

О.П. Яворовський<sup>1</sup>,   
 Т.С. Зазуляк<sup>2</sup>,   
 Д.Д. Остапів<sup>3</sup>,   
 В.М. Рябовол<sup>1\*</sup>,   
 О.В. Демецька<sup>4</sup> 

## ПОРІВНЯЛЬНА ОЦІНКА ПОШКОДЖУЮЧОЇ ДІЇ НАНОЧАСТИНОК НА ОСНОВІ ДІОКСИДУ ТИТАНУ НА СТАТЕВІ КЛІТИНИ КНУРІВ В ЕКСПЕРИМЕНТІ *IN VITRO*

Національний медичний університет ім. О.О. Богомольця<sup>1</sup>  
 бул. Т. Шевченка, 13, Київ, 01601, Україна  
 Львівський національний медичний університет ім. Данила Галицького<sup>2</sup>  
 вул. Пекарська, 69, Львів, 79010, Україна  
 Інститут біології тварин НААН України<sup>3</sup>  
 вул. В. Стуса, 38, Львів, 79034, Україна  
 Інститут медицини праці ім. Ю.І. Кундієва НАМН України<sup>4</sup>  
 вул. Саксаганського, 75, Київ, 01033, Україна  
 Bogomolets National Medical University<sup>1</sup>  
 T. Shevchenko Blvd., 13, Kyiv, 01601, Ukraine  
 Danylo Halytsky Lviv National Medical University<sup>2</sup>  
 Pekarska str., 69, Lviv, 79010, Ukraine  
 Institute of Animal Biology NAAS of Ukraine<sup>3</sup>  
 Stus str., 38, Lviv, 79034, Ukraine  
 SI "Yu. Kundiev Institute for Occupational Health of the NAMS of Ukraine"<sup>4</sup>  
 Saksahansko str., 75, Kyiv, 01033, Ukraine  
 \*e-mail: riabovoll@ukr.net

Цитування: Медичні перспективи. 2022. Т. 27, № 4. С. 13-19

Cited: Medicni perspektivi. 2022;27(4):13-19

**Ключові слова:** наночастинки діоксиду титану, нанокмпозит діоксиду титану зі сріблом, нанотоксикологія, сукцинатдегідрогеназа, цитохромоксидаза, статеві клітини кнурів

**Key words:** nanoparticles of titanium dioxide, nanocomposite of titanium dioxide with silver, nanotoxicology, succinate dehydrogenase, cytochrome oxidase, boar germ cells

**Реферат.** Порівняльна оцінка пошкоджуючої дії наночастинок на основі діоксиду титану на статеві клітини кнурів в експерименті *in vitro*. Яворовський О.П., Зазуляк Т.С., Остапів Д.Д., Рябовол В.М., Демецька О.В. Сучасні наноматеріали на основі діоксиду титану, зокрема модифіковані наносріблом, володіють противірусною, антибактеріальною, протигрибковою активністю, цитотоксичною дією в експериментах *in vitro* та можуть вражати статеві клітини теплокровних лабораторних тварин. Метою дослідження було вивчення впливу різних типів наночастинок на основі діоксиду титану на фізіолого-біохімічні характеристики модельних клітин – статевих клітин кнурів в експерименті *in vitro*. При застосуванні максимальної дози ( $LD_{50}$ ) досліджуваних нанопорошків у всіх зразках виживання спермій було вірогідно нижчим, ніж у контролі: на 41,9% ( $p < 0,001$ ) – за дії наночастинок (далі НЧ)  $TiO_2$  (ППМ ім. І.М. Францевича, далі ППМ), на 28,0% ( $p < 0,05$ ) – за дії НЧ  $TiO_2$  (Acros Organics), на 53,5% ( $p < 0,001$ ) – за дії НЧ 4% Ag- $TiO_2$  (ППМ) і на 55,9% ( $p < 0,001$ ) – за дії НЧ 8% Ag- $TiO_2$  (ППМ). Нанопорошки на основі діоксиду титану різних виробників, що характеризуються подібною морфологічною характеристикою та різним ступенем доповненості наносріблом (вміст Ag від 0 до 8%), починаючи з дози 1/10  $LD_{50}$  можуть чинити ушкоджуючу дію на статеві клітини кнурів, яка проявляється зниженням дихальної активності спермій та активності цитохромоксидази, збільшенням активності сукцинатдегідрогенази. Найбільш чутливим маркером виявився показник виживання спермій, значення якого достовірно знизилось за дії наночастинок 8% Ag- $TiO_2$  (ППМ) у дозі 1/100  $LD_{50}$ , що є наслідком порушення активності мітохондріальних ензимів і, відповідно, ресинтезу АТФ. Отримані нами результати підтверджують та розширюють дані щодо характеру пошкоджуючого впливу наночастинок на основі діоксиду титану на статеві клітини теплокровних тварин за рахунок оксидативного стресу. Одержані експериментальні дані будуть враховані при гігієнічній регламентації досліджених нанопорошків.

**Abstract.** Comparative assessment of the effect of titanium dioxide – based nanoparticles on boar germ cells *in vitro*. Yavorovsky O.P., Zazuliak T.S., Ostapiv D.D., Riabovol V.M., Demetska O.V. Modern titanium dioxide nanomaterials, in particular modified with nanosilver, have antiviral, antibacterial, antifungal activity, cytotoxic effects *in vitro* experiments and can affect germ cells of warm-blooded laboratory animals. The research aims to study the effect of different types of titanium dioxide nanoparticles on the physiological and biochemical characteristics of wild boar

germ cells *in vitro*. When applying the maximum dose ( $LD_{50}$ ) of the studied nanopowders in all samples, sperm survival was probably lower than in the control: by 41.9% ( $p < 0.001$ ) – under the action of  $TiO_2$  nanoparticles (hereinafter NPs) (Frantsevich Institute for Problems of Materials Science of NAS of Ukraine, hereinafter IPM), by 28.0% ( $p < 0.05$ ) – under the action of  $TiO_2$  NPs (Acros Organics), by 53.5% ( $p < 0.001$ ) – under the action of 4% Ag- $TiO_2$  NPs (IPM) and by 55.9% ( $p < 0.001$ ) – are the action of NPs 8% Ag- $TiO_2$  (IPM). Nanopowders of different based on titanium dioxide manufacturers, characterized by similar morphological characteristics and varying degrees of nanosilver addition (Ag content from 0 to 8%), starting from a dose of  $1/10 LD_{50}$ , can have a damaging effect on the germ cells of wild boars, which is manifested by a decrease in the respiratory activity of sperm and cytochrome oxidase activity, by increasing succinate dehydrogenase activity. The most sensitive marker was the sperm survival rate, the value of which significantly decreased under the action of 8% Ag- $TiO_2$  nanoparticles (IPM) at a dose of  $1/100 LD_{50}$ , which is a consequence of disruption of the activity of mitochondrial enzymes and, accordingly, resynthesis of ATP. Our results confirm and extend the data on the nature of the damaging effect of titanium dioxide-based nanoparticles on germ cells of warm-blooded animals due to oxidative stress. The obtained experimental data will be taken into account in the hygienic regulation of the investigated nanopowders.

Нанопорошки на основі діоксиду титану знайшли своє цільове застосування в таких галузях економічної діяльності, як будівництво, сільське господарство, медицина, косметологія, фармація, охорона довкілля, матеріалознавство, енергетика, харчова промисловість [1]. Зокрема, наночастинки діоксиду титану ( $HЧ TiO_2$ ) є одними з найбільш ефективних фотокаталізаторів, і з метою поліпшення цієї властивості Інститутом проблем матеріалознавства імені І.М. Францевича НАМН України (ІПМ ім. І.М. Францевича) було синтезовано новий композит – нанодіоксид титану, модифікований наносріблом ( $HЧ Ag-TiO_2$ ) [2, 3]. Водночас на клітинах культур MDBK (нирки бика) було показано, що поєднання з наносріблом  $HЧ TiO_2$  підвищує ступінь цитотоксичності цих наночастинок [2]. Наночастинки  $TiO_2$  володіють антивірусною активністю, що було продемонстровано на аденовірусі людини 5 серотипу та показано, що віруліцидна дія  $HЧ$  посилюється під впливом УФ-опромінення [4]. Підтвердженою є протигрибкова дія  $HЧ TiO_2$  стосовно *Candida Spp.* та антимікробна активність проти грамположитивних і грамнегативних бактерій, включаючи стійкі до антибіотиків штами [5, 6].

$HЧ TiO_2$  та  $HЧ Ag-TiO_2$  не чинять місцево-подразнюючої дії на шкіру лабораторних тварин, мають слабку подразнюючу дію на слизову оболонку ока кролика та характеризуються слабо вираженими сенсibiliзуючими властивостями. Однак у гострому експерименті на мишах шляхом внутрішньоочеревинного введення було встановлено, що для нанопорошку  $TiO_2$  французького виробництва «Acros Organics»  $LD_{50}$  перевищує 11000 мг/кг; для нанопорошку  $TiO_2$  виробництва ІПМ ім. І.М. Францевича  $LD_{50}$  рівне 4783,30 мг/кг, для нанопорошку  $Ag-TiO_2$  з масовою часткою Ag 4%  $LD_{50}$  становить 724,44 мг/кг, а введення нано- $TiO_2$  з масовою часткою Ag 8% того ж виробника в дозі 1000 мг/кг призводило до загибелі всіх тварин у статистичній групі [3, 7].

Паралельно з дослідженнями токсиколого-гігієнічних властивостей нових наноматеріалів ведеться активний пошук простих й адекватних біологічних моделей для їх вивчення.

Отже, вищенаведені дані свідчать про те, що наночастинки на основі діоксиду титану володіють високою біологічною активністю і можуть впливати не лише на віруси, бактерії, гриби, а також можуть чинити токсичну дію на організм теплокровних лабораторних тварин. Останнє вказує на необхідність подальшого вивчення токсичного впливу згаданих сполук, зокрема на таку чутливу частину організму, як статеві клітини, що може бути здійснено з використанням біологічних моделей [8, 9].

Також встановлено, що наноконкомпозит  $Ag-TiO_2$  (масова частка Ag 4% (ІПМ), та  $HЧ TiO_2$  (ІПМ) у концентраціях 3 мг/мл ініціюють патологічні зміни в сперматозоїдах великої рогатої худоби (бика), що є маркерами оксидативного стресу (аномалії головки, середньої частини та хвоста, а також відсутність акросоми тощо), при цьому патологічна дія наноконкомпозиту  $Ag-TiO_2$  є більш вираженою [10, 11].

Таким чином, наявні літературні дані та попередні власні дослідження свідчать про те, що сучасні титановмісні наноматеріали, зокрема доповнені наносріблом, певною мірою володіють противірусною, антибактеріальною, протигрибковою активністю, цитотоксичною дією в експериментах *in vitro* та *in vivo* та можуть вражати статеві клітини теплокровних тварин (ссавців).

З цього приводу варто зауважити, що необхідність постійного удосконалення методів тестування наночастинок *in vitro* зумовлена високою швидкістю розвитку сучасних нанотехнологій, які постійно продукують нові об'єкти. Вибір як тест-об'єкта сперматозоїдів зумовлений тим, що, незважаючи на порівняно короткий (до декількох діб) період життя, їх біологічні особливості (плазматична мембрана й акросома, що є

ліпопротеїдними та глікопротеїдними утвореннями, щільність упаковки протеїнів і нуклеїнових кислот у ядрі, малий вміст води, низький рівень метаболізму в нерухомому стані) зумовлюють високу стійкість до зовнішніх впливів. У той же час сперматозоїди більш чутливі до оксидативного стресу, ніж інші клітини, через велику кількість поліненасичених жирних кислот, які легко піддаються перекисному окисненню, незначну кількість цитоплазми, що містить низьку концентрацію ДНК-відновлювальних систем та антиоксидантних ензимів, які виявляються нездатними захистити клітинну мембрану на рівні хвоста й акросоми. Накопичення перекисів ліпідів у тканинах супроводжується руйнуванням молекулярної структури клітинних мембран, найважливішими компонентами яких є фосfolіпіди. Інтенсифікація процесів перекисного окиснення ліпідів залежить від ступеня пошкодження мембран сперматозоїдів [10, 11].

У свою чергу, дані щодо пошкоджуючої дії (за рахунок оксидативного стресу) титановмісних нанопорошків на статеві клітини теплокровних тварин потребують підтвердження та розширення.

Мета досліджень – вивчити вплив різних типів наночастинок на основі діоксиду титану на фізіолого-біохімічні характеристики модельних клітин – статевих клітин кнурів в експерименті *in vitro*.

#### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Для оцінювання дії наночастинок на основі діоксиду титану на фізіолого-біохімічні характеристики статевих клітин використовували свіжоотримані еякуляти кнурів ( $n=6$ ). В еякулятах визначали фізіологічні показники: об'єм (мл) і концентрацію спермій шляхом підрахунку в камері Горяєва ( $10^6$  клітин/мл). Для досліджень кожен еякулят розбавляли 1:10 фосфатно-сольовим буфером (NaCl – 0,8 г, KCl – 0,02 г,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  – 0,11 г,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 0,02 г,  $\text{MgCl}_2$  – 0,01 г, вода дистильована – до 100 мл) і ділили на частини: контрольну (без додавання нанопорошку) та дослідні – з додаванням нанопорошків діоксиду титану.

Використовували такі нанопорошки:  $\text{TiO}_2$  (ІПМ ім. І.М. Францевича, далі – ІПМ),  $\text{TiO}_2$  (Acros Organics, Франція) і композити з наночастинками срібла – 4% Ag- $\text{TiO}_2$  (з масовою часткою Ag 4%, ІПМ), 8% Ag- $\text{TiO}_2$  (з масовою часткою Ag 8%, ІПМ) [2-4, 7].

Методами трансмісійної і скануючої електронних мікроскопій встановлено, що нанопорошок  $\text{TiO}_2$  (ІПМ) має наночастинки переважно розміром 20-30 нм; 4% Ag- $\text{TiO}_2$  та 8% Ag- $\text{TiO}_2$  містять наночастинки Ag, що мають

середній розмір Ag 35-40 нм та  $\text{TiO}_2$  – 13-20 нм [2-4]. Частилки наносрібла локалізовані на поверхні нанодіоксиду титану для 4% Ag- $\text{TiO}_2$ , а у 8% Ag- $\text{TiO}_2$  частинки наносрібла знаходяться в кристалічній структурі нанодіоксиду титану. Середній розмір наночастинок  $\text{TiO}_2$  (Acros Organics, Франція) близько 75-90 нм. Усі названі наночастилки мають переважно сферичну форму.

Дози титановмісних наноматеріалів для експозиції модельних клітин обирали з урахуванням попередньо встановлених нами параметрів гострої токсичності для теплокровних тварин (значення  $\text{LD}_{50}$  для мишей самок внутрішньоочеревинно) [3, 7]. Дослідні зразки експонували титановмісними наноматеріалами в дозах  $1/100 \text{LD}_{50}$ ,  $1/10 \text{LD}_{50}$  і  $\text{LD}_{50}$  на мл сперми. Розраховані кількісні дози  $\text{LD}_{50}$  на мл сперми: для  $\text{TiO}_2$  (ІПМ) – 47 мкг/мл; для  $\text{TiO}_2$  (Acros Organics) – 110 мкг/мл; для 4% Ag- $\text{TiO}_2$  (ІПМ) – 7 мкг/мл; 8% Ag- $\text{TiO}_2$  (ІПМ) – 10 мкг/мл.

У контрольних та дослідних зразках визначали такі показники: виживання спермій (год.) за температури 18-20°C – до припинення прямолінійно-поступального руху; дихальну активність – полярографічно (нг-атом  $\text{O}_2/\text{хв} \times 0,1$  мл сперми) в термостатованій комірці (38,5°C) з вмонтованим електродом Кларка; активність сукцинатдегідрогенази (СДГ, од/год  $\times 0,1$  мл сперми) визначали за вмістом утвореного продукту реакції червоного кольору – червоного формазану впродовж 2 год. інкубування за температури 38,5°C й активність цитохромоксидази (ЦХО, од/год  $\times 0,1$  мл сперми) визначали за вмістом утвореного продукту реакції синього кольору – індофенолового синього впродовж 1 год. інкубування за температури 38,5°C [12].

Дослідження проведені згідно із Законом України «Про затвердження порядку проведення науковими установами дослідів, експериментів на тваринах» № 249 від 01.03.2012 р. та вимог «Директиви 2010/63/ЄС Європейського парламенту і Ради ЄС від 22 вересня 2010 року про захист тварин, що використовуються в наукових цілях».

Аналіз результатів досліджень здійснювали методами варіаційної статистики з використанням програмного забезпечення Microsoft Excel 2010. Як міру кореляційного зв'язку між кількісними змінними використано кореляційне відношення ( $\eta^2$ ). Дані представляли як середнє значення  $\pm$  довірчий інтервал при довірчому рівні 95%. Різницю між контрольними та дослідними даними вважали достовірною при  $p < 0,05$  [13].

#### РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Дихальна активність спермій під впливом наночастинок на основі діоксиду титану

достовірно знижується проти контролю починаючи з дози 1/10 LD<sub>50</sub> і вище (табл. 1). Так, значення дихальної активності за дії НЧ TiO<sub>2</sub> (ІПМ) достовірно зменшується проти контролю (p<0,05) на 57,3% та за дії TiO<sub>2</sub> (Acros Organics) –

на 64,1%. Наночастинки TiO<sub>2</sub> з додаванням срібла на рівні згаданої дози на дихальну активність достовірно не впливають – за дії 4% Ag-TiO<sub>2</sub> (ІПМ) дихальна активність зменшується на 23,3%, за дії 8% Ag-TiO<sub>2</sub> (ІПМ) – на 10,7%.

Таблиця 1

**Дихальна активність спермійв за дії наночастинок на основі діоксиду титану (нг-атом O<sub>2</sub>/0,1 мл за хв, n=6, M±m)**

Нанопорошок	Контроль	Дози діючої речовини			η <sup>2</sup>
		1/100 LD <sub>50</sub>	1/10 LD <sub>50</sub>	LD <sub>50</sub>	
TiO <sub>2</sub> (ІПМ)		0,62±0,182	0,44±0,143*	0,10±0,040***	0,228
TiO <sub>2</sub> (Acros Organics)		0,70±0,262	0,37±0,230*	0,30±0,111**	0,164
4% Ag-TiO <sub>2</sub> (ІПМ)	1,03±0,170	0,79±0,291	0,60±0,312	0,13±0,045***	0,161
8% Ag-TiO <sub>2</sub> (ІПМ)		0,92±0,296	0,82±0,319	0,21±0,058***	0,128

Примітки: різниця статистично вірогідна проти контролю \* – p<0,05; \*\* – p<0,01; \*\*\* – p<0,001.

У дозі на рівні LD<sub>50</sub> достовірний вплив на дихальну активність спермійв чинять усі типи наночастинок на основі діоксиду титану: за дії НЧ TiO<sub>2</sub> (ІПМ) величина дихальної активності зменшується на 90,3% (p<0,001) проти контролю, за дії НЧ TiO<sub>2</sub> (Acros Organics) – на 70,9% (p<0,01), за дії НЧ 4% Ag-TiO<sub>2</sub> (ІПМ) – на 87,4% (p<0,001) та за дії НЧ 8% Ag-TiO<sub>2</sub> (ІПМ) – на 79,7% (p<0,001).

Слід зауважити, що експонування статевих клітин кнурів нанопорошками TiO<sub>2</sub>, допованими наносріблом, за умов їх максимального вмісту (LD<sub>50</sub>) призводило до генерування оксигену: у двох (33,3%) зразках – для НЧ Ag-TiO<sub>2</sub> 4% і в одному зразку (16,6%) – для НЧ Ag-TiO<sub>2</sub> 8%. Вочевидь, комплекс НЧ Ag-TiO<sub>2</sub> за максимального вмісту в модельному середовищі порушує перебіг окиснювальних процесів у сперміях із подальшим стимулюванням процесів вільнорадикального окиснення з руйнуванням комплексів ліпід-ліпід та ліпід-протеїн у мембранах, спричиняє порушення ресинтезу аденозинтрифосфорної кислоти (АТФ) і загибель клітин (апоптоз чи некроз). Водночас вірогідних відмінностей між величинами середніх значень показника за дії TiO<sub>2</sub> в композитах з різною масовою часткою наносрібла (4 та 8%) не виявлено. Отриманий результат свідчить, що обсяг масової частки (4%) Ag у комплексі з TiO<sub>2</sub>

достатній для проявлення ефекту, який характеризує ушкодження мембран і порушення метаболізму клітин.

При дослідженні дихальної активності спермійв за дії всіх типів вищезгаданих наночастинок на основі діоксиду титану спостерігається низька кореляція між введеною дозою та ступенем вираженості ефекту (величина η<sup>2</sup> максимально становить 0,228).

Пригнічення дихальної активності спермійв під впливом наночастинок на основі діоксиду титану, ймовірно, зумовлено порушенням використання субстратів і транспорту електронів у дихальному ланцюзі мітохондрій клітин, що характеризується змінами активності мітохондріальних ензимів. Зокрема, встановлено достовірне дозозалежне (величина η<sup>2</sup> рівне 0,415) підвищення активності СДГ під впливом TiO<sub>2</sub> (ІПМ) на рівні 1/10 LD<sub>50</sub> (на 87,4% за p<0,05) та на рівні LD<sub>50</sub> (на 154,7% за p<0,01) проти контролю (табл. 2). Решта дослідних сполук на рівень згаданого ензиму достовірно не впливали, що підтверджується, зокрема, низьким кореляційним відношенням (0,025 не вище). Разом з тим у випадку TiO<sub>2</sub> (Acros Organics) спостерігається підвищення рівня ензиму у двох вищих дозах, достовірність якого статистично не підтверджена, відповідно на 7,4% за 1/10 LD<sub>50</sub> та на 31,6% за LD<sub>50</sub>.

Таблиця 2

**Активність сукцинатдегідрогенази спермійв при дії наночастинок на основі діоксиду титану (од/год×0,1 мл, n=6, M±m)**

Нанопорошок	Контроль	Дози діючої речовини			$\eta^2$
		1/100 LD <sub>50</sub>	1/10 LD <sub>50</sub>	LD <sub>50</sub>	
TiO <sub>2</sub> (ІПМ)		10,3±2,13	17,8±3,69*	24,2±2,98**	0,415
TiO <sub>2</sub> (Acros Organics)	9,5±2,57	9,3±2,06	10,2±2,24	12,5±5,10	0,025
4% Ag-TiO <sub>2</sub> (ІПМ)		7,0±2,09	8,0±2,08	8,7±4,11	0,017
8% Ag-TiO <sub>2</sub> (ІПМ)		8,0±2,01	8,3±2,57	7,7±1,85	0,015

Примітки: різниця статистично вірогідна проти контролю \* – p < 0,05; \*\* – p < 0,01.

Нанопорошки на основі TiO<sub>2</sub> є слабозчинні у фосфатно-сольовому буфері й перебувають у середовищі у вигляді суспензії, що може призводити до ушкодження мембран клітин, зокрема мітохондрій. Унаслідок руйнування мембран (чи збільшення їх проникності) відбувається створення умов для проникнення субстрату (сукцинату) в мітохондрії та активування СДГ. Однак вплив нанопорошків TiO<sub>2</sub>, що містять срібло (НЧ 4% Ag-TiO<sub>2</sub> (ІПМ) та НЧ 8% Ag-TiO<sub>2</sub> (ІПМ)), виглядає дещо інакше, а саме – достовірних змін рівнів СДГ не спостерігається, що може бути зумовлено інгібуванням SH-групи активного центру ензиму йонами срібла (табл. 2).

За такої умови НЧ 4% Ag-TiO<sub>2</sub> (ІПМ) та НЧ 8% Ag-TiO<sub>2</sub> (ІПМ) вже на рівні 1/100 LD<sub>50</sub> інгібують активність ензиму, значення якого за вищих доз вказаних речовин майже не змінюється. Отже, нанопорошки TiO<sub>2</sub>, доповані наносріблом, ймовірно пригнічують активність СДГ незалежно від обсягу його масової частки (4 та 8% Ag).

Установлено, що НЧ TiO<sub>2</sub> (Acros Organics) та НЧ 8% Ag-TiO<sub>2</sub> (ІПМ) на рівні дози LD<sub>50</sub> та 1/10 LD<sub>50</sub> відповідно достовірно знижують активність ЦХО проти контролю, причому дозозалежний характер зміни мають лише у випадку введення НЧ TiO<sub>2</sub> (Acros Organics), де  $\eta^2=0,624$  (табл. 3).

Таблиця 3

**Активність цитохромоксидази спермійв за дії наночастинок на основі діоксиду титану (од/год×0,1 мл, n=6, M±m)**

Нанопорошки	Контроль	Дози діючої речовини			$\eta^2$
		1/100 LD <sub>50</sub>	1/10 LD <sub>50</sub>	LD <sub>50</sub>	
TiO <sub>2</sub> (ІПМ)		29,2±3,80	26,7±3,85	29,2±3,42	0,071
TiO <sub>2</sub> (Acros Organics)	33,3±3,04	28,3±3,47	24,2±2,98	10,0±0,24***	0,624
4% Ag-TiO <sub>2</sub> (ІПМ)		26,7±2,26	25,0±2,36	27,5±3,06	0,183
8% Ag-TiO <sub>2</sub> (ІПМ)		30,0±2,63	23,3±2,26 <sup>c</sup>	29,2±4,92	0,183

Примітки: різниця статистично вірогідна проти контролю \* – p < 0,05; \*\*\* – p < 0,001.

Як показано в таблиці 3, ступінь впливу також відрізняється, а саме – НЧ TiO<sub>2</sub> (Acros Organics) чинить вплив у найвищій дозі (LD<sub>50</sub>), а НЧ 8% Ag-TiO<sub>2</sub> (ІПМ) – вже в дозі 1/10 LD<sub>50</sub>, що, на нашу думку, може бути пов'язано з високим вмістом

срібла в цій сполуці. Ймовірно, НЧ TiO<sub>2</sub> (Acros Organics), як і НЧ 8% Ag-TiO<sub>2</sub> (ІПМ) дозою 1/10 LD<sub>50</sub> здатні гальмувати транспорт електронів до термінальної ланки дихального ланцюга мітохондрій (ЦХО) чи взаємодіяти з активним



центром ензиму, що проявляється зниженням його активності. При цьому вказані сполуки, залежно від дози, проявляють властивості неконкурентних інгібіторів.

Наслідком змін окиснювальних процесів, які характеризують ресинтез АТФ у досліджуваних зразках за дії наночастинок на основі діоксиду

титану та його композитів з наносріблом, є зниження фізіологічних характеристик спермій, зокрема їх виживання. Доза 1/100 LD<sub>50</sub> НЧ 8% Ag-TiO<sub>2</sub> (ІПМ) призводить до вірогідного зниження показника виживання спермій (на 32,6%) проти контролю (табл. 4).

Таблиця 4

**Вживання спермій за дії наночастинок на основі діоксиду титану (год, n=6, M±m)**

Нанопорошок	Контроль	Дози діючої речовини			η <sup>2</sup>
		1/100 LD <sub>50</sub>	1/10 LD <sub>50</sub>	LD <sub>50</sub>	
TiO <sub>2</sub> (ІПМ)		82,0±7,16	58,0±3,37***	50,0±5,23***	0,589
TiO <sub>2</sub> (Acros Organics)	86,0±4,39	89,3±3,96	76,0±8,33	62,0±6,58*	0,338
4% Ag-TiO <sub>2</sub> (ІПМ)		88,7±3,04	73,3±9,87	40,0±9,24***	0,542
8% Ag-TiO <sub>2</sub> (ІПМ)		58,0±12,14*#	56,0±9,66*	38,0±8,21***	0,375

Примітки: різниця статистично вірогідна проти контролю \* – p<0,05; \*\*\* – p<0,001. Різниця статистично вірогідна між величинами значень 4% Ag-TiO<sub>2</sub> і 8% Ag-TiO<sub>2</sub>: # – p<0,05.

Збільшення дози досліджуваних речовин до 1/10 LD<sub>50</sub> однозначно впливало на величину фізіологічного показника, який знижується на 11,7% і 14,8% за додавання, НЧ TiO<sub>2</sub> (Acros Organics) і НЧ 4% Ag-TiO<sub>2</sub> (ІПМ) відповідно, та на 34,6% (p<0,001) і 34,9% (p<0,05) за додавання НЧ TiO<sub>2</sub> (ІПМ) і НЧ 8% Ag-TiO<sub>2</sub> (ІПМ) відповідно. При застосуванні максимальної дози (LD<sub>50</sub>) у всіх зразках виживання спермій було вірогідно нижчим, ніж у контролі: на 41,9% (p<0,001) – за дії НЧ TiO<sub>2</sub> (ІПМ), на 28,0% (p<0,05) – за дії НЧ TiO<sub>2</sub> (Acros Organics), на 53,5% (p<0,001) – за дії НЧ 4% Ag-TiO<sub>2</sub> (ІПМ) і на 55,9% (p<0,001) – за дії НЧ 8% Ag-TiO<sub>2</sub> (ІПМ).

Водночас за умов додавання 1/100 LD<sub>50</sub> НЧ 8% Ag-TiO<sub>2</sub> (ІПМ) тривалість виживання спермій була на 34,7% (p<0,05) нижчою порівняно з НЧ 4% Ag-TiO<sub>2</sub> (ІПМ), тоді як за умов 1/10 LD<sub>50</sub> різниця між величинами значення зменшувалась і становила 23,7%, а за умов дії LD<sub>50</sub> обох зазначених діючих речовин виживання статевих клітин було однаково низьким (38,0-40,0 год.). Цілком ймовірно, що 1/100 LD<sub>50</sub> комплексу НЧ 8% Ag-TiO<sub>2</sub> (ІПМ) завдяки вищому вмісту Ag інгібує не тільки аеробні процеси ресинтезу АТФ, але й анаеробні – анаеробний гліколіз, що призводить до більш значущого зниження виживання спермій порівняно з аналогічною дозою 4% Ag-TiO<sub>2</sub> (ІПМ).

Показники виживання статевих клітин та дози досліджуваних нанопорошків мають середню за силою негативну кореляцію. Кореляційне відношення (η<sup>2</sup>) за пропорційно зростаючих доз НЧ TiO<sub>2</sub> (ІПМ) становить 0,589, доз НЧ 4% Ag-TiO<sub>2</sub> (ІПМ) – η<sup>2</sup>=0,542, меншою мірою кореляція спостерігається для НЧ TiO<sub>2</sub> (Acros Organics) – η<sup>2</sup>=0,338 і для НЧ 8% Ag-TiO<sub>2</sub> (ІПМ) – η<sup>2</sup>=0,375.

Отримані нами результати підтверджують та розширюють дані щодо пошкоджуючого впливу наночастинок на основі діоксиду титану на статеві клітини теплокровних тварин за рахунок окисативного стресу [8-11].

**ВИСНОВКИ**

1. Нанопорошки на основі діоксиду титану різних виробників, що характеризуються подібною морфологічною характеристикою та різним ступенем доповненості наносріблом (вміст Ag від 0 до 8%), починаючи з дози 1/10 LD<sub>50</sub> можуть чинити ушкоджуючу дію на статеві клітини кнурів, яка проявляється зниженням дихальної активності спермій та активності цитохромоксидази, збільшенням активності сукцинатдегідрогенази. Найбільш чутливим маркером виявився показник виживання спермій, значення якого достовірно знизилось за дії наночастинок 8% Ag-TiO<sub>2</sub> (ІПМ) у дозі 1/100 LD<sub>50</sub>, що є наслідком порушення активності мітохондріальних ензимів і, відповідно, ресинтезу АТФ.



2. Установлено, що вплив допованих сріблом нанопорошків діоксиду титану (масова частка срібла 4% та 8%) у всіх дозах на активність сперміїв та активність сукцинатдигідрогенази є подібним, проте наночастинки з більшим вмістом срібла – 8% Ag-TiO<sub>2</sub> (ППМ), на відміну від 4% Ag-TiO<sub>2</sub> (ППМ), достовірно знижують рівень цитохромоксидази сперміїв у дозі LD<sub>50</sub> та знижують виживання сперміїв вже в мінімальній дозі – 1/100 LD<sub>50</sub>.

3. Сперматозоїди кнурів можуть бути використані в методах *in vitro* на етапах токсиколого-гігієнічної оцінки нових наноматеріалів та хімічних речовин.

4. Одержані експериментальні дані будуть враховані при гігієнічній регламентації досліджених нанопорошків.

#### Внески авторів:

Яворовський О.П. – концептуалізація, написання – рецензування та редагування, адміністрування проєкту, ведення;

Зазуляк Т.С. – ресурси, формальний аналіз, написання – рецензування та редагування;

Остапів Д.Д. – методологія, формальний аналіз, дослідження, ресурси, написання – початковий проєкт;

Рябовол В.М. – методологія, формальний аналіз, дослідження, написання – початковий проєкт;

Демецька О.В. – формальний аналіз, написання – рецензування та редагування.

**Фінансування.** Бюджетні та власні кошти.

**Конфлікт інтересів.** Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

## REFERENCES

1. Waghmode MS, Gunjal AB, Mulla JA, et al. Studies on the titanium dioxide nanoparticles: biosynthesis, applications and remediation. *SN Appl. Sci.* 2019;1:310. doi: <https://doi.org/10.1007/s42452-019-0337-3>
2. Zahorny M, Tyschenko N, Shyrokov O, et al. The Effect of Ag Content on the Structural, Optical, and Cytotoxicity Properties of TiO<sub>2</sub> Nanopowders Grown from TiO(OH)<sub>2</sub> Precursor by the Chemical Deposition Method. *Nanosistemi, Nanomateriali, Nanotehnologii.* 2021;19(4):923-40. doi: <https://doi.org/10.15407/nnn.19.04.923>
3. Zahorny MM, Yavorovsky OP, Riabovol VM, et al. [Morphological, spectral and toxicological features of new composite material of titanium nanodioxide with nanosilver for use in medicine and biology]. *Medicni perspektivi.* 2022;27(1):152-9. Ukrainian. doi: <https://doi.org/10.26641/2307-0404.2022.1.254381>
4. Pankivska YuB, Biliavska LO, Povnitsa OYu, et al. [Antiadenoviral activity of titanium dioxide nanoparticles]. *Mikrobiolohichniy zhurnal.* 2019;81(5):73-84. Ukrainian. doi: <https://doi.org/10.15407/microbiolj81.05.073>
5. Kermani SA, Salari S, Nejad Almani PG. Comparison of antifungal and cytotoxicity activities of titaniumdioxide and zinc oxide nanoparticles with amphotericin Bagainst different Candida species: In vitro evaluation. *J Clin Lab Anal.* 2021;35(1):e23577. doi: <https://doi.org/10.1002/jcla.23577>
6. de Dicastillo CL, Correa MG, Martínez FB, et al. Antimicrobial Effect of Titanium Dioxide Nanoparticles. In: Mareş M, Lim SHE, Lai K, Cristina R, editors. *Antimicrobial Resistance – A One Health Perspective* [Internet]. London: IntechOpen; 2020 [cited 2022 Jul 12]. doi: <https://doi.org/10.5772/intechopen.90891>
7. Riabovol VM, Kozar TI. [Investigation of acute toxic effects of nanopowders of titanium dioxide and its composites with nanosilver in laboratory mice. Ecological and hygienic problems of the sphere of human life]. Collection of materials of the scientific-practical conference with international participation; Kyiv; 2022. p. 160-2. Ukrainian.
8. Alae S, Ilani M. Effect of Titanium Dioxide Nanoparticles on Male and Female Reproductive Systems. *Journal of Advanced Medical Sciences and Applied Technologies.* 2017;3(1):3-8. doi: <https://doi.org/10.18869/nrip.jamsat.3.1.3>
9. Guerreiro DD, Mbemya GT, Bruno JB, et al. In-vitro culture systems as an alternative for female reproductive toxicology studies. *Zygote.* 2019;27(2):55-63. doi: <https://doi.org/10.1017/S0967199419000042>
10. Demetska OV, Didenko MM, Movchan VO, et al. [Screening assessment of the damaging effect of nanomaterials using bovine spermatozoa as a test object]. *Pivdennoukrainskyi medychnyi naukovyi zhurnal.* 2021;29:12-15. Ukrainian.
11. [Express method for determining the toxicity of nanomaterials in *in vitro* solutions using bovine spermatozoa as a test object]: pat. 101308 Ukraine. No. u201412531; appl. 19.12.2014; publ. 10.09.2015, bull. No. 17. 2 p. Ukrainian. Available from: [http://www.medfoundation.od.ua/zhurnaly/29\\_2021.pdf](http://www.medfoundation.od.ua/zhurnaly/29_2021.pdf)
12. Vlizlo VV, Fedoruk RS, Ratych IB, et al. [Laboratory research methods in biology, animal husbandry and veterinary medicine]. *Vlizlo VV, edotir.* Lviv: Spolom; 2012. Ukrainian. ISBN 976-966-665-677-6.
13. Antomonov MYu. [Mathematical processing and analysis of medical and biological data]. Kyiv: Medinform. 2018. Russian.

Стаття надійшла до редакції  
29.07.2022