Калиновський Віталій Євгенійович, асистент кафедри цитології, гістології та репродуктивної медицини ННЦ &laquo;Інститут біології та медицини&raquo; Київського національного університету імені Тараса Шевченка МОН України: &laquo;Нано- частинки золота та срібла як модулятори кісспептин-опосередкованої регуляції репродуктивної системи самців щурів&raquo; (03.00.11 - цитологія, клітинна біологія, гістологія). Спецрада Д 26.001.38 у Київському національному універ&shy;ситеті імені Тараса Шевченка

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: Дзержинський Микола Едуардович, доктор біологічних наук,

професор.

Київ – 2017

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 КІССПЕПТИНУ В РЕГУЛЯЦІЇ РОБОТИ ГІПОТАЛАМОГІПОФІЗАРНО-ГОНАДНОЇ СИСТЕМИ ССАВЦІВ ................................................ 34

2.1. Загальна характеристика кісспептинів та їхніх рецепторів ........................... 34

2.2. Гістоархітектоніка кісспептинергічної системи гіпоталамусу...................... 36

2.3. Кісспептин 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

12

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

РОЗДІЛ 5. ВПЛИВ НАНОЧАСТИНОК ЗОЛОТА ТА СРІБЛА НА МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН СІМ’ЯНИКІВ ТВАРИН РІЗНОГО ВІКУ ................ 76

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

РОЗДІЛ 6. ВПЛИВ НАНОЧАСТИНОК ЗОЛОТА ТА СРІБЛА НА МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН ПРИДАТКІВ СІМ’ЯНИКІВ І ПЕРЕДМІХУРОВОЇ

ЗАЛОЗИ ТВАРИН РІЗНОГО ВІКУ .......................................................................... 102

6.1. Морфо-функціональна характеристика придатків сім’яників тварин 1-

місячного віку різних експериментальних груп .................................................. 102

13

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

14

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

Р-234 – пептид-234

15

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 ХХІ столітті і зараз значна кількість товарів

має у своєму складі наноматеріали того чи іншого складу. За даними всесвітньої

бази даних Woodraw 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].

16

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].

17

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 кісспептинопосередкованої 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.

18

Для досягнення поставленої мети було сформульовано наступні завдання:

1) З’ясувати вплив наночастинок золота та срібла на морфофункціональний 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 морфофункціональний 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 морфофункціональний 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 морфофункціональний 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 гіпоталамогіпофізарно-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

19

наночастинки золота та срібла пригнічують активність не лише периферичних, а й

центральних компонентів гіпоталамо-гіпофізарно-гонадної системи. При дії обох

видів наночастинок в статевих органах спостерігали розвиток дегенеративних

змін різного ступеню тяжкості, а в гіпоталамо-гіпофізарному комплексі –

морфологічні ознаки пригнічення активності. Дія наночастинок золота

проявлялась у більшому, порівнюючи зі сріблом, пригніченні активності

аденогіпофіза, в той час як на периферійні ланки гіпоталамо-гіпофізарно-гонадної

системи вплив срібла був більш вираженим. Стимулюючий вплив екзогенного

кісспептину в значній мірі нівелювався введенням наночастинок, а в сім’яниках

не спостерігався взагалі. Водночас, пригнічення активності кісспептинергічної

системи гіпоталамусу призводило до посилення токсичної дії наночастинок на

морфо-функціональний стан органів статевої системи. 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 гіпоталамогіпофізарно-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

20

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); ХІ та ХІІ

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.

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

Наночастинкизолотатасріблапригнічуютьактивністьнейронів

преоптичноготааркуатногоядергіпоталамусубезпосередньоневпливаючина

процесикісспептинергічноїсигналізації

Активністьгонадотропоцитіваденогіпофізазнижуваласьзавведення

наночастинокзолотатасріблапричомувведеннянанорозмірногозолота

блокувалокісспептиніндукованустимуляціюгонадотропоцитів

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

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

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

Морфофункціональнізміниврепродуктивнійсистемі

статевонезрілихщурівпридіїнаночастинокбулибільшвираженимипорівняноіз

аналогічнимипоказникамидорослихособин