

ДИНАМІКА АКТИВНОСТІ ГЕПАТОСПЕЦИФІЧНИХ ЕНЗИМІВ ТА СТАН ПРОТЕЇНСИНТЕЗУВАЛЬНОЇ ФУНКЦІЇ ПЕЧІНКИ У ЩУРІВ ЗА ХРОНІЧНОГО НАДХОДЖЕННЯ НАНОЧАСТИНОК ЦИНКУ ГІДРОКАРБОНАТУ

Кошевой В. І.¹, Науменко С. В.¹, Беспалова І. І.²,
Радзиховський М. Л.³, Балим Ю. П.¹

¹ Державний біотехнологічний університет,

Харків, Україна, e-mail: koshevoyvsevolod@gmail.com

² Інститут сцинтиляційних матеріалів НАН України, Харків, Україна

³ Національний університет біоресурсів і природокористування України, Київ, Україна

Токсикологічні властивості наночастинок (НЧ) на основі Цинку спонукають дослідників до створення нових, безпечних і екологічних сполук даного мікроелементу. У цій статті нами визначено параметри гепатотоксичності НЧ цинку гідрокарбонату (ZnCH) отриманих методом співсаджень. Для цього у хронічному токсикологічному експерименті на 25 статевозрілих щурах-самцях лінії Вістар було визначено активність індикаторних ензимів печінки (АлАТ, АсАТ, ГГТП та ЛФ) та протеїновий профіль плазми крові за введення різних доз НЧ ZnCH упродовж 30 діб. За результатами досліджень хронічного перорального введення НЧ ZnCH загибелі чи ознак отруєння у тварин у дозуванні 25–200 мг/кг ж. м. зареєстровано не було. Порушень процесів природної детоксикації організму — зниження активності індикаторних ензимів у печінці щурів дослідних груп 1–3 не спостерігали. Лише у дослідній групі 3 активність ГГТП була вищою на 30-ту і 45-ту добу — на 7,8 і 9,6 % відповідно ($P < 0,05$) порівняно з контролем. У тварин дослідної групи 4 (200 мг/кг ж. м.) на 30-ту добу дослідження відбувалася зростання активності АлАТ на 25,2 %, а на 45-ту добу — АлАТ і АсАТ на 28,9 і 15,6 % відповідно ($P < 0,05$). Разом з тим весь термін дослідження у тварин даної групи спостерігали достовірно вищу активність ГГТП: на 15-ту, 30-ту і 45-ту добу — на 8,8, 13,6 і 10,0 % відповідно ($P < 0,05-0,01$). Подібну динаміку виявляла й активність ЛФ: на 15-ту, 30-ту і 45-ту добу вона була на 25,1, 26,2 і 19,5 % ($P < 0,05$) вищою контрольних значень. Стан протеїнсинтезувальної функції печінки щурів за введення НЧ ZnCH у дозі 25–100 мг/кг ж. м. (дослідні групи 1–3) не зазнавав достовірних змін, але тенденції що спостерігали протягом експерименту свідчать про покращення протеїнового профілю, особливо рівня глобулінів. У дослідній групі 4 відзначали негативний стан протеїнового обміну — рівні загального протеїну, альбумінів і глобулінів були нижчі даних контролю протягом усього терміну дослідження

Ключові слова: токсичність, наночастинок, Цинк, обмін речовин, печінка

Наночастинок цинку оксиду (НЧ ZnO) є одними з найбільш широко використовуваних наноматеріалів після НЧ діоксиду Титану і діоксиду Силіцію; відомо, що нанорозмірний ZnO володіє унікальними властивостями, що роблять його затребуваним у багатьох галузях, в тому числі і для біомедичних застосувань [1, 2]. Невеликий розмір Цинку робить його легкозасвоюваним з наночастинок, що за різних шляхів введення в тій чи іншій формі беруть участь у регуляції фізіологічних процесів в організмі [3]. Завдяки своїй біосумісності НЧ ZnO можуть використовуватися для терапії різних захворювань, оскільки вони мають протигрибкову, антимікробну, противірусну та протипухлинну дію [4]. У різних дослідженнях повідомлялося про вибірковість і токсичність НЧ ZnO для ракових клітин, що може виявитися корисним при лікуванні раку, при цьому введення НЧ ZnO може змінювати імунний захист, надаючи сприятливі або шкідливі ефекти, як наприклад, підвищення рівня металлотіонеїну, що бере участь у фагоцитозі, розпізнаванні антигену макрофагами та запальних реакціях [5, 6]. Крім того, НЧ ZnO регулювали рівень глюкози в крові у щурів з діабетом завдяки своєму потужному антидіабетичному ефекту шляхом модуляції глікемічних параметрів разом із зменшенням вироблення вільних радикалів [7].

Комбіноване застосування НЧ ZnO з вітамінами та антиоксидантами успішно використовується у зменшенні негативного впливу різноманітних токсикантів на організм

тварин. Наприклад, введення НЧ ZnO з вітаміном С перорально в дозі 10 мг/кг та 200 мг/кг протягом 30 днів до та разом з атразином значно полегшує окислювальний стрес, запалення та апоптоз, покращує біомаркери функції печінки та гістопатологію і регулює активність печінкового цитохрому P450 [8].

Ще одним важливим аспектом застосування НЧ на основі Цинку є їх антигельмінтна та антипротозойна активність, наприклад, у складі нанокompatитів [9]. Хоча Цинк є важливим мікроелементом, дослідження показали, що НЧ ZnO можуть бути більш токсичними, ніж джерела цього мінерального елемента у макроформі, було доведено, що проникнення розчиненого іона Цинку в клітини призводить до збільшення рівня активних форм Оксигену дозозалежним чином, пошкодження лізосом і мітохондрій, що в кінцевому підсумку призводить до апоптозу і некрозу [10].

Дослідження *in vitro* токсичності НЧ ZnO виявили окислювальний стрес, перекисне окислення ліпідів, пошкодження клітинної мембрани, ДНК і навіть антипроліферативну активність, викликані цими НЧ в різних клітинних культурах [11, 12]. Було виявлено, що токсичність НЧ ZnO пов'язана з їх розчинністю та здатністю генерувати вільні радикали, крім того, було показано, що наностержні ZnO були більш токсичними, ніж НЧ сферичної форми, а менші за розміром НЧ були більш токсичними, ніж більші [13].

Більшість нових властивостей НЧ пов'язані з їх розміром. Зменшення розміру призводить до збільшення питомої площі НЧ до маси, що сприяє не тільки накопиченню НЧ, але й підвищенню реактивності та посиленню взаємодії між НЧ та біомолекулами цільової тварини [14]. НЧ на основі Цинку, залежно від розміру, геометрії і дозування, здатні проникати і ушкоджувати внутрішні органи тварин і людини, особливо статеві залози і печінку [15]. В цілому печінка є одним з найважливіших органів-мішеней наночастинок після надходження в організм [16].

Гістологічні зміни в печінці, такі як некроз, руйнування мембран гепатоцитів, розширення синусоїдальних просторів і вакуоляція їх цитоплазми, судинний застій і збільшення кількості клітин Купфера, були індуковані у мишей, які отримували НЧ ZnO у дозах 100 і 200 мг/кг ж. м. [17]. Напроти, було доведено, що НЧ ZnO пом'якшують гістологічні зміни через апоптотичну регуляцію генів на моделі ішемії-реперфузійного ушкодження печінки у щурів [18].

Останніми дослідженнями було виявлено, що шляхи аутофагії-піроптозу, що регулюються TFEB, є основою гепатотоксичності, індукованої НЧ ZnO, а також дані НЧ здатні посилювати експресію генів (CYP1A1 та NBN) у печінці [19, 20]. Відомі на сьогодні шляхи гепатотоксичності, в тому числі піроптоз як основна мішень для впливу НЧ ZnO, узагальнені на рис. 1.

Канонічний шлях Caspase-1/GSDMD, що був залучений до піроптозу, індукованого НЧ ZnO було вперше обґрунтовано Pei зі співавт. (2023) [21]. Цими ж дослідниками було визначено, що у процесі коригування експресії TFEB та ядерної транслокації шляхом нокауту генів та їх експресії змінювалася тенденція піроптозу, спричиненого НЧ ZnO, через регуляцію аутофагії та лізосомального біогенезу [22]. НЧ ZnO, головним чином, індукують гостру та субхронічну токсичність: ЛД₅₀ після одноразової ін'єкції НЧ ZnO у хвостову вену мишей складає 0,3 мг/кг, тоді як за інтраперитонеального введення ЛД₅₀ становить 299,9 мг/кг, субхронічне дослідження показало запальні ураження печінки, шлунку, підшлункової та передміхурової залоз у щурів після внутрішньошлункового введення НЧ ZnO у дозі 125 мг/кг м. т. протягом 90 діб [1].

При введенні у вигляді одноразової пероральної дози НЧ ZnO легко всмоктуються в кровотік через шлунково-кишковий тракт, внаслідок чого печінка, легені і нирки є органами-мішенями для накопичення даних НЧ і їх токсичних ефектів. Пероральний прийом наночастинок ZnO призводить до вивільнення вільного Zn²⁺ іона в шлунковій кислоті; таким чином, іон Zn²⁺ є основним токсичним матеріалом *in vivo*. Печінка як головний орган-мішень НЧ ZnO, метаболізує ліки через свою конститутивну ферментну систему цитохрому P450, тому терапевтичні дози НЧ ZnO спричиняють побічні ефекти, оскільки цинк накопичується в печінці та знижує швидкість виведення інших ліків, що призводить до їх накопичення та пов'язаних з цим токсичних побічних ефектів [23].

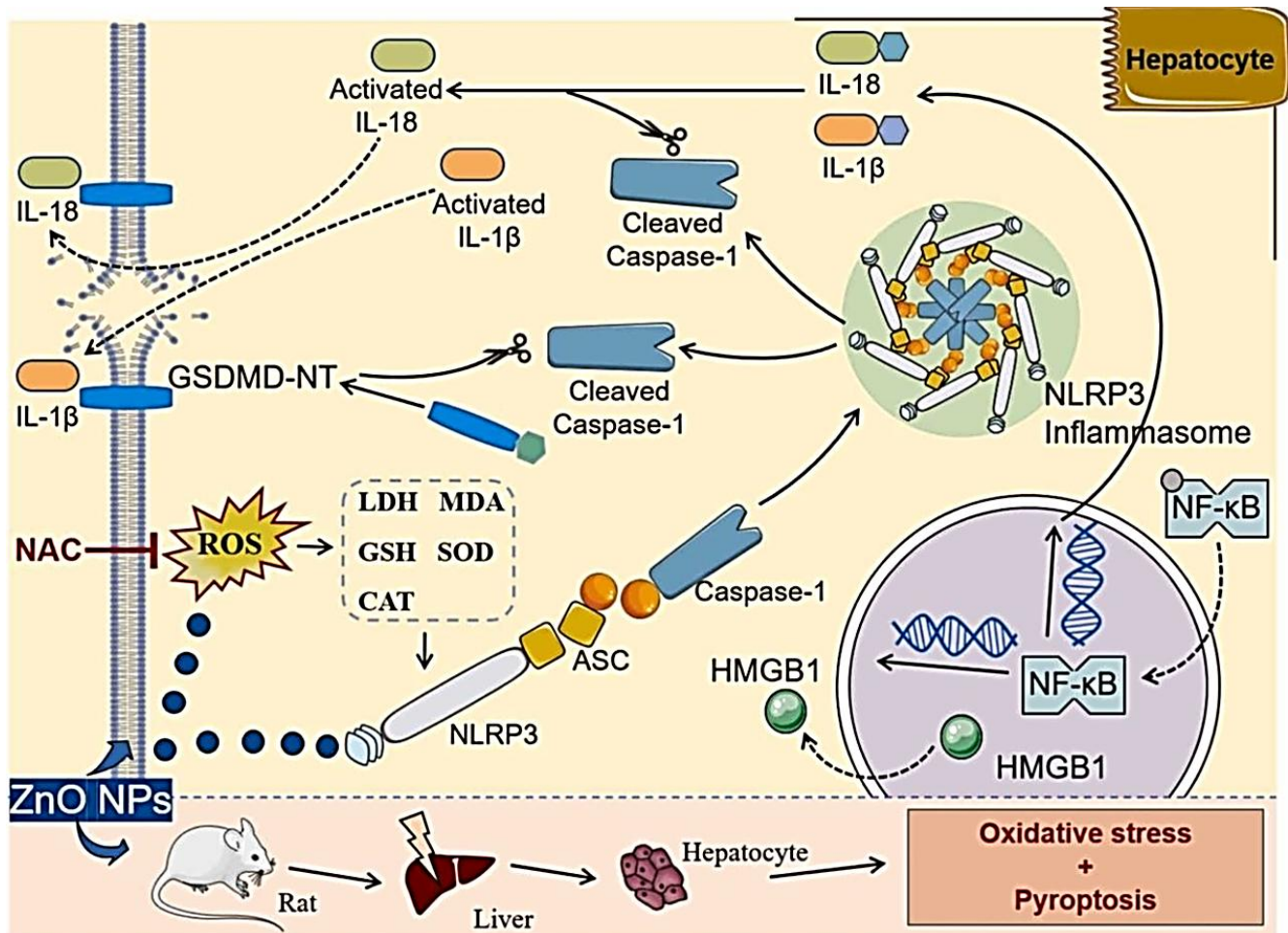


Рис. 1. Потенційні шляхи і мішені в механізмах гепатотоксичності наночастинок цинку оксиду [21].

Результати Wang зі співавт. (2017) показали, що НЧ ZnO у дозі 250 мг/кг знижували масу тіла, підвищували активність глутаміно-піровиноградних трансаміназ та концентрацію цинку в сироватці крові, печінці та нирках, водночас не впливаючи на відносну масу органів, кишкову мікробіоту та концентрацію інших мінералів (Fe, Cu та Mn) у нирках, печінці щурів порівняно з цинку сульфатом у макроформі [24]. Токсикокінетика за перорального введення НЧ ZnO у дозі 350 мг/кг ж. м. або сульфату цинку в дозі 700 мг/кг ж. м. досліджена протягом 90 днів продемонструвала підвищений рівень Цинку у печінці, нирках та кістках. НЧ ZnO порівняно з макросполукою, незалежно від тривалості впливу або статі щурів, відмінностей у токсикокінетиці не виявляли. НЧ ZnO мали схожий профіль біорозподілу з цинку сульфатом і абсорбувалися переважно в іонних формах [25].

Для зменшення токсичності НЧ на основі Цинку, використовують різні методи, зокрема синтез із використанням «зеленої хімії». З одного боку метою цього є отримання безпечних, екологічних НЧ, а з іншого — можливість навантаження цих НЧ екстрактами різних фітобіотичних засобів, використовуючи їх в якості наноконтейнера [11, 26, 27]. Іншим підходом до уникнення токсичних ефектів іонів цинку, що вивільняються з НЧ ZnO є інкапсуляція даного мікроелементу в НЧ сироваткового протеїну, що виявляє гепатопротекторний ефект [28].

Існують дані щодо використання НЧ на основі Цинку у сільському господарстві [29, 30]. Так, Pei зі співавт. (2019) показали, що низькі дози НЧ ZnO можуть мати сприятливий вплив на продуктивність, ріст, морфологію та мікрофлору кишечника, імунітет у свиней на відлученні, подібно до ефектів фармакологічних доз цинку оксиду у макроформі, разом з тим НЧ ZnO можуть зменшувати екскрецію мінералів, що є важливим аспектом у вирішенні екологічних проблем у свинарстві [31]. Введення НЧ ZnO у дозі 50 мг/кг самцям кролів в умовах підвищених температур дозволяють отримати позитивні дані щодо зниження біомаркерів окисного стресу, індикаторних ензимів печінки, гормонального фону, а також показників росту, імунітету

тощо [32]. Дієтичні добавки НЧ ZnO (10–100 мг/кг ж. м.) підвищували абсорбцію Цинку у курчат-бройлерів та мали позитивний вплив на розвиток великогомілкової кістки та антиоксидантний статус у сироватці крові та тканині печінки, при цьому дозування 70 та 100 мг/кг показали оптимальний ефект [33].

Метою роботи було визначити активність гепатоспецифічних ензимів та оцінити стан протеїнсинтезувальної функції печінки самців щурів за введення наночастинок цинку гідрокарбонату.

Матеріали і методи. Дослідження проведені на 25 статевозрілих самцях щурів лінії Вістар, масою 200–250 г, що утримувались за оптимальних умов віварію: температура у приміщенні складала $18,0 \pm 2$ °C, відносна вологість повітря 60–70 %, цикл освітлення день–ніч, упродовж експерименту, складав 10–14 год, а також було забезпечено 10-ти разову зміну об'єму повітря в кімнаті віварію за годину. Тварини мали вільний доступ до води та корму.

Враховуючи численні дані щодо токсичної дії наночастинок ZnO [14, 34, 35, 36] було розроблено удосконалену технологію синтезу й складу НЧ на основі Цинку — НЧ цинку гідрокарбонату (ZnCH), що були синтезовані у відділі наноструктурних матеріалів імені Ю. В. Малюкіна Інституту сцинтиляційних матеріалів НАНУ. НЧ ZnCH отримували методом співосадження у водних розчинах. Спочатку у певному мольному співвідношенні розчин натрію цитрату (Na₃Cit, Sigma Aldrich, США) змішували з розчином цинку ацетату (Zn(Ac)₂, Sigma Aldrich, США). Потім при інтенсивному перемішуванні до суміші додавали натрію карбонат (Na₂CO₃, Sigma Aldrich, США) у стехіометричному співвідношенні до Zn(Ac)₂. Постійно перемішуючи отриману суміш нагрівали до 80–85 °C і витримували в цих умовах 40–50 хв. Після охолодження колоїдний розчин НЧ піддавали діалізу до води протягом 120 хв у целюлозному діалізному мішку (пори $d = 2,5$ нм, MWCO 12 000 кДа). Кінцеве значення рН розчину становило 7,5. Після цього у якості стабілізатора до розчину додавали 0,6 мас. % полівінілпіролідону. Колоїдний розчин НЧ ZnCH мав вихідну концентрацію 2,5 г/дм³. За даними попередніх досліджень за одноразового внутрішньошлункового введення НЧ ZnCH можна віднести до VI класу токсичності — речовини відносно нешкідливі (ЛД₅₀ > 15000,0 мг/кг маси тіла), а за ступенем небезпечності до IV класу — малонебезпечних речовин (ЛД₅₀ > 5000,0 мг/кг маси тіла) [37].

Перед початком досліджень кожну тварину зважували. За принципом аналогів було сформовано 5 груп тварин: щурам вводили колоїдний розчин наночастинок карбонату цинку в дозах 25,0 мг/кг (дослідна група 1); 50,0 мг/кг (дослідна група 2); 100,0 мг/кг (дослідна група 3); 200,0 мг/кг (дослідна група 4) перорально. Щурам контрольної групи за аналогічним регламентом вводили дистильовану воду в об'ємі 2,0 см³. У кожній групі (як дослідних, так і контрольній) було по 5 щурів.

Після підготовчого періоду (7 діб) — витримування тварин усіх груп на стандартному раціоні, тваринам дослідних груп було задано з кормом упродовж 30 діб розчини НЧ ZnCH у вищезазначених дозах. Спостереження за щурами всіх груп проводили упродовж 45 діб (основний період). Проби крові, для отримання плазми, відбирали на 15-ту, 30-ту і 45-ту добу основного періоду досліджень. Для оцінки гепатотоксичності визначали активність аланінамінотрансферази (АлАТ), аспартатамінотрансферази (АсАТ), лужної фосфатази (ЛФ) та гаммаглутамілтранспептидази (ГГТП), а також рівень загального протеїну, альбумінів і глобулінів, за використання наборів реактивів виробництва НВП «Філісіт-Діагностика» (Україна) [38].

Усі маніпуляції над щурами здійснювали відповідно до існуючих нормативних документів, що регламентують організацію робіт із використанням експериментальних тварин і дотриманням принципів «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються в експериментальних та інших наукових цілях» (Страсбург, 1986).

Статистичну обробку результатів експерименту для визначення біометричних показників (середні значення та їх похибки, порівняння середніх значень за критерієм Стьюдента) проводили за допомогою програми *Microsoft Excel*.

Результати досліджень та їх обговорення. Внаслідок хронічного надходження (30 діб) дозового діапазону 25–200 мг/кг ж. м. НЧ ZnCH клінічними спостереженнями протягом 45 діб

загибелі експериментальних тварин чи ознак отруєння у них зареєстровано не було. Динаміка активності індикаторних ензимів печінки у щурів наведено у таблиці 1.

Таблиця 1 — Активність гепатоспецифічних ензимів у плазмі крові щурів за хронічного надходження наночастинок цинку гідрокарбонату

Показник	Групи щурів:				
	контрольна (n=5)	дослідна 1 (n=5)	дослідна 2 (n=5)	дослідна 3 (n=5)	дослідна 4 (n=5)
15-та доба дослідження					
АлАТ, мкмоль/год см ³	1,41 ± 0,11	1,44 ± 0,09	1,39 ± 0,06	1,47 ± 0,14	1,51 ± 0,13
АсАТ, мкмоль/год см ³	1,31 ± 0,06	1,29 ± 0,05	1,32 ± 0,06	1,34 ± 0,07	1,37 ± 0,09
ГГТП, ммоль/год л	2,61 ± 0,04	2,54 ± 0,03	2,67 ± 0,07	2,71 ± 0,06	2,84 ± 0,08*
ЛФ, нмоль/сек л	2137,6 ± 134,8	2241,4 ± 142,3	2274,7 ± 130,8	2336,8 ± 127,9	2674,4 ± 157,3*
30-та доба дослідження					
АлАТ, мкмоль/год см ³	1,47 ± 0,09	1,53 ± 0,05	1,42 ± 0,07	1,54 ± 0,08	1,84 ± 0,11*
АсАТ, мкмоль/год см ³	1,33 ± 0,11	1,30 ± 0,06	1,34 ± 0,09	1,31 ± 0,05	1,51 ± 0,04
ГГТП, ммоль/год л	2,57 ± 0,03	2,63 ± 0,05	2,71 ± 0,09	2,77 ± 0,08*	2,92 ± 0,09**
ЛФ, нмоль/сек л	2213,8 ± 120,6	2281,1 ± 137,6	2314,1 ± 126,4	2407,3 ± 131,7	2793,7 ± 140,2*
45-та доба дослідження					
АлАТ, мкмоль/год см ³	1,52 ± 0,12	1,61 ± 0,08	1,54 ± 0,11	1,67 ± 0,09	1,96 ± 0,13*
АсАТ, мкмоль/год см ³	1,41 ± 0,09	1,34 ± 0,07	1,35 ± 0,08	1,37 ± 0,06	1,63 ± 0,03*
ГГТП, ммоль/год л	2,49 ± 0,07	2,61 ± 0,04	2,63 ± 0,04	2,73 ± 0,06	2,74 ± 0,03
ЛФ, нмоль/сек л	2084,7 ± 117,6	2191,6 ± 129,4	2266,3 ± 136,1	2309,4 ± 119,1	2490,8 ± 131,2

Примітки: * — P<0,05; ** — P<0,01 — порівняно з показниками контрольної групи.

З даних таблиці 1 видно, що виражених змін активності ензиматичних детоксикаційних систем в організмі щурів дослідних груп 1–3 виявлено не було, а у дослідній групі 4 спостерігали зростання активності АлАТ, АсАТ протягом експерименту. Так, на 30-ту добу дослідження відбувалася незначна активація АлАТ на 25,2 % (P<0,05), тоді як активність інших гепатоспецифічних ензимів мала лише тенденцію до зростання. Після закінчення введення НЧ ZnCN залишалися деякі ознаки гепатотоксичності — активність АлАТ і АсАТ була вищою контролю на 28,9 і 15,6 % відповідно (P<0,05).

Більш виразних змін зазнавала активність ГГТП в динаміці дослідження. У тварин дослідних груп 1 і 2 спостерігали незначну тенденцію до активації даного ензиму. У щурів дослідної групи 3 активність ГГТП виявляла тенденцію до зростання на 15-ту добу, була вищою контрольних значень на 30-ту і 45-ту добу дослідження — на 7,8 і 9,6 % відповідно (P<0,05). За введення найвищої дози НЧ ZnCN — у тварин дослідної групи 4 встановлено достовірно вищу активність ГГТП протягом усього терміну дослідження: так, на 15-ту добу активація даного ензиму була на 8,8 % вище контролю (P<0,05), на 30-ту добу досягала максимального значення, що було на 13,6 % (P<0,01) більшим значення контрольної групи та на 45-ту добу експерименту залишалася вищою на 10,0 % (P<0,05), що вказувало на токсичний вплив дозування 200 мг/кг ж. м.

Подібними змінами у дослідній групі 4 характеризувалася динаміка активності ЛФ, що протягом усього періоду дослідження перевищувала контрольні значення, зокрема на 15-ту, 30-ту і 45-ту добу — на 25,1, 26,2 і 19,5 % (P<0,05). Разом з тим, у тварин дослідних груп 1–3

активація ЛФ достовірних змін не мала. Таким чином, введення найвищої дози НЧ ZnCN призводило до вивільнення індикаторних ензимів печінки, що вказує на цитоліз гепатоцитів у щурів дослідної групи 4 та виражену гепатотоксичність введеної ним дози НЧ.

Наступним завданням при оцінці впливу хронічного надходження НЧ ZnCN на функціональну активність печінки щурів було визначення стану протеїнсинтезувальної здатності за показниками білкового профілю плазми крові — рівня загального протеїну, кількості альбумінів і глобулінів, що узагальнено у таблиці 2.

Таблиця 2 — Стан протеїнсинтезувальної функції печінки у щурів за хронічного надходження наночастинок цинку гідрокарбонату

Показник	Групи щурів:				
	контрольна (n=5)	дослідна 1 (n=5)	дослідна 2 (n=5)	дослідна 3 (n=5)	дослідна 4 (n=5)
15-та доба дослідження					
Загальний протеїн, г/дм ³	59,3 ± 1,7	61,6 ± 2,0	62,2 ± 1,4	61,4 ± 1,6	57,0 ± 1,1
Альбуміни, г/дм ³	35,4 ± 1,4	36,0 ± 1,2	36,3 ± 2,2	35,2 ± 1,0	34,6 ± 1,8
Глобуліни, г/дм ³	23,9 ± 0,8	25,6 ± 1,1	25,9 ± 1,3	26,2 ± 1,1	22,4 ± 0,9
30-та доба дослідження					
Загальний протеїн, г/дм ³	63,5 ± 2,2	60,7 ± 1,6	60,8 ± 1,4	63,1 ± 1,8	52,4 ± 1,2**
Альбуміни, г/дм ³	38,2 ± 2,2	36,4 ± 1,6	36,2 ± 1,2	36,0 ± 0,8	32,2 ± 1,4*
Глобуліни, г/дм ³	25,3 ± 1,6	24,3 ± 0,7	24,6 ± 1,1	27,1 ± 0,6	20,2 ± 0,4*
45-та доба дослідження					
Загальний протеїн, г/дм ³	62,9 ± 1,8	64,4 ± 2,1	63,2 ± 1,6	64,4 ± 1,4	57,0 ± 1,1*
Альбуміни, г/дм ³	36,8 ± 1,8	38,1 ± 1,2	37,8 ± 1,4	35,6 ± 1,8	35,3 ± 1,0
Глобуліни, г/дм ³	26,1 ± 1,4	26,3 ± 1,1	25,4 ± 0,9	28,8 ± 1,2	21,7 ± 0,8*

Примітки: * — P<0,05; ** — P<0,01 — порівняно з показниками контрольної групи.

Дані таблиці 2 свідчать, що у щурі дослідних груп 1–3 протеїнсинтезувальна функція печінки упродовж всього терміну дослідження достовірних змін відносно значень контрольної групи не зазнавала. Водночас варто звернути увагу на тенденцію до зростання рівня глобулінів у щурів цих груп на 15-ту добу дослідження і збереження зареєстрованої тенденції у тварин дослідної групи 3 протягом усього дослідження. Такі коливання у протеїнограмі плазми крові дослідних тварин є опосередкованим свідченням позитивного впливу НЧ ZnCN на імунний статус щурів.

Натомість, у дослідній групі 4 всі досліджені показники протеїнового профілю плазми крові зменшувалися — на 15-ту добу було відзначено наявність тенденції до зниження, особливо рівня загального протеїну і глобулінів. На 30-ту добу рівень цих показників був нижчим даних контролю на 3,9 і 6,3 % (P<0,05–0,01), а рівень альбумінів — меншим на 15,7 % (P<0,05). Наприкінці експерименту, на 45-ту добу, у тварин дослідної групи 4 рівень загального протеїну був нижчим контрольних значень на 9,4, а рівень глобулінів — на 16,9 % (P<0,05). Таким чином, у щурів за введення максимальної дози НЧ ZnCN протеїнограма плазми крові показала прояв токсичного впливу даної дози, що узгоджується із змінами активності ензимних систем природної інтоксикації, що свідчить про гепатотоксичність НЧ ZnCN у дозуванні 200 мг/кг м. т.

Отримані дані узгоджуються із результатами Srivastav зі співавт. (2016), що спостерігали зміну біомаркерів гепатотоксичності — АлАТ, ЛФ та інших ензимів за введення НЧ ZnO у дозі 300 мг/кг ж. м. [14]. Зауважимо, що зміна шляху введення не змінює прояву гепатотоксичності НЧ ZnO — так, Abouzeinab зі співавт. (2023) встановили активацію індикаторних ензимів печінки за інтраперитонеального введення у дозі 200 мг/кг ж. м. [34]. Результати Daei зі співавт. (2023) показали, що НЧ ZnO у дозі 200 мг/кг ж. м. покращують відношення мРНК Вах до Vcl-2 та експресію протеїну, а також активність каспази порівняно з контрольною групою. Крім того, отримані дані вказують на те, що підвищений рівень TNF-α може бути пов'язаний з апоптозом, опосередкованим НЧ ZnO, у печінці щурів [35]. Менша доза (100 мг/кг ж. м.) НЧ ZnO, як було встановлено Abo-EI-Sooud зі співавт. (2023) також викликала виразний ушкоджувальний вплив на печінку щурів [36]. У нашому дослідженні НЧ ZnCN у дозовому діапазоні 25–100 мг/кг ж. м.

(дослідні групи 1–3) ознак ураження печінки не виявляли, що свідчить про зменшення токсичного впливу даних НЧ порівняно з НЧ ZnO.

Висновки. За результатами оцінки динаміки активності гепатоспецифічних ензимів та протеїнограми у самців щурів за перорального введення НЧ ZnCN підсумовано наступне:

1. Загибелі чи ознак отруєння у тварин за хронічного надходження (30 діб) НЧ ZnCN у дозуванні 25–200 мг/кг ж. м. зареєстровано не було. Порушень процесів природної детоксикації організму — зниження активності індикаторних ензимів у печінці (АсАТ, АлАТ, ЛФ і ГГТП) щурів дослідних груп 1–3 не спостерігали. Лише у дослідній групі 3 активність ГГТП була вищою на 30-ту і 45-ту добу — на 7,8 і 9,6 % відповідно ($P < 0,05$) порівняно з контролем.

2. У тварин дослідної групи 4 (200 мг/кг ж. м.) на 30-ту добу дослідження відбувалося зростання активності АлАТ на 25,2 %, а на 45-ту добу — АлАТ і АсАТ на 28,9 і 15,6 % відповідно ($P < 0,05$). Разом з тим весь термін дослідження у тварин даної групи спостерігали достовірно вищу активність ГГТП: на 15-ту, 30-ту і 45-ту добу — на 8,8, 13,6 і 10,0 % відповідно ($P < 0,05–0,01$). Подібну динаміку виявляла й активність ЛФ: на 15-ту, 30-ту і 45-ту добу вона була на 25,1, 26,2 і 19,5 % ($P < 0,05$) вищою контрольних значень.

3. Стан протеїнсинтезувальної функції печінки щурів за введення НЧ ZnCN у дозі 25–100 мг/кг ж. м. (дослідні групи 1–3) не зазнавав достовірних змін, але тенденції що спостерігали протягом експерименту свідчать про покращення протеїнового профілю, особливо рівня глобулінів. У дослідній групі 4 відзначали негативний стан протеїнового обміну — рівні загального протеїну, альбумінів і глобулінів були нижчі даних контролю протягом усього терміну дослідження.

Перспективи подальших досліджень. Отримані дані щодо гепатотоксичності НЧ ZnCN потребують поглиблених досліджень гістоморфології печінки та токсикокінетики Цинку, адже органом-мішенню для даного металу є саме печінка. Також автори даної статті зацікавлені визначити вплив досліджених дозувань НЧ ZnCN на функціональний стан нирок, серця і статевих залоз тварин.

Список літератури

1. Pei X., Jiang H., Xu G., Li C., Li D., Tang S. Lethality of Zinc Oxide Nanoparticles Surpasses Conventional Zinc Oxide via Oxidative Stress, Mitochondrial Damage and Calcium Overload: A Comparative Hepatotoxicity Study. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022. Vol. 23, No 12. P. 6724. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms23126724>.
2. Forest V. Experimental and Computational Nanotoxicology—Complementary Approaches for Nanomaterial Hazard Assessment. *Nanomaterials*. 2022. Vol. 12, No 8. P. 1346. DOI: <https://doi.org/10.3390/nano12081346>.
3. Adeniyi O. E., Adebayo O. A., Akinloye O., Adaramoye O. A. Combined cerium and zinc oxide nanoparticles induced hepato-renal damage in rats through oxidative stress mediated inflammation. *Scientific Reports*. 2023. Vol. 13, No 1. P. 8513. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-023-35453-5>.
4. Hashim M., Mujahid H., Hassan S., Bukhari S., Anjum I., Hano C., Abbasi B. H., Anjum S. Implication of Nanoparticles to Combat Chronic Liver and Kidney Diseases: Progress and Perspectives. *Biomolecules*. 2022. Vol. 12, No 10. P. 1337. DOI: <https://doi.org/10.3390/biom12101337>.
5. Watson C. Y., Molina R. M., Louzada A., Murdaugh K. M., Donaghey T. C., Brain J. D. Effects of zinc oxide nanoparticles on Kupffer cell phagosomal motility, bacterial clearance, and liver function. *International journal of nanomedicine*. 2015. Vol. 10. P. 4173–4184. DOI: <https://doi.org/10.2147/IJN.S82807>.
6. Singh A. V., Varma M., Laux P., Choudhary S., Datusalia A. K., Gupta N., Luch A., Gandhi A., Kulkarni P., Nath B. Artificial intelligence and machine learning disciplines with the potential to improve the nanotoxicology and nanomedicine fields: a comprehensive review. *Archives of toxicology*. 2023. Vol. 97. P. 963–979. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00204-023-03471-x>.
7. Ahmed E. S., Mohamed H. E., Farrag M. A. Luteolin loaded on zinc oxide nanoparticles ameliorates non-alcoholic fatty liver disease associated with insulin resistance in diabetic rats via regulation of PI3K/AKT/FoxO1 pathway. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*. 2022. Vol. 36. P. 039463202211374. DOI: <https://doi.org/10.1177/03946320221137435>.
8. Mohammed E. T., Safwat G. M., Bahnasawy E. A., Abdel-Razik A. H., Mohamed D. S. Zinc Oxide Nanoparticles and Vitamin C Ameliorate Atrazine-Induced Hepatic Apoptosis in Rat via CYP450s/ROS Pathway and Immunomodulation. *Biological trace element research*. 2023. Vol. 201, No 11. P. 5257–5271. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12011-023-03587-2>.
9. do Carmo Neto J. R., Franco P. I. R., Braga Y. L. L., de Oliveira J. F., Perini H. F., Albuquerque L. F. D., Martins D. B., Helmo F. R., Andrade A. A., Miguel M. P., Celes M. R. N., Rocha T. L., Almeida Silva A. C., Machado J. R., da Silva M. V. Toxicity Assessment of New Ag-ZnO/AgO Nanocomposites: An In Vitro and In Vivo Approach. *Journal of Functional Biomaterials*. 2024. Vol. 15, No 3. P. 51. DOI: <https://doi.org/10.3390/jfb15030051>.
10. Yi J., Li Y., Mai Q., Li Y., Lin Y., Weng X., Ai Z., Li M., Shang P., Iqbal M., Mehmood K., Chang Y. F., Tang Z., Zhang H., Li, Y. Hepatotoxicity and the role of the gut-liver axis in dogs after oral administration of zinc oxide

- nanoparticles. *Metalomics: integrated biometal science* 2022. Vol. 14, No 11. P. mfac066. DOI: <https://doi.org/10.1093/mtomcs/mfac066>.
11. Rahimi G., Mohammad K. S., Zarei M., Shokoohi M., Oskoueian E., Poorbagher M. R. M., Karimi E. Zinc oxide nanoparticles synthesized using *Hyssopus Officinalis* L. extract induced oxidative stress and changes the expression of key genes involved in inflammatory and antioxidant Systems. *Biological research*. 2022. Vol. 55, No 1. P. 24. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40659-022-00392-4>.
 12. Horie M., Tabei Y. Role of oxidative stress in nanoparticles toxicity. *Free radical research*. 2021. Vol. 55, No 4. P. 331–342. DOI: <https://doi.org/10.1080/10715762.2020.1859108>.
 13. Almansour M. I., Alferah M. A., Shraideh Z. A., Jarrar B. M. Zinc oxide nanoparticles hepatotoxicity: Histological and histochemical study. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2017. Vol. 51. P. 124–130. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.etap.2017.02.015>.
 14. Srivastav A. K., Kumar M., Ansari N. G., Jain A. K., Shankar J., Arjaria N., Jagdale P., Singh D. A comprehensive toxicity study of zinc oxide nanoparticles versus their bulk in Wistar rats: Toxicity study of zinc oxide nanoparticles. *Human & experimental toxicology*. 2016. Vol. 35, No 12. P. 1286–1304. DOI: <https://doi.org/10.1177/0960327116629530>.
 15. Ziamajidi N., Khajvand-Abedini M., Daei S., Abbasalipourkabir R., Nourian A. Ameliorative Effects of Vitamins A, C, and E on Sperm Parameters, Testis Histopathology, and Oxidative Stress Status in Zinc Oxide Nanoparticle-Treated Rats. *BioMed research international*. 2023. P. 4371611. DOI: <https://doi.org/10.1155/2023/4371611>.
 16. Bayat M., Daei S., Ziamajidi N., Abbasalipourkabir R., Nourian A. The protective effects of vitamins A, C, and E on zinc oxide nanoparticles (ZnO NPs)-induced liver oxidative stress in male Wistar rats. *Drug and chemical toxicology*. 2023. Vol. 46, No 2. P. 209–218. DOI: <https://doi.org/10.1080/01480545.2021.2016809>.
 17. Al-Ragi M. J., Kariab S. S., Fathallah N., Zaïri A. Effect of Zinc Oxide Nanoparticles on Liver Functions in Albino Mice. *Cureus*. 2024. Vol. 16, No 2. P. e54822. DOI: <https://doi.org/10.7759/cureus.54822>.
 18. Jafar Sameri M., Savari F., Mard S. A., Rezaie A., Kalantar M. Zinc Oxide Nanoparticles Ameliorate Histological Alterations Through Apoptotic Gene Regulation in Rat Model of Liver Ischemia-Reperfusion Injury. *Reports of biochemistry & molecular biology*. 2024. Vol. 12, No 4. P. 619–630. DOI: <https://doi.org/10.61186/rbmb.12.4.619>.
 19. Pei X., Tang S., Jiang H., Zhang W., Xu G., Zuo Z., Ren Z., Chen C., Shen Y., Li C., Li D. Paeoniflorin recued hepatotoxicity under zinc oxide nanoparticles exposure via regulation on gut-liver axis and reversal of pyroptosis. *The Science of the total environment*. 2023. Vol. 904. P. 166885. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.166885>.
 20. Moselhy W. A., Ibrahim M. A., Khalifa A. G., El-Nahass E. S., Hassan N. E. Y. The effects of TiO₂, ZnO, IONs and Al₂O₃ metallic nanoparticles on the CYP1A1 and NBN transcripts in rat liver. *Toxicology research*. 2024. Vol. 13, No 2. P. tfae034. DOI: <https://doi.org/10.1093/toxres/tfae034>.
 21. Pei X., Jiang H., Li C., Li D., Tang S. Oxidative stress-related canonical pyroptosis pathway, as a target of liver toxicity triggered by zinc oxide nanoparticles. *Journal of hazardous materials*. 2023. Vol. 442. P. 130039. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.130039>.
 22. Pei X., Liu D., Li J., Li L., Ding X., Zhang W., Li Z., Xu G., Li C., Li D. TFEB coordinates autophagy and pyroptosis as hepatotoxicity responses to ZnO nanoparticles. *The Science of the total environment*. 2023. Vol. 865. P. 161242. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.161242>.
 23. Tang H. Q., Xu M., Rong Q., Jin R. W., Liu Q. J., Li Y. L. The effect of ZnO nanoparticles on liver function in rats. *International journal of nanomedicine*. 2016. Vol. 11. P. 4275–4285. DOI: <https://doi.org/10.2147/IJN.S109031>.
 24. Wang C., Cheng K., Zhou L., He J., Zheng X., Zhang L., Zhong X., Wang T. Evaluation of Long-Term Toxicity of Oral Zinc Oxide Nanoparticles and Zinc Sulfate in Mice. *Biological trace element research*. 2017. Vol. 178, No 2. P. 276–282. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12011-017-0934-1>.
 25. Liang C., Fang J., Hu J., Geng X., Liu H., Feng Y., Wang W., Cui W., Yu Z., Jia X. Toxicokinetics of zinc oxide nanoparticles and food grade bulk-sized zinc oxide in rats after oral dosages. *NanoImpact*. 2022. Vol. 25. P. 100368. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.impact.2021.100368>.
 26. Sattar Ali Z. Hepatic Impact of Different Concentrations of Hibiscus rosa Zinc Oxide Nanoparticles on Rats. *Archives of Razi Institute*. 2022. Vol. 77, No 3. P. 1199–1206. DOI: <https://doi.org/10.22092/ARI.2022.357530.2060>.
 27. Ahmad A., Imran M., Sharma N. Precision Nanotoxicology in Drug Development: Current Trends and Challenges in Safety and Toxicity Implications of Customized Multifunctional Nanocarriers for Drug-Delivery Applications. *Pharmaceutics*. 2022. Vol. 14 No 11. P. 2463. DOI: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14112463>
 28. Hassan M. A., El-Nekeety A. A., Abdel-Aziem S. H., Hassan N. S., Abdel-Wahhab M. A. Zinc citrate incorporation with whey protein nanoparticles alleviate the oxidative stress complication and modulate gene expression in the liver of rats. *Food and chemical toxicology*. 2019. Vol. 125. P. 439–451. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.01.026>.
 29. Koshevoy V., Naumenko S., Skliarov P., Syniahovska K., Vikulina G., Klochkov V., Yefimova S. Effect of gadolinium orthovanadate nanoparticles on male rabbits' reproductive performance under oxidative stress. *World's Veterinary Journal*. 2022. Vol. 12, No 3. P. 296–303. DOI: <https://doi.org/10.54203/scil.2022.vwj37>.
 30. Naumenko S., Koshevoy V., Matsenko O., Miroshnikova O., Zhukova I., Bepalova I. Antioxidant properties and toxic risks of using metal nanoparticles on health and productivity in poultry. *Journal of World's Poultry Research*. 2023. Vol. 13, No 3. P. 292–306. DOI: <https://www.doi.org/10.36380/jwpr.2023.32>.
 31. Pei X., Xiao Z., Liu L., Wang G., Tao W., Wang M., Zou J., Leng D. Effects of dietary zinc oxide nanoparticles supplementation on growth performance, zinc status, intestinal morphology, microflora population, and immune response in weaned pigs. *Journal of the science of food and agriculture*. 2019. Vol. 99, No 3. P. 1366–1374. DOI: <https://doi.org/10.1002/jsfa.9312>.

32. Abdel-Wareth A. A. A., El-Sayed H. G. M., Abdel-Warith A. A., Younis E. M., Hassan H. A., Affi A. S., El-Chaghaby G. A., Rashad S., Amer S. A., Lohakare J. Effects of Dietary Acacia nilotica Fruit, Zinc Oxide Nanoparticles and Their Combination on Productive Performance, Zinc Retention, and Blood Biochemistry of Rabbits. *Animals*. 2023. Vol. 13, No 20. P. 3296. DOI: <https://doi.org/10.3390/ani13203296>.
33. Mohd Yusof H., Abdul Rahman N., Mohamad R., Zaidan U. H., Samsudin A. A. Influence of Dietary Biosynthesized Zinc Oxide Nanoparticles on Broiler Zinc Uptake, Bone Quality, and Antioxidative Status. *Animals*. 2022. Vol. 13, No 1. P. 115. DOI: <https://doi.org/10.3390/ani13010115>.
34. Abouzeinab N. S., Kahil N., Fakhruddin N., Awad R., Khalil M. I. Intraperitoneal hepato-renal toxicity of zinc oxide and nickel oxide nanoparticles in male rats: biochemical, hematological and histopathological studies. *EXCLI journal*. 2023. Vol. 22. P. 619–644. DOI: <https://doi.org/10.17179/excli2023-6237>.
35. Daei S., Abbasalipourkabir R., Khajvand-Abedini M., Ziamajidi N. The Alleviative Efficacy of Vitamins A, C, and E Against Zinc Oxide Nanoparticles-Induced Hepatic Damage by Reducing Apoptosis in Rats. *Biological trace element research*. 2023. Vol. 201, No 3. P. 1252–1260. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12011-022-03218-2>.
36. Abo-El-Sooud K., Abd-El Hakim Y. M., Hashem M. M. M., El-Metwally A. E., Hassan B. A., El-Nour H. H. M. Restorative effects of gallic acid against sub-chronic hepatic toxicity of co-exposure to zinc oxide nanoparticles and arsenic trioxide in male rats. *Heliyon*. 2023. Vol. 9, No 6. P. e17326. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e17326>.
37. Koshevoy V., Naumenko S., Orobchenko O., Bepalova I. Acute toxicity of zinc carbonate nanocrystals on white mice model. *Scientific Messenger of LNU of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Veterinary Sciences*. 2023. Vol. 25, No 112. P. 123–130. DOI: <https://doi.org/10.32718/nvlvet11220>.
38. Kutsan O. T., Romanko M. E., Orobchenko O. L., Ushkalov V. O. *Toxico-biochemical assessment of nanometals by systemic markers when used in veterinary medicine*. Kharkiv : NTMT, 2016. 327 p.

**DYNAMICS OF THE ACTIVITY OF HEPATO-SPECIFIC ENZYMES AND
THE STATE OF PROTEIN SYNTHESIZER FUNCTION OF THE LIVER IN RATS
DURING CHRONIC INTAKE OF ZINC CARBONATE HYDROXIDE NANOPARTICLES**

Koshevoy V. I.¹, Naumenko S. V.¹, Bepalova I. I.², Radzihovskyi M. L.³, Balyu Yu. P.¹

¹ State Biotechnological University, Kharkiv, Ukraine

² Institute for Scintillation Materials of NAS of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

³ National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

Toxicological properties of zinc-based nanoparticles (NPs) encourage researchers to create new, safe, and environmentally friendly compounds of this trace element. In this article, we determined the parameters of hepatotoxicity of zinc carbonate hydroxide (ZnCH) NPs obtained by coprecipitation method. For this purpose, in a chronic toxicological experiment on 25 male Wistar rats, the activity of liver indicator enzymes (ALT, AST, GGT, and ALP) and the protein profile of blood plasma were determined after administration of various doses of ZnCH NPs for 30 days. According to the results of studies on chronic oral administration of ZnCH NPs, there were no deaths or signs of intoxication in animals at the dose of 25–200 mg/kg body weight. Violations of the processes of natural detoxification of the body — a decrease in the activity of indicator enzymes in the liver of rats of experimental groups 1–3 were not observed. Only in experimental group 3 the GGT activity was higher on the 30th and 45th day — by 7.8 and 9.6%, respectively ($P < 0.05$) in comparison with the control group. In the animals of experimental group 4 (200 mg/kg body weight), ALT activity increased by 25.2% on day 30 of the study, and ALT and AST activity increased by 28.9% and 15.6%, respectively, on day 45 ($P < 0.05$). At the same time, animals in this group had significantly higher GGT activity throughout the study period: on days 15, 30, and 45 — by 8.8, 13.6, and 10.0%, respectively ($P < 0.05–0.01$). ALP activity showed similar dynamics: on days 15, 30, and 45, it was 25.1, 26.2, and 19.5% ($P < 0.05$) higher than the control values. The state of the protein-synthesizing function of the liver of rats after administration of ZnCH NPs in the dose of 25–100 mg/kg bw (experimental groups 1–3) did not undergo significant changes, but the trends observed during the experiment indicate an improvement of the protein profile, especially the level of globulins. In research group 4, a negative state of protein metabolism was noted — the levels of total protein, albumins and globulins were lower than the control data throughout the study period

Keywords: toxicity, nanoparticles, Zinc, metabolism, liver