

В. Е. КАЛИНОВСКИЙ¹, А. С. ПУСТОВАЛОВ¹, Г. Я. ГРОДЗЮК²,
Н. С. АНДРЮШИНА², Н. Э. ДЗЕРЖИНСКИЙ¹

ВЛИЯНИЕ НАНОЧАСТИЦ ЗОЛОТА И СЕРЕБРА НА КИСПЕПТИНЗАВИСИМУЮ РЕГУЛЯЦИЮ ГИПОТАЛАМО-ГИПОФИЗАРНО-ГОНАДНОЙ ОСИ

Поступила 21.06.16

Были исследованы особенности морфофункциональных реакций в нейронах аркуатного и преоптического ядер (АЯ и ПОЯ соответственно) гипоталамуса (измерялись площади сечений ядер нейроцитов). Эти реакции вызывались введением наночастиц (НЧ) золота и серебра (НЧЗ и НЧС соответственно) в условиях активации и блокирования кисспептинопосредованной сигнализации у одно- и шестимесячных самцов крыс. Внутривентрикулярное введение НЧЗ, и НЧС обуславливало уменьшение размеров ядер упомянутых нейронов животных обеих возрастных групп, что, вероятно, указывало на подавление активности гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси. При комбинации введения НЧ с интрацеребровентрикулярными инъекциями активатора или блокатора кисспептинергической сигнализации наблюдали независимое действие примененных агентов на нейроны ПОЯ. Нейроны АЯ молодых крыс в случае комбинированных введений сохраняли чувствительность к инъекциям кисспептина, но не его антагониста; нейроны АЯ взрослых крыс реагировали противоположным образом. Полученные результаты свидетельствуют о неспецифическом токсическом действии НЧЗ и НЧС на работу центрального регулятора репродуктивной системы самцов крыс.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: кисспептин, наночастицы (НЧ), золото, серебро, аркуатное ядро (АЯ), преоптическое ядро (ПОЯ).

ВВЕДЕНИЕ

Функционирование репродуктивной системы млекопитающих зависит от состояния гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси (ГГГО). Основным центральным регуляторным компонентом последней является комплекс гипоталамических структур промежуточного мозга. Важнейшую роль при этом играют нейроны двух пар гипоталамических ядер – аркуатных (АЯ) и преоптических (ПОЯ). Повышение активности половой системы обеспечивается выделением гонадолиберина (гонадного рилизинг-гормона – ГнРГ) нейронами, расположенными в ПОЯ переднего гипоталамуса [1]. Активность этих клеток, в свою очередь, регулируется белком

кисспептином, который продуцируется и выделяется нейронами АЯ и перивентрикулярного ядра. АЯ обеспечивает регуляцию активности половой системы по принципу негативной обратной связи. Изменения активности нейроцитов АЯ определяют наступление полового созревания и у самцов, и у самок. Перивентрикулярное ядро гипоталамуса у грызунов развито только у самок; его активность обеспечивает преовуляторный выброс половых гормонов [2, 3].

Использование наноматериалов в настоящее время является одним из наиболее популярных и перспективных направлений науки и медицины. Наночастицы (НЧ) разных форм и размеров предлагаются применять для терапии онкологических заболеваний, доставки лекарственных препаратов к тканям/клеткам-целям, а также в системах биодетекции [4, 5]. Во многих случаях такие предложения уже реализуются. Уже существует значительное количество готовых коммерческих продуктов, в составе которых присутствуют НЧ; такие продукты создаются пищевой и фармацевтической промышлен-

¹ УНЦ «Институт биологии и медицины Киевского национального университета им. Тараса Шевченка» (Украина).

² ООО «Наномедтех», Киев (Украина).

Эл. почта: squilchuw@gmail.com (В. Е. Калиновский);
aspustovalov@yandex.ua (А. С. Пустовалов);
nanosvin@meta.ua (Г. Я. Гродзюк);
natashaand9@gmail.com (Н. С. Андриюшина);
cytolog@univ.kiev.ua (Н. Э. Дзержинский).

ленностью, применяются в косметологии. В то же время необходимо признать, что информация о безопасности подобных продуктов крайне ограничена [6].

Было продемонстрировано, что НЧ различных размеров и химического состава способны преодолевать биологические барьеры в организме, селективно накапливаться в определённых тканях и вызывать в них существенные структурные и функциональные изменения [7]. В ряде исследований была показана токсичность НЧ в отношении репродуктивной системы, но конкретные механизмы такого действия пока не установлены [8, 9].

В нашей работе мы пытались выяснить влияния введения НЧ таких металлов, как золото и серебро (НЧЗ и НЧС соответственно), на работу центральных регуляторов половой функции – АЯ и ПОЯ гипоталамуса крыс. В качестве индикаторов функционального состояния упомянутых гипоталамических структур мы использовали геометрические размеры ядер нейроцитов, расположенных в их пределах, поскольку известно о положительной корреляции между изменениями этих параметров и активацией соответствующих клеточных элементов или подавлением их активности [10, 11].

МЕТОДИКА

НЧЗ и НЧС получали соответственно путем восстановления натрия тетрахлораурата(III) и серебра нитрата аскорбиновой кислотой в присутствии 0.25 мМ натрия полифосфата в качестве стабилизатора. Физико-химические параметры полученных наноструктур контролировали, используя растровую электронную микроскопию (LMU Mira3 Tescan; «Tescan a.s.», Чехия) и энергодисперсионную рентгеновскую спектроскопию (Oxford X-MAX 80-mm²; «Oxford Instruments», США). Как выяснилось, полученные нами частицы имели сферическую форму и диаметр 8–12 нм. Концентрация указанных металлов в их коллоидных растворах составляла 0.2 г/л. Готовые растворы хранили в темноте при комнатной температуре.

Эксперименты были проведены на самцах белых лабораторных крыс двух возрастных групп – одно- и шестимесячных; начальная масса тела составляла 130–150 и 250–300 г соответственно. Животные каждой из возрастных групп были рандомизированно разделены на 11 подгрупп (в каждой группе $n = 6$).

Т а б л и ц а 1. Характеристика экспериментальных групп животных

Т а б л и ц я 1. Характеристика экспериментальных групп тварин

Группа	Вводимые препараты и способ введения	
	первый–10-й дни эксперимента, внутривентрикулярно	восьмой–10-й дни эксперимента, интрацеребровентрикулярно
Контроль	NaCl, 0.9 %	–
Холостой контроль	натрия полифосфат, 0.25 мМ	–
НЧЗ	коллоидный раствор НЧЗ	–
НЧС	коллоидный раствор НЧС	–
ДМСО	NaCl, 0.9 %	ДМСО, 10 %
КП-10	NaCl, 0.9 %	КП-10
P-234	NaCl, 0.9 %	P-234
НЧЗ+КП-10	раствор НЧЗ	КП-10
НЧЗ+P-234	раствор НЧЗ	P-234
НЧС+КП-10	раствор НЧС	КП-10
НЧС+P-234	раствор НЧС	P-234

П р и м е ч а н и я. НЧЗ – наночастицы золота, НЧС – наночастицы серебра; ДМСО – диметилсульфоксид; КП-10 – кисспептин-10; P-234 – блокатор кисспептиновых рецепторов.

Характеристики экспериментальных групп представлены в табл. 1.

Животным контрольной группы ежедневно в течение 10 дней внутривентрикулярно (в.в.) вводили 0.9 %-ный изотонический раствор натрия хлорида. Крысам группы холостого контроля вводили в.в. только раствор натрия полифосфата (0.25 мМ). Экспериментальным группам животных вводили в.в. НЧЗ или НЧС из расчёта 0.1 мг металла/100 г массы тела.

Активацию функционирования ГГГО экспериментальных животных трех групп моделировали введением кисспептина-10 (КП-10; метастин-(45-54)-амид; «Merck KGaA», ФРГ. Для подавления указанной системы крысам других трёх групп инъецировали антагонист рецепторов кисспептина пептид 234 (P-234; кисспептин-234-трифторацетат; «Sigma», США). Рабочие растворы пептидов готовили на 10 %-ном диметилсульфоксиде (ДМСО) и вводили интрацеребровентрикулярно (в полость левого желудочка мозга) в дозах 0.1 мкг/100 г массы

тела в течение восьмого–10-го дней согласно ранее описанной методике [12]. Контролем выступала группа животных, которым также интрацеребровентрикулярно вводили 10 %-ный ДМСО. Место инъекирования определяли согласно картам стереотаксического атласа [13].

На 10-й день эксперимента, через 1 ч после последней инъекции, животных усыпляли в атмосфере CO₂ и декапитировали. Участки головного мозга, соответствующие гипоталамической зоне, фиксировали в жидкости Буэна и заливали в парафин по общепринятой методике [14]. Из этих блоков изготавливали фронтальные срезы толщиной 5 мкм, которые окрашивали гематоксилином Бёмера и эозинном.

В ходе морфометрических исследований препараты просматривали под микроскопом Olympus Primo Star («Carl Zeiss Microimaging GmbH», ФРГ) при большом увеличении; цветные микрофотографии получали с помощью камеры Tucsен 5.0MP CMOS TCA-5.0C («Tucsен Photonics», КНР). Используя анализатор изображений, измеряли морфометрический коррелят функционального состояния клеток – площади поперечного сечения ядер нейроцитов (*n* таких измерений в группах варьировало в пределах 120–150).

Полученные данные представлены ниже как среднее ± ошибка среднего ($M \pm m$). Межгрупповые сравнения проводили с помощью однофакторного дисперсионного анализа с апостериорным тестом Тьюки. Межгрупповые различия считали значимыми при $P < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

При в.б. введении раствора натрия полифосфата каких-либо значимых отличий средних размеров ядер нейроцитов обеих исследованных гипоталамических структур как молодых, так и взрослых животных от контроля не наблюдалось. Аналогичные результаты были получены в условиях интрацеребровентрикулярного введения 10 %-ного ДМСО, комбинированного с в.б. инъекциями физиологического раствора.

В то же время после 10-дневного в.б. введения коллоидного раствора НЧЗ средние значения площадей поперечного сечения ядер нейроцитов как в АЯ, так и в ПОЯ оказались достоверно меньшими, чем в контроле. Декременты у нейроцитов АЯ молодых и взрослых крыс составляли 8 и 17%, а у клеток ПОЯ – 12 и 14 % соответственно. Действие НЧС обуславливало в целом аналогичные эффекты; у нейронов одномесечных крыс измеренные параметры АЯ и ПОЯ соответственно были меньше на 9 и 14%, а у шестимесечных – на 16 и 14 %. Средние значения измеренных параметров вышеописанных групп приведены в табл. 2.

Интрацеребровентрикулярное введение КП-10 обуславливало достоверное уменьшение средней площади сечения ядер нейронов АЯ как у молодых, так и у взрослых животных (рис. 1). В то же время существенных изменений размеров ядер нейроцитов ПОЯ в условиях данного модуса введения не наблюдали ни в одной из возрастных групп. Ин-

Т а б л и ц а 2. Средние площади поперечного сечения ядер нейроцитов аркуатного и преоптического ядер (АЯ и ПОЯ соответственно) гипоталамуса при введении наночастиц золота и серебра (НЧЗ и НЧС соответственно)

Т а б л и ц я 2. Середні площі поперечного перерізу ядер нейроцитів аркуатного та преоптичного ядер (АЯ і ПОЯ відповідно) гіпоталамуса при введенні наночастинок золота та срібла (НЧЗ і НЧС відповідно)

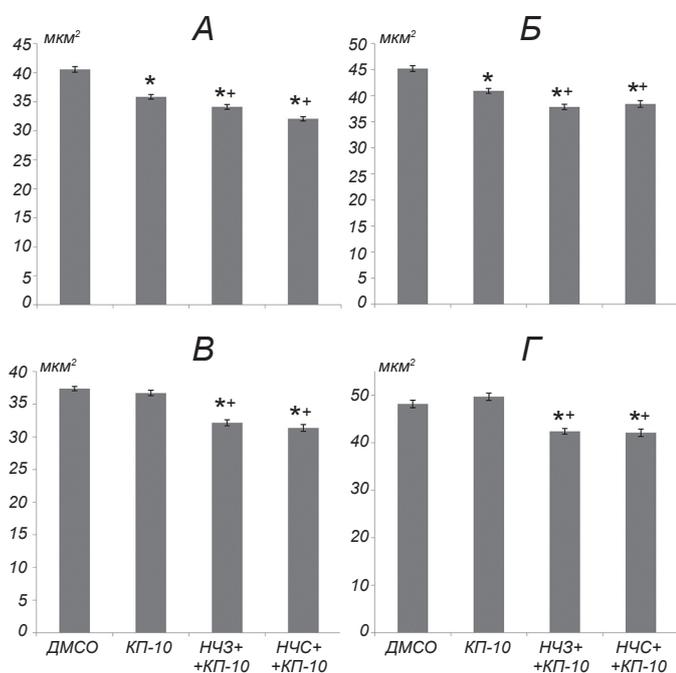
Группа	Площадь сечения ядер, мкм ²			
	одномесечные крысы		шестимесечные крысы	
	АЯ	ПОЯ	АЯ	ПОЯ
Контроль	40.45 ± 0.48	36.71 ± 0.33	45.21 ± 0.46	48.06 ± 0.64
Полифосфат натрия	39.75 ± 0.35	37.00 ± 0.37	46.27 ± 0.50	48.13 ± 0.82
ДМСО	40.56 ± 0.49	37.38 ± 0.33	45.21 ± 0.55	48.17 ± 0.78
НЧЗ	37.26 ± 0.36*	32.46 ± 0.51*	37.30 ± 0.59*	41.46 ± 0.67*
НЧС	36.83 ± 0.49*	31.66 ± 0.28*	37.86 ± 0.47*	41.67 ± 0.70*

Примечания. ДМСО – диметилсульфоксид. *Разница между контрольной и экспериментальной группами достоверна с $P < 0.05$.

трацеребровентрикулярное введение КП-10, комбинированное с в.б. инъекциями НЧЗ одномесячным животным, приводило к уменьшению размеров ядер (при сравнении с соответствующим значением в группе НЧЗ) и, очевидно, соответственно к понижению функциональной активности нейроцитов АЯ. В то же время в ПОЯ параллельных изменений не наблюдалось. При аналогичной схеме введения достоверных изменений как в АЯ, так и в ПОЯ взрослым животным также не наблюдалось. Инъекции КП-10 животным, получающим коллоидный раствор НЧС, не приводили к сдвигам размерных параметров и, соответственно, изменениям активности нейроцитов ПОЯ в обеих возрастных группах. В то же время в АЯ молодых крыс было отмечено уменьшение площади сечения ядер ней-

роцитов в среднем на 13 %.

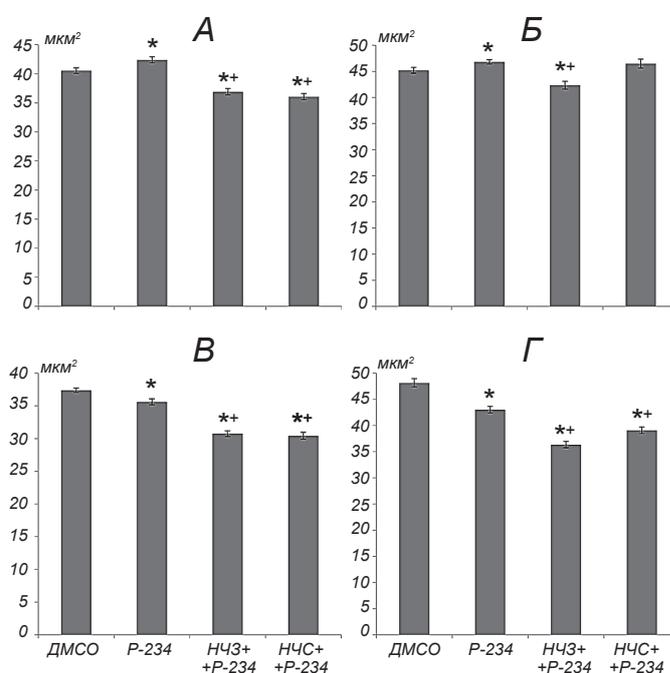
Введение в полость бокового желудочка головного мозга антагониста кисспептиновых рецепторов P-234 обуславливало увеличение размеров ядер, т. е. достоверное повышение активности нейронов в АЯ и понижение – в ПОЯ крыс обеих возрастных групп (рис. 2). Комбинированное введение P-234 и НЧ металлов вызывало подавление активности нейронов по сравнению с таковой в группах НЧЗ и НЧС. В АЯ шестимесячных животных при комбинации введений P-234 и НЧ было отмечено достоверное увеличение размеров ядер нейронов. В то же время в АЯ молодых животных аналогичных существенных изменений не наблюдалось.



Р и с. 1. Средние значения площадей поперечного сечения (мкм^2) ядер нейроцитов аркуатного (А, Б) и преоптического (В, Г) ядер гипоталамуса одно- (А, В) и шестимесячных (Б, Г) крыс при действии кисспептина (КП-10) и наночастиц золота и серебра (НЧЗ и НЧС соответственно).

ДМСО – группы холостого контроля, животным которых вводили демитилсульфоксид. *Разница между контрольной и экспериментальной группами достоверна с $P < 0.05$; +разница между группой КП-10 и экспериментальной группой достоверна с $P < 0.05$.

Р и с. 1. Середні значення площ поперечного перерізу (мкм^2) ядер нейроцитів аркуатного (А, Б) та преоптичного (В, Г) ядер гіпоталамуса одно- (А, В) та шестимісячних (Б, Г) шурів при дії кисспептину (КП-10) та наночастинок золота та срібла (НЧЗ і НЧС відповідно).



Р и с. 2. Средние значения площадей поперечного сечения (мкм^2) ядер нейроцитов аркуатного (А, Б) и преоптического (В, Г) ядер гипоталамуса одно- (А, В) и шестимесячных (Б, Г) крыс при действии блокатора кисспептиновых рецепторов (P-234) и наночастиц золота и серебра (НЧЗ и НЧС соответственно).

*Разница между группой P-234 и экспериментальной группой достоверна с $P < 0.05$. Остальные обозначения те же, что и на рис. 1.

Р и с. 2. Середні значення площ поперечного перерізу (мкм^2) ядер нейроцитів аркуатного (А, Б) та преоптичного (В, Г) ядер гіпоталамуса одно- (А, В) та шестимісячних (Б, Г) шурів при дії блокатора кисспептинових рецепторів (P-234) та наночастинок золота та срібла (НЧЗ і НЧС відповідно).

ОБСУЖДЕНИЕ

В проведенных нами исследованиях введения натрия полифосфата и 10 %-ного раствора ДМСО не вызывали заметных биологических эффектов. Это подтверждает правомерность выбора данных соединений в качестве вспомогательных веществ для проведенных экспериментов.

В наших опытах и НЧЗ, и НЧС оказывали заметное негативное воздействие на морфометрические характеристики нейроцитов и, соответственно, уровень функционирования обоих регуляторных центральных компонентов ГГГО. Известно, что наноразмерные частицы металлов (<20 нм) могут проходить через биологические барьеры – гемато-тестикулярный, плацентарный и гемато-энцефалический [15]. В экспериментах Села и Ченга было показано, что НЧЗ селективно накапливаются в семенниках и головном мозгу [16, 17]. Кроме того, оказывая непосредственное токсическое действие на барьеробразующие клетки, НЧ могут обуславливать повышение проницаемости биобарьеров, что неизбежно будет сопряжено с нарушениями функционирования соответствующих органов [15]. Поскольку наблюдаемые нами изменения под действием НЧС и НЧЗ были однонаправленными, можно предположить проникновение данных частиц в гипоталамическую область (например, из области срединного возвышения), откуда они могут проникать непосредственно в кисспептин- и ГнРГ-продуцирующие нейроны, а это приводит к нарушению функционирования последних [18].

Подавляющее воздействие КП-10 на работу аркуатных нейронов является типичным проявлением функционирования негативной обратной связи. Следует, однако, отметить, что такое действие не является прямым – на аркуатных кисспептинпродуцирующих нейронах не были обнаружены рецепторы собственно к кисспептину. Поэтому компенсаторное подавление активности упомянутых клеток при введении экзогенного КП-10, видимо, связано с активацией всей ГГГО. Такая активация приводит к повышению концентрации половых гормонов, которые и действуют на нейроны АЯ [19]. Действие блокатора кисспептиновых рецепторов Р-234 на аркуатные нейроциты может быть объяснено работой подобных же механизмов.

Известно, что рецепторы к кисспептину у ГнРГ-продуцирующих нейронов располагаются как в области перикариона, так и около терминалей аксона [20]. При этом активация указанных рецепторов не-

обходима и для поддержания определённого уровня функциональной активности данных клеток как таковой, и для непосредственного контроля секреции ГнРГ [19]. В исследованиях Новайры и соавт. было показано, что повышение экспрессии мРНК ГнРГ происходит под действием кисспептина только в определённой концентрации [21]. С учетом этого отсутствие достоверных изменений размеров ядер нейронов ПОЯ при введении КП-10 в нашем эксперименте может быть связано с десенситизацией нейронов. В то же время достоверное уменьшение размеров ядер в случае введения Р-234 является результатом блокирования поддерживающего влияния кисспептина на активность преоптических нейронов.

При комбинированном введении НЧС и НЧЗ совместно с интрацеребровентрикулярными инъекциями КП-10 и Р-234 каждое из действующих веществ сохраняло особенности своего влияния на нейроны ПОЯ животных обеих возрастных групп. КП-10 не оказывал достоверного влияния на размеры ядер нейроцитов данной структуры, а НЧ и Р-234 действовали ингибирующе, причём подобные эффекты были синергичными. В условиях комбинированных введений молодым животным было отмечено отсутствие стимулирующего действия Р-234 на аркуатные нейроны. Возможной причиной такой ситуации является общее подавление клеточного метаболизма исследуемых нейронов в результате действия НЧЗ и НЧС. Следует отметить, что введение кисспептина на фоне инъекций НЧС обеспечивало больший подавляющий эффект по сравнению с таковым в группе НЧЗ+КП-10. Подобное наблюдение может свидетельствовать о том, что для молодых животных наносеребро более токсично, чем нанозолото. Было показано, что цитотоксические эффекты НЧС в значительной мере обусловлены высвобождением с их поверхности ионов серебра, обладающих весьма высокой токсичностью [22]. Подобный вид токсичности у НЧЗ, видимо, выражен в меньшей степени.

Характер действия Р-234 на нейроны АЯ шестимесячных животных при комбинированном введении использованных препаратов соответствовал наблюдаемому в группе Р-234, что может свидетельствовать о нормальном, в целом, функционировании внутриклеточных регуляторных систем. Отсутствие ингибирующего действия КП-10 на нейроны АЯ взрослых животных в условиях комбинированных введений может быть следствием подавляющего действия наноразмерных структур

на функциональное состояние соответствующих клеток. Следует отметить, что при введении НЧС (но не НЧЗ) в комплексе с введением Р-234 нейроны АЯ восстанавливали свою активность практически до уровня контрольных значений. Подобная специфика может быть обусловлена разными механизмами действия частиц исследуемых металлов.

Таким образом, мы обнаружили, что НЧЗ и НЧС оказывают подавляющее действие на активность нейронов АЯ и ПОЯ гипоталамуса. Особенности изменений морфофункционального состояния нейроцитов этих ядер при комбинированных введениях препаратов согласуются с интерпретацией действия нанопрепаратов золота и серебра как неспецифических токсикантов по отношению к исследованной функциональной системе (ГГГО).

Эксперименты на животных были проведены в соответствии с положениями Хельсинкской Декларации 1975 г., пересмотренной и дополненной в 2000 г. На всех этапах исследования соблюдались современные правила содержания лабораторных животных, соответствующие принципам Европейской Конвенции о защите позвоночных животных, которые используются для экспериментов и других научных целей (Страсбург, 1985).

У всех авторов данной работы – В. Е. Калиновского, А. С. Пустовалова, Г. Я. Гродзюк, Н. С. Андрушиной и Н. Э. Дзержинского – отсутствуют конфликты любого рода, касающиеся коммерческих или финансовых отношений, отношений с организациями или лицами, которые каким-либо образом могли быть связаны с исследованием, а также взаимоотношений соавторов статьи.

В. Е. Калиновский¹, А. С. Пустовалов¹, Г. Я. Гродзюк²,
Н. С. Андрушина², М. Е. Дзержинский¹

ВПЛИВ НАНОЧАСТИНОК ЗОЛОТА І СРІБЛА НА КІСПЕПТИНЗАЛЕЖНУ РЕГУЛЯЦІЮ ГІПОТАЛАМО-ГІПОФІЗАРНО-ГОНАДНОЇ ОСІ

¹ УНЦ «Інститут біології та медицини Київського національного університету ім. Тараса Шевченка» (Україна).

² ТОВ «Наномедтех», Київ (Україна).

Резюме

Було досліджено особливості морфофункціональних реакцій у нейронах аркуатного та преоптичного ядер (АЯ та ПОЯ відповідно) гіпоталамуса (вимірювали площі перерізу ядер нейроцитів). Ці реакції викликалися введенням наночастинок (НЧ) золота та срібла (НЧЗ і НЧС відповідно) в умовах активації та блокування кіспептинопосередкованої сигналізації в одно- та шестимісячних самців шурів. Внутрішньоочеревинне введення і НЧЗ, і НЧС зумовлювало

зменшення розмірів ядер згаданих нейронів, що, вірогідно, вказувало на пригнічення активності гіпоталамо-гіпофізарно-гонадної осі. При комбінації введення НЧ з інтрацеребровентрикулярними ін'єкціями активатора або блокатора кіспептинергічної сигналізації відмічали незалежну дію застосованих агентів на нейроцити ПОЯ. Нейрони АЯ молодих шурів у разі комбінованих уведень зберігали чутливість до ін'єкцій кіспептину, але не його антагоніста; нейрони АЯ дорослих шурів реагували протилежним чином. Отримані результати свідчать про неспецифічну токсичну дію НЧЗ і НЧС на роботу центрального регулятора репродуктивної системи самців шурів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. R. P. Miller and C. L. Newton, "Current and future applications of GnRH, kisspeptin and neurokinin B analogues," *Nat. Rev. Endocrinol.*, **9**, 451-466 (2013).
2. H. M. Dungan, D. K. Clifton, and R. A. Steiner, "Minireview: kisspeptin neurons as central processors in the regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion," *Endocrinology*, **147**, No. 3, 1154-1158 (2006).
3. M. N. Lehman, S. M. Hileman, and R. L. Goodman, "Neuroanatomy of the kisspeptin signaling system in mammals: comparative and developmental aspects," *Adv. Exp. Med. Biol.*, **784**, 27-62 (2013).
4. L. Yildirim, N. T. K. Thanh, M. Loizidou, et al., "Toxicology and clinical potential of nanoparticles," *Nano Today*, **6**, No. 6, 585-607 (2011).
5. Л. А. Дыкман, Н. Г. Хлебцов, "Золотые наночастицы в биологии и медицине: достижения последних лет и перспективы", *Acta Naturae*, **3**, No. 2 (9), 36-58 (2011).
6. X. Lu, Y. Liu, X. Kong, et al., "Nanotoxicity: a growing need for study in the endocrine system," *Small*, **9**, Nos. 9/10, 1654-1671 (2013).
7. W. H. De Jong, W. I. Hagens, P. Krystek, et al., "Particle size-dependent organ distribution of gold nanoparticles after intravenous administration," *Biomaterials*, **29**, No. 12, 1912-1919 (2008).
8. Z. Lan and W.-X. Yang, "Nanoparticles and spermatogenesis: how do nanoparticles affect spermatogenesis and penetrate the blood-testis barrier," *Nanomedicine*, **7**, No. 4, 576-596 (2012).
9. A. Pizent, B. Tariba, and T. Živković, "Reproductive toxicity of metals in men," *Arh. Hig. Rada Toksikol.*, **63**, 35-46 (2012).
10. М. Матвиенко, А. Пустовалов, Н. Дзержинский, С. Михальский, "Возможности коррекции kisspeptinom репродуктивного статуса при применении блокаторов и активаторов А-адренергических рецепторов", *Вестн. КНУ им. Тараса Шевченка, Сер. Биология*, **68**, № 3, 14-18 (2014).
11. M. G. Matvienko, A. S. Pustovalov, N. A. Buzynskaya, and N. E. Dzerzhinsky, "Morphofunctional modifications of cells of the preoptic hypothalamic nucleus of prepubescent rats under conditions of stimulation and blocking of the α -adrenergic and kisspeptinergic systems," *Neurophysiology*, **45**, Nos. 5/6, 417-422 (2013).
12. М. Г. Матвиенко, А. С. Пустовалов, Н. Э. Дзержинский, "Возрастная динамика реакции клеток преоптического ядра гипоталамуса крыс при введении мелатонина на фоне

- блокады и активации кисспептинергической системы”, *Успехи геронтологии*, **27**, № 1, 81-86 (2014).
13. G. Paxinos and C. Watson, *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, Acad. Press, New York (2007).
 14. Р. Д. Лилли, *Патогистологическая техника и практическая гистохимия*, Мир, Москва (1969).
 15. B. Huppertz, “Nanoparticles: barrier thickness matters,” *Nat. Nanotechnol.*, **6**, No. **12**, 758-759 (2012).
 16. H. Sela, H. Cohen, R. Zach, et al., “Spontaneous penetration of gold nanoparticles through the blood-brain-barrier (BBB),” *J. Nanobiotechnol.*, **13**, 71 (2015).
 17. Y. Cheng, Q. Dai, X. Fan, et al., “Blood-brain barrier permeable gold nanoparticles: an efficient delivery platform for enhanced malignant glioma therapy and imaging,” *Small*, **10**, No. 24, 5137-5150 (2014).
 18. I. J. Clarke, “Hypothalamus as an endocrine organ,” *Comp. Physiol.*, **5**, No. 1, 217-253 (2015).
 19. M. G. Matvienko, A. S. Pustovalov, and N. E. Dzerzhinsky, “Variety of functions and effects of kisspeptin,” *Biopolym. Cell*, **29**, No. 1, 11-20 (2013).
 20. M. Beltramo, H. Dardente, X. Cayle, et al., “Cellular mechanisms and integrative timing of neuroendocrine control of GnRH secretion by kisspeptin,” *Mol. Cell Endocrinol.*, **382**, No. 1, 387-399 (2014).
 21. H. J. Novaira, Y. Ng, A. Wolfe, et al., “Kisspeptin increases GnRH mRNA expression and secretion in GnRH secreting neuronal cell lines,” *Mol. Cell Endocrinol.*, **311**, Nos. 1/2, 126-134 (2009).
 22. W. Likus, G. Bajor, and K. Siemianowicz, “Nanosilver - does it have only one face?” *Acta Biochim. Pol.*, **60**, No. 4, 495-501 (2013).