

Н.Д. Носенко, Н.М. Жолобак, Л.І. Полякова, П.В. Сініцин, А.А. Лимарєва,
О.Б. Щербаков, М.Я. Співак, О.Г. Резніков

Морфофункціональний стан репродуктивної системи щурів у період старіння за умов застосування наноцерію

Досліджено вплив 1 або 100 мг/кг нанокристалічного діоксиду церію (НДЦ) на морфофункціональний стан органів репродуктивної системи у старіючих самців щурів. Встановлено стимулювальний вплив низької дози НДЦ (1 мг/кг) на гормональну функцію сім'яників і сперматогенез. Показано, що в основі цієї дії НДЦ лежить активація гормонпродукуючих клітин Лейдига сім'яників, а також секреторних і проліферативних процесів у передміхуровій залозі старіючих самців щурів. Застосування НДЦ у дозі 100 мг/кг не спричиняло суттєвого впливу на досліджувані показники морфофункціонального стану репродуктивної системи.

Ключові слова: нанокристалічний діоксид церію, сім'яники, передміхурова залоза, самці щурів, старіння.

ВСТУП

Нанотехнології відкрили нові і перспективні напрями в сучасній біології та медицині. Базову позицію в них займають нанокристалічні матеріали, до яких відносяться і наноматеріали на основі діоксиду церію (НДЦ). Нині накопичений значний експериментальний матеріал, який свідчить про високу біологічну активність НДЦ і розкриває потенційну можливість його використання для розробки і застосування нанокомпозицій, здатних активувати системи клітинного та гуморального імунного захисту, профілактики і терапії вірусних захворювань, а також для підвищення ефективності лікування злоякісних новоутворень [2, 4, 5]. Показано, що НДЦ має високу антиоксидантну активність, він здійснює нейротрофічну і нейропротекторну дію, підвищує життєздатність клітин головного мозку (астроцити, нейрони, мікрогліальні клітини та олігодендроцити), збільшує тривалість життя мікро- та макроорганізмів [1, 6–9, 11, 12]. Разом з тим свідчення про дію

НДЦ на репродуктивні процеси в період старіння вкрай обмежені. Є повідомлення про його вплив на мейотичне дозрівання ооцитів і фолікулогенез в яєчниках старіючих мишей [13]. У наших попередніх дослідженнях було показано, що введення НДЦ спричиняє деякі зміни функціональної активності репродуктивної системи у старіючих самців щурів [3]. Останні залежать від морфофункціонального стану органів статевих системи, проте такі відомості стосовно НДЦ відсутні. У зв'язку з цим метою нашої роботи було вивчити гормональну функцію та проаналізувати особливості морфологічної будови органів статевих системи у старіючих самців щурів за умов застосування високих і низьких доз НДЦ.

МЕТОДИКА

Експерименти проведено на 29 щурах Вістар віком 18 міс, масою тіла 380–440 г. Тварин утримували у стандартних умовах віварію при природному освітленні та раціоні. Роботу виконано з дотриманням вимог Європейської

© Н.Д. Носенко, Н.М. Жолобак, Л.І. Полякова, П.В. Сініцин, А.А. Лимарєва, О.Б. Щербаков, М.Я. Співак, О.Г. Резніков

конвенції із захисту хребетних тварин, яких використовують для експериментальних та інших наукових цілей.

Цитратний золь НДЦ, що містив частинки CeO_2 розміром 2–3 нм, отримували як описано раніше [3]. Золь різної концентрації (1 або 100 ммоль/л) вводили в дозі 1 або 100 мг/кг самцям щурів (по 6 тварин у кожній групі) через металевий зонд у шлунок щодобово впродовж 10 діб. Щурів швидко декапітували під легким ефірним наркозом через 24 год після останнього введення препарату. Контрольні тварини отримували розчинник препарату ($n=7$).

Для морфологічних досліджень відбирали зразки тканин сім'яників і передміхурової залози, які фіксували в рідині Буена. Зрізи завтовшки 5–6 мкм фарбували гематоксиліном Бемера та еозином. Гістологічні препарати вивчали на світлооптичному мікроскопі Leika DME.

У змивах епідидимісів визначали кількість сперматозоїдів і аналізували їх морфологічну будову. Для оцінки запліднювальної здатності частину старіючих самців контрольної та дослідної груп (по 5 тварин у кожній групі) парували з молодими самицями статевозрілого віку у співвідношенні 1:2. У потомства вивчали показники соматичного розвитку та статевого дозрівання.

Вміст тестостерону в плазмі крові визначали радіоімунологічним методом з використанням набору реагентів "RIA Testosterone direct" ("Immunotech", Франція). Вірогідність різниці розраховували за критерієм t Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Відомо, що процес старіння організму супроводжується інволюційними змінами органів статевої системи і зниженням їх гормональної активності. З цим узгоджуються результати наших досліджень. Показано, що у старіючих самців щурів контрольної групи вміст тестостерону в плазмі крові відповідав ві-

ковій нормі і становив $2,64 \pm 0,40$ нмоль/л, що приблизно вдвічі менше, ніж у молодих статевозрілих тварин (діапазон коливання вмісту гормону від 5 до 6 нмоль/л). Після 10-добового перорального застосування НДЦ у дозі 1 мг/кг вміст тестостерону в плазмі крові вірогідно підвищувався ($P<0,05$), проте за умов введення більш високої дози НДЦ (100 мг/кг) – суттєво не змінювався порівняно з контролем (рис. 1).

Одним із інформативних показників для морфологічної оцінки гормональної функції репродуктивної системи є активність гормонпродукуючих клітин Лейдига сім'яників. Проведені гістологічні дослідження показали, що морфологічна будова сім'яників старіючих самців контрольної групи відповідала загальній картині їх вікових змін (рис. 2, а). Кількість активованих клітин Лейдига значно зменшувалася, що свідчить про зниження секреторної активності сім'яників. Більшість клітин Лейдига мала середнього об'єму цитоплазму, нерідко густу. Вакуолізованою вона була лише в частині клітин. Ядра клітин Лейдига були овальної форми, дещо гіперхромні.

При введенні низької дози НДЦ (1 мг/кг) характерною була наявність певних змін,

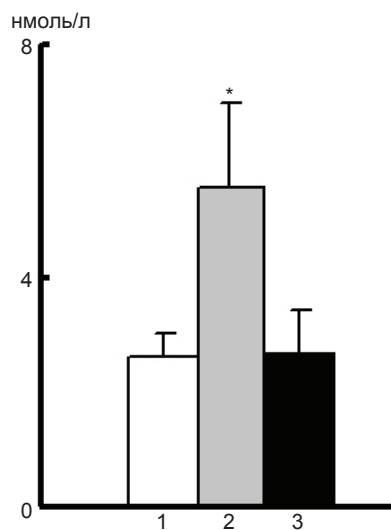
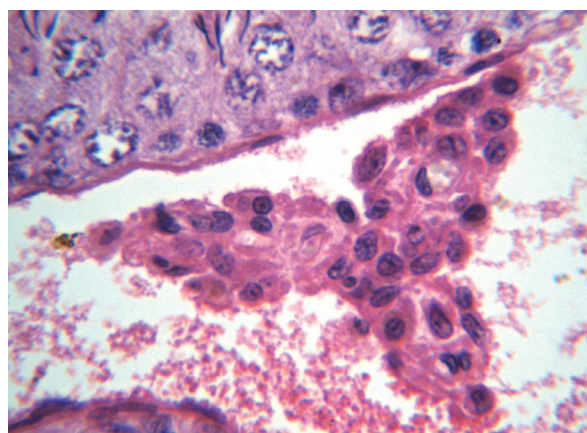
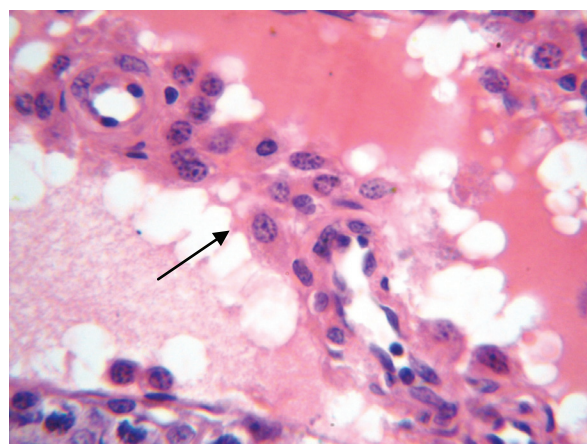


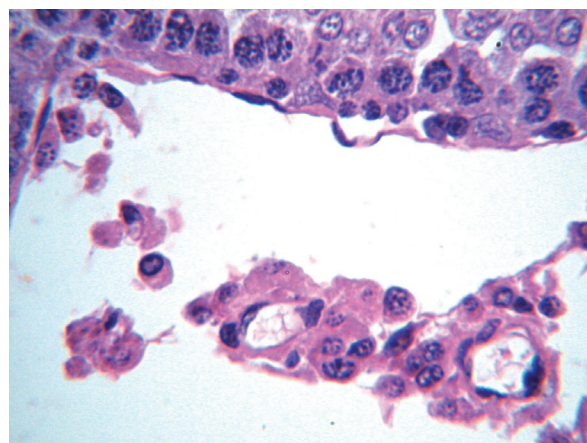
Рис. 1. Вміст тестостерону в плазмі крові старіючих самців: 1 – контроль, 2, 3 – нанокристалічний діоксид церію в дозі 1 і 100 мг/кг відповідно. * $P<0,05$ порівняно з контролем



а



б



в

Рис. 2. Мікрофотографії острівців клітин Лейдига в інтерстиціальному просторі сім'яників старіючих щурів: а – контроль; б, в – нанокристалічний діоксид церію в дозі 1 і 100 мг/кг відповідно. Стрілка – клітина Лейдига з масивною цитоплазмою в острівці. Фарбування гематоксилін-еозин. Об. $\times 40$

а саме збільшення кількості активованих гормонпродукуючих клітин Лейдига (див. рис. 2,б). Цілком імовірно, що це є найбільш вірогідною причиною підвищення гормональної активності сім'яників і, як результат, зростання вмісту тестостерону в плазмі крові (див. рис. 1). Про активацію клітин Лейдига свідчить наявність більших за об'ємом нормохромних ядер з чітким ядерцем. Цитоплазма їх також мала більший об'єм, часто була вакуолізованою по периферії.

Слід зазначити, що у разі дії НДЦ в дозі 100 мг/кг, активованих клітин Лейдига було значно менше, а їх дегенеративні зміни більш виражені, ніж у тварин, що отримували низьку дозу НДЦ (див. рис. 2, в). У цілому за умов введення високої дози НДЦ спостерігалися такі самі вікові зміни клітин Лейдига, як і в контролі.

Беручи до уваги тісний функціональний зв'язок між сім'яниками і передміхуровою залозою, ми визнали доцільним дослідити гістологічну будову останньої. У щурів контрольної групи стан вентральної частки передміхурової залози можна охарактеризувати як гіпофункціональний, що відповідає віковій нормі (рис. 3, а, б). У багатьох центрально розташованих ацинусах, які мали підвищено звивисту форму, епітелій був плаский, атрофічний. Частина прошарків сполучної тканини між ацинусами була розширена, мала ознаки набряку строми. В них знаходили активовані тканинні базофіли, лейкоцити та гістіоцитарні клітини.

Під впливом НДЦ у дозі 1 мг/кг у передміхуровій залозі старіючих щурів спостерігалась активація секреторних і проліферативних процесів. Про це свідчить різке зростання базофільної зернистості цитоплазми у перинуклеарній та апікальній частинах епітеліальних клітин і збільшення кількості рибосом і полісом, а також наявність у шарі епітелію клітин на різних стадіях мітотичного поділу (див. рис. 3, в, г). Це цілком узгоджується з даними про вірогідне збільшення відносної маси передміхурової залози (135,6

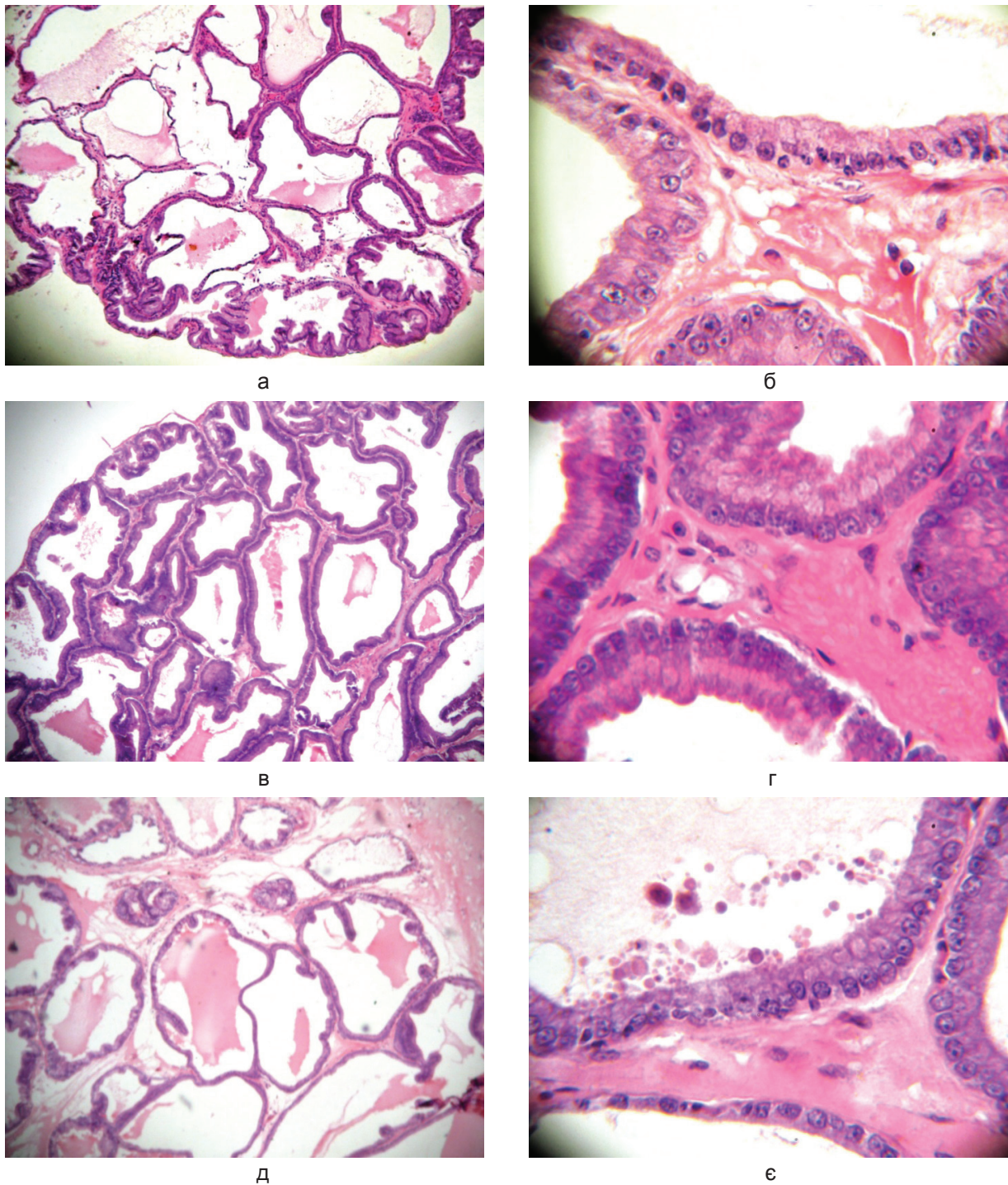


Рис. 3. Мікрофотографії тканин вентральної частки передміхурової залози старіючих шурів: а – контроль (загальний вигляд), б – контроль (гіперхромні ядра в частині епітеліальних клітин та набряк стромы); в – нанокристалічний діоксид церію в дозі 1 мг/кг (загальний вигляд), г – нанокристалічний діоксид церію в дозі 1 мг/кг (високий циліндричний епітелій з великою кількістю базофільної зернистості у перинуклеарній ділянці); д – нанокристалічний діоксид церію в дозі 100 мг/кг (загальний вигляд), е – нанокристалічний діоксид церію в дозі 100 мг/кг (плаский і низький циліндричний епітелій в ацинусах та утворення простатичних конкрементів). Фарбування гематоксилін-еозин. а, в, д – Об. $\times 4$; б, г, е – Об. $\times 40$

$\pm 6,0$ мг/100 г) відносно контролю ($107,2 \pm 10,6$ мг/100 г; $P < 0,05$).

У разі введення високої дози НДЦ зміни у будові передміхурової залози були менш виражені, ніж у дослідних тварин, які отримували низьку дозу. Проте й мали свої особливості, які характеризувались активацією як секреторних, так і атрофічних процесів у епітелії та стромі органа (див. рис. 3, д,є). Це може свідчити як про меншу ефективність застосованої дози препарату, так і про пригнічення функціональної активності передміхурової залози після короткого етапу її активації. В частині залоз епітелій був високий циліндричний, проте його висота, кількість папілярних виростів і їх розміри були менші, ніж у дослідних тварин, що отримували НДЦ в дозі 1 мг/кг. У багатьох ацинусах епітелій був плаский, атрофічний. Зрідка знаходили клітини на різних етапах мітотичного поділу, частина мітозів були патологічними. Частіше виявляли простатичні конкременти в ацинусах та спостерігали їх утворення внаслідок відщеплення фрагментів цитоплазми та десквамації епітеліальних клітин. Набряк стромы та активація тканинних базофілів були виражені сильніше, ніж у контрольних і дослідних тварин за умов введення низької дози НДЦ.

При дослідженні сперматогенної функції сім'яників слід відмітити, що кількість сперматозоїдів у змивах епідидимісів після 10-добового застосування НДЦ у дозі 1 мг/кг вірогідно збільшувалася ($P < 0,05$), а в дозі 100 мг/кг мала тенденцію до підвищення у порівнянні з контролем (рис. 4).

Варто зазначити, що у тварин контрольної групи переважна частина сперматозоїдів (93,9 %) мали нормальну будову, тоді як у дослідних тварин таких було дещо менше (в середньому 87,4 %). Основна частина порушень будови сперматозоїдів у старіючих самців після застосування НДЦ, торкалася підвищеної "м'якості" їх хвостового відділу, що характерно для незрілих сперматозоїдів і може призводити до зниження їх рухливості та порушення процесу запліднення. Поява

незрілих сперматозоїдів у дослідних тварин, цілком імовірно, може бути пов'язана з посиленням гормональної стимуляції сперматогенезу, що призводить до прискорення їх виходу з сім'яника в епідидиміс [10].

Дослідження запліднювальної здатності показало, що при паруванні старіючих самців, які отримували НДЦ у дозі 1 мг/кг, з інтактними самицями статевозрілого віку, при досить високому рівні осіменіння, індекс вагітності був майже удвічі менший, ніж у контролі (таблиця). Можна припустити, що послаблення запліднювальної здатності старіючих самців дослідної групи зумовлено наявністю незрілих сперматозоїдів.

Слід зазначити, що в разі наявності вагітності у самиць дослідної групи тривалість її була в межах норми і становила 22 доби. Щуренята народжувалися живими, смертність їх у перші 2 тиж була відсутня. Зовнішній огляд не виявив відхилень у соматичному їх розвитку. Цікаво відмітити той факт, що середня кількість щуренят у приплоді в розрахунку на одну самицю була удвічі більшою порівняно з контрольною групою, при цьому серед потомків старіючих самців як контрольної, так і дослідної груп превалювали самці (див. таблицю). Причини

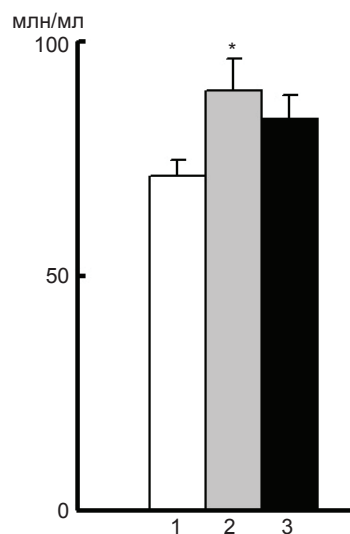


Рис. 4. Вміст сперматозоїдів у епідидимісі старіючих самців: 1 – контроль, 2, 3 – нанокристалічний діоксид церію в дозі 1 і 100 мг/кг відповідно. * $P < 0,05$ порівняно з контролем

Показники фертильності та плодючості статевозрілих самиць щурів, парованих з контрольними та дослідними старіючими самцями, що отримували нанокристалічний діоксид церію в дозі 1 мг/кг (n = 8)

Група тварин	Кількість запліднених самиць (індекс осіменіння, %)	Кількість вагітних самиць (індекс вагітності, %)	Загальна кількість народжених щуренят	Середня кількість щуренят в одному приплоді	Співвідношення самців до самоць у приплоді
Контроль	8 (100 %)	7 (87,5 %)	38	5	1,9:1
Дослід	7 (87,5 %)	3 (43 %)	30	10	1,3:1

цього явища потребують спеціального вивчення. Подальші спостереження показали, що у потомків старіючих самців дослідної групи основні параметри статевого розвитку – опускання сім'яників у самців ($34,4 \pm 1,6$ діб) та відкриття піхви у самиць ($43,9 \pm 0,3$ діб) – не відрізнялися від контрольних значень ($35,8 \pm 0,7$ та $42,8 \pm 0,3$ діб відповідно).

Таким чином, отримані результати свідчать про стимулювальний вплив низької дози НДЦ (1 мг/кг) на гормональну функцію та сперматогенез сім'яників старіючих самців щурів. Є підстави вважати, що в основі цієї дії НДЦ лежить активація гормонпродукуючих клітин Лейдига сім'яників, а також секреторних і проліферативних процесів у передміхуровій залозі. Цілком імовірно, що зазначені зміни можуть говорити про певне напруження структурно-функціональних резервів репродуктивної системи старіючих самців під впливом НДЦ і насамперед пов'язані зі стимуляцією біосинтетичних процесів. Проте механізм цього феномену потребує подальшого вивчення.

Н.Д. Носенко, Н.М. Жолобак, Л.И. Полякова, П.В. Синицын, А.А. Лимарева, А.Б. Щербakov, Н.Я. Спивак, А.Г. Резников

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ РЕПРОДУКТИВНОЙ СИСТЕМЫ КРЫС В ПЕРИОД СТАРЕНИЯ ПРИ ПРИМЕНЕНИИ НАНОЦЕРИЯ

Исследовано влияние нанокристаллического диоксида церия (НДЦ, 1 и 100 мг/кг, перорально, ежедневно в течение 10 сут) на морфофункциональное состояние органов половой системы у стареющих самцов крыс. Установлено стимулирующее действие низкой дозы НДЦ (1 мг/кг) на гормональную функцию семенников и сперматогенез.

Показано, что в основе этого действия НДЦ лежит активация гормонпродуцирующих клеток Лейдига семенников, а также секреторных и пролиферативных процессов в предстательной железе стареющих самцов крыс. Введение НДЦ в дозе 100 мг/кг не оказало существенного влияния на исследуемые показатели морфофункционального состояния репродуктивной системы.

Ключевые слова: нанокристаллический диоксид церия, семенники, предстательная железа, самцы крыс, старение.

N.D. Nosenko, N.M. Zholobak, L.I. Polyakova, P.V. Sinitsyn, A.A. Limareva, A.B. Sherbakov, N.Ya. Spivak, A.G. Reznikov

MORPHOFUNCTIONAL STATE OF REPRODUCTIVE SYSTEM OF AGEING MALE RATS IN CASE OF USE OF NANO CERIU

The influence of nanocrystalline cerium dioxide (NCD, 1 and 100 mg/kg per os daily for 10 days) on morphofunctional state of reproductive system was investigated in ageing male rats. It has been established that activation of hormone-producing testicular leydig's cells, as well as of secretory and proliferative processes in prostate, underlies the stimulating effect of NCD at a dose 1 mg/kg on hormonal function of testis and spermatogenesis of ageing male rats. NCD used at a dose 100 mg/kg had no significant effect on the assessed indices of morphofunctional state of reproductive system.

Key words: nanocrystalline cerium dioxide, testes, prostate, male rats, ageing.

State Institution "V.P. Komissarenko Institute of Endocrinology and Metabolism of National Academy of Medical Sciences of Ukraine", Kyiv;

D.K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

REFERENCES

1. Ivanov VK, Shcherbakov AB, Usatenko AV. [Structure-sensitive properties and biomedical applications of nano-dispersed cerium dioxide]. Chem Rev. 2009;**78**(9): 924-41.
2. Zholobak NM, Olevinskaya ZM, Spivak NYa, Shcherbakov AB, Ivanov VK, Usatenko AV. [Antiviral effect of cerium dioxide nanoparticles stabilized by low-molecular polyacrylic acid]. Microbiol Z. 2010;**72**(3): 42-7.

3. Spivak NYa, Nosenko ND, Zholobak NM, Shcherbakov AB, Reznikov AG, Ivanova OS, Ivanov VK, Tretyakov YuD. [The nanocrystalline cerium dioxide raises the functional activity on genesial system of ageing males of rats]. Nanosystems phys chem mathematics. 2013;**4**(1):72-7.
4. Shcherbakov AB, Ivanov VK, Zholobak NM, Krysanov EYu, Baranchikov AE, Spivak NYa, Tretyakov YuD. [Nanocrystalline ceria based materials – perspectives for biomedical application]. Biophys. 2011;**56**(6):995-1015.
5. Shcherbakov AB, Zholobak NM, Ivanov VK, Tretyakov YuD, Spivak NYa. [Nanomaterials based on the nanocrystalline ceria: properties and use perspectives in biology and medicine]. Biotechnology. 2011;**4**(1): 9-28.
6. Chigurupati C, Mughal MR, Okun E, Das S, Kumar A, McCaffery M, Seal S, Mattson MP. [Effects of cerium oxide nanoparticles on the growth of keratinocytes, fibroblasts and vascular endothelial cells in cutaneous wound healing]. Biomaterial. 2013;**34**(9):2194-201.
7. Cimini A, D'Angelo B, Das S, Gentile R, Benedetti E, Singh V, Monaco AM, Santucci S, Seal S. [Antibody-conjugated PEGylated cerium oxide nanoparticles for specific targeting of A β aggregates modulate neuronal survival pathways]. Acta Biomater. 2012;**8**(6):2056-67.
8. Estevez AY, Pritchard S, Harper K, Aston JW, Lynch A, Lucky JJ, Ludington JS, Chatani P, Mosenthal WP, Leiter JC, Andreescu S, Erlichman JS. [Neuroprotective mechanisms of cerium oxide nanoparticles in a mouse hippocampal brain slice model of ischemia]. Free Radic Biol Med. 2011;**51**(6):1155-63.
9. Hardas SS, Butterfield DA, Sultana R, Tseng MT, Dan M, Florence RL, Unrine JM, Graham UM, Wu P, Grulke EA, Yokel RA. [Brain distribution and toxicological evaluation of a systemically delivered engineered nanoscale ceria]. Toxicol Sci. 2010;**116**(2):562-76.
10. McLachlan RI, O'Donnell L, Meachem SJ, Stanton PG, de Kretser DM, Pratis K, Robertson DM. [Hormonal regulation in spermatogenesis in rats, monkeys and man]. Res Progr Horm Res. 2002;**57**:149-79.
11. Rzigalinski B. [Nanoparticles and cell longevity]. Technol Cancer Res Treat. 2005;**4**(6):651-9.
12. Singh N, Cohen CA, Rzigalinski BA. [Treatment of neurodegenerative disorders with radical nanomedicine]. Ann NY Acad Sci. 2007;**1122**:219-30.
13. Spivak NYa, Shepel EA, Zholobak NM, Shcherbakov AB, Antonovich GV, Yanchiy RI, Ivanov VK, Tretyakov YuD. [Ceria nanoparticle boost activity of aged murine oocytes]. Nano Biomed Eng. 2012;**4**(4):188-94.

*ДУ “Ін-т ендокринології та обміну речовин ім.
В.П. Комісаренка НАМН України”, Київ;
Ін-т мікробіології та вірусології
ім. Д.К. Заболотного НАН України, Київ
E-mail:reprod@i.com.ua*

*Матеріал надійшов
до редакції 09.07.2013*