

**ВІКОВІ ОСОБЛИВОСТІ ВПЛИВУ НАНОЧАСТИНОК СРІБЛА НА
МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН СІМ'ЯНИКІВ ЩУРІВ**

В. Є. КАЛИНОВСЬКИЙ, аспірант*,

E-mail: squilchuw@gmail.com

А. С. ПУСТОВАЛОВ, кандидат біологічних наук, доцент

*Навчально-науковий центр «Інститут біології» Київського національного
університету імені Тараса Шевченка*

E-mail: aspustovalov@yandex.ua

Г. Я. ГРОДЗЮК, кандидат хімічних наук,

E-mail: nanosvin@meta.ua

Н. С. АНДРЮШИНА, кандидат хімічних наук,

ТОВ «Наномедтех»

E-mail: natashaand9@gmail.com

М. Е. ДЗЕРЖИНСЬКИЙ, доктор біологічних наук,

*Навчально-науковий центр «Інститут біології» Київського національного
університету імені Тараса Шевченка*

E-mail: cytolog@univ.kiev.ua

***Анотація.** Серед різних наноромірних структур, які використовуються в сучасній промисловості та медицині, наночастинки на основі срібла є одними з найбільш поширених. Незважаючи на високий потенціал застосування даних наноматеріалів, відомостей щодо токсичності нанорозмірного срібла порівняно мало, тому наше дослідження було направлено на виявлення вікових особливостей впливу наночастинок срібла на сім'яники. Було досліджено особливості впливу 10-15 нм наночастинок срібла на морфо-функціональний стан сім'яників молодих, дорослих та старих щурів, які були представлені 1-, 6- та 24-місячними тваринами. Для цього впродовж 10 діб щурам інтраперитонеально вводили розчин наночастинок срібла, стабілізованих поліфосфатом натрію. Встановлено, що введення даних наноматеріалів достовірно пригнічує як ендокринну, так і сперматогенну функції сім'яників 6- та 24-місячних тварин, що проявлялось у зменшенні площ перетину ядер клітин Сертолі і Лейдіга, а також у зменшенні діаметру звивистих сім'яних каналців. У сім'яниках молодих тварин спостерігали пригнічення функціональної активності лише клітин Сертолі, в той час як достовірних змін інших вимірних параметрів зафіксовано не було. Таким чином, нами було встановлено, що наночастинки срібла пригнічують функціонування сім'яників щурів на різних етапах онтогенезу, що має бути враховане під час біомедичного застосування даних структур.*

***Ключові слова:** наночастинки, срібло, сім'яник, статеві система*

* Науковий керівник – професор, доктор біологічних наук М. Е. Держинський

Актуальність. Наночастинки срібла (НЧС) є найбільш широко використовуваними матеріалами сучасної нанотехнології. Завдяки добре відомим антибактеріальним властивостям срібла вони використовуються як компоненти антисептичних засобів, а також для обробки косметичних та харчових продуктів [1, 2]. Окрім того, існують підходи щодо використання НЧС для обробки перев'язувальних матеріалів для пригнічення розвитку патогенної мікрофлори та прискорення загоєння ран [3]. Завдяки особливим фізико-хімічним властивостям, НЧС використовуються також для фототермальної терапії онкологічних захворювань, а також як компоненти біодетекторів [4]. Враховуючи таке широке застосування НЧС питання біологічної сумісності даних матеріалів є вкрай актуальним.

Аналіз останніх досліджень та публікацій. Більшість досліджень щодо токсичності наноматеріалів проводяться *in vitro*. В той же час дослідження *in vivo* стосуються в першу чергу особливостей фармакокінетики наночастинок [5, 6]. В цих дослідженнях було показано можливість проходження НЧС через гемато-тестикулярний бар'єр та їхнього накопичення в сім'яниках [7]. Але відомостей щодо впливу НЧС на різні компоненти репродуктивної системи порівняно мало. Так, у дослідях Сирватки було показано, що НЧС негативно впливають на фолікулярні клітини яєчника, в той час як вплив безпосередньо на ооцити є меншим (переважно через наявність блискучої оболонки) [8]. Дослідження ж статевої системи ссавців обмежені хронічними впливами НЧС. У роботі Gromadzka-Ostrowska було встановлено, що одноразове введення НЧС у дозі 10 мг/кг призводить до порушення сперматогенезу, а в дослідях Thakur – що 90-денне введення НЧС призводить до розвитку значних морфологічних та ультраструктурних порушень [9, 10].

Враховуючи, що чутливість статевих органів до дії різних токсикантів сильно змінюється з віком, **метою** нашої роботи було дослідити особливості впливу наночастинок срібла на сім'яники щурів різних вікових груп.

Матеріали та методи дослідження. Дослідження було проведено на білих щурах *Rattus norvegicus* віком 1 (початкова вага 130-150 г), 6 (початкова вага

230-250 г) та 24 місяці (початкова вага 370-400 г). Всього в експерименті були задіяні по 18 тварин кожного віку.

Наночастинки срібла були синтезовані шляхом відновлення нітрату срібла в лужному середовищі. Для цього готували два розчини: перший містив 4 мМ AgNO_3 та 0,5 мМ поліфосфату натрію (у якості стабілізатора); другий – 2 мМ аскорбінову кислоту та 0,02 М NaOH . Обидва розчини змішували в рівних концентраціях та перемішували впродовж 10 хв. В подальшому фізико-хімічні властивості отриманих колоїдів аналізували за допомогою растрової електронної мікроскопії (LRU Mira3 Tescan, Чеська республіка) та енергодисперсійної рентгенівської спектроскопії (Oxford X-MAX 80 mm, США). Було встановлено, що розмір частинок становив 10-15 нм. Розчин зберігали за кімнатної температури без доступу прямих сонячних променів.

Експеримент тривав 10 діб. Кожну вікову групу було випадковим чином розділено на три підгрупи по 6 тварин: «Контроль», «Холостий контроль» та «НЧС». Тваринам контрольної групи вводили 0,9 % ізотонічний розчин NaCl (АТЗТ з виробництва інсуліну Індар, Україна); тваринам групи «Холостий контроль» – 0,25 мМ розчин поліфосфату натрію. Тварини експериментальної групи отримували ін'єкції розчину наночастинок. Всі введення проводили інтраперитонеально. Розчин срібла вводили в дозі 0,1 мг/100 г маси тіла, тваринам контрольних груп – відповідні об'єми фізіологічного та холостого розчинів.

На 10 добу введень тварин знеживлено в атмосфері CO_2 та декапітовано. Для подальших досліджень відбирали лівий сім'яник, фіксували його в суміші Буена впродовж 72 год та заливали в парафін за загальноприйнятою методикою [11]. Для морфометричних досліджень виготовляли зрізи товщиною 5 мкм, які забарвлювали гематоксиліном Бьомера та еозином. У якості морфометричних критеріїв оцінки функціонального стану сім'яника використовували діаметр звивистих сім'яних каналців, а також площу поперечного перерізу клітин Лейдіга та клітин Сертолі.

Отримані дані обробляли методами варіаційної статистики. Нормальність розподілу аналізували за допомогою W-критерію Шапіро-Уїлка, гомогенність дисперсій – за допомогою тесту Левена. Оскільки дані було розподілено нормально, вибіркові середні порівнювали за допомогою t-критерію Стьюдента. Різницю вважали достовірною за $p < 0,05$.

Результати досліджень та їх обговорення. Під час дослідження гістологічної будови сім'яників щурів контрольної групи було відмічено, що тварини всіх вікових груп мали нормальну будову сім'яників – було виявлено сім'яні каналці на всіх стадіях розвитку, в тому числі були пристуні зрілі сперматозоїди. Клітини Лейдіга мали помірно окисифільну цитоплазму та округле ядро з невеликою кількістю гетерохроматину. Всі ці ознаки свідчать про нормальний рівень функціональної активності. Морфометричні параметри тварин контрольної групи наведено у таблиці 1.

Будова сім'яників тварин, яким вводили розчин поліфосфату натрію не відрізнялась від контрольної групи. Серед досліджених морфометричних показників також не було знайдено достовірних змін в жодній із вікових груп (табл. 1). Отримані дані свідчать, що поліфосфат натрію не впливає на морфофункціональний стан сім'яників, а тому використання його у якості стабілізатора НЧС для біомедичних досліджень є виправданим.

Загальна будова сім'яника щурів 1-місячного віку, яким вводили розчин НЧС була відповідною до контрольної. В той же час було виявлено достовірне зменшення площі поперечного перерізу ядер клітин Сертолі (до $85,79 \pm 2,09$ мкм), хоча площа перерізу ядер клітин Лейдіга та діаметр звивистих сім'яних каналців не відрізнялись від контрольних значень (відповідно $44,17 \pm 0,50$ мкм² та $232,67 \pm 2,97$ мкм²).

Під час аналізу даних, отриманих в групі «НЧС» 6-місячних щурів було встановлено, що площа перерізу ядер клітин Лейдіга становила $44,77 \pm 0,61$ мкм², а ядер клітин Сертолі – $113,82 \pm 2,14$ мкм². В той же час діаметр звивистих сім'яних каналців становив $271,15 \pm 3,76$ мкм². Всі виміряні нами

показники є достовірно меншими за контрольні значення. Під час морфологічного аналізу не було виявлено патологічних змін будови сім'яників.

1. Морфометричні параметри сім'яників щурів.

Вік тварин	Група	Діаметр звивистих сім'яних каналців, мкм	Площа поперечного перерізу ядер клітин Сертолі, мкм ²	Площа поперечного перерізу ядер клітин Лейдіга, мкм ²
1 місяць	Контроль	234,77 ± 3,06	93,72 ± 2,19	45,69 ± 0,57
	Поліфосфат	233,84 ± 1,88	92,87 ± 1,83	45,81 ± 0,61
	Наносрібло	232,67 ± 2,97	85,79 ± 2,09*	44,17 ± 0,50
6 місяців	Контроль	285,43 ± 4,02	126,61 ± 2,53	52,11 ± 0,75
	Поліфосфат	284,95 ± 3,88	127,42 ± 2,87	53,02 ± 0,81
	Наносрібло	271,15 ± 3,76*	113,82 ± 2,14*	44,77 ± 0,61*
24 місяці	Контроль	247,21 ± 1,62	112,73 ± 2,03	50,27 ± 0,33
	Поліфосфат	248,66 ± 1,84	114,33 ± 1,98	50,49 ± 0,35
	Наносрібло	233,61 ± 1,56*	103,74 ± 2,02*	45,75 ± 0,36*

Примітка: * – відмінності від контрольної групи достовірні за $p < 0,05$.

Зміни в сім'яниках щурів 24-місячного віку були аналогічними до групи 6-місячних тварин. Також було виявлено достовірне зменшення всіх вимірних нами морфометричних параметрів за збереження нормальної загальної будови органу (табл. 1).

Пригнічення функціональної активності сім'яника за дії НЧС спостерігали також і в інших дослідженнях, але ці дослідження носили хронічний характер. У цих експериментах було показано різке порушення нормальної будови органу, що пов'язують із безпосереднім токсичним впливом НЧС на клітини сперматогенного епітелію, а також порушення гемато-тестикулярного бар'єру [12]. Відсутність таких змін у нашому дослідженні може бути наслідком короткого терміну введення наноматеріалів. Слід зауважити, що у всіх досліджених нами вікових групах ми спостерігали достовірні зміни лише щодо клітин Сертолі. Даний тип клітин є дуже чутливим до дії токсикантів, а також до коливань рівня тестостерону, тому зміни в цих клітинах спостерігаються на найбільш ранніх етапах. Відсутність достовірних морфометричних змін в клітинах Лейдіга, а також у діаметрі звивистих сім'яних каналців за дії НЧС на молодих тварин можуть бути пояснені загальним невисоким рівнем активності

репродуктивної системи у молодих щурів, а тому на ранніх етапах токсичної дії НЧС морфологічні зміни не спостерігаються.

Висновки та перспективи подальших досліджень. В ході нашої роботи було встановлено, що наночастинки срібла пригнічують як ендокринну, так і сперматогенну функції сім'яника дорослих та старих тварин. В той же час морфометричні зміни в сім'яниках молодих тварин були обмежені клітинами Сертолі. Не зважаючи на те, що для встановлення конкретного механізму впливу нанорозмірного срібла на морфо-функціональний стан сім'яників необхідні подальші дослідження, отримані нами дані мають бути прийняті до уваги у разі біомедичного застосування даних наноматеріалів.

Список літератури.

1. Yildirimer, J. Toxicology and clinical potential of nanoparticles [Text] / L. Yildirimer, N.T.K. Thanh, M. Loizidou, A.M. Seifalian // *Nano Today*. – 2011. – Vol. 6, Issue 6. – P. 585-607 .
2. Santos, C. A. Silver nanoparticles: therapeutical uses, toxicity, and safety issues [Text] / C. A. Santos, M. M. Seckler, A. P. Ingle, I. Gupta, S. Galdiero, M. Galdiero, A. Gade, M. Rai // *J. Pharm. Sci.* – 2014. – Vol. 103, Issue 7. – P. 1931–1944.
3. Liu, X. Silver nanoparticles mediate differential responses in keratinocytes and fibroblasts during skin wound healing [Text] / X Liu, P. Y. Lee C. M. Ho, V. C. Lui, Y. Chen, C M. Che, P. K. Tam, K. K. Wong // *Chem. Med. Chem.* – 2010. – Vol. 5, Issue 3. – P. 468-475.
4. Mishra, M. Nanosilver and its medical implications [Text] / M. Mishra, P. Chauhan // *J. Nanomed. Res.* – 2015. – Vol. 2, Issue 5. – P. 1-10.
5. Lee, J. H. Biopersistence of silver nanoparticles in tissues from Sprague–Dawley rats [Text] / J. H. Lee, Y. S. Kim, K. S. Song, H. R. Ryu, J. H. Sung, J. D. Park, H. M. Park, N. W. Song, B. S. Shin, D. Marshak, K. Ahn, J. E. Lee, I. J. You // *Particle and Fibre Toxicology*. – 2013. – Vol. 10, Issue 1. – P. 36.
6. Lu, X. Nanotoxicity: a growing need for study in the endocrine system [Text] / X. Lu, Y. Liu, X. Kong, P. Lobie, C. Cheb, T. Zhu // *Small*. – 2013. – Vol. 9, Issue 9. –P. 1654-1671.-10, 1654-1671 (2013).
7. Huppertz, B. Nanoparticles: barrier thickness matters / B. Huppertz // *Nature nanotechnology*. - 2012– - Vol. 6 – P. 758-759.
8. Сирватка, В. Я. Вплив наночастинок срібла на дозрівання яйцеклітин кролів під час кокультивування з клітинами гранульози *in vitro* / В. Я. Сирватка, Ю. І. Сливчук, І. І. Розгоні, І. І. Гевкан, О. В. Штапенко // *Біологічні Студії*. – 2015. – Т. 9, № 1. – С. 57-66.
9. Gromadzka-Ostrowska, J. Silver nanoparticles effects on epididymal sperm in rats [Text] / J. Gromadzka-Ostrowska, K. Dziendzikowska, A. Lankoff, M.

Dobrzyńska, C. Instanes, G. Brunborg, A. Gajowik, J. Radzikowska, M. Wojewodzka, M. Kruszewski. // *Toxicology Letters*. – 2012. – Vol. 214, № 3. – P. 251–258.

10. Thakur, M. Histopathological and ultra structural effects of nanoparticles on rat testis following 90 days (Chronic study) of repeated oral administration / M. Thakur, H. Gupta, D. Singh, I. R. Mohantiy, U. Maheswari, G. Vanage, D. S. Joshi // *Journal of Nanobiotechnology*. – 2014. – Vol. 12, No 1. – P. 42

11. Лилли Р.Д. Патогистологическая техника и практическая гистохимия [Текст] / Р.Д. Лилли. – М.: Мир, 1969. – 624 с.

12. Lan, Z. Nanoparticles and spermatogenesis: how do nanoparticles affect spermatogenesis and penetrate the blood–testis barrier / Z. Lan, W.-X. Yang // *Nanomedicine-UK*. – 2012. – Vol. 7, No 4. – P. 579–596.

References

1. Yildirimer, L., Thanh, N., Loizidou, M., & Seifalian, A. (2011). Toxicology and clinical potential of nanoparticles. *Nano Today*, 6(6), 585–607.

2. Dos Santos, C. A., Seckler, M. M., Ingle, A. P., Gupta, I., Galdiero, S., Galdiero, M., & Rai, M. (2014). Silver nanoparticles: therapeutical uses, toxicity, and safety issues. *Journal of pharmaceutical sciences*, 103(7), 1931-1944. doi:10.1002/jps.24001.

3. Liu, X., Lee, P., Ho, C., Lui, V. C., Chen, Y., Che, C., ... Wong, K. K. (2010). Silver nanoparticles mediate differential responses in keratinocytes and fibroblasts during skin wound healing. *ChemMedChem*, 5(3), 468-475. doi:10.1002/cmdc.200900502.

4. Mishra, M., Chauhan, P. (2015). Nanosilver and its medical implications. *J Nanomed Res* 2015, 2(5): 1-10.

5. Lee, J., Kim, Y., Song, K., Ryu, H., Sung, J., Park, J., Park, H. (2013). Biopersistence of silver nanoparticles in tissues from Sprague–Dawley rats. *Particle and Fibre Toxicology*, 10(1), 36.

6. Lu, X., Liu, Y., Kong, X., Lobie, P., Chen, C., & Zhu, T. (2013). Nanotoxicity: A Growing Need for Study in the Endocrine System. *Small*, 9(9-10), 1654–1671.

7. Huppertz, B. (2011). Nanoparticles: Barrier thickness matters. *Nature nanotechnology*, 6(12), 758–9.

8. Syrvatka, V. J., Slyvchuk, Y. I., Rozgoni, I. I., Gevkan, I. I., Shtapenko, O. V. (2015). Effect of silver nanoparticles on maturation of rabbit's oocytes co-cultured with granulosa cells in vitro. *Studia Biologica*, 9(1), 57-66.

9. Gromadzka-Ostrowska, J., Dziendzikowska, K., Lankoff, A., Dobrzyńska, M., Instanes, C., Brunborg, G., Gajowik, A., et al. (2012). Silver nanoparticles effects on epididymal sperm in rats. *Toxicology Letters*, 214(3), 251–258.

10. Thakur, M., Gupta, H., Singh, D., Mohanty, I., Maheswari, U., Vanage, G., & Joshi, D. (2014). Histopathological and ultra structural effects of nanoparticles

on rat testis following 90 days (Chronic study) of repeated oral administration. Journal of Nanobiotechnology, 12(1), 42.

11. Lilli, R. D. (1969). Patologicheskaya tekhnika i prakticheskaya gistokhimiya [Pathological techniques and practical histochemistry]. Mir, 645.

12. Lan, Z., & Yang, W.-X. (2012). Nanoparticles and spermatogenesis: how do nanoparticles affect spermatogenesis and penetrate the blood–testis barrier. Nanomedicine, 7(4), 579–596.

ВОЗРАСТНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ВЛИЯНИЯ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА НА МОРФО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ СЕМЕННОКОВ КРЫС

**В. Е. Калиновский, А. С. Пустовалов, Г. Я. Гродзюк, Н. С. Андриюшина,
Н. Э. Держинский**

***Аннотация.** Среди разных наноразмерных структур, которые используются в современной промышленности и медицине, наночастицы на основе серебра являются одними из наиболее распространённых. Несмотря на высокий потенциал использования наноматериалов, сравнительно мало данных о токсичности наноразмерного серебра. Поэтому наше исследование было направлено на изучение возрастных особенностей влияния наночастиц серебра на семенники. Были исследованы особенности влияния 10-15 нм наночастиц серебра на морфо-функциональное состояние семенников молодых, взрослых и старых крыс, представленных 1-, 6- и 24-месячными животными. Для этого в течении 10 дней интраперитонеально вводили раствор наночастиц серебра, стабилизированных полифосфатом натрия. Показано, что введение этих наноматериалов достоверно подавляет как эндокринную, так и сперматогенную функции семенника 6- и 24-месячных животных, что проявлялось в уменьшении площади сечения ядер клеток Лейдига и Сертоли, а также в уменьшении диаметра извитых семенных канальцев. В семенниках молодых животных наблюдали подавление функциональной активности только клеток Сертоли, в то время как достоверных изменений других измеренных параметров выявлено не было. Таким образом, нами было показано, что наночастицы серебра подавляют функционирование семенников крыс на разных этапах онтогенеза, что должно быть принято во внимание при биомедицинском использовании этих структур.*

***Ключевые слова:** наночастицы, серебро, семенник, половая система*

AGE-DEPENDENT EFFECTS OF SILVER NANOPARTICLES ON THE MORPHO-FUNCTIONAL STATE OF RAT TESTES

**V. Ye. Kalynovskyi, A. S. Pustovalov, G. Ya. Grodzyuk, N. S. Andriushyna,
M. E. Dzerzhynsky**

***Abstract.** Silver nanoparticles are among the most widely used nanomaterials, used in medicine and industry. Although their practical application is promising, not*

much is currently known about the toxicity of silver nanosized particles. That's why our investigation was aimed to describe the effect of nanosilver on rat testicles, regarding age effects. We investigated influence of 10-15 nm particles on the testes of young, adult and old rats, represented by 1-, 6- and 24-month-old animals respectively. The colloidal solution of silver, stabilized by sodium polyphosphate, was injected intraperitoneally for 10 days. As a result, both endocrine and spermatogenic testicular function in adult and old animals were reduced. This was observed as reduction in seminiferous tubules' diameter and shrinkage of Sertoli and Leydig cells' nuclei. At the same time we observed the decrease of Sertoli cells' nuclear cross-section only in young animals. To sum up, we showed that silver nanoparticles downregulate testicular functions in every age group, which must be taken into account in case of biomedical application of these structures.

Keywords: nanoparticles, silver, testis, reproductive system