи «НЧС».

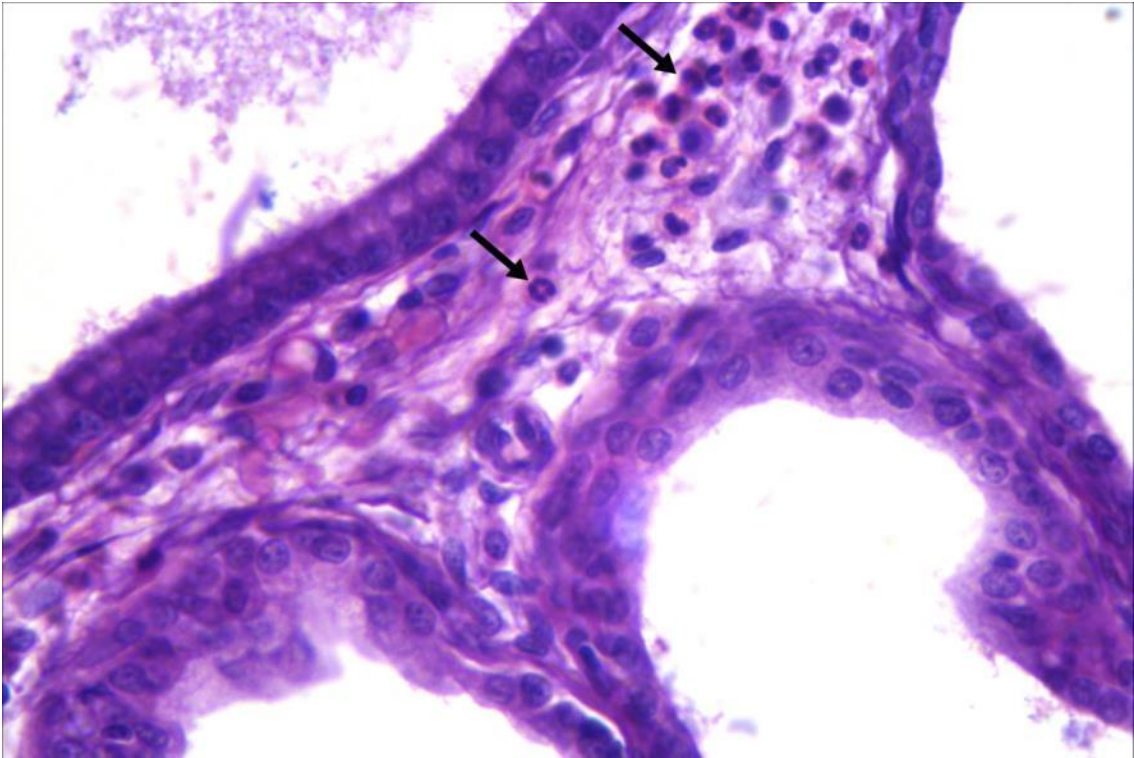


Рис. 6.21. Мікрофотографія передміхурової залози тварини віком 1 місяць групи «НЧС». Стрілкою позначено ділянки лейкоцитарної інфільтрації. Забарвлення гематоксиліном Бемера та еозином, зб.  $\times 400$ .

В групі «НЧС+Р-234» спостерігали розростання строми передміхурової залози разом з переважанням плоского епітелію в секреторних відділах. Секрет залози був розрідженим, водночас багато ацинусів на зрізах були порожніми. Відносний об'єм епітелію становив  $29,36 \pm 0,34\%$ , що достовірно менше, ніж в групі «НЧС».

#### **6.4. Морфо-функціональна характеристика передміхурової залози тварин 6-місячного віку різних експериментальних груп**

Секреторна частина вентральної передміхурової залози щурів контрольної групи віком 6 місяців була представлена двома типами ацинусів. Меншу частину, переважно на периферії залози, становили порівняно невеликі секреторні відділи,

вистелені циліндричним епітелієм, який утворював численні складки. В таких ацинусах розташовувався помірно еозинофільний пухкий секрет. В центральній частині залози містились переважно великі секреторні відділи, вистелені кубічним епітелієм та заповнені великою кількістю щільного секрету. Між різними ацинусами розташовувались тонкі прошарки сполучної тканини, в яких проходили кровоносні судини (рис. 6.22). Відносний об'єм епітелію передміхурової залози становив  $32,54 \pm 0,84$  %.

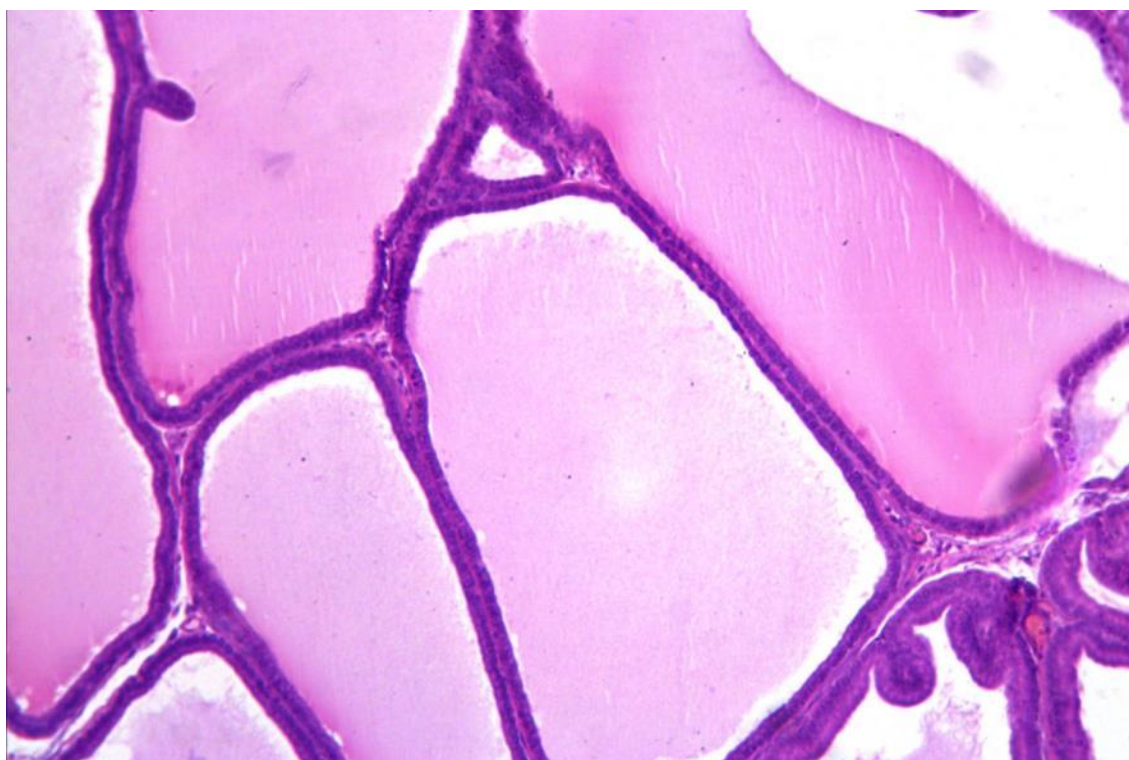


Рис. 6.22. Мікрофотографія вентральної передміхурової залози тварини віком 6 місяців контрольної групи. Забарвлення гематоксиліном Бемера та еозином, зб.  $\times 100$ .

Введення розчинів ПФН та ДМСО не призвело до достовірних морфологічних та морфометричних змін в тканині передміхурової залози. Поліморфність ацинусів зберігалась на рівні контрольної групи, так само як і ступінь розвитку сполучнотканинної стромы. Ознак запалення чи новоутворень виявлено не було. Відносний об'єм епітелію вентральної простати складав  $32,22 \pm 0,76$  % та  $31,77 \pm 0,69$  % для груп «ПФН» та «ДМСО» відповідно. Обидва параметри не відрізняються від контрольного значення (рис. 6.23).

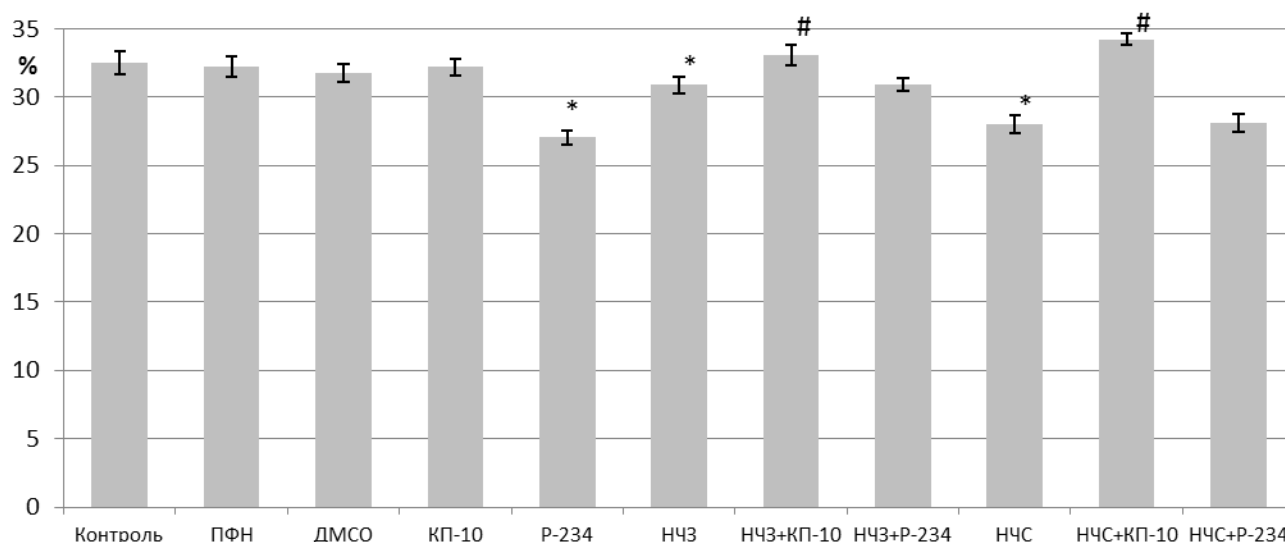


Рис. 6.23. Відносний об'єм епітелію вентральної частини передміхурової залози щурів віком 6 місяців.

Примітка: \* – різниця між контрольною та дослідною групою достовірна при  $p < 0,05$ ; # – різниця між групами «НЧЗ+КП-10», «НЧЗ+P-234», «НЧС+КП-10», «НЧС+P-234» та відповідною групою з введенням лише НЧЗ чи НЧС достовірна при  $p < 0,05$ .

Будова передміхурової залози групи «КП-10» відповідала контрольним зразкам. В тканині простати виявляли наявність різних типів ацинусів, водночас щільність та еозинофільність секрету були вищими, ніж в контролі. Об'єм сполучнотканинних прошарків був незначним. Відносний об'єм епітелію становив  $32,21 \pm 0,61$  %, що не відрізняється від контрольних значень. В той же час, введення P-234 сумісно з внутрішньоочеревинними ін'єкціями фізіологічного розчину призвело до зменшення кількості секрету у просвітах ацинусів. Водночас з'являлись секреторні відділи, вистелені плоским епітелієм. Також спостерігали фокальне розростання сполучнотканинної строми. Відносний об'єм епітелію становив  $27,03 \pm 0,50$  %, що достовірно менше за відповідний показник контрольної групи.

Введення НЧС призвело до достовірного зменшення об'єму епітелію до  $28,00 \pm 0,64$  %. При цьому спостерігали зростання частки секреторних відділів, вистелених з плоским чи кубічним епітелієм та помірне розростання строми.

Ін'єкції КП-10 при одночасному введенні НЧС призвели до зростання кількості секреторних відділів, вистелених призматичним епітелієм. Водночас, у більшості ацинусів секрет був світлим, розрідженим. Також відмічали розростання строми органу. На додаток, окрім нормальних ацинусів в залозі фіксували локальну дегенерацію секреторного епітелію: в таких ділянках ацинуси були вистелені плоским епітелієм, а їхній вмісту був представлений клітинним детритом та еозинофільним кристалічним матеріалом (рис. 6.24). Наявність подібних відкладень часто супроводжує розвиток багатьох патологічних процесів, у першу чергу запалень [243].

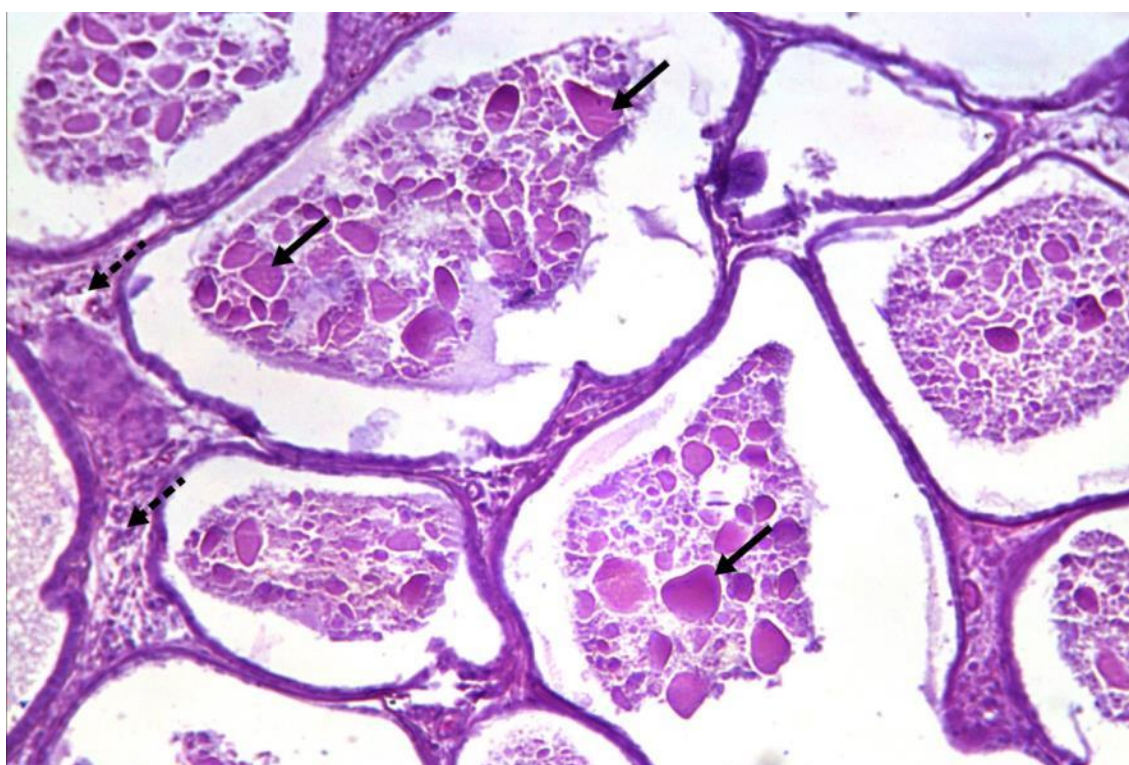


Рис. 6.24. Мікрофотографія передміхурової залози тварини віком 6 місяців групи «НЧС+КП-10». Суцільною стрілкою позначено еозинофільні утворення в порожнині ацинусів, пунктирною – ділянки розростання сполучнотканинної строми. Забарвлення гематоксиліном Бемера та еозином, зб.  $\times 100$ .

Відносний вміст епітелію передміхурової залози становив  $34,21 \pm 0,41$  %, що достовірно вище за показник групи «НЧС». Сумісні введення НЧС та Р-234 призвели до розростання сполучнотканинної строми органу. При цьому спостерігалась значна поліморфність секреторного епітелію – від плоского до

високого призматичного (рис. 6.25). Вміст секрету в ацинусах був помірним. Відносний об'єм епітелію був рівний  $28,10 \pm 0,65$  %, що не відрізняється від аналогічного параметру групи «НЧС».

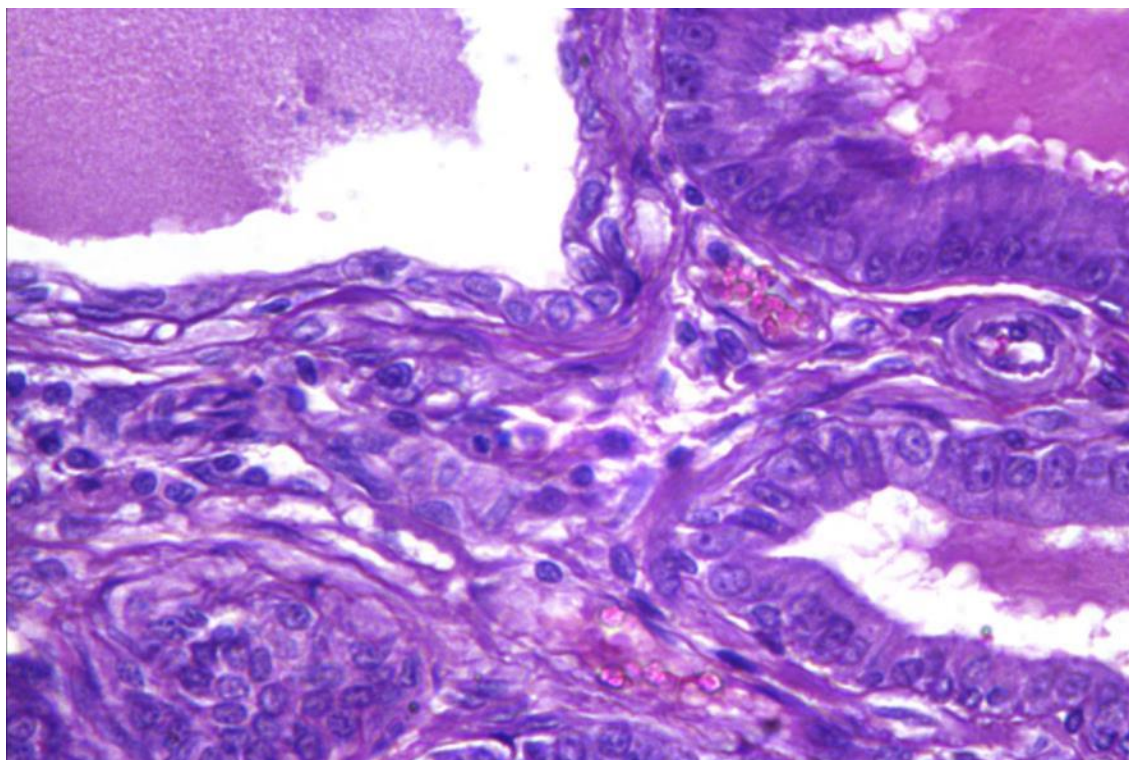


Рис. 6.25. Мікрофотографія вентральної передміхурової залози тварини віком 6 місяців групи «НЧС+Р-234». Забарвлення гематоксилином Бемера та еозином, зб.  $\times 400$ .

Ін'єкції НЧЗ щурами 6-місячного віку призвели до достовірного зменшення відносного об'єму секреторного епітелію до  $30,88 \pm 0,59$  %. Морфологічно спостерігали розрідження вмісту ацинусів та дифузне розростання сполучної тканини. Поодинокі ацинуси були вистелені плоским епітелієм, в той час як інші – кубічним чи високим призматичним.

Морфологічно передміхурова залоза тварин групи «НЧЗ+КП-10» була подібною до зразків групи «НЧЗ». Кількість еозинофільної субстанції в секреторних відділах залози відповідала показникам групи тварин, які отримували ін'єкції лише нанорозмірного золота. Втім, кількість ацинусів з плоским епітелієм зменшилась і вони зустрічались лише поодинокі. Відносний

об'єм епітелію передміхурової залози становив  $33,08 \pm 0,73$  %, що достовірно більше за аналогічний параметр групи «НЧЗ».

В тканині вентральної частини передміхурової залози групи «НЧЗ+Р-234» спостерігали розвиток дегенеративних змін (рис. 6.26). Відмічали ділянки розростання стромы, а також збільшення частки ацинусів, вистелених плоским епітелієм. Відносний об'єм епітелію становив  $30,92 \pm 0,48$  %, що не відрізняється від аналогічного показника групи «НЧЗ».

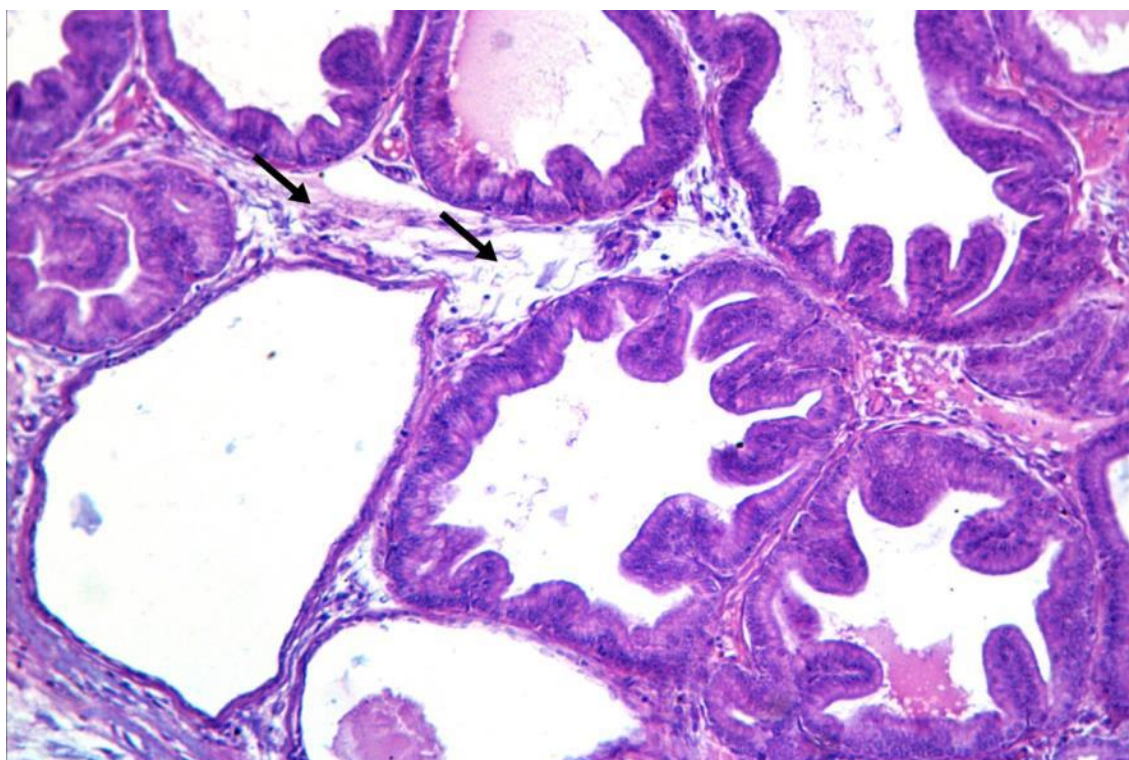


Рис. 6.26. Мікрофотографія вентральної передміхурової залози тварини віком 6 місяців групи «НЧЗ+Р-234». Стрілкою позначено ділянку збільшення об'єму сполучнотканинної стромы. Забарвлення гематоксиліном Бемера та еозином, зб.  $\times 100$ .

Підсумовуючи, слід зазначити, що, аналогічно до інших досліджених нами структур, морфо-функціональний стан придатку сім'яника та передміхурової залози 6-місячних тварин свідчить про високий рівень активності статеві системи, в той час як 1-місячних – про незавершеність процесу статевого дозрівання.

Вплив КП на придаток сім'яника проявлявся в першу чергу у збільшенні ядер головних епітеліоцитів, в той час висота клітин залишалась без змін. Поява більшої кількості сперматогенних клітин за впливу Р-234 узгоджується з нашими даними щодо порушення ходу сперматогенезу за дії цього антагоніста. Наночастинки обох металів справляли пригнічуючий вплив на активність придатків сім'яників, хоча НЧС, але не НЧЗ нівелювали стимулюючий вплив КП-10 у молодих тварин. Водночас, морфологічні зміни в тканині придатка сім'яника були більш вираженими в групах 6-місячних тварин. Розростання сполучної тканини, яке часто спостерігали при дії НЧ, може бути як опосередкованим наслідком порушення гормонального балансу, так і результатом безпосереднього пошкоджуючого впливу на орган.

Дія КП-10 на передміхурову залозу щурів не проявлялась у зростанні відносного об'єму епітелію, хоча було виявлено морфологічні ознаки активізації органу. Водночас, Р-234 призводив до достовірного зниження функціональної активності простати. Дія ж НЧ обох металів призводила до розвитку запальних процесів та дегенеративних явищ, в обох вікових групах. Втім, сумісні введення НЧ та КП-10 призводили до активізації залози, що може бути пов'язане із сенситизацією простати на тлі пригнічуючої дії НЧ.

## РОЗДІЛ 7

### АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Біологічні властивостей НЧ металів значною мірою залежать не лише від характеристик власне частинок, а й від складу розчину, в якому знаходяться наноструктури [21,86,244]. Оскільки в нашому експерименті обидва типи наночастинок були стабілізовані розчином ПФН, було виокремлено групу тварин, які отримували лише ін'єкції відповідної кількості цієї речовини. Було встановлено, що введення ПФН не вплинуло на морфо-функціональний стан жодної із досліджуваних структур. Таким чином, можна стверджувати, що виявлені нами біологічні ефекти розчинів наночастинок золота та срібла обумовлені впливом саме нанометалів.

**Аркуатне ядро гіпоталамусу.** Слід зазначити, що хоча нейрони АЯ обох вікових груп мали нормальну морфологію, морфо-функціональний стан нейроцитів АЯ 6-місячних щурів відповідав стану вищої, порівняно з нейронами молодих тварин, функціональної активності. Це може свідчити про незавершеність процесу статевого дозрівання у 1-місячних щурів.

Відомо, що вплив екзогенного КП на морфо-функціональний стан нейроцитів АЯ гіпоталамусу може залежати від віку та загального гормонального статусу тварин, оскільки саме в цьому ядрі синтезується основна частка КП [54,220]. У різних дослідженнях продемонстровано можливість як активації, так і пригнічення нейронів АЯ за введення КП [50,240]. У нашому досліді ми спостерігали пригнічення активності нейронів АЯ за інтрацеребровентрикулярних ін'єкцій КП-10. Водночас дія антагоніста рецепторів до КП була діаметрально протилежною. Такий характер відповіді з боку клітин АЯ спостерігався для обох вікових груп. Можна припустити, що вищеописані ефекти є проявом нормальних регуляторних механізмів за принципом негативного зворотного зв'язку.

Незважаючи на доведену можливість проникнення НЧ через ГЕБ, порівняно мало існує інформації щодо змін в конкретних мозкових структурах за впливу наноматеріалів, особливо стосовно гіпоталамічних структур. Так, у дослідях

проведених Kwon та співавт. було продемонстровано накопичення флуоресцентних наночастинок в тканині мозку взагалі, без деталізації їхньої локалізації та ефектів [64]. В інших досліджах було продемонстровано активацію апоптичних процесів у гіпокампальній ділянці і, як наслідок, пригнічення процесів запам'ятовування при введенні НЧ оксиду титану [245]. Загалом, більшість дослідників відмічають активацію запальних процесів в тканині мозку при потраплянні НЧ [91,107].

Введення розчинів НЧЗ та НЧС в умовах нашого досліду призвело до достовірного зменшення площі перерізу ядер нейронів, що свідчить про пригнічення їхньої функціональної активності [246]. Водночас, нейрони тварин 1-місячного віку зберігали здатність негативно реагувати на екзогенний КП навіть за дії нанометалів, хоча морфометричних змін на введення Р-234 не відмічали. В групах 6-місячних щурів, навпаки, комбіновані введення НЧ та КП не призводили до подальшого пригнічення нейронів, а от за дії антагоніста KISS1R відмічали зростання площі перерізу ядер. Така різниця у відповіді може бути пов'язана з більшою чутливістю нейроцитів АЯ до дії НЧ або з незрілістю регуляторних взаємодій у молодих тварин.

Зазначимо, що хоча в різних вікових групах НЧ по-різному вплинули на здатність нейронів реагувати на зміну кіссептин-опосередкованих взаємодій, нами не було виявлено ознак розвитку патологічних процесів, у тому числі запалення. Отримані результати дозволяють припустити, що вплив НЧ на нейроцити АЯ не був пов'язаний із безпосереднім порушенням роботи кіссептинергічної системи. Найімовірніше, дія НЧ на нейрони була не прямою, а опосередкована позагіпоталамічною зміною рівнів гормонів або метаболітів.

**Преоптичне ядро гіпоталамусу.** В площі поперечного перерізу нейронів ПОЯ існували значні вікові відмінності. Оскільки саме в цій ділянці міститься основна частина ГнРГ-продукуючих нейронів [166,192,247], виявлена нами різниця морфометричних параметрів вказує на загально нижчий рівень ГТГС у молодих тварин, що підтверджує вихідну гіпотезу про їхню статеву незрілість.

Дія КП на ГнРГ-продукуючі нейрони є багатогранною. В численних дослідженнях продемонстровано комплексний стимулюючий ефект КП. Так, з одного боку, КП стимулює транскрипцію генів, необхідних для синтезу гонадоліберинів, а з іншого безпосередньо стимулює секрецію ГнРГ в портальну систему [248–250]

У нашому досліді не було виявлено позитивного впливу КП-10 на площу перерізу ядра нейронів ПОЯ у молодих тварин. В той же час спостерігали достовірне збільшення площі перетину ядер в групі «КП-10» 6-місячних щурів. Водночас, пригнічуючу дію Р-234 реєстрували в обох вікових групах. Виявлені відмінності можуть свідчити про низький рівень чутливості ГнРГ-продукуючих нейронів до зміни концентрації КП, що є характерним для деяких етапів статевого дозрівання [211,212,221]. З іншого боку, у досліді Zhao та Kriegsfield [251] було продемонстровано, що КП-опосередкована стимуляція транскрипції генів ГнРГ-продукуючими нейронами реалізується лише у дуже вузькому діапазоні концентрацій, а тому відсутність стимулюючого впливу КП у молодих тварин може бути пов'язана із невідповідністю створеної в тканині концентрації екзогенного КП цьому оптимуму.

В результаті введення як НЧЗ, так і НЧС, спостерігали зменшення площі перерізу ядер нейронів ПОЯ, що корелює з результатами, отриманими в АЯ. Водночас, ін'єкції КП на тлі дії НЧ не призвели до зміни площі перерізу ядер нейронів навіть у тварин віком 6 місяців. Пригнічуюча ж дія Р-234 зберігалась. Така зміна цитофізіологічних ефектів КП може бути пов'язана із безпосередньою цитотоксичною дією НЧЗ та НЧС на ГнРГ-нейрони. Однак, оскільки в тканині гіпоталамуса при цьому не було виявлено розвитку патологічних змін, а також не було зафіксовано інтенсифікацію апоптичних процесів, найбільш імовірним є опосередкований вплив НЧ через модуляцію активності КП-синтезуючих нейронів.

Таким чином, нейрони ПОЯ, найімовірніше, не є безпосередньою мішенню впливу НЧ на активність ГГГС.

**Гонадотропоцити аденогіпофіза.** Питання щодо функціональної гетерогенності гонадотропоцитів до сих пір залишається остаточно невирішеним. Імунологічні дослідження показують, що часто в гонадотропоцитах міститься лише один з двох тропних гормонів – ФСГ чи ЛГ [252]. Водночас в тканині аденогіпофіза завжди ідентифікуються також клітини, які секретують обидва ці гормони. Також є свідчення на користь відмінності морфології та сприйнятливості деяких барвників ФСГ- та ЛГ-синтезуючими клітинами [236,237,253,254]. Втім, найбільш розповсюдженою на сьогодні є думка про те, що популяція гонадотропоцитів є більш-менш однорідною, а окремі клітини здатні змінювати свій секреторний профіль впродовж життя [252,255]. Тому під час гістологічних досліджень ми не диференціювали гонадотропні базофіли аденогіпофіза.

Гонадотропоцити контрольних тварин різних вікових груп були подібними за розмірами, хоча ядра, а тому й ЯЦС, були більшими у дорослих особин. Окрім того, більш світлий колір цитоплазми, який спостерігали в гонадотропоцитах цих тварин, означає швидше виведення секрету з клітини. Тому можна стверджувати про вищий рівень функціональної активності гонадотропних базофілів аденогіпофіза у 6-місячних щурів, порівняно з одномісячними.

З літературних даних відомо про можливість безпосереднього впливу КП на гонадотропоцити [205]. Однак, оскільки КП та його антагоніст нами вводились інтрацеребровентрикулярно, ми припускаємо лише опосередковану активацію через залучення гіпоталамічних структур. Вплив КП-10 був однаковим для обох вікових груп. Морфометрично відмічали зростання площі перерізу ядра і цитоплазми, при чому у дорослих тварин збільшення об'єму цитозолу відбувалось непропорційно до зміни об'єму ядра, що викликало зменшення ЯЦС. Блокада кіссептинергічної сигналізації не викликала морфометричних змін, хоча спостерігали накопичення секрету в клітинах. Виявлені нами зміни цілком відповідають сучасним уявленням про стимулюючу роль КП в регуляції роботи гонадотропоцитів аденогіпофіза [256,257].

Безпосередня дія НЧ різного складу на аденогіпофіз є малодослідженою. визначення активності гонадотропоцитів у сучасній літературі в основному спирається на визначення рівнів ФСГ та ЛГ в крові піддослідних тварин. В дослідженнях Лі та співавт. [138] було продемонстровано відсутність змін вказаних тропних гормонів при дії НЧЗ. З іншого боку, є повідомлення про компенсаторне посилення ендокринної функції аденогіпофіза за дії НЧС [152].

В умовах нашого експерименту вплив НЧЗ та НЧС на щурів 1-місячного віку призвів до достовірного зменшення об'єму цитозолу та зменшення рівнів виведення секрету, що проявлялось у зміни забарвлення клітини на темно-фіолетовий, а також сильним розвитком макули, в якій містяться цистерни апарату Гольджі. Слід зауважити, що у попередніх дослідженнях було продемонстровано, що вплив НЧ на компоненти репродуктивної системи самців призводить до пригнічення синтезу тестостерону, але не тропних гормонів [152]. У нашому експерименті вперше було продемонстровано наявність центрального пригнічуючого впливу НЧ. Стимулюючий вплив КП-10 не спричинив збільшення розміру цитоплазми, хоча в групі «НЧС+КП-10» спостерігали достовірне зростання площі перетину ядра.

У тварин 6-місячного віку виявили нормальну відповідь гонадотропоцитів на дію КП-10 при сумісних з НЧС введеннях. Водночас, в групі «НЧЗ+КП-10» спостерігали лише збільшення об'єму ядер при незмінності розмірів цитоплазми, що може свідчити про порушення внутрішньоклітинних регуляторних процесів.

Таким чином, гонадотропоцити молодих тварин виявилися більш чутливими до дії НЧ. При цьому дія НЧЗ виявилась більш токсичною, ніж дія НЧС, в обох вікових групах. Можливим поясненням цього явища є потенційна тропність НЧЗ до ендокринних клітин, хоча це питання потребує подальшого дослідження.

**Сім'яники.** Звивисті сім'яні каналці щурів 1-місячного віку були досить добре розвиненими. Окрім того, що власне стінка каналцю була побудована з нормальної кількості шарів клітин, всередині деяких з них виявляли нормальної будови сперматозоїди. Втім, розмір люмену та інтерстиціальної тканини дозволяє

стверджувати про репродуктивну незрілість цих тварин. Натомість, звивисті сім'яні каналці дорослих тварин мали широкий просвіт, часто заповнений сперматозоїдами і морфологічні ознаки високої функціональної активності клітин Лейдіга. Ці дані говорять про нормальну активність сім'яників 6-місячних тварин. Морфологічні дані додатково підтверджуються біохімічними, адже вміст ТС в плазмі крові контрольних дорослих щурів в 4 рази перевищував аналогічний показник молодих тварин.

Стимулюючий вплив КП на роботу як ендокринної так і сперматогенної частин сім'яника підтверджується багатьма дослідженнями [165,214,258,259]. Аналогічно, у нашому досліді дія КП-10 проявлялась в достовірному підвищенні функціональної активності сім'яників за усіма досліджуваними показниками. При цьому спостерігали як покращення морфологічного стану тканини сім'яника, так і достовірне підвищення концентрації ТС в плазмі крові. Дія Р-234 при цьому не призводила до яких-небудь морфометричних змін. Однак в сім'яниках молодих та, меншою мірою, дорослих тварин помічали ознаки дегенерації сперматогенних клітин. Такі зміни є однією із найбільш ранніх ознак зниження рівня ТС [243]. Дійсно, за даних умов спостерігали достовірне зменшення концентрації ТС в крові 6-місячних тварин та недостовірне – в 1-місячних. Останній факт може бути пояснений загалом нижчим рівнем функціональної активності ГГГС.

Гігантські багатоядерні клітини, які також спостерігали при зниженні активності сім'яників в різних групах, також є ознакою зменшення концентрації ТС. Ці клітини утворюються внаслідок злиття декількох сперматогенних (в першу чергу сперматид) внаслідок гормон-залежного руйнування контактів із клітинами Сертолі [243].

Токсичні ефекти НЧ різного складу щодо морфо-функціонального стану сім'яників описані у багатьох дослідженнях. Дослідники відмічають в першу чергу пригнічення ендокринної функції сім'яника та порушення гістоархітектури органу [136,143,151]. Водночас, виявлені зміни як правило пов'язують лише із безпосереднім впливом наноструктур на компоненти сім'яників [152].

В нашому досліді дія НЧЗ на сім'яник за морфологічними проявами була схожою на вплив Р-234, хоча наявність більшої кількості зморщених каналців свідчить про нижчий рівень ТС. Це дозволяє припустити наявність ТС-опосередкованого впливу НЧЗ на морфо-функціональний стан сім'яника [260–265]. При введеннях Р-234 сумісно з НЧЗ, як і передбачалось, спостерігали ознаки значного зниження рівня ТС, що проявлялось у розвитку різноманітних гістопатологічних змін в обох вікових групах [266]. Водночас, в групах «НЧЗ+КП-10» спостерігали виникнення протиріччя між даними морфометричного та імунологічних аналізів: не зважаючи на достовірне зниження площі ядер клітин Лейдіга, спостерігали значне зростання вмісту ТС в плазмі крові. Аналогічні дані було отримано з групи «НЧС+КП-10», хоча зростання концентрації гормону було не таким різким.

Можливим поясненням такого протиріччя є особливості впливу ЛГ на клітини Лейдіга. Власне дія ЛГ є двокомпонентною: з одного боку активізується робота ферментів, які займаються утворенням тестостерону, а з іншого запускається транскрипція відповідних генів. За часом розвитку ці два види клітинної відповіді можна назвати «швидким» та «повільним». У розвитку обох типів реакцій задіяні цАМФ та протеїназа А [267–269].

Відповідно, високий рівень ТС при дії КП-10 на тлі впливу НЧ можна пояснити взаємодією в клітинах Лейдіга двох регуляторних механізмів: дія КП-10, а далі й ГнРГ, призводить до активації швидкої клітинної відповіді, але повільна відповідь так і не ініціюється. Причиною такої зміни клітинної чутливості найімовірніше є внутрішньоклітинний стрес внаслідок безпосередньої цитотоксичної дії НЧ, хоча загальна зміна гормонального статусу організму також можлива.

Дія НЧС на сім'яник призводила до розвитку тяжчих, ніж у групах «НЧЗ» гістопатологічних змін. Дегенерація сім'яних каналців та часткова ексфоціація сперматогенних клітин можуть бути результатом як прямого токсичного впливу, так і опосередковуватись змінами концентрації тестостерону [270–273].

Таким чином, НЧЗ та НЧС пригнічують функціональну активність сім'яників щурів обох вікових груп, при чому токсична дія НЧС є більш вираженою. Найімовірнішою мішенню дії НЧ в сім'яниках є клітини Лейдіга. В цих клітинах НЧ порушують роботу систем внутрішньоклітинної сигналізації, що веде до зменшення концентрації ТС в крові.

**Придатки сім'яників.** Основною функцією придатку сім'яника є забезпечення проходження останніх стадій формування сперматозоїдів. Відповідно, дослідження вмісту придаткових каналців дозволяє оцінити процеси сперміації та порушення ходу сперматогенезу.

В нашому експерименті було встановлено, що в придатку сім'яника контрольних щурів 1-місячного віку містилась значна кількість сперматогенних клітин. Це вказує на недосконалість процесу сперматогенезу у даних тварин, що пов'язане із їхньою статевію незрілістю [243]. Водночас, придатки дорослих тварин були заповнені великою кількістю сперматозоїдів, майже без сторонніх клітин, що свідчить про високі якість та інтенсивність сперматогенезу.

Відомо, що робота придатків сім'яників значною мірою залежить від рівня статевих стероїдів в організмі. Окрім того встановлено, що на роботу епітеліоцитів придатку може впливати не тільки ТС, а й безпосередньо ФСГ та ЛГ [274–276].

В нашому дослідженні дія КП-10 в обох вікових групах була подібною і призводила до зростання всіх вимірюваних морфометричних параметрів. Інгібування кіссептинергічної передачі, навпроти, призводило до зменшення лише площі перерізу ядер. Такі результати підтверджують значну гормонзалежність тканини придатку.

Вплив НЧ різного складу на тканину придатків сім'яника є малоз'ясованим. Увага дослідників в основному звернута на стан сперматозоїдів, що проходять модифікації у різних відділах придатку [136,142,277].

В нашому експерименті дія НЧЗ в обох вікових групах була подібною та призводила до достовірного зменшення площі перерізу ядер головних епітеліоцитів. У тварин 6-місячного віку одночасно розвивалась вакуолярна

дегенерація яка, однак, не вплинула на висоту клітин. При цьому епітеліоцити нормально реагували на введення екзогенного КП-10. Зазначимо, що чорна аморфна субстанція, виявлена у зразках групи «НЧЗ+КП-10» 1-місячного віку, найімовірніше є агрегатом НЧЗ. Сумісне введення Р-234 та НЧЗ призвело до значного спаду якості вмісту каналцю при збереженні морфометричних показників на рівні «НЧЗ». Отримані дані підтверджують інформацію про розвиток функціональних порушень в тканині сім'яника.

Дія НЧС була подібною до НЧЗ, але токсичні ефекти були більш виражені. Наприклад, у 1-місячних тварин групи «НЧС+КП-10» морфометричні показники не відрізнялись від значень «НЧС», хоча 6-місячні тварини реагували нормально. Більш того, одночасне пригнічення ГГГС за рахунок дії Р-234 та НЧС призвело до розвитку дегенеративних процесів в придатках дорослих тварин.

Отже, вплив НЧС та НЧЗ на морфо-функціональний стан придатку сім'яника був інгібуючим. При цьому відмічали наявність вікової (молоді були більш чутливими) та якісної (НЧС більш токсичні за НЧЗ) залежності.

**Передміхурова залоза.** Фокальні атрофічні явища є цілком нормальними для тканини передміхурової залози [243]. Водночас, в передміхуровій залозі 1-місячних тварин контрольної групи виявляли значний ступінь гетерогенності ацинусів та малий вміст секрету, що свідчить про невисокий рівень функціональної активності залози. Напроти, в простаті 6-місячних тварин зустрічалась велика кількість заповнених секретом ацинусів, що обумовило меншу величину відносного об'єму епітелію у дорослих щурів, порівняно з молодими [261].

Дія КП-10 на залозу проявлялась в першу чергу не морфометрично, а морфологічно та супроводжувалась зростанням кількості та щільності секрету. Вплив Р-234 був повністю протилежним – спостерігали розростання сполучної тканини та одночасне зменшення кількості секрету у секреторних відділах. Наявність чіткої реакції з боку залози у відповідь на пригнічення активності кіссептинергічної системи додатково підтверджує гормонзалежний характер регуляції функціонування простати [278,279].

Дія НЧЗ на морфо-функціональний стан передміхурової залози обох груп в нашому дослідженні була подібною. Спостерігали зменшення якості секрету з одночасним розростанням стромы. Втім, у молодих, але не дорослих, тварин при цьому значно збільшувалась кількість плоского епітелію. Не зважаючи на це, відносний об'єм епітелію не змінився, що пов'язане із зменшенням розмірів самої простати. Стимулюючий вплив КП-10 не змінювався на тлі введення НЧЗ, однак ефекти Р-234 були значно посилені, особливо у статевонезрілих тварин, де спостерігали розвиток дистрофічних явищ у секреторному епітелії.

З літературних даних відомо, що НЧЗ можуть спричинити розвиток запальних явищ в тканині передміхурової залози [140]. В нашому експерименті ми виявили, що розвиток запальних процесів був спричинений введенням в першу чергу НЧС. При чому за одночасного введення НЧС та КП-10 дорослим щурам спостерігали локальну дегенерацію епітелію та появу еозинофільних кристалів, що може свідчити про порушення процесів репарації та проліферації [243]. Дія КП-10 на організм молодих щурів не призвела до змін, порівняно з НЧС. Пригнічуючий вплив Р-234 спостерігали лише в групі одномісячних тварин.

**Вікові особливості впливу наночастинок.** Враховуючи складність обробки та великий обсяг даних, нанотоксикологічні дослідження в основному проводяться на тваринах лише однієї вікової групи [67,103,147,280,281]. Певним винятком є дослідження щодо впливу наноматеріалів на структури плоду та подальший постнатальний розвиток [282–284]. Оскільки наше дослідження було зосереджено на компонентах репродуктивної системи, активність якої значно відрізняється на різних етапах онтогенезу, визначення вікових особливостей дії НЧ є вкрай важливим.

Нами було продемонстровано, що в усіх досліджуваних структурах загальний характер відповіді на введення НЧ був подібним для обох вікових груп. Виявлені патологічні процеси (наприклад, розвиток запалення в передміхуровій залозі), також були в тій чи іншій мірі представлені і у дорослих, і у молодих тварин.

Водночас, нами були відмічені і певні відмінності, в першу чергу у відповіді досліджуваних структур на КП-опосередковану стимуляцію. Встановлено, що гонадотропоцити дорослих тварин за дії обох видів НЧ зберігали здатність відповідати на дію КП-10 та Р-234 аналогічно до контрольної групи, в той час в групах 1-місячних тварин за дії НЧЗ ця здатність була порушеною.

В сім'яниках статевонезрілих тварин різні порушення сперматогенезу за впливу обох видів НЧ відмічали частіше, ніж у 6-місячних тварин [265,266,270]. Також, дія КП на тлі введення НЧЗ та НЧС призвела до зменшення площі перерізу ядер клітин Лейдіга у 1-місячних тварин, хоча подібного ефекту у 6-місячних щурів виявлено не було.

В придатках сім'яників статевонезрілих тварин, на відміну від дорослих, частіше спостерігали гіоспермію та аспермію, кількість сперматогенних клітин та лейкоцитів була вищою. Також, лише у молодих тварин дія НЧС проявлялась у нівелюванні стимулюючого ефекту ін'єкцій КП. Водночас, вакуолізацію цитоплазми епітеліоцитів за дії НЧЗ відмічали лише у 6-місячних щурів [261].

Аналогічно, в передміхуровій залозі тварин обох вікових груп спостерігали розвиток запальних процесів, розростання сполучнотканинної стромы та пригнічення секреторної функції за дії НЧ. Але лише у статевонезрілих тварин дія КП-10 на тлі введення НЧС не призводила до зростання відносного об'єму епітелію.

Підсумовуючи, можна стверджувати, що, хоча загальні закономірності впливу НЧЗ та НЧС на кісспептин-опосередковану регуляцію репродуктивної системи були подібними в обох вікових групах, отримані нами дані свідчать про більш виражене порушення досліджуваних регуляторних механізмів у статевонезрілих тварин, порівняно із статевозрілими.

Таким чином, в ході проведених нами досліджень було встановлено, що наночастинки золота та срібла негативно впливають на морфо-функціональний стан компонентів репродуктивної системи самців щурів. Виявлено, що токсичні ефекти НЧ пов'язані одночасно як і з безпосереднім їхнім впливом на

функціональний стан статевих органів, так і з опосередкованим пригніченням роботи гіпоталамічних регуляторних центрів. Серед досліджених нами типів НЧ, срібло володіло найбільшою токсичністю. Найімовірніше, такий ефект пов'язаний із значним токсичним впливом йонів срібла, які за нормальних умов можуть виділятися з поверхні НЧС. Також в ході наших досліджень продемонстровано, що репродуктивна система статевонезрілих особини є більш сприйнятливою до дії НЧ, що може бути пов'язане із недорозвиненістю та недосконалістю регуляторних та компенсаторно-приспосувальних систем.

Враховуючи відомі літературні дані щодо регуляції роботи гіпоталамо-гіпофізарно-гонадної осі [54, 267], узагальнення отриманих нами даних щодо впливу НЧЗ та НЧС та репродуктивну систему наведено на рис. 7.1.

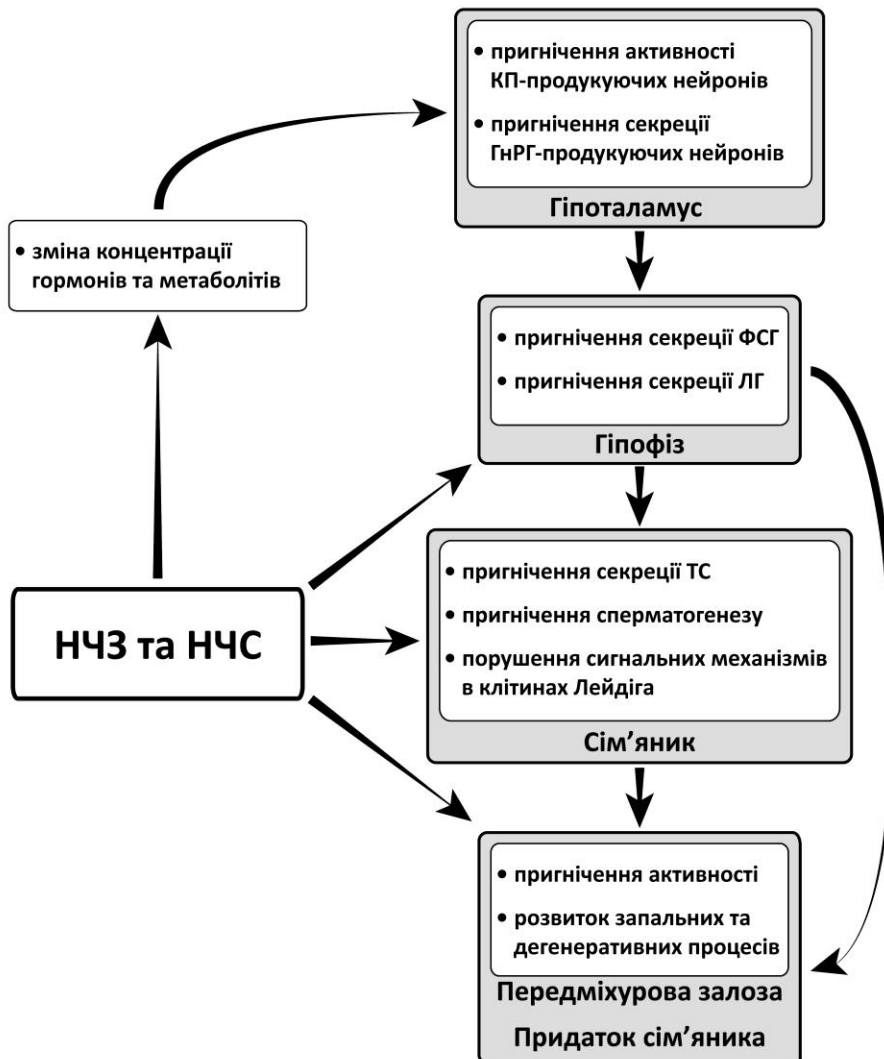


Рис. 7.1.Схема впливу наночастинок золота та срібла на репродуктивну систему самців щурів.

## 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 кісспептинергічної сигналізації;

2. Активність гонадотропоцитів аденогіпофіза знижувалась за введення наночастинок золота та срібла, при чому введення нанорозмірного золота блокувало кісспептин-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 кісспептину 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 кісспептин-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 кісспептин-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 ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Maynard AD. Don't define nanomaterials. *Nature*. 2011 Jul 6;475(7354):31–31.
2. Lu X, Liu Y, Kong X, Lobie PE, Chen C, Zhu T. Nanotoxicity: A growing need for study in the endocrine system. *Small*. 2013;9(9–10):1654–71.
3. Zhang X-F, Liu Z-G, Shen W, Gurunathan S. Silver nanoparticles: synthesis, characterization, properties, applications, and therapeutic approaches. *Int J Mol Sci*. 2016;17(9):1534.
4. Wilner OI, Willner B, Willner I. Nano-biotechnology for biomedical and diagnostic research. *Nano-Biotechnology Biomed Diagnostic Res*. 2012;733:97–114.
5. Vance ME, Kuiken T, Vejerano EP, McGinnis SP, Hochella MF, Rejeski D, et al. Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory. *Beilstein J Nanotechnol*. 2015 Aug 21;6:1769–80.
6. The Nanodatabase [Internet]. 2017 [cited 2017 Jul 8]. Available from: <http://nanodb.dk/>
7. Foss Hansen S, Heggelund LR, Revilla Besora P, Mackevica A, Boldrin A, Baun A. Nanoproducts – what is actually available to European consumers? *Environ Sci Nano*. 2016;3(1):169–80.
8. Nowack B, Krug HF, Height M. 120 Years of nanosilver history: implications for policy makers. *Environ Sci Technol*. 2011 Feb 15;45(4):1177–83.
9. Boudreau MD, Imam MS, Paredes AM, Bryant MS, Cunningham CK, Felton RP, et al. Differential effects of silver nanoparticles and silver ions on tissue accumulation, distribution, and toxicity in the sprague dawley rat following daily oral gavage administration for 13 weeks. *Toxicol Sci*. 2016;150(1):131–60.
10. McGillicuddy E, Murray I, Kavanagh S, Morrison L, Fogarty A, Cormican M, et al. Silver nanoparticles in the environment: sources, detection and ecotoxicology. *Sci Total Environ*. 2017 Jan;575:231–46.
11. Franci G, Falanga A, Galdiero S, Palomba L, Rai M, Morelli G, et al. Silver nanoparticles as potential antibacterial agents. *Molecules*. 2015;20(5):8856–74.

12. Piccinno F, Gottschalk F, Seeger S, Nowack B. Industrial production quantities and uses of ten engineered nanomaterials in Europe and the world. *J Nanoparticle Res.* 2012 Sep 19;14(9):1109.
13. Halbus AF, Horozov TS, Paunov VN. Colloid particle formulations for antimicrobial applications. *Adv Colloid Interface Sci.* 2017;249:134–48.
14. Сердюк АМ, Бабій ВФ, Корчак ГІ, Сурмашева ОВ, Томашевська ЛА, Кондратенко ОЄ, et al. Антимікробні та токсичні властивості наночастинок срібла у стабілізованих розчинах та у композиційній системі на основі високодисперсного кремнезему. *Environ Heal.* 2010;4:3–8.
15. Кістерська ЛД, Співак МЯ, Перевертайло ВМ, Лазаренко ЛМ, Садохін ВВ, Садохін ВП, et al. Нанодисперсні суспензії срібла та їхні антивірусні властивості. *Наноструктурное материаловедение.* 2010;(3):62–9.
16. Elechiguerra J, Burt JL, Morones JR, Camacho-Bragado A, Gao X, Lara HH, et al. Interaction of silver nanoparticles with HIV-1. *J Nanobiotechnology.* 2005;3(1):6.
17. Bogdanchikova N, Muñoz RV, Saquero AH, Jasso AP, Uzcanga GA, Díaz PLP, et al. Silver nanoparticles composition for treatment of distemper in dogs. *Int J Nanotechnol.* 2016;13(1/2/3):227.
18. Politano AD, Campbell KT, Rosenberger LH, Sawyer RG. Use of silver in the prevention and treatment of infections: silver review. *Surg Infect (Larchmt).* 2013;14(1):8–20.
19. Дыкман ЛА, Хлебцов НГ. Золотые наночастицы в биологии и медицине □: достижения последних лет и перспективы. *Acta Naturae.* 2011;3(2 (9)):36–58.
20. Trouiller AJ, Hebié S, El Bahhaj F, Napporn TW, Bertrand P. Chemistry for oncotheranostic gold nanoparticles. *Eur J Med Chem.* 2015;99:92–112.
21. Дыкман ЛА, Богатырев ВА. Наночастицы золота: получение, функционализация, использование в биохимии и иммунохимии. *Успехи химии.* 2007;76(2):199–213.
22. Rayavarapu RG, Petersen W, Ungureanu C, Post JN, Leeuwen TG, Manohar S. Synthesis and bioconjugation of gold nanoparticles as potential molecular probes

- for light-based imaging techniques. *Int J Biomed Imaging*. 2007;2007:1-10.
23. Cheng J, Gu Y-J, Cheng SH, Wong W-T. Surface functionalized gold nanoparticles for drug delivery. *J Biomed Nanotechnol*. 2013 Aug;9(8):1362–9.
  24. Asadi N, Davaran S, Panahi Y, Hasanzadeh A, Malakootikhah J, Fallah Moafi H, et al. Application of nanostructured drug delivery systems in immunotherapy of cancer: a review. *Artif cells, nanomedicine, Biotechnol*. 2017 Feb;45(1):18–23.
  25. Dreaden EC, Alkilany AM, Huang X, Murphy CJ, El-Sayed MA. The golden age: gold nanoparticles for biomedicine. *Chem Soc Rev*. 2012;41(7):2740–79.
  26. Klinman DM, Sato T, Shimosato T. Use of nanoparticles to deliver immunomodulatory oligonucleotides. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*. 2016 Jul;8(4):631–7.
  27. Shah M, Badwaik VD, Dakshinamurthy R. Biological applications of gold nanoparticles. *J Nanosci Nanotechnol*. 2014 Jan;14(1):344–62.
  28. Maughan CN, Preston SG, Williams GR. Particulate inorganic adjuvants: recent developments and future outlook. *J Pharm Pharmacol*. 2015 Mar;67(3):426–49.
  29. Carabineiro SAC. Applications of gold nanoparticles in nanomedicine: Recent advances in vaccines. *Molecules*. 2017;22(5).
  30. Rosa S, Connolly C, Schettino G, Butterworth KT, Prise KM. Biological mechanisms of gold nanoparticle radiosensitization. *Cancer Nanotechnol*. 2017;8(1):2.
  31. Cui L, Her S, Borst GR, Bristow RG, Jaffray DA, Allen C. Radiosensitization by gold nanoparticles: Will they ever make it to the clinic? *Radiother Oncol*. 2017;
  32. Raju GSR, Benton L, Pavitra E, Yu JS. Multifunctional nanoparticles: recent progress in cancer therapeutics. *Chem Commun*. 2015;51(68):13248–59.
  33. Haume K, Rosa S, Grellet S, Śmiałek MA, Butterworth KT, Solov'yov A V., et al. Gold nanoparticles for cancer radiotherapy: a review. *Cancer Nanotechnol*. 2016;7(1):8.
  34. Bucharskaya A, Maslyakova G, Terentyuk G, Yakunin A, Avetisyan Y, Bibikova O, et al. Towards effective photothermal/photodynamic treatment using plasmonic gold nanoparticles. *Int J Mol Sci*. 2016;17(8):1–26.

35. Shao J, Griffin RJ, Galanzha EI, Kim J-W, Koonce N, Webber J, et al. Photothermal nanodrugs: potential of TNF-gold nanospheres for cancer theranostics. *Sci Rep.* 2013;3:1–9.
36. Bhattacharyya K, Goldschmidt BS, Hannink M, Alexander S, Jurkevic A, Viator JA. Gold nanoparticle-mediated detection of circulating cancer cells. *Clin Lab Med.* 2012 Mar;32(1):89–101.
37. Majdalawieh A, Kanan MC, El-Kadri O, Kanan SM. Recent advances in gold and silver nanoparticles: synthesis and applications. *J Nanosci Nanotechnol.* 2014;14(7):4757–80.
38. Boote BW, Byun H, Kim JH. Silver-gold bimetallic nanoparticles and their applications as optical materials. *J Nanosci Nanotechnol.* 2014;14(2):1563–77.
39. Li J, Chang X, Chen X, Gu Z, Zhao F, Chai Z, et al. Toxicity of inorganic nanomaterials in biomedical imaging. *Biotechnol Adv.* 2014;32(4):727–43.
40. Sengupta J, Ghosh S, Datta P, Gomes A, Gomes A. Physiologically important metal nanoparticles and their toxicity. *J Nanosci Nanotechnol.* 2014;14(1):990–1006.
41. Tiedemann D, Taylor U, Rehbock C, Jakobi J, Klein S, Kues WA, et al. Reprotoxicity of gold, silver, and gold–silver alloy nanoparticles on mammalian gametes. *Analyst.* 2014;139(5):931–42.
42. Das J, Choi Y, Song H, Kim J. Potential toxicity of engineered nanoparticles in mammalian germ cells and developing embryos: treatment strategies and anticipated applications of nanoparticles in gene delivery. *Hum Reprod Update.* 2016;1–32.
43. Yoisungnern T, Choi Y, Han JW, Kang M, Das J, Gurunathan S, et al. Internalization of silver nanoparticles into mouse spermatozoa results in poor fertilization and compromised embryo development. *Sci Rep.* 2015;5(May):11170.
44. Ema M, Okuda H, Gamo M, Honda K. A review of reproductive and developmental toxicity of silver nanoparticles in laboratory animals. *Reprod Toxicol.* 2017;67:149–64.

45. Ema M, Gamo M, Honda K. Developmental toxicity of engineered nanomaterials in rodents. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2016;299:47–52.
46. Глушкова АВ, Раділов АС, Рембовський ВР. Нанотехнології і нанотоксикологія - взгляд на проблему. *Токсикологічний вестник*. 2007;(6):4–8.
47. Yildirim L, Thanh NTK, Loizidou M, Seifalian AM. Toxicological considerations of clinically applicable nanoparticles. *Nano Today*. 2011;6(6):585–607.
48. Бойчук ТМ, Андрійчук НЙ, Власик ЛІ. До проблеми оцінки токсичності наночастинок срібла. *Клінічна та експериментальна патологія*. 2012;11(4(42)):151–7.
49. Nameed S, Jayasena CN, Dhillon WS. Kisspeptin and fertility. *J Endocrinol*. 2011;208(2):97–105.
50. Tena-Sempere M. Keeping puberty on time. Novel signals and mechanisms involved. *Curr Top Dev Biol*. 1st ed. 2013;105:299–329.
51. Fuqua JS. Treatment and outcomes of precocious puberty: An update. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98(6):2198–207.
52. Sanchez-Garrido MA, Tena-Sempere M. Metabolic control of puberty: roles of leptin and kisspeptins. *Horm Behav*. 2013;64(2):187–94.
53. Матвієнко МГ, Пустовалов АС, Бузинська НО, Держинський МЕ. Морфофункціональні зміни в тестикулах щурів 24-місячного віку під впливом кіссептина на фоні блокади та активації альфа-адренорецепторів і при введенні мелатоніна. *Вісник проблем біології і медицини*. 2012;2(95):170–3.
54. Matvienko MG, Pustovalov AS, Dzerzhinsky NE. Variety of functions and effects of kisspeptin. *Biopolym Cell*. 2013 Jan 20;29(1):11–20.
55. Capco DG. Nanomaterial. Capco DG, Chen Y, editors. Dordrecht: Springer Netherlands; 2014. 514 p. (Advances in Experimental Medicine and Biology; vol. 811).
56. Aitken RJ, Chaudhry MQ, Boxall ABA, Hull M. Manufacture and use of

- nanomaterials: current status in the UK and global trends. *Occup Med (Lond)*. 2006 Aug;56(5):300–6.
57. Weir A, Westerhoff P, Fabricius L, Hristovski K, von Goetz N. Titanium dioxide nanoparticles in food and personal care products. *Environ Sci Technol*. 2012 Feb 21;46(4):2242–50.
  58. Lomer MCE, Hutchinson C, Volkert S, Greenfield SM, Catterall A, Thompson RPH, et al. Dietary sources of inorganic microparticles and their intake in healthy subjects and patients with Crohn's disease. *Br J Nutr*. 2004 Dec;92(6):947–55.
  59. Windler L, Lorenz C, von Goetz N, Hungerbühler K, Amberg M, Heuberger M, et al. Release of titanium dioxide from textiles during washing. *Environ Sci Technol*. 2012 Aug 7;46(15):8181–8.
  60. Benn TM, Westerhoff P. Nanoparticle silver released into water from commercially available sock fabrics. *Environ Sci Technol*. 2008 Jun;42(11):4133–9.
  61. Benn T, Cavanagh B, Hristovski K, Posner JD, Westerhoff P. The release of nanosilver from consumer products used in the home. *J Environ Qual*. 39(6):1875–82.
  62. Quadros ME, Pierson R, Tulse NS, Willis R, Rogers K, Thomas TA, et al. Release of silver from nanotechnology-based consumer products for children. *Environ Sci Technol*. 2013 Aug 6;47(15):8894–901.
  63. Quadros ME, Marr LC. Silver nanoparticles and total aerosols emitted by nanotechnology-related consumer spray products. *Environ Sci Technol*. 2011 Dec 15;45(24):10713–9.
  64. Kwon JT, Hwang SK, Jin H, Kim DS, Minai-Tehrani A, Yoon HJ, et al. Body distribution of inhaled fluorescent magnetic nanoparticles in the mice. *J Occup Health*. 2008;50(1):1–6.
  65. Pietroiusti A, Campagnolo L, Fadeel B. Interactions of engineered nanoparticles with organs protected by internal biological barriers. *Small*. 2013;9(9–10):1557–72.
  66. Geraets L, Oomen AG, Schroeter JD, Coleman V a., Cassee FR. Tissue

- distribution of inhaled micro- and nano-sized cerium oxide particles in rats: Results from a 28-day exposure study. *Toxicol Sci.* 2012;127(2):463–73.
67. Van Der Zande M, Vandebriel RJ, Van Doren E, Kramer E, Herrera Rivera Z, Serrano-Rojero CS, et al. Distribution, elimination, and toxicity of silver nanoparticles and silver ions in rats after 28-day oral exposure. *ACS Nano.* 2012;6(8):7427–42.
  68. Lee JH, Kim YS, Song KS, Ryu HR, Sung JH, Park JD, et al. Biopersistence of silver nanoparticles in tissues from Sprague-Dawley rats. *Part Fibre Toxicol.* 2013;10:36.
  69. Tassinari R, Cubadda F, Moracci G, Aureli F, D'Amato M, Valeri M, et al. Oral, short-term exposure to titanium dioxide nanoparticles in Sprague-Dawley rat: focus on reproductive and endocrine systems and spleen. *Nanotoxicology.* 2014;8(6):654–62.
  70. Sycheva LP, Zhurkov VS, Iurchenko V V., Daugel-Dauge NO, Kovalenko M a., Krivtsova EK, et al. Investigation of genotoxic and cytotoxic effects of micro- and nanosized titanium dioxide in six organs of mice in vivo. *Mutat Res - Genet Toxicol Environ Mutagen.* 2011;726(1):8–14.
  71. Lee Y, Kim P, Yoon J, Lee B, Choi K, Kil K-H, et al. Serum kinetics, distribution and excretion of silver in rabbits following 28 days after a single intravenous injection of silver nanoparticles. *Nanotoxicology.* 2012;7(February 2012):1–11.
  72. De Jong WH, Hagens WI, Krystek P, Burger MC, Sips AJAM, Geertsma RE. Particle size-dependent organ distribution of gold nanoparticles after intravenous administration. *Biomaterials.* 2008;29(12):1912–9.
  73. Leclerc L, Klein JP, Forest V, Boudard D, Martini M, Pourchez J, et al. Testicular biodistribution of silica-gold nanoparticles after intramuscular injection in mice. *Biomed Microdevices.* 2015;17(4):1–11.
  74. Morishita Y, Yoshioka Y, Takimura Y, Shimizu Y, Namba Y, Nojiri N, et al. Distribution of silver nanoparticles to breast and their biological effects on breast-fed offspring mice. 2016;10(9):8180–91.
  75. Semmler-Behnke M, Lipka J, Wenk A, Hirn S, Schäffler M, Tian F, et al. Size

- dependent translocation and fetal accumulation of gold nanoparticles from maternal blood in the rat. *Part Fibre Toxicol.* 2014 Dec 10;11(1):33.
76. Balasubramanian SK, Jittiwat J, Manikandan J, Ong C-N, Yu LE, Ong W-Y. Biodistribution of gold nanoparticles and gene expression changes in the liver and spleen after intravenous administration in rats. *Biomaterials.* 2010;31(8):2034–42.
  77. Lan Z, Yang W-X. Nanoparticles and spermatogenesis: how do nanoparticles affect spermatogenesis and penetrate the blood–testis barrier. *Nanomedicine.* 2012;7(4):579–96.
  78. Melnik EA, Buzulukov YP, Demin VF, Demin VA, Gmoshinski I V., Tyshko N V., et al. Transfer of silver nanoparticles through the placenta and breast milk during in vivo experiments on rats. *Acta Naturae.* 2013;5(18):107–15.
  79. Taylor U, Tiedemann D, Rehbock C, Kues WA, Barcikowski S, Rath D. Influence of gold, silver and gold-silver alloy nanoparticles on germ cell function and embryo development. *Beilstein J Nanotechnol.* 2015;6(1):651–64.
  80. Liu Y, Li H, Xiao K. Distribution and biological effects of nanoparticles in the reproductive system. *Curr Drug Metab.* 2016;17(5):478–96.
  81. Buerki-Thurnherr T, Von Mandach U, Wick P. Knocking at the door of the unborn child: Engineered nanoparticles at the human placental barrier. *Swiss Med Wkly.* 2012;142(April):1–9.
  82. Huppertz B. Nanoparticles: barrier thickness matters. *Nat Nanotechnol.* 2011;6(December):758–9.
  83. Kulvietis V, Zalgevicene V, Didziapetriene J, Rotomskis R. Transport of nanoparticles through the placental barrier. *Tohoku J Exp Med.* 2011;225:225–34.
  84. Kreyling WG, Semmler-Behnke M, Takenaka S, Möller W. Differences in the biokinetics of inhaled nano- versus micrometer-sized particles. *Acc Chem Res.* 2013 Mar 19;46(3):714–22.
  85. Schleh C, Semmler-Behnke M, Lipka J, Wenk A, Hirn S, Schäffler M, et al. Size and surface charge of gold nanoparticles determine absorption across intestinal barriers and accumulation in secondary target organs after oral administration. *Nanotoxicology.* 2012 Feb;6(1):36–46.

86. Arvizo RR, Bhattacharyya S, Kudgus R a., Giri K, Bhattacharya R, Mukherjee P. Intrinsic therapeutic applications of noble metal nanoparticles: past, present and future. *Chem Soc Rev.* 2012;41(7):2943–70.
87. Elder A, Gelein R, Silva V, Feikert T, Opanashuk L, Carter J, et al. Translocation of inhaled ultrafine manganese oxide particles to the central nervous system. *Environ Health Perspect.* 2006 Aug;114(8):1172–8.
88. Pelletier RM. The blood-testis barrier: the junctional permeability, the proteins and the lipids. *Prog Histochem Cytochem.* 2011;46(2):49–127.
89. Mital P, Hinton BT, Dufour JM. The blood-testis and blood-epididymis barriers are more than just their tight junctions. *Biol Reprod.* 2011;84(5):851–8.
90. Jiang X-H, Bukhari I, Zheng W, Yin S, Wang Z, Cooke HJ, et al. Blood-testis barrier and spermatogenesis: lessons from genetically-modified mice. *Asian J Androl.* 2014;16(4):572–80.
91. Park E-J, Bae E, Yi J, Kim Y, Choi K, Lee SH, et al. Repeated-dose toxicity and inflammatory responses in mice by oral administration of silver nanoparticles. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2010 Sep;30(2):162–8.
92. Monopoli MP, Åberg C, Salvati A, Dawson KA. Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials. *Nat Nanotechnol.* 2012 Dec 5;7(12):779–86.
93. Tenzer S, Docter D, Kuharev J, Musyanovych A, Fetz V, Hecht R, et al. Rapid formation of plasma protein corona critically affects nanoparticle pathophysiology. *Nat Nanotechnol.* 2013 Sep 22;8(10):772–81.
94. Wang L, Jiang X, Ji Y, Bai R, Zhao Y, Wu X, et al. Surface chemistry of gold nanorods: origin of cell membrane damage and cytotoxicity. *Nanoscale.* 2013 Sep 21;5(18):8384–91.
95. Deng ZJ, Liang M, Monteiro M, Toth I, Minchin RF. Nanoparticle-induced unfolding of fibrinogen promotes Mac-1 receptor activation and inflammation. *Nat Nanotechnol.* 2011 Jan 19;6(1):39–44.
96. Shi J, Sun X, Lin Y, Zou X, Li Z, Liao Y, et al. Endothelial cell injury and dysfunction induced by silver nanoparticles through oxidative stress via IKK/NF-

- κB pathways. *Biomaterials*. 2014 Aug;35(24):6657–66.
97. Zhang Y, Mu Q, Zhou H, Vrijens K, Roussel MF, Jiang G, et al. Binding of carbon nanotube to BMP receptor 2 enhances cell differentiation and inhibits apoptosis via regulating bHLH transcription factors. *Cell Death Dis*. 2012 May 10;3:e308.
  98. Tang M, Xing T, Zeng J, Wang H, Li C, Yin S, et al. Unmodified CdSe quantum dots induce elevation of cytoplasmic calcium levels and impairment of functional properties of sodium channels in rat primary cultured hippocampal neurons. *Environ Health Perspect*. 2008 Mar 31;116(7):915–22.
  99. Mu Q, Hondow NS, Krzemiński Ł, Brown AP, Jeuken LJ, Routledge MN. Mechanism of cellular uptake of genotoxic silica nanoparticles. *Part Fibre Toxicol*. 2012;9(1):29.
  100. Zhao Y, Sun X, Zhang G, Trewyn BG, Slowing II, Lin VS-Y. Interaction of mesoporous silica nanoparticles with human red blood cell membranes: size and surface effects. *ACS Nano*. 2011 Feb 22;5(2):1366–75.
  101. Wang L, Chen C. Pathophysiologic mechanisms of biomedical nanomaterials. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2016;299:30–40.
  102. Fu PP, Xia Q, Hwang H-M, Ray PC, Yu H. Mechanisms of nanotoxicity: generation of reactive oxygen species. *J Food Drug Anal*. 2014 Mar;22(1):64–75.
  103. Ferreira GK, Cardoso E, Vuolo FS, Michels M, Zanoni ET, Carvalho-Silva M, et al. Gold nanoparticles alter parameters of oxidative stress and energy metabolism in organs of adult rats. *Biochem Cell Biol*. 2015;93(6):548–57.
  104. Kim S, Ryu D-Y. Silver nanoparticle-induced oxidative stress, genotoxicity and apoptosis in cultured cells and animal tissues. *J Appl Toxicol*. 2013 Feb;33(2):78–89.
  105. Xia T, Kovochich M, Brant J, Hotze M, Sempf J, Oberley T, et al. Comparison of the abilities of ambient and manufactured nanoparticles to induce cellular toxicity according to an oxidative stress paradigm. *Nano Lett*. 2006 Aug;6(8):1794–807.
  106. Culcasi M, Benameur L, Mercier A, Lucchesi C, Rahmouni H, Asteian A, et al. EPR spin trapping evaluation of ROS production in human fibroblasts exposed to

- cerium oxide nanoparticles: evidence for NADPH oxidase and mitochondrial stimulation. *Chem Biol Interact.* 2012 Sep 30;199(3):161–76.
107. Feng X, Chen A, Zhang Y, Wang J, Shao L, Wei L. Central nervous system toxicity of metallic nanoparticles. *Int J Nanomedicine.* 2015;10:4321–40.
108. Teodoro JS, Simões AM, Duarte F V, Rolo AP, Murdoch RC, Hussain SM, et al. Assessment of the toxicity of silver nanoparticles in vitro: a mitochondrial perspective. *Toxicol In Vitro.* 2011 Apr;25(3):664–70.
109. Gaillet S, Rouanet J. Silver nanoparticles: Their potential toxic effects after oral exposure and underlying mechanisms - A review. *Food Chem Toxicol.* 2014;77C:58–63.
110. Boyoglu C, Boyoglu-Barnum S, Soni S, He Q, Willing G, Miller ME, et al. The intracellular co-localizations of different size of gold nanoparticles. *NSTI-Nanotech 2011.* 2011;3:489–92.
111. Skuridin SG, Dubinskaya V a., Rudoy VM, Dement'eva O V., Zakhidov ST, Marshak TL, et al. Effect of gold nanoparticles on DNA package in model systems. *Dokl Biochem Biophys.* 2010;432(1):141–3.
112. Ordzhonikidze CG, Ramaiyya LK, Egorova EM, Rubanovich AV. Genotoxic effects of silver nanoparticles on mice in vivo. *Acta Naturae.* 2009;1(3):99–101.
113. Jia Y-P, Ma B-Y, Wei X-W, Qian Z-Y. The in vitro and in vivo toxicity of gold nanoparticles. *Chinese Chem Lett.* 2017 Apr;28(4):691–702.
114. McShan D, Ray PC, Yu H. Molecular toxicity mechanism of nanosilver. *J Food Drug Anal.* 2014 Mar;22(1):116–27.
115. Fröhlich E. Cellular elimination of nanoparticles. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2016;46:90–4.
116. Serda RE, Mack A, van de Ven AL, Ferrati S, Dunner K, Godin B, et al. Logic-embedded vectors for intracellular partitioning, endosomal escape, and exocytosis of nanoparticles. *Small.* 2010 Dec 6;6(23):2691–700.
117. Elgrabli D, Dachraoui W, Ménard-Moyon C, Liu XJ, Bégin D, Bégin-Colin S, et al. Carbon nanotube degradation in macrophages: live nanoscale monitoring and understanding of biological pathway. *ACS Nano.* 2015 Oct 27;9(10):10113–24.

118. Žalgevičiene V, Kulvietis V, Bulotiene D, Didžiapetriene J, Rotomskis R. The effect of nanoparticles in rats during critical periods of pregnancy. *Med.* 2012;48(5):256–64.
119. Gao G, Ze Y, Zhao X, Sang X, Zheng L, Ze X, et al. Titanium dioxide nanoparticle-induced testicular damage, spermatogenesis suppression, and gene expression alterations in male mice. *J Hazard Mater.* 2013;258–259:133–43.
120. Syrvatka VJ, Slyvchuk YI, Rozgoni II, Gevkan II, Shtapenko O V. Effect of silver nanoparticles on maturation of rabbit's oocytes co-cultures with granulosa cells in vitro. *Stud Biol.* 2015;9(1):57–66.
121. Xiong X, Arvizo RR, Saha S, Robertson DJ, McMeekin S, Bhattacharya R, et al. Sensitization of ovarian cancer cells to cisplatin by gold nanoparticles. *Oncotarget.* 2014 Aug 15;5(15):6453–65.
122. Dayal N, Singh D, Patil P, Thakur M, Vanage G, Joshi DS. Effect of bioaccumulation of gold nanoparticles on ovarian morphology of female zebrafish (*Danio rerio*). *World J Pathol.* 2017;6(1):1–12.
123. Yang H, Sun C, Fan Z, Tian X, Yan L, Du L, et al. Effects of gestational age and surface modification on materno-fetal transfer of nanoparticles in murine pregnancy. *Sci Rep.* 2012;2:847.
124. Taylor U, Barchanski A, Kues W, Barcikowski S, Rath D. Impact of metal nanoparticles on germ cell viability and functionality. *Reprod Domest Anim.* 2012;47:359–68.
125. Massarsky A, Dupuis L, Taylor J, Eisa-Beygi S, Streck L, Trudeau VL, et al. Assessment of nanosilver toxicity during zebrafish (*Danio rerio*) development. *Chemosphere.* 2013;92(1):59–66.
126. Pineda L, Sawosz E, Hotowy A, Elnif J, Sawosz F, Ali A, et al. Effect of nanoparticles of silver and gold on metabolic rate and development of broiler and layer embryos. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 2012;161(3):315–9.
127. Sikorska J, Szmidt M, Sawosz E, Niemiec T, Grodzik M, Chwalibog A. Can silver nanoparticles affect the mineral content, structure and mechanical properties of chicken embryo bones? *J Anim Feed Sci.* 2010 May 9;19(2):286–91.

128. Zielinska M, Sawosz E, Grodzik M, Wierzbicki M, Gromadka M, Hotowy A, et al. Effect of heparan sulfate and gold nanoparticles on muscle development during embryogenesis. *Int J Nanomedicine*. 2011;6:3163–72.
129. Söderstjerna E, Johansson F, Klefbohm B, Englund Johansson U. Gold- and silver nanoparticles affect the growth characteristics of human embryonic neural precursor cells. *PLoS One*. 2013;8(3):1–13.
130. Kong L, Tang M, Zhang T, Wang D, Hu K, Lu W, et al. Nickel nanoparticles exposure and reproductive toxicity in healthy adult rats. *Int J Mol Sci*. 2014;15(11):21253–69.
131. Wang Z, Chen Z, Zuo Q, Song F, Wu D, Cheng W, et al. Reproductive toxicity in adult male rats following intra-articular injection of cobalt-chromium nanoparticles. *J Orthop Sci*. 2013;18(6):1020–6.
132. Komatsu T, Tabata M, Kubo-Irie M, Shimizu T, Suzuki K, Nihei Y, et al. The effects of nanoparticles on mouse testis Leydig cells in vitro. *Toxicol Vitro*. 2008;22(8):1825–31.
133. Cao Y, Wang D, Li Q, Deng H, Shen J, Zheng G, et al. Rat testis damage caused by lead sulfide nanoparticles after oral exposure. *J Nanosci Nanotechnol*. 2016;16(3):2378–83.
134. Nazari M, Talebi AR, Sharifabad MH, Khoradmehr A, Danafar AH. Acute and chronic effects of gold nanoparticles on sperm parameters and chromatin structure in Mice. 2016;14(10):637–42.
135. Taylor U, Barchanski A, Petersen S, Kues WA, Baulain U, Gamrad L, et al. Gold nanoparticles interfere with sperm functionality by membrane adsorption without penetration. *Nanotoxicology*. 2014 Aug 31;8(sup1):118–27.
136. Zakhidov ST, Pavlyuchenkova SM, Marshak TL, Rudoy VM, Dement'eva O V., Zelenina IA, et al. Effect of gold nanoparticles on mouse spermatogenesis. *Biol Bull*. 2012 May 14;39(3):229–36.
137. Velikorodnaya YI, Pocheptsov AY, Sokolov OI, Bogatyrev VA, Dykman LA. Effect of gold nanoparticles on proliferation and apoptosis during spermatogenesis in rats. *Nanotechnologies Russ*. 2015;10:814–9.

138. Li W-Q, Wang F, Liu Z-M, Wang Y-C, Wang J, Sun F. Gold nanoparticles elevate plasma testosterone levels in male mice without affecting fertility. *Small*. 2012;(9):1–7.
139. Резников АГ. Репродуктивные мишени эндокринных дизрапторов. *Репродуктивная эндокринология*. 2014;3(17):14–21.
140. Салівоник ОА, Сачинська ОВ, Полякова ЛІ, Чайковська ЛВ. Вплив наночастинок золота на органи репродуктивної системи самців щурів. *Клінічна та експериментальна патологія*. 2015;2(52):176–9.
141. Biswas NM, Chattopadhyay A, Sarkar M. Effects of gold on testicular steroidogenic and gametogenic functions in immature male albino rats. *Life Sci*. 2004;76:629–36.
142. Gromadzka-Ostrowska J, Dziendzikowska K, Lankoff A, Dobrzyńska M, Instanes C, Brunborg G, et al. Silver nanoparticles effects on epididymal sperm in rats. *Toxicol Lett*. 2012;214:251–8.
143. Lafuente D, Garcia T, Blanco J, Sánchez DJ, Sirvent JJ, Domingo JL, et al. Effects of oral exposure to silver nanoparticles on the sperm of rats. *Reprod Toxicol*. 2016;60:133–9.
144. Han JW, Jeong J, Gurunathan S, Choi Y, Das J, Kwon D, et al. Male- and female-derived somatic and germ cell-specific toxicity of silver nanoparticles in mouse. *Nanotoxicology*. 2015;5390(October):1–13.
145. Asare N, Instanes C, Sandberg WJ, Refsnes M, Schwarze P, Kruszewski M, et al. Cytotoxic and genotoxic effects of silver nanoparticles in testicular cells. *Toxicology*. 2012;291(1–3):65–72.
146. Braydich-Stolle LK, Lucas B, Schrand A, Murdock RC, Lee T, Schlager JJ, et al. Silver nanoparticles disrupt GDNF/Fyn kinase signaling in spermatogonial stem cells. *Toxicol Sci*. 2010;116(2):577–89.
147. Thakur M, Gupta H, Singh D, Mohanty IR, Maheswari U, Vanage G, et al. Histopathological and ultra structural effects of nanoparticles on rat testis following 90 days (Chronic study) of repeated oral administration. *J Nanobiotechnology*. 2014;12(1):42.

148. Almansour M, Jarrar Q, Battah A. Histomorphometric alterations induced in the testicular tissues by variable sizes of silver nanoparticles. *J Reprod Med.* 2016;62(2455):1–19.
149. Zhang XF, Gurunathan S, Kim JH. Effects of silver nanoparticles on neonatal testis development in mice. *Int J Nanomedicine.* 2015;10:6243–56.
150. Sleiman HK, Romano RM, Oliveira CA De, Romano MA. Effects of prepubertal exposure to silver nanoparticles on reproductive parameters in adult male Wistar rats. *J Toxicol Environ Health A.* 2013;76(17):1023–32.
151. Baki ME, Miresmaili SM, Pourentezari M, Amraii E, Yousefi V, Spenani HR, et al. Effects of silver nano-particles on sperm parameters, number of Leydig cells and sex hormones in rats. *Iran J Reprod Med.* 2014;12(2):139–44.
152. Dziendzikowska K, Krawczyńska A, Oczkowski M, Królikowski T, Brzóska K, Lankoff A, et al. Progressive effects of silver nanoparticles on hormonal regulation of reproduction in male rats. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2016 Dec;313:35–46.
153. Lee J-HJ, Miele ME, Hicks DJ, Phillips KK, Trent JM, Weissman BE, et al. KiSS-1, a Novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene. *JNCI J Natl Cancer Inst.* 1996 Dec 4;88(23):1731–7.
154. Ohtaki T, Shintani Y, Honda S, Matsumoto H, Hori A, Kanehashi K, et al. Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. *Nature.* 2001 May 31;411(6837):613–7.
155. Kotani M, Detheux M, Vandenberghe A, Communi D, Vanderwinden JM, Le Poul E, et al. The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. *J Biol Chem.* 2001 Sep 14;276(37):34631–6.
156. Muir AI, Chamberlain L, Elshourbagy NA, Michalovich D, Moore DJ, Calamari A, et al. AXOR12, a novel human G protein-coupled receptor, activated by the peptide KiSS-1. *J Biol Chem.* 2001 Aug 3;276(31):28969–75.
157. Seminara SB, Messenger S, Chatzidaki EE, Thresher RR, Acierno JS, Shagoury JK, et al. The GPR54 gene as a regulator of puberty. *N Engl J Med.* 2003 Oct

- 23;349(17):1614–27.
158. Funes S, Hedrick JA, Vassileva G, Markowitz L, Abbondanzo S, Golovko A, et al. The KiSS-1 receptor GPR54 is essential for the development of the murine reproductive system. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;312(4):1357–63.
  159. Putteeraj M, Soga T, Ubuka T, Parhar IS. A “timed” kiss is essential for reproduction: lessons from mammalian studies. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2016;7(August):121.
  160. Skorupskaite K, George JT, Anderson RA. The kisspeptin-GnRH pathway in human reproductive health and disease. *Hum Reprod Update.* 2014;20(4):485–500.
  161. Pasquier J, Lafont AG, Tostivint H, Vaudry H, Rousseau K, Dufour S. Comparative evolutionary histories of kisspeptins and kisspeptin receptors in vertebrates reveal both parallel and divergent features. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2012;3(DEC):1–15.
  162. Drummond S, Bianco C, Kaiser UB. Kisspeptin signaling in reproductive biology. Vol. 784, *Kisspeptin signaling in reproductive biology.* 2013. 133-158 p.
  163. Mechaly AS, Viñas J, Piferrer F. The kisspeptin system genes in teleost fish, their structure and regulation, with particular attention to the situation in Pleuronectiformes. *Gen Comp Endocrinol.* 2013;188(1):258–68.
  164. Ji K, Ye L, Mason MD, Jiang WG. The Kiss-1/Kiss-1R complex as a negative regulator of cell motility and cancer metastasis (Review). *Int J Mol Med.* 2013;32(4):747–54.
  165. Matsui H, Asami T. Effects and therapeutic potentials of kisspeptin analogs: regulation of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. *Neuroendocrinology.* 2014;99(1):49–60.
  166. Alvarado M V, Carrillo M, Felip A. Expression of kisspeptins and their receptors, *gnrh-1/gnrhr-II-1a* and gonadotropin genes in the brain of adult male and female European sea bass during different gonadal stages. *Gen Comp Endocrinol.* 2013;187(April):104–16.
  167. Cvetković D, Babwah A V, Bhattacharya M. Kisspeptin/KISS1R system in breast

- cancer. *J Cancer*. 2013;4(8):653–61.
168. Taylor J, Pampillo M, Bhattacharya M, Babwah A V. Kisspeptin/KISS1R signaling potentiates extravillous trophoblast adhesion to type-I collagen in a PKC- and ERK1/2-dependent manner. *Mol Reprod Dev*. 2014;81(1):42–54.
  169. Babwah A V, Navarro VM, Ahow M, Pampillo M, Nash C, Fayazi M, et al. GnRH neuron-specific ablation of  $G\alpha_q/11$  results in only partial inactivation of the neuroendocrine-reproductive axis in both male and female mice: in vivo evidence for Kiss1r-coupled  $G\alpha_q/11$ -independent GnRH Secretion. *J Neurosci*. 2015;35(37):12903–16.
  170. Navenot JM, Wang Z, Chopin M, Fujii N, Peiper SC. Kisspeptin-10-induced signaling of GPR54 negatively regulates chemotactic responses mediated by CXCR4: A potential mechanism for the metastasis suppressor activity of kisspeptins. *Cancer Res*. 2005;65(22):10450–6.
  171. Peng J, Tang M, Zhang B-P, Zhang P, Zhong T, Zong T, et al. Kisspeptin stimulates progesterone secretion via the Erk1/2 mitogen-activated protein kinase signaling pathway in rat luteal cells. *Fertil Steril*. 2013;99(5):1436–1443.e1.
  172. Castaño JP, Martínez-Fuentes AJ, Gutiérrez-Pascual E, Vaudry H, Tena-Sempere M, Malagón MM. Intracellular signaling pathways activated by kisspeptins through GPR54: Do multiple signals underlie function diversity? *Peptides*. 2009;30(1):10–5.
  173. Seminara SB, DiPietro MJ, Ramaswamy S, Crowley WF, Plant TM. Continuous human metastin 45-54 infusion desensitizes G protein-coupled receptor 54-induced gonadotropin-releasing hormone release monitored indirectly in the juvenile male rhesus monkey (*Macaca mulatta*): A finding with therapeutic implications. *Endocrinology*. 2006;147(5):2122–6.
  174. Rather MA, Basha SH, Bhat IA, Sharma N, Nandanpawar P, Badhe M, et al. Characterization, molecular docking, dynamics simulation and metadynamics of kisspeptin receptor with kisspeptin. *Int J Biol Macromol*. 2017 Aug;101:241–53.
  175. Millar RP, Babwah A V. KISS1R: Hallmarks of an effective regulator of the neuroendocrine axis. *Neuroendocrinology*. 2015;101(3):193–210.

176. Lehman MN, Merkley CM, Coolen LM, Goodman RL. Anatomy of the kisspeptin neural network in mammals. *Brain Res.* 2010 Dec;1364:90–102.
177. Yeo S. Neuronal circuits in the hypothalamus controlling gonadotrophin-releasing hormone release: the neuroanatomical projections of kisspeptin neurons. *Exp Physiol.* 2013;98(11):1544–9.
178. Ramaswamy S, Guerriero KA, Gibbs RB, Plant TM. Structural interactions between kisspeptin and GnRH neurons in the mediobasal hypothalamus of the male rhesus monkey (*Macaca mulatta*) as revealed by double immunofluorescence and confocal microscopy. *Endocrinology.* 2008 Sep;149(9):4387–95.
179. Xu Z, Kaga S, Mochiduki A, Tsubomizu J, Adachi S, Sakai T, et al. Immunocytochemical localization of kisspeptin neurons in the rat forebrain with special reference to sexual dimorphism and interaction with GnRH neurons. *Endocr J.* 2012;59(2):161–71.
180. Kim J, Semaan SJ, Clifton DK, Steiner RA, Dhamija S, Kauffman AS. Regulation of *Kiss1* expression by sex steroids in the amygdala of the rat and mouse. *Endocrinology.* 2011 May;152(5):2020–30.
181. Goodman RL, Hileman SM, Nestor CC, Porter KL, Connors JM, Hardy SL, et al. Kisspeptin, neurokinin B, and dynorphin act in the arcuate nucleus to control activity of the GnRH pulse generator in ewes. *Endocrinology.* 2013;154(11):4259–69.
182. Lehman MN, Coolen LM, Goodman RL. Minireview: kisspeptin/neurokinin B/dynorphin (KNDy) cells of the arcuate nucleus: A central node in the control of gonadotropin-releasing hormone secretion. *Endocrinology.* 2010;151(8):3479–89.
183. Grachev P, Millar RP, O’Byrne KT. The role of neurokinin B signalling in reproductive neuroendocrinology. *Neuroendocrinology.* 2014;99(1):7–17.
184. Goodman RL, Coolen LM, Lehman MN. A role for neurokinin B in pulsatile GnRH secretion in the ewe. *Neuroendocrinology.* 2014;99(1):18–32.
185. Abizaid A, Spergel DJ, Naor Z, Constantin S. Progress and challenges in the search for the mechanisms of pulsatile gonadotropin-releasing hormone secretion. *Artic Mini Rev.* 2017;8(180):1–11.

186. Clarkson J, Herbison AE. Dual phenotype kisspeptin-dopamine neurones of the rostral periventricular area of the third ventricle project to gonadotrophin-releasing hormone neurones. *J Neuroendocrinol.* 2011 Apr;23(4):293–301.
187. Porteous R, Petersen SL, Yeo SH, Bhattarai JP, Ciofi P, de Tassigny XD, et al. Kisspeptin neurons co-express met-enkephalin and galanin in the rostral periventricular region of the female mouse hypothalamus. *J Comp Neurol.* 2011 Dec 1;519(17):3456–69.
188. Yamada S, Uenoyama Y, Kinoshita M, Iwata K, Takase K, Matsui H, et al. Inhibition of metastin (kisspeptin-54)-GPR54 signaling in the arcuate nucleus-median eminence region during lactation in rats. *Endocrinology.* 2007 May;148(5):2226–32.
189. Beltramo M, Dardente H, Cayla X, Caraty A. Cellular mechanisms and integrative timing of neuroendocrine control of GnRH secretion by kisspeptin. *Mol Cell Endocrinol.* 2014;382(1):387–99.
190. Caraty A, Lomet D, Sébert ME, Guillaume D, Beltramo M, Evans NP. Gonadotrophin-releasing hormone release into the hypophyseal portal blood of the ewe mirrors both pulsatile and continuous intravenous infusion of kisspeptin: an insight into kisspeptin's mechanism of action. *J Neuroendocrinol.* 2013;25(6):537–46.
191. Han SY, McLennan T, Czielesky K, Herbison AE. Selective optogenetic activation of arcuate kisspeptin neurons generates pulsatile luteinizing hormone secretion. *Proc Natl Acad Sci.* 2015;112(42):13109–14.
192. Kanasaki H, Oride A, Mijiddorj T, Sukhbaatar U, Kyo S. How is GnRH regulated in GnRH-producing neurons? Studies using GT1-7 cells as a GnRH-producing cell model. *Gen Comp Endocrinol.* 2017;247:138–42.
193. Clarkson J, Herbison AE. Postnatal development of kisspeptin neurons in mouse hypothalamus; sexual dimorphism and projections to gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology.* 2006;147(12):5817–25.
194. Hrabovszky E, Ciofi P, Vida B, Horvath MC, Keller E, Caraty A, et al. The kisspeptin system of the human hypothalamus: sexual dimorphism and

- relationship with gonadotropin-releasing hormone and neurokinin B neurons. *Eur J Neurosci.* 2010 Jun;31(11):1984–98.
195. Jayasena CN, Comminos AN, Veldhuis JD, Misra S, Abbara A, Izzi-Engbeaya C, et al. A single injection of kisspeptin-54 temporarily increases luteinizing hormone pulsatility in healthy women. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2013;79(4):558–63.
196. Tovar S, Vázquez MJ, Navarro VM, Fernández-Fernández R, Castellano JM, Vigo E, et al. Effects of single or repeated intravenous administration of kisspeptin upon dynamic LH secretion in conscious male rats. *Endocrinology.* 2006;147(6):2696–704.
197. Gottsch ML, Cunningham MJ, Smith JT, Popa SM, Acohido B V, Crowley WF, et al. A role for kisspeptins in the regulation of gonadotropin secretion in the mouse. *Endocrinology.* 2004;145(9):4073–7.
198. Han S, Gottsch ML, Lee KJ, Popa SM, Smith JT, Jakawich SK, et al. Activation of gonadotropin-releasing hormone neurons by kisspeptin as a neuroendocrine switch for the onset of puberty. *J Neurosci.* 2005;25(49):11349–56.
199. Messenger S, Chatzidaki EE, Ma D, Hendrick AG, Zahn D, Dixon J, et al. Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(5):1761–6.
200. Pineda R, Garcia-Galiano D, Roseweir A, Romero M, Sanchez-Garrido MA, Ruiz-Pino F, et al. Critical roles of kisspeptins in female puberty and preovulatory gonadotropin surges as revealed by a novel antagonist. *Endocrinology.* 2010;151(2):722–30.
201. Dhillon WS, Chaudhri OB, Patterson M, Thompson EL, Murphy KG, Badman MK, et al. Kisspeptin-54 stimulates the hypothalamic-pituitary gonadal axis in human males. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90(12):6609–15.
202. Narayanaswamy S, Jayasena CN, Ng N, Ratnasabapathy R, Prague JK, Papadopoulou D, et al. Subcutaneous infusion of kisspeptin-54 stimulates gonadotrophin release in women and the response correlates with basal oestradiol levels. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2016;84(6):939–45.
203. George JT, Anderson RA, Millar RP. Kisspeptin-10 stimulation of gonadotrophin

- secretion in women is modulated by sex steroid feedback. *Hum Reprod.* 2012 Dec;27(12):3552–9.
204. Kanasaki H, Purwana IN, Oride A, Mijiddorj T, Sukhbaatar U, Miyazaki K. Circulating kisspeptin and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) do not correlate with gonadotropin serum levels. *Gynecol Endocrinol.* 2013;29(6):583–7.
205. Richard N, Galmiche G, Corvaisier S, Caraty A, Kottler M-L. KiSS-1 and GPR54 genes are co-expressed in rat gonadotrophs and differentially regulated in vivo by oestradiol and gonadotrophin-releasing hormone. *J Neuroendocrinol.* 2008 Mar;20(3):381–93.
206. Mostari P, Ieda N, Deura C, Minabe S, Yamada S, Uenoyama Y, et al. dynorphin-kappa opioid receptor signaling partly mediates estrogen negative feedback effect on LH pulses in female rats. *J Reprod Dev.* 2013;59(3):266–72.
207. Helena C V., Toporikova N, Kalil B, Stathopoulos AM, Pogrebna V V., Carolino RO, et al. KNDy neurons modulate the magnitude of the steroid-induced luteinizing hormone surges in ovariectomized rats. *Endocrinology.* 2015;156(11):4200–13.
208. Alçın E, Sahu a., Ramaswamy S, Hutz ED, Keen KL, Terasawa E, et al. Ovarian regulation of kisspeptin neurones in the arcuate nucleus of the rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *J Neuroendocrinol.* 2013;25(5):488–96.
209. Smith JT, Clifton DK, Steiner RA. Regulation of the neuroendocrine reproductive axis by kisspeptin-GPR54 signaling. *Reproduction.* 2006;131(4):623–30.
210. Christian CA, Moenter SM. The neurobiology of preovulatory and estradiol-induced gonadotropin-releasing hormone surges. *Endocr Rev.* 2010 Aug;31(4):544–77.
211. Hu MH, Li XF, McCausland B, Li SY, Gresham R, Kinsey-Jones JS, et al. Relative importance of the arcuate and anteroventral periventricular kisspeptin neurons in control of puberty and reproductive function in female rats. *Endocrinology.* 2015;156(7):2619–31.
212. Novaira HJ, Sonko ML, Hoffman G, Koo Y, Ko C, Wolfe A, et al. Disrupted

- kisspeptin signaling in GnRH neurons leads to hypogonadotropic hypogonadism. *Mol Endocrinol*. 2014;28(2):225–38.
213. Gianetti E, Seminara S. Kisspeptin and KISS1R: A critical pathway in the reproductive system. *Reproduction*. 2008;136(3):295–301.
214. d'Anglemont de Tassigny X, Fagg LA, Dixon JPC, Day K, Leitch HG, Hendrick AG, et al. Hypogonadotropic hypogonadism in mice lacking a functional Kiss1 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(25):10714–9.
215. Bianco SDC. A potential mechanism for the sexual dimorphism in the onset of puberty and incidence of idiopathic central precocious puberty in children: sex-specific kisspeptin as an integrator of puberty signals. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2012;3(December):149.
216. Chen C-Y, Chou Y-Y, Wu Y-M, Lin C-C, Lin S-J, Lee C-C. Phthalates may promote female puberty by increasing kisspeptin activity. *Hum Reprod*. 2013;28(10):2765–73.
217. Shahab M, Mastronardi C, Seminara SB, Crowley WF, Ojeda SR, Plant TM. Increased hypothalamic GPR54 signaling: a potential mechanism for initiation of puberty in primates. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(6):2129–34.
218. Clarkson J. Effects of estradiol on kisspeptin neurons during puberty. *Front Neuroendocrinol*. 2013;34(2):120–31.
219. Leka-Emiri S, Chrousos GP, Kanaka-Gantenbein C. The mystery of puberty initiation: genetics and epigenetics of idiopathic central precocious puberty (ICPP). *J Endocrinol Invest*. 2017;0(0):1–14.
220. Матвієнко МГ, Пустовалов АС, Бузинська НО, Держинський МЕ. Морфофункціональні зміни в тестикулах щурів 24-місячного віку під впливом кіссептину на фоні блокади та активації альфа-адренорецепторів і при введенні мелатоніну. *Вісник проблем біології та медицини*. 2012;2(3):170–3.
221. Plant TM. The role of KiSS-1 in the regulation of puberty in higher primates. *Eur J Endocrinol*. 2006;155(suppl\_1):S11–6.
222. Constantin S, Iremonger KJ, Herbison AE. In vivo recordings of GnRH neuron

- firing reveal heterogeneity and dependence upon GABAA receptor signaling. *J Neurosci*. 2013;33(22):9394–401.
223. Liu X, Herbison AE. Kisspeptin regulation of neuronal activity throughout the central nervous system. *Endocrinol Metab*. 2016;31:193–205.
224. George JT, Veldhuis JD, Tena-Sempere M, Millar RP, Anderson RA. Exploring the pathophysiology of hypogonadism in men with type 2 diabetes: Kisspeptin-10 stimulates serum testosterone and LH secretion in men with type 2 diabetes and mild biochemical hypogonadism. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2013;79(1):100–4.
225. Jeon YE, Lee KE, Jung JA, Yim SY, Kim H, Seo SK, et al. Kisspeptin, leptin, and retinol-binding protein 4 in women with polycystic ovary syndrome. *Gynecol Obstet Invest*. 2013;75(4):268–74.
226. Wang O. Glucocorticoids regulate kisspeptin neurons during stress and contribute to infertility and obesity in leptin-deficient mice. Harvard University; 2012. 150 p.
227. Hill JW, Elmquist JK, Elias CF. Hypothalamic pathways linking energy balance and reproduction. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2008;294(5):E827–32.
228. Takumi K, Iijima N, Higo S, Ozawa H. Immunohistochemical analysis of the colocalization of corticotropin-releasing hormone receptor and glucocorticoid receptor in kisspeptin neurons in the hypothalamus of female rats. *Neurosci Lett*. 2012;531(1):40–5.
229. Hrabovszky E, Liposits Z. Afferent neuronal control of type-I gonadotropin releasing hormone neurons in the human. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2013;4(SEP):1–19.
230. Sengupta P. The laboratory rat: relating its age with human's. *Int J Prev Med*. 2013 Jun;4(6):624–30.
231. Європейська конвенція про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986) [Інтернет]. [Цитовано 2017 Лип 2]. Доступно на: [http://zakon2.rada.gov.ua/laws/show/994\\_137](http://zakon2.rada.gov.ua/laws/show/994_137)
232. George JT, Veldhuis JD, Roseweir AK, Newton CL, Faccenda E, Millar RP, et al. Kisspeptin-10 is a potent stimulator of lh and increases pulse frequency in men. *J*

- Clin Endocrinol Metab. 2011 Aug;96(8):E1228–36.
233. Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 6th ed. NY: Academic Press; 2007. 456 p.
234. Suvarna K, Layton C, Bancroft JD, editors. Bancroft's theory and practice of histological techniques. 7th ed. Churchill Livingstone Elsevier; 2013. 654 p.
235. Лилли Р. Патогистологическая техника и практическая гистохимия. М: Мир; 1969. 646 p.
236. Pasteels JL, Herlant M. Notions nouvelles sur la cytologie de l'antehypophyse chez le rat. Zeitschrift fur Zellforsch und Mikroskopische Anat. 1962;56(1):20–39.
237. Laura C, Jacqueline T, Andrada L, Angela B. Herlant's tetrachrome staining, a useful tool for pituitary adenoma diagnosis. Acta Medica Marisiensis. 2013;59(4):209–11.
238. Phifer RF, Spicer SS, Hennigar GR. Histochemical reactivity and staining properties of functionally defined cell types in the human adenohypophysis. Am J Pathol. 1973;73(3):569.
239. Zar JH. Biostatistical analysis. 5th ed. Upper Saddle River: PIE; 2009. 756 p.
240. Матвиенко М, Пустовалов А, Михальский С. Возможности коррекции ксиспептином репродуктивного статуса при применении блокаторов и активаторов  $\alpha$ -адренергических рецепторов. Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія: Біологія. 2014;68(3):14–8.
241. Пустовалов А, Матвієнко М, Держинський М. Вплив стресу на морфометричні параметри функціональної активності астроцитів і нейроцитів аркуатного ядра гіпоталамуса щурів на різних стадіях естрального циклу. Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка Серія: Біологія. 2012;61(2):17–20.
242. Жураківська ОЯ. Морфо-функціональні зміни гонадотропів аденогіпофіза в щурів різного віку при експериментальному цукровому діабеті. Вісник проблем біології і медицини. 2012;2(93)(2):189–93.

243. Creasy D, Bube A, Rijk E, Kandori H, Kuwahara M, Masson R, et al. Proliferative and nonproliferative lesions of the rat and mouse male reproductive system. *Toxicol Pathol.* 2012;40(6 Suppl):40S–121S.
244. Rai M, Kon K, Ingle A, Duran N, Galdiero S, Galdiero M. Broad-spectrum bioactivities of silver nanoparticles: The emerging trends and future prospects. Vol. 98, *Applied Microbiology and Biotechnology.* 2014. p. 1951–61.
245. Hu R, Gong X, Duan Y, Li N, Che Y, Cui Y, et al. Neurotoxicological effects and the impairment of spatial recognition memory in mice caused by exposure to TiO<sub>2</sub> nanoparticles. *Biomaterials.* 2010 Nov;31(31):8043–50.
246. Калиновский ВЕ, Пустовалов АС, Гродзюк ГЯ, Андриюшина НС, Держинский НЭ. Влияние системного введения наночастиц и растворов солей золота и серебра на размеры ядер нейронов гипоталамуса самцов крыс. *Нейрофизиология.* 2016;48(4):289–90.
247. Roa J, Vigo E, Castellano JM, Navarro VM, Fernández-Fernández R, Casanueva FF, et al. Hypothalamic expression of KiSS-1 system and gonadotropin-releasing effects of kisspeptin in different reproductive states of the female rat. *Endocrinology.* 2006;147(6):2864–78.
248. Zhang C, Roepke TA, Kelly MJ, Rønnekleiv OK. Kisspeptin depolarizes gonadotropin-releasing hormone neurons through activation of TRPC-like cationic channels. *J Neurosci.* 2008;28(17):4423–34.
249. Choe HK, Kim H-D, Park SH, Lee H-W, Park J-Y, Seong JY, et al. Synchronous activation of gonadotropin-releasing hormone gene transcription and secretion by pulsatile kisspeptin stimulation. *Proc Natl Acad Sci.* 2013;110(14):5677–82.
250. Witham E a, Meadows JD, Hoffmann HM, Shojaei S, Coss D, Kauffman AS, et al. Kisspeptin regulates gonadotropin genes via immediate early gene induction in pituitary gonadotropes. *Mol Endocrinol.* 2013;27(8):1283–94.
251. Zhao S, Kriegsfeld LJ. Daily Changes in GT1-7 Cell sensitivity to GnRH secretagogues that trigger ovulation. *Neuroendocrinology.* 2009 Dec;89(4):448–57.
252. Melmed S., editor. *The pituitary: third edition.* Academic Press; 2010. 744 p.

253. Halmi NS, De Groote JW. Remarks concerning two types of basophil cells in the human adenohypophysis. *J Clin Endocrinol Metab.* 1961;21(6):732–5.
254. Using AS, Cell and tissue localization of gonadotrophic hormones in the dog pituitary gland: a study using immunoenzyme histochemistry and chemical staining. *Histochemistry I.* 1977;175:167–75.
255. Culling CFA, Allison RT, Barr WT. Endocrine cells. *Cell Pathol Tech.* 1985;(1973):474–86.
256. Sam S, Frohman LA. Normal physiology of hypothalamic pituitary regulation. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2008;37(1):1–22.
257. Jin J, Yang W. Molecular regulation of hypothalamus–pituitary–gonads axis in males. *Gene.* 2014 Nov;551(1):15–25.
258. Selvaraj S, Ohga H, Nyuji M, Kitano H, Nagano N, Yamaguchi A, et al. Subcutaneous administration of Kiss1 pentadecapeptide accelerates spermatogenesis in prepubertal male chub mackerel (*Scomber japonicus*). *Comp Biochem Physiol - A Mol Integr Physiol.* 2013;166(2):228–36.
259. Pinto FM, Cejudo-Román A, Ravina CG, Fernández-Sánchez M, Martín-Lozano D, Illanes M, et al. Characterization of the kisspeptin system in human spermatozoa. *Int J Androl.* 2012;35(1):63–73.
260. Калиновський В, Пустовалов А, Бузинська Н, Держинський М. Вплив наночасток золота на морфофункціональний стан сім'яників статевонезрілих щурів. В: Молодь і поступ біології: збірник тез XI Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів; 2015 квіт. 20-23; Львів. Львів: СПОЛОМ; 2015. с. 462–3.
261. Калиновський ВЄ, Пустовалов АС, Гродзюк ГЯ, Андрюшина НС, Держинський МЕ. Морфо-функціональний стан передміхурової залози та придатків сім'яників за дії наночастинок золота та срібла. *Вісник Дніпропетровського університету. Біологія, медицина.* 2016;7(2):106–11.
262. Калиновський ВЄ, Пустовалов АС, Гродзюк ГЯ, Андрюшина НС, Держинський МЕ. Вплив наночастинок та йонів золота на морфо-функціональний стан сім'яників статевонезрілих щурів. *Вісник Київського*

- національного університету імені Тараса Шевченка Серія: Біологія. 2016;71(1):23–6.
263. Kalynovskyi V, Pustovalov A, Grodzyuk G, Andryushina N, Dzerzhynskyi M. Morpho-functional changes in the rat testes under the effect of gold nanoparticles. В: Молодь і поступ біології: збірник тез XII Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів; 2016 квіт. 19-21; Львів. Львів:СПОЛОМ; 2016. с. 317–8.
264. Kalynovskyi V, Pustovalov A, Grodzyuk G, Andryushina N, Dzerzhynsky M. Morphofunctional changes in the testes of juvenile rats after administration of gold nanoparticles. In: Abstracts of the 25th Anniversary of the FEPS , 168th Anniversary of French Physiological Society; 2016 June 29th – July 1st; Paris. Paris;2016. p. 120.
265. Калиновський ВС, Пустовалов АС, Гродзюк ГЯ, Андрюшина НС, Держинський МЕ. Вікові особливості впливу наночастинок срібла на морфофункціональний стан сім'яників щурів. Наукові доповіді НУБіП України. [Інтернет]. 2016. [цитовано 2017 Лип 15];63. Доступно на: <http://journals.nubip.edu.ua/index.php/Dopovidi/article/view/7536>.
266. Калиновський ВС, Пустовалов АС, Гродзюк ГЯ, Андрюшина НС, Держинський МЕ. Кіссептин-опосередкована регуляція морфофункціонального стану сім'яників щурів за дії наночастинок золота. Вісник Дніпропетровського університету. Біологія, екологія. 2016;24(2):359–63.
267. Singh SK, editor. Mammalian endocrinology and male reproductive biology. CRC Press; 2016. 360 p.
268. Beattie MC, Adekola L, Papadopoulos V, Chen H, Zirkin BR. Leydig cell aging and hypogonadism. *Exp Gerontol*. 2015;68:87–91.
269. Svechnikov K, Landreh L, Weisser J, Izzo G, Colón E, Svechnikov I, et al. Origin, development and regulation of human leydig cells. *Horm Res Paediatr*. 2010;73(2):93–101.
270. Калиновський ВС, Пустовалов АС, Гродзюк ГЯ, Андрюшина НС,

- Держинський МЕ. Вплив наночастинок срібла на кісспептин-опосередковану регуляцію морфо-функціонального стану сім'яників щурів. Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка Серія: Проблеми регуляції фізіологічних функцій. 2016;20(1):8–11.
271. Kalynovskyi VY, Pustovalov AS, Grodzyuk GY, N.S. A, Dzerzhynsky ME. Silver nanoparticles affect testicular function of the rats of different age. In: Abstract Book of participants of the International Summer School and International research and practice conference “NANO-2016”; 2016 Aug; Lviv. Lviv: Eurosvit; 2016. p. 471.
272. Kalynovskyi VE, Pustovalov AS, Dzerzhynsky ME. Morphofunctional changes in the reproductive system of juvenile rats following nanosilver administration. In: Abstract book of participants of the international summer school and international research and practice conference “NANO-2015”; 2015 Aug 26-29; Lviv. Lviv: Eurosvit; 2015. p. 390.
273. Kalynovskyi V, Pustovalov A, Grodzyuk G, Andriushyna N, Dzerzhynsky M. Silver nanoparticles affect regulation of testicular activity in the young rats. In: Proceedings of the joint meeting of the american physiological society and the physiological society; 2016 Jul 29-3; Dublin. Dublin; 2016. p. 171P.
274. Dahia CL, Petrusz P, Hall SH, Rao AJ. Effect of deprivation of endogenous follicle stimulating hormone on rat epididymis: a histological evaluation. *Reprod Biomed Online*. 2008;17(3):331–7.
275. Dahia CL, Rao AJ. Demonstration of follicle-stimulating hormone receptor in cauda epididymis of rat. *Biol Reprod*. 2006;75(1):98–106.
276. Świder-Al-Amawi M, Kolasa A, Sikorski A, Marchlewicz M, Baranowska-Bosiacka I, Wiszniewska B. The immunoexpression of FSH-R in the ductuli efferentes and the epididymis of men and Rat: effect of FSH on the morphology and steroidogenic activity of rat epididymal epithelial cells in vitro. *J Biomed Biotechnol*. 2010;2010.
277. Talebi AR, Khorsandi L, Moridian M. The effect of zinc oxide nanoparticles on mouse spermatogenesis. *J Assist Reprod Genet*. 2013;30(9):1203–9.

278. Dirnhofer S, Berger C, Hermann M, Steiner G, Madersbacher S, Berger P. Coexpression of gonadotropic hormones and their corresponding FSH- and LH/CG-receptors in the human prostate. *Prostate*. 1998;35(3):212–20.
279. Śluczanska-Głabowska S, Laszczyńska M, Wylot M, Głabowski W, Piasecka M, Gacarzewicz D. Morphological and immunohistochemical compare of three rat prostate lobes (lateral, dorsal and ventral) in experimental hyperprolactinemia. *Folia Histochem Cytobiol*. 2010;48(3):447–54.
280. Kool PL, Ortiz MD, Van Gestel C a M. Chronic toxicity of ZnO nanoparticles, non-nano ZnO and ZnCl<sub>2</sub> to *Folsomia candida* (Collembola) in relation to bioavailability in soil. *Environ Pollut*. 2011;159(10):2713–9.
281. Amin YM, Hawas AM, Hassan SHM, Elsayed ME. Evaluation of acute and subchronic toxicity of silver nanoparticles in normal and irradiated animals. *Br J Pharmacol Toxicol*. 2015;6(2):22–38.
282. Umezawa M, Tainaka H, Kawashima N, Shimizu M, Takeda K. Effect of fetal exposure to titanium dioxide nanoparticle on brain development - brain region information. *J Toxicol Sci*. 2012;37(6):1247–52.
283. Jackson P, Vogel U, Wallin H, Hougaard KS. Prenatal exposure to carbon black (Printex 90): effects on sexual development and neurofunction. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2011;109(6):434–7.
284. Blum JL, Xiong JQ, Hoffman C, Zelikoff JT. Cadmium associated with inhaled cadmium oxide nanoparticles impacts fetal and neonatal development and growth. *Toxicol Sci*. 2012;126(2):478–86.

## ДОДАТКИ

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.

1. Калиновский ВЕ, Пустовалов АС, Гродзюк ГЯ, Андрюшина НС, Дзержинский НЭ. Влияние системного введения наночастиц и растворов солей золота и серебра на размеры ядер нейронов гипоталамуса самцов крыс. *Нейрофизиология*. 2016;48(4):289–90.
2. Калиновський ВС, Пустовалов АС, Гродзюк ГЯ, Андрюшина НС, Дзержинський МЕ. Кіспептин-опосередкована регуляція морфофункціонального стану сім'яників щурів за дії наночастинок золота. *Вісник Дніпропетровського університету. Біологія, екологія*. 2016;24(2):359–63.
3. Калиновський ВС, Пустовалов АС, Гродзюк ГЯ, Андрюшина НС, Дзержинський МЕ. Морфо-функціональний стан передміхурової залози та придатків сім'яників за дії наночастинок золота та срібла. *Вісник Дніпропетровського університету. Біологія, медицина*. 2016;7(2):106–11.
4. Калиновський ВС, Пустовалов АС, Гродзюк ГЯ, Андрюшина НС, Дзержинський МЕ. Вплив наночастинок та йонів золота на морфофункціональний стан сім'яників статевонезрілих щурів. *Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія: Біологія*. 2016;71(1):23–6.
5. Калиновський ВС, Пустовалов АС, Гродзюк ГЯ, Андрюшина НС, Дзержинський МЕ. Вплив наночастинок срібла на кіспептин-опосередковану регуляцію морфо-функціонального стану сім'яників щурів.

- Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія: Проблеми регуляції фізіологічних функцій. 2016;20(1):8–11.
6. Калиновський ВС, Пустовалов АС, Гродзюк ГЯ, Андрюшина НС, Держинський МЕ. Вікові особливості впливу наночастинок срібла на морфофункціональний стан сім'яників щурів. Наукові доповіді НУБіП України. [Інтернет]. 2016. [цитовано 2017 Лип 15];63. Доступно на: <http://journals.nubip.edu.ua/index.php/Dopovidi/article/view/7536>
  7. Калиновський В, Пустовалов А, Бузинська Н, Держинський М. Вплив наночасток золота на морфофункціональний стан сім'яників статевонезрілих щурів. В: Молодь і поступ біології: збірник тез XI Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів; 2015 квіт. 20-23; Львів. Львів: СПОЛОМ; 2015. с. 462–3.
  8. Kalynovskyi VE, Pustovalov AS, Dzerzhynsky ME. Morphofunctional changes in the reproductive system of juvenile rats following nanosilver administration. In: Abstract book of participants of the international summer school and international research and practice conference “NANO-2015”; 2015 Aug 26-29; Lviv. Lviv: Eurosvit; 2015. p. 390.
  9. Kalynovskyi V, Pustovalov A, Grodzyuk G, Andryushina N, Dzerzhynskyi M. Morpho-functional changes in the rat testes under the effect of gold nanoparticles. В: Молодь і поступ біології: збірник тез XII Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів; 2016 квіт. 19-21; Львів. Львів: СПОЛОМ; 2016. с. 317–8.
  10. Kalynovskyi V, Pustovalov A, Grodzyuk G, Andriushyna N, Dzerzhynsky M. Silver nanoparticles affect regulation of testicular activity in the young rats. In: Proceedings of the joint meeting of the american physiological society and the physiological society; 2016 Jul 29-3; Dublin. Dublin; 2016. p. 171P.
  11. Kalynovskyi V, Pustovalov A, Grodzyuk G, Andryushina N, Dzerzhynsky M. Morphofunctional changes in the testes of juvenile rats after administration of gold nanoparticles. In: Abstracts of the 25th Anniversary of the FEPS , 168th

Anniversary of French Physiological Society; 2016 June 29th – July 1st; Paris. Paris;2016. p. 120.

12. Kalynovskyi VY, Pustovalov AS, Grodzyuk GY, N.S. A, Dzerzhynsky ME. Silver nanoparticles affect testicular function of the rats of different age. In: Abstract Book of participants of the International Summer School and International research and practice conference “NANO-2016”; 2016 Aug; Lviv. Lviv: Eurosvit; 2016. p. 471.

**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).