

ISSN 1561-8323 (Print)

ISSN 2524-2431 (Online)

УДК 577.352

<https://doi.org/10.29235/1561-8323-2019-63-1-72-78>

Поступило в редакцию 03.10.2018

Received 03.10.2018

**Ю. М. Гармаза, А. В. Тамашевский, член-корреспондент Е. И. Слобожанина***Институт биофизики и клеточной инженерии Национальной академии наук Беларуси,  
Минск, Республика Беларусь***МЕМБРАННЫЕ ЭФФЕКТЫ ВОЗДЕЙСТВИЯ НАНОСТЕРЖНЕЙ  
И НАНОЧАСТИЦ ОКСИДА ЦИНКА НА ЛИМФОЦИТЫ ЧЕЛОВЕКА**

**Аннотация.** Выявлено снижение микровязкости в гидрофильной области и ее увеличение в гидрофобной области липидного бислоя (внешнего монослоя) мембраны лимфоцитов после воздействия наностержней оксида цинка (ZnO NRs). При этом не обнаружено статистически достоверных изменений исследуемых параметров при действии наночастиц оксида цинка (ZnO NPs). Изучение структурного состояния белкового компонента клеточных мембран выявило увеличение количества NH<sub>2</sub>-групп на поверхности мембран только после действия ZnO NRs. Установлено, что экспозиция клеток с ZnO NPs сопровождалась увеличением содержания SH-групп белков на поверхности мембран лимфоцитов, а взаимодействие ZnO NRs с клеткой приводило к окислению белковых сульфгидрильных групп. Согласно результатам сканирующей электронной микроскопии геометрические размеры наночастиц не превышали 30–100 нм, а диаметр наностержней оксида цинка составлял 70–150 нм при их длине до 500 нм. Полученные результаты могут быть частично объяснены возможностью наночастиц проникать внутрь клетки, а предполагаемым механизмом взаимодействия наностержней с клеткой является электростатическое взаимодействие или «прокалывание» цитоплазматической мембраны.

**Ключевые слова:** наностержни и наночастицы оксида цинка, микровязкость липидного бислоя, структурное состояние мембранных белков, лимфоциты человека

**Для цитирования.** Гармаза, Ю. М. Мембранные эффекты воздействия наностержней и наночастиц оксида цинка на лимфоциты человека / Ю. М. Гармаза, А. В. Тамашевский, Е. И. Слобожанина // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2019. – Т. 63, № 1. – С. 72–78. <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2019-63-1-72-78>

**Yuliya M. Harmaza, Alexander V. Tamashevski, Corresponding Member Ekaterina I. Slobozhanina***Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus***MEMBRANE EFFECTS OF ZINC OXIDE NANORODS AND NANOPARTICLES  
IN HUMAN LYMPHOCYTES**

**Abstract.** The study of the physical state of membrane lipids after the exposure of lymphocytes to ZnO NRs revealed a decrease in the lipid microviscosity of the hydrophilic membrane area and its increase in the hydrophobic area (external monolayer). The effects of ZnO NPs on membrane lipid components were not significant. Investigations of the membrane proteins conformation state revealed a rise of the protein NH<sub>2</sub>-groups level on the membrane surface only after the lymphocytes exposure to ZnO NRs. The level of SH-groups of the membrane protein after the action of ZnO NPs increased, otherwise the interaction of ZnO NRs with cells leads to the oxidation of thiol groups. According to the results of SEM, the geometric size of ZnO NPs did not exceed 30–100 nm, the diameter of ZnO NRs was 70–150 nm and the length – more than 500 nm. So the obtained results of toxicological tests can be partly explained by the possibility of ZnO NPs to enter into the cell but the most probable mechanisms for the NRs interaction with the cell are an electrostatic interaction or membrane puncturing.

**Keywords:** zinc oxide nanorods and nanoparticles, lipid bilayer microviscosity, a structural state of membrane proteins, human lymphocytes

**For citation:** Harmaza Yu. M., Tamashevski A. V., Slobozhanina E. I. Membrane effects of zinc oxide nanorods and nanoparticles in human lymphocytes. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2019, vol. 63, no. 1, pp. 72–78 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2019-63-1-72-78>

**Введение.** При быстрых темпах развития области нанотехнологий постоянно растет число наноматериалов, которые имеют широкое применение в повседневной жизни человека. Наноструктурированный оксид цинка (ZnO) также нашел широкий спектр применения в биомедицинском секторе, включая биовизуализацию и адресную доставку лекарственных средств [1]. Более того, на сегодняшний день наноструктуры оксида цинка являются одними из часто

используемых материалов для создания иммуносенсоров благодаря их большой площади поверхности и химической стабильности, а также хорошей совместимости с биообъектами [2; 3]. Однако оказалось, что в сравнении с другими металл-содержащими наноматериалами ZnO-наноструктуры при попадании в организм человека проявляют повышенную цитотоксичность из-за более низкого заряда их катиона [4].

Токсическое действие наночастиц оксида цинка было изучено на животных моделях *in vivo*: как при остром (до 14 дней) [5], суб-остром (от 15 дней до 4 нед.), суб-хроническом (до 90 дней) [6], так и при хроническом (до 4 мес.) их воздействии [7], а также на клетках и клеточных линиях человека *in vitro* [8; 9]. Обнаружено, что окислительный стресс (усиление процессов перекисного окисления липидов, ингибирование активности супероксиддисмутазы, глутатионпероксидазы, глутатион-S-трансферазы и снижение концентрации восстановленного глутатиона) [9; 10] и воспалительные процессы (экспрессия некоторых воспалительных факторов IL-1b, IL-6, IL-8, IL-12, TNF-a, IFN-g, MCP-1, CRP) [4; 6; 11] – два основных компонента в механизме токсичности наноматериалов на основе ZnO. Также было показано, что апоптотические сигнальные пути, включающие белок p53 и каспазу-3 [9; 10], играют важную роль в цитотоксичности наноструктурированного ZnO. Но точный механизм, лежащий в основе этих эффектов, до сих пор не известен.

Продемонстрировано, что в целом токсичность наноматериалов значительно варьирует в зависимости от размера их частиц (эта зависимость носит обратный характер), а разные формы с фиксированным размером и площадью поверхности оказывают различное токсическое действие на клетку [12]. Кроме того, при изучении влияния поверхностного заряда наночастиц на основе оксида металла (TiO<sub>2</sub>, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, ZnO) Jiang и соавт. [13] обнаружили, что наночастицы оксида цинка предпочтительно прикрепляются к отрицательно заряженной поверхности бактериальной клетки. Согласно этим результатам, токсичность данных наноструктур существенно зависит от их физико-химических свойств. Таким образом, выявление взаимосвязи между биологическими эффектами на клетку и физико-химическими свойствами наноструктурированного оксида цинка является важной задачей для дальнейших исследований потенциальных рисков, связанных с их воздействием.

Цель работы – проведение сравнительного анализа действия различных форм наноразмерного оксида цинка (наностержни – ZnO NRs и наночастицы – ZnO NPs) на структурно-функциональное состояние белков и липидов мембран лимфоцитов человека.

**Материалы и методы исследования.** В работе использована периферическая кровь практически здоровых доноров (антикоагулянт – гепарин), полученная из РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий Министерства здравоохранения Республики Беларусь. Периферические мононуклеарные клетки (ПМНК) крови выделяли в градиенте плотности Histopaque-1077 путем центрифугирования в течение 30 мин, 300g.

Порошок ZnO NPs и ZnO NRs разводили в деионизированной воде до конечной концентрации 1 мг/мл. Перед каждым использованием полученную суспензию обрабатывали ультразвуком в течение 30 мин, 22 кГц. Морфологию ZnO NRs и ZnO NPs изучали методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) при увеличении 50000 с электрическим напряжением 3,0 кВ.

Клетки инкубировали с ZnO NPs, ZnO NRs и ZnCl<sub>2</sub> в концентрациях 10 и 50 мкг/мл в течение 3 ч в питательной среде RPMI-1640 с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки и 2 mM L-глутамин в увлажненной атмосфере с 5%-ным содержанием CO<sub>2</sub> при температуре 37 °C. Отмывку проводили в течение 10 мин, 300g в 10 mM фосфатном буфере следующего состава: KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 2 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O – 10 mM, NaCl – 137 mM, KCl – 2,7 mM, pH 7,4 (PBS), супернатант удаляли, а клетки ресуспензировали в том же буфере и использовали в дальнейших экспериментальных протоколах.

Изменение микровязкости липидного бислоя мембран лимфоцитов изучали с использованием липофильных флуоресцентных зондов 1-(4-триметиламмоний)-6-фенил-1,3,5-гексатриена (ТМА-ДФГ) и 6-додеканол-2-диметиламинонафтадена (лаурдана). Оценку уровня сульфгидрильных (SH)-групп белков мембран ПМНК проводили с использованием N-(1-пирен)-малеимида (ПМ). Об уровне NH<sub>2</sub>-групп на поверхности мембран клеток судили по интенсивности флуоресценции флуорескамина (4-фенилспиро[фуран-2(3H),1'-фталан]-3,3'-диона).

Флуориметрический анализ проводили на спектрофлуориметре SM2203 (СОЛАР, Беларусь), а СЭМ-исследования с помощью сканирующего электронного микроскопа S-4800 FE-SEM (Hitachi, Япония). Статистическая обработка результатов экспериментов проводилась с использованием непараметрического критерия Уилкоксона.

**Результаты и их обсуждение.** Известно, что клеточная мембрана является барьером, защищающим клетку и ее содержимое, и поэтому именно цитоплазматическая мембрана – одна из главных мишеней действия ксенобиотиков. Структурное и функциональное состояние плазматической мембраны часто играют важную роль в формировании ответа клетки на действие токсичных агентов. На первом этапе работы нами изучено изменение физического состояния липидов в мембранах ПМНК при взаимодействии их с наноразмерным оксидом цинка *in vitro*. Для этого использовали липофильные флуоресцентные зонды ТМА-ДФГ и лаурдан, параметры флуоресценции которых позволяют судить о микровязкости липидного бислоя клеточной мембраны. Существенным различием этих флуоресцентных зондов является их локализация в мембране, что позволило оценить физическое состояние фосфолипидов на разной глубине липидного бислоя лимфоцитарных мембран, модифицированных ZnO NRs и ZnO NPs. Как видно из данных таблицы, инкубация ПМНК крови с наноструктурированным ZnO различной формы приводит к дозозависимому снижению поляризации флуоресценции (P) ТМА-ДФГ, включенного в мембраны лимфоцитов, по сравнению с интактными клетками. В силу того, что ТМА-ДФГ локализуется вблизи поверхности липидного бислоя, можно предположить, что при действии исследуемых Zn-содержащих соединений *in vitro* происходит снижение микровязкости липидов в области полярных головок липидного бислоя мембран лимфоцитов на границе раздела «вода–липид». При этом более выраженный эффект был характерен именно для ZnO NRs. Параллельно установлено, что при воздействии ZnO NRs (50 мкг/мл) на ПМНК значение генерализованной поляризации флуоресценции (GP) лаурдана, встроенного в клеточную мембрану, достоверно увеличивалось в среднем на 15 % по сравнению со значением GP, характерного для контроля (таблица), в то время как при действии ZnO NPs наблюдалась лишь тенденция к его увеличению. Из полученных результатов можно заключить, что при воздействии именно наностержней оксида цинка на лимфоциты происходит увеличение микровязкости липидов в гидрофобной части внешнего липидного монослоя.

Для выяснения вопроса, изменяется ли структурное состояние мембранных белков ПМНК при взаимодействии с ZnO NRs и ZnO NPs были использованы параметры собственной и зондовой флуоресценции. Известно, что основными группами в белках, ответственными за их флуоресцентные свойства, являются ароматические аминокислоты – триптофан, тирозин и фенилаланин. Триптофан, благодаря наиболее высокому квантовому выходу в белках, часто доминирует не только в спектрах флуоресценции отдельных белков (альбумин сыворотки), но и их гетерогенных смесей. Установлено, что после инкубации ПМНК человека с двумя формами наноструктурированного оксида цинка в концентрациях 10 и 50 мкг/мл в течение 3 ч при 37 °С, положение максимума спектра собственной флуоресценции не изменяется, в то время как интенсивность триптофановой флуоресценции мембранных белков исследуемых клеток достоверно снижается в среднем на 10–25 % (таблица) и, более того, степень снижения зависела от концентрации наноструктурированного ZnO в инкубационной среде. Однако отличий в значениях интенсивности триптофановой флуоресценции мембранных белков лимфоцитов в зависимости от формы наноструктурированного цинка не обнаружено (таблица). Оценка интенсивности флуоресценции ПМНК в видимой области, которая обусловлена в основном восстановленной формой пиридиннуклеотидов НАД(Ф)Н, выявила достоверные отличия данного параметра до и после экспозиции исследуемых клеток с ZnO NRs и ZnO NPs. Как видно из таблицы, наночастицы оказывают действие лишь в концентрации 50 мкг/мл, а наностержни – на всем исследуемом диапазоне концентраций.

Изучение структурной модификации белков цитоплазматической мембраны лимфоцитов, о которой можно судить по количеству SH- и NH<sub>2</sub>-групп, выявило разнонаправленный характер действия ZnO NRs и ZnO NPs. Показано, что 3-часовая инкубация суспензии ПМНК с ZnO NPs в концентрациях 10 и 50 мкг/мл приводит к дозозависимому увеличению интенсивности

Средние значения флуоресцентных показателей, характеризующих физико-химическое состояние компонентов мембран лимфоцитов человека до и после воздействия различных форм наноразмерного оксида цинка и хлорида цинка  
 An average values of the fluorescent parameters characterizing the physical and chemical state of the membrane components of human lymphocyte before and after exposure to various forms of nano-sized zinc oxide and zinc chloride

Показатель, отн. ед. Indicator, relative unit	Параметры регистрации Registration parameters	Контроль (интактные лимфоциты) Control (intact lymphocytes)	ZnO NRS		ZnO NPs		ZnCl <sub>2</sub>	
			10 мкг/мл	50 мкг/мл	10 мкг/мл	50 мкг/мл	10 мкг/мл	50 мкг/мл
Поляризация флуоресценции ТМА-ДФГ (P)	$\lambda_{\text{возб}} = 363 \text{ нм}$ , $\lambda_{\text{рег}} = 428 \text{ нм}$	$0,352 \pm 0,008$	$0,342 \pm 0,015$	$0,309 \pm 0,012^*$	$0,342 \pm 0,001$	$0,325 \pm 0,014^*$	$0,352 \pm 0,012$	$0,335 \pm 0,007$
Генерализованная поляризация флуоресценции лаурдана (GP)	$\lambda_{\text{возб}} = 368 \text{ нм}$ , $\lambda_{\text{рег}} = 436 \text{ и } 490 \text{ нм}$	$0,408 \pm 0,008$	$0,429 \pm 0,014$	$0,458 \pm 0,015^*$	$0,425 \pm 0,011$	$0,429 \pm 0,015$	$0,419 \pm 0,016$	$0,438 \pm 0,014^*$
Интенсивность собственной флуоресценции белков мембран лимфоцитов	$\lambda_{\text{возб}} = 296 \text{ нм}$ , $\lambda_{\text{рег}} = 330 \text{ нм}$	$3,18 \pm 0,17$	$2,77 \pm 0,04$	$2,54 \pm 0,06^*$	$2,64 \pm 0,13^*$	$2,48 \pm 0,15^*$	$2,72 \pm 0,12^*$	$2,57 \pm 0,13^*$
Интенсивность собственной флуоресценции компонентов мембран лимфоцитов в видимой области	$\lambda_{\text{возб}} = 350 \text{ нм}$ , $\lambda_{\text{рег}} = 440 \text{ нм}$	$0,037 \pm 0,002$	$0,050 \pm 0,003^*$	$0,049 \pm 0,006^*$	$0,042 \pm 0,005$	$0,049 \pm 0,006^*$	$0,041 \pm 0,001$	$0,041 \pm 0,002$
Интенсивность флуоресценции N-(1-пирен)-малеимид	$\lambda_{\text{возб}} = 340 \text{ нм}$ , $\lambda_{\text{рег}} = 395 \text{ нм}$	$0,455 \pm 0,015$	$0,459 \pm 0,027$	$0,439 \pm 0,020$	$0,472 \pm 0,023$	$0,503 \pm 0,017^*$	$0,484 \pm 0,020$	$0,521 \pm 0,013^*$
Интенсивность флуоресценции флуорескамина	$\lambda_{\text{возб}} = 383 \text{ нм}$ , $\lambda_{\text{рег}} = 485 \text{ нм}$	$0,282 \pm 0,020$	$0,274 \pm 0,023$	$0,331 \pm 0,015^*$	$0,286 \pm 0,026$	$0,276 \pm 0,006$	$0,281 \pm 0,015$	$0,275 \pm 0,013$

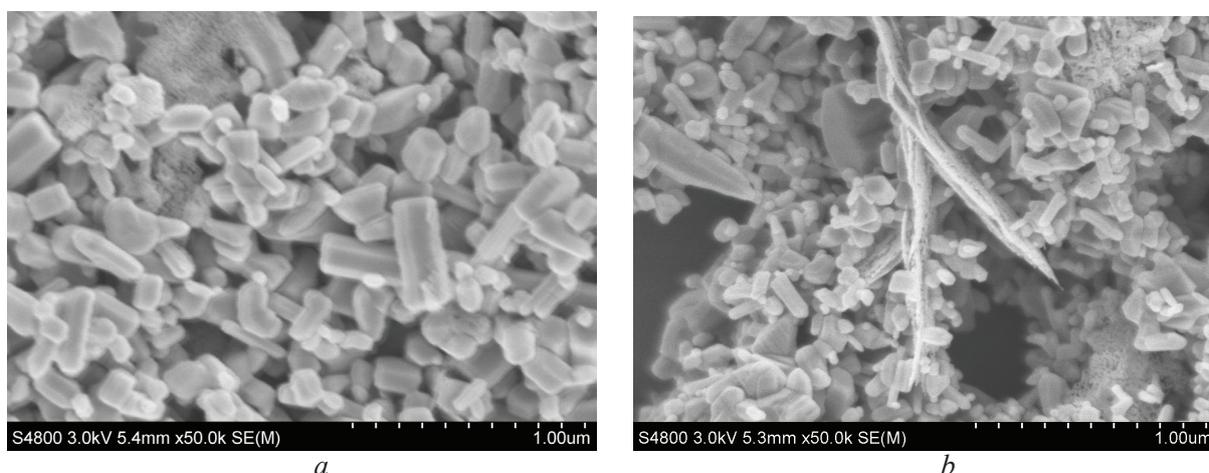
Примечание: данные представлены как  $x_{\text{cp}} \pm sd$ ,  $n = 5-6$ ; \* – различия по сравнению с контролем (интактные лимфоциты человека) достоверны  $p < 0,05$ .  
 Note: the data are presented as  $x_{\text{cp}} \pm sd$ ,  $n = 5-6$ ; \* – differences in contrast to control (human intact lymphocytes) are true  $p < 0.05$ .

флуоресценции N-(1-пирен)-малеимида в среднем на 4–13 % (таблица), который, как известно, при встраивании в цитоплазматическую мембрану взаимодействует с SH-группами белков и по интенсивности флуоресценции его продуктов можно судить об уровне сульфгидрильных групп на поверхности мембраны. В то же время при экспозиции клеток с наностержнями ZnO наблюдалась обратная тенденция – снижение интенсивности флуоресценции ПМ, что указывает на возможную инициацию окислительных процессов мембранных белков.

Исследование влияния наноструктурированного оксида цинка на уровень  $\text{NH}_2$ -групп на поверхности мембран лимфоцитов человека с помощью флуорескамина, взаимодействующего с доступными первичными аминами на поверхности клетки, продемонстрировало, что в случае экспозиции клеток с наночастицами ZnO сферической формы изменения количества  $\text{NH}_2$ -групп не происходит, а при взаимодействии с наностержнями ZnO в концентрации 50 мкг/мл регистрируется увеличение интенсивности флуоресценции флуорескамина в среднем на 15–20 % (таблица), что свидетельствует о возрастании доступных для флуоресцентного зонда аминогрупп на поверхности мембраны.

Параллельно нами была проведена оценка действия хлорида цинка, как источника  $\text{Zn}^{2+}$ , на вышеисследованные параметры, характеризующие структурно-функциональное состояние мембран лимфоцитов. Как видно из таблицы, инкубация суспензии ПМНК с хлоридом цинка в концентрациях 10 и 50 мкг/мл приводила к дозозависимому увеличению интенсивности флуоресценции N-(1-пирен)-малеимида в среднем на 10–20 %, а интенсивность флуоресценции флуорескамина не отличалась от значений, характерных для интактных клеток. Таким образом, эффект воздействия  $\text{Zn}^{2+}$  на белковую компоненту цитоплазматической мембраны сопоставим с таковым для ZnO NPs. При этом сравнительный анализ ответа липидной компоненты (по параметрам флуоресценции липофильных зондов: P и GP) плазматической мембраны ПМНК после инкубации с наноразмерным оксидом цинка и хлоридом цинка выявил однонаправленный характер их действия.

Одним из возможных объяснений столь разных мембранных эффектов действия наностержней и наночастиц оксида цинка может являться способность наноструктур на основе ZnO «отдавать» ионы цинка (англ.: ion-shedding effect), которые в высоких концентрациях способны запускать процессы программируемой клеточной гибели и влиять на физико-химические свойства компонентов (белков и липидов) цитоплазматической мембраны клеток, как было показано нами ранее на эритроцитах человека [14; 15]. Согласно результатам сканирующей электронной микроскопии (рисунок), геометрические размеры используемых в работе наночастиц оксида цинка находились в диапазоне 30–100 нм, в то время как диаметр наностержней оксида цинка составлял 70–150 нм, а их длина не превышала 500 нм. Таким образом, можно предположить,



СЭМ-изображения наностержней (a) и наночастиц (b) оксида цинка, нанесенных на стеклянную подложку, в концентрации 1 мг/мл

SEM-images of zinc oxide nanorods (a) and nanoparticles (b) deposited on a glass substrate in concentration 1 mg/ml

что именно наночастицы оксида цинка имеют возможность проникать внутрь клетки, в то время как предполагаемым механизмом взаимодействия наностержней с клеткой является электростатическое взаимодействие или «прокалывание» цитоплазматической мембраны.

**Заключение.** Полученные результаты указывают на изменение физико-химического состояния компонентов мембран иммунокомпетентных клеток, подвергшихся воздействию разных форм наноразмерного оксида цинка. При этом стоит отметить, что более выраженные мембранотропные эффекты наблюдаются для ZnO NRs. Данный факт может являться результатом особенностей взаимодействия исследуемых форм наноматериала с поверхностью клетки, что вероятнее всего, вносит существенный вклад в ответ цитоплазматической мембраны на их воздействие.

**Благодарности.** Авторы выражают благодарность ст. науч. сотруднику Института атомной физики и спектроскопии Латвийского Университета (г. Рига, Латвия) канд. физ.-мат. наук Р. В. Витеру за предоставленные образцы наноструктурированного оксида цинка и помощь в проведении СЭМ-исследований. Работа поддержана грантом БРФФИ (№ Б17-128).

**Acknowledgements.** The authors are grateful to the Senior researcher of Institute of Atomic Physics and Spectroscopy of the University of Latvia (Riga, Latvia) Ph. D. R. V. Viter for the provided samples of nanostructured zinc oxide and assistance in conducting SEM-studies. This work was supported by the BRFFR (grant Б17-128).

### Список использованных источников

1. Xiong, H. M. ZnO nanoparticles applied to bioimaging and drug delivery / H. M. Xiong // *Adv. Mater.* – 2013. – Vol. 25, N 37. – P. 5329–5335. <https://doi.org/10.1002/adma.201301732>
2. Imaging of zinc oxide nanoparticle penetration in human skin *in vitro* and *in vivo* / A. V. Zvyagin [et al.] // *J. Biomed. Opt.* – 2008. – Vol. 13, N 6. – P. 064031. <https://doi.org/10.1117/1.3041492>
3. Ultrasensitive detection of cytokines enabled by nanoscale ZnO arrays / V. Adalsteinsson [et al.] // *Anal. Chem.* – 2008. – Vol. 80, N 17. – P. 6594–6601. <https://doi.org/10.1021/ac800747q>
4. Predictive value of *in vitro* assays depends on the mechanism of toxicity of metal oxide nanoparticles / W. S. Cho [et al.] // *Part Fibre. Toxicol.* – 2013. – Vol. 10, N 1. – P. 55. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-10-55>
5. Application of short-term inhalation studies to assess the inhalation toxicity of nanomaterials / R. Landsiedel [et al.] // *Part Fibre Toxicol.* – 2014. – Vol. 11, N 1. – P. 16. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-11-16>
6. Toxicity assessment of zinc oxide nanoparticles using sub-acute and sub-chronic murine inhalation models / A. Adamcakova-Dodd [et al.] // *Part Fibre Toxicol.* – 2014. – Vol. 11, N 1. – P. 15. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-11-15>
7. Particulate nature of inhaled zinc oxide nanoparticles determines systemic effects and mechanisms of pulmonary inflammation in mice / J. K. Chen [et al.] // *Nanotoxicology.* – 2014. – Vol. 9, N 1. – P. 43–53. <https://doi.org/10.3109/17435390.2014.886740>
8. *In vitro* mechanistic study towards a better understanding of ZnO nanoparticle toxicity / T. Buerki-Thurnherr [et al.] // *Nanotoxicology.* – 2012. – Vol. 7, N 4. – P. 402–416. <https://doi.org/10.3109/17435390.2012.666575>
9. Acute exposure to ZnO nanoparticles induces autophagic immune cell death / B. M. Johnson [et al.] // *Nanotoxicology.* – 2014. – Vol. 9, N 6. – P. 737–748. <https://doi.org/10.3109/17435390.2014.974709>
10. Zinc oxide nanoparticle induced autophagic cell death and mitochondrial damage via reactive oxygen species generation / K. N. Yu [et al.] // *Toxicol. in Vitro.* – 2013. – Vol. 27, N 4. – P. 1187–1195. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2013.02.010>
11. Evaluation of the cytotoxic and inflammatory potential of differentially shaped zinc oxide nanoparticles / B. C. Heng [et al.] // *Arch. Toxicol.* – 2011. – Vol. 85, N 12. – P. 1517–1528. <https://doi.org/10.1007/s00204-011-0722-1>
12. Effects of surface-modifying ligands on the colloidal stability of ZnO nanoparticle dispersions *in vitro* cytotoxicity test media / D. Kwon [et al.] // *Int. J. Nanomedicine.* – 2014. – Vol. 9, N 2. – P. 57–65. <https://doi.org/10.2147/ijn.s57924>
13. Jiang, W. Bacterial toxicity comparison between nano and micro-scaled oxide particles / W. Jiang, H. Mashayekhi, B. Xing // *Environ. Pollut.* – 2009. – Vol. 157, N 5. – P. 1619–1625. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2008.12.025>
14. Optical, nanostructural, and biophysical properties of Zn-induced changes in human erythrocyte membranes / A. Ya. Khairullina [et al.] // *Optics and Spectroscopy.* – 2011. – Vol. 110, N 4. – P. 534–540. <https://doi.org/10.1134/s0030400x11040138>
15. Harmaza, Y. M. Zinc essentiality and toxicity. Biophysical aspects / Y. M. Harmaza, E. I. Slobozhanina // *Biophysics.* – 2014. – Vol. 59, N 2. – P. 264–275. <https://doi.org/10.1134/s0006350914020092>

### References

1. Xiong H. M. ZnO nanoparticles applied to bioimaging and drug delivery. *Advanced Materials*, 2013, vol. 25, no. 37, pp. 5329–5335. <https://doi.org/10.1002/adma.201301732>
2. Zvyagin A. V., Zhao X., Gierden A., Sanchez W., Ross J. A., Roberts M. S. Imaging of zinc oxide nanoparticle penetration in human skin *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Biomedical Optics*, 2008, vol. 13, no. 6, pp. 064031. <https://doi.org/10.1117/1.3041492>
3. Adalsteinsson V., Parajuli O., Kepics S., Gupta A., Reeves W. B., Hahn J. I. Ultrasensitive detection of cytokines enabled by nanoscale ZnO arrays. *Analytical Chemistry*, 2008, vol. 80, no. 17, pp. 6594–6601. <https://doi.org/10.1021/ac800747q>

4. Cho W. S., Duffin R., Bradley M., Megson I. L., MacNee W., Lee J. K., Jeong J., Donaldson K. Predictive value of *in vitro* assays depends on the mechanism of toxicity of metal oxide nanoparticles. *Particle and Fibre Toxicology*, 2013, vol. 10, no. 1, pp. 55. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-10-55>
5. Landsiedel R., Ma-Hock L., Hofmann T., Wiemann M., Strauss V., Treumann S., Wohlleben W., Gröters S., Wiench K., van Ravenzwaay B. Application of short-term inhalation studies to assess the inhalation toxicity of nanomaterials. *Particle and Fibre Toxicology*, 2014, vol. 11, no. 1, pp. 16. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-11-16>
6. Adamcakova-Dodd A., Stebounova L. V., Kim J. S., Vorrink S. U., Ault A. P., O'Shaughnessy P. T., Grassian V. H., Thorne P. S. Toxicity assessment of zinc oxide nanoparticles using sub-acute and sub-chronic murine inhalation models. *Particle and Fibre Toxicology*, 2014, vol. 11, no. 1, pp. 15. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-11-15>
7. Chen J. K., Ho C. C., Chang H., Lin J. F., Yang C. S., Tsai M. H., Tsai H. T., Lin P. Particulate nature of inhaled zinc oxide nanoparticles determines systemic effects and mechanisms of pulmonary inflammation in mice. *Nanotoxicology*, 2014, vol. 9, no. 1, pp. 43–53. <https://doi.org/10.3109/17435390.2014.886740>
8. Buerki-Thurnherr T., Xiao L., Diener L., Arslan O., Hirsch C., Maeder-Althaus X., Grieder K., Wampfler B., Mathur S., Wick P., Krug H. F. *In vitro* mechanistic study towards a better understanding of ZnO nanoparticle toxicity. *Nanotoxicology*, 2012, vol. 7, no. 4, pp. 402–416. <https://doi.org/10.3109/17435390.2012.666575>
9. Johnson B. M., Fraietta J. A., Gracias D. T., Hope J. L., Stairiker C. J., Patel P. R., Mueller Y. M., McHugh M. D., Jablonowski L. J., Wheatley M. A., Katsikis P. D. Acute exposure to ZnO nanoparticles induces autophagic immune cell death. *Nanotoxicology*, 2014, vol. 9, no. 6, pp. 737–748. <https://doi.org/10.3109/17435390.2014.974709>
10. Yu K. N., Yoon T. J., Minai-Tehrani A., Kim J. E., Park S. J., Jeong M. S., Ha S. W., Lee J. K., Kim J. S., Cho M. H. Zinc oxide nanoparticle induced autophagic cell death and mitochondrial damage via reactive oxygen species generation. *Toxicology in Vitro*, 2013, vol. 27, no. 4, pp. 1187–1195. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2013.02.010>
11. Heng B. C., Zhao X., Tan E. C., Khamis N., Assodani A., Xiong S., Ruedl C., Ng K. W., Loo J. S. Evaluation of the cytotoxic and inflammatory potential of differentially shaped zinc oxide nanoparticles. *Archives of Toxicology*, 2011, vol. 85, no. 12, pp. 1517–1528. <https://doi.org/10.1007/s00204-011-0722-1>
12. Kwon D., Park J., Park J., Choi S. Y., Yoon T. H. Effects of surface-modifying ligands on the colloidal stability of ZnO nanoparticle dispersions *in vitro* cytotoxicity test media. *International Journal of Nanomedicine*, 2014, vol. 9, no. 2, pp. 57–65. <https://doi.org/10.2147/ijn.s57924>
13. Jiang W., Mashayekhi H., Xing B. Bacterial toxicity comparison between nano and micro-scaled oxide particles. *Environmental Pollution*, 2009, vol. 157, no. 5, pp. 1619–1625. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2008.12.025>
14. Khairullina A. Ya., Ol'shanskaya T. V., Filimonenko D. S., Kozlova N. M., Garmaza Yu. M., Slobozhanina E. I. Optical, nanostructural, and biophysical properties of Zn-induced changes in human erythrocyte membranes. *Optics and Spectroscopy*, 2011, vol. 110, no. 4, pp. 534–540. <https://doi.org/10.1134/s0030400x11040138>
15. Harmaza Y. M., Slobozhanina E. I. Zinc essentiality and toxicity. Biophysical aspects. *Biophysics*, 2014, vol. 59, no. 2, pp. 264–275. <https://doi.org/10.1134/s0006350914020092>

### Информация об авторах

Гармаза Юлия Михайловна – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: [garmaza@yandex.ru](mailto:garmaza@yandex.ru).

Тамашевский Александр Владимирович – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: [tayzoe@mail.ru](mailto:tayzoe@mail.ru).

Слобожанина Екатерина Ивановна – член-корреспондент, д-р биол. наук, профессор, заведующая лабораторией. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: [slobozhanina@ibp.org.by](mailto:slobozhanina@ibp.org.by).

### Information about the authors

Harmaza Yuliya Mikhailovna – Ph. D. (Biology), Leading researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: [garmaza@yandex.ru](mailto:garmaza@yandex.ru).

Tamashevski Alexander Vladimirovich – Ph. D. (Biology), Leading researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: [tayzoe@mail.ru](mailto:tayzoe@mail.ru).

Slobozhanina Ekaterina Ivanovna – Corresponding Member, D. Sc. (Biology), Professor, Head of Laboratory. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: [slobozhanina@ibp.org.by](mailto:slobozhanina@ibp.org.by).