

## НАНОКРИСТАЛЛИЧЕСКИЙ ДИОКСИД ЦЕРИЯ ПОВЫШАЕТ ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ РЕПРОДУКТИВНОЙ СИСТЕМЫ СТАРЕЮЩИХ САМЦОВ КРЫС

Н. Я. Спивак<sup>1,2</sup>, Н. Д. Носенко<sup>3</sup>, Н. М. Жолобак<sup>1</sup>, А. Б. Щербаков<sup>1</sup>, А. Г. Резников<sup>3</sup>,  
О. С. Иванова<sup>4</sup>, В. К. Иванов<sup>4,5</sup>, Ю. Д. Третьяков<sup>4,5</sup>

<sup>1</sup>Институт микробиологии и вирусологии им. Д. К. Заболотного НАН Украины,  
Киев, Украина

<sup>2</sup>ООО «ДиаПрофМед», Киев, Украина

<sup>3</sup>Институт эндокринологии и обмена веществ им. В. П. Комиссаренко НАМН Украины,  
Киев, Украина

<sup>4</sup>Институт общей и неорганической химии им. Н. С. Курнакова РАН, Москва, Россия

<sup>5</sup>Факультет наук о материалах, Химический факультет,

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия

van@igic.ras.ru

### PACS 87.85.Rs

Исследовано влияние нанокристаллического диоксида церия (НДЦ) на состояние репродуктивной системы у стареющих самцов крыс. Показано, что введение стареющим самцам НДЦ в дозе 1 мг/кг в течение 10 дней значительно повышает уровень тестостерона, количество сперматозоидов и количество детенышей в приплоде, рожденных половозрелыми интактными самками. При этом в опытной группе физическое и половое развитие их потомков не отличались от контроля.

**Ключевые слова:** Ключевые слова: нанокристаллический диоксид церия, самцы крыс, тестостерон, сперматозоиды.

### 1. Введение

Нанокристаллический диоксид церия (НДЦ) — полифункциональный материал, перспективный для использования в области катализа, сенсорики, защитных покрытий, а также в области биологии и медицины [1, 2]. Систематические сведения о биологической активности НДЦ в настоящее время отсутствуют. Тем не менее, многочисленные сообщения свидетельствуют о чрезвычайно высокой перспективности биомедицинских приложений НДЦ. Помимо нейропротекторного действия НДЦ, известна его антиоксидантная активность, а также способность значительно повышать жизнедеятельность клеток головного мозга (астроциты, нейроны, микроглиальные клетки и олигодендроциты); показана возможность использования НДЦ для профилактики осложнений радиотерапии некоторых онкозаболеваний [3, 4]. Следует отметить, что области применения НДЦ не ограничиваются только приведенными выше примерами. Так, нами впервые установлена антивирусная активность НДЦ на моделях РНК- и ДНК-содержащих вирусов [5, 6], а также его способность усиливать антивирусную активность интерферона- $\alpha$  [7].

В процессе изучения биологической активности НДЦ нами отмечено улучшение физиологического состояния экспериментальных животных, особенно стареющих особей.

В работе [8] мы показали положительное влияние НДЦ на созревание ооцитов и жизнеспособность фолликулярных клеток у стареющих самок мышей. С целью уточнения причин наблюдаемого явления в настоящей работе проведены исследования по влиянию НДЦ на состояние репродуктивной системы у стареющих самцов крыс. Работа была выполнена в соответствии с условиями Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях.

## 2. Материалы и методы

**Животные:** использовали 26 крыс-самцов (Вистар) в возрасте 18 мес (масса тела 380–440 г). Животные содержались в стандартных условиях вивария при естественном освещении и рационе, рекомендованном для данного вида животных. Исследования проведены в зимне-весенний период (февраль–май).

**Золь НДЦ:** 0,1 М коллоидный раствор диоксида церия получен по методике [9]. К 200 мл раствора, содержащего 3,26 г  $\text{Ce}(\text{NO}_3)_3$  ( $\sim 0,01$  М) добавляли 1,5 г лимонной кислоты ( $\sim 0,0075$  М) и доводили pH до  $\sim 10,0$  водным раствором аммиака (3М). Полученный светло-коричневый раствор кипятили с обратным холодильником в течение 8 ч, после чего доводили до pH  $\sim 4,5$  0,01 М азотной кислотой. Наночастицы диоксида церия отделяли декантацией и несколько раз промывали на фильтре. Осадок переносили в колбу, растворяли в 100 мл воды и доводили pH до  $\sim 9$  водным раствором аммиака. Согласно данным просвечивающей электронной микроскопии и электронной дифракции (микроскоп Leo 912 AB Omega, увеличение до  $\times 500000$ ), полученные наночастицы являются кристаллическими, характеризуются высокой монодисперсностью и имеют размер 2,5–3 нм.

Золь НДЦ (1 мМ или 100 мМ) вводили животным в дозе 1 или 100 мг/кг массы тела через металлический зонд в желудок ежедневно на протяжении 10 суток. Для определения возможного токсического действия НДЦ оценивали общее состояние животных, взвешивали их до введения препарата, а также через 5 и 10 дней. Эвтаназию животных проводили быстрой декапитацией под легким эфирным наркозом через 24 ч после последнего введения препарата. Извлекали и взвешивали органы половой системы, надпочечники, почки, селезенку. Кровь собирали в гепаринизированные пробирки и отделяли плазму для определения уровня тестостерона радиоиммунологическим методом с использованием набора реагентов «RIA Testosterone direct» (Immunotech, Франция).

У животных контрольной и опытных групп в придатках семенников (эпидидимусах) по стандартной методике [10] определяли количество сперматозоидов, исследовали их морфологию и способность к оплодотворению.

Для изучения оплодотворяющей способности стареющих самцов контрольной группы и животных, получавших НДЦ в дозе 1 мг/кг (по 4 самца в каждой группе), к каждому из них подсаживали двух интактных половозрелых самок крыс (масса тела 180–200 г), которые пребывали в стадии эструса. Самок, у которых выявляли сперматозоиды в вагинальных мазках, взятых утром следующего дня после спаривания (1-й день беременности), отсаживали поодиночке в отдельные клетки и оставляли до родов. После родов подсчитывали общее количество крысят в приплоде (отдельно количество самок и самцов в каждом приплоде), взвешивали их на десятый день после рождения.

У полученного потомства определяли показатели физического развития: массу тела, время открывания глаз, отлипание ушных раковин, появление первого волосяного покрова. В более отдаленные сроки жизни проводили определение параметров полового созревания у молодых самцов (опускание семенников) и самок (открытие вагины).

Статистическую обработку результатов экспериментов проводили с использованием критерия *t* Стьюдента.

ТАБЛИЦА 1. Влияние 10-дневного введения золя НДЦ на массу половых органов стареющих самцов крыс ( $M \pm m$ ,  $n = 6$ )

Исследуемый показатель	Контроль	НДЦ, 1 мг/кг	НДЦ, 100 мг/кг
Масса тела, г	361,7±25,2	338,6±14,6	351,7±19,7
Семенники, г/100г м.т.	0,92±0,06	1,01±0,03	0,98±0,03
Семенные пузырьки, мг/100 г м.т.	130,7±6,8	141,1±8,8	137,7±7,6
Вентральная простата, мг/100 г м.т.	107,2±10,6	135,6±6,0*	117,4±15,1
Эпидидимис, мг/100 г м.т.	285,2±22,9	313,1±13,1	314,5±11,6
Коагулирующая железа, мг/100 г м.т.	60,9±4,0	57,6±4,2	56,9±8,3

Примечание: \* $P < 0,05$  в сравнении с контролем.

### 3. Результаты исследований и обсуждение

В результате изучения влияния НДЦ на морфофункциональное состояние репродуктивной системы стареющих самцов крыс установлено, что масса тела животных после 10-дневного курса введения НДЦ (по 1 или 100 мг/кг ежедневно) не отличалась от показателей контрольных животных. Двигательная активность, внешний вид, потребление воды и пищи были одинаковыми во всех группах, что свидетельствует об отсутствии токсического эффекта НДЦ на организм животных в данных условиях.

При анализе массы органов половой системы установлено, что применение НДЦ в дозе 100 мг/кг ежедневно в течение 10 дней не вызывало изменений массы органов половой системы. В то же время, введение меньшей дозы НДЦ (1 мг/кг) достоверно увеличивало (на 25,6 %) массу вентральной доли простаты по сравнению с контролем (табл. 1).

Следует также отметить, что масса надпочечников, почек и селезенки при использовании обеих концентраций НДЦ не отличалась от контрольных показателей.

Определение уровня тестостерона в плазме крови животных показало, что в контрольной группе индивидуальные значения содержания гормона колебались от 1,9 до 4,6 нмоль/л (при среднем значении 2,64 нмоль/л), что соответствовало возрастному снижению уровня гормона у стареющих самцов крыс. При 10-дневном введении НДЦ в дозе 100 мг/кг не отмечали существенных изменений уровня тестостерона в плазме крови животных (индивидуальные колебания 0,96–4,87 нмоль/л; среднее 2,66 нмоль/л). В то же время использование меньшей дозы НДЦ (1 мг/кг) приводило к двукратному повышению уровня гормона по сравнению с контрольными животными, а также животными, получавшими НДЦ в дозе 100 мг/кг (табл. 2). При этом следует отметить, что практически у всех животных, которым в течение 10 дней ежедневно вводили 1 мг/кг золя НДЦ (у 5 из 6), отмечали статистически достоверное повышение уровня тестостерона в плазме крови (диапазон колебаний составлял от 4,42 до 12,1 нмоль/л, среднее значение  $6,35 \pm 1,46$  нмоль,  $P < 0,05$ ); только в одном случае уровень тестостерона составил 1,52 нмоль/л.

При определении количества сперматозоидов в перфузатах эпидидимусов опытных и контрольных животных установлено, что 10-дневное введение НДЦ в дозе 1 мг/кг приводило к значительному (достоверному) повышению их количества (на 25,5%) по сравнению с контролем ( $P < 0,05$ ). В группе животных, получавших НДЦ в дозе 100 мг/кг (табл. 3), достоверного увеличения количества сперматозоидов не зарегистрировано.

ТАБЛИЦА 2. Влияние 10-дневного введения золя НДЦ на уровень тестостерона в плазме крови крыс ( $M \pm m$ ,  $n = 6$ )

п/п	Группы животных	Уровень тестостерона, нмоль/л
1	Контроль	2,64±0,40 (1,90–4,60)
2	НДЦ 1 мг/кг	5,55±1,40 (1,52–12,10)
3	НДЦ 100 мг/кг	2,66±0,78 (0,96–4,87)

Примечание: здесь и в табл. 3 в скобках указан диапазон колебаний индивидуальных значений.

ТАБЛИЦА 3. Влияние 10-дневного введения золя НДЦ на количество сперматозоидов (млн/мл) в перфузатах эпидидимусов стареющих самцов крыс ( $M \pm m$ ,  $n = 6$ )

п/п	Группы животных	Концентрация сперматозоидов, млн/мл
1	Контроль	71,3±3,5 (68–83)
2	НДЦ 1 мг/кг	89,5±6,8* (67–114)
3	НДЦ 100 мг/кг	83,5±5,1 (68–100)

Примечание: \* $P < 0,05$  в сравнении с контролем.

При морфологическом анализе сперматозоидов самцов крыс опытных и контрольной групп (в среднем по 200 сперматозоидов в каждом мазке) не отмечали патологии головок сперматозоидов, редко (1,35–2,1%) встречалась патология шейки (неправильный угол соединения с головкой или отрыв головки от шейки) и хвоста (3,9–12,4%).

При определении оплодотворяющей способности стареющих самцов, которые получали НДЦ в дозе 1 мг/кг на протяжении 10 дней, установлено, что беременность у подсаженных к ним интактных самок протекала нормально и составила 22 суток, потомство рождалось живым, летальность в первые 2 недели после рождения отсутствовала.

У самок, которых спаривали с самцами контрольной группы, в среднем рождалось по 5 животных в приплоде. В то же время, у самок, оплодотворенных стареющими самцами опытной группы (доза НДЦ — 1 мг/кг), рождалось в среднем по 10 животных, что вдвое больше, чем у самок контрольной группы. При этом следует отметить, что в контрольной и опытной группах разделение по полу (самцы:самки) было соответственно 1,9:1 и 1,3:1. То есть самцов в потомстве опытной группы ( $n = 17$ ) было почти в 1,5 раза меньше, чем в контрольной ( $n = 25$ ). Что же касается физического развития потомства в контрольной и опытной группах, то оказалось, что животные, которые были рождены в опытной группе, в среднем имели меньшую массу тела при рождении. Очевидно, это обусловлено тем, что в приплоде рождалось в 2 раза больше животных. В то же время, все остальные параметры физического и полового развития потомства самок, которых оплодотворяли самцы контрольной и опытной групп (отхождение ушных раковин, открытие глаз, прорезывание резцов, появление волосяного покрова, опускание семенников у самцов и открытие вагины у самок), практически не отличались.

#### 4. Заключение

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют, что введение стареющим самцам НДЦ в дозе 1 мг/кг в течение 10 дней значительно повышает уровень тестостерона,

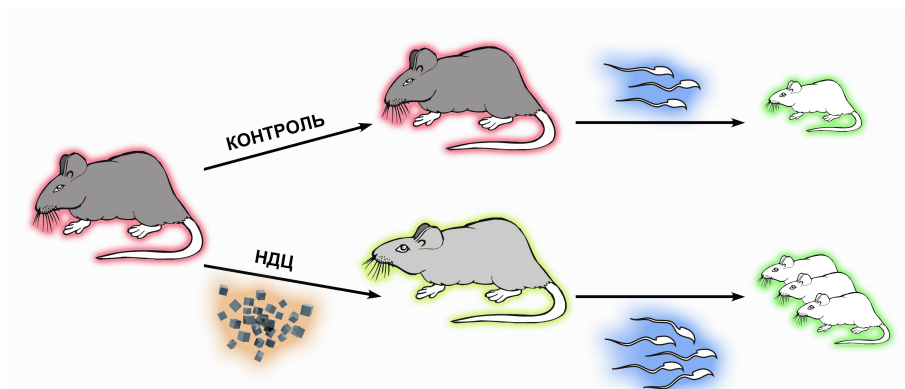


РИС. 1. Нанокристаллический диоксид церия (НДЦ) повышает функциональную активность репродуктивной системы стареющих самцов крыс

количество сперматозоидов и количество детенышей в приплоде, рожденных половозрелыми интактными самками (см. рис. 1). При этом в опытной группе физическое и половое развитие их потомков не отличались от контроля. Дальнейшие исследования влияния НДЦ на функциональную активность репродуктивной системы у стареющих самцов и самок позволят ответить на вопросы, связанные с механизмом его действия, найти оптимальные схемы введения, определить продолжительность наблюдаемых эффектов и др.

Работа выполнена при финансовой поддержке Государственного агентства по вопросам науки, инноваций и информатизации Украины проекта «Разработка, создание и испытания композитных наноматериалов на основе наночастиц диоксида церия», а также РФФИ (11-02-01103 и 11-03-00828) и программ фундаментальных исследований Президиума РАН.

Авторы благодарны сотрудникам ГУ Институт эндокринологии и обмена веществ им. В.П. Комиссаренко НАМН Украины Поляковой Л.И., Синицыну П.В., Лимаревой А.А. за помощь в проведении экспериментов.

## Литература

- [1] Щербаков А.Б., Иванов В.К., и др. Нанокристаллический диоксид церия — перспективный материал для биомедицинского применения // Биофизика. — 2011. — Т. 56, № 6. — С. 995–1015.
- [2] Hirst S.M., Karakoti A., et al. Bio-distribution and In Vivo Antioxidant Effects of Cerium Oxide Nanoparticles in Mice // Environmental Toxicology. — 2011. — V. 26. — DOI 10.1002/tox.20704.
- [3] Colon J., Hsieh N., et al. Cerium oxide nanoparticles protect gastrointestinal epithelium from radiation-induced damage by reduction of reactive oxygen species and upregulation of superoxide dismutase 2 // Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine. — 2010. — V. 6, No. 5. — P. 698–705.
- [4] Baker C.H. Radiation Protection with Nanoparticles. In: Nanomedicine in Health and Disease. Eds: Hunter R.J., Preedy V.R. — Science Publishers, 2011. — 448 p.
- [5] Жолобак Н.М., Олевинская З.М., и др. Антивирусное действие наночастиц диоксида церия, стабилизированных низкомолекулярной полиакриловой кислотой // Мікробіол. журн. — 2010. — Т. 72, № 3. — С. 42–47.
- [6] Zhlobak N., Sherbakov A., et al. Antiviral effectivity of ceria colloid solutions // Antiviral Research, Twenty-Fourth International Conference on Antiviral Research, Sofia, Bulgaria, 2011. — V. 90, No. 2. — P. A67.
- [7] Жолобак Н.М., Кривохатская Л.Д., и др. Влияние нанокристаллического диоксида церия на активность препарата лаферон-фармбиотек // Сборник трудов конференции «Нанотехнологии в онкологии, 2010», Москва, 30 октября 2010.
- [8] Spivak N.Ya., Shepel E.A., et al. Ceria nanoparticles boost activity of aged murine oocytes // Nano Biomed Eng. — 2012. — V. 4, No. 4. — P. 188.

- [9] Иванов В.К., Полежаева О.С., и др. Синтез и исследование термической устойчивости золь нанокристаллического диоксида церия стабилизированных лимонной и полиакриловыми кислотами // Журнал неорганической химии. — 2010. — Т. 55, № 3. — С. 368–373.
- [10] Сапоцкий И.В., Фоменко В.Н., и др. Методы экспериментального исследования по установлению порогов действия промышленных ядов на генеративную функцию с целью гигиенического нормирования. Метод. рекомендации. — МЗ СССР, М., 1978. — 36 с.

**THE NANOCRYSTALLINE CERIUM DIOXIDE RAISES THE FUNCTIONAL ACTIVITY OF GENESIAL SYSTEM OF AGEING MALES OF RATS**

N. Ya. Spivak<sup>1,2</sup>, N. D. Nosenko<sup>3</sup>, N. M. Zholobak<sup>1</sup>, A. B. Shcherbakov<sup>1</sup>, A. G. Reznikov<sup>3</sup>,  
O. S. Ivanova<sup>4</sup>, V. K. Ivanov<sup>4,5</sup>, Yu. D. Tretyakov<sup>4,5</sup>

<sup>1</sup>D. K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

<sup>2</sup>"DiaProphMed" Ltd, Kyiv, Ukraine

<sup>3</sup>V. P. Komissarenko Institute of Endocrinology and Metabolism of National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

<sup>4</sup>N. S. Kurnakov Institute of General and Inorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

<sup>5</sup>Department of Materials Science, M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Effect of a nanocrystalline cerium dioxide (nanoceria) on the reproductive system of elderly male rats has been studied. It was shown that nanoceria administration (1 mg/kg for 10 days) considerably increases testosterone level, quantity of spermatozoa and quantity of rat cubs in the litter born by pubertal intact females. Physical and sexual development of rat cubs in the test group did not differ from the control.

**Keywords:** nanocrystalline cerium dioxide, male rats, testosterone, spermatozoa.