

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
Медико-профилактический факультет с отделением биологии
Кафедра фундаментальной и прикладной микробиологии
Кафедра гистологии

На правах рукописи



Акрамова Элина Ринатовна

**МОРФО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ СЕМЕННИКОВ
КРЫС НА ФОНЕ ПЕРОРАЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ
НАНОДИСПЕРСНОГО ДИОКСИДА ТИТАНА РУТИЛЬНОЙ
МОДИФИКАЦИИ**

Научный руководитель:

доктор биологических наук,
профессор кафедры гистологии



Л.А. Шарафутдинова

Уфа - 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	8
1. Общая характеристика мужской репродуктивной системы	8
1. 1. Извитые семенные канальцы	8
1. 2. Гистологическое строение извитых семенных канальцев	10
2. Сперматогенез и морфология сперматозоидов	11
2. 1. Половые клетки	12
3. Интерстициальные эндокриноциты (клетки Лейдига)	15
3. 1. Вклад клеток Лейдига в сперматогенез	15
3. 2. Морфология клеток Лейдига	16
4. Стероидогенез	17
4. 1. Тестостерон	18
4. 2. Эстрадиол	18
5. Свойства наночастиц	19
5. 1. Структура НЧ	19
5. 2. Особенности НЧ	20
5. 3. Химические и физические свойства наночастиц диоксида титана	21
6. Синтез наночастиц	22
7. Пути поступления наночастиц в организм	22
7. 1. Поступление НЧ через легкие	22
7. 2. Поступление НЧ через кожу	23
7. 3. Поступление НЧ через желудочно-кишечный тракт	23
8. Применение НЧ диоксида титана в различных промышленности	24
8. 1. Микробиологическая промышленность	24

8. 2. Медицинская промышленность	25
8. 3. Пищевая промышленность	26
8. 4. Фармацевтическая промышленность	29
8. 5. Косметическая промышленность	30
8. 6. Строительная промышленность	31
9. Механизмы токсичности наночастиц	32
10. Негативное влияние НЧ диоксида титана на репродуктивную систему крыс и мышей	33
МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	36
1. Объекты исследования	36
2. Экспериментальный материал	36
3. Секционный материал	37
4. Метод маркировки экспериментальных животных	37
5. Классические гистологические методы исследования	38
6. Метод микроскопии	38
7. Морфометрические методы	38
8. Метод статистической обработки данных	39
РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	40
1. Гистоморфологическая характеристика семенников крыс контрольной группы	40
2. Гистоморфологическая и морфометрическая характеристика яичек крыс при пероральном введении наночастиц TiO_2 рутильной модификации	42
ВЫВОДЫ	54
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	55

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	64
ПРИЛОЖЕНИЕ	65

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Сперматогенез имеет основополагающее значение для установления и поддержания мужской репродукции, в то время как его нарушение приводит к мужскому бесплодию. Соматические клетки Лейдига, секретирующие гормон тестостерон, составляют микроокружение или нишу семенника, которая необходима для регуляции нормального сперматогенеза [2].

В условиях падения рождаемости и высокого уровня общей смертности населения проблема охраны репродуктивного здоровья приобретает особую, не только медицинскую, но и социальную значимость. Уровень заболеваемости мужчин в плане репродуктивной патологии неуклонно растет.

Согласно последним статистическим данным ВОЗ на 2015 г., примерно 50-80 миллионов человек во всем мире страдают от бесплодия, а это означает что в 20-30% случаев причиной бесплодия являлся исключительно мужской фактор [30]. На основе данных Европейской ассоциации урологов показатель бесплодия у мужчин по результатам на 2021 г. возрос до 50%. [42]. Количество официально зарегистрированных мужчин с бесплодием в России выросло в 2,1 раза в период с 2000 по 2018 год [10].

Сперматогенез – процесс очень чувствительный к воздействию различных неблагоприятных факторов среди которых особенно выделяют наночастицы (НЧ) диоксида титана (TiO_2), годовой объем которого с 2008 г. превысил 5 млн. тонн [35].

НЧ TiO_2 представлены в виде трех кристаллических форм: рутил (тетрагональный), анатаз (тетрагональный) и брукит (орторомбический) [43]. Рутил – широко распространённая и естественная форма диоксида титана, используемая в пищевой, строительной, косметической, фармацевтической, микробиологической и медицинской промышленности [50, 65].

Некоторые исследования показали, что НЧ TiO_2 обладают особенностью легко проникать через мембраны клеток и преодолевать различные биологические барьеры [55]. Установлено, что НЧ TiO_2 , проходя через гематотестикулярный барьер, способны накапливаться в мужских половых органах и тем самым негативно влиять на мужскую фертильность [4, 43]. Проведенные эксперименты подтвердили неблагоприятное воздействие НЧ TiO_2 на мужскую репродуктивную систему вследствие уменьшения числа и подвижности сперматозоидов, изменения уровня андрогеновых гормонов и числа интерстициальных гранулоцитов (эндокриноцитов, клеток Лейдига (КЛ)), и как следствие нарушение процессов сперматогенеза [4, 19].

Когда организмы подвергаются воздействию НЧ TiO_2 , избыточное количество АФК, индуцируемое НЧ TiO_2 , приводит к инактивации белков клеточных мембран и повреждению митохондрий и ДНК, что приводит к токсическим патологическим эффектам [52].

Тем не менее, механизмы, лежащие в основе нарушения сперматогенеза под влиянием НЧ остаются недостаточно изученными.

Поэтому возникла необходимость изучения воздействия НЧ TiO_2 рутильной модификации на половозрелые мужские железы в период постэмбрионального развития организма.

Цель исследования: определить морфологические, морфометрические и функциональные изменения в семенниках лабораторных крыс при воздействии рутильной формы нанодисперсного диоксида титана.

Задачи исследования:

1. Охарактеризовать морфологические особенности семенников белых крыс при пероральном воздействии наночастиц диоксида титана рутильной формы.

2. С помощью гистологических и морфометрических методов изучить реактивные изменения интерстициальной ткани и клеток Лейдига семенников белых крыс на фоне перорального введения нанодисперсного диоксида титана рутильной модификации.

3. Определить возможное влияние диоксида титана рутильной модификации на процессы сперматогенеза.

Научная новизна. Изучено воздействие диоксида титана на морфофункциональное состояние мужских половых желез, а также на процессы образования и формирования половых клеток. Было доказано, что диоксида титана негативно влияет на репродуктивную способность половых желез, что проявляется в снижении их функциональности.

ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1. Общая характеристика мужской репродуктивной системы

Репродуктивная система мужчин – это система органов, играющая роль в размножении. Она представлена внешними и внутренними половыми органами. Внутренние половые органы включают (рис.1): яички вместе с их придатками и оболочками, семявыносящие и семявыбрасывающие протоки, добавочные половые железы – семенные пузырьки, предстательную железу и бульбоуретральные железы. Внешние половые органы образованы половым членом и мошонкой [9].



Рисунок 1. Мужская репродуктивная система: 1 – яички, 2 – придаток яичка, 3 – семявыносящий проток, 4 – семенные пузырьки, 5 – предстательная железа, 6 – бульбоуретральная железа, 7 – мужской половой член [17].

1. 1. Извитые семенные канальцы

Семенники - парные органы, расположенные у человека и животных не в полости тела, а в мошонке. Левый семенник несколько крупнее правого и свисает ниже, что предохраняет его от ущемления в мошонке суженном пространстве позади бедер [9]. ИСК являются функциональной единицей яичка и занимают две трети объема органа.

Средний объем яичка взрослого человека составляет 30 мл, а его паренхима разделена на 200-300 долек перегородками, образующимися из белочной оболочки. Белочная оболочка обильно васкуляризованная, кровеносные сосуды проникают в соединительнотканые перегородки. Каждая из этих долек содержит от одной до трех петель ИСК, каждая из которых при растяжении имеет длину 70-80 см, а общая длина каждого яичка составляет 250 метров [3]. В просвете канальцев находятся сперматозоиды.

Вынос семенников за пределы полости тела связан с тем, что для нормального созревания сперматозоидов необходима температура не выше 35 °С. Развиваясь в брюшной полости, семенники спускаются в мошонку на поздних стадиях созревания плода под влиянием гормона, вырабатываемого плацентой [9].

Семенники имеют чрезвычайно высокую чувствительность к действию многих повреждающих факторов: нервно-психологических и инфекционно-токсических, эндокринных, физических (температурных, ионизирующего облучения, травм), влиянию сосудистых расстройств [18] .

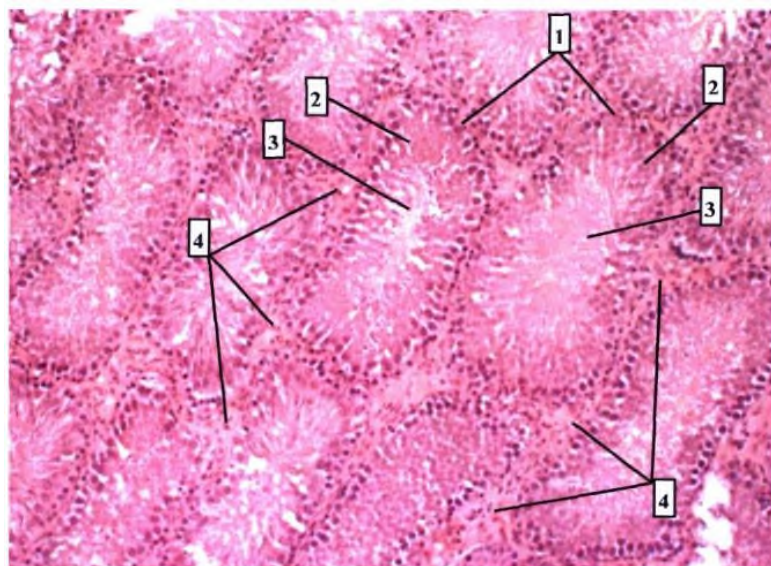


Рисунок 2. Поперечный срез семенников. Окраска гематоксилин-эозин. Об. 10 х ок. 10: 1 - извитой семенной каналец; 2 - сперматогенный эпителий; 3 - просвет канальца; 4 - интерстициальная ткань [2].

1. 2. Гистологическое строение извитых семенных канальцев

Семенные канальцы выстланы сперматогенным эпителием, окружены базальной пластинкой, лежащей на тонкой собственной пластинке, состоящей из одного или нескольких слоев околоканальцевых миофибробластов и отдельных фибробластов. Ритмические сокращения миофибробластов независимо от нервных импульсов постепенно смещают сперматозоиды по направлению к сети семенника, расположенной в средостении яичка. Соединительнотканная строма занимает оставшееся пространство между канальцами, хорошо кровоснабжается (рис.2).

Стенки извитых семенных канальцев располагаются близко друг к другу. Сперматогенный эпителий состоит из поддерживающих клеток, sustentоцитов – клеток Сертоли (КС), лежащих на базальной мембране вместе со стволовыми клетками и сперматогониями в базальном слое. Клетки Сертоли неправильной формы, не делятся, широким основанием лежат на базальной мембране, их вершины достигают просвета извитых семенных канальцев, ответственны за образование гематотестикулярного барьера. Они выполняют разнообразные функции: опорную, защитную, метаболическую для сперматогенного эпителия, секретируют андрогенсвязывающий белок [14].

Сперматоциты, сперматиды и сперматозоиды лежат в люминальном слое. В просвете семенных канальцев видны сперматозоиды. За базальной мембраной лежат слой миоидных клеток – миофибробластов и волокнисто-мышечная соединительная ткань с фибробластами. Различия клеточного состава сперматогенного эпителия свидетельствует о волнообразном течении сперматогенеза по длине канальцев.

Перитубулярная ткань окружает ИСК и состоит из слоев миоидных клеток, фиброцитоподобных адвентициальных клеток и коллагенового

матрикса. Вместе с КС эта перитубулярная ткань образует гематотестикулярный барьер яичка (ГТБ)[2].

Пространства между петлями извитых канальцев заняты рыхлой волокнистой соединительной тканью (интерстициальной тканью, стромой), содержащей большое количество кровеносных и лимфатических сосудов, нервных окончаний, а также клетки Лейдига. Клетки Лейдига являются мезенхимными производными. Это клетки округлой формы диаметром 10-15 мкм с оксифильной цитоплазмой, располагающиеся между извитыми канальцами небольшими группами или одиночно. Они синтезируют мужские половые гормоны — тестостерон, дигидротестостерон, андростендион, а также небольшие количества эстрогенов [9].

Помимо половых гормонов, клетки Лейдига вырабатывают вещества, оказывающие паракринное воздействие на клетки Сертоли; небольшие количества окситоцина, стимулирующего сокращения перитубулярных миоидных клеток извитых семенных канальцев, а также интерлейкин-1, действующий как фактор роста на сперматогонии типа В [2].

2. Сперматогенез и морфология сперматозоидов

Сперматогенез включает в себя сложную сеть процессов, которые происходят в извитых семенных канальцах (ИСК) и завершаются образованием зрелой мужской гаметы- сперматозоидом. Этими процессами являются: пролиферация сперматогоний; дифференцировка сперматогониев в сперматоциты; мейотическое деление сперматоцитов, продуцирующих сперматиды; созревание круглых сперматид; и высвобождение высокоспециализированных зрелых сперматозоидов в просвет канальца яичка [9].

Считается, что весь сперматогенетический процесс занимает примерно 74 дней, но более недавнее исследование у нормальных мужчин

показало, что общее время выработки эякулированной спермы может варьироваться от 42 до 76 дней. Предполагаемая суточная выработка спермы на одного мужчину колеблется от 150 до 275 миллионов сперматозоидов[15].

Сперматогенез протекает в четыре периода: период размножения; период роста, в течение которого происходит заметное увеличение размеров половых клеток; период созревания, включающий мейоз; период формирования, завершающийся появлением сперматозоидов [2, 39].

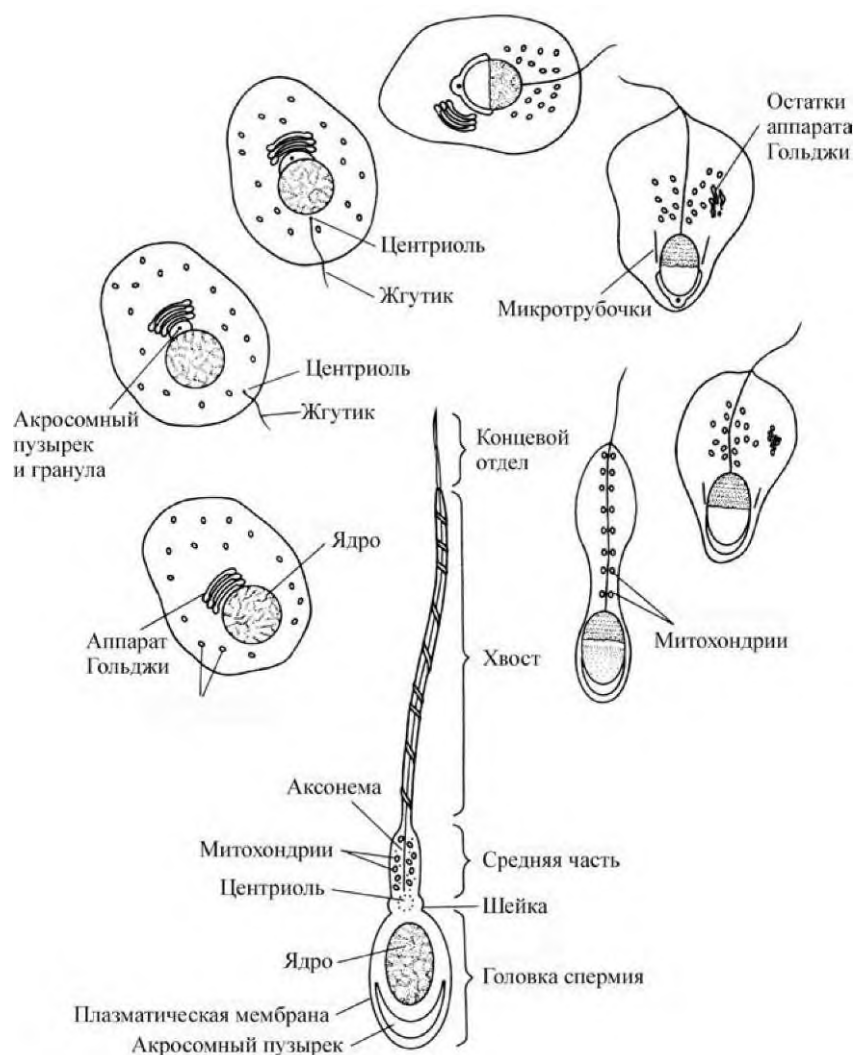


Рисунок 3. Формирование сперматозоида и его строение (по Гилберту, 1993) Размер зрелого спермия увеличен по отношению к другим рисункам.

2. 1. Половые клетки

Эпителиосперматогенный слой состоит из двух основных популяций клеток: сперматогенные клетки на различных стадиях дифференцировки

(стволовые клетки, сперматогонии, сперматоциты, сперматиды и сперматозоиды) и поддерживающие клетки, (суспендоциты, клетки Сертоли)[11].

Половые клетки (ПК) представляют собой семейство клеток, единственная цель которых – стать сперматозоидами и, таким образом, передавать генетическую и эпигенетическую информацию из поколения в поколение. Это единственный тип клеток человека, способный к мейозу. Расположенные внутри ИСК, ПК распределяются высокоорганизованным образом, при этом менее зрелые клетки занимают базальный компартмент и по мере созревания переходят в адлюминальный компартмент [2].

Между рождением и через 6 месяцев гонациты будут далее дифференцироваться в сперматогонии (СПГ), которые остаются неподвижными до возраста 5-7 лет, когда их количество увеличивается посредством митоза. Начиная с полового созревания и параллельно с процессом пролиферации, СПГ начинают процесс дифференцировки в направлении сперматозоидов[14].

Сперматогонии (рис.4) являются диплоидными предшественниками всех других типов ПК и несут двойную ответственность: подвергаются мейозу для образования мужской гаметы и митозу для самообновления, поддерживая непрерывное производство сперматозоидов на протяжении всей жизни человека. Расположенные в базальном отделе ИСК и в тесном контакте с КС, они имеют яйцевидное ядро и плотную цитоплазму, содержащую небольшой аппарат Гольджи, несколько митохондрий и много свободных рибосом. В наиболее распространенной модели стволовыми половыми клетками (СПК) являются темные и светлые СПГ. Темные СПГ – это неподвижные или резервные СПК, в то время как бледные СПГ – это активные стволовые ПК [7].

Решение о том, будет ли СПГ самообновляться, дифференцироваться или станет на апоптоз в основном влияют факторы, производные КС. Апоптоз - это механизм, используемый КС для контроля

количества ПК, поддерживающий соотношение КС/ПК постоянным. На самом деле, около 50-70% развивающихся ПК выбрасываются в процессе сперматогенеза. Учитывая их важность, любое нарушение в этих механизмах может повлиять на потенциал мужской фертильности[14].

Первичные сперматоциты (ПСЦ) образуются путем митотического деления типа В СПГ и знаменуют окончание пролиферативной части сперматогенеза. Они являются самыми первыми ПК проникают через ГТБ в просвечивающий компартмент, где они становятся иммунологически изолированными и переходят к мейозу. ПСК подразделяются на подклассы в соответствии со стадиями профазы 1 (т.е. прелептотена, лептотена, зиготена и пахитена [7]).

Процесс рекомбинации ДНК происходит на стадии пахитены и имеет решающее значение для эволюции человека, поэтому контроль качества мейоза 1 очень строгий, с контрольными точками во время пахитены и перехода метафаза 1/анафаза1. После мейоза 1 образуются два вторичных сперматоцита, каждый с гаплоидным числом хромосом, но с содержанием ДНК $2n$. Во время мейоза 2, один одиночный вторичный сперматоцит превращается в две гаплоидные - n круглые сперматиды Sa [17].

Спермиогенез - это процесс созревания, при котором одна круглая сперматида Sa превращается в один сперматозоид. На этой стадии больше не происходит клеточных делений, а происходит ряд цитоплазматических и ядерных изменений. Акросома образуется из аппарата Гольджи при участии цитоскелетной структуры, называемой перинуклеарной текой [12, 18].

Ядро становится более уплотненным и перемещается в эксцентрическое положение. Протамины заменяют 85% содержания ядерных гистонов, и ДНК аккуратно упаковывается вокруг них в сверхспиральные структуры, называемые тороидами, повышая защиту ДНК и становясь, по большей части, транскрипционно бесшумной. В

условиях высокой конденсации ДНК синтез белка зависит от РНК, хранящейся в кроматоидном теле. Некоторые из этих РНК были идентифицированы как некодирующие РНК, которые играют определенную роль в регуляции экспрессии генов (рис.3).

Спермиогенез может быть прерван на любой стадии развития сперматозоидов. Когда остановка происходит на ранней стадии сперматид (темные круглые ядра), это состояние называется задержкой позднего созревания, а когда присутствуют уплотненные овальные сперматиды, это называется гипосперматогенезом [14].

Рисунок 4. собственно сперматогенез по М. Dym D. Fawcett

3. 1. Вклад клеток Лейдига в сперматогенез

семенников человека, участвуют в регуляции ниши сперматогониальных стволовых клеток (ССК). Эти типы клеток важны для морфогенеза яичек плода [11] и для стимуляции сперматогенеза во взрослом возрасте для обеспечения мужской фертильности [46]. КЛ управляют сперматогенезом посредством секреции андрогенов, других гормонов, цитокинов, факторов роста, факторов транскрипции и рецепторов, связанных с КЛ [70].

3. 2. Морфология клеток Лейдига

Клетки Лейдига (рис.5) располагаются в семенниках млекопитающих группами или поодиночке, локализуясь вокруг капилляров либо перитубулярно. Форма клеток может быть овальной, округлой, полигональной или вытянутой [39].

Эндокриноциты отличаются гладкими контурами плазмалеммы, на которой могут быть выделены короткие микроворсинки. В этих клетках цитоплазма обычно плотная по структуре [71].

Клетки Лейдига содержат большое количество пиноцитозных пузырьков, а цитолемма формирует инвагинации для поглощения веществ в особенности на поверхности, прилегающей к сосудам. Они могут быть соединены соседними клетками Лейдига с помощью десмосом и щелевидных контактов. На поверхности клеток Лейдига может находиться базальная мембрана [45].

Клетки Лейдига отличаются наличием обширной цитоплазмы. В ней имеется хорошо развитый гладкий эндоплазматический ретикулум, заполняющий цитоплазму равномерно. Шероховатый эндоплазматический ретикулум встречается только скопированным в виде коротких канальцев. В зрелых клетках Лейдига структуры гладкого эндоплазматического ретикулума представлены в виде везикул и тубул, которые широко анастомозируют между собой [20].

Характерным для клеток Лейдига является наличие многочисленных митохондрий, кристы которых погружены в матрикс умеренной электронной плотности. Большой объем цитоплазмы клеток

Лейдига, приходящийся на митохондрии, связан с тем, что в этих органеллах завершается начатый на агранулярной эндоплазматической сети синтез стероидных гормонов. Типичной картиной для клеток Лейдига является тесный контакт митохондрий с элементами гладкого эндоплазматического ретикулума. В ядрах клеток Лейдига выделяются 1-2 интенсивно окрашивающихся ядрышка. Центриоли в клетках Лейдига обнаруживаются редко, и если присутствуют, то обычно они прилегают к комплексу Гольджи, представленному диктиосомами и пузырьками диаметром 20 нм. [7].

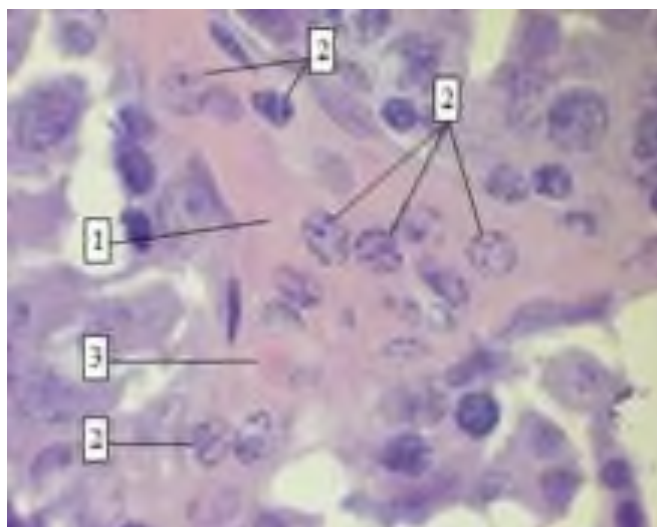


Рисунок 5. Интерстициальная ткань яичка: 1 – участок интерстиция, 2 – клетки Лейдига, 3 – кровеносный сосуд [9]

4. Стероидогенез

Стероидогенез — биосинтетический процесс превращения холестерина в стероидные гормоны, включая тестостерон (Т) [15]. Хотя они синтезируются в основном в половых железах, стероидные гормоны также вырабатываются в надпочечниках. Во взрослом семеннике продукция тестостерона в КЛ зависит от пульсирующего высвобождения ЛГ гипофизом в периферическую циркуляцию. В стероидогенезе КЛ играет две важные роли: поддержание соответствующих уровней стероидогенных ферментов и мобилизация и транспортировка холестерина к внутренней митохондриальной мембране. ЛГ индуцирует превращение

аденозинтрифосфата (АТФ) в циклический аденозинмонофосфат (цАМФ), который затем катализирует выработку протеинкиназы А, необходимой для переноса холестерина из цитоплазматического пула в митохондрии [18].

4. 1. Тестостерон

КЛ представляют собой основную популяцию стероидогенных клеток в интерстиции яичка, и их бесспорным вкладом в мужские репродуктивные функции является синтез тестостерона, который имеет фундаментальное значение для развития сперматогенеза [62]. Этот андроген диффундирует в интерстициальное пространство и влияет на сигнальные пути мужских половых клеток, связываясь с рецепторами андрогенов (РА) [66].

Т необходимо, по крайней мере, для четырех критических процессов во время сперматогенеза: поддержание гемато-тестикулярного барьера (ВТВ), мейоз, адгезия сперматозоидов КС и высвобождение сперматозоидов [51]. Анализ РА-дефицитных СК в семенниках грызунов выявил наличие основных нарушений фертильности: блокирование превращения круглых сперматозоидов в удлинённые сперматозоиды из-за дефекта клеточной адгезии, который вызывает преждевременное отделение круглых сперматид от КС [63]; задержка и фагоцитоз зрелых сперматозоидов КС. Другое исследование, включающее нокаут РА у мышей, показало, что передача сигналов тестостерона необходима для некоторых типов соматических клеток для поддержания сперматогенеза и сохранения мужской фертильности [41].

4. 2. Эстрадиол

Эстроген был признан ещё одним важным регулятором сперматогенеза у различных животных, включая человека [15]. Считается, что КС являются первым местом выработки эстрогена в яичках, переключаясь на КЛ во время неонатального развития, когда присутствует

ароматаза, регулируемая гонадотропинами. Эстроген воздействует на клетки, обладающие эстрогеновыми рецепторами (ЭР), индуцируя таким образом сперматогенез. КЛ человека имеют низкие уровни рецептор эстрогена 1 (ESR1) и (рецептор эстрогена 2) ESR2, но высокие уровни G-белка (GPER) [18].

Наиболее важным эстрогеном, вырабатываемым в семенниках человека, является эстрадиол (E2). E2, по-видимому, вызывает различные изменения в КЛ в зависимости от стадии их развития. В семенниках плода и новорожденного эстрадиол действует, блокируя морфогенетическое развитие КЛ из клеток-предшественников [31]. Кроме того, E2 влияет на продукцию тестостерона в КЛ. По-видимому, это происходит за счет блокирования активности многих стероидогенных ферментов, участвующих в синтезе тестостерона [60]. Кроме того, E2 действует как фактор выживания половых клеток [69]. Помимо выживания репродуктивных клеток, E2 регулирует их пролиферацию и дифференцировку, а также апоптоз [7]. Эти результаты, наряду с данными, демонстрируют важность эстрогенов для нормальной функции взрослых яичек.

5. Свойства наночастиц

5. 1. Структура НЧ

Атомы или молекулы, составляющие НЧ можно разделить на два типа: расположенные в приповерхностном слое (толщиной около 1 нм) и расположенные в объеме (оставшаяся часть НЧ). Атомы (молекулы) разных типов имеют различное окружение и поэтому по-разному взаимодействуют с соседними атомами (молекулами), что приводит к отличию в их свойствах. Это дает основание рассматривать приповерхностный слой НЧ, у которых соотношение числа атомов (молекул), лежащих на поверхности, больше или равно объемным, как новую фазу вещества. Ее наличие подтверждается резким увеличением

химической и каталитической активности поверхности, увеличением ее сорбционной емкости и другими эффектами [6].

5. 2. Особенности НЧ

1. НЧ низкомолекулярных веществ – это объекты с размером до 10 нм, высокомолекулярных – до 100 нм. Эти размеры являются верхней границей наномира [6]. Эти границы следует считать условными. Например, недавно было установлено, что НЧ диоксида кремния размером 100–120 нм обладают более высокой токсичностью, чем частицы размером 10–15 нм [1]. Поверхность НЧ обладает химической и каталитической активностью, не проявляющейся у более крупных частиц того же вещества. Это может быть обусловлено высокой кривизной поверхности, избыточной свободной поверхностной энергией и высокими величинами напряженности электростатического поля [59].

2. НЧ способны давать достаточно высокую концентрацию частиц в воздухе при незначительных массовых концентрациях распыленного вещества [6].

3. НЧ способны к ингаляционному, трансдермальному, транснейральному и энтеральному проникновению в любые органы и ткани человека, включая ЦНС. НЧ по размеру сопоставимы с рецепторами клеток и молекулами, осуществляющими сигнальную функцию. Исследования *in vitro* с использованием различных клеточных систем, подвергнутых воздействию НЧ, выявили их провоспалительный эффект и показали развитие в клетках процессов, связанных с окислительным стрессом [32].

4. Для НЧ размером 1–30 нм не существует инертной среды – в любой среде, на поверхности отдельно взятой НЧ всегда имеются продукты взаимодействия со средой, оказывающие существенное влияние на свойства НЧ. Состав адсорбированных молекул и сформировавшихся функциональных поверхностных групп определяет гидрофильность или

гидрофобность поверхности, например, как это показано в работе по детонационным наноалмазам [6].

5. НЧ способны приобретать поверхностный заряд. Недавно было установлено, что токсичность НЧ зависит от их размера и заряда поверхности намного сильнее, чем от их химического состава [54]. Авторы считают, что это открытие позволит регулировать токсичность наночастиц и расширит возможности для их применения в медицине. По их мнению, одна из причин потенциальной "молекулярной" токсичности наночастиц заключается в их взаимодействиях с белками «за счет поверхностных зарядов», что приводит к изменениям структуры биологических молекул. В результате этих изменений, функция белка (гормона или фермента) нарушается, развивается аутоиммунная реакция (организм начинает блокировать измененные молекулы белка, принимая их за чужеродные образования). Также образуются агрегаты белков в виде фибрилл и бляшек, приводящие к нейродегенеративным заболеваниям (болезням Альцгеймера и Паркинсона).

5. 3. Химические и физические свойства наночастиц диоксида титана

Диоксид титана представляет собой в основном три кристаллические фазы (рис.8), а именно: рутил (тетрагональный), анатаз (тетрагональный) и брукит (орторомбический) [37]. Рутил – наиболее распространённая и естественная форма диоксида титана, так как он является неотъемлемой частью тяжёлых минералов [43].

Рутил образует столбчатые или игольчатые кристаллы, в то время как анатаз образует тетрагональные кристаллы. При нагревании и анатаз, и брукит необратимо превращаются в рутил (температуры перехода соответственно 400—1000°C и около 750°C). Основой структур этих модификаций являются октаэдры TiO_6 , то есть каждый ион Ti^{4+} окружён шестью ионами O^{2-} , а каждый ион O^{2-} окружён тремя ионами Ti^{4+} [35].

Октаэдры расположены таким образом, что каждый ион кислорода принадлежит трём октаэдрам. В анатазе на один октаэдр приходятся 4

общих ребра, в рутиле — 2. Поскольку в природе существует дефицит брукита, эта форма не имеет существенного экономического значения [35].

6. Синтез наночастиц

Методы химического синтеза НЧ используют реакции неорганического, металлоорганического или органического синтеза. Производство частиц субмикронного размера из биогенных источников называется зеленым синтезом. В настоящее время доступны следующие виды «зеленых» НЧ металлов: Ag, Au, Cu, Cd, Pt, Pd, Fe, а также оксиды других металлов – ZnO, CeO₂, TiO₂, ZrO₂, In₂O₃, Cu₂O и CuO, PbS, Fe₃O₄. Эти НЧ хорошо известны своим антимикробным и антиоксидантным действием, поэтому они могут найти применение в системах доставки БАВ. При зеленом синтезе НЧ, необходимо принимать во внимание характер среды – pH, природу восстановителя и стабилизатора [21].

Отличительными физико-химическими свойствами синтезированных зеленых НЧ являются размер, форма, масса, чистота, химический состав, стабильность и растворимость. Эти свойства определяют уникальный характер воздействия НЧ на целевые объекты, который можно применять в сельском хозяйстве и пищевой промышленности, системах доставки лекарств, медицине, в производстве биомаркеров, биосенсоров, косметике и т.д. Это позволит достигать повышенного положительного эффекта при пониженной токсичности [58, 22].

7. Пути поступления наночастиц в организм

НЧ могут поступать в организм человека через контактирующие с внешней средой легкие, обонятельный эпителий, кожу и желудочно-кишечный тракт [37].

7. 1. Поступление НЧ через легкие

Наиболее доступны для аэрозольных НЧ легкие. Физиологические реакции, после вдыхания различных веществ дают информацию о месте их осаждения; именно в этих областях появятся

признаки раздражения. Большие частицы (от 10 до 20 мкм) осаждаются в носу и верхних дыхательных путях, меньшие частицы (от 5 до 10 мкм) оседают в трахее и бронхах, а частицы менее 5 мкм могут достигать альвеол. Частицы с размерами менее 0,5 мкм настолько малы, что ведут себя подобно газам. Токсичные газы осаждаются в соответствии с их растворимостью. Например, углеродные частицы размером менее 100 нм уже через одну минуту после экспозиции можно обнаружить в крови экспериментального животного [47]. НЧ металлов проявляют наибольшую системную токсичность и в большей степени способны проникать в компоненты внутренней поверхности дыхательной системы.

7. 2. Поступление НЧ через кожу

Возможны три пути проникновения наночастиц через кожу: между клеток, через клетки и через волосяные фолликулы. Например, липосомы с размерами в пределах от 20 нм до 200 нм легко «проходят» между клетками. Проникновение в организм человека через кожные покровы для НЧ облегчается тонкостью верхнего слоя кожи – эпидермиса. Лежащий же под ним слой – дерма – очень богат макрофагами крови и тканей, лимфатическими узлами, дендритными клетками, в него «выходят» окончания сенсорных нервов пяти различных типов; все эти «обитатели» дермального слоя способны поглощать и распространять нанообъекты за пределы их первоначальной аппликации. Любые незначительные механические повреждения кожи делают ее более «проницаемой» для НЧ. Ученые [57] продемонстрировали, что неповрежденная кожа в местах сгиба, например, в области запястья, может становиться проницаемой для НЧ.

7. 3. Поступление НЧ через желудочно-кишечный тракт

Источником наночастиц, поступающих в желудочно-кишечный тракт (ЖКТ), являются пища, вода, гигиенические и косметические средства, а также слизь, поступающая из дыхательных путей.

Можно указать четыре потенциальных пути абсорбции наночастиц в ЖКТ [40]:

1. транцитоз;
2. захват М-клетками Пейеровых бляшек и лимфоидной системы кишечника;
3. парацеллюлярная диффузия,
4. персорбция.

Общепринятым является мнение, что транслокация наночастиц из просвета ЖКТ осуществляется в значительной степени через Пейеровы бляшки и лимфоидные клетки соответственно тонкого и толстого кишечника, хотя они и составляют незначительный процент от общей поверхности кишечника. В то же время, отмечается возможность захвата наночастиц и энтероцитами [56]. Эффективность поглощения наночастиц в ЖКТ в значительной мере определяется их поверхностными характеристиками и размером. Поглощение гидрофобных и аминированных частиц более эффективно, чем гидрофильных и карбоксилированных, что в определенной степени отражает свойства муцинового слоя, покрывающего эпителий ЖКТ [49]. В целом, лишь небольшое количество наночастиц абсорбируется в желудочно-кишечном тракте (ЖКТ), откуда они могут распространяться по организму лимфо- и кровотоком и накапливаться в различных органах. От 7 до 4% полистирольных наночастиц и наночастиц TiO_2 , абсорбированных в ЖКТ, были в дальнейшем обнаружены в печени, селезенке, крови и костном мозге [49].

8. Применение НЧ диоксида титана в различных промышленности

8. 1. Микробиологическая промышленность

При наличии на поверхности диоксида титана микроорганизмов кислород, взаимодействуют с клеточными мембранами, подавляют активность ферментов, и уничтожают генетические супрамолекулы [46].

Бактерицидное воздействие УФ и TiO_2 исследовано на многих опасных бактериях и вирусах, известных в клинической практике [34].

Анализ данных приведенных в работе [53], свидетельствует, о том, что пленки диоксида титана для фотокатализа и медицины предпочтительнее получать методом фотокаталитических пленок. Наилучшими свойствами обладают пленки, получаемые с помощью плазменных фильтров (систем очистки потоков вакуумно-дуговой плазмы от микрокапель катодного материала).

Изучена противомикробная активность 4 титановых пластин в отношении референтных штаммов стафилококков, кишечной палочки, псевдомонад и кандид. Доказано, что этоний и декаметоксин в достаточном количестве сорбируется на поверхности титанового композита, что придает структуре пролонгованную противомикробную активность [54].

Нанотрубки, синтезированные из углеводов и аммония, демонстрируют антимикробный эффект. Установлено, что наноструктурированная частицами ZnO и TiO_2 поверхность способствует лучшей адгезии и функциональной активности остеобластов и, препятствуют адгезии патогенных бактерий. Под действием УФ - излучения с поверхности наночастиц диоксида титана могут выходить электроны, что ведет в воде или в кислороде к образованию высокоактивных радикалов — гидроксильных ($\text{OH}\cdot$) и пергидроксильных ($\text{HOO}\cdot$), которые разрушают микроорганизмы на поверхности частиц [61].

8. 2. Медицинская промышленность

В последние годы появились новые методы регенерации костной ткани, основанные на применении наноматериалов. Подобные костные матрицы, содержащие коллаген и гиалуроновую кислоту, уже прошли клинические испытания на пациентах. Клетки костной ткани также могут эффективно расти и пролиферировать на матрице и нанотрубках,

поскольку последние не разрушаются и являются биологически инертными [69]. Тонкая структура электросшитой поли-L-лактидной матрицы представляет собой идеальную основу для формирования тканей, в частности, хряща.

Имплантированные в такую матрицу клетки растут вдоль нановолокон, которые демонстрируют хорошую биосовместимость и, в то же время, являются биodeградируемыми. Разработке методики управления размерами кристаллитов при осаждении диоксида титана TiO_2 (анатаз) посвящена работа [8]. Данный метод позволяет регулировать биоактивные свойства материала и дает возможность сокращения сроков остеоинтеграции имплантатов в костную ткань.

Методика формирования пленок TiO_2 анатаза с помощью атомарно-слоевого осаждения позволяет наносить покрытие на медицинские изделия любой геометрии и уже успешно интегрируется в технологию производства дентальных имплантатов компании ООО «Конмет». Предложенная *in situ* методика диагностики биоактивных свойств поверхностей посредством выдержки в буферном растворе, моделирующем тканевую жидкость [8].

Разработан процесс синтеза из нанопорошков TiO_2 и Al_2O_3 наноструктурированных покрытий [64]. Исследования показали, что адгезия остеобластов на наноструктурированной поверхности TiO_2 существенно сильнее, чем на традиционной за счет повышенной удельной поверхности.

8. 3. Пищевая промышленность

В пищевой промышленности TiO_2 применяется в качестве добавки для улучшения белого цвета некоторых продуктов (рис.6), таких как сладости или продукты на основе молока [65, 32, 33]. В 2012 году Вейр и др. измерили и сравнили количество титана в обычных пищевых продуктах [65]. Полученные данные, нормированные по содержанию

титана на порцию, доказали, что самое высокое содержание титана можно найти в жевательных резинках, конфетах, сахарной пудре или изделиях с белой глазурью. Разница в потреблении TiO_2 между женщинами и мужчинами в Соединенных Штатах была незначительной. Однако разница в потреблении между детьми и взрослыми была признана значительной. Дети склонны потреблять в четыре раза больше TiO_2 на килограмм массы тела, чем взрослый человек. Этот факт можно просто объяснить их потребительскими предпочтениями, как правило, основанными на вкусе сладких закусок, среди которых многие содержат E171. Следовательно, воздействие TiO_2 зависит также от привычек питания [65].

Поскольку ежедневное воздействие E171 может достигать нескольких сотен миллиграммов, из которых значительная часть приходится на наноразмерный диапазон (около 36%) [65], существуют опасения, что длительное воздействие этого вещества может привести к вредным последствиям для организма человека.

Исследование, проведенное Беттини и др. [24] доказали, что пероральное введение пищевого TiO_2 , содержащего наноразмерные частицы, нарушает иммунный гомеостаз и индуцирует канцерогенез у крыс. Основываясь на этой публикации, французское ANSES (Агентство по продовольствию, охране окружающей среды и гигиены труда) опубликовало свое заключение по НЧ TiO_2 [72], в котором была подчеркнута необходимость проведения тщательного исследования возможных опасностей, связанных с использованием E171. Франция является первой страной, запретившей использование пищевой добавки E171 из-за возможного вредного воздействия на человека и отсутствия научных данных, подтверждающих ее безопасность. Ограничения вступили в силу в 2020 году [74].



Рисунок 6. Порошок диоксида титана, применяемый в пищевой промышленности [75].

Вредное воздействие NPS TiO_2 было подтверждено Grissa et al. [34]. Предположение этого исследования состояло в том, чтобы имитировать длительный прием E171 в низких дозах людьми.

В исследовании Talamini и соавт. был использован материал, имеющий распределение частиц по размерам, соответствующее качеству пищевых продуктов [56]. Исследователи изучали повторное 3-недельное пероральное введение E171 мышам (суспензию E171 капали мышам в рот, 5 мг/кг массы тела в течение 3 дней в неделю). Результаты были связаны не только с токсическими исходами, такими как воспалительная реакция и повышенная выработка супероксида в пищеварительном тракте, но и с отложением TiO_2 во внутренних органах, особенно в печени и толстом кишечнике, где было отмечено трехкратное увеличение НЧ TiO_2 [56].

Зубная паста является еще одним источником TiO_2 (также в наноформе), который может попадать в организм. Поэтому неудивительно, что сейчас внимание переключилось на это средство личной гигиены. Обзор научных данных по этому вопросу, который был проведен национальными и международными агентствами, привел к запрету использования E171 в производстве пищевых продуктов [73]. Обычно

количество используемой зубной пасты невелико, поэтому прием НЧ TiO_2 внутрь возможен только в случае нежелательного проглатывания.

Наноматериалы могут взаимодействовать с молекулами, которые присутствуют в биологических жидкостях, например, с бактериальным липополисахаридом (ЛПС), который является провоспалительным соединением, присутствующим в желудочно-кишечном тракте. Бьянки и др. показано, что ЛПС, включенный в биокорону частицы titania P25, проявляет усиленные провоспалительные эффекты [25].

Биологическая судьба наноматериалов также должна оцениваться с учетом воздействия пищевых ингредиентов. Например, модельные пищевые ингредиенты, бычий сывороточный альбумин и сахароза, были способны стабилизировать НЧ TiO_2 и индуцировать уменьшение размеров их агломератов [68]. Было также показано, что адсорбция белков на пищевых наночастицах TiO_2 ингибируется в присутствии оксалата, дикарбоновой кислоты или фосфатов [38].

Поскольку НЧ TiO_2 в значительной степени используются в продуктах на основе молочных продуктов, Сао et al. основное внимание уделялось их взаимодействию с молочными белками. Исследователи наблюдали диссоциацию мицелл казеина и образование NP-белковых комплексов. Было высказано предположение, что это взаимодействие, возможно, изменило экранирование пептидных связей. Следовательно, можно было бы предположить, что количество непереваренного белка, который может попасть в толстую кишку и повлиять на микрофлору кишечника, будет значительно изменено [26].

8. 4. Фармацевтическая промышленность

Пероральное воздействие НЧ TiO_2 связано не только с приемом E171 внутрь, но и с потреблением фармацевтических препаратов. TiO_2 является распространенным фармацевтическим наполнителем, в основном

используемым в качестве белого пигмента, но в своей наноформе он также может быть эффективным носителем антибиотиков, что дополнительно усиливает или продлевает действие препарата [44, 49]. Доказательства генотоксического действия лекарственного носителя нано-TiO₂, вводимого перорально, были недавно предоставлены Моттолой и др., которые исследовали влияние совместного воздействия НЧ TiO₂ и линкомицина на амниоциты человека. Результаты этого исследования *in vitro* демонстрируют, что воздействие НЧ TiO₂ индуцировало увеличение разрывов нитей ДНК, потерю стабильности ДНК и апоптоз, а также снижало жизнеспособность клеток, тогда как воздействие самого линкомицина не оказывало токсического/генотоксического воздействия на амниотические клетки. Авторы предположили, что основным молекулярным механизмом повреждения ДНК может быть выработка АФК НЧ, в частности радикала ОН [44]. На сегодняшний день исследователи обычно связывают генотоксичность НЧ TiO₂ с образованием окислителей [27, 40, 48].

8. 5. Косметическая промышленность

В настоящее время основным потребителем НЧ и наноматериалов является косметическая промышленность. НЧ в косметике улучшают потребительские свойства (стабильность парфюмерных композиций и их прозрачность) и оказывают функциональное воздействие (улучшают микрорельеф и цвет кожи) [28].

Различные крупные косметические компании, включая L'Oréal, Christian Dior и Estee Lauder финансируют исследования в области нанокосметики, чтобы улучшить потребительские свойства продуктов. Это достигается благодаря повышенной стабильности, биодоступности, а также увеличению скорости проникновения в кожу и увлажнения НЧ. На рынке уже представлены различные виды нанокосметики: средства от и после загара с нанокапсулами витаминов, "возрастная" косметика с

использованием таких компонентов, как фуллерены, НЧ глюконолактат, витамины, липосомы, оксид цинка, диоксид титана, нанокапсулированный ретинол и витамины, нанолипосомы лактата натрия, календулы, орешника, женьшеня, а также наносомы витамина Е и провитамина В5. Также доступны крем против воспаления и зуда с нанокапсулированным оксидом цинка, крем от мешков под глазами с использованием фуллеренов и липосом, румяна с пигментами, диоксидом титана и оксидом цинка, а также лосьоны для тела и другие продукты [6].

В связи с возрастающими дозами УФ облучения связанными с разрушением озонового слоя все более популярными становятся солнцезащитные средства, это объясняет почему самой большой группой НЧ, используемых в косметике, не проникающей через кожу, являются пигменты и УФ-фильтры на основе оксидов цинка, титана и церия и циркония [6]. Оксиды металлов в наноформе бесцветны и поглощают УФ, защищая кожу от его разрушающего действия. Введение НЧ оксидов металла расширяет спектральный диапазон защиты и увеличивает коэффициента SPF за счет отражения, рассеивания и (или) поглощения УФ-излучения. Современные солнцезащитные фильтры содержат нерастворимые НЧ диоксида титана, оксида цинка, диоксида церия или диоксида циркония. Эти наноксиды входят в состав дневных кремов [47].

8. 6. Строительная промышленность

Субмикронный порошок TiO_2 в сочетании с поливиниловым спиртом применяется для изготовления пористой керамики методом гелевого литья [13]. В лакокрасочной промышленности диоксид титана является, практически, эталоном белого цвета [6]. В композиционных материалах известно применение нанотрубчатого анодного диоксида титана (НТАДОТ), который является матрицей при создании армированных наполнителями композитов, обладающими высокой прочностью, твердостью, жесткостью и т.п. Одним из таких материалов

может быть нанобетон, с размером частиц от 1 до 100 нм. Для получения нанобетона используют технологию домолла цемента до наноразмерных частиц [43].

9. Механизмы токсичности наночастиц

Взаимодействие НЧ с биологическими объектами может приводить к встраиванию НЧ в мембраны, их проникновению в клетки и клеточные органеллы, взаимодействию с нуклеиновыми кислотами, белками, а также различными классами органических соединений (липидами, полисахаридами и др.), что может привести даже к изменению функций различных биологических структур [53].

Из анализа литературы следует [53], что наиболее распространенными механизмами цитотоксичности НЧ являются следующие:

1. НЧ могут вызывать окисление за счет образования активных форм кислорода и других свободных радикалов;
2. НЧ могут повреждать клеточные мембраны, перфорируя их;
3. НЧ повреждают компоненты цитоскелета, нарушая внутриклеточный транспорт и деление клеток;
4. НЧ нарушают транскрипцию и повреждают ДНК, тем самым ускоряя мутагенез;
5. НЧ повреждают митохондрии и нарушают их метаболизм, что приводит к энергетическому дисбалансу клеток;
6. НЧ мешают образованию лизосом, тем самым препятствуя аутофагии и деградации макромолекул и запуская апоптоз;
7. НЧ вызывают структурные изменения в мембранных белках, нарушая их транспортные функции, включая межклеточный транспорт;
8. НЧ активируют синтез медиаторов воспаления, нарушая нормальные механизмы клеточного метаболизма, а также метаболизма тканей и органов.

10. Негативное влияние НЧ диоксида титана на репродуктивную систему крыс и мышей

Наиболее часто применяются диоксид титана и наносеребро. Из-за своих замечательных оптических и электрических свойств наночастицы диоксида титана используются в производстве красок, бумаги, пластмасс, косметических средств, в качестве покрытия сварочных электродов, в фармацевтике и т.п.

В исследованиях влияния наночастиц TiO_2 на репродуктивную систему мужчин использовались различные концентрации наночастиц и различный способ и продолжительность введения, что привело к противоречивым результатам.

Дехгани и соавт. продемонстрировали, что внутрибрюшинное введение наночастиц TiO_2 в дозе 50, 100 и 150 мг/кг в течение пяти дней не изменял уровень гормона ФСГ и количество сперматогониальных клеток, однако Уровень ЛГ и тестостерона, а также среднее количество сперматозоидов и сперматидных клеток значительно снизилось в экспериментальных группах. [29]

В эксперименте Гао и соавт. мышам вводили 2,5, 5 и 10 мг/кг наночастиц TiO_2 внутрижелудочно в течение 90 дней, что приводило к его накоплению в семенниках, что приводило к поражению яичек, порокам развития сперматозоидов и изменениям уровня половых гормонов в сыворотке крови. Кроме того, была изменена экспрессия генов, связанных со сперматогенезом и метаболизмом стероидов и гормонов [33].

Внутрибрюшинная инъекция наноразмерного TiO_2 в дозе 500 мг/кг значительно увеличивала количество аномалий сперматозоидов и половых клеток приводя к апоптозу, а также снижение плотности и подвижности сперматозоидов без каких-либо очевидных патологических изменений в яичке и придатке яичка [62].

Гонг и соавт. (2015) продемонстрировали, что внутрижелудочное введение наночастиц TiO_2 в дозах 2,5, 5, 10 и 30 мг/кг мышам-самцам в

течение 60 дней подряд приводило к поражению яичек и придатка яичка, снижению концентрации сперматозоидов и подвижности сперматозоидов, а также увеличению количества аномальных сперматозоидов. Снижение активности лактатдегидрогеназы, сорбитол-31-дегидрогеназы, сукцинатдегидрогеназы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, Na^+/K^+ , Ca^{2+} - АТФазы и $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ - АТФазы, а также наблюдалась повышенная активность кислой фосфатазы, алюмокалиевой фосфатазы и общей синтазы оксида азота в семенниках мышей. Кроме того, выработка активных форм кислорода, уровень перекисного окисления липидов и 8-гидроксидезоксигуанозин как продукт окисления ДНК повышен в семенниках. Это подразумевало, что подавление сперматогенеза, вызванное воздействием наночастиц TiO_2 , может быть связано с изменениями ферментов, маркированных тестикулами, и окислительным стрессом в семенниках [37].

Бакаре и соавт. исследовали действие пяти концентраций 9,38, 18,75, 37,50, 75,00 и 150,00 мг/кг наночастиц TiO_2 , которые вводили внутрибрюшинно в течение пяти дней подряд. Наблюдалось значительное увеличение количества аномальных сперматозоидов в тестируемых концентрациях через 5 и 10 недель с первого дня воздействия. Кроме того, наблюдались нарушение клеточной оболочки, вакуолизация и некроз тканей яичек [23].

Йе и соавт. культивировали первичные клетки Сертоли крысы в средах, содержащих 5, 15 или 30 мкг/мл наночастиц TiO_2 , в течение 24 ч. Их результаты показали, что наночастицы TiO_2 проникают через мембрану клеток Сертоли в цитоплазму или ядро и значительно подавляют их жизнеспособность в зависимости от концентрации. Также наблюдалась повышенная экспрессия NF- κ B, TNF- α и IL-1 β , а также снижение экспрессии IkB [67].

После введения наночастицы TiO_2 в дозе 100 мг/ кг/сут перорально взрослым крысам-самцам в течение 8 недель наблюдались

гистопатологические изменения и заметное снижение массы семенника, придатка яичка, семенного пузырька и предстательной железы со снижением уровня тестостерона в сыворотке крови, подвижности сперматозоидов, концентрации и жизнеспособности сперматозоидов и увеличением частоты морфологических отклонений от нормы [43].

Экспозиция наночастицами диоксида титана в концентрациях от 5 до 40 мкг/мл приводила к повышению образования активных форм кислорода, индукции генов, связанных с оксидативным стрессом и воспалением, и даже к гибели клеток бронхиального эпителия человека BEAS-2B. Наночастицы диоксида титана проникали в клетку и располагались в цитоплазме в перинуклеарной зоне [55].

Исследование цитотоксичности наночастиц диоксида титана (3-600 мкг/мл) на клетках фибробластов мышей L929 выявило изменения формы клеток, накопление в клетке фрагментированного хроматина и даже некроз клетки. В среде, в которой культивировались клетки, отмечалось повышенное образование активных форм кислорода [52].

При нахождении наночастиц диоксида титана в среде, в которой культивировались человеческие монобластоидные клетки RPMI, через 24 и 48 часов обнаруживались как некротические изменения клеток, так и апоптоз [59].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Объекты исследования

Исследование было проведено на 18 белых лабораторных крысах-самцах репродуктивного периода линии Wistar массой 170-210 г, которые были разделены на три группы: одна контрольная группа ($n=6$) и две экспериментальные группы (срок выведения 14 дней и 30 дней, $n=12$). Подопытные животные содержались в стандартных условиях вивария ФГБУ «ВЦГПХ» Всероссийский центр глазной и пластической хирургии Минздрава России с постоянной комнатной температурой, равной 20-21°C со световым режимом 12 ч дня и 12 ч ночи. Доступ к воде и пище животные получали *ad libitum* в соответствии с Хельсинской Декларацией Всемирной Медицинской Ассоциации о гуманном отношении к животным (редакция октябрь 2008 г.). Все эксперименты, уход и содержание с животными проводились в соответствии с нормами, изложенными в «Санитарных правилах по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник» от 06.04.1993 г., приказе Минздрава РФ №267 от 19.06.2003г. и Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях от 18.03.1986.

2. Экспериментальный материал

Токсическое поражение крыс моделировали путем перорального введения нанодисперсного диоксида титана рутильной модификации - TiO_2 в дозе 10 мг/кг веса животного.

Дисперсию диоксида титана (рутильная форма, 40-60 нм) получали с помощью разведения порошка TiO_2 (рис.7) производства ЗАО «Промхимпермь», г. Пермь (рутильная форма, массовая доля TiO_2 не менее 99,9%) в дистиллированной воде. Для исключения агрегации наночастиц суспензию нанодисперсного TiO_2 обрабатывали в ультразвуковой ванне.

Крысам контрольной группы в аналогичных условиях и в том же объеме вводили дистиллированную воду.

Самцов крыс выводили из эксперимента на 14-е и 30-е сутки методом декапитации под эфирным наркозом с соблюдением основных требований к эвтаназии, изложенных в «Правилах проведения работ с использованием экспериментальных животных» в соответствии с приказами МЗ СССР от 12.08.1977 № 755 и от 24.07.1978 № 701

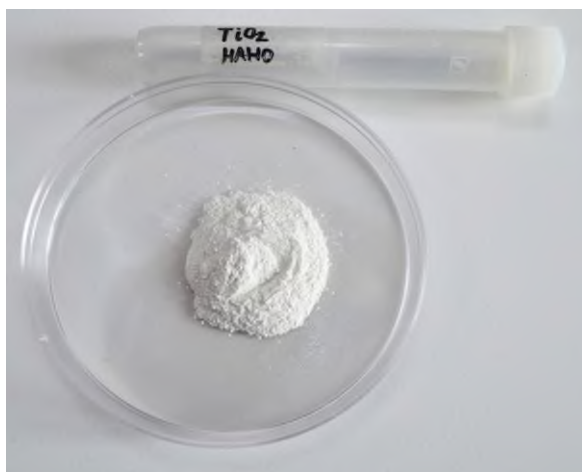


Рисунок 7. Нанодисперсный диоксид титана

3. Секционный материал

Материалом для секционной части работы послужили семенники лабораторных крыс. Материал для гистологического исследования изымался на базе морфологической лаборатории ФГБУ «ВЦГПХ» Всероссийского центра глазной и пластической хирургии Минздрава России.

4. Метод маркировки экспериментальных животных

Животные были пронумерованы согласно схеме мечения белых крыс (рис.14). В качестве красителя использовался насыщенный раствор пикриновой кислоты, так как метки имели свойство удерживаться в течение двух-трех месяцев. Краску наносили в виде полосок на спине и по бокам животного.

5. Классические гистологические методы исследования

Органы фиксировали в 10%-ном растворе нейтрального формалина, время фиксации материала наблюдается в течение 24–48 часов, обезвоживали в серии спиртов возрастающей концентрации (70°, 80°, 96°, 100°). Перед проводкой в спиртах следует промывать образцы в проточной воде 24 часа. Заливали в парафин по общепринятой методике. На микротоме LEICA RM 2145 (LEICA, Германия) готовили стандартные серийные срезы толщиной около 5 мкм, затем проводили окрашивание растворами гематоксилина и эозина. После окрашивания на предметные стёкла со срезами капали 1–2 капли бальзама и покрывали заранее стерилизованным покровным стеклом.

6. Метод микроскопии

Морфологическое, морфометрическое и функциональное состояния ИСК проводили с использованием цифрового сканирующего биологического микроскопа 3DHISTECH PANNORAMIC 250 Flash (3DHISTECH, Венгрия) и лицензионного пакета прикладных программ со специализированным программным обеспечением управления настройками и захвата изображения Slide Viewer (3DHISTECH, Венгрия) на базе ЦНИЛ БГМУ.

7. Морфометрические методы

В каждом гистологическом препарате исследовали по 100 поперечно ориентированных срезов ИСК.

Проводили оценку площади интерстициальной ткани, толщины и Диаметра ИСК.

Производили подсчет количества КЛ на 100 клеток в одном интерстициальном участке, среди которых выявляли, согласно литературным источникам, число больших и средних форм КЛ являющиеся активным стероидпродуцирующим клеткам и число малых

незрелых форм КЛ относящиеся в отношении стероидогенеза к неактивным инволюционирующим клеткам [4]

Индекс активности КЛ подсчитывали как отношение суммарного числа активных клеток к неактивным [5].

Для оценки генеративной активности ИСК на различных стадиях развития вычисляли индекс сперматогенеза, заключающийся в подсчете числа канальцев, содержащих 4 стадии развития половых клеток (сперматогонии, сперматоциты, сперматиды и сперматозоиды), 3 стадии (сперматогонии, сперматоциты и сперматиды), 2 стадии (сперматогонии и сперматоциты) и 1 стадию (сперматогонии). Индекс сперматогенеза считали по формуле $ИС = (4*a_4 + 3*a_3 + 2*a_2 + a_1)/100$, где a_4 – число канальцев, содержащих 4 стадии развития половых клеток, a_3 – 3 стадии, a_2 – 2 стадии, a_1 – 1 стадию [5].

Учитывали плотность КЛ в усл. ед. площади интерстициальной ткани, заключающуюся в соотношении количества клеток в одном интерстициальном участке на усл. единицу площади интерстициальной ткани.

8. Метод статистической обработки данных

Полученные результаты были обработаны с помощью пакета прикладных программ Statistica 10.0 (Stasoft, Inc.) и Microsoft Excel (Microsoft, Inc.)

Все количественные данные представляли в виде: среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего значения. Сравнение средних значений, подчиняющихся закону нормального распределения, в контрольных и экспериментальной выборках проводили с использованием непараметрического критерия сравнения для независимых выборок (t-критерий Стьюдента), различия считались значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Гистоморфологическая характеристика семенников крыс контрольной группы

Гистологическое исследование семенников половозрелых крыс линии Wistar показало, что мужские репродуктивные органы крыс имеют округлую или овальную форму. При обзорной микроскопии рассматривалась розовая соединительнотканная белочная оболочка, идущая по краю препарата.

Основную массу семенника образовывали семенные извитые каналы. На гистологическом срезе в зависимости от плоскости сечения каналы семенника выглядели округлыми или овальными (рис. 8).

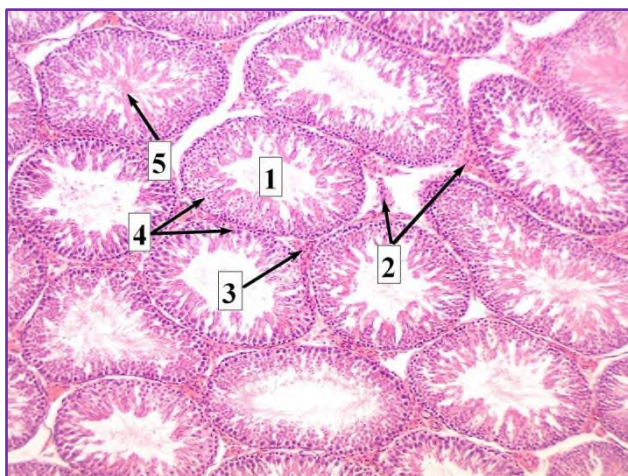


Рисунок 8. Поперечный срез семенных желез в контрольной группе «К». Об.: 1 – извитой семенной каналец; 2 – интерстициальная ткань; 3 – клетки Лейдига, 4 – сперматогенный эпителий, 5 – просвет канальца. Окраска гематоксилин-эозин. Ув.: x100.

Благодаря морфометрическому анализу удалось убедиться, что петли семенных канальцев соединены рыхлой интерстициальной соединительной тканью, где и расположены эндокриноциты (гранулоциты или клетки Лейдига), продуцирующие в большом количестве тестостерон. Участки интерстиция между извитыми семенными канальцами располагались равномерно и в большинстве случаев обладали треугольной

формой. Клетки Лейдига имели достаточно крупную и округлую форму. С помощью микроскопического метода удалось определить, что КЛ характерна ацидофильная цитоплазма и четко выраженные округло-овальные ядра с 2-3 ядрышками. Гранулоциты чаще располагались группами по 5-7 клеток, а общее количество КЛ в одном участке интерстиция достигало 13-15 шт (рис. 9).

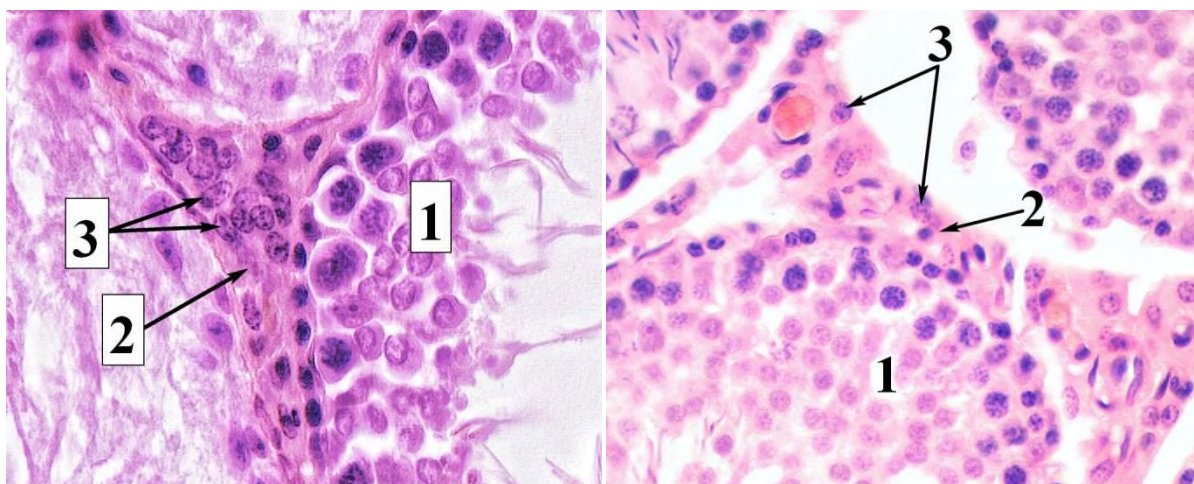


Рисунок 9. Интерстициальная ткань семенных извитых канальцев в контрольной группе «К». Об.: 1 – извитой семенной каналец; 2 – интерстициальная ткань; 3 – клетки Лейдига. Окраска гематоксилин-эозин. Ув.: x400.

Внутренняя оболочка семенных канальцев образована эпителиосперматогенным слоем (сперматогенным эпителием), расположенным на базальной мембране. Даже при слабом увеличении заметно, что разные канальцы проходят разные стадии сперматогенеза. Процесс сперматогенеза протекает волнообразно по всему извитому семенному канальцу. Следовательно, на каждом сегменте семенного канальца имеется определенный набор клеток эпителиосперматогенного слоя.

При анализе гистологических препаратов контрольной группы заметно полное наличие генеративных клеток – от сперматогоний и сперматоцитов до сперматид и сперматозоидов (рис. 13). Кроме того,

пространство канальца характеризовалось правильно упорядоченным расположением генеративных клеток.

2. Гистоморфологическая и морфометрическая характеристика яичек крыс при пероральном введении наночастиц TiO_2 рутильной модификации

Проведенное морфологическое исследование семенников лабораторных крыс в двух экспериментальных группах «Д-14» и «Д-30» при пероральном введении TiO_2 рутильной модификации в дозе 10 мг/кг веса животного выявило, что после 14-ти и 30-ти суток воздействия TiO_2 семенники снаружи состоят из неоднородной белочной оболочки, которая окружает семенники. ИСК обладали неправильной вытянутой прямолинейной многогранной формой, располагались свободно и не прилегали плотно друг к другу. Редко встречались извитые семенные каналцы правильной эллипсовидной формы. Граница между сперматогенным эпителием и просветом канальца плохо просматривалась и имела нечеткие контуры. В собственной оболочке канальцев отмечено разволокнение и дезорганизация базальных мембран (рис. 10).

Д-14

Д-30

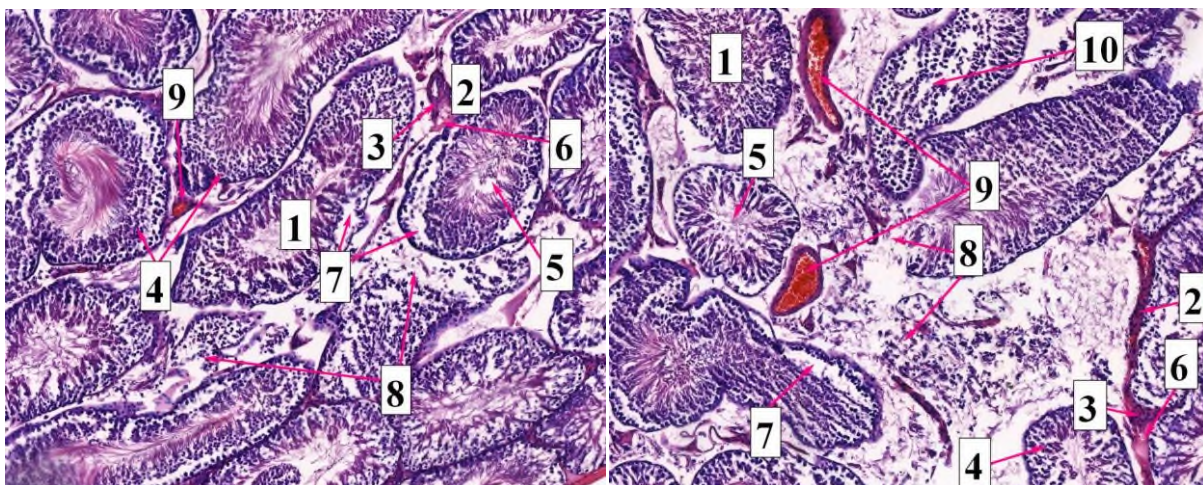


Рисунок 10. Поперечный срез семенных желез в опытных группах «Д-14» и «Д-30». Об.: 1 – извитой семенной каналец; 2 – интерстициальная ткань; 3 – клетки Лейдига, 4 – сперматогенный эпителий, 5 – просвет канальца, 6

– отек интерстициальной ткани, 7 – отслоение сперматогенного эпителия, 8 – деформация ИСК и выход сперматогенных клеток в интерстициальное пространство, 9 – стаз эритроцитов в капиллярах - «Д-14» и венах - «Д-30», 10 – отсутствие сперматозоидов. Окраска гематоксилин-эозин. Ув.: x100.

При анализе микропрепаратов семенника крыс было обнаружено расширенные и полнокровные пре- и посткапиллярные сосуды во всей строме. Большинство капилляров также имели расширенный просвет и были заполнены эритроцитами. В расширенных просветах венул и мелких вен обнаруживался сладж эритроцитов (рис. 11).

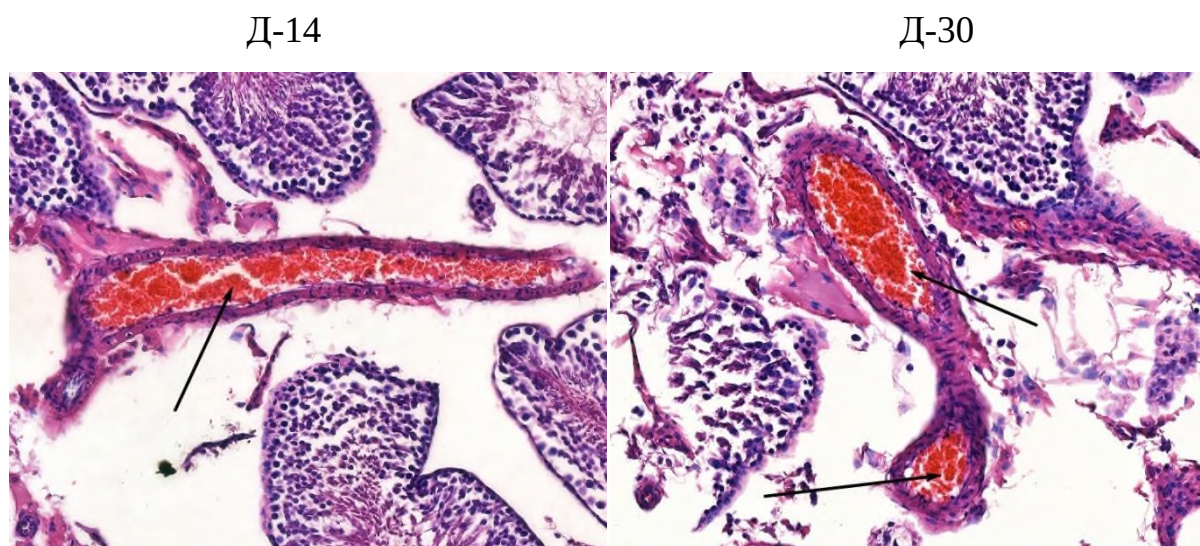


Рисунок 11. Венозное полнокровие, стаз эритроцитов в опытных группах «Д-14» и «Д-30». Окраска гематоксилин-эозин. Ув.: x200.

Морфометрическая оценка семенников позволила установить, что средняя толщина сперматогенного эпителия в двух экспериментальных группах «Д-14» ($84,88 \pm 1,40^*$) и «Д-30» ($80,25 \pm 1,50^*$) уменьшается на 18,19% и 22,65% в отличие от контрольной группы «К-1» ($103,75 \pm 2,14$). В двух экспериментальных группах «Д-14» ($237,25 \pm 2,69^*$) и «Д-30» ($243,63 \pm 1,90^*$) средний диаметр извитых семенных канальцев уменьшался на 8,57% и 6,12% по сравнению с контрольной группы «К-1» ($259,5 \pm 4,37$) (рис. 12, табл. 1). Путем осуществления морфологического анализа было выявлено, что изменение структуры клеток сперматогенного

слоя приводило к уменьшению диаметра извитых семенных канальцев и их деформации в направлении удлинения.

Таблица 1

Макроскопические показатели семенных желез самцов белых крыс

Показатели	контроль	14 дней	30 дней
Толщина СЭ, мкм	103,75±2,14	84,88±1,40*	80,25±1,50*
Диаметр ИСК, мкм	259,5±4,37	237,25±2,69*	243,63±1,90*

Примечание: *-статистически значимые отличия по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$).

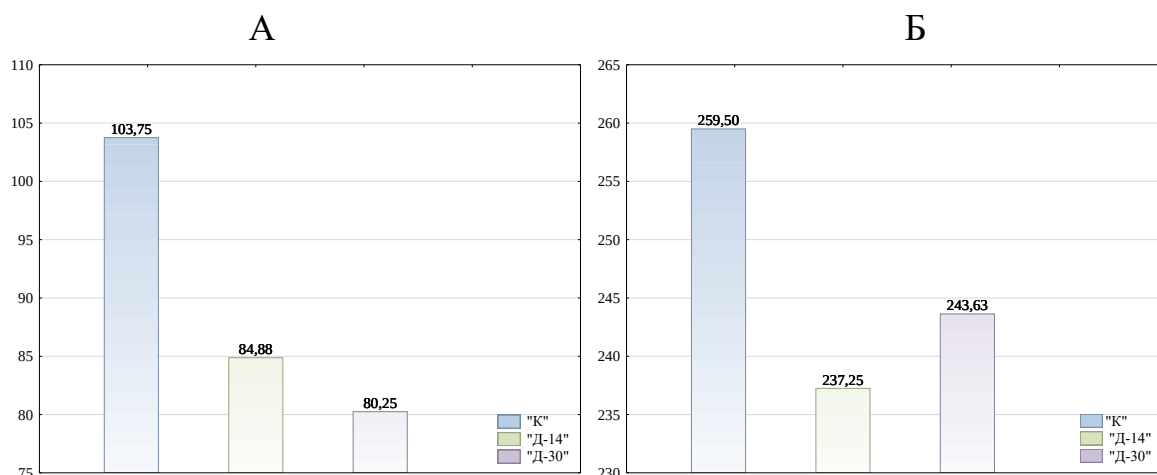


Рисунок 12. А - Толщина сперматогенного эпителия, Б - Диаметр ИСК в контрольной и опытных группах, мкм.

С помощью микроскопического метода удалось определить, что участки интерстиция между извитыми семенными канальцами располагались рыхло и неравномерно и в большинстве случаев имели многогранную форму. В семенниках опытных крыс отмечались отёчность и разрыв интерстициальной ткани (рис. 13).

Д-14

Д-30

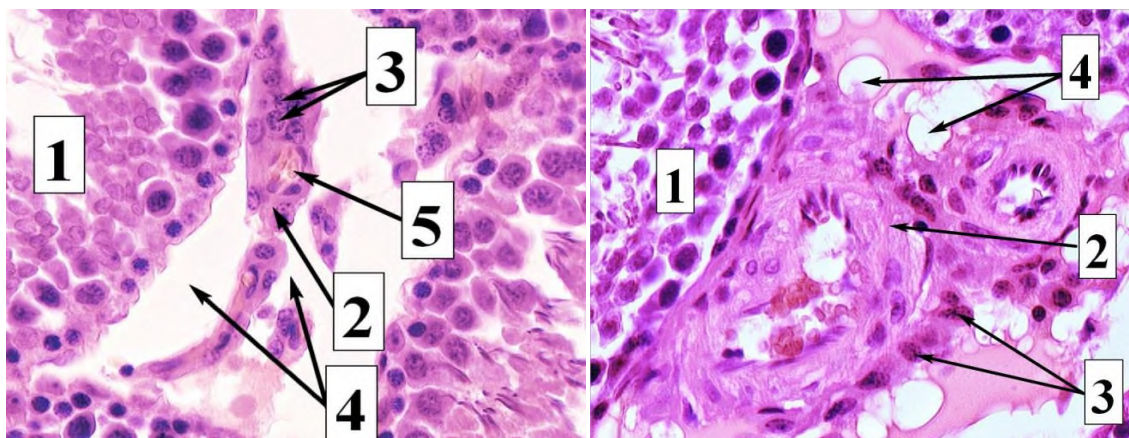


Рисунок 13. Интерстициальная ткань семенных извитых канальцев в опытных группах «Д-14» и «Д-30». Об.: 1 – извитой семенной каналец; 2 – интерстициальная ткань; 3 – клетки Лейдига, 4 – отек. Окраска гематоксилин-эозин. Ув.: x400.

Отмечалось уменьшение средней площади интерстиции семенника в экспериментальных группах «Д-14» ($3246,63 \pm 126,34^*$) и «Д-30» ($4117,25 \pm 396,54^*$) на 35,83% и 18,62% в отличие от контрольной группы «К-1» ($5059,88 \pm 218,52$) (табл. 2, рис. 14).

Таблица 2

Морфометрические показатели интерстициальной ткани семенных желез
самцов белых крыс

Показатели	Контроль	Д- 14	Д-30
Площадь интерстиции, мкм ²	5059,25±218,52	3246,63±126,34*	4117,25±396,54*

Примечание: *-статистически значимые отличия по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$).

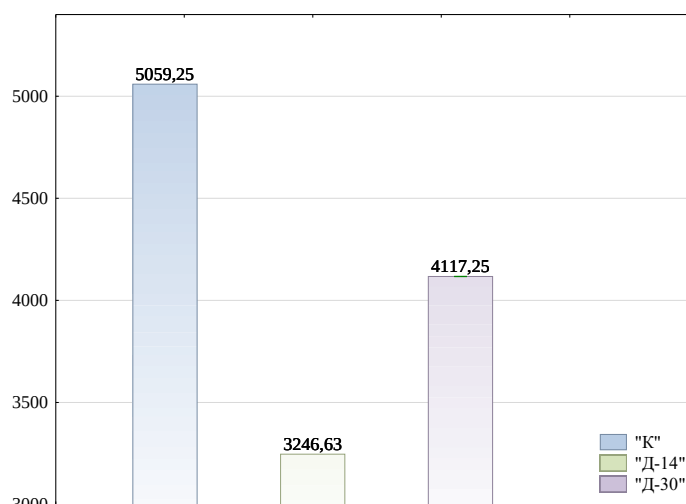


Рисунок 14. Площадь интерстициальной ткани, мкм².

Проведенное исследование позволило выявить общую картину распределения гранулоцитов в рыхлой интерстициальной ткани. Клетки Лейдига располагались одиночно, лишь изредка встречались небольшие группы по 3-4 клетки. Общее их количество в одном участке интерстиция достигало 7-9 шт. Большинство гранулоцитов представляли собой вытянутые клетки округлой формы (рис. 13).

Среднее количество КЛ в одном интерстициальном участке семенника в экспериментальных группах «Д-14» ($10,25 \pm 0,40^*$) и «Д-30» ($12,13 \pm 1,08^*$) на 47,11% и 37,41% гораздо становилось меньше, чем в контрольной группе «К-1» ($19,38 \pm 0,56$) (табл. 3, рис. 15) при этом плотность КЛ оставалась неизменной (табл. 5).

Таблица 3

Морфометрические показатели интерстициальных клеток Лейдига в норме и при воздействии НЧ TiO₂

Показатели	Контроль	Д-14	Д-30
Среднее количество КЛ в одном участке интерстициальной ткани	19,35±0,56	10,21±0,40*	12,13±1,08*

Примечание: *-статистически значимые отличия по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$).

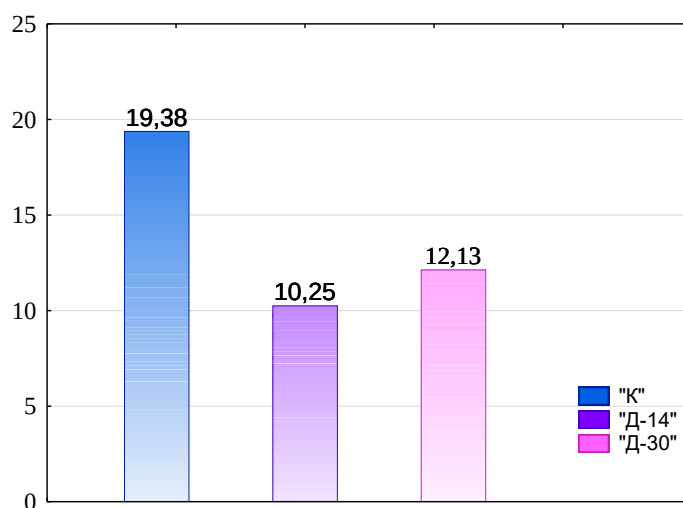


Рисунок 15. Среднее число клеток Лейдига в одном интерстициальном участке.

Таблица 5

Морфометрические показатели плотности КЛ при влиянии НЧ TiO₂

Показатели	Контроль	Д- 14	Д-30
Плотность КЛ в усл. ед. площади	0,01±0,00	0,00±0,00*	0,00±0,00*

Примечание: *-статистически значимые отличия по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$).

Было отмечено, что площадь КЛ в экспериментальных группах «Д-14» ($25,63 \pm 0,27$) и «Д-30» ($18,63 \pm 0,42^*$) на 20,85% и 42,46% уменьшалась в отличие от контрольной группы «К-1» ($32,38 \pm 0,26$) (табл. 6, рис. 16).

Таблица 6

Морфометрические показатели интерстициальной ткани семенных желез самцов белых крыс

Показатели	Контроль	Д- 14	Д-30
Площадь КЛ, мкм ²	32,38±0,26	25,63±0,27*	18,63±0,42*

Примечание: *-статистически значимые отличия по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$).

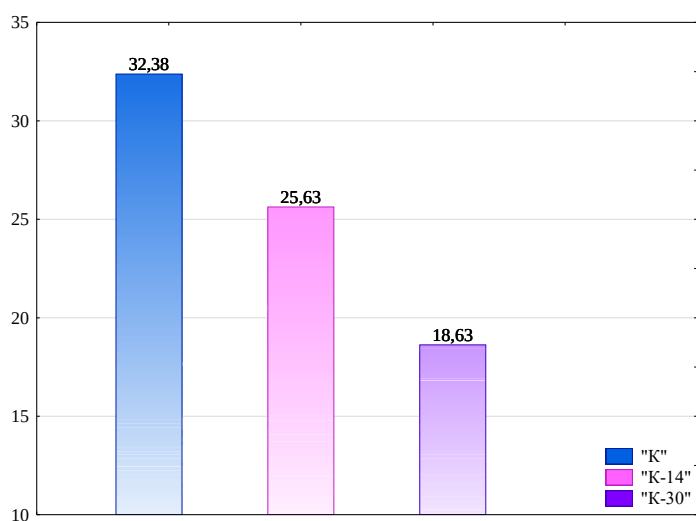


Рисунок 16. Площадь Клеток Лейдига в контрольной и опытных группах, мкм².

Полученные результаты могут быть обусловлены апоптозом клеток, что может приводить к снижению выработки тестостерона и андрогенсвязывающего белка, а также замедлением редукционного деления половых клеток, что соответствует данным литературы [4, 16, 31].

Морфометрический анализ интерстициальных эндокриноцитов показал, что среднее количество активных больших форм КЛ в экспериментальных группах «Д-14» ($23,38 \pm 5,16^*$) и «Д-30» ($3,00 \pm 7,94^*$) на 39,66% и 92,26% значительно меньше в сравнении с контрольной группой «К-1» ($38,75 \pm 8,23$). Среднее количество активных средних форм КЛ в экспериментальных группах «Д-14» ($58,25 \pm 2,77^*$) и «Д-30» ($54,38 \pm 3,51^*$) статистически уменьшалось на 18,11% и 23,55% соответственно в отличие от контрольной группы «К-1» ($71,13 \pm 6,62$). Среднее количество неактивных малых форм КЛ в экспериментальных группах «Д-14» ($18,63 \pm 3,56^*$) и «Д-30» ($26,00 \pm 4,10^*$) статистически увеличивались на 129,15% и 219,80% соответственно по сравнению с контрольной группой «К-1» ($8,13 \pm 2,61$) (табл. 7, рис. 17).

Таблица 7

Морфометрические показатели интерстициальных клеток Лейдига в норме
и при воздействии НЧ TiO₂

Показатели	Контроль	Д-14	Д-30
Среднее число активных больших КЛ	38,75±8,23	23,38±5,16*	3,00±7,94*
Среднее число активных средних КЛ	71,13±6,62	58,25±2,77*	54,38±3,51*
Среднее число неактивных маленьких КЛ	8,13±2,61	18,63±3,56*	26,00±4,10*

Примечание: *-статистически значимые отличия по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$).

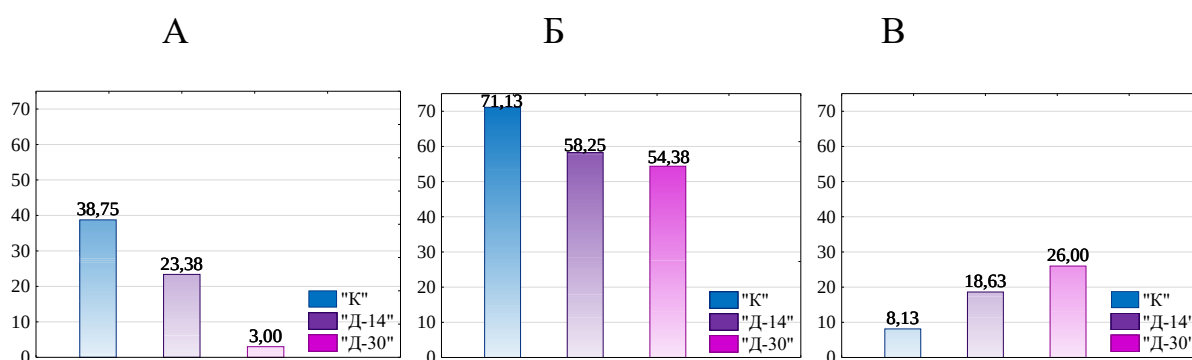


Рисунок 17. Среднее число А - активных больших форм клеток Лейдига, Б - активных средних форм клеток Лейдига, В - неактивных малых форм клеток Лейдига в контрольной и опытных группах.

Наблюдалось значительное уменьшение индекса активности КЛ в экспериментальных группах «Д-14» ($5,36 \pm 1,38^*$) и «Д-30» ($2,77 \pm 6,67^*$) на 84,23% и 91,85% по сравнению с контрольной группой «К-1» ($33,99 \pm 11,91$), что свидетельствует о преобладании молодых неактивных клеток над более зрелыми, а также задержке созревания мужских половых клеток. (табл. 8, рис. 18).

Таблица 8

Морфометрические показатели интерстициальных клеток Лейдига в норме
и при воздействии НЧ TiO₂

Показатели	Контроль	Д-14	Д-30
------------	----------	------	------

Индекс активности КЛ (у. е.)	33,99±11,91	5,36±1,38*	2,77±6,67*
------------------------------	-------------	------------	------------

Примечание: *-статистически значимые отличия по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$).

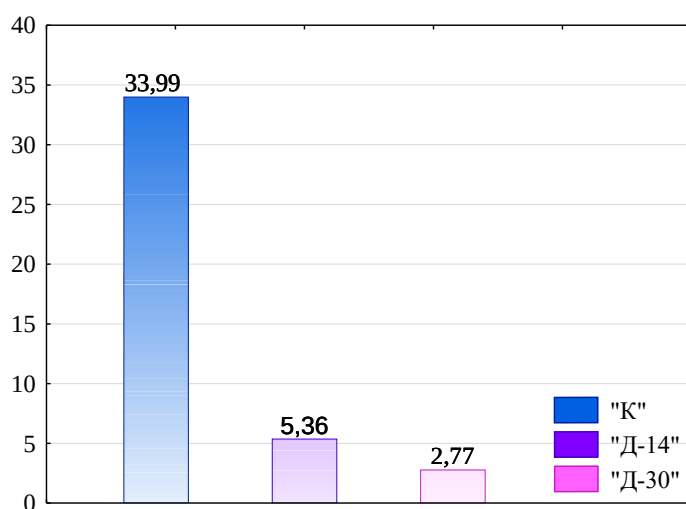
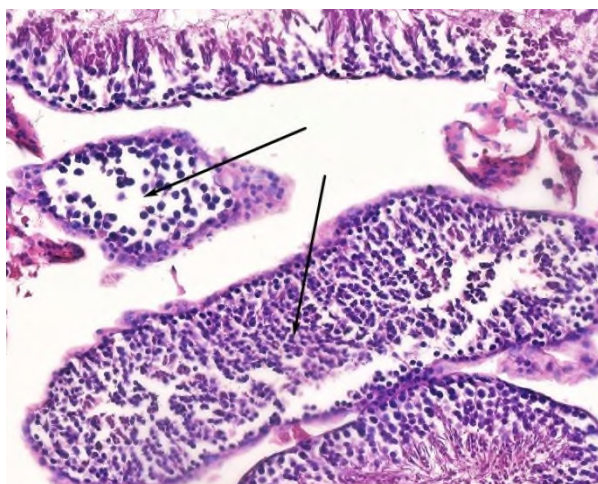


Рисунок 18. Индекс активности клеток Лейдига в контрольной и опытных группах.

При обзорной микроскопии ИСК было обнаружено, что генеративные клетки были расположены беспорядочно, а в просвете некоторых ИСК отсутствовали сперматозоиды (рис. 19). Это свидетельствует о том, что находящиеся в более поздней стадии развития генеративные клетки, а именно сперматозоиды, являются более чувствительными к НЧ TiO_2 .

«Д-14»



«Д-30»

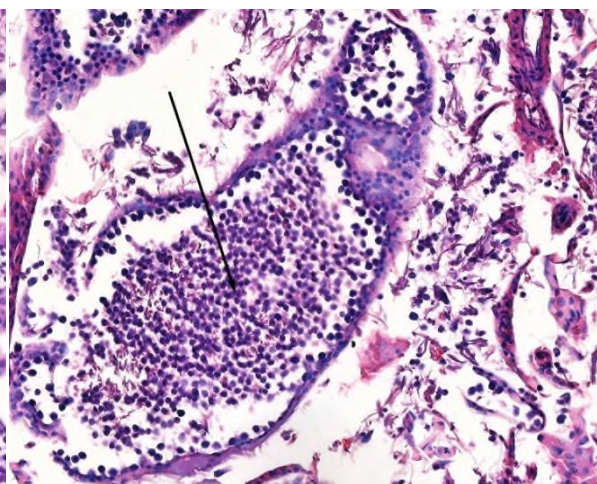


Рисунок 19. Эпителиосперматогенный слой в двух опытных группах «Д-14» и «Д-30».

Морфометрический анализ сперматогенеза показал уменьшение среднего количества семенников с 4 стадией развития половых клеток в экспериментальных группах «Д-14» ($93,63 \pm 0,98^*$) и «Д-30» ($85,38 \pm 0,37^*$) на 2,97% и 11,52% по сравнению с контрольной группой «К-1» ($96,50 \pm 0,49$) (табл. 9). Наблюдалось увеличение среднего количества семенников с 3 стадиями развития половых клеток в экспериментальных группах «Д-14» ($3,88 \pm 0,60^*$) и «Д-30» ($8,75 \pm 0,37^*$) на 55,20% и 250,00% в сравнении с контрольной группой «К-1» ($2,50 \pm 0,37$). Было выявлено увеличение среднего количества семенников с 2 стадиями развития половых клеток в экспериментальных группах «Д-14» ($1,88 \pm 0,45^*$) и «Д-30» ($3,5 \pm 0,24^*$) на 88,00% и 250,00% в сравнении с контрольной группой «К-1» ($1,00 \pm 0,42$) (рис. 20). Изменения в семенниках лабораторных крыс с 1 стадии развития половых клеток не наблюдалось. Полученные результаты показывают замедление или частичную блокировку дифференцировки сперматоцитов и сперматид в сперматозоиды, вызванным 14- и 30-дневным воздействием TiO_2 . Данные процессы могут указывать на нарушение генеративной и экскреторной активности семенников.

Таблица 9

Количественное изменение генеративной активности в извитом семенном канальце белых крыс в условиях воздействия НЧ TiO_2

Показатели	Контроль	Д- 14	Д-30
4 стадии развития половых клеток (у. е.)	$96,50 \pm 0,49$	$93,63 \pm 0,98^*$	$85,38 \pm 0,37^*$
3 стадии развития половых клеток (у. е.)	$2,50 \pm 0,37$	$3,88 \pm 0,60^*$	$8,75 \pm 0,37^*$
2 стадии развития половых клеток (у. е.)	$1,00 \pm 0,42$	$1,88 \pm 0,45^*$	$3,5 \pm 0,24^*$

1 стадии развития половых клеток (у. е.)	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
--	-----------	-----------	-----------

Примечание: *-статистически значимые отличия по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$).

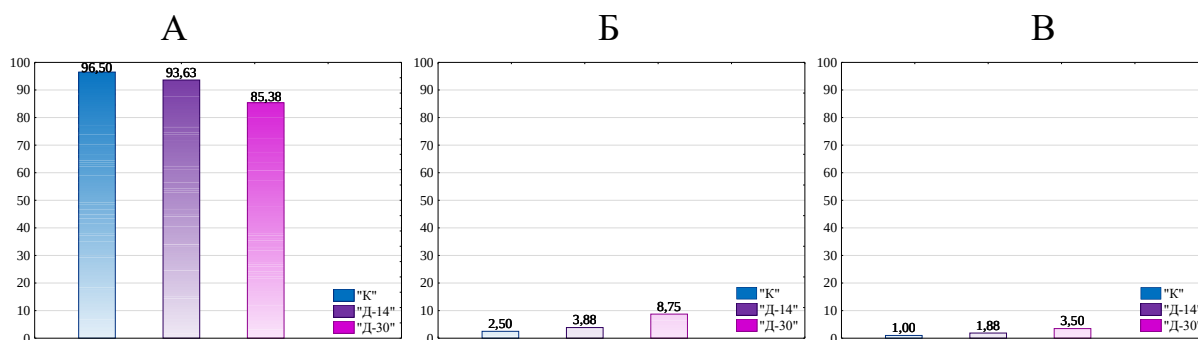


Рисунок 20. Среднее число ИСК лабораторных крыс с А - 4 стадиями, Б - 3 стадиями, В - 2 стадиями развития половых клеток в контрольной и опытных группах.

Показатели индекса сперматогенеза, отражающие интенсивность функционального процесса сперматогенеза в экспериментальных группах «Д-14» ($3,88 \pm 0,02^*$) и «Д-30» ($3,75 \pm 0,01^*$) на 3,00% и 6,25% уменьшается в сравнении с контрольной группой «К-1» ($4,00 \pm 0,01$) (табл. 10, рис. 21), следовательно данный процесс свидетельствует о неблагоприятном снижении функциональной активности семенных желез за счет увеличения числа ИСК с 3 и 2 генерациями и снижения числа ИСК с 4 генерациями половых клеток. Возможно данная закономерность обуславливается токсической интоксикацией НЧ TiO_2 вследствие окислительного стресса, приводящее к снижению численности генеративных клеток и их программируемую гибель, что соответствует данным литературы [19]. Выявленные морфологические изменения свидетельствуют о нарушении сперматогенеза и могут стать причиной нарушения функции мужской репродуктивной системы.

Таблица 10

Показатели	Контроль	Д- 14	Д-30
Индекс сперматогенеза	4,00±0,01	3,88±0,02*	3,75±0,01*

Примечание: *-статистически значимые отличия по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$).

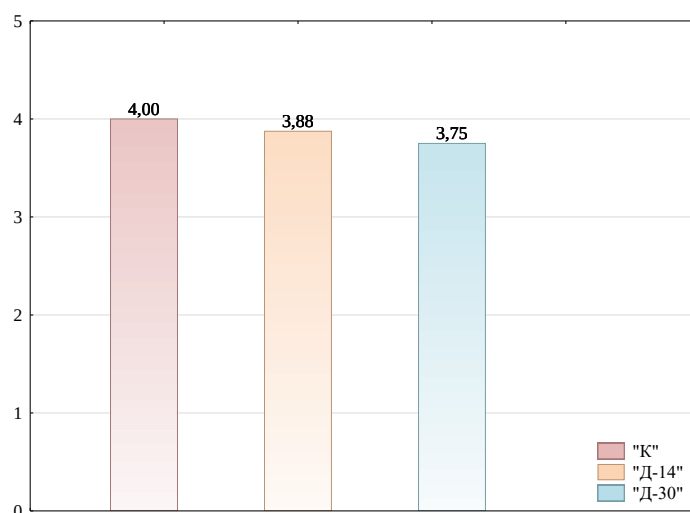


Рисунок 21. Индекс сперматогенеза в контрольной и опытных группах.

Уменьшение числа генераций половых клеток в извитых канальцах отрицательно сказывается на генеративной активности семенников и может привести к нарушению процесса сперматогенеза.

ВЫВОДЫ

Проведенное гистологическое исследование позволило установить, что воздействие TiO_2 рутильной формы в дозе 10 мкг/кг на семенники крыс в двух экспериментальных группах «Д-14» и «Д-30» в отличие от контрольной группы «К» приводила к отрицательным изменениям, а именно:

1. ИСК обладали неправильной вытянутой прямолинейной многогранной формой, располагались свободно и не прилегали плотно друг к другу. Наблюдалась суженность диаметра и толщины ИСК ввиду уменьшения в них ширины эпителиосперматогенного слоя.

2. Отмечалась обедненность и дегенерация интерстициальной соединительной ткани. КЛ были в основном отростчатой формы и располагались чаще всего поодиночке. Индекс активности КЛ статистически уменьшался, на фоне уменьшения количества гормонально активных КЛ среднего и большого размера, продуцирующих тестостерон, необходимый для регуляции нормального сперматогенеза, а также на фоне увеличения количества инволюционирующих, гормонально неактивных в отношении стероидогенеза КЛ.

3. Сперматогенные клетки были представлены в основном сперматогониями, сперматоцитами 1 и 2 порядка и сперматотидами, расположенные в ИСК беспорядочно. Данный феномен может свидетельствовать о нарушении генеративной и экскреторной активности семенников. Были обнаружены ИСК, в просвете которых отсутствовали сперматозоиды. Индекс половой генерации ИСК уменьшался за счет снижения числа ИСК с 4 генерациями половых клеток и увеличения числа ИСК с 2 и 3 генерациями. Выявленные морфологические изменения свидетельствуют о нарушении сперматогенеза и могут стать причиной нарушения функции мужской репродуктивной системы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Асанова, А.А. Эколого-биохимическая оценка токсичности окружающей среды, загрязненной наноматериалами : диссертация... к.б.н.: 03.02.08 / Асанова А.А. Место защиты: Владимирский государственный университет имени Александра Григорьевича и Николая Григорьевича Столетовых. - Владимир, 2019. - 158 с. : ил.
2. Афанасьев, Ю. И. Гистология, эмбриология, цитология : учебник / Ю. И. Афанасьев, Б. В. Алешин, Н. П. Барсуков [и др.] ; под ред. Ю. И. Афанасьева, Н. А. Юриной. - 7-е изд., перераб. и доп. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2021. - 832 с. - ISBN 978-5-9704-6158-7.
3. Ахмадеев А. В., Калимуллина Л. Б., Федорова А. М. - гистология, эмбриология, цитология 2-е изд., испр. и доп. Учебное пособие для СПО - М.:Издательство Юрайт - 2021 - 138с. - ISBN: 978-5-534-13451-3
4. Беляева, Н.Н. Воздействие на печень, почку и семенник теплокровных животных наночастиц серебра и сульфата серебра / Н.Н. Беляева, Н.И. Николаева, М.В Вострикова // Modern Science. 2019. № 7-1. С.144-146.
5. Брюхин, Г. В. Влияние иммобилизационного стресса на морфофункциональное состояние клеток Лейдига у потомства самок крыс с экспериментальным сахарным диабетом 1-го типа / Г. В. Брюхин, С. Д. Антонов // Журнал анатомии и гистопатологии. 2019. Том 8, № 4. С. 15-21.
6. Верещагин, А.Л. Специфическая токсичность наночастиц (обзор) / А.Л. Верещагин, Е.А. Морозова // Южно-сибирский научный вестник. 2022. № 1 (41). С. 76-88.
7. Виноградов, С.Ю. Эмбриология / С.Ю. Виноградов, С.В. Диндяев. – Москва : Юрайт, 2022. – 348 с. – ISBN 978-5-534-13548-0.
8. Гудкова, С. Ал.. Дисс. канд.ф.-м.наук,– Долгопрудный, 2011. С. 137.
9. Данилов, Р. К. Гистология, эмбриология, цитология : учебник / Данилов Р. К. , Боровая Т. Г. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2020. - 528 с.

- Гистология, эмбриология, цитология Данилов Р.К., Боровая Т.Г. 2020 – Афанасьев
10. Лебедев, Г.С. Мужское бесплодие в Российской Федерации: статистические данные за 2000-2018 годы / Г.С. Лебедев, Н.А. Голубев, И.А. Шадеркин, В.А. Шадеркина, О.И. Аполихин, А.В. Сивков, В.А. Комарова // Экспериментальная и клиническая урология. 2019. – С. 4-12
 11. Ленченко, Е. М. Цитология, гистология и эмбриология : учебник для вузов / Е. М. Ленченко. — 2-е изд., испр. и доп. — Москва : Издательство Юрайт, 2023. — 347 с. — (Высшее образование). — ISBN 978-5-534-08185-5.
 12. Мешер, Э. Л. Гистология по Жункейре. Учебное пособие. Атлас / Э. Л. Мешер. – Москва : ГЭОТАР-Медиа. 2022. – 624 с. – ISBN 978-5-9704-6981-1.
 13. Мишинов Б. П., Порозова С. Е. Оптимизация условий получения пористой керамики гелевым литьем субмикронного порошка диоксида титана // Современные проблемы науки и образования. 2015. № 2-2. С. 164-169.
 14. Самусев, Р. П. Атлас по цитологии, гистологии и эмбриологии : учебное пособие / Р. П. Самусев, А. В. Смирнов ; под ред. Р. П. Самусева. - 3-е изд. - Москва : ГЭОТАР-Медиа : Мир и Образование, 2020. - 400 с. : ил. - doi: 10.33029/9704-5353-7-ACG-2020-1-400/ - ISBN 978-5-9704-5353-7.
 15. Скопичев, В. Г. Физиология репродуктивной системы млекопитающих. В 2-х частях. Часть 1. Учебник для ВУЗов / В.Г. Скопичев, И. О. Боголюбова – Москва : Юрайт, 2023. – 201 с.
 16. Солодова, Е.К. Морфологические изменения в семенниках крыс линии Вистар под влиянием неспецифического хронического стресса / Е.К.

- Солодова, К.А. Кидун, Т.С. Угольник // Проблемы здоровья и экологии. 2019. С. 70-74.
- 17.Студеникина, Т.М. Гистология, цитология и эмбриология : учеб. пособие / Т.М. Студеникина [и др.] ; под ред. Т.М. Студеникиной. — Минск : Новое знание ; М. : ИНФРА-М, 2018. — 574 с.
 - 18.Ульрих, Д. Атлас эмбриологии человека / Дрюс Ульрих. – Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2022. – 416 с. – ISBN 978-5-9704-6529-5.
 - 19.Шарафутдинова, Л.А. Структурно-функциональная характеристика сперматогенного эпителия крыс в условиях воздействия наночастиц диоксида титана/ Л.А.Шарафутдинова, А.М.Федорова, С.А.Башкатов, К.Н.Синельников, В.В.Валиуллин // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2018. Том 166, № 8. С. 241-245.
 - 20.Adamczewska, D. The Fate of Leydig Cells in Men with Spermatogenic Failure / D. Adamczewska, J. Słowikowska-Hilczer, R. Walczak-Jędrzejowska // Department of Andrology and Reproductive Endocrinology. 2022. Vol. 12, №4. P. 92-213.
 - 21.Anukiruthika T. Characterisation of Green Nanomaterials/ T. Anukiruthika, S. Priyanka, J.A.Moses, C. Anandharamakrishnan // Green Nanomaterials. 2020. Vol. 126. P. 43-79.
 - 22.Bai R.G. / R. G. Bai, R. Sabouni, G. Hussein / Green Nanotechnology—A Road Map to Safer Nanomaterials. In: Applications of nanotechnologies: Advances and key technologies. 2018. P.133-159.
 - 23.Bakare AA, Udoakang AJ, Anifowoshe AT, Fadoju OM, Ogunsuyi OI, Alabi OA, et al. Genotoxicity of titanium dioxide nanoparticles using the mouse bone marrow micronucleus and sperm morphology assays. Journal of Pollution Effects & Control. 2016; 04(02).
 - 24.Bettini, S.; Boutet-Robinet, E.; Cartier, C.; Coméra, C.; Gaultier, E.; Dupuy, J.; Naud, N.; Taché, S.; Grysan, P.; Reguer, S.; et al. Food-grade TiO₂ impairs intestinal and systemic immune homeostasis, initiates preneoplastic

- lesions and promotes aberrant crypt development in the rat colon. *Sci. Rep.* 2017. Vol.7. P. 1-13.
25. Bianchi, M.G.; Allegri, M.; Chiu, M.; Costa, A.L.; Blosi, M.; Ortelli, S.; Bussolati, O.; Bergamaschi, E. Lipopolysaccharide adsorbed to the bio-corona of TiO₂ nanoparticles powerfully activates selected pro-inflammatory transduction pathways. *Front. Immunol.* 2017. Vol. 8. P. 1-12
 26. Cao, X.; Han, Y.; Li, F.; Li, Z.; McClements, D.J.; He, L.; Decker, E.A.; Xing, B.; Xiao, H. Impact of protein-nanoparticle interactions on gastrointestinal fate of ingested nanoparticles: Not just simple protein corona effects. *NanoImpact.* 2019. Vol.13. P. 37-43.
 27. Carriere, M.; Arnal, M.-E.; Douki, T. TiO₂ genotoxicity: An update of the results published over the last six years. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagenesis.* 2020.
 28. Cosmetics and textiles: dangers and risks of nanotechnologies and nanomaterials / G.E. Krichevsky // *Nanotechnology, ecology, production.* 2010. Vol. 6, № 4. P. 102-107.
 29. Dehghani N, Noori A, Modaresi M. Investigating the effect of titanium dioxide nanoparticles on the growth and sexual maturation of male rats. *International Journal of Basic Sciences and Applied Research.* 2014. Vol. 36 №11. P.772-776.
 30. Dohle GR, Colpi GM, Hargreave TB, Papp GK, Jungwirth A, Weidner W. EAU guidelines on male infertility. *Eur Urol.* 2015. Vol. 48, №5, P.703-711.
 31. Du, Z. Melatonin attenuates detrimental effects of diabetes on the niche of mouse spermatogonial stem cells by maintaining Leydig cells / Z. Du, S. Xu, S. Hu, H. Yang, Z. Zhou, K. Sidhu, Y. Miao, Z. Liu, W. Shen, R. J. Reiter, J. Hua, S. Peng // *Cell Death and Disease.* 2018. Vol.15. P. 1-15.
 32. Dudefoi, W.; Terrisse, H.; Popa, A.F.; Gautron, E.; Humbert, B.; Ropers, M.-H. Evaluation of the content of TiO₂ nanoparticles in the coatings of chewing gums. *Food Addit. Contam. Part A* 2018. Vol. 35. P. 211–221.

33. Geiss, O.; Ponti, J.; Senaldi, C.; Bianchi, I.; Mehn, D.; Barrero, J.; Gilliland, D.; Matissek, R.; Anklam, E. Characterisation of food grade titania with respect to nanoparticle content in pristine additives and in their related food products. *Food Addit. Contam. Part A*. 2020. Vol. 37. P. 239–253.
34. Grissa, I.; Elghoul, J.; Ezzi, L.; Chakroun, S.; Kerkeni, E.; Hassine, M.; El Mir, L.; Mehdi, M.; Ben Cheikh, H.; Haouas, Z. Anemia and genotoxicity induced by sub-chronic intragastric treatment of rats with titanium dioxide nanoparticles. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen*. 2015. Vol. 794. P. 25–31.
35. Hafsa Siddiqui Modification of Physical and Chemical Properties of Titanium Dioxide (TiO₂) by Ion Implantation for Dye Sensitized Solar Cells, Hafsa Siddiqui. 2019. P. 1-13.
36. Heinrich, A.; DeFalco, T. Essential roles of interstitial cells in testicular development and function. *Andrology*. 2020. Vol. 8. P. 903-914.
37. Hong F, Si W, Zhao X, Wang L, Zhou Y, Chen M, et al. TiO₂ nanoparticle exposure decreases spermatogenesis via biochemical dysfunctions in the testis of male mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2015. Vol. 63, №31. P. 7084-7092.
38. Kim, J.; Doudrick, K. Emerging investigator series: Protein adsorption and transformation on catalytic and food-grade TiO₂ nanoparticles in the presence of dissolved organic carbon. *Environ. Sci. Nano*. 2019. Vol. 6. P. 1688-1703.
39. Kubota, H. Spermatogonial stem cells/H. Kubota, R. Brinster//Biology of reproduction. 2018. Vol. 01, №99. P. 52-74.
40. Liao, F.; Chen, L.; Liu, Y.; Zhao, D.; Peng, W.; Wang, W.; Feng, S. The size-dependent genotoxic potentials of titanium dioxide nanoparticles to endothelial cells. *Environ. Toxicol*. 2019. Vol. 34. P.1199-1207.
41. Mayer, C.; Ádám, M.; Walenta, L.; Schmid, N.; Heikela, H.; Schubert, K.; Flenkenthaler, F.; Dietrich, K.-G.; Gruschka, S.; Arnold, G.J.; et al. Insights

- into the role of androgen receptor in human testicular peritubular cells. *Andrology*. 2018. Vol. 6. P. 756–765.
- 42.Minhas, S., Bettocchi, C., Boeri, L. et al. European Association of Urology Guidelines on Male Sexual and Reproductive Health: 2021 Update on Male Infertility // *European Urology* 2021. Vol. 80 (5). P. 603-620
 - 43.Morgan, A M. Reproductive toxicity provoked by titanium dioxide nanoparticles and the ameliorative role of Tiron in adult male rats / A. M Morgan, M. A Ibrahim, P. A Noshay // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2017. Vol. 486, №2. P. 595-600.
 - 44.Mottola, F.; Iovine, C.; Santonastaso, M.; Romeo, M.L.; Pacifico, S.; Cobellis, L.; Rocco, L. NPs-TiO₂ and lincomycin coexposure induces DNA damage in cultured human amniotic cells. *Nanomaterials*. 2019. Vol. 9, P. 1-14.
 - 45.Mularoni, V., Esposito, V., Persio, S.D. et al. Age-related changes in human Leydig cell status // *Human Reproduction*. 2020.Vol. 35 (12). P. 2663–2676.
 - 46.Potter, S.J.; DeFalco, T. Role of the testis interstitial compartment in spermatogonial stem cell function. *Reproduction*. 2017. Vol. 154. P. 151-162.
 - 47.Ritesh K Shukla, et al. "TiO₂ nanoparticles induce oxidative DNA damage and apoptosis in human liver cells" // *Nanotoxicology*. 2013. Vol. 1. P. 48-60
 - 48.Santonastaso, M.; Mottola, F.; Colacurci, N.; Iovine, C.; Pacifico, S.; Cammarota, M.; Cesaroni, F.; Rocco, L. In vitro genotoxic effects of titanium dioxide nanoparticles (n-TiO₂) in human sperm cells. *Mol. Reprod. Dev.* 2019. Vol. 86. P. 1369-1377.
 - 49.Seyed-Talebi, S.M.; Kazeminezhad, I.; Motamedi, H. TiO₂ hollow spheres as a novel antibiotic carrier for the direct delivery of gentamicin. *Ceram. Int.* 2018. Vol. 44. P. 13457-13462.

50. Shi H., Magaye R., Castranova V., Zhao J. Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data // *Particle and Fibre Toxicology*. 2013. Vol. 10, №15. P. 1-33.
51. Smith, L.B.; Walker, W.H. The regulation of spermatogenesis by androgens. *Semin. Cell Dev. Biol.* 2014. Vol. 30. P. 2-13.
52. Song B, Zhou T, Yang W, Liu J, Shao L. Contribution of oxidative stress to TiO₂ nanoparticle-induced toxicity. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2016. Vol. 48. P. 130–40.
53. Sukhanova, A., et al. Dependence of Nanoparticle Toxicity on Their Physical and Chemical Properties // *Nanoscale Res Lett*. 2018. P. 1-21
54. Sukhanova, A., et al. Nanoparticles with a specific size and surface charge promote disruption of the secondary structure and amyloid-like fibrillation of human insulin under physiological conditions // *Frontiers in Chemistry*. 2019. Vol. 7. P. 1-13
55. Takeda K., Suzuki K., Ishihara A., Kubo-Irie M., Fujimoto R., Tabata M, Oshio S., Nihei Y., Ihara, T, Sugamata M. Nanoparticles Transferred From Pregnant Mice to Their Offspring can Damage the Genital and Cranial Nerve System // *Journal of Health Science*. 2009. Vol. 55(1). P. 95–102.
56. Talamini, L.; Gimondi, S.; Violatto, M.B.; Fiordaliso, F.; Pedica, F.; Tran, N.L.; Sitia, G.; Aureli, F.; Raggi, A.; Nelissen, I.; et al. Repeated administration of the food additive E171 to mice results in accumulation in intestine and liver and promotes an inflammatory status. *Nanotoxicology*. 2019. Vol. 13. P. 1087-1101.
57. Tinkle S. S., et al.” Skin as a route of exposure and sensitization in chronic beryllium disease ” *Environ. Health. Perspect.* 2003. Vol. 111. P. 1202-1208.
58. Tripathi, D.K. et al. “Nanomaterials in plants, algae, and microorganisms: concepts and controversies». 2018. Vol. 1. P.534.

59. Vamanu C.I., Cimpan M.R., Høl P.J. et al. Induction of cell death by TiO₂ nanoparticles: studies on a human monoblastoid cell line // *Toxicol. In Vitro*. 2008. Vol. 22, №7. P.1689-1696.
60. Vaucher, L., Funaro, M.G., Mehta, A. et al. Activation of GPER-1 Estradiol Receptor Downregulates Production of Testosterone in Isolated Rat Leydig Cells and Adult Human Testis // *PLoS ONE*. 2014. Vol.9 (4). P. 1-7
61. Wagner, V., D. Wechsler, Technologieanalyse, Zukunftige Technologien Consulting der VDI Technologiezent- rum GmbH, Dusseldorf, 2004. S. 194
62. Walker, W.H. Testosterone signaling and the regulation of spermatogenesis. *Spermatogenesis*. 2011. Vol. 1. P. 116-120.
63. Wang, R.-S.; Yeh, S.; Chen, L.-M.; Lin, H.-Y.; Zhang, C.; Ni, J.; Wu, C.-C.; di Sant'Agnes, P.A.; Demesy-Bentley, K.L.; Tzeng, C.-R.; et al. Androgen Receptor in Sertoli Cell Is Essential for Germ Cell Nursery and Junctional Complex Formation in Mouse Testes. *Endocrinology* 2006. Vol. 147. P. 5624-5633.
64. Webster, T. J., R. W. Siegel, R. Bizios, *Biomaterials*. 1999. Vol.20. P. 1221-1227.
65. Weir A, Westerhoff P, Fabricius L, Hristovski K, von Goetz N. Titanium dioxide nanoparticles in food and personal care products // *Environmental Science & Technology*. 2012. Vol. 46(4). P. 2242–2250.
66. Willems, A.; Roesl, C.; Mitchell, R.; Milne, L.; Jeffery, N.; Smith, S.; Verhoeven, G.; Brown, P.; Smith, L. Sertoli cell androgen receptor signalling in adulthood is essential for post-meiotic germ cell development. *Mol. Reprod. Dev*. 2015. Vol. 82. P. 626–627.
67. Ye, L, Hong, F, Ze, X, et al. Toxic effects of TiO₂ nanoparticles in primary cultured rat Sertoli cells are mediated via a dysregulated Ca²⁺ /PKC/p38 MAPK/NF-κB cascade // *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2017. Vol. 105 (5). P. 1374-1382

68. Yusoff, R.; Nguyen, L.T.H.; Chiew, P. et al. Comparative differences in the behavior of TiO_2 and SiO_2 food additives in food ingredient solutions // J. Nanopart. Res. 2018. P. 1-31.
69. Zanello, L.P. B. Zhao, H. Hu, R.C. Haddon, Bone cell proliferation on carbon nanotubes, Nano Lett. 2006. P. 348
70. Zhou, R.; Wu, J.; Liu, B.; Jiang, Y.; Chen, W.; Li, J.; He, Q.; He, Z. The roles and mechanisms of Leydig cells and myoid cells in regulating spermatogenesis. Cell Mol. Life Sci. 2019. Vol. 76. P. 2681-2695.
71. Zirkin, B.R. Leydig cells: formation, function, and regulation / B. R. Zirkin, V. Papadopoulos // Biology of Reproduction. Vol. 99, Issue 1, July 2018, P.101–111.
72. Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail (ANSES). Avis Relatif à Une Demande d'Avis Relatif à l'Exposition Alimentaire Aux Nanoparticules de Dioxyde de Titane; ANSES: Paris, France, 2017.
73. Agir pour l'Environnement. Rapport d'Enquête Sur la Présence de Dioxyde de Titane Dans les Dentifrices; Agir pour l'Environnement: Paris, France, 2019. Streit um Weißmacher -Plusminus -ARD [Das Erste. Available online: <https://www.daserste.de/information/wirtschaft-boerse/plusminus/sendung/hr/streit-um-titandioxid-100.html> (accessed on 19 January 2020)
74. Arrêté du 17 avril 2019 Portant Suspension de la Mise sur le Marché des Denrées Contenant l'Additif E 171 (dioxyde de titane- TiO_2). Available online: <https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000038410047&categorieLien=id> (accessed on 24 May 2020).
75. Диоксид титана R-216 (Китай) [Электронный ресурс] — Режим доступа: https://zavodform.ru/catalog/dioksid_titana/ToO2-r216_china/ (дата обращения: 28.04.2023).

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АГ – аппарат Гольджи

АЛТ – аланинаминотрансфераза

АСТ – аспартатаминотрансфераза

АФК – активные формы кислорода

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИСК – извитые семенные канальца

КЛ – клетки Лейдига

КС – клетки Сертоли

НЧ – наночастицы

ПК – половые клетки

РНК – рибонуклеиновая кислота

СПГ – сперматогонии

СЭ – сперматогенный эпителий

Т – тестостерон

ЭПС – эндоплазматическая сеть

ЭР – эстрогеновые рецепторы

ESR1 – рецептор эстрогена 1

ESR2 – рецептор эстрогена 2

TiO₂ – диоксид титана

ПРИЛОЖЕНИЕ

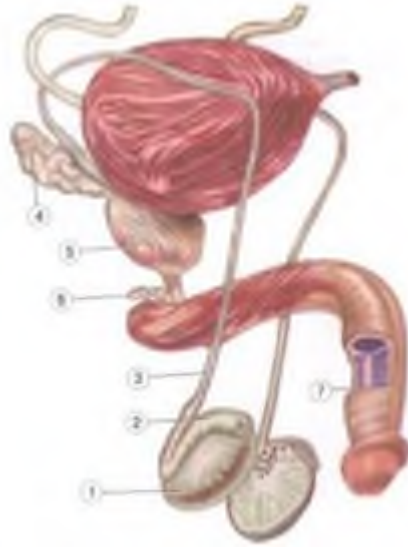


Рисунок 1. Мужская репродуктивная система: 1 – яички, 2 – придаток яичка, 3 – семявыносящий проток, 4 – семенные пузырьки, 5 – предстательная железа, 6 – бульбоуретральная железа, 7 – мужской половой член [17].

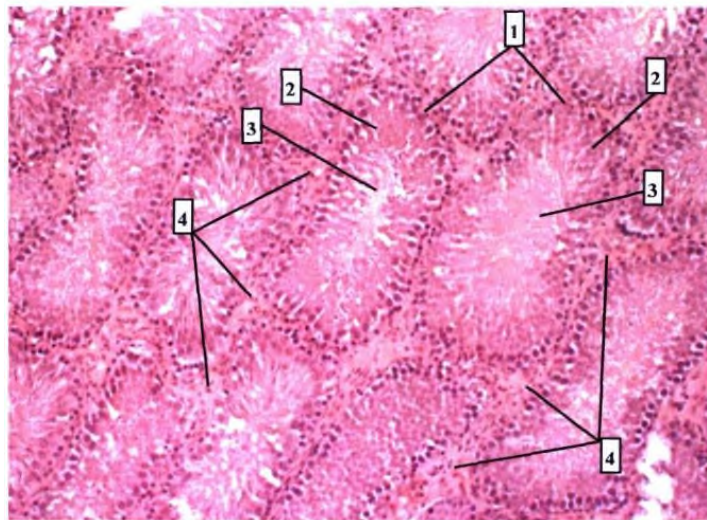


Рисунок 2. Поперечный срез семенников. Окраска гематоксилин-эозин. Об. 10 х ок. 10: 1 - извитой семенной каналец; 2 - сперматогенный эпителий; 3 - просвет канальца; 4 - интерстициальная ткань [2].

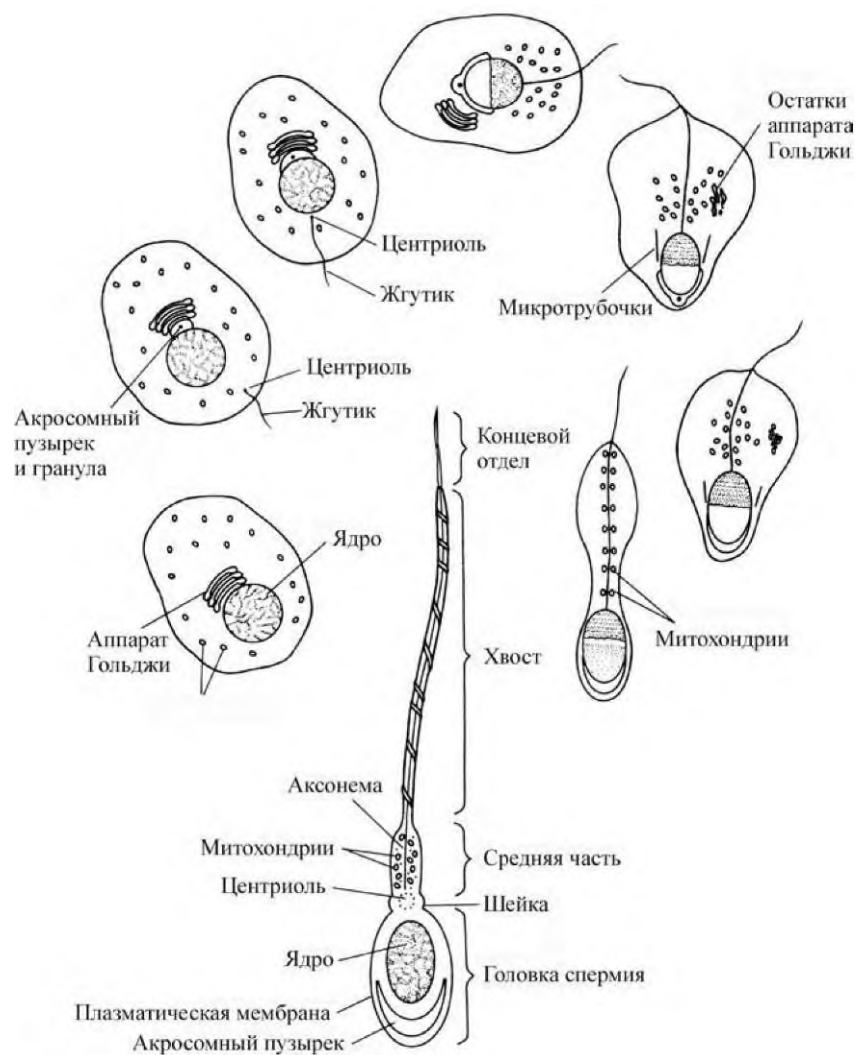


Рисунок 3. Формирование сперматозоида и его строение (по Гилберту, 1993)

Размер зрелого спермия увеличен по отношению к другим рисункам.

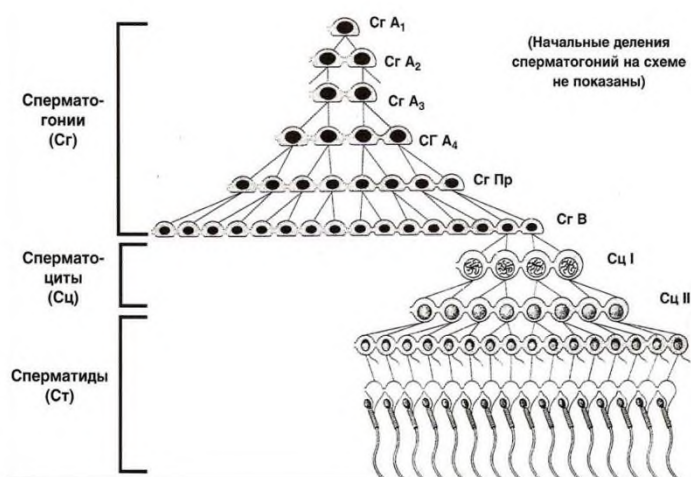


Рисунок 4. собственно сперматогенез по М. Dym D. Fawcett

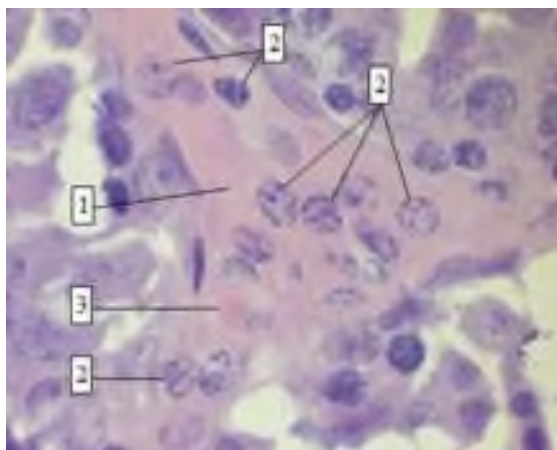


Рисунок 5. Интерстициальная ткань яичка: 1 – участок интерстиция, 2 – клетки Лейдига, 3 – кровеносный сосуд [9]



Рисунок 6. Порошок диоксида титана, применяемый в пищевой промышленности [75].

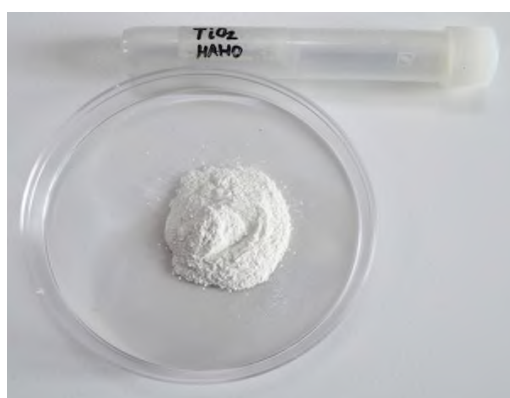


Рисунок 7. Нанодисперсный диоксид титана

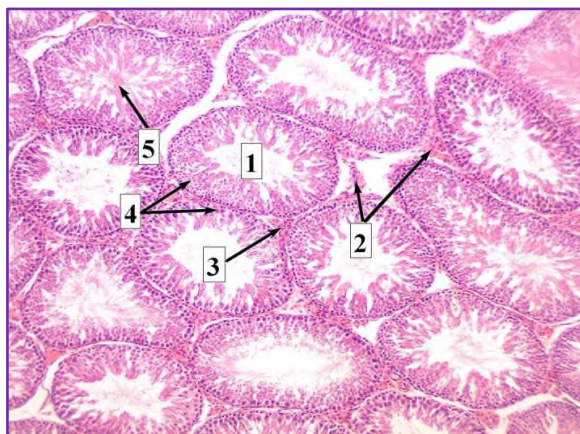


Рисунок 8. Поперечный срез семенных желез в контрольной группе «К». Об.: 1 – извитой семенной каналец; 2 – интерстициальная ткань; 3 – клетки Лейдига, 4 – сперматогенный эпителий, 5 – просвет канальца. Окраска гематоксилин-эозин. Ув.: x100.

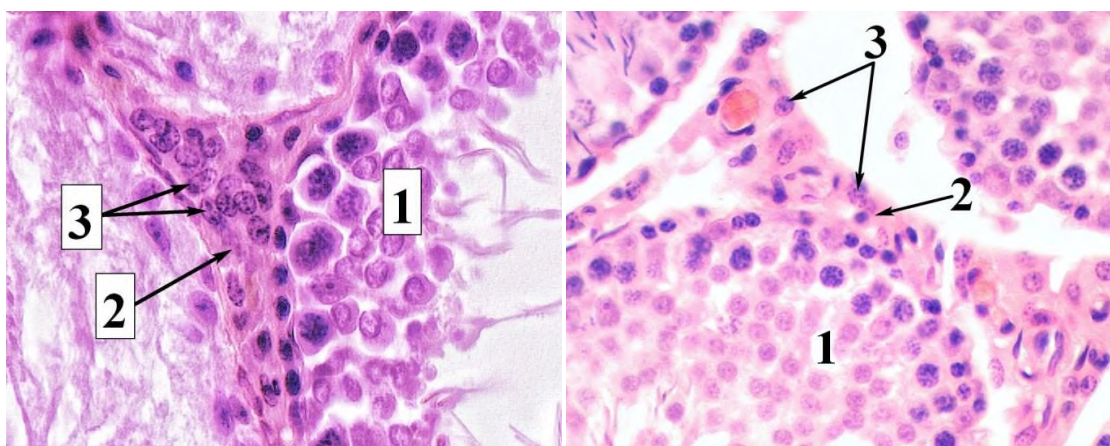


Рисунок 9. Интерстициальная ткань семенных извитых канальцев в контрольной группе «К». Об.: 1 – извитой семенной каналец; 2 – интерстициальная ткань; 3 – клетки Лейдига. Окраска гематоксилин-эозин. Ув.: x400.

Д-14



Д-30

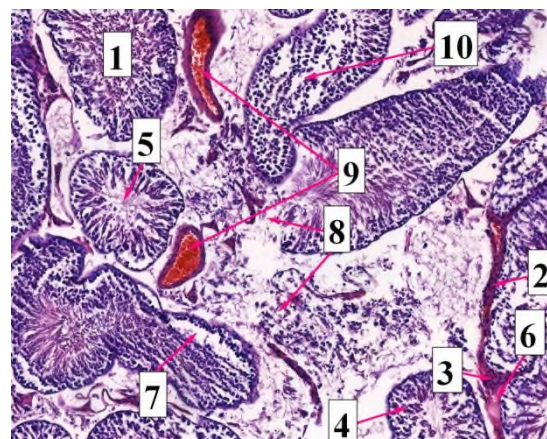


Рисунок 10. Поперечный срез семенных желез в опытных группах «Д-14» и «Д-30». Об.: 1 – извитой семенной каналец; 2 – интерстициальная ткань; 3 – клетки Лейдига, 4 – сперматогенный эпителий, 5 – просвет канальца, 6 – отек интерстициальной ткани, 7 – отслоение сперматогенного эпителия, 8 – деформация ИСК и выход сперматогенных клеток в интерстициальное пространство, 9 – стаз эритроцитов в капиллярах - «Д-14» и венах - «Д-30», 10 – отсутствие сперматозоидов. Окраска гематоксилин-эозин. Ув.: x100.

Д-14

Д-30

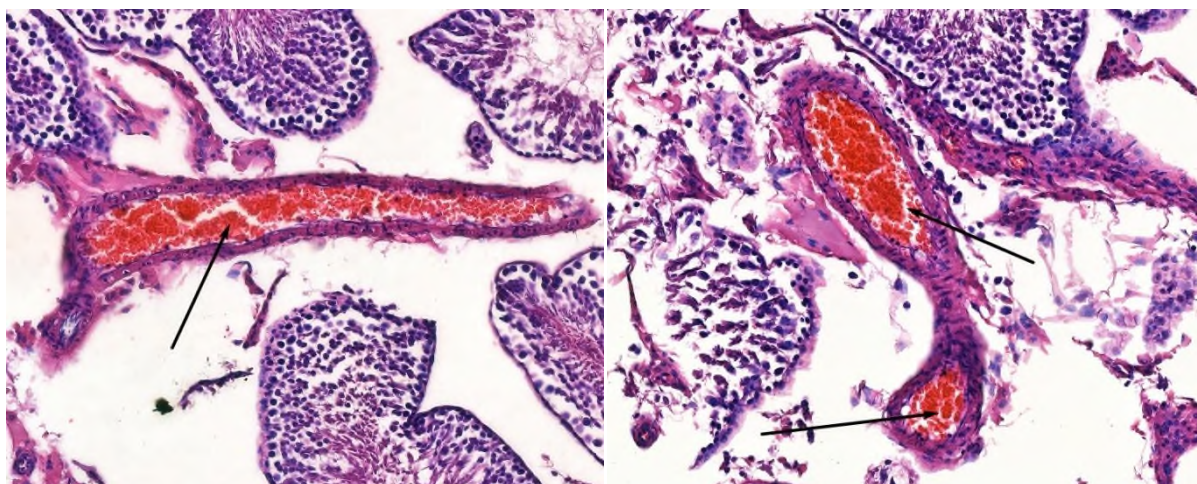


Рисунок 11. Венозное полнокровие, стаз эритроцитов в опытных группах «Д-14» и «Д-30». Окраска гематоксилин-эозин. Ув.: x200.

Таблица 1

Макроскопические показатели семенных желез самцов белых крыс

Показатели	контроль	14 дней	30 дней
Толщина СЭ, мкм	103,75±2,14	84,88±1,40*	80,25±1,50*
Диаметр ИСК, мкм	259,5±4,37	237,25±2,69*	243,63±1,90*

Примечание: *-статистически значимые отличия по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$).

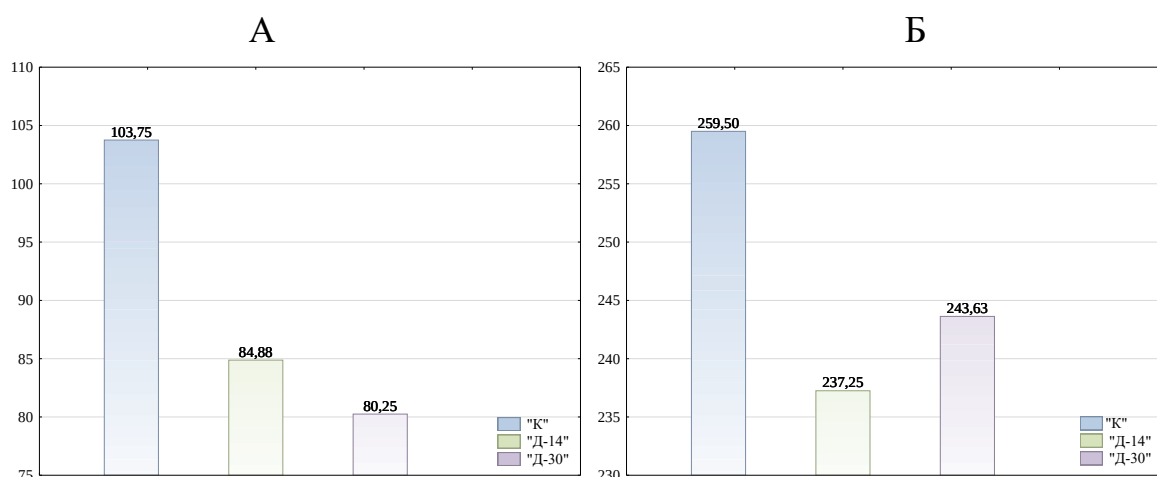


Рисунок 12. А - Толщина сперматогенного эпителия, Б - Диаметр ИСК в контрольной и опытных группах, мкм.

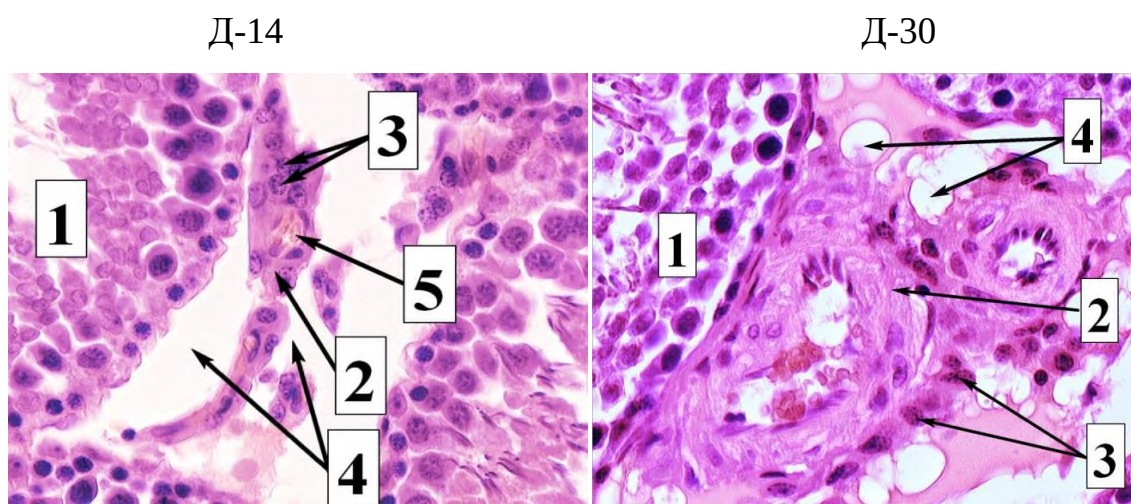


Рисунок 13. Интерстициальная ткань семенных извитых канальцев в опытных группах «Д-14» и «Д-30». Об.: 1 – извитой семенной каналец; 2 – интерстициальная ткань; 3 – клетки Лейдига, 4 – отек. Окраска гематоксилин-эозин. Ув.: x400.

Таблица 2

Морфометрические показатели интерстициальной ткани семенных желез самцов белых крыс

Показатели	Контроль	Д- 14	Д-30
Площадь интерстиции, мкм ²	5059,25±218,52	3246,63±126,34*	4117,25±396,54*

Примечание: *-статистически значимые отличия по сравнению с контрольной группой ($p<0,05$).

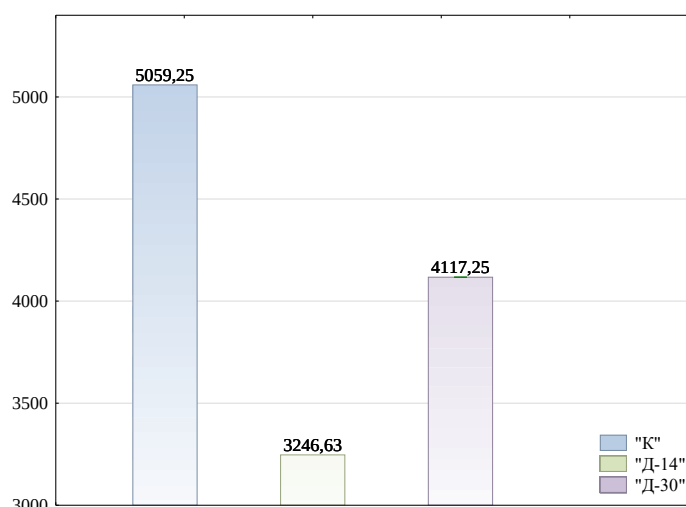


Рисунок 14. Площадь интерстициальной ткани, мкм².

Таблица 3

Морфометрические показатели интерстициальных клеток Лейдига в норме и при воздействии НЧ TiO₂

Показатели	Контроль	Д-14	Д-30
Среднее количество КЛ в одном участке интерстициальной ткани	19,35±0,56	10,21±0,40*	12,13±1,08*

Примечание: *-статистически значимые отличия по сравнению с контрольной группой ($p<0,05$).

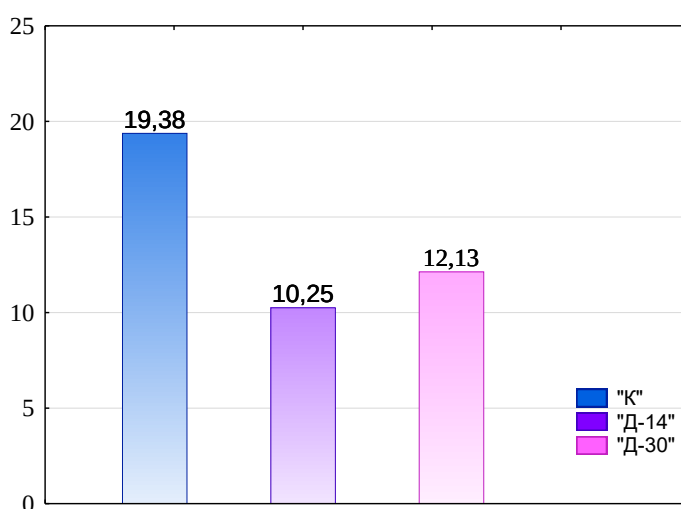


Рисунок 15. Среднее число клеток Лейдига в одном интерстициальном участке.

Таблица 5

Морфометрические показатели плотности КЛ при влиянии НЧ TiO₂

Показатели	Контроль	Д- 14	Д-30
Плотность КЛ в усл. ед. площади	0,01±0,00	0,00±0,00*	0,00±0,00*

Примечание: *-статистически значимые отличия по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$).

Таблица 6

Морфометрические показатели интерстициальной ткани семенных желез
самцов белых крыс

Показатели	Контроль	Д- 14	Д-30
Площадь КЛ, мкм ²	32,38±0,26	25,63±0,27*	18,63±0,42*

Примечание: *-статистически значимые отличия по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$).

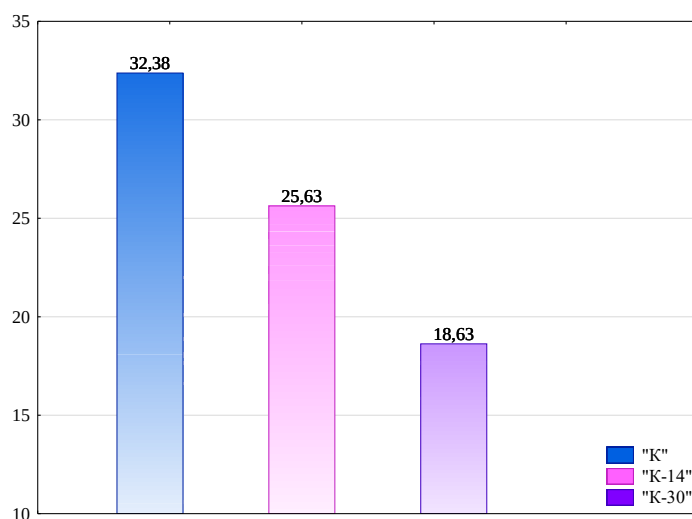


Рисунок 16. Площадь Клеток Лейдига в контрольной и опытных группах, мкм².

Таблица 7

Морфометрические показатели интерстициальных клеток Лейдига в норме
и при воздействии НЧ TiO₂

Показатели	Контроль	Д-14	Д-30
Среднее число активных больших КЛ	38,75±8,23	23,38±5,16*	3,00±7,94*
Среднее число активных средних КЛ	71,13±6,62	58,25±2,77*	54,38±3,51*
Среднее число неактивных маленьких КЛ	8,13±2,61	18,63±3,56*	26,00±4,10*

Примечание: *-статистически значимые отличия по сравнению с контрольной группой ($p<0,05$).

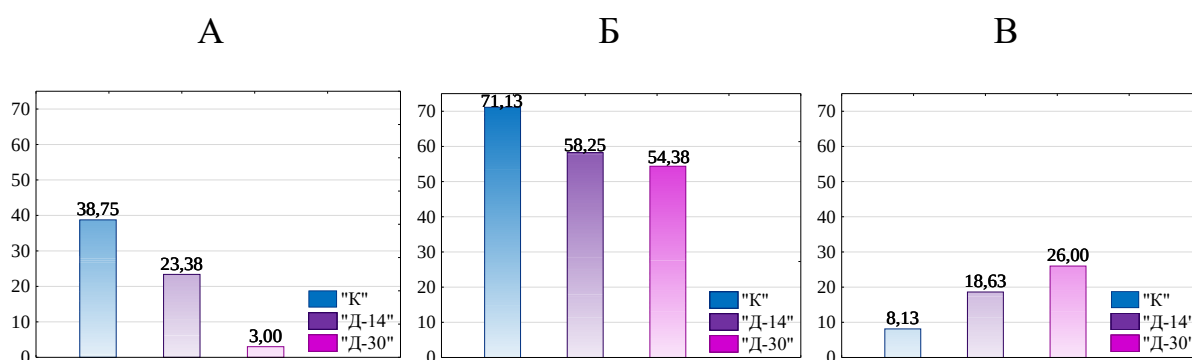


Рисунок 17. Среднее число А - активных больших форм клеток Лейдига, Б - активных средних форм клеток Лейдига, В - неактивных малых форм клеток Лейдига в контрольной и опытных группах.

Таблица 8

Морфометрические показатели интерстициальных клеток Лейдига в норме
и при воздействии НЧ TiO₂

Показатели	Контроль	Д-14	Д-30
Индекс активности КЛ (у. е.)	33,99±11,91	5,36±1,38*	2,77±6,67*

Примечание: *-статистически значимые отличия по сравнению с контрольной группой ($p<0,05$).

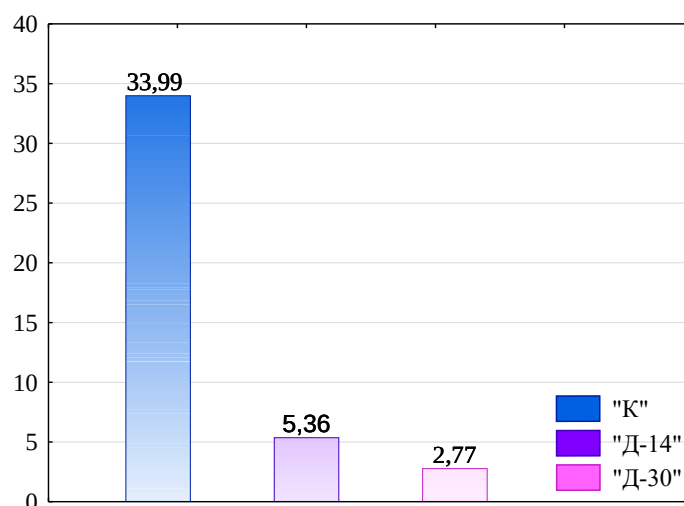


Рисунок 18. Индекс активности клеток Лейдига в контрольной и опытных группах.

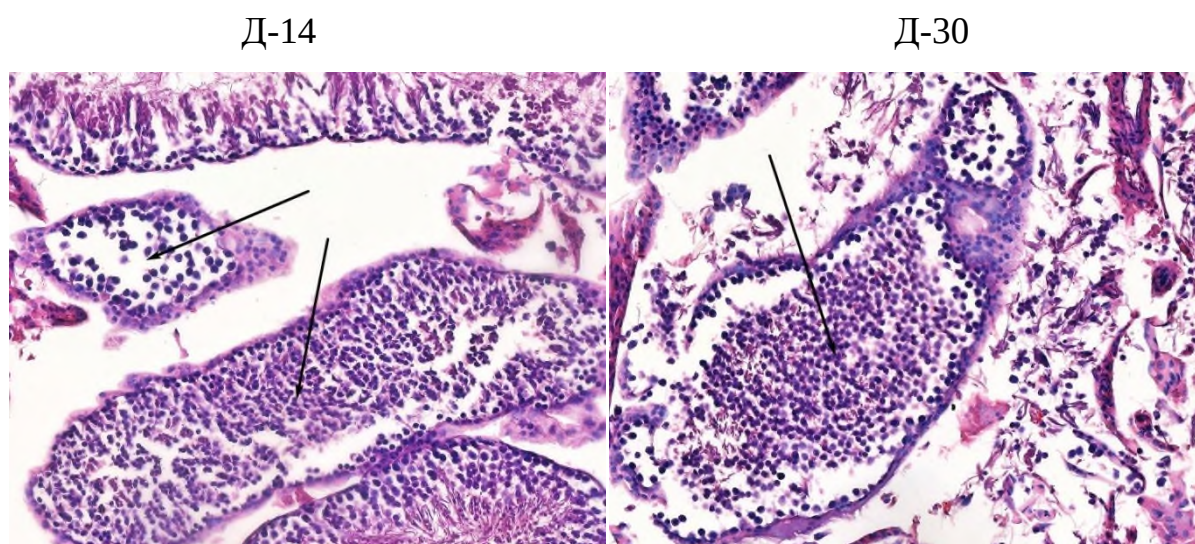


Рисунок 19. Эпителиосперматогенный слой в двух опытных группах «Д-14» и «Д-30».

Таблица 9

Количественное изменение генеративной активности в извитом семенном канальце белых крыс в условиях воздействия НЧ TiO_2

Показатели	Контроль	Д- 14	Д-30
4 стадии развития половых клеток (у. е.)	96,50±0,49	93,63±0,98*	85,38±0,37*
3 стадии развития половых клеток (у. е.)	2,50±0,37	3,88±0,60*	8,75±0,37*

2 стадии развития половых клеток (у. е.)	1,00±0,42	1,88±0,45*	3,5±0,24*
1 стадии развития половых клеток (у. е.)	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00

Примечание: *-статистически значимые отличия по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$).

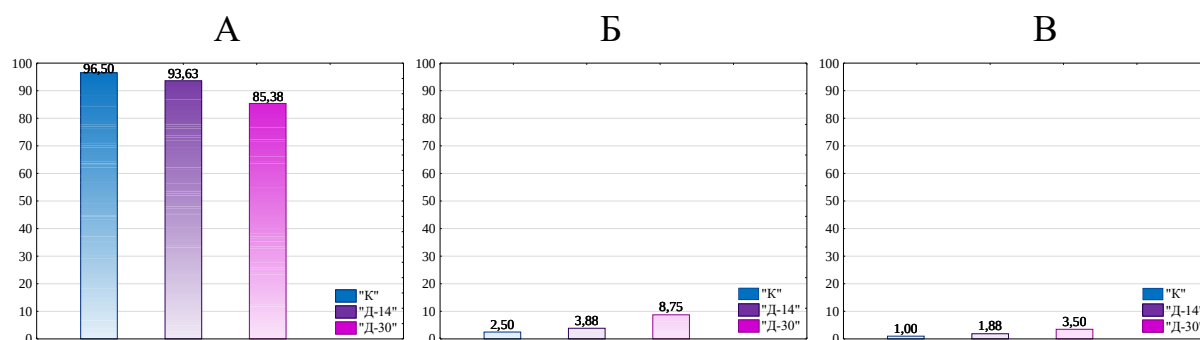


Рисунок 20. Среднее число ИСК лабораторных крыс с А - 4 стадиями, Б - 3 стадиями, В - 2 стадиями развития половых клеток в контрольной и опытных группах.

Таблица 10

Показатели	Контроль	Д- 14	Д-30
Индекс сперматогенеза	4,00±0,01	3,88±0,02*	3,75±0,01*

Примечание: *-статистически значимые отличия по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$).

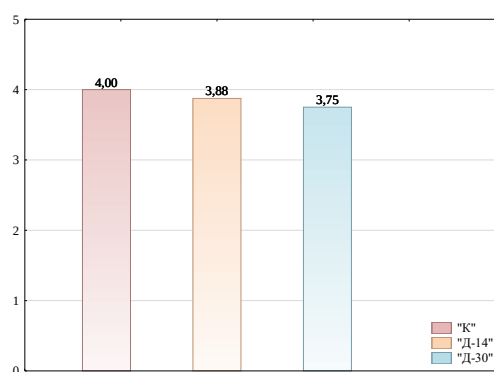


Рисунок 21. Индекс сперматогенеза в контрольной и опытных группах.

Отчет о проверке на заимствования №1



Автор: Акрамова Элина Ринатовна
Проверяющий: Кобзева Наталья Рудольфовна
Организация: Башкирский государственный медицинский университет
Отчет предоставлен сервисом «Антиплагиат» - <http://bashgpmu.antiplagiat.ru>

ИНФОРМАЦИЯ О ДОКУМЕНТЕ

№ документа: 11679
Начало загрузки: 24.06.2023 14:55:13
Длительность загрузки: 00:00:08
Имя исходного файла: 2) Акрамова_ВКР на АП - копии.docx
Название документа: МОРОФ-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ СЕМЕННИКОВ КРЫС НА ФОНЕ ПЕРОРАЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ НАДОДИПЕРСНОГО ДИОКСИДА ТИТАНА РУТИЛЬНОЙ МОДИФИКАЦИИ
Размер текста: 65 кБ
Тип документа: Выпускная квалификационная работа
Символов в тексте: 66299
Слов в тексте: 7484
Число предложений: 678

ИНФОРМАЦИЯ ОБ ОТЧЕТЕ

Начало проверки: 24.06.2023 14:55:21
Длительность проверки: 00:01:38
Корректировка от 24.06.2023 14:58:46
Комментарии: [Автосохраненная версия]
Поиск с учетом редактирования: да
Проверенные разделы: титульный лист с. 1, содержание с. 2-3, основная часть с. 4-44, библиография с. 45-50
Модули поиска: ИПС Адилет, Модуль поиска "БГМУ", Библиография, Сводная коллекция ЭБС, Интернет Плюс*, Сводная коллекция РГБ, Цитирование, Переводные заимствования (RuEn), Переводные заимствования по eLIBRARY.RU (EnRu), Переводные заимствования по Интернету (EnRu), Переводные заимствования издательства Wiley, eLIBRARY.RU, СПС ГАРАНТ: аналитика, СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация, Медицина, Диссертации НББ, Коллекция НБУ, Перефразирование по eLIBRARY.RU, Перефразирование по СПС ГАРАНТ: аналитика*, Перефразирование по Интернету, Перефразирование по Интернету (EN), Перефразирование по коллекции издательства Wiley, Патенты СССР, РФ, СНГ, СМИ России и СНГ, Шаблонные фразы, Кольцо вузов, Издательство Wiley, Переводные заимствования



СОВПАДЕНИЯ	САМОЦИТИРОВАНИЯ	ЦИТИРОВАНИЯ	ОРИГИНАЛЬНОСТЬ
21.57%	0%	1.12%	77.31%

Совпадения — фрагменты проверяемого текста, полностью или частично сходные с найденными источниками, за исключением фрагментов, которые система отнесла к цитированию или самоцитированию. Показатель «Совпадения» — это доля фрагментов проверяемого текста, отнесенных к совпадениям, в общем объеме текста.

Самоцитирования — фрагменты проверяемого текста, совпадающие или почти совпадающие с фрагментом текста источника, автором или соавтором которого является автор проверяемого документа. Показатель «Самоцитирования» — это доля фрагментов текста, отнесенных к самоцитированию, в общем объеме текста.

Цитирования — фрагменты проверяемого текста, которые не являются авторскими, но которые система отнесла к корректно оформленным. К цитированиям относятся также шаблонные фразы, библиография, фрагменты текста, найденные модулем поиска «СПС Гарант: нормативно-правовая документация». Показатель «Цитирования» — это доля фрагментов проверяемого текста, отнесенных к цитированию, в общем объеме текста.

Текстовое пересечение — фрагмент текста проверяемого документа, совпадающий или почти совпадающий с фрагментом текста источника.

Источник — документ, проиндексированный в системе и содержащийся в модуле поиска, по которому проводится проверка.

Оригинальный текст — фрагменты проверяемого текста, не обнаруженные ни в одном источнике и не отмеченные ни одним из модулей поиска. Показатель «Оригинальность» — это доля фрагментов проверяемого текста, отнесенных к оригинальному тексту, в общем объеме текста.

«Совпадения», «Цитирования», «Самоцитирования», «Оригинальность» являются отдельными показателями, отображаются в процентах и в сумме дают 100%, что соответствует полному тексту проверяемого документа.

Обращаем Ваше внимание, что система находит текстовые совпадения проверяемого документа с проиндексированными в системе источниками. При этом система является вспомогательным инструментом, определение корректности и правомерности совпадений или цитирований, а также авторства текстовых фрагментов проверяемого документа остается в компетенции проверяющего.

№	Доля в тексте	Доля в отчете	Источник	Актуален на	Модуль поиска	Блоков в отчете	Блоков в тексте	Комментарии
[01]	12.19%	0%	не указано	29 Сен 2022	Библиография	0	1	
[02]	8.68%	0%	http://s-sibsb.ru/images/articles/2022/1... http://s-sibsb.ru	06 Дек 2022	Интернет Плюс*	0	28	
[03]	8.4%	0%	http://s-sibsb.ru/images/articles/2022/1... http://s-sibsb.ru	18 Мая 2023	Интернет Плюс*	0	20	
[04]	7.92%	6.43%	СПЕЦИФИЧЕСКАЯ ТОКСИЧНОСТЬ НА... https://elibrary.ru	17 Июл 2022	eLIBRARY.RU	8	12	
[05]	4.27%	0%	https://mdpi-res.com/d_attachment/na... https://mdpi-res.com	24 Июн 2023	Интернет Плюс*	0	24	
[06]	3.95%	2.75%	НАНОДИСПЕРСНЫЕ МАТЕРИАЛЫ НА ... http://elibrary.ru	29 Авг 2014	Перефразирование по eLIBRARY.RU	5	8	
[07]	3.84%	0%	НАНОДИСПЕРСНЫЕ МАТЕРИАЛЫ НА ... http://elibrary.ru	29 Авг 2014	eLIBRARY.RU	0	9	
[08]	3.78%	0.06%	Нанодисперсные материалы на осно... https://yandex.ru	07 Ноя 2018	Интернет Плюс*	1	15	
[09]	3.72%	0%	Нанодисперсные материалы на осно... https://cyberleninka.ru	16 Июн 2022	Интернет Плюс*	0	12	
[10]	3.72%	0%	Нанодисперсные материалы на осно... https://cyberleninka.ru	19 Апр 2023	Интернет Плюс*	0	12	
[11]	2.52%	0.92%	ОЦЕНКА ПОТЕНЦИАЛЬНОЙ БИОЛОГ... http://elibrary.ru	раньше 2011	Перефразирование по eLIBRARY.RU	2	4	

[12]	2,4%	0%	ОЦЕНКА ПОТЕНЦИАЛЬНОЙ БИОЛОГ... http://elibrary.ru	раньше 2011	eLIBRARY.RU	0	7
[13]	2,06%	1,15%	Дуденкова, Наталья Анатольевна Мо... http://dlib.rsl.ru	22 Апр 2019	Сводная коллекция РГБ	7	9
[14]	1,99%	0%	Исследование механизма воздействи... http://elibrary.ru	28 Апр 2017	eLIBRARY.RU	0	3
[15]	1,84%	0%	230614 http://biblioclub.ru	19 Апр 2016	Сводная коллекция ЭБС	0	5
[16]	1,84%	0%	221684 http://biblioclub.ru	19 Апр 2016	Сводная коллекция ЭБС	0	5
[17]	1,76%	0%	Safety assessment of titanium dioxide (... https://doi.org	31 Мая 2021	Издательство Wiley	0	6
[18]	1,75%	0%	Нанообъекты как новая биологическ... http://supornitsky.ru	23 Янв 2021	Интернет Плюс*	0	15
[19]	1,75%	0%	Нанообъекты как новая биологическ... http://supornitsky.ru	23 Янв 2021	Интернет Плюс*	0	15
[20]	1,7%	0,01%	Спецвыпуск Медико-биологические ... http://moluch.ru	01 Янв 2017	Перефразирования по Интернету	1	2
[21]	1,68%	0,23%	Исследование механизма воздействи... http://elibrary.ru	28 Апр 2017	Перефразирования по eLIBRARY.RU	1	2
[22]	1,68%	0%	Исследование механизма воздействи... http://moluch.ru	30 Янв 2017	Перефразирования по Интернету	0	2
[23]	1,68%	0%	Безопасность токсичности в с... https://ochemetecats.mfbest.ru	02 Июн 2021	Интернет Плюс*	0	7
[24]	1,63%	1,12%	не указано	29 Сен 2022	Шаблонные фразы	22	28
[25]	1,62%	0%	Диплом: Микроструктурная реорган... http://privetstudent.com	10 Июл 2018	Интернет Плюс*	0	7
[26]	1,62%	0%	Диплом: Микроструктурная реорган... https://privetstudent.com	28 Мая 2021	Интернет Плюс*	0	7
[27]	1,62%	0%	Диплом: Микроструктурная реорган... http://privetstudent.com	16 Мая 2019	Интернет Плюс*	0	7
[28]	1,46%	0,58%	Уланов, Владимир Сергеевич Морфо... http://dlib.rsl.ru	27 Дек 2019	Сводная коллекция РГБ	3	5
[29]	1,4%	0%	Навигация http://amede.org	18 Янв 2021	Интернет Плюс*	0	14
[30]	1,36%	1,36%	Краснодар http://medec.org	05 Янв 2017	Перефразирования по Интернету	1	1
[31]	1,34%	0%	Органы мужской половой системы. Я... https://meduniver.com	24 Июн 2023	Интернет Плюс*	0	6
[32]	1,33%	0%	Органы мужской половой системы. Я... https://meduniver.com	24 Июн 2023	Интернет Плюс*	0	2
[33]	1,33%	0%	Органы мужской половой системы. Я... https://meduniver.com	24 Июн 2023	Интернет Плюс*	0	2
[34]	1,32%	0,38%	Гормональная регуляция деятельнос... http://megalektsia.ru	09 Июл 2017	Интернет Плюс*	5	13
[35]	1,3%	0%	https://mdpi-res.com/d_attachment/na... https://mdpi-res.com	24 Июн 2023	Интернет Плюс*	0	9
[36]	1,26%	0,92%	ТОКСИЧНОСТЬ ИСКУССТВЕННЫХ НА... http://elibrary.ru	раньше 2011	Перефразирования по eLIBRARY.RU	3	3
[37]	1,25%	0,74%	Дуденкова, Наталья Анатольевна Мо... http://dlib.rsl.ru	13 Сен 2015	Сводная коллекция РГБ	4	6
[38]	1,24%	0,42%	ТОКСИЧНОСТЬ ИСКУССТВЕННЫХ НА... http://elibrary.ru	раньше 2011	eLIBRARY.RU	1	3
[39]	1,22%	0%	Прорыв в биоинженерии: найден спо... http://moskva.bezformata.com	23 Фев 2022	СМИ России и СНГ	0	2
[40]	1,21%	0%	КОВИД-19: вакцины, тесты, дезинфект... https://ext-5299091.livejournal.com	23 Фев 2022	Интернет Плюс*	0	5
[41]	1,16%	0%	Прорыв в биоинженерии: найден спо... https://ria.ru	23 Фев 2022	Интернет Плюс*	0	5
[42]	1,15%	0,74%	Glava_20_polovaya_sistema http://studfiles.ru	30 Янв 2017	Перефразирования по Интернету	1	2
[43]	1,14%	0%	Прорыв в биоинженерии: найден спо... http://nanonewsnet.ru	24 Июн 2023	Интернет Плюс*	0	5
[44]	1,13%	0,78%	Морфологическая характеристика се... https://nauchkor.ru	08 Ноя 2021	Интернет Плюс*	5	7
[45]	1,11%	0%	253933 http://biblioclub.ru	19 Апр 2016	Сводная коллекция ЭБС	0	2
[46]	1,11%	0%	59792 http://e-lanbook.com	раньше 2011	Сводная коллекция ЭБС	0	2
[47]	1,11%	0%	Safety assessment of titanium dioxide (... https://doi.org	31 Мая 2021	Перефразирования по коллекции издательства Wiley	0	4
[48]	1,08%	0%	Бозрова, Светлана Викторовна Иссле... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2019	Сводная коллекция РГБ	0	3
[49]	0,99%	0%	Гистология, эмбриология, цитология http://studentlibrary.ru	20 Янв 2020	Медицина	0	2
[50]	0,99%	0%	Гистология, эмбриология, цитология http://studentlibrary.ru	20 Янв 2020	Медицина	0	2
[51]	0,99%	0%	Гистология, эмбриология, цитология http://studentlibrary.ru	20 Дек 2016	Медицина	0	2
[52]	0,99%	0%	Гистология, эмбриология, цитология http://studentlibrary.ru	20 Дек 2016	Медицина	0	2
[53]	0,96%	0%	Гудкова, Светлана Александровна Исс... http://dlib.rsl.ru	14 Июн 2011	Сводная коллекция РГБ	0	2

[54]	0,95%	0%	МОЧЕВЫВОДЯЩИЕ ПУТИ. http://www.lects.ru	24 Июнь 2023	Интернет Плюс*	0	1	
[55]	0,88%	0%	Ю. И. Афанасьев, Н. А. Юрина, Б. В. Ал... http://dlib.rsl.ru	21 Фев 2019	Сводная коллекция РГБ	0	2	
[56]	0,82%	0,82%	ПУТИ ПОСТУПЛЕНИЯ НАНОЧАСТИЦ В... http://elibrary.ru	29 Авг 2014	Перефразирования по eLIBRARY.RU	1	1	
[57]	0,82%	0%	XVI Республиканская школа студенто... http://studentlibrary.ru	20 Янв 2020	Сводная коллекция ЭБС	0	2	
[58]	0,81%	0%	Вышел из печати очередной номер ж... http://nich.tsure.ru	05 Янв 2017	Перефразирования по Интернету	0	2	
[59]	0,8%	0%	Морфологические особенности стро... https://mash-express.ru	03 Июнь 2022	Интернет Плюс*	0	8	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[60]	0,77%	0%	Аннотация http://aspirantura.mpi.ru	08 Янв 2017	Перефразирования по Интернету	0	1	
[61]	0,75%	0%	Смешанной оболочкой http://q02.ru	23 Фев 2022	Перефразирования по Интернету	1	1	
[62]	0,75%	0%	Дисперсные и нанодисперсные мате... http://elibrary.ru	28 Авг 2014	eLIBRARY.RU	0	2	
[63]	0,75%	0%	ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ НАН... http://elibrary.ru	31 Авг 2010	eLIBRARY.RU	0	2	
[64]	0,73%	0,73%	ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ СРЕДЫ НА... http://elibrary.ru	13 Янв 2017	eLIBRARY.RU	2	2	
[65]	0,73%	0%	Навигация http://vmede.org	23 Мая 2022	Интернет Плюс*	0	1	
[66]	0,73%	0%	Навигация http://vmede.org	20 Сен 2022	Интернет Плюс*	0	1	
[67]	0,69%	0,69%	МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В... http://elibrary.ru	11 Фев 2019	Перефразирования по eLIBRARY.RU	2	2	
[68]	0,68%	0%	Международный опыт: болезни дыха... https://doi.org	23 Фев 2022	Интернет Плюс*	0	2	
[69]	0,67%	0%	Food-grade titanium dioxide (E171) by ... https://doi.org	30 Ноя 2019	Издательство Wiley	0	2	
[70]	0,66%	0%	Шарафутдинова, Люция Ахтямовна М... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2019	Сводная коллекция РГБ	0	2	
[71]	0,65%	0%	Тело: здравоохранение: профилактик... http://emil.ru	21 Дек 2016	Медицина	0	1	
[72]	0,64%	0%	Власов, Владислав Геннадьевич диссе... http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Сводная коллекция РГБ	0	2	
[73]	0,64%	0,64%	МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕ... http://elibrary.ru	14 Янв 2020	Перефразирования по eLIBRARY.RU	1	1	
[74]	0,63%	0%	Потапова, Мария Кирилловна Эффект... http://dlib.rsl.ru	08 Ноя 2022	Сводная коллекция РГБ	0	2	
[75]	0,62%	0%	104385 http://e.lanbook.com	раньше 2011	Сводная коллекция ЭБС	0	3	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[76]	0,62%	0,37%	Морфофункциональные особенност... http://dslib.net	05 Янв 2017	Перефразирования по Интернету	1	2	
[77]	0,59%	0%	ОСВЕТИТЕЛЬНЫЕ ПРИБОРЫ - ДЕЗИН... https://elibrary.ru	31 Дек 2022	eLIBRARY.RU	0	2	
[78]	0,58%	0%	Зерницкая, Екатерина Александровна... http://dlib.rsl.ru	05 Апр 2022	Сводная коллекция РГБ	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[79]	0,53%	0,16%	http://www.morfolforum.ru/_src/Dissove... http://morfolforum.ru	23 Дек 2021	Интернет Плюс*	1	2	
[80]	0,53%	0,53%	Оценка воздействия наночастиц диок... http://elibrary.ru	24 Янв 2020	Перефразирования по eLIBRARY.RU	1	1	
[81]	0,51%	0,14%	Диссертация на тему «Морфофункц... https://dissert.ru	23 Мая 2022	Интернет Плюс*	1	2	
[82]	0,49%	0%	Guidance on technical requirements for ... https://doi.org	31 Авг 2021	Издательство Wiley	0	1	
[83]	0,49%	0%	http://medtsu.tula.ru/VNMU/Bulletin/E... http://medtsu.tula.ru	17 Окт 2022	Интернет Плюс*	0	4	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[84]	0,46%	0%	http://emjournal.ru/article/2018/v3/1830... http://emjournal.ru	16 Янв 2023	Интернет Плюс*	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[85]	0,44%	0%	Publications - LNBE http://lnbe.mephi.ru	14 Окт 2019	Интернет Плюс*	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[86]	0,44%	0%	Публикации - LNBE http://lnbe.mephi.ru	07 Дек 2021	Интернет Плюс*	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[87]	0,44%	0%	Приказ Министерства просвещения Р... http://ivo.garant.ru	10 Июл 2022	СПС ГАРАНТ; нормативно-правовая документация	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[88]	0,44%	0%	Приказ Министерства науки и высше... http://ivo.garant.ru	26 Апр 2021	СПС ГАРАНТ; нормативно-правовая документация	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[89]	0,44%	0%	Приказ Министерства науки и высше... http://ivo.garant.ru	04 Мая 2022	СПС ГАРАНТ; нормативно-правовая документация	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[90]	0,43%	0%	Моделирование биопленки у бактер... http://emil.ru	08 Июл 2017	Медицина	0	1	

[91]	0,4%	0%	Formation and biological effects of prot... https://doi.org	31 Мар 2022	Издательство Wiley	0	1	
[92]	0,37%	0%	Re- evaluation of sodium aluminium sili... https://doi.org	раньше 2011	Перефразирования по коллекции издательства Wiley	0	1	
[93]	0,37%	0%	Развитие фетальных вычек при неосл... http://elibrary.ru	11 Мар 2018	Перефразирования по elIBRARY.RU	0	1	
[94]	0,36%	0%	Critical review of the safety assessment ... https://nanobiotechnology.biomedcentr	02 Apr 2020	Интернет Плюс*	0	5	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[95]	0,36%	0%	Re- evaluation of sodium aluminium sili... https://doi.org	30 Июнь 2020	Издательство Wiley	0	1	
[96]	0,36%	0%	Re- evaluation of sodium aluminium sili... https://doi.org	раньше 2011	Издательство Wiley	0	1	
[97]	0,34%	0%	Issue Information https://doi.org	30 Сен 2018	Издательство Wiley	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[98]	0,33%	0%	Ласьков, Дмитрий Сергеевич Особен... http://dlib.rsl.ru	08 Дек 2017	Сводная коллекция РГБ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[99]	0,33%	0%	137246 http://biblioclub.ru	15 Apr 2016	Сводная коллекция ЭБС	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[100]	0,33%	0%	T. 4, № 4 (13) http://emil.ru	21 Дек 2016	Медицина	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[101]	0,33%	0%	Involvement of Bcl-2 Activation and G1 ... https://frondiersin.org	15 Июля 2020	СМИ России и СНГ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[102]	0,33%	0%	https://moolimk.com/assets/files/journ... https://moolimk.com	14 Июнь 2023	Интернет Плюс*	0	3	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[103]	0,32%	0%	https://daigau.ru/upload/iblock/db9/So... https://daigau.ru	05 Apr 2023	Интернет Плюс*	0	3	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[104]	0,32%	0%	Приказ Министерства образования и ...	27 Дек 2018	СМИ России и СНГ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[105]	0,3%	0%	Шарафутдинова, Люция Ахтямовна М... http://dlib.rsl.ru	11 Июнь 2020	Сводная коллекция РГБ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[106]	0,3%	0%	Комелькова, Мария Владимировна П... http://dlib.rsl.ru	27 Июнь 2022	Сводная коллекция РГБ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[107]	0,3%	0%	Хирургическая коррекция контуров т... http://der.nlb.by	04 Июнь 2017	Диссертации НББ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[108]	0,3%	0%	Morphological and Functional Changes ... http://idosi.org	06 Янв 2018	Переводные заимствования (RuEn)	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[109]	0,29%	0%	"Эндокриндик жүйе" модулі. Модуль "... http://studenslibrary.ru	16 Янв 2018	Медицина	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[110]	0,29%	0%	Демяшкин, Григорий Александрович ... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2017	Сводная коллекция РГБ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[111]	0,28%	0%	Советы родителям: что рассказать ма... http://it-vest.ru	25 Дек 2018	СМИ России и СНГ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[112]	0,28%	0%	Вопрос: Сроки и размер выплаты ден... http://vo.garant.ru	25 Дек 2021	СПС ГАРАНТ: аналитика	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[113]	0,28%	0%	Коронавирус COVID-19 http://vo.garant.ru	08 Фев 2020	СПС ГАРАНТ: аналитика	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[114]	0,28%	0%	не указано http://vo.garant.ru	05 Apr 2022	СПС ГАРАНТ: аналитика	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[115]	0,28%	0%	Влияние мелодия на клиническое т...	18 Окт 2018	Модуль поиска "БГМУ"	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[116]	0,28%	0%	Менеджмент и Бизнес-Администриро... http://biblioclub.ru	21 Янв 2020	Сводная коллекция ЭБС	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[117]	0,28%	0%	Светличкина, Анастасия Александров... http://dlib.rsl.ru	16 Июнь 2021	Сводная коллекция РГБ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[118]	0,28%	0%	Йодсодержащие тиреоидные гормон... http://der.nlb.by	16 Янв 2020	Диссертации НББ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[119]	0,28%	0%	Эстетическое восстановление депуль... http://der.nlb.by	16 Янв 2020	Диссертации НББ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.

[120]	0,28%	0%	Лаборатория кафедры физиологии и — http://bashedu.ru	04 Мар 2021	Интернет Плюс*	0	3	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[121]	0,27%	0%	Adverse Outcome Pathway Developme... https://frontiersin.org	29 Apr 2021	СМИ России и СНГ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[122]	0,27%	0%	Bisamide Derivative of Dicarboxylic Add... https://frontiersin.org	13 Jan 2021	СМИ России и СНГ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[123]	0,27%	0%	Melatonin appears to protect against st... https://doi.org	30 Сен 2019	Издательство Wiley	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[124]	0,27%	0%	Семенов, Сергей Васильевич Клинико... http://dlib.rsl.ru	22 Apr 2019	Сводная коллекция РГБ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[125]	0,26%	0%	Протокол заседания Комиссии по раз... http://ivo.garant.ru	11 Apr 2015	СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[126]	0,26%	0%	T. 61, № 4, июль-август http://emil.ru	28 Apr 2017	Медицина	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[127]	0,24%	0%	МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ... http://eLibrary.ru	04 Apr 2016	Перефразирования по eLIBRARY.RU	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[128]	0,24%	0%	Л. В. Капилевич, Е. Ю. Дьякова ; Федер... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2008	Сводная коллекция РГБ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[129]	0,24%	0%	Guidance on technical requirements for ... https://doi.org	31 Apr 2021	Перефразирования по коллекции издательства Wiley	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[130]	0,24%	0%	Расчет вдыхаемой фракции дисперсн... https://diss.unn.ru	30 Янв 2017	Перефразирования по Интернету	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[131]	0,23%	0%	Мухаметзанов, Ильнар Талыатович — http://dlib.rsl.ru	27 Дек 2019	Сводная коллекция РГБ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[132]	0,22%	0%	О двойственности правового регулир... http://ivo.garant.ru	05 Mar 2022	СПС ГАРАНТ: аналитика	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[133]	0,21%	0%	Красок диссертация антиплагиат	30 Мая 2018	Модуль поиска "БГМУ"	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[134]	0,21%	0%	Роль хламидийной инфекции в мужск... http://emil.ru	28 Apr 2017	Медицина	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[135]	0,21%	0%	испр_Петренкова, А. Ю. Христюков, А...	22 Mar 2018	Модуль поиска "БГМУ"	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[136]	0,21%	0%	T. 2 http://emil.ru	08 Июл 2017	Медицина	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[137]	0,2%	0%	КРИП Набиева МА. 3191111	12 Apr 2023	Кольцо вузов	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[138]	0,2%	0%	Бессонов, Максим Александрович Алг... http://dlib.rsl.ru	27 Дек 2019	Сводная коллекция РГБ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[139]	0,18%	0%	Telemedicine Across the Globe-Position ... https://frontiersin.org	16 Oct 2020	СМИ России и СНГ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[140]	0,18%	0%	https://spbguvm.ru/wp-content/uploads/2021/04/20210401.pdf https://spbguvm.ru	21 Apr 2022	Интернет Плюс*	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[141]	0,18%	0%	Личикаюи, Валерия Анатольевна Влия... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2015	Сводная коллекция РГБ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[142]	0,18%	0%	Особенности клинической картины, ... http://emil.ru	20 Янв 2020	Медцина	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[143]	0,17%	0%	A Testis-Specific Long Noncoding RNA S... https://frontiersin.org	01 Apr 2021	СМИ России и СНГ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[144]	0,16%	0%	Evaluation of the In vivo acute toxicity o...	31 Mar 2022	Издательство Wiley	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[145]	0,16%	0%	Формирование системы опережающ... http://ivo.garant.ru	16 Apr 2022	СПС ГАРАНТ: аналитика	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[146]	0,16%	0%	не указано http://ivo.garant.ru	03 Apr 2022	СПС ГАРАНТ: аналитика	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[147]	0,15%	0%	Билячурина_Татьяна_диплом	24 Мая 2023	Кольцо вузов	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.

[148]	0,15%	0%	DNA-GEL, Novel Nanomaterial for Biom... https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/anie.202201234	23 Фев 2022	СМИ России и СНГ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[149]	0,14%	0%	ISSUE INFORMATION - TOC https://doi.org/10.1002/anie.202201234	30 Ноя 2019	Издательство Wiley	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[150]	0,14%	0%	Общество : политика, экономика, пра... http://biblioclub.ru	21 Янв 2020	Сводная коллекция ЭБС	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[151]	0,14%	0%	Письмо Министерства науки и высше... http://www.garant.ru	14 Июн 2022	СПС ГАРАНТ; нормативно-правовая документация	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[152]	0,13%	0%	Нанотехнологии и охрана здоровья. — http://biblioclub.ru	разные 2011	Сводная коллекция ЭБС	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.