



УДК 546.59:591.463.2

## Кіспептин-опосередкована регуляція морфофункціонального стану сім'яників шурів за дії наночастинок золота

В.Є. Калиновський<sup>1</sup>, А.С. Пустовалов<sup>1</sup>, Г.Я. Гродзюк<sup>2</sup>, Н.С. Андрюшина<sup>2</sup>, М.Е. Дзержинський<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

<sup>2</sup>ТОВ «Наномедтех», Київ, Україна

З'ясовано особливості впливу наночастинок золота на функціональну активність сім'яників шурів різного віку. За інтраперитонеального уведення наночастинок золота в дозі 0,1 мг/100 г маси тіла гістологічна структура сім'яника залишається в межах норми. Встановлено пригнічувальний вплив нанозолота на ендокринну та сперматогенну активність сім'яників дорослих тварин, хоча змін морфометричних параметрів у молодих тварин не виявлено. За дії нанорозмірного золота активація кіспептинергічної системи гіпоталамуса шляхом інтрацеребровентрикулярного уведення кіспептину в бічний шлуночок мозку не викликає підвищення функціональної активності сім'яників тварин обох вікових груп. Блокування кіспептин-опосередкованої регуляції посилює пригнічувальний вплив нанозолота, при цьому в сім'яниках з'являються морфологічні ознаки пригнічення сперматогенезу. Вплив нанорозмірного золота на регуляцію активності сім'яників не залежить від віку тварини. Наші дані свідчать, що наночастинок золота порушують систему регуляторних взаємодій репродуктивної системи самців шурів, що необхідно брати до уваги у подальшому практичному застосуванні цих наноматеріалів.

*Ключові слова:* нанозолото; клітини Лейдіга; клітини Сертолі; кіспептин-10; пептид-234

## Kisspeptin-mediated regulation of testicular activity of rats under the effect of gold nanoparticles

V.Y. Kalynovsky<sup>1</sup>, A.S. Pustovalov<sup>1</sup>, G.Y. Grodzyuk<sup>2</sup>, N.S. Andriushyna<sup>2</sup>, M.E. Dzerzhynsky<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

<sup>2</sup>Nanomedtech-LLC, Kyiv, Ukraine

There are a variety of biomedical applications of nanoparticles. They can be used as drug carriers, anti-tumor agents, biosensors and modulators of immune response. But full-scale real clinical application of nanomaterials requires a great deal of information on their safety and biotoxicity. Even traditionally harmless materials, like gold, can obtain toxic features when scaled to the nanosize. *In vitro* studies showed that nanoparticles can be geno- and cytotoxic, but their effects on the body as a whole remain largely a mystery. To shed some light on this, our study focused on the reproductive toxicity of nanomaterials. We synthesized 10–15 nm gold nanoparticles through the reduction of sodium tetrachloroaurate (III) in an alkaline medium with the addition of sodium polyphosphate as a stabilizing agent. Next, these particles were administered intraperitoneally to young and old rats for 10 days. To test functional capabilities of the testes, we injected kisspeptin-10 or its antagonist peptide-234 intracerebroventricularly. These substances are known to stimulate or inhibit the central component of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis respectively. After the routine histological procedures, we measured the diameter of seminiferous tubules and the nuclear cross-sectional area of Sertoli cells as markers of testicular spermatogenic activity and a cross-sectional area of the Leydig cells' nuclei as a marker of testicular steroidogenesis. We found that injections of nanogold caused no significant changes in the

Київський національний університет ім. Тараса Шевченка, ННЦ "Інститут біології", вул. Володимирська, 64/13, Київ, 01601, Україна  
Taras Shevchenko National University of Kyiv, ESC "Institute of Biology", Volodymyrska Str., 64/13, Kyiv, 01601, Ukraine  
Tel.: +38-066-307-77-72. E-mail: squilchuw@gmail.com

ТОВ «Наномедтех», вул. Антоновича, 68, Київ, 03680, Україна  
NanoMedTech-LLC, Antonovycha str., 68, Kyiv, 03680, Ukraine  
Tel.: +38-044-200-82-51. E-mail: administration@nanomedtech.com.ua

young animals. At the same time, morphometric parameters of adult animals were significantly lower compared to control, although we observed no pathological changes in the tissue. Combined administration of gold nanoparticles and kisspeptin showed that the stimulatory effect of the latter was not observed at all. This is a specific feature of toxicants called "endocrine disruptors". Moreover, we found morphological signs of testicular degeneration, which are characteristic of the low-testosterone state. Simultaneous injections of gold and peptide-234 resulted in the highest degree of testicular functional downregulation, regardless of age. Taken as a whole, our data indicates that gold nanoparticles disrupt the regulatory network of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis, possibly due to direct action on the interstitial cells and spermatogenic epithelium.

**Keywords:** nanogold; Sertoli cells; Leydig cells; kisspeptin-10; peptide-234

## Вступ

Наночастинки – один із найпопулярніших об'єктів досліджень сучасної науки. Завдяки особливим фізичним та хімічним властивостям ці структури знаходять своє застосування у різних галузях медицини та промисловості (Lu, 2013). Наприклад, на основі наночастинок срібла створено антисептичні препарати, також їх використовують для прискорення загоєння ран (Zande et al., 2012). Частинок на основі карбону (фулерени та нанотрубки) та заліза (магнітні частинки) пропонується використовувати для адресної доставки лікарських речовин (Kim, 2012; Bogdanovic and Djordjevic, 2016). Оптичні властивості нанорозмірного кадмію зумовлюють широке його застосування як компонента детекторів (Reyes-Esparza et al., 2015). Найпоширеніша сфера біомедичного застосування наночастинок різного складу – використання їх у протипухлинній терапії: для адресної доставки ліків, фототермальної терапії чи для безпосереднього знищення трансформованих клітин (Dreaden et al., 2011; Lu, 2013; Shao, 2013). У зв'язку із цим вкрай актуальне дослідження біологічної безпеки наночастинок різного складу.

Біологічна дія наночастинок зумовлена, з одного боку, вивільненням компонентів частинки у вигляді іонів, а з іншого, безпосереднім впливом частинок на клітинні мішені (Wang, 2016). За дії наночастинок срібла спостерігається окиснення сульфгідрильних груп багатьох білків – один з основних механізмів токсичності іонів  $\text{Ag}^+$  (Han et al., 2015). Саме тому для дослідження токсичності власне наночастинок оптимальне використання структур на основі біологічно інертних матеріалів, наприклад, золота (Cabuzu et al., 2015).

Більшість досліджень у галузі нанотоксикології проводяться *in vitro*. Наночастинки металів – цито- та генотоксичні, можуть пошкоджувати біологічні мембрани та впливати на активність різних ензимів (Asare et al., 2012; Gao et al., 2013; Talebi et al., 2013). Дослідження *in vivo* в основному направлені на з'ясування фармакокінетичних властивостей частинок. Наночастинки можуть проходити через біологічні бар'єри (гемато-тестикулярний, гемато-енцефалічний, плацентарний) та акумулюватися у різних органах, у тому числі у тканинах плоду (Balasubramanian et al., 2012; Buerki-Thurner et al., 2012; Melnik et al., 2013).

Один з органів, здатних накопичувати наночастинки, – це сім'яник. *In vitro* продемонстровано токсичний вплив наночастинок на сперматозоїди та інтерстиціальні клітини сім'яника (Pizent et al., 2012; Zakhidov et al., 2012). У той же час даних щодо репродуктивної токсичності частинок *in vivo* порівняно мало: відомо, що за тривалого уведення наночастинки спричинюють появу структурно-функціональних порушень, хоча короткотривалі ефекти досліджені недостатньо (Thakur et al., 2014). Наночастин-

ки можуть виступати в ролі «ендокринних роз'єднувачів»: не спричиняючи значних порушень гістологічної будови органа, вони можуть впливати на системи регуляторних взаємодій (Li et al., 2012). Тому доцільне дослідження впливу наночастинок на характер відповіді органа на стимулювальні та інгібувальні впливи. У випадку гіпоталамо-гіпофізарно-гонадної системи ключова стимулювальна молекула – це кіспептин, який виділяється нейронами аркуатного ядра гіпоталамуса (Matvienko et al., 2013). Тому мета статті полягає у з'ясуванні особливостей морфофункціональних змін у сім'яниках щурів за дії наночастинок золота.

## Матеріал і методи досліджень

Наночастинки золота розміром 10–15 нм синтезували шляхом відновлення 1 ммоль/л розчину  $\text{NaAuCl}_4$  аскорбіновою кислотою у лужному середовищі за раніше описаною методикою (Kalynovskyi et al., 2016). Як стабілізатор наночастинок використовували 0,25 ммоль/л розчин поліфосфату натрію. Фізичні властивості отриманих розчинів контролювали за допомогою растрової електронної мікроскопії (Tescan (Tescan a.s., Чеська Республіка)) за напруги прискорення 5–20 кВ і лазерної фотокореляційної спектроскопії (Zeta Sizer Nano S (Malvern, Великобританія)). Готові розчини зберігали у темряві за кімнатної температури. Кінцева концентрація золота в розчині становила 200 мг/л.

Експеримент проводили на самцях білих щурів *Rattus norvegicus* віком 1 та 6 місяців (вагою 150–170 та 250–300 г відповідно), по 48 тварин у групі. У подальшому кожному віковій групі поділено на 8 підгруп по 6 тварин у кожній (табл. 1).

Експериментальні препарати вводили упродовж 10 діб. Наночастинки золота вводили інтраперитонеально з розрахунку 0,1 мг золота/100 г маси тіла тварини. Тваринам контрольних груп вводили відповідні об'єми 0,9% ізотонічного розчину  $\text{NaCl}$  та 0,25 ммоль/л розчину поліфосфату натрію.

Для стимуляції та пригнічення роботи сім'яників з 8-ї по 10-ту добу тваринам вводили кіспептин-10 (метастин-(45-54)-амід, Merck KGaA, Німеччина) та пептид 234 (кіспептин-234-трифлюороацетат, Sigma, США) відповідно. Для цього на 8-му добу експерименту тварин відповідних груп наркотизували сумішшю кетамін (8 мг/100 г маси тіла) та ксилазину (1 мг/100 г маси тіла). У подальшому проводили трепанацію та вводили розчини препаратів у порожнину лівого шлуночка мозку в дозі 3 мкг/100 г маси тіла. Робочі розчини препаратів виготовляли шляхом розчинення сухих пептидів у 10% диметилсульфоксиді. Місце уведення визначали за допомогою стереотаксичного атласу (Paxinos and Watson, 2007). Контролем до цих груп слугували тварини, яким

інтрацеребровентрикулярно вводили 10% розчин диметилсульфоксиду.

На 10-ту добу експерименту тварин декапітували та брали лівий сім'яник для подальших досліджень. Орган фіксували в суміші Буена упродовж 72 годин, зневоднювали у спиртах і заливали у парафін за загальноприйнятою методикою. Для мікроскопічних досліджень виготовляли зрізи товщиною 5–6 мкм, які забарвлювали гематоксилином Бюмера та еозином. Готові мікропрепарати аналізували на мікроскопі Olympus BX51 (Olympus, Японія), обладнаному цифровою фотокамерою Camedia C-5050 zoom. Для оцінювання морфофункціонального

стану сім'яників вимірювали діаметр звивистих сім'яних каналців, а також площу поперечного перерізу ядер клітин Сертолі та клітин Лейдіга.

Статистичну обробку даних виконували за допомогою програми Statistica 6.0. Характер розподілу даних у вибірках визначали за допомогою тесту Шапіро – Уїлка. Оскільки ми не виявили достовірних відмінностей від нормального розподілу, відмінності між групами оцінювали за допомогою однофакторного дисперсійного аналізу з апостеріорним тестом Тьюкі. Різницю вважали достовірною за  $P < 0,05$ . Дані представляли як середнє  $\pm$  стандартна похибка ( $\bar{x} \pm SE$ ).

Таблиця 1

Характеристика експериментальних груп тварин

Назва групи	Назва препарату	
	внутрішньочеревинне введення (1–10-та доба експерименту)	інтрацеребровентрикулярне введення (8–10-та доба експерименту)
Контроль	0,9% NaCl	–
ПФН	0,25 ммоль/л поліфосфат натрію	–
НЧЗ	200 мг/л розчин наночастинок золота	–
ДМСО	0,9% NaCl	10% диметилсульфоксид
КП-10	0,9% NaCl	кіспептин-10
Р-234	0,9% NaCl	пептид-234
НЧЗ + КП-10	200 мг/л розчин наночастинок золота	кіспептин-10
НЧЗ + Р-234	200 мг/л розчин наночастинок золота	пептид-234

### Результати та їх обговорення

Аналіз зрізів сім'яника тварин контрольної групи виявив типову для цього органа будову. У тварин місячного віку в деяких каналцях виявили сперматозоїди; це свідчить, що тварини вже перейшли до статевого дозрівання. Уведення розчинів поліфосфату натрію та диметилсуль-

фоксиду не спричинило змін жодного з виміряних нами морфометричних параметрів для обох вікових груп (табл. 1, 2). Це свідчить про правильність вибору речовин як допоміжних. Уведення розчину наночастинок золота щурам місячного віку не спричинило зменшення проаналізованих нами параметрів.

Таблиця 2

Морфометричні параметри сім'яників щурів місячного віку

Назва групи	Діаметр звивистих сім'яних каналців, мкм	Площа поперечного перерізу ядер клітин Сертолі, мкм <sup>2</sup>	Площа поперечного перерізу ядер клітин Лейдіга, мкм <sup>2</sup>
Контроль	237,76 $\pm$ 3,06	91,42 $\pm$ 1,89	43,32 $\pm$ 0,48
ПФН	234,75 $\pm$ 2,32	91,93 $\pm$ 2,11	43,87 $\pm$ 0,55
НЧЗ	236,77 $\pm$ 2,79	90,47 $\pm$ 1,96	42,16 $\pm$ 0,50
ДМСО	235,81 $\pm$ 2,34	90,40 $\pm$ 1,91	43,05 $\pm$ 0,58
КП-10	247,91 $\pm$ 2,53 <sup>#</sup>	99,90 $\pm$ 1,92 <sup>#</sup>	49,92 $\pm$ 0,63 <sup>#</sup>
Р-234	223,52 $\pm$ 2,46 <sup>#</sup>	91,02 $\pm$ 1,61	40,01 $\pm$ 0,55 <sup>#</sup>
НЧЗ + КП-10	236,97 $\pm$ 2,00 <sup>^</sup>	89,34 $\pm$ 1,61 <sup>^</sup>	37,48 $\pm$ 0,47 <sup>#^</sup>
НЧЗ + Р-234	223,51 $\pm$ 2,12 <sup>#</sup>	78,65 $\pm$ 1,86 <sup>#^</sup>	37,76 $\pm$ 0,62 <sup>#^</sup>

Примітки: \* – відмінності від контрольної групи достовірні за  $P < 0,05$ ; # – відмінності від групи «ДМСО» достовірні за  $P < 0,05$ ; ^ – відмінності від відповідної групи без введення наночастинок золота достовірні за  $P < 0,05$ .

Таблиця 3

Морфометричні параметри сім'яників щурів шестимісячного віку

Назва групи	Діаметр звивистих сім'яних каналців, мкм	Площа поперечного перерізу ядер клітин Сертолі, мкм <sup>2</sup>	Площа поперечного перерізу ядер клітин Лейдіга, мкм <sup>2</sup>
Контроль	280,75 $\pm$ 3,22	131,68 $\pm$ 2,65	52,17 $\pm$ 0,96
ПФН	280,33 $\pm$ 3,17	131,92 $\pm$ 2,72	52,43 $\pm$ 0,82
НЧЗ	269,12 $\pm$ 3,01*	124,77 $\pm$ 2,34*	48,53 $\pm$ 0,54*
ДМСО	280,55 $\pm$ 2,97	132,41 $\pm$ 2,58	51,67 $\pm$ 0,73
КП-10	291,57 $\pm$ 3,58 <sup>#</sup>	137,05 $\pm$ 2,62 <sup>#</sup>	56,89 $\pm$ 0,74 <sup>#</sup>
Р-234	269,83 $\pm$ 3,07 <sup>#</sup>	127,51 $\pm$ 2,39 <sup>#</sup>	46,94 $\pm$ 0,66 <sup>#</sup>
НЧЗ + КП-10	269,32 $\pm$ 3,08 <sup>#^</sup>	124,52 $\pm$ 2,38 <sup>#^</sup>	48,81 $\pm$ 0,52 <sup>#^</sup>
НЧЗ + Р-234	258,95 $\pm$ 2,94 <sup>#^</sup>	120,97 $\pm$ 2,17 <sup>#^</sup>	45,75 $\pm$ 0,54 <sup>#</sup>

Примітки: див. табл. 2.

У тварин шестимісячного віку спостерігали достовірне пригнічення як сперматогенної, так і ендокринної функцій сім'яника. При цьому спостерігали підвищення кількості гетерохроматину в ядрах і зменшення оксифільності цитоплазми інтерстиціальних клітин. Виявлені відмінності у відповіді тварин різних вікових груп можуть бути пояснені загальним нижчим рівнем функціональної активності сім'яників у тварин місячного віку. Інтрацеребровентрикулярне уведення кіспептину-10 на тлі ін'єкції фізіологічного розчину викликало достовірне зростання морфометричних параметрів як у молодих, так і у дорослих щурів. Морфологічно це проявлялось у підвищенні оксифільності цитоплазми та просвітлішанні ядер. Ядра клітин Сертолі часто полігональні, з 1–2 інвагінаціями каріолеми. Отримані дані свідчать про стимулювальний вплив кіспептину на сім'яники, що збігається з літературними даними (Matvienko et al., 2013; Helena et al., 2015).

Уведення пептиду 234 мало протилежний вплив. Морфологічні особливості клітин сім'яника були схожі на результати, отримані за умов уведення розчину наночастинок золота, та відображали загальне зниження функціональної активності органа. У деяких каналцях виявили дегенеровані сперматоцити – рання ознака зменшення рівня інтратестикулярного тестостерону (Creasy et al., 2012). Слід зауважити, що, на відміну від усіх інших вимірних нами параметрів, не виявлено змін площі ядер клітин Сертолі у тварин місячного віку. Цей факт також можна пояснити низьким рівнем активності сім'яників молодих тварин, а тому дія пригнічувальних факторів не була значною. Наші результати щодо впливу пептиду-234 на статеву систему повністю збігаються з літературними даними (Pineda et al., 2012).

Стимуляція сім'яників кіспептином-10 на тлі уведення наночастинок золота не викликала зростання морфометричних параметрів. Морфологічно спостерігали підвищення базofilії ядер, зменшення оксифільності цитоплазми клітин Лейдига, а також округлення ядер клітин Сертолі. У поодиноких каналцях були присутні дегенеровані сперматоцити. Відсутність відповіді сім'яника на стимулювальний вплив із боку гіпоталамуса свідчить про порушення регуляторних взаємодій у гіпоталамо-гіпофізарно-гонадній системі. Припускається, що один із патогенетичних ефектів наночастинок – їх втручання у внутрішньоклітинні сигнальні системи (Lucas et al., 2009). Можлива причина цього явища – ініціація стрес-реакції у клітинах залози за дії наночастинок, що продемонстровано за дії наночастинок срібла (Han et al., 2015). У той же час пригнічувальний вплив пептиду-234 зберігався: за комбінованого уведення пептиду та наночастинок зафіксували найнижчий рівень усіх вимірних морфометричних показників. На світлооптичному рівні відмічали ознаки зниження екзо- та ендокринної функцій сім'яника. Імовірно, у разі зниження кількості стимулювальних впливів на сім'яник на тлі дії стресора (наночастинок) спостерігається посилення розвитку стрес-реакції та пригнічення секреторних функцій клітин Лейдига та Сертолі.

## Висновки

Наночастинки золота пригнічують функціональну активність сім'яника дорослих тварин, не спричиняючи

значних патогістологічних змін. У той же час, за дії нанорозмірного золота як на дорослих, так і на молодих тварин спостерігається зміна характеру відповіді залози на стимуляцію з боку гіпоталамо-гіпофізарного комплексу. Пригнічувальний вплив наночастинок на залозу може бути пояснений їх цитотоксичністю щодо клітин Лейдига та елементів сперматогенного епітелію. Незважаючи на те, що встановлення точного механізму дії наночастинок потребує подальшого дослідження, наші результати мають бути прийняті до уваги під час біомедичного застосування наночастинок золота.

## Бібліографічні посилання

- Asare, N., Instanes, C., Sandberg, W., Refsnes, M., Schwarze, P., Kruszewski, M., Brunborg, G., 2012. Cytotoxic and genotoxic effects of silver nanoparticles in testicular cells. *Toxicology* 291, 65–72.
- Balasubramanian, S., Jittiwat, J., Manikandan, J., Ong, C.-N., Yu, L., Ong, W.-Y., 2010. Biodistribution of gold nanoparticles and gene expression changes in the liver and spleen after intravenous administration in rats. *Biomaterials* 31(8), 2034–2042.
- Bogdanovic, G., Djordjevic, A., 2016. Carbon nanomaterials: Biologically active fullerene derivatives. *Srp. Arh. Celok. Lek.* 144, 222–231.
- Buerki-Thurnherr, T., Mandach, U., Wick, P., 2012. Knocking at the door of the unborn child: Engineered nanoparticles at the human placental barrier. *Swiss Medical Weekly* 142, w13559.
- Cabuzu, D., Cirja, A., Puiu, R., Grumezescu, A., 2015. Biomedical applications of gold nanoparticles. *Curr. Top. Med. Chem.* 15(16), 1605–1613.
- Creasy, D., Bube, A., Rijk, E., Kandori, H., Kuwahara, M., Masson, R., Nolte, T., Reams, R., Regan, K., Rehm, S., Rogerson, P., Whitney, K., 2012. Proliferative and nonproliferative lesions of the rat and mouse male reproductive system. *Toxicol. Pathol.* 40(6), 40S–121S.
- Dreaden, E., Alkilany, A., Huang, X., Murphy, C., El-Sayed, M., 2011. The golden age: Gold nanoparticles for biomedicine. *Chem. Soc. Rev.* 41(7), 2740–2779.
- Gao, G., Ze, Y., Zhao, X., Sang, X., Zheng, L., Ze, X., Gui, S., Sheng, L., Sun, Q., Hong, J., Yu, X., Wang, L., Hong, F., Zhang, X., 2013. Titanium dioxide nanoparticle-induced testicular damage, spermatogenesis suppression, and gene expression alterations in male mice. *J. Hazard. Mater.* 258–259, 133–143.
- Han, J., Jeong, J.-K., Gurunathan, S., Choi, Y.-J., Das, J., Kwon, D.-N., Cho, S.-G., Park, C., Seo, H., Park, J., Kim, J., 2016. Male- and female-derived somatic and germ cell-specific toxicity of silver nanoparticles in mouse. *Nanotoxicology* 10(3), 361–373.
- Helena, C., Toporikova, N., Kalil, B., Stathopoulos, A., Pogrebna, V., Carolino, R., Anselmo-Franci, J., Bertram, R., 2015. KNDy neurons modulate the magnitude of the steroid-induced luteinizing hormone surges in ovariectomized rats. *Endocrinology* 156(11), 4200–4213.
- Kalynovskiy, V., Pustovalov, A., Grodzyuk, G., Andriushyna, N., Dzerzhynsky, M., 2016. Vplyv nanochastynok ta ioniv zlota na morfo-funkcionalnyi stan sim'yanykh statevonezrylykh shhuriv [Testicular morpho-functional state of immature rats under the effect of gold nanoparticles and ions]. *Visn. Kyiv Nat. Univ. im. Tar. Shev. Ser. Biol.* 71(1), 23–26 (in Ukrainian).
- Kim, J.-E., Shin, J.-Y., Cho, M.-H., 2012. Magnetic nanoparticles: An update of application for drug delivery and possible toxic effects. *Arch. Toxicol.* 86(5), 685–700.

- Li, W., Wang, F., Liu, Z., Wang, Y., Wang, J., Sun, F., 2013. Gold nanoparticles elevate plasma testosterone levels in male mice without affecting fertility. *Small* 9, 1708–1714.
- 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, 1654–1671.
- Lucas, B., Fields, C., Hofmann, M.-C., 2009. Signaling pathways in spermatogonial stem cells and their disruption by toxicants. *Birth Defects Research. Part C, Embryo Today: Reviews* 87(1), 35–42.
- Matvienko, M.G., Pustovalov, A.S., Dzerzhinsky, M.E., 2013. Variety of functions and effects of kisspeptin. *Biopolym. Cell* 29(1), 11–20.
- Melnik, E., Buzulukov, Y., Demin, V., Demin, V., Gmshinski, I., Tyshko, N., Tutelyan, V., 2013. Transfer of silver nanoparticles through the placenta and breast milk during *in vivo* experiments on rats. *Acta Naturae* 5(3), 107–115.
- Paxinos, G., Watson, C., 2007. The rat brain in stereotaxic coordinates 6th edition. Academic Press, London.
- Pineda, R., Garcia-Galiano, D., Roseweir, A., Romero, M., Sanchez-Garrido, M.A., Ruiz-Pino, F., Morgan, K., Pinilla, L., Millar, R., Tena-Sempere, M., 2010. Critical roles of kisspeptins in female puberty and preovulatory gonadotropin surges as revealed by a novel antagonist. *Endocrinology* 151(2), 722–730.
- Pizent, A., Tariba, B., Živković, T., 2012. Reproductive toxicity of metals in men. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology* 63(Suppl. 1), 35–46.
- Reyes-Esparza, J., Martínez-Mena, A., Gutiérrez-Sancha, I., Rodríguez-Fragoso, P., de la Cruz, G.G., Mondragón, R., Rodríguez-Fragoso, L., 2015. Synthesis, characterization and biocompatibility of cadmium sulfide nanoparticles capped with dextrin for *in vivo* and *in vitro* imaging application. *J. Nanobiotechnology* 13, 83.
- Shao, J., Griffin, R., Galanzha, E., Kim, J.-W., Koonce, N., Webber, J., Mustafa, T., Birls, A., Nedosekin, D., Zharov, V., 2013. Photothermal nanodrugs: Potential of TNF-gold nanospheres for cancer theranostics. *Sci. Rep.* 3, 1293.
- Talebi, A., Khorsandi, L., Moridian, M., 2013. The effect of zinc oxide nanoparticles on mouse spermatogenesis. *J. Assist. Reprod. Genet.* 30(9), 1203–1209.
- 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. *J. Nanobiotechnology* 12, 42.
- Wang, L., Chen, C., 2016. Pathophysiologic mechanisms of biomedical nanomaterials. *Toxicol. Appl. Pharm.* 299, 30–40.
- Zakhidov, S., Pavliuchenkova, S., Marshak, T., Rudoi, V., Dement'eva, O., Zelenina, I., Skuridin, S., Makarov, A., Khokhlov, A., Evdokimov, I., 2012. Effect of gold nanoparticles on mouse spermatogenesis. *Izv. Akad. Nauk Ser. Biol.* 39(3), 279–287.
- Zande, M., Vandebriel, R., Doren, E., Kramer, E., Rivera, Z., Serrano-Rojero, C., Gremmer, E., Mast, J., Peters, R., Hollman, P., Hendriksen, P., Marvin, H., Peijnenburg, A., Bouwmeester, H., 2012. Distribution, elimination, and toxicity of silver nanoparticles and silver ions in rats after 28-day oral exposure. *ACS Nano* 6(8), 7427–7442.

Надійшла до редколегії 08.09.2016