

ФУНКЦІОНАЛЬНА АКТИВНІСТЬ СПЕРМІЇВ КРОЛІВ ЗА ДІЇ НАНОЧАСТИНОК СРІБЛА ПРИ КОРОТКОЧАСНОМУ ЗБЕРІГАННІ *IN VITRO*

В. Сирватка*, Ю. Сливчук, І. Розгоні, І. Гевкан

Інститут біології тварин НААН
вул. Василя Стуса, 38, Львів 79034, Україна
e-mail: vasyly.syrvatka@gmail.com

Проведено дослідження з вивчення впливу наночастинок срібла з різними композитними речовинами на функціональну активність спермійв кролів при короткотривалому зберіганні за умов *in vitro*. Встановлено, що наночастинок срібла з полівінілпіролідом, бичачим сироватковим альбуміном і гіалуроновою кислотою не впливають на кількість життєздатних спермійв і їх рухливість. Проте залежно від дози (1 мкг/мл і більше) зумовлюють зниження активності аланін- і аспаргатамінотрансфераз, збільшення активності лужної фосфатази, лактатдегідрогенази та концентрації тригліцеридів у кондиційному середовищі.

Ключові слова: наночастинок срібла, спермії, кролі, біохімічні показники.

Патогенні бактерії, віруси та грибки мають негативний вплив на гамети, а також перешкоджають заплідненню яйцеклітини й імплантації ембріонів або є причиною ранньої ембріональної смертності [6, 15]. Відомо, що найбільш широко використовувані антибіотики не завжди є ефективними щодо більшості мікроорганізмів, а деякі з них мають токсичний вплив на процеси запліднення і вагітності [9]. Отже, дослідження можливості використання інших альтернативних речовин, наприклад наноматеріалів, як антимікробних препаратів становить значний науковий інтерес.

Серед антибактеріальних препаратів наночастинок срібла (AgNPs) є найефективнішими для боротьби з інфекціями. Токсична дія AgNPs проти полірезистентних грамнегативних і грампозитивних бактерій, вірусів і грибків є добре дослідженою [7, 11, 12, 17]. Терапевтичний потенціал цих наночастинок у даний час вивчений досить широко, незважаючи на відсутність інформації про їхні механізми дії на молекулярному і клітинному рівнях [13]. Результати токсикологічних досліджень на рибках Данію показали, що наночастинок срібла, залежно від дози, викликають вади в розвитку ембріонів [2]. Також встановлено цитотоксичну дію наночастинок срібла на деякі соматичні клітини тварин і людини [14]. Однак залишається невивченим вплив наночастинок срібла на репродуктивну систему ссавців, зокрема їхню дію на сперматозоїди. Зважаючи на це, метою нашого дослідження було вивчення впливу наночастинок срібла із різними композитними речовинами на функціональну активність спермійв кролів за умов короткотривалого зберігання *in vitro*.

Матеріали та методи

Наночастинок срібла було синтезовано хімічним відновленням водного розчину нітрату срібла натрій борогідридом [18]. Успішність отримання наночастинок визначали одразу після синтезу за кольором розчину. Прозорий розчин реакційної суміші вказував на те, що реакція не відбулася, яскраво-жовтий – на успішний синтез, наявність темного кольору – на агрегацію наночастинок. Після синтезу наночастинок срібла проводили зв'язування їх зі стабілізуючими речовинами. Як стабілізатор використали: бичачий

сироватковий альбумін (BSA), полівінілпіролідон (PVP) і глікозаміноглікангіалуронову кислоту (HA). Після зв'язування наночастинок срібла з полімерами й альбуміном проводили їхнє очищення від нітрату натрію, залишків натрій борогідриду та стабілізуючих речовин шляхом ультрацентрифугування при 25000 g упродовж 50 хв.

Для з'ясування впливу синтезованих нами композитних наночастинок срібла на функціональну активність спермійів *in vitro* було досліджено їхній вплив на виживаність і рухливість за умов короткотривалого зберігання впродовж 3 год за температури 37°C. Дослід був проведений в умовах лабораторії репродуктивної біотехнології та розведення тварин Інституту біології тварин НААН з використанням свіжоодрержаної сперми самців кролів породи новозеландська біла. Як розбавник використовували тріс-ацетат-глюкозний буфер із додаванням синтезованих нами композитних наночастинок срібла (AgNPs-PVP, AgNPs-BSA та AgNPs-HA) у концентраціях: 0,1; 1 та 10 мкг/мл.

Відношення розбавника до еякуляту становило 5:1. Зберігання спермійів проводили впродовж 3-х годин за температури 37°C з підрахунком їхньої життєздатності й рухливості перед початком культивування, після 1, 2 і 3 год зберігання. Через 3 год культивування проводили відбір кондиційного середовища шляхом центрифугування при 2500 g за температури 4°C для визначення біохімічних показників: концентрації Кальцію (К), Фосфору (Р), Магнію (Mg), Калію (К), Натрію (Na), глюкози, тригліцеридів (ТГ) і холестеролу (ХС), а також активність аланін-амінотрансферази (АЛАТ), аспартат-амінотрансферази (АсАТ), лужної фосфатази (ЛФ) та лактатдегідрогенази (ЛДГ). Усі біохімічні визначення проводили за допомогою комерційних тест-наборів (HumanGmbH, Germany) на біохімічному аналізаторі.

Усі статистичні розрахунки проводили за допомогою Minitab 15 пакету програмного забезпечення. Відмінності між групами були визначені за критерієм Стьюдента.

Результати і їхнє обговорення

Синтезовані функціональні наночастинок срібла показали високу стабільність і рівномірну дисперсію в розчині впродовж експериментального періоду. AgNPs з BSA, PVP та HA не виявляли ознак агломерації й осідання у процесі зберігання, тоді як наночастинок без стабілізуючих речовин агрегували та випадали в осад.

Порівняльний аналіз впливу різних концентрацій композитних наночастинок срібла в середовищі для розведення сперми показав, що рухливість і відсоток живих спермійів знижується у процесі культивування в усіх дослідних групах (табл. 1). У контрольній групі життєздатність знижувалася з 73,73±3,36% перед початком культивування до 49,78±3,79% після 3 год інкубації, а рухливість – з 64,53±2,32% до 39,97±3,58%.

Таблиця 1

Рухливість і відсоток живих спермійів за різних концентрацій композитних наночастинок срібла у розбавнику впродовж 3 год зберігання ($M \pm m$, $n=3$)

Дослідні групи	Життєздатні спермії, %				Рухливість, %			
	0 год	1 год	2 год	3 год	0 год	1 год	2 год	3 год
Контрольна	73,73±3,36	66,34±6,79	61,10±3,81	49,78±3,79	64,53±2,32	57,21±5,61	54,08±3,60	39,97±3,58
AgNPs-PVP 0,1 мкг/мл	73,46±1,67	64,56±4,15	58,17±6,30	52,21±4,19	63,06±2,40	56,65±3,71	50,84±6,53	41,87±5,34
AgNPs-PVP 1 мкг/мл	74,89±9,05	63,46±1,55	60,94±2,23	53,41±1,42	63,89±6,96	55,62±1,80	52,76±2,52	41,80±1,49
AgNPs-PVP 10 мкг/мл	69,91±2,11	65,15±4,64	60,64±1,74	52,80±3,98	61,54±2,68	50,71±1,95	48,48±1,16	37,86±3,75
AgNPs-BSA 0,1 мкг/мл	71,66±0,97	64,28±2,14	60,69±2,48	50,49±1,62	62,17±1,91	53,62±1,79	52,00±1,54	40,49±1,27
AgNPs-BSA 1 мкг/мл	73,60±0,40	64,95±3,80	62,52±2,10	51,86±1,90	61,10±1,56	55,10±4,15	53,39±1,77	42,62±1,42
AgNPs-BSA 10 мкг/мл	73,04±2,50	65,76±2,07	62,09±3,70	53,40±0,56	60,53±3,59	49,78±4,33	49,55±3,42	39,46±0,40
AgNPs-HA 0,1 мкг/мл	73,90±5,74	66,92±0,78	59,40±2,94	49,25±1,21	64,54±6,24	54,91±1,97	51,14±4,26	41,13±2,29
AgNPs-HA 1 мкг/мл	72,12±5,66	66,66±2,93	62,33±2,82	52,65±2,09	64,37±4,48	57,93±2,07	53,45±3,13	41,44±2,03
AgNPs-HA 10 мкг/мл	71,71±2,16	66,27±0,75	60,01±1,40	50,09±1,08	62,02±2,85	56,58±1,30	50,70±1,47	40,65±1,7

Наночастинки срібла мають здатність проходити тестикулярний бар'єр і накопичуватись у сім'яниках, здійснюючи токсичний ефект на репродуктивну систему самців, зокрема на клітини сперми [1]. Проте в наших дослідженнях між контрольною та дослідними групами з композитними наночастинками срібла не виявлено вірогідних різниць у життєздатності й рухливості спермій упродовж 3 год зберігання за температури 37°C (табл. 1). Не встановлено і безпосереднього вірогідного впливу AgNPs-PVP, BSA та HA на концентрацію Кальцію, Магнію, Фосфору, Калію, Натрію та глюкози в кондиційному середовищі після 3 год зберігання за температури 37°C (табл. 2). Результати Braudich-Stolle зі співавторами (2005) показали, що залежно від концентрації наночастинки срібла характеризуються більшою цитотоксичною дією на стовбурові клітини сперматогоній C184 ніж наночастинки молібдену (III) оксиду й алюмінію. Крім того, негативний ефект на репродуктивні стовбурові клітини сперматогоній більш виражений порівняно зі соматичними клітинами печінки BRL 3A [3].

Таблиця 2

Біохімічні показники кондиційного середовища спермій кролів після 3 год зберігання за умов додавання різних концентрацій композитних наночастинок срібла (M±m, n=3)

Дослідні групи	Показники					
	Ca ммоль/л	Mg ммоль/л	P ммоль/л	K ммоль/л	Na ммоль/л	Глюкоза ммоль/л
Контрольна	0,37±0,01	1,25±0,02	0,43±0,02	2,80±0,06	12,67±0,67	34,26±0,42
AgNPs-PVP 0,1 мкг/мл	0,36±0,03	1,23±0,01	0,43±0,01	2,83±0,03	12,00±0,58	34,11±0,40
AgNPs-PVP 1 мкг/мл	0,36±0,006	1,21±0,02	0,41±0,01	2,73±0,09	12,00±0,58	34,58±0,70
AgNPs-PVP 10 мкг/мл	0,35±0,02	1,25±0,01	0,41±0,02	2,83±0,12	12,33±0,33	34,59±0,39
AgNPs-BSA 0,1 мкг/мл	0,35±0,03	1,23±0,01	0,41±0,01	2,73±0,03	12,00±0,58	33,52±0,31
AgNPs-BSA 1 мкг/мл	0,37±0,02	1,23±0,01	0,42±0,02	2,83±0,12	12,00±1,00	34,16±0,58
AgNPs-BSA 10 мкг/мл	0,38±0,006	1,24±0,01	0,41±0,02	2,80±0,10	11,67±0,33	34,45±0,63
AgNPs-HA 0,1 мкг/мл	0,35±0,01	1,24±0,01	0,40±0,01	2,70±0,06	12,33±0,33	33,19±0,45
AgNPs-HA 1 мкг/мл	0,37±0,01	1,25±0,01	0,42±0,02	2,73±0,03	11,67±0,88	33,17±0,53
AgNPs-HA 10 мкг/мл	0,35±0,04	1,25±0,01	0,41±0,003	2,83±0,09	12,67±0,88	33,59±0,41

У результаті визначення активності ферментів кондиційного середовища виявлено вірогідне зниження активності аланін-амінотрансферази ($p<0,01$) й аспаргатамінотрансферази ($p<0,05$) у разі додавання наночастинок срібла із полівінілпіролідом і бичачим сироватковим альбуміном у концентрації 1 і 10 мкг/мл та із гіалуроновою кислотою – 10 мкг/мл (табл. 3). Втрата активності цих ферментів може відображати безпосередній вплив наночастинок срібла, зокрема, зв'язування їх з активними центрами чи порушення структури ензимів. Різна модифікація поверхонь наночастинок зумовлює їх різну біологічну активність [8]. Дія наночастинок срібла із PVP та BSA в меншій концентрації (1 мкг/мл), очевидно, пов'язана із їх більш реакційноздатними поверхнями або більшою стійкістю в кондиційному середовищі порівняно з наночастинками стабілізованих гіалуроновою кислотою. Так, за впливу AgNPs-PVP та AgNPs-BSA на спермії кролів у концентраціях 1 і 10 мкг/мл підвищувалась активність лужної фосфатази та лактатдегідрогенази, тоді як за дії AgNPs-HA тільки в концентрації 10 мкг/мл знижувалась активність ЛФ. Активність ЛДГ та ЛФ у плазмі сперми негативно корелює з рухливістю і відсотком живих сперматозоїдів [16]. Тому збільшення активності цих ферментів у кондиційному середовищі, можливо, пов'язане із безпосереднім впливом наночастинок срібла на спермії кролів, а саме на дестабілізацію їх мембран і вихід цих ферментів у кондиційне середовище. Аналогічну цитотоксичну дію наночастинок срібла спостерігали на клітинах, зокрема, стовбурових сперматогоніях мишей C184[3], альвеолярних макрофагах щурів [5] та клітинах печінки щурів BRL 3A[10].

Таблиця 3

Біохімічні показники кондиційного середовища спермійів кролів після 3 год зберігання при температурі 37°C за умов додавання різних концентрацій наночастинок срібла

Дослідні групи	Показники					
	АлАТ (МО)	АсАТ (МО)	ЛФ (МО)	ЛДГ (МО)	ТГ ммоль/л	ХС ммоль/л
Контрольна	11,50±1,60	177,93±5,29	582,37±5,42	985,67±9,64	14,31±0,11	0,220±0,011
AgNPs-PVP 0,1 мкг/мл	10,97±1,75	179,40±5,32	582,40±5,73	985,03±4,84	14,41±0,06	0,217±0,009
AgNPs-PVP 1 мкг/мл	3,87±0,33↓↓	162,87±5,60	642,27±4,99↑↑	1121,37±15,48↑↑	15,81±0,10↑↑↑	0,197±0,009
AgNPs-PVP 10 мкг/мл	3,07±0,50↓↓	132,80±5,84↓↓	667,10±5,73↑↑↑	1138,37±5,45↑↑↑	16,35±0,28↑↑	0,237±0,015
AgNPs-BSA 0,1 мкг/мл	10,27±0,84	181,20±3,90	591,13±5,79	997,37±6,68	14,49±0,10	0,200±0,006
AgNPs-BSA 1 мкг/мл	3,03±0,45↓↓	155,50±3,69↓	670,10±10,13↑↑	1124,00±13,19↑↑	15,65±0,19↑↑	0,217±0,009
AgNPs-BSA 10 мкг/мл	2,80±0,25↓↓	132,00±2,92↓↓	674,47±11,12↑↑	1136,27±5,84↑↑↑	15,92±0,07↑↑	0,217±0,015
AgNPs-NA 0,1 мкг/мл	11,73±0,99	177,27±6,21	581,60±4,95	985,20±7,62	14,40±0,11	0,220±0,015
AgNPs-NA 1 мкг/мл	12,40±0,82	175,57±3,35	608,53±5,29↑	995,67±4,66	14,42±0,08	0,217±0,003
AgNPs-NA 10 мкг/мл	3,80±0,55↓	147,93±3,92↓	596,50±9,69	1001,5±4,51	14,44±0,06	0,220±0,006

Примітка: ↑ – вірогідно вищий рівень, $p < 0,05$; ↑↑ – вірогідно вищий рівень, $p < 0,01$; ↑↑↑ – вірогідно вищий рівень, $p < 0,001$; ↓ – вірогідно нижчий рівень, $p < 0,05$; ↓↓ – вірогідно нижчий рівень, $p < 0,01$ (порівняння з контрольною групою), МО – міжнародні одиниці.

Аналіз даних, отриманих при визначенні концентрації тригліцеридів, показав, що за дії наночастинок срібла із полівінілпіролідом і бичачим сироватковим альбуміном у концентраціях 1 і 10 мкг/мл вміст тригліцеридів вірогідно зростає ($p < 0,01$). Однак не було виявлено вірогідних різниць у концентрації холестеролу між контрольною та всіма дослідними групами.

Механізми цитотоксичності наночастинок срібла реалізуються через продукцію активних форм кисню та взаємодію із ДНК, що призводить до запалення або навіть до злоякісної трансформації соматичних клітини [2, 13, 14]. Однак у випадку із зародковими клітинами, зокрема сперматозоїдами, такі дефекти можуть призводити до порушення відтворювальної здатності у тварин та вроджених дефектів у їхнього потомства [19]. Braydich-Stolle зі співавторами встановили (2010), що, крім продукції активних форм кисню й індукції апоптозу, наночастинок срібла викликають порушення GDNF/Fun кінзального сигнального шляху, що призводить до зниження проліферативної активності стовбурових сперматогоніальних клітин мишей [4].

Дані, отримані в нашому дослідженні, дають підстави стверджувати, що наночастинок срібла не впливають на кількість життєздатних спермійів і їхню рухливість, однак зумовлюють на молекулярному рівні зміни деяких показників кондиційного середовища, зокрема активність ферментів АлАТ, АсАТ, ЛФ, ЛДГ та концентрацію тригліцеридів. Подальші дослідження необхідні для оцінки молекулярних механізмів впливу наночастинок срібла на спермії тварин. З'ясування механізмів клітинного засвоєння та біодеградації всередині клітин і вивчення впливу модифікації поверхні наночастинок срібла різними композитними речовинами на ці процеси допоможе більш ефективно використовувати наночастинок срібла в терапевтичних цілях.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Asare N., Instanes C., Sandberg W. J. et al. Cytotoxic and genotoxic effects of silver nanoparticles in testicular cells // *Toxicol.* 2012. Vol. 291. P. 65–72.
2. Asharani P. V., Wu Y. L., Gong Z., Valiyaveetil S. Toxicity of silver nanoparticles in zebrafish models // *Nanotechnology.* 2008. Vol. 19. N 25.5102. P. 1–8.
3. Braydich-Stolle L. K., Hussain S., Schlager J. *In vitro* cytotoxicity of nanoparticles in mammalian germ-line stem cells // *Toxicol. Sci.* 2005. Vol. 88. P. 412–419.

4. *Braydich-Stolle L. K., Lucas B., Schrand A.* et al. Silver Nanoparticles disrupt GDNF/Fyn kinase signaling in spermatogonial stem cells // *Toxicol. Sci.* 2010. Vol. 116. N 2. P. 577–589.
5. *Cataleya C.* *In vitro* Toxicity assessment of silver nanoparticles in rat alveolar macrophages M.S., Department of Pharmacology and Toxicology, Wright State University, 2006. P. 1–327.
6. *Eckert L. O., Moore D. E., Patton D. L.* et al. Relationship of vaginal bacteria and inflammation with conception and early pregnancy loss following in-vitro fertilization // *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology.* 2003. Vol. 11. P. 11–17.
7. *Elechiguerra J. L., Burt J. L., Morones J. R.* et al. Interaction of silver nanoparticles with HIV-1 // *J. Nanobiotechnology.* 2005. Vol. 3. P. 1–10.
8. *Galdiero S., Falanga A., Vitiello M.* et al. Silver Nanoparticles as Potential Antiviral Agents // *Molecules.* 2011. Vol. 16. P. 8894–8918.
9. *Garbis H., Rost van Tonningen M., Reuvers M.* Anti-infective agent, in: *Shaefer C., Peters P., Miller R. K.* Drags during pregnancy and lactation: 2nd ed. Great Britain.: Elsevier, 2007. P. 248–320.
10. *Hussain S. M., Hess K. L., Gearhart J. M.* et al. *In vitro* toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells // *Toxicol. in Vitro.* 2005. Vol. 19. P. 975–983.
11. *Kim J. S., Kuk E., Yu K. N.* et al. Antimicrobial effects of silver nanoparticles // *Nanomedicine.* 2007. Vol. 3. P. 95–101.
12. *Kim K.-J., Sung W. S., Suh B. K.* et al. Antifungal activity and mode of action of silver nanoparticles on *Candida albicans* // *BioMetals.* 2009. Vol. 22. P. 235–242.
13. *Lim H. K., Asharani P. V., Hande M. P.* Enhanced genotoxicity of silver nanoparticles in DNA repair deficient mammalian cells // *Front. Gene.* 2012. Vol. 3. Article 104. P. 1–13.
14. *Park E. J., Yi J., Kim Y.* et al. Silver nanoparticles induce cytotoxicity by a Trojan-horse type mechanism // *Toxicol. In Vitro.* 2010. Vol. 24. P. 872–878.
15. *Rennemeier C., Frambach T., Hennicke F.* et al. Microbial quorum-sensing molecules induce acrosome loss and cell death in human spermatozoa // *Infect. Immun.* 2009. Vol. 77. P. 4990–4997.
16. *Roussel J. D., Stallcup O. T.* Activity of lactic dehydrogenase and its isozymes in bovine semen // *J. Dairy Sci.* 1965. Vol. 48. P. 1506–1510.
17. *Shahverdi A. R., Fakhimi A., Shahverdi H. R., Minaian S.* Synthesis and effect of silver nanoparticles on the antibacterial activity of different antibiotics against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* // *Nanomedicine.* 2007. Vol. 3. P. 168–171.
18. *Solomon S. D., Bahadory M., Jeyarajasingam, A. V.* et al. Synthesis and study of silver nanoparticles // *J. Chem. Ed.* 2007. Vol. 84. N 2. P. 322–325.
19. *Zahavy E., Ordentlich A., Yitzhaki S., Shafferman A.* Nano-Biotechnology for Biomedical and Diagnostic Research. Series: Advances in Experimental Medicine and Biology. Springer. 2011. Vol. 8. P. 182.

Стаття: надійшла до редакції 01.03.13

доопрацьована 22.03.13

прийнята до друку 01.04.13

FUNCTIONAL ACTIVITY OF RABBIT'S SPERM UNDER INFLUENCE OF SILVER NANOPARTICLES AFTER SHORT TERM STORAGE *IN VITRO*

V. Syrvatka, Y. Slyvchuk, I. Rozgoni, I. Hevkan

*Institute of Animal Biology NAAS
38, V. Stus St., Lviv 79034, Ukraine
e-mail: vasyi.syrvatka@gmail.com*

It was investigated the effect of silver nanoparticles with different composite agents on functional activity of rabbits sperm after short-term storage *in vitro*. Silver nanoparticles

with polyvinylpyrrolidone, bovine serum albumin and hyaluronan did not influenced on number of sperm viability and motility was found. However, silver nanoparticles in dose depend (1 µg/mL and higher) decreased the activity of aspartat eaminotransferase and alanineaminotransferase, increased alkaline phosphatase, lactate dehydrogenase and concentration of triglycerides in condition medium.

Keywords: silver nanoparticles, sperm, rabbits, biochemical parameter.

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ СПЕРМАТОЗОИДОВ КРОЛИКОВ ПРИ ДЕЙСТВИИ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА И КРАТКОВРЕМЕННОМ ХРАНЕНИИ *IN VITRO*

В. Сырватка, Ю. Сливчук, І. Розгоні, І. Гевкан

*Институт биологии животных НААН
ул. В. Стуса, 38, Львов 79034, Украина
e-mail: vasylysyrvatka@gmail.com*

Проведены исследования по изучению влияния наночастиц серебра с различными композитными веществами на функциональную активность сперматозоидов кроликов при кратковременном хранении в условиях *in vitro*. Установлено, что наночастицы серебра с поливинилпирролидоном, бычьим сывороточным альбумином и гиалуроновой кислотой не влияют на количество жизнеспособных сперматозоидов и их подвижность. Однако, в зависимости от дозы (1 мкг/мл и более), обуславливают снижение активности аланин- и аспаргатаминотрансфераз, увеличение активности щелочной фосфатазы, лактатдегидрогеназы и концентрации триглицеридов в кондиционной среде.

Ключевые слова: наночастицы серебра, сперматозоиды, кролики, биохимические параметры.