

УДК 615.038

DOI 10.23648/UMBJ.2017.27.7089

НАКОПЛЕНИЕ ЦИНКА В СЕМЕННИКАХ КРЫС ПРИ МНОГОКРАТНОМ ЭНТЕРАЛЬНОМ ВВЕДЕНИИ НАНОФОРМЫ ГИДРОКСИДА ЦИНКА

С.Л. Ларин, А.Р. Звягинцева, Е.Б. Артющкова, А.А. Хабаров, Е.В. Будко

ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения РФ, г. Курск, Россия

e-mail: sergeilarin.kursk@gmail.com

Цель работы – изучить динамику накопления цинка в тканях семенников при энтеральном введении наночастиц гидроксида цинка в сравнительном аспекте с растворенным сульфатом цинка. Материалы и методы. Эксперимент проведен на 108 крысах-самцах породы Wistar, которым в течение 168 ч по схеме 0 – 24 – 48 – 72 – 120 – 168 ч энтерально вводили наночастицы гидроксида цинка (2–3 нм) и растворенный сульфат цинка в качестве препарата сравнения в дозировках 100 мг/кг (в пересчете на цинк). Через 4 ч после введения проводили измерение концентраций Zn^{2+} в семенниках и фракциях крови (эритроцитарной массе и плазме) методом пламенной атомно-абсорбционной спектроскопии с предварительной пробоподготовкой методом «мокрого» озоления в хлорной кислоте.

Результаты. Наночастицы гидроксида цинка характеризуются более интенсивной динамикой накопления цинка в период от 4 до 72 ч, составившая количественно $6,55 \pm 0,77$ мкг/г в сравнении со значением $4,02 \pm 0,31$ мкг/г для препарата сравнения. К концу эксперимента статистически значимых различий в концентрациях Zn^{2+} между группами животных, получавших наночастицы и растворимое соединение, не наблюдалось. Определено, что в группе, получавшей наночастицы гидроксида цинка, концентрация Zn^{2+} в эритроцитарной массе и тканях семенников не имеет статистически значимых различий.

Выводы. Анализ количественных данных накопления цинка позволяет характеризовать наночастицы гидроксида цинка как перспективное соединение, обладающее лучшей способностью к накоплению в тканях семенников в сравнении с сульфатом цинка. Данная особенность может быть использована для дальнейшей разработки препарата направленного действия после изучения токсикологических характеристик.

Ключевые слова: наночастицы, гидроксид цинка, семенники, сульфат цинка, крысы.

Введение. Сперматогенез представляет собой комплексный процесс пролиферации и дифференциации половых клеток, результатом которого является образование сперматозоидов [1]. Важную роль играет барьер из плотно соединенных между собой клеток Сертоли, который создает специализированную микросреду для развития и поддержания жизнеспособности развивающихся сперматозоидов. Данная среда должна содержать в себе оптимальный состав питательных веществ и микронутриентов, обеспечивающих нормальное протекание процесса сперматогенеза [2, 3]. Немаловажной функцией клеток Сертоли является барьерная, благодаря которой обеспечивается защита от токсикантов и точная регуляция количеств поступающих микронутриентов и питательных веществ.

Немаловажную роль на каждом из этапов сперматогенеза играет цинк, выполняющий главным образом структурную функцию как кофактор ферментов. В литературе описаны нарушения сперматогенеза у лабораторных животных при употреблении цинкдефицитного корма [4].

Растет интерес к исследованию в экспериментах *in vivo* наноразмерных форм цинка, что обусловлено в первую очередь улучшенными характеристиками их накопления в органах и тканях [5–7]. Изучение накопления наночастиц цинка в тканях семенников немаловажно и с точки зрения выявления токсичности наночастиц для репродуктивной системы.

Ранее нами была получена наноформа гидроксида цинка [8], которая обладает более интенсивной характеристикой накопления в эритроцитарной массе крови крыс и большей скоростью накопления в плазме крови по сравнению с растворимым сульфатом цинка [9].

Цель исследования. Изучение динамики накопления цинка в тканях семенников при энтеральном введении наноформы гидроксида цинка в сравнительном аспекте с сульфатом цинка.

Материалы и методы. Для проведения экспериментального исследования были использованы 108 крыс-самцов породы Wistar, отобранных по массе тела в диапазоне 150–180 г. Животные были разделены на 3 группы по 36 крыс: первая группа получала энтерально суспензию наноформы гидроксида цинка в дистиллированной воде (100 мг/кг), вторая группа – раствор сульфата цинка – соединение сравнения (100 мг/кг). Третью группу (контрольную) составили животные, которым внутривентрикулярно вводилась дистиллированная вода.

Введение изучаемых соединений производилось один раз в день по схеме: 0 – 24 – 48 – 72 – 120 – 168 ч. Спустя 4 ч после введения у наркотизированных хлоралгидратом животных осуществлялось взятие образцов крови и семенников.

Экспериментальная работа была выполнена на базе НИИ экологической медицины ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава России. Крысы перед началом исследования прошли двухнедельный карантин и содержались при контролируемых параметрах микроклимата (влажность 40–60 %, температура 21–24 °С), был также организован искусственный двенадцатичасовой день. Во время эксперимента животные получали стандартный экструдированный гранулированный полнорационный комбикорм для лабораторных животных ПК-120 (ГОСТ Р 51849-2001) и питьевую профильтрованную воду в количестве *adlibitum*. За 12 ч до введения исследуемых соединений крыс лишали корма, предоставляя свободный доступ к питьевой воде. На стадии планирования и реализации исследо-

вания руководствовались требованиями директивы 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях, от 22 сентября 2010 г.

Синтез наноформы гидроксида цинка, использованной для исследования, проводился конденсационным методом в среде абсолютированного этанола реакцией между ацетатом цинка и гидроксидом лития. Распределение частиц по размеру изучалось методом малоуглового рентгеновского рассеяния на энергодисперсионном рентгенофлуоресцентном спектрометре EDX-800HS (Shimadzu, Япония) [9]. Было определено, что наночастицы обладают размером 2–3 нм.

Для предварительной пробоподготовки тканей и биологических жидкостей использовался метод «мокрого» озоления в концентрированной хлорной кислоте (72 %) при 210 °С с доокислением перекисью водорода (36 %) [10]. Завершение минерализации определялось визуально по изменению цвета раствора до прозрачного.

Определение концентрации цинка в минерализатах производилось методом пламенной атомно-абсорбционной спектроскопии на спектрометре «СПЕКТР-5-4» (ОАО «Союзцветметавтоматика», Россия, номер в Государственном реестре средств измерений 13743-04). Перед началом работы оборудование калибровалось по 7 концентрационным точкам (концентрация Zn^{2+} от 0,001 до 3,000 мг/дм³). Растворы для калибровки готовились из государственных стандартных образцов цинка с концентрацией 1 г/дм³ (ООО «Центр стандартных образцов и высокочистых веществ», Россия).

Для характеристики полученных экспериментальных данных рассчитывалась средняя арифметическая (M), медиана (Me), стандартное квадратичное отклонение средней арифметической (SD), стандартная ошибка средней арифметической (m). Для определения статистической значимости различий средних величин между экспериментальными группами использовался непараметрический критерий Манна–Уитни. Различия считались достоверными при уровне значимости $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение. По результатам количественного определения Zn^{2+} построены кривые, характеризующие процесс его накопления в тканях семенников (рис. 1).

В группе, получавшей наночастицы гидроксида цинка, наблюдался быстрый рост концентрации цинка в семенниках, которая к 168 ч достигла значения $10,24 \pm 0,21$ мкг/г.

Эти данные сопоставимы с полученными в группе, где вводился сульфат цинка: к концу эксперимента концентрация цинка в группе сравнения составила $10,34 \pm 0,14$ мкг/г. Следует отметить, что рост концентрации цинка в группе сравнения начался только с 72 ч, в то время как в основной группе – сразу после введения.

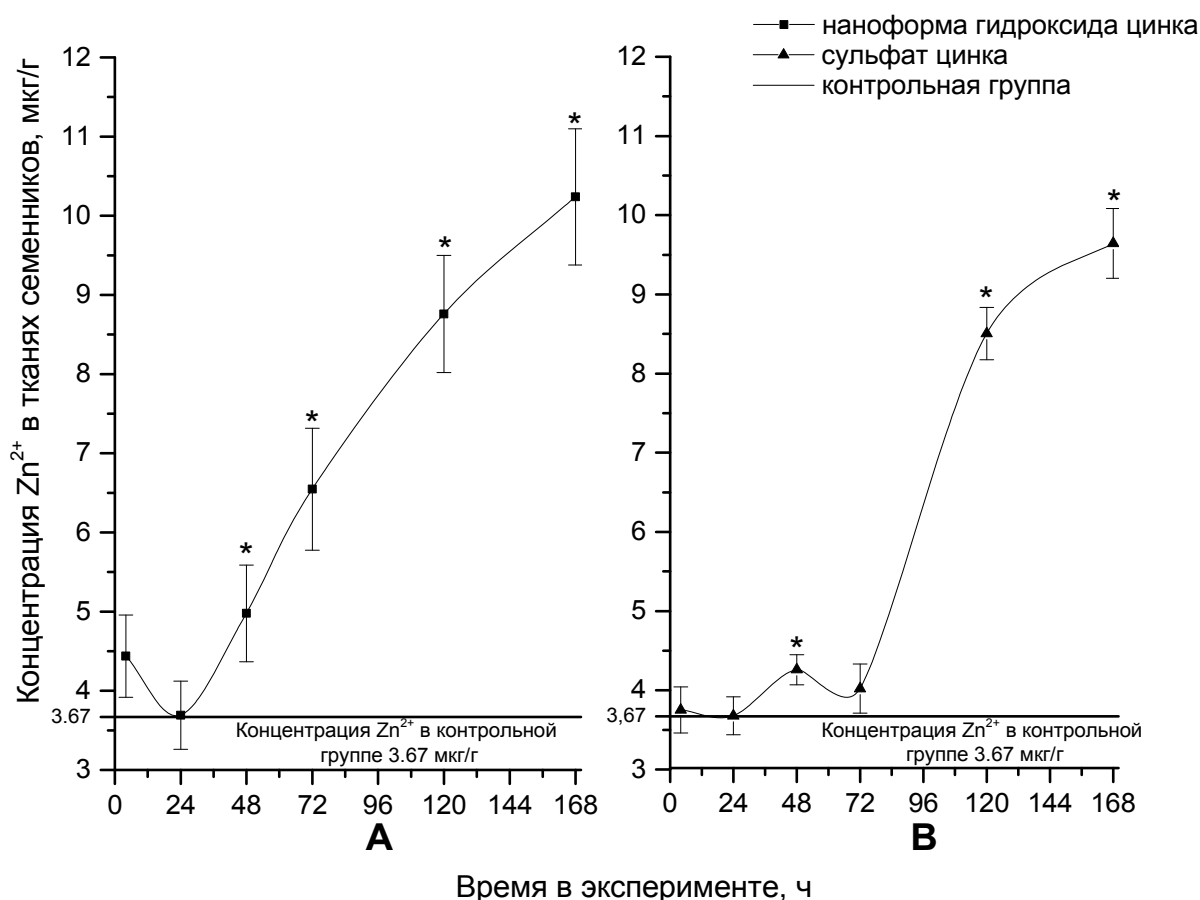


Рис. 1. Динамика накопления Zn^{2+} в семенниках крыс:

А – группа, получавшая наноразмерный $Zn(OH)_2$; В – группа, получавшая $ZnSO_4$.

Примечание. * – достоверность различия показателей по отношению к контрольной группе ($p \leq 0,05$)

В группе, получавшей наночастицы гидроксида цинка, отмечалась тенденция к стабильному накоплению Zn^{2+} уже начиная с 48 ч и вплоть до конца эксперимента (рис. 1). Не наблюдалось снижения уровня цинка в семенниках в период прекращения введения исследуемого соединения. Уровень цинка к концу эксперимента увеличился на 6,57 мкг/г, что примерно в 2,5 раза больше по сравнению с контрольной группой. В группе, в которой

вводился сульфат цинка, тенденция к накоплению ионов цинка в семенниках наметилась только со 120 ч, однако их концентрация к концу эксперимента была сходной с показателем первой группы (рис. 2). Отмеченная высокая тенденция к накоплению наноразмерного соединения цинка связана с размером частиц, которые легко преодолевают гематотестикулярный барьер из клеток Сертоли. Для сульфата цинка, который всасывается в виде ио-

нов, требуется связывание с белками-переносчиками и ряд других длительных стадий, в результате чего его накопление начинается не сразу. Кроме того, избирательное пропускание гематотестикулярного барьера не дает ионам цинка проникать в семенные каналцы только при повышении общего уровня цинка в орга-

низме, для успешного проникновения через барьер требуется еще ряд факторов.

Во временном промежутке до 72 ч наноформа гидроксида цинка характеризуется более интенсивным накоплением – $6,55 \pm 0,77$ мкг/г по сравнению с накоплением препарата сравнения – $4,02 \pm 0,31$ мкг/г (рис. 2).

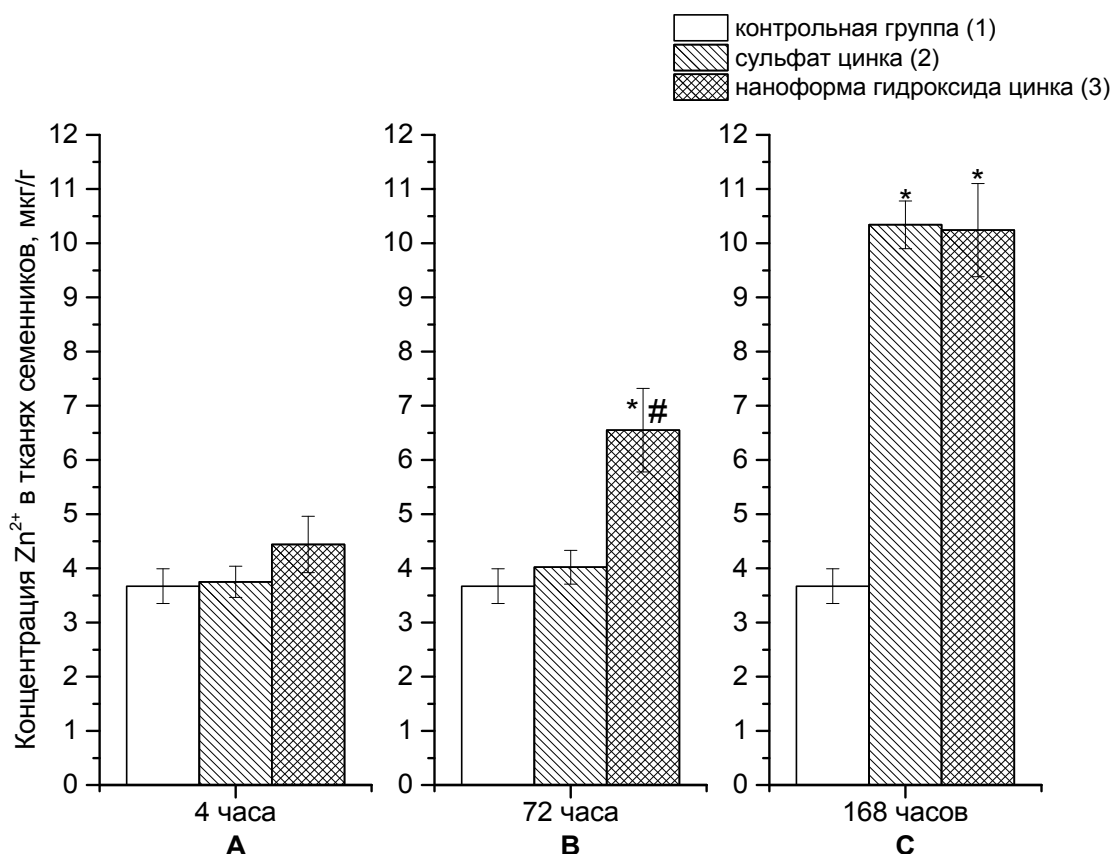


Рис. 2. Сопоставление концентраций цинка в контрольной группе, группе, получавшей сульфат цинка, и группе, получавшей наноформу гидроксида цинка, в 4 ч (А), 72 ч (В) и 168 ч (С).

Примечание. * – достоверность различия показателей по отношению к контрольной группе;
– достоверность различия показателей по отношению к группе сравнения ($p \leq 0,05$)

При сопоставлении концентрации цинка в семенниках и эритроцитарной массе крови было обнаружено, что в группе, где вводилась наноформа гидроксида цинка, на протяжении всего эксперимента данные показатели не имели статистически значимых различий (рис. 3). Однако в группе, получавшей сульфат цинка, после 72 ч уровень цинка в эритроцитарной массе оказался статистиче-

ски значимо ниже, чем в тканях семенников (рис. 3). Полученные результаты могут быть обусловлены в первую очередь специфической способностью наночастиц к адсорбции на эритроцитах [10], что позволяет наноформе дольше находиться в кровяном русле, обеспечивая постоянное поступление наночастиц к тканям семенников.

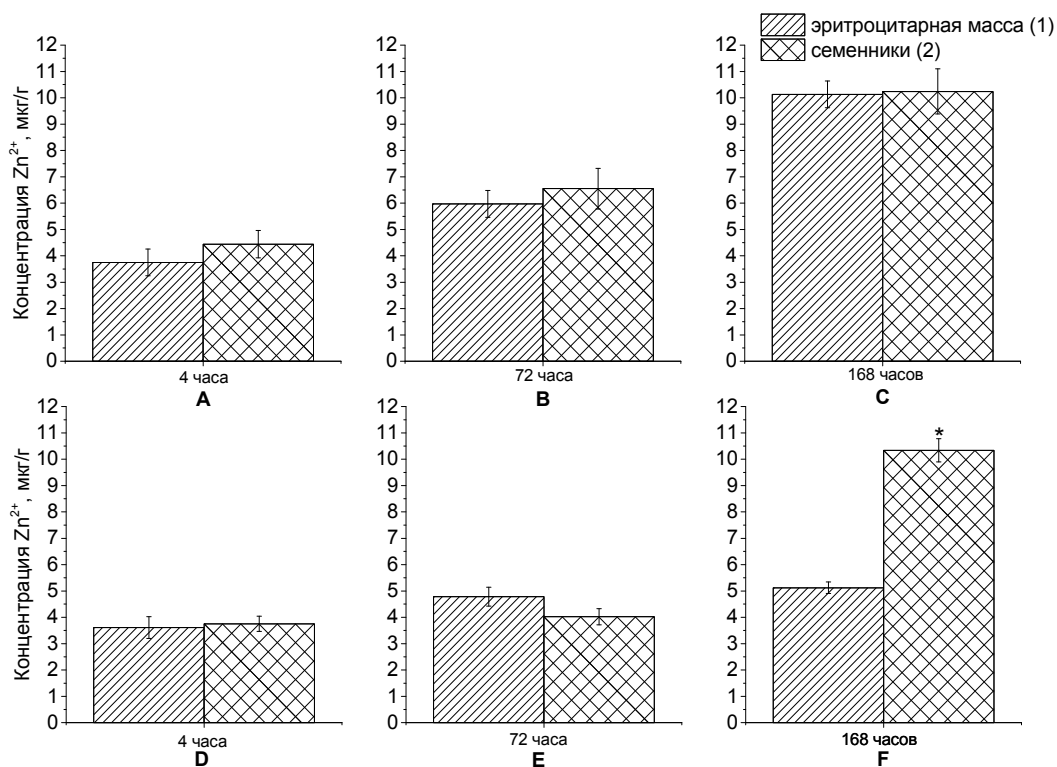


Рис. 3. Сопоставление концентрации цинка в эритроцитарной массе и тканях семенников в группе, получавшей наночастицы гидроксида цинка (А, В и С), и в группе, получавшей сульфат цинка (D, F и E).

Примечание. * – достоверность различия показателей по отношению к данным по концентрации цинка в эритроцитарной массе ($p \leq 0,05$)

Смещение распределения сульфата цинка между форменными элементами крови в сторону плазмы крови может быть связано с особенностями транспорта растворимых соединений цинка и может обеспечивать формирование пула цинка в других органах, например в печени. Данное предположение подтверждено нами в экспериментах на крысах, где было зарегистрировано более интенсивное накопление цинка в тканях печени в случае введения растворимого сульфата цинка по сравнению с наночастицами гидроксида цинка [9]. Транспорт наночастиц в организме к органам и тканям может быть осуществлен двумя путями: полным растворением в ЖКТ или проникновением частиц в неизменном виде в кровяное русло [12]. Поскольку наночастица представляет собой коллоидные частицы, окруженные стабилизирующей оболочкой из противоионов [8], то растворение наночастицы в желудочном соке затруднено,

механизм их всасывания и транспорта отличается от механизма продвижения растворимой формы. Таким образом, наночастицы, адсорбированные на поверхности эритроцитов, поступают к тканям семенников быстрее, чем ионы Zn^{2+} , которые сначала формируют пул, а только затем транспортируются.

Однако избыточное поступление наночастиц цинка через барьер из клеток Сертоли может оказывать отрицательное действие на процессы сперматогенеза. В работе [13] установлена цитотоксичность наночастиц оксида цинка (70 нм) в отношении клеток Сертоли и Лейдига, возрастающая дозозависимо. Описано негативное влияние наночастиц оксида цинка, введенных энтерально в дозе 50–300 мг/кг, на протекание сперматогенеза у крыс [3]. Механизм токсического действия объясняется авторами формированием активных форм кислорода (reactive oxygen species) и, как следствие, повреждением митохондрий клеток [14].

Однако имеются данные о том, что совместное введение наночастиц оксида цинка (доза 5 мг/кг) и циклофосамида (доза 15 мг/кг) мышам снижает негативное влияние на сперматогенез последнего [15].

Заключение. Таким образом, результаты анализа концентрации цинка в семенниках крыс, которые получали наночастицы гидроксида цинка и сульфат цинка в дозе 100 мг/кг, позволяют сделать вывод о более быстром накоплении цинка в тканях семенников в первые 72 ч приема для наночастицы (6,55±0,77 против 4,02±0,31 мкг/г, p≤0,05).

К концу эксперимента уровень накопления Zn^{2+} в семенниках не имел статистически значимых межгрупповых различий

(10,24±0,86 и 10,34±0,44 мкг/г для наночастиц гидроксида цинка и сульфата цинка соответственно, p>0,05).

Различия в накоплении Zn^{2+} могут быть объяснены особенностями транспорта наночастицы, которая всасывается в кровяное русло в неизменном виде.

Полученные в ходе эксперимента данные характеризуют наночастицу гидроксида цинка как перспективное соединение, обладающее улучшенными характеристиками транспорта в отношении семенников. Однако окончательное заключение может быть дано только после проведения токсикологических исследований и дополнительного гистологического изучения тканей семенников.

Литература

1. Franca L.R., Ghosh S., Ye S.J., Russell L.D. Surface and surface to volume relationships of the Sertoli cells during the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Biology of Reproduction*. 1993; 49 (6): 1215–1228.
2. Boekelheide K., Fleming S.L., Johnson K.J., Patel S.R., Schoenfeld H.A. Role of Sertoli cells in injury-associated testicular germ cell apoptosis. *Experimental Biology and Medicine*. 2000; 225 (2): 105–115.
3. Talebi A.R., Khorsandi L., Moridian M. The effect of zinc oxide nanoparticles on mouse spermatogenesis. *Gamete biology*. 2013; 30: 1203–1209.
4. Mason K.E., Burns W.A., Smith J.C. Testicular damage associated with zinc deficiency in pre and post-pubertal rats: Response to zinc repletion. *The Journal of Nutrition*. 1982; 112: 1019–1028.
5. Kim M.K., Lee J.-A., Jo M.-R., Choi S.-J. Bioavailability of silica, titanium dioxide, and zinc oxide nanoparticles in rats. *Journal of nanoscience and nanotechnology*. 2016; 16 (6): 6580–6586.
6. Котенко К.В., Беляев И.К., Бузулуков Ю.П., Бушманов А.Ю., Демин В.Ф., Жорова Е.С. Экспериментальное исследование биокинетики наночастиц оксида цинка у крыс после однократного перорального введения с использованием технологии меченых атомов. *Медицинская радиология и радиационная безопасность*. 2011; 56 (2): 5–10.
7. Baek M., Chung H.E., Yu J., Lee J.A., Kim T.H., Oh J.M. Pharmacokinetics, tissue distribution, and excretion of zinc oxide nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*. 2012; 7: 3081–3097.
8. Будко Е.В., Хабаров А.А., Ларин С.Л. Синтез и характеристика малоразмерных соединений цинка для коррекции гипоцинкозов. *Перспективные материалы*. 2016; 3: 41–46.
9. Ларин С.Л., Будко Е.В., Хабаров А.А., Липатов В.А., Звягинцева А.П. Экспериментальное исследование динамики накопления цинка при внутрижелудочном введении наночастиц $Zn(OH)_2$ и микрочастиц ZnO. *Человек и его здоровье*. 2016; 3: 100–106.
10. Бок Р. Методы разложения в аналитической химии. М.: Химия; 1984. 432.
11. Simundic M., Drasler B., Sustar V., Zupanc J., Štukelj R., Makovec D., Erdogmus D., Hägerstrand H., Drobne D., Kralj-Iglič V. Effect of engineered TiO_2 and ZnO nanoparticles on erythrocytes, platelet-rich plasma and giant unilamellar phospholipid vesicles. *BMC Veterinary Research*. 2013; 9: 1–13.
12. Furuse M. Molecular basis of the core structure of tight junctions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2010; 2: 1–18.
13. Han Z., Yan Q., Ge W., Liu Z.-G., Gurunathan S., Felici M.D., Shen W., Zhang X.-F. Cytotoxic effects of ZnO nanoparticles on mouse testicular cells. *International Journal of Nanomedicine*. 2016; 11: 5187–5202.
14. Lan Z., Yang W.-X. Nanoparticles and spermatogenesis: how do nanoparticles affect spermatogenesis and penetrate the blood–testis barrier. *Future Medicine*. 2012; 7 (4): 579–596.
15. Mohammadi T., Hoveizi E., Khajehpour L., Jelodar Z. Protective effects of zinc oxide nanoparticles on testis histological structure in cyclophosphamide treated adult mice. *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences*. 2016; 26 (144): 19–27.

ACCUMULATION OF ZINC IN RAT TESTES AFTER REPEATED ENTERAL ADMINISTRATION OF ZINC HYDROXIDE NANOFORM

S.L. Larin, A.R. Zvyagintseva, E.B. Artyushkova, A.A. Khabarov, E.V. Budko

Kursk State Medical University, Ministry of Health, Kursk, Russia

e-mail: sergeilarin.kursk@gmail.com

The aim of the study was to analyze the dynamics of zinc accumulation in the testicular tissues of rats after enteral administration of zinc hydroxide nanoform as compared with dissolved zinc sulfate.

Materials and Methods. 108 male Wistar rats served as experimental subject. During 168 hours zinc hydroxide nanoform (2–3 nm) in the dose of 100 mg/kg (on zinc basis) was enterally administered according to the schedule 0 – 24 – 48 – 72 – 120 – 168 h. Dissolved zinc sulfate was administered as a comparator agent in the same dose. In 4 hours after the administration, Zn^{2+} concentrations in the testes and blood fractions (erythrocyte mass and plasma) were measured. We used flame atomic absorption spectrometry and preliminary wet ashing with perchloric acid.

Results. Zinc hydroxide nanoform was characterized by a more intensive dynamics of zinc accumulation (4–72 hour). Thus, zinc accumulation was $6.55 \pm 0.77 \mu\text{g/g}$ in comparison with $4.02 \pm 0.31 \mu\text{g/g}$ for the comparator agent. By the end of the experiment, there were no statistically significant differences in Zn^{2+} concentrations between animals treated with nanoform and soluble compound. It was determined that in the group receiving zinc hydroxide nanoparticles, Zn^{2+} concentration in erythrocyte mass and testicular tissues did not have statistically significant differences.

Conclusions. Analysis of Zn^{2+} levels in testicular tissues makes it possible to characterize zinc hydroxide nanoform as a promising compound with a better ability to accumulate in the testes in comparison with zinc sulfate. This characteristic can be used for further development of the treated agent after studying its toxic properties.

Keywords: nanoparticles, zinc hydroxide, testes, zinc sulfate, rats.

References

1. Franca L.R., Ghosh S., Ye S.J., Russell L.D. Surface and surface to volume relationships of the Sertoli cells during the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Biology of Reproduction*. 1993; 49 (6): 1215–1228.
2. Boekelheide K., Fleming S.L., Johnson K.J., Patel S.R., Schoenfeld H.A. Role of Sertoli cells in injury-associated testicular germ cell apoptosis. *Experimental Biology and Medicine*. 2000; 225 (2): 105–115.
3. Talebi A.R., Khorsandi L., Moridian M. The effect of zinc oxide nanoparticles on mouse spermatogenesis. *Gamete biology*. 2013; 30: 1203–1209.
4. Mason K.E., Burns W.A., Smith J.C. Testicular damage associated with zinc deficiency in pre and post-pubertal rats: Response to zinc repletion. *The Journal of Nutrition*. 1982; 112: 1019–1028.
5. Kim M.K., Lee J-A., Jo M-R., Choi S-J. Bioavailability of silica, titanium dioxide, and zinc oxide nanoparticles in rats. *Journal of nanoscience and nanotechnology*. 2016; 16 (6): 6580–6586.
6. Kotenko K.V., Belyaev I.K., Buzulukov Yu.P., Bushmanov A.Yu., Demin V.F., Zhorova E.S. Eksperimental'noe issledovanie biokinetiki nanochastits oksida tsinka u krysa posle odnokratnogo peroral'nogo vvedeniya s ispol'zovaniem tekhnologii mechenykh atomov [Experimental study of zinc oxide-labeled nanoparticles biokinetics in rats after single oral administration]. *Meditsinskaya radiologiya i radiatsionnaya bezopasnost'*. 2011; 56 (2): 5–10 (in Russian).
7. Baek M., Chung H.E., Yu J., Lee J.A., Kim T.H., Oh J.M. [et al.]. Pharmacokinetics, tissue distribution, and excretion of zinc oxide nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*. 2012; 7: 3081–3097.
8. Budko E.V., Khabarov A.A., Larin S.L. Sintez i kharakteristika malorazmernykh soedineniy tsinka dlya korrektsii gipotsinkozov [Synthesis and characterization of small-sized zinc compounds for hypozincosis correction]. *Perspektivnye materialy*. 2016; 3: 41–46 (in Russian).

9. Larin S.L., Budko E.V., Khabarov A.A., Lipatov V.A., Zvyagintseva A.R. Eksperimental'noe issledovanie dinamiki nakopleniya tsinka pri vnutrizheludochnom vvedenii nanochastits $Zn(OH)_2$ i mikrochastits ZnO [Experimental study of zinc accumulation dynamics in intragastric administration of $Zn(OH)_2$ nanoparticles and ZnO microparticles]. *Chelovek i ego zdorov'e*. 2016; 3: 100–106 (in Russian).
10. Bock R. *Metody razlozheniya v analiticheskoy khimii* [A handbook on decomposition methods in analytical chemistry]. Moscow: Khimiya; 1984. 432 (in Russian).
11. Simundic M., Drasler B., Sustar V., Zupanc J., Štukelj R., Makovec D., Erdogmus D., Hägerstrand H., Drobne D., Kralj-Iglič V. Effect of engineered TiO_2 and ZnO nanoparticles on erythrocytes, platelet-rich plasma and giant unilamellar phospholipid vesicles. *BMC Veterinary Research*. 2013; 9: 1–13.
12. Furuse M. Molecular basis of the core structure of tight junctions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2010; 2: 1–18.
13. Han Z., Yan Q., Ge W., Liu Z-G., Gurunathan S., Felici M.D., Shen W., Zhang X-F. Cytotoxic effects of ZnO nanoparticles on mouse testicular cells. *International Journal of Nanomedicine*. 2016; 11: 5187–5202.
14. Lan Z., Yang W-X. Nanoparticles and spermatogenesis: how do nanoparticles affect spermatogenesis and penetrate the blood-testis barrier. *Future Medicine*. 2012; 7 (4): 579–596.
15. Mohammadi T., Hoveizi E., Khajehpour L., Jelodar Z. Protective effects of zinc oxide nanoparticles on testis histological structure in cyclophosphamide treated adult mice. *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences*. 2016; 26 (144): 19–27.