УДК 577.3’32/.’36, 577.334

НАНОСТРУКТУРИРОВАННЫЙ ОКСИД ЦИНКА: РОЛЬ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ В БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ И ПОТЕНЦИАЛЬНОЙ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ МАТЕРИАЛА

***Ю. М. ГАРМАЗА*[1)], *А. В. ТАМАШЕВСКИЙ*[1)], *Е. И. СЛОБОЖАНИНА*[1), 2), 3)]**

[1)]*Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий, Долгиновский тракт, 160, 220053, г. Минск, Беларусь*
[2)]*Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Беларусь*
[3)]*Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Беларусь*

Аннотация. За последние два десятилетия нанотехнологии стали представлять интерес не только для науки, но и для промышленности. Использование нанотехнологических подходов обеспечило возможность получения различных наночастиц и новых материалов на их основе со специфическими свойствами, отличными от свойств микроаналогов. К таким новым материалам можно отнести наноструктурированный оксид цинка, который нашел применение в биомедицинском секторе, включая биовизуализацию и адресную доставку лекарственных средств. Производство частиц в наноразмерном диапазоне позволило значительно увеличить активную площадь поверхности данного типа материалов в занимаемом объеме, что и привело к улучшению их химических, электрических, магнитных, структурных и (или) морфологических свойств. Однако в зависимости от способа проникновения в организм человека наночастицы могут перемещаться в различные органы и ткани, где способны вызывать побочные эффекты. Для проведения токсикологических исследований необходимо смоделировать *in vitro* взаимодействие между наночастицами и клеточными системами *in vivo*, а для возможности соотнесения любых токсических реакций с типом наночастиц требуется выяснить, в какой степени они способны адсорбироваться на клеточной поверхности и проникать внутрь клеток. Известно, что цитотоксичность наноструктурированного оксида цинка также может существенно зависеть от его физико-химических свойств, в частности от размера и формы частиц. По этой причине понимание взаимосвязи между цитотоксичностью и физико-химическими свойствами наночастиц представляется актуальным для объективной оценки возможных рисков от их воздействия. Таким образом, в настоящем обзоре рассмотрены основные механизмы воздействия наноматериалов на организм человека, роль их физико-химических свойств в биологической активности, а также вопросы потенциальной цитотоксичности наноструктурированного оксида цинка.

Образец цитирования:
Гармаза ЮМ, Тамашевский АВ, Слобожанина ЕИ. Наноструктурированный оксид цинка: роль физико-химических свойств в биологической активности и потенциальной цитотоксичности материала. *Экспериментальная биология и биотехнология.* 2024;2:24–35.
EDN: HIXMUP

For citation:
Harmaza YM, Tamashevski AV, Slobozhanina EI. Nanostructured zinc oxide: role of physico-chemical properties into the biological activity and potential cytotoxicity of the material. *Experimental Biology and Biotechnology.* 2024;2:24–35. Russian.
EDN: HIXMUP

Авторы:
Юлия Михайловна Гармаза – кандидат биологических наук, доцент; ведущий научный сотрудник лаборатории биотехнологии антител и цитокинов.
Александр Владимирович Тамашевский – кандидат биологических наук; докторант лаборатории биотехнологии антител и цитокинов.
Екатерина Ивановна Слобожанина – доктор биологических наук, член-корреспондент НАН Беларуси, профессор; главный научный сотрудник лаборатории производственной трансфузиологии[1)], главный научный сотрудник лаборатории медицинской биофизики[2)], профессор кафедры биохимии биологического факультета[3)].

Authors:
Yuliya M. Harmaza, PhD (biology), docent; leading researcher at the laboratory of biotechnology of antibody and cytokines.
garmaza@yandex.ru
https://orcid.org/0000-0003-3964-0585
Alexander V. Tamashevski, PhD (biology); doctoral student at the laboratory of biotechnology of antibody and cytokines.
tayzoe@gmail.com
https://orcid.org/0000-0001-8676-2871
Ekaterina I. Slobozhanina, doctor of science (biology), corresponding member of the National Academy of Sciences of Belarus, full professor; chief researcher at the laboratory of applied transfusiology[a], chief researcher at the laboratory of medical biophysics[b] and professor at the department of biochemistry, faculty of biology[c].
slobozhanina@ibce.by

Ключевые слова: наноструктурированный оксид цинка; физико-химические свойства; биораспределение наночастиц; биологическая активность наноматериалов; цитотоксичность; активные формы кислорода; апоптоз.

Благодарность. Работа выполнена при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (грант № Б17-128, 2017–2019 гг.) и рамочной программы Европейского союза по науке и инновациям «Горизонт-2020» (подпрограмма Марии Склодовской-Кюри, грант № 778157 (CanBioSe), 2018–2023 гг.).

NANOSTRUCTURED ZINC OXIDE: ROLE OF PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES INTO THE BIOLOGICAL ACTIVITY AND POTENTIAL CYTOTOXICITY OF THE MATERIAL

***Y. M. HARMAZA*[a], *A. V. TAMASHEVSKI*[a], *E. I. SLOBOZHANINA*[a, b, c]**

[a]*Republican Scientific and Practical Centre for Transfusiology and Medical Biotechnology, 160 Dawginawski Tract, Minsk 220053, Belarus*
[b]*Institute of Biophysics and Cell Engineering, National Academy of Sciences of Belarus, 27 Akademichnaja Street, Minsk 220072, Belarus*
[c]*Belarusian State University, 4 Niezaliezhnasci Avenue, Minsk 220030, Belarus*
Corresponding author: Y. M. Harmaza (garmaza@yandex.ru)

Abstract. Over the past two decades, nanotechnology has become interesting not only for science, but also for industry. Application of nanotechnological approaches has provided opportunities for obtaining various nanoparticles and new materials based on them with specific properties different from the properties of microanalogues. These new materials include nanostructured zinc oxide, which has found application into the biomedical sector, including bioimaging and targeted drug delivery. The production of particles in the nanoscale range has made it possible to increase the active surface area of this type of materials in the occupied volume, which has led to an improvement into their chemical, electrical, magnetic, structural and (or) morphological properties. However, depending on the entry type to the human body, nanoparticles can travel to various organs and tissues, where they can cause side effects. So, it is important *in vitro* to simulate the interaction *in vivo* between nanoparticles and cellular systems for toxicological studies. Moreover, in order to correlate any toxic reactions with the type of nanoparticles, it is necessary to find out the degree of their ability to adsorb on the cell surface and penetrate inside cell. It is known that the cytotoxicity of nanostructured zinc oxide can also significantly depend on its physico-chemical properties, in particular on the size and shape of the particles. For this reason, understanding the relationship between cytotoxicity and the physico-chemical properties of nanoparticles seems relevant for the objective assessment of possible risks associated with their exposure. Thus, the review provides a comprehensive overview of the main mechanisms of nanomaterials action on the human organism, the role of their physico-chemical properties into the biological activity, as well as the questions of potential cytotoxicity of nanostructured zinc oxide.

Keywords: nanostructured zinc oxide; physico-chemical properties; biodistribution of nanoparticles; biological activity of nanomaterials; cytotoxicity; reactive oxygen species; apoptosis.

Acknowledgements. This work was carried out with financial support from the Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research (grant No. B17-128, 2017–2019) and the European Union framework programme for research and innovation «Horizon-2020» (Marie Sklodowska-Curie actions, grant No. 778157 (CanBioSe), 2018–2023).

Введение

Научные достижения в области нанотехнологий и в сфере их применения приносят значительную пользу экономике и обществу. По некоторым оценкам, в настоящее время нанотехнологии существенно усилили свое влияние в промышленном секторе, и емкость их рынка составила около 3 трлн долл. США. Причина, по которой инженерные наноматериалы (ИНМ) стали популярными, главным образом заключается в уникальных физико-химических свойствах, обеспечивающих им огромный потенциал для применения в биомедицине [1]. К наноразмерным объектам обычно относят молекулы (0,5 нм), кластеры (1 нм), наночастицы (НЧ) (1–100 нм), коллоидные частицы (3–100 нм), вирусы (100 нм). Как видно, НЧ сопоставимы с молекулами естественного происхождения, при этом они намного меньше, чем бактериальные клетки (10^3 нм) или клетки млекопитающих (например, эритроциты и лейкоциты

(около 10^4 нм)). Уменьшение размера частиц до такого уровня значительно увеличивает площадь активной поверхности наноматериалов, что непосредственно приводит к улучшению их химических, электрических, магнитных, структурных и (или) морфологических характеристик. По этой причине наноматериалы часто приобретают свойства, отличные от свойств микроаналогов, и находят широкое применение во многих областях повседневной жизни и в более высокотехнологичных производствах [1; 2].

В зависимости от способа проникновения (через дыхательные пути, желудочно-кишечный тракт или кожу) НЧ могут распространяться по всему организму либо перемещаться в различные органы и ткани и индуцировать в них побочные эффекты. Для нанотоксикологических исследований особую важность представляет моделирование *in vitro* взаимодействия между НЧ и клеточными системами *in vivo*. Например, для проведения корреляции между типом НЧ и ответом со стороны организма необходимо выяснить, адсорбируются частицы на поверхности клетки или проникают в ее цитоплазматическое пространство [3]. Уникальные физико-химические свойства ИНМ, такие как размер, поверхностная структура, растворимость, форма и агрегатное состояние [4], также являются причиной их всестороннего научного исследования как возможных чужеродных соединений для организма с использованием широкого спектра междисциплинарных подходов – от физико-химических до медико-биологических [1]. Показано, что цитотоксичность различных наноматериалов значительно варьируется в зависимости от их размера и формы [3], что свидетельствует о существенном вкладе в этот процесс именно физико-химических свойств.

Наноструктурированный оксид цинка (ZnO) нашел широкое применение в биомедицинском секторе, включая биовизуализацию и адресную доставку лекарственных средств [1–4]. Кроме того, наноструктуры ZnO являются одним из материалов, используемых для создания иммуносенсоров, за счет их большой площади поверхности и химической стабильности [5; 6]. По этой причине понимание взаимосвязи между биологической активностью, цитотоксичностью и физико-химическими свойствами НЧ ZnO представляется актуальным для объективной оценки потенциальных рисков от их воздействия.

Механизмы воздействия наноматериалов на организм человека и их биораспределение

С ростом коммерциализации ИНМ существенно увеличивается вероятность их воздействия на организм человека. Поскольку токсичность ИНМ, как правило, связана с их распространенностью и инерционностью, эффективной дозой и продолжительностью воздействия, то необходим тщательный систематический анализ влияния этих материалов на человека [7]. В целом НЧ способны вступать в прямой контакт с организмом человека по четырем основным путям, таким как проникновение через кожу, проглатывание, вдыхание и системный вход [8]. Поскольку одежда, лекарственные препараты, косметика и различные средства по уходу за кожей содержат НЧ, их контакт с кожей происходит как преднамеренно, так и случайно. Кроме того, возрастает использование ИНМ в пищевых продуктах (в качестве добавок) и фармацевтических препаратах, в связи с чем люди в развитых странах ежедневно потребляют приблизительно 10^{12}–10^{14} частиц на человека [7].

Дыхательный тракт – один из основных путей проникновения в человеческий организм НЧ, содержащихся в загрязненной атмосфере. Поступившие через дыхательный тракт НЧ осаждаются во всех областях дыхательных путей: крупные частицы могут быть отфильтрованы в верхних отделах, тогда как более мелкие частицы обнаруживаются в периферических отделах [9]. После поглощения через эпителий легких НЧ попадают в кровь и лимфу, достигая таким образом клеток костного мозга, лимфатических узлов, селезенки, сердца или любого другого органа и даже ганглиев центральной нервной системы [10].

Несмотря на способ поступления НЧ, их распределение в организме сильно зависит от поверхностных характеристик [11], а также от состава, размера и заряда. НЧ достаточно малы, что обусловливает их способность проникать в небольшие капилляры по всему телу и перемещаться через клеточные барьеры, поэтому они могут попадать в цитозоль клетки с помощью различных механизмов и взаимодействовать с субклеточными структурами и органами-мишенями [7]. Соответственно, такие эффекты, как воспаление, окислительный стресс и активация молекулярных клеточных процессов, скорее всего, развиваются не только в органе поступления, но и в органах-мишенях [11].

Известно, что НЧ могут активно проникать в клетки путем фагоцитоза, пиноцитоза, клатринзависимого эндоцитоза, клатрин- и кавеолиннезависимого эндоцитоза или кавеолинопосредованного эндоцитоза [12; 13]. НЧ, интернализированные посредством активного транспорта, обычно переносятся в везикулярные структуры, которые затем сливаются с фаголизосомами или эндосомами. Альтернативно НЧ также могут переноситься в цитозоль, транспортироваться через кавеосомы в эндоплазматический ретикулум либо «пересекать» клетку, используя трансцитотические процессы. Помимо активного транспорта, НЧ способны проникать в клетку через плазматическую мембрану путем пассивной диффузии.

Из цитоплазмы они затем могут доставляться к субклеточным компартментам, таким как ядро и митохондрии. Эти уникальные свойства НЧ делают их материалом, подходящим для терапевтического и диагностического применения. Однако при этом они могут попадать в органы-мишени, а именно в центральную нервную систему, которая сильно уязвима для потенциальных неблагоприятных воздействий [14; 15]. Таким образом, чрезвычайно малые размеры НЧ позволяют им проникать в клетки и транспортироваться в их цитозольном пространстве [15], причем разные исследования показали очень быстрый вход наноструктур в клетки крови *in vitro*. Попадание НЧ в клетку, субклеточная локализация и способность катализировать окислительные процессы зависят от химических свойств, размера и формы наноматериала, которые и определяют скорость транспорта ИНМ в клетку.

НЧ могут попасть в ядро посредством транспорта через ядерные поры, путем диффузии через ядерную мембрану или же оказаться в нем случайно в результате того, что ядерная мембрана деградирует во время процесса деления клеток, а затем реорганизуется в каждое дочернее ядро [11]. Этот способ поглощения и свободного движения внутри клетки делает НЧ очень опасными, так как они получают прямой доступ к белкам цитоплазмы и органеллам. В зависимости от локализации внутри клетки НЧ могут обусловливать определенные повреждения клеточных органелл и ДНК как прямо, так и косвенно, взаимодействуя с ДНК-связанными белками. Действительно, исследования *in vivo* и *in vitro* демонстрируют способность наноматериалов вызывать повреждение ДНК [16; 17]. Косвенное повреждение ДНК может происходить без взаимодействия НЧ с молекулой ДНК напрямую, для этого будет достаточно взаимодействия НЧ с белками, участвующими в процессе деления клеток. Кроме того, НЧ способны вызывать различные клеточные реакции, которые, в свою очередь, приводят к генотоксичности, например, через активацию окислительного стресса, воспалительных процессов и (или) аберрантных сигнальных реакций [16]. В ряде работ [18; 19] показана возможность взаимодействия НЧ с клеточными мембранами и продемонстрированы негативные эффекты в отношении их физико-химического состояния. Такое взаимодействие достигается либо за счет адсорбции НЧ на клеточной поверхности, либо за счет нарушения целостности мембраны, что приводит к образованию пор, разжижению мембраны и перекисному окислению липидов [18]. Результатом внезапного увеличения проницаемости внутренней митохондриальной мембраны может стать потеря функции митохондрий и, как следствие, запуск апоптотических и (или) некротических процессов [20]. Наряду с этим НЧ могут проникать в организм человека и взаимодействовать с компонентами иммунной системы, индуцируя воспалительные процессы, аллергические реакции, или оказывать непосредственное влияние на клетки иммунной системы [21]. Это взаимодействие приводит к повышенному высвобождению различных сигнальных молекул иммунной системы, включая цитокины. Однако остается открытым вопрос о том, как именно НЧ ведут себя в клетке и взаимодействуют с ее компонентами.

Роль физико-химических свойств наноматериалов в их биологической активности

Наноразмер – это основная физико-химическая особенность, которая отличает ИНМ от аналогов бóльших размеров [1]. С уменьшением размера увеличиваются мобильность, возможность транспортировки и доступность частиц в окружающем пространстве. Кроме того, НЧ имеют огромную площадь поверхности по сравнению с такими же образованиями более крупных размеров при условии их сопоставления в одинаковом занимаемом объеме. Этот факт может быть одной из причин, по которым НЧ в итоге оказываются более токсичными, чем частицы бóльших размеров из того же материала. Другими словами, уменьшение размера частиц напрямую связано с увеличением площади их поверхности (по сравнению с макрочастицами, занимающими тот же объем), что позволяет большему числу их атомов и (или) молекул находиться на поверхности материала, а не внутри него. Соответственно, увеличение площади поверхности определяет потенциальное число реакционноспособных групп на поверхности НЧ, что вполне может привести к повышению биологической активности наноматериала [1; 22].

Другим очень важным физико-химическим фактором, который вносит вклад в поведение и биологические реакции ИНМ, является дисперсионное состояние в системе частиц. Оно определяется отношением количества отдельных частиц в суспензионной среде к количеству агломератов [22; 23]. Как известно, частицы будут стремиться агломерироваться во взвешенном состоянии, если условия для стабильной дисперсии отсутствуют. Эти агломераты могут формироваться благодаря силам притяжения между частицами (например, гидрофобным взаимодействиям, силам Ван-дер-Ваальса) или за счет взаимодействия молекул (например, полимеров, белков, полисахаридов и т. п.) в окружающей среде. Стоит отметить, что чем меньше размер частиц, тем сильнее силы притяжения, которые возникают между ними. Таким образом, частицы могут формировать агрегаты совершенно разных форм и размеров, что также существенно влияет на их свойства и, соответственно, потенциальную токсичность [24].

Как и в случае с размером, частицы в суспензионной среде могут иметь форму, отличную от формы, задаваемой при синтезе (сферической, овальной, кубической, призменной, спиральной и т. п.). Влияние формы наночастиц на их интернализацию рассмотрено в работе [25], где продемонстрировано, что сферические частицы поглощаются клетками в 5 раз эффективнее, чем стержнеобразные частицы аналогичного размера. Подобные выводы были сделаны и авторами настоящей статьи при изучении взаимодействия наноструктурированного ZnO различной формы (стержни и сферические частицы) с периферическими мононуклеарными клетками крови человека [19; 26].

Химические особенности поверхности наноматериала включают широкий спектр свойств, которые способны определять механизм взаимодействия частиц с биомолекулами и биологическими системами. Например, поверхностный заряд НЧ имеет большое значение для индукции биологических эффектов. Он является основным фактором, определяющим дисперсионные свойства частиц и адсорбцию ионов и биомолекул, которые могут влиять на процесс взаимодействия клеток с частицами. Поверхностный заряд твердых частиц оценивается через определение их дзета-потенциала [23; 24].

Различия в физико-химических свойствах НЧ и более крупных частиц определяют их поведение и биораспределение в организме с последующей транслокацией (от попадания в организм до взаимодействия с клеточными структурами) [27]. В то время как большинство эффектов влияния на «первичный» орган (как было сказано выше, чаще всего это дыхательные пути) могут быть одинаковыми для частиц обоих размеров, эффекты влияния на «вторичные» органы (например, кроветворную систему) могут различаться. Таким образом, существенные особенности, которые выделяют НЧ среди более крупных аналогов, – это их потенциальные токсические свойства и необычное биокинетическое поведение.

Наноструктурированный ZnO имеет гексагональную кристаллическую решетку, состоящую из нескольких плоскостей с тетраэдрически скоординированными атомами O^{2-} и Zn^{2+}, расположенными поочередно вдоль оси. Тетраэдрическая координация ZnO обусловливает образование структуры, несимметричной относительно центра симметрии, где каждый анион окружен четырьмя катионами в углах тетраэдра, что приводит к спонтанной поляризации, а также к расходимости в поверхностной энергии [28; 29]. Благодаря уникальным физико-химическим свойствам, таким как высокая химическая стабильность, большой диапазон поглощения излучения и фотостабильность, ZnO является привлекательным ИНМ для широкого применения [29]. Кроме того, в наномасштабе частицы ZnO имеют особенные характеристики, а именно высокую изоэлектрическую точку и фотокаталитическую активность.

Благодаря своим фотокаталитическим свойствам НЧ ZnO при попадании в клетку способны повышать содержание активных форм кислорода (АФК) в цитоплазме, что обусловливает их уникальные антибактериальные свойства. НЧ ZnO имеют положительный поверхностный заряд и поэтому хорошо взаимодействуют с отрицательно заряженными бактериальными мембранами, что облегчает проникновение частиц в клетки и способствует запуску в них апоптотических процессов. Эти особенности позволяют использовать данные наноматериалы в качестве добавок к бактерицидам, применяемым в стоматологии и косметологии [30]. Изоэлектрическая точка НЧ ZnO находится в области pH ~9. При меньших значениях pH частицы ZnO поверхностно протонируются до формы $ZnOH_2^+$, что дает им возможность оставаться положительно заряженными в диапазоне pH, соответствующем физиологическим жидкостям организма (т. е. их можно использовать в качестве носителей лекарственных веществ и т. п.) [5]. Комбинирование фотолюминесцентных свойств НЧ ZnO с антибактериальными открывает многообещающие перспективы для их применения в тераностике [30]. Более 10 лет назад на культуре клеток рака яичников человека OVCAR-3 была продемонстрирована возможность использования ZnO в фотодинамической терапии в сочетании с уже известными противоопухолевыми препаратами [31].

Биологическая активность и потенциальная цитотоксичность наноструктурированного оксида цинка

Известно, что НЧ ZnO проявляют более высокую степень токсичности в ряде типов клеток по сравнению с НЧ оксидов других металлов. Поглощение НЧ клетками, которое, как было сказано выше, зависит от поверхностных свойств наноматериала, является необходимым условием для анализа цитотоксичности, опосредованной НЧ [32]. Чтобы объективно оценить вероятность цитотоксичности НЧ и их провоспалительный потенциал *in vitro*, важно учитывать особенности взаимодействующих типов клеток. В случае с ZnO было показано, что линии опухолевых клеток более восприимчивы к действию данных НЧ, чем здоровые клетки. Кроме того, в ряде работ продемонстрировано, что НЧ ZnO индуцируют селективную цитотоксичность в клетках гепатоцеллюлярной карциномы HepG2, эпителиальных клетках легких A549, клетках бронхиального эпителия человека BEAS-2B [33]. В свою очередь, цитотоксичность НЧ ZnO не всегда специфична для опухолевых клеток. Например, в работе [34] отмечено, что при инкубации

первичных периферических мононуклеарных клеток крови человека с НЧ ZnO не было обнаружено токсического эффекта, тогда как при их воздействии на моноцитарные дендритные клетки наблюдалась дозозависимая цитотоксическая реакция.

Принимая во внимание усиленную токсичность НЧ ZnO в отношении быстро пролиферирующих плюрипотентных, но недифференцированных клеток независимо от природы их происхождения (опухолевые или обычные), многие нанотоксикологические исследования основываются на использовании стабильных клеточных линий [3; 32; 33]. Это обстоятельство затрудняет сравнительный анализ профилей токсичности НЧ ZnO и экстраполяцию полученных данных для понимания возможных неблагоприятных последствий воздействия НЧ на человека. Однако, учитывая необходимость сокращения использования в исследованиях животных и принимая во внимание значительные видовые различия (например, в строении легких), которые влияют на последующее взаимодействие частиц, именно стабильные клеточные линии чаще всего применяются как модельные системы *in vitro* для анализа цитотоксичности НЧ. При культивировании клеток может происходить осаждение НЧ, что приводит к усилению их контакта с клетками. Этот важный фактор необходимо учитывать при исследовании легочной токсичности, когда взаимодействие НЧ с клетками происходит на границе раздела воздух – жидкость (далее – условия ALI) [35]. Помимо типа клеток, на результаты нанотоксикологических тестов могут влиять физические характеристики НЧ (размер и форма) и окружающая среда. Например, было показано, что взаимодействие НЧ ZnO с фосфатами, присутствующими в клеточной культуральной среде, повышает цитотоксический потенциал частиц [36].

Токсичность НЧ ZnO также может зависеть от концентрации белка в среде для культивирования клеток, что объясняется присоединением белков к поверхности НЧ и ее экранированием (т. е. НЧ способны влиять на вторичные структуры белков). Было показано, что взаимодействие НЧ ZnO с такими белками, как α-лактальбумин (НЧ ZnO диаметром 4–7 нм) или белок ToxR холерного вибриона (НЧ ZnO диаметром ~25 нм), сопровождается модификацией их структуры [37]. В свою очередь, индуцированные НЧ изменения в структуре адсорбированных белков могут влиять на их дальнейшую биореактивность [37]. Однако вопрос о том, как адсорбция белка на поверхности НЧ ZnO влияет на нанотоксические свойства частиц, остается слабоизученным и требует дальнейших исследований. Модификация поверхности НЧ ZnO различными покрытиями также может значительно изменять их цитотоксический потенциал [32]. Из-за большой величины отношения площади поверхности НЧ к их массе они обладают поверхностной реактивностью и по сравнению с более крупными частицами могут вызывать чрезмерное повреждение клеток [38]. Авторы работы [39] предположили, что существует критический размер, от которого зависит цитотоксичность НЧ ZnO. Но имеющегося количества информации в поддержку этой гипотезы пока недостаточно. Например, было показано, что НЧ ZnO (~100 нм) сильно влияют на фагоцитарную активность клеток острой моноцитарной лейкемии человека THP-1 по сравнению с микроразмерными частицами ZnO (5 мкм) [40].

Интересным фактом является влияние формы НЧ ZnO на их цитотоксический потенциал. Так, в работе [39] продемонстрировано, что сферические НЧ ZnO (диаметр 10–30 нм) проявляют более сильную цитотоксичность в отношении клеточной линии мышиных макрофагов Ana-1 по сравнению с наностержнями ZnO. В статье [26] на основе сравнительной оценки молекулярного действия двух различных форм НЧ ZnO на клетки также был сделан вывод о более сильном цитотоксическом эффекте именно у сферических частиц.

При изучении токсичности аэрозольных НЧ ZnO в клетках A549, культивируемых в условиях ALI, которые имитируют сложный характер среды легких *in vivo*, была выявлена активация экспрессии провоспалительных цитокинов (IL-8, IL-6 и GM-CSF) без влияния на цитотоксичность по сравнению с теми же клетками, культивируемыми в водных условиях. Но подобный эффект не наблюдался для генов, ассоциированных с окислительным стрессом (например, генов, кодирующих гемоксигеназу 1-го типа и супероксиддисмутазу 2-го типа). Таким образом, авторы показали, что субкультуры в условиях ALI могут давать меньше ложноотрицательных результатов при изучении иммунотоксичности, чем клетки, погруженные в культуральную среду [41]. Вместе с тем было обнаружено развитие окислительного стресса в клетках A549, культивируемых в условиях ALI и не погруженных в воду, при воздействии аэрозольных НЧ ZnO. Однако подобные эффекты регистрировались при высоких концентрациях НЧ ZnO, приводящих к нарушению целостности клеточных мембран и высвобождению лактатдегидрогеназы [42]. Возможно, степень взаимодействия НЧ ZnO с клетками, культивируемыми в условиях ALI или в условиях погружения, может отличаться, если учитывать динамику растворения НЧ ZnO и их последующее взаимодействие с клеткой. После воздействия НЧ ZnO у субкультур в условиях ALI было зарегистрировано значительно более низкое содержание внутриклеточных ионов цинка (в 3 раза меньше) по сравнению с погруженными эпителиальными клетками мыши C10. Кроме того, показано, что количество ионов цинка в клетках, культивируемых в условиях ALI, увеличилось через 3 ч инкубации,

а в погруженных клетках постоянно росло с течением времени. Для объяснения разницы в уровнях внутриклеточной концентрации ионов цинка была предложена гипотеза о динамике осаждения НЧ ZnO на поверхности клеток [43].

Оценка цитотоксичности НЧ ZnO может быть сложной задачей, так как они могут растворяться в цитозоле и высвобождать ионы (*shedding-effect*), которые сами по себе способны нарушать функционирование многих внутриклеточных компонентов. Проведенные к настоящему времени исследования демонстрируют, что, по-видимому, сразу несколько факторов вносят вклад в цитотоксический потенциал НЧ ZnO. К этим факторам относятся физико-химические характеристики самих НЧ, первичные иммунные ответы взаимодействующих клеток, а также условия культивирования, включая компоненты питательных сред [31–43].

В последнее время опосредованная НЧ ZnO цитотоксичность изучается во многих лабораториях как *in vivo*, так и *in vitro* на различных клетках и клеточных линиях млекопитающих [44]. Анализ литературы показал, что к ключевым факторам, обусловливающим цитотоксичность НЧ ZnO, можно отнести: 1) вне- и внутриклеточное растворение НЧ; 2) дисбаланс клеточного редокс-статуса, вызывающий накопление АФК; 3) запуск процессов программируемой клеточной гибели (апоптоза). Кратко рассмотрим каждый из этих факторов.

Цитотоксичность НЧ ZnO, связанная с их растворением. Растворение НЧ ZnO считается одной из основных причин их цитотоксичности. Интересно, что в то время как одни исследователи предполагают, что внеклеточное растворение НЧ ZnO ответственно за цитотоксичность, другие ученые демонстрируют, что долго продолжающееся поглощение НЧ ZnO клетками и последующее их растворение в лизосомах приводят к повышению цитозольного уровня ионов цинка, которое впоследствии индуцирует цитотоксичность [44]. Поглощение ионов Zn^{2+}, высвобожденных из НЧ и растворенных во внеклеточной среде, скорее всего, происходит через цинковые транспортеры семейства ZIP, локализованные на поверхности мембран, а далее клетки локализуют эти избыточные ионы внутри везикул, известных как цинкосомы [45].

Рентгенофлуоресцентный анализ и сканирующая электронная микроскопия выявили 200-кратное увеличение концентрации ионов цинка в клетках, обработанных НЧ ZnO [46]. Однако в клетках, проинкубированных с соответствующими концентрациями $ZnCl_2$, содержание свободных ионов цинка было значительно выше [26]. Избыток ионов цинка в клеточной культуральной среде из-за растворения НЧ ZnO может привести к потере целостности клеточной мембраны, высвобождению цитозольной лактатдегидрогеназы и последующей гибели клеток по пути апоптоза. Установлено, что внеклеточное растворение НЧ ZnO (~30 % при самой высокой тестируемой концентрации) в культуральной среде индуцирует нефротоксичность в гломерулярных и тубулярных клетках почки человека [47]. Авторы работы [48] показали, что НЧ ZnO способны индуцировать цитотоксичность только при прямом воздействии на моноциты. Возможным объяснением этих противоречивых результатов является образование плохо растворимого аморфного цинк-карбонат-фосфатного наноразмерного осадка, который способен защитить клетки от токсического воздействия внеклеточных ионов цинка [36].

Обнаруженная сверхэкспрессия генов металлотионеинов в клетках связана с хелатированием ионов металлов и, следовательно, с запуском механизмов детоксикации [45]. Воздействие НЧ ZnO на моноцитарные дендритные клетки, моноцитарные макрофаги человека и клеточную линию Т-лимфобластной лейкемии человека Jurkat приводило к усилению активности общих генов металлотионеинов, доказывая, что НЧ ZnO являются источниками ионов цинка, принимающих участие в клеточном метаболизме [49]. Аналогичное наблюдение было сделано, когда клеточная линия легких человека L-132 подвергалась воздействию НЧ ZnO (диаметр ~50 нм) в течение 24 ч, но профиль растворения изученных НЧ ZnO при этом не исследовался [50]. Учитывая относительную нестабильность НЧ ZnO при низких значениях pH, кислое микроокружение опухолевых клеток способствует внеклеточному растворению НЧ ZnO (~100 % после воздействия в течение 24 ч при pH 4–6), что может привести к накоплению АФК, разрушению митохондриальных мембран и остановке клеточного цикла [51]. Этим можно объяснить более высокую цитотоксичность НЧ ZnO в отношении раковых клеточных линий, о чем сообщалось ранее [44].

Дисперсная природа НЧ ZnO играет важную роль в итоговой цитотоксичности. Хотя растворение НЧ ZnO является предпосылкой для их цитотоксичности, в настоящее время нет единого мнения относительно предпочтительного места растворения НЧ ZnO (внутри или вне клетки). Кроме того, пока неясно, почему различаются механизмы, опосредующие цитотоксичность, которая индуцирована ионами цинка, высвобожденными из нано- и микрочастиц ZnO. Считается, что аналитические методы часто переоценивают количество ионов цинка, высвободившихся из НЧ в культуральную среду, и общий вклад таких ионов в итоговую цитотоксичность НЧ составляет лишь около 10 % [52].

Следует отметить, что результаты исследования цитотоксичности НЧ сильно варьируют при использовании разных типов клеток из-за различия в механизмах клеточного поглощения, и поэтому количество НЧ, напрямую взаимодействующих с клетками, также будет разным. Модификация поверхности НЧ ZnO различными покрытиями для изменения характеристик растворения может снизить их токсичность. Было установлено, что оболочка из оксида титана, покрывающая НЧ ZnO, уменьшает скорость высвобождения ионов цинка при взаимодействии с клетками [53], в результате чего снижается итоговая цитотоксичность НЧ как вне клетки, так и внутри нее. В качестве альтернативного подхода можно предложить модифицировать поверхностные свойства НЧ ZnO таким образом, чтобы усилить их поглощение клетками, не изменяя при этом скорость растворения наноматериала внутри клетки [54]. Следовательно, новые подходы, направленные на изучение растворения НЧ ZnO, могут помочь повысить биобезопасность использования этих наноматериалов в биомедицинских приложениях.

Цитотоксичность НЧ ZnO, связанная с накоплением АФК в клетках. АФК, такие как гидроксильные, супероксидные радикалы и перекись водорода, являются реакционноспособными молекулами, состоящими из анионсодержащих атомов кислорода. Нарушение окислительно-восстановительного баланса клеток может быть вызвано снижением выработки антиоксидантов или изменением их способности восстанавливать окислительные повреждения. Следствием этих процессов в клетках становится активация сигнальных каскадов, приводящая в итоге к цитотоксичности. В работе [55] была предложена иерархическая модель развития окислительного стресса для дальнейшего объяснения повреждений клетки, опосредованных НЧ. В этой модели реакция 1-го уровня характеризуется усилением активности антиоксидантных систем, за ней следует реакция 2-го уровня, включающая активацию сигнальных путей NF-κB (семейство транскрипционных факторов) или MAPK (митогенактивируемая протеинкиназа) и запускающая реакцию 3-го уровня, которая приводит к гибели клеток по пути апоптоза. Исходя из анализа литературных данных, был выдвинут постулат о ZnO-индуцированном повышении содержания АФК в различных типах клеток. Показано, что мощная антиоксидантная активность клеток BEAS-2B после предварительной инкубации с H_2O_2 помогла им лучше переносить воздействие НЧ ZnO [56]. Этот результат свидетельствует об эссенциальной роли поддержания клеточного окислительно-восстановительного баланса в физиологическом диапазоне в процессе выживания клеток при воздействии НЧ ZnO. Чтобы понять, опосредовано образование АФК воздействием НЧ ZnO или же их цитотоксичностью, авторы работы [57] изучили способность клеточной линии A549 проявлять антиоксидантный ответ после воздействия субцитотоксической концентрации НЧ ZnO. О наличии ответа свидетельствовало повышенное содержание маркера окислительно-восстановительных процессов – гемоксигеназы-1. Максимум его концентрации был достигнут через 6 ч после воздействия НЧ ZnO, при этом базальный уровень наблюдался уже спустя 24 ч после воздействия. Было высказано предположение о том, что наличие избытка ионов цинка в клетках при воздействии НЧ ZnO может вызывать нарушение равновесия в Zn-зависимой активности данного белка за счет инактивации клеточных окислительно-восстановительных систем, которое и приводит в дальнейшем к гибели клеток. Показано, что чрезмерная экспрессия такого антиоксидантного фермента, как микросомальная глутатион-S-трансфераза-1, не способствует снижению цитотоксичности в клетках рака молочной железы человека MCF-7, подвергшихся воздействию НЧ ZnO. Этот результат мог быть связан с прямым ингибированием данного фермента растворенными ионами цинка [58].

Таким образом, воздействие НЧ ZnO нарушает внутриклеточный гомеостаз ионов цинка, что приводит к повышению содержания АФК. В свою очередь, смещение клеточного окислительно-восстановительного баланса в сторону окислителей индуцирует наблюдаемые токсические эффекты НЧ ZnO, включая рост концентрации провоспалительных маркеров, инициацию процессов окислительного стресса и активацию апоптотических сигнальных путей, приводящих в дальнейшем к клеточной гибели.

Цитотоксичность НЧ ZnO, связанная с запуском апоптоза. Помимо того, что митохондрии являются основными энергетическими органеллами клетки, они также участвуют в регуляции ее сигнальных путей, которые управляют процессами апоптоза. Деполяризация митохондриальной мембраны ИНМ может вызвать гибель клеток, как было показано на примере клеток аденокарциномы легких человека H1355, подвергшихся воздействию НЧ ZnO [59]. Характерные особенности клеток, в которых запущен процесс апоптоза, включают физические изменения в цитоплазме, плазматической мембране и ядре. Отмечено, что НЧ ZnO при взаимодействии с клетками *in vitro* индуцируют несколько сигнальных путей, которые и приводят к апоптотической гибели клеток. При этом установлено, что именно сигнальные пути p53 и p38 вовлечены в апоптотическую гибель клеток, индуцированную НЧ ZnO. Авторы работ [60; 61] продемонстрировали повышенную активность проапоптотических генов каспазы-3, белка Bax и белка p53, выполняющего функцию опухолевого супрессора, наряду с фрагментацией ДНК для клеток HepG2 и дермальных фибробластов человека, обработанных НЧ ZnO. Недавнее исследование, проведенное на

ганглиозных клетках сетчатки глаза крысы RCG-5, показало, что увеличение содержания АФК приводит к сверхэкспрессии каспазы-12, активации окислительного стресса в эндоплазматическом ретикулуме и, соответственно, гибели клеток [62]. Было отмечено, что NOX2-фагоцитарный ферментный комплекс НАДФН-оксидазы является основным источником образования АФК и индукции апоптоза и (или) некроза. Известные редокс-чувствительные пути, такие как каскад Nrf2 (антиоксидантный транскрипционный ядерный фактор, связанный с эритроидом-2), могут способствовать цитотоксичности макрофагов [63]. Недавнее исследование действия НЧ ZnO на культуру первичных астроцитов крысы подтвердило роль сигнального пути JNK (N-концевая киназа c-Jun) в развитии апоптоза [64].

Альтернативным апоптотическим механизмом клеточной гибели является аутофагия, при которой клетка выживает, но ее компоненты доставляются внутрь везикул, называемых аутофагосомами. В конечном итоге они сливаются с лизосомами, что приводит к разрушению инкапсулированного материала [65]. Показано, что воздействие НЧ ZnO на клетки эпидермиса мыши способствует образованию аутофагической вакуоли с последующей митохондриальной дисфункцией и гибелью клеток [66]. Тем не менее примечательно, что для лейкозных Т-клеток человека воздействие НЧ ZnO инициировало альтернативный путь апоптоза, независимый от каспаз и неопосредованный АФК [67].

Под генотоксичностью, обусловленной НЧ, обычно понимают повреждение клеточной ДНК, которое может происходить либо непосредственно (из-за взаимодействия НЧ с ядерным материалом), либо косвенно (из-за повышения содержания АФК, других реактивных ионов или механического повреждения). Механизмы повреждения ДНК могут быть неактивны или даже снижены при взаимодействии клеток с НЧ ZnO, что объясняется генотоксическим потенциалом этих НЧ. Показано, что НЧ ZnO в концентрации 5 мкг/мл вызывают значительное повреждение ДНК, о чем свидетельствует увеличение момента хвоста кометы (метод ДНК-комет) в клетках эпидермиса человека A431 [68]. Схожие результаты получены и для эпителиальных клеток проксимальных канальцев почек человека HK-2 [69]. Также было продемонстрировано концентрационнозависимое окислительное повреждение ДНК, приводящее к ядерной конденсации, фрагментации ДНК, образованию в ней гиподиплоидных ядер и апоптотических телец при обработке макрофагов НЧ ZnO [63]. В качестве возможного объяснения генотоксичности предложено внутриядерное распределение НЧ ZnO, которое наблюдалось в клетках плоскоклеточного рака головы и шеи человека [70]. Однако до настоящего времени нет полного понимания механизма повреждения ДНК НЧ ZnO, а в клетках THP-1, подвергшихся воздействию нано- или микрочастиц ZnO, вообще не было выявлено признаков генотоксического повреждения. Данный результат можно объяснить размером частиц нанопорошка ZnO, который использовали исследователи (он превышал 100 нм) [48; 49]. Так, например, обработка клеток фибробластов легких китайского хомяка CHL положительно или отрицательно заряженными НЧ ZnO размером 20 или 70 нм не приводила к индуцированию кластогенного эффекта (включая генотоксичность *in vivo*) [71].

В связи с широким использованием НЧ ZnO в качестве УФ-фильтров в солнцезащитной косметике крайне актуальным представляется исследование влияния УФ-излучения на генотоксичность НЧ ZnO. Авторы работы [72] показали, что в клетках эмбриональной почки человека HEK293 и эмбриональных фибробластов мыши NIH/3T3, подвергнутых воздействию НЧ ZnO в концентрации 100 мкг/мл, происходит повреждение ДНК, хотя после воздействия УФ-B-излучения (280–315 нм) на клетки, проинкубированные с НЧ, наблюдалось значительное снижение генотоксического потенциала. Совместное воздействие НЧ ZnO и УФ-A-излучения (315–400 нм) на клетки THP-1 приводило к накоплению в них такого же количества АФК, как при воздействии УФ-A-излучения в отсутствие НЧ, что указывает на минимальное участие НЧ ZnO в индукции повреждений в данных клетках [73].

Заключение

Таким образом, многочисленные исследования токсичности НЧ ZnO указывают на их реактивную природу. Цитотоксические реакции НЧ ZnO могут в значительной степени зависеть от типа исследуемой клетки, условий и времени воздействия, а также способа получения НЧ ZnO, обусловливающего их основные физико-химические характеристики. Стоит отметить, что наличие покрытий и (или) ионных примесей в НЧ ZnO наряду с присутствием в среде инкубации белков и (или) фосфатов также может влиять на общий цитотоксический потенциал частиц. Растворение НЧ ZnO вне клеток либо внутри их лизосомального компартмента приводит к нарушению клеточного гомеостаза ионов цинка, что впоследствии индуцирует накопление АФК.

Недавние исследования также продемонстрировали склонность НЧ ZnO к взаимодействию со специфическими рецепторными молекулами на поверхности клеток, что обусловливает влияние на транскрипцию провоспалительных цитокинов через определенные сигнальные пути. Помимо иммуномодуляции, воздействие НЧ ZnO *in vitro* может приводить к аутофагии, генотоксичности и апоптозу в различных

типах клеток. Воздействие НЧ ZnO *in vivo* по пероральному, интратрахеальному или ингаляционному пути способствует их накоплению в жизненно важных органах, таких как печень, почки, сердце и легкие, что сопряжено с токсическими и (или) воспалительными последствиями. Исследования *in vitro* широкого диапазона концентраций НЧ ZnO могут помочь расширить существующие токсикологические представления об этом наноматериале. Детальное понимание цитотоксического и воспалительного потенциала НЧ ZnO лежит в основе всестороннего изучения возможности их дальнейшего применения в биомедицинском секторе.

Библиографические ссылки / References

1. Nel A, Xia T, Mädler L, Li N. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science.* 2006;311(5761):622–627. DOI: 10.1126/science.1114397.

2. Rasmussen JW, Martinez E, Louka P, Wingett DG. Zinc oxide nanoparticles for selective destruction of tumor cells and potential for drug delivery applications. *Expert Opinion on Drug Delivery.* 2010;7(9):1063–1077. DOI: 10.1517/17425247.2010.502560.

3. Wiesmann N, Tremel W, Brieger J. Zinc oxide nanoparticles for therapeutic purposes in cancer medicine. *Journal of Materials Chemistry B.* 2020;8(23):4973–4989. DOI: 10.1039/d0tb00739k.

4. Czyżowska A, Barbasz A. A review: zinc oxide nanoparticles – friends or enemies? *International Journal of Environmental Health Research.* 2022;32(4):885–901. DOI: 10.1080/09603123.2020.1805415.

5. Tamashevski A, Harmaza Y, Viter R, Jevdokimovs D, Poplausks R, Slobozhanina E, et al. Zinc oxide nanorod based immunosensing platform for the determination of human leukemic cells. *Talanta.* 2019;200:378–386. DOI: 10.1016/j.talanta.2019.03.064.

6. Tamashevski A, Harmaza Y, Slobozhanina E, Viter R, Iatsunskyi I. Photoluminescent detection of human T-lymphoblastic cells by ZnO nanorods. *Molecules.* 2020;25(14):3168. DOI: 10.3390/molecules25143168.

7. Yoshioka Y, Higashisaka K, Tsunoda S, Tsutsumi Y. The absorption, distribution, metabolism, and excretion profile of nanoparticles. In: Akashi M, Akagi T, Matsusaki M, editors. *Engineered cell manipulation for biomedical application.* Tokyo: Springer; 2014. p. 259–271 (Zucolotto V, editor. Nanomedicine and nanotoxicology). DOI: 10.1007/978-4-431-55139-3_15.

8. Martirosyan A, Schneider Y-J. Engineered nanomaterials in food: implications for food safety and consumer health. *International Journal of Environmental Research and Public Health.* 2014;11(6):5720–5750. DOI: 10.3390/ijerph110605720.

9. Keerthana S, Kumar A. Potential risks and benefits of zinc oxide nanoparticles: a systematic review. *Critical Reviews in Toxicology.* 2020;50(1):47–71. DOI: 10.1080/10408444.2020.1726282.

10. Boyes WK, van Thriel C. Neurotoxicology of nanomaterials. *Chemical Research in Toxicology.* 2020;33(5):1121–1144. DOI: 10.1021/acs.chemrestox.0c00050.

11. Hoet PHM, Brüske-Hohlfeld I, Salata OV. Nanoparticles – known and unknown health risks. *Journal of Nanobiotechnology.* 2004;2:12. DOI: 10.1186/1477-3155-2-12.

12. Patel S, Kim J, Herrera M, Mukherjee A, Kabanov AV, Sahay G. Brief update on endocytosis of nanomedicines. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 2019;144:90–111. DOI: 10.1016/j.addr.2019.08.004.

13. Chen W, D'Argenio DZ, Sipos A, Kim K-J, Crandall ED. Biokinetic modeling of nanoparticle interactions with lung alveolar epithelial cells: uptake, intracellular processing, and egress. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology.* 2021;320(1):R36–R43. DOI: 10.1152/ajpregu.00184.2020.

14. Means N, Elechalawar CK, Chen WR, Bhattacharya R, Mukherjee P. Revealing macropinocytosis using nanoparticles. *Molecular Aspects of Medicine.* 2022;83:100993. DOI: 10.1016/j.mam.2021.100993.

15. Shende P, Wakade VS. Biointerface: a nano-modulated way for biological transportation. *Journal of Drug Targeting.* 2020;28(5):456–467. DOI: 10.1080/1061186X.2020.1720218.

16. Landsiedel R, Honarvar N, Seiffert SB, Oesch B, Oesch F. Genotoxicity testing of nanomaterials. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology.* 2022;14(6):e1833. DOI: 10.1002/wnan.1833.

17. Yao Yongshuai, Zhang Ting, Tang Meng. The DNA damage potential of quantum dots: toxicity, mechanism and challenge. *Environmental Pollution.* 2023;317:120676. DOI: 10.1016/j.envpol.2022.120676.

18. Mandal P, Ghosh SK. Graphene-based nanomaterials and their interactions with lipid membranes. *Langmuir.* 2023;39(51):18713–18729. DOI: 10.1021/acs.langmuir.3c02805.

19. Harmaza YM, Tamashevski AV, Slobozhanina EI. Membrane effects of zinc oxide nanorods and nanoparticles in human lymphocytes. *Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus.* 2019;63(1):72–78. Russian. DOI: 10.29235/1561-8323-2019-63-1-72-78.

20. Wu Daming, Ma Ying, Cao Yuna, Zhang Ting. Mitochondrial toxicity of nanomaterials. *Science of the Total Environment.* 2020;702:134994. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2019.134994.

21. Aljabali AA, Obeid MA, Bashatwah RM, Serrano-Aroca Á, Mishra V, Mishra Y, et al. Nanomaterials and their impact on the immune system. *International Journal of Molecular Sciences.* 2023;24(3):2008. DOI: 10.3390/ijms24032008.

22. Mukherjee B, Maji R, Roychowdhury S, Ghosh S. Toxicological concerns of engineered nanosize drug delivery systems. *American Journal of Therapeutics.* 2016;23(1):e139–e150. DOI: 10.1097/01.mjt.0000433947.16654.75.

23. Domb AJ, Sharifzadeh G, Nahum V, Hosseinkhani H. Safety evaluation of nanotechnology products. *Pharmaceutics.* 2021;13(10):1615. DOI: 10.3390/pharmaceutics13101615.

24. Sayes CM, Warheit DB. Characterization of nanomaterials for toxicity assessment. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology.* 2009;1(6):660–670. DOI: 10.1002/wnan.58.

25. Sabourian P, Yazdani G, Ashraf SS, Frounchi M, Mashayekhan S, Kiani S, et al. Effect of physico-chemical properties of nanoparticles on their intracellular uptake. *International Journal of Molecular Sciences.* 2020;21(21):8019. DOI: 10.3390/ijms21218019.

26. Harmaza YM, Tamashevski AV, Slobozhanina EI. Molecular nature of cytotoxicity of zinc oxide nanostructures. *Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*. 2020;64(4):448–456. Russian. DOI: 10.29235/1561-8323-2020-64-4-448-456.

27. Zielińska A, Costa B, Ferreira MV, Miguéis D, Louros JMS, Durazzo A, et al. Nanotoxicology and nanosafety: safety-by-design and testing at a glance. *International Journal of Environmental Research and Public Health.* 2020;17(13):4657. DOI: 10.3390/ijerph17134657.

28. Verma HK, Vij M, Maurya KK. Synthesis, characterization and sun light-driven photocatalytic activity of zinc oxide nanostructures. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology.* 2020;20(6):3683–3692. DOI: 10.1166/jnn.2020.17679.

29. Jha S, Rani R, Singh S. Biogenic zinc oxide nanoparticles and their biomedical applications: a review. *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials.* 2023;33(6):1437–1452. DOI: 10.1007/s10904-023-02550-x.

30. Yi Caixia, Yu Zhihai, Ren Qian, Liu Xian, Wang Yan, Sun Xin, et al. Nanoscale ZnO-based photosensitizers for photodynamic therapy. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy.* 2020;30:101694. DOI: 10.1016/j.pdpdt.2020.101694.

31. Li Jingyuan, Guo Dadong, Wang Xuemei, Wang Huangping, Jiang Hui, Chen Baoan. The photodynamic effect of different size ZnO nanoparticles on cancer cell proliferation *in vitro*. *Nanoscale Research Letters.* 2010;5(6):1063–1071. DOI: 10.1007/s11671-010-9603-4.

32. Fujihara J, Nishimoto N. Review of zinc oxide nanoparticles: toxicokinetics, tissue distribution for various exposure routes, toxicological effects, toxicity mechanism in mammals, and an approach for toxicity reduction. *Biological Trace Element Research.* 2024;202(1):9–23. DOI: 10.1007/s12011-023-03644-w.

33. Akhtar MJ, Ahamed M, Kumar S, Khan MM, Ahmad J, Alrokayan SA. Zinc oxide nanoparticles selectively induce apoptosis in human cancer cells through reactive oxygen species. *International Journal of Nanomedicine.* 2012;7:845–857. DOI: 10.2147/IJN.S29129.

34. Andersson-Willman B, Gehrmann U, Cansu Z, Buerki-Thurnherr T, Krug HF, Gabrielsson S, et al. Effects of subtoxic concentrations of TiO_2 and ZnO nanoparticles on human lymphocytes, dendritic cells and exosome production. *Toxicology and Applied Pharmacology.* 2012;264(1):94–103. DOI: 10.1016/j.taap.2012.07.021.

35. Lovén K, Dobric J, Bölükbas DA, Kåredal M, Tas S, Rissler J, et al. Toxicological effects of zinc oxide nanoparticle exposure: an *in vitro* comparison between dry aerosol air – liquid interface and submerged exposure systems. *Nanotoxicology.* 2021;15(4):494–510. DOI: 10.1080/17435390.2021.1884301.

36. Everett WN, Chern C, Sun D, McMahon RE, Zhang X, Chen WJA, et al. Phosphate-enhanced cytotoxicity of zinc oxide nanoparticles and agglomerates. *Toxicology Letters.* 2014;225(1):177–184. DOI: 10.1016/j.toxlet.2013.12.005.

37. Bardhan M, Mandal G, Ganguly T. Steady state, time resolved, and circular dichroism spectroscopic studies to reveal the nature of interactions of zinc oxide nanoparticles with transport protein bovine serum albumin and to monitor the possible protein conformational changes. *Journal of Applied Physics.* 2009;106(3):034701. DOI: 10.1063/1.3190483.

38. Babayevska N, Przysiecka Ł, Iatsunskyi I, Nowaczyk G, Jarek M, Janiszewska E, et al. ZnO size and shape effect on antibacterial activity and cytotoxicity profile. *Scientific Reports.* 2022;12:8148. DOI: 10.1038/s41598-022-12134-3.

39. Song Wenhua, Zhang Jinyang, Guo Jing, Zhang Jinhua, Ding Feng, Li Liying, et al. Role of the dissolved zinc ion and reactive oxygen species in cytotoxicity of ZnO nanoparticles. *Toxicology Letters.* 2010;199(3):389–397. DOI: 10.1016/j.toxlet.2010.10.003.

40. Li Xianqiang, Fang Xin, Ding Yanhuai, Li Juan, Cao Yi. Toxicity of ZnO nanoparticles (NPs) with or without hydrophobic surface coating to THP-1 macrophages: interactions with BSA or oleate-BSA. *Toxicology Mechanisms and Methods.* 2018;28(7):520–528. DOI: 10.1080/15376516.2018.1469708.

41. Bengalli R, Gualtieri M, Capasso L, Urani C, Camatini M. Impact of zinc oxide nanoparticles on an *in vitro* model of the human air-blood barrier. *Toxicology Letters.* 2017;279:22–32. DOI: 10.1016/j.toxlet.2017.07.877.

42. Xie Y, Williams NG, Tolic A, Chrisler WB, Teeguarden JG, Maddux BLS, et al. Aerosolized ZnO nanoparticles induce toxicity in alveolar type II epithelial cells at the air – liquid interface. *Toxicological Sciences.* 2012;125(2):450–461. DOI: 10.1093/toxsci/kfr251.

43. Mihai C, Chrisler WB, Xie Y, Hu D, Szymanski CJ, Tolic A, et al. Intracellular accumulation dynamics and fate of zinc ions in alveolar epithelial cells exposed to airborne ZnO nanoparticles at the air – liquid interface. *Nanotoxicology.* 2015;9(1):9–22. DOI: 10.3109/17435390.2013.859319.

44. Pei Xingyao, Jiang Haiyang, Xu Gang, Li Cun, Li Daowen, Tang Shusheng. 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;23(12):6724. DOI: 10.3390/ijms23126724.

45. Harmaza YM, Tamashevski AV, Slobozhanina EI. The role of metallothioneins in maintenance of zinc homeostasis and redox state in erythrocytes of cardiologic patients with metabolic syndrome. *Journal of Integrated OMICS.* 2019;9(1):260. DOI: 10.5584/jiomics.v9i1.260.

46. James SA, Feltis BN, de Jonge MD, Sridhar M, Kimpton JA, Altissimo M, et al. Quantification of ZnO nanoparticle uptake, distribution, and dissolution within individual human macrophages. *ACS Nano.* 2013;7(12):10621–10635. DOI: 10.1021/nn403118u.

47. Iavicoli I, Fontana L, Nordberg G. The effects of nanoparticles on the renal system. *Critical Reviews in Toxicology.* 2016;46(6):490–560. DOI: 10.1080/10408444.2016.1181047.

48. Shen C, James SA, de Jonge MD, Turney TW, Wright PFA, Feltis BN. Relating cytotoxicity, zinc ions, and reactive oxygen in ZnO nanoparticle-exposed human immune cells. *Toxicological Sciences.* 2013;136(1):120–130. DOI: 10.1093/toxsci/kft187.

49. Tuomela S, Autio R, Buerki-Thurnherr T, Arslan O, Kunzmann A, Andersson-Willman B, et al. Gene expression profiling of immune-competent human cells exposed to engineered zinc oxide or titanium dioxide nanoparticles. *PLoS One.* 2013;8(7):e68415. DOI: 10.1371/journal.pone.0068415.

50. Elfsmark L, Ekstrand-Hammarström B, Forsgren N, Lejon C, Hägglund L, Wingfors H. Characterization of toxicological effects of complex nano-sized metal particles using *in vitro* human cell and whole blood model systems. *Journal of Applied Toxicology.* 2022;42(2):203–215. DOI: 10.1002/jat.4202.

51. Sasidharan A, Chandran P, Menon D, Raman S, Nair S, Koyakutty M. Rapid dissolution of ZnO nanocrystals in acidic cancer microenvironment leading to preferential apoptosis. *Nanoscale.* 2011;3(9):3657–3669. DOI: 10.1039/c1nr10272a.

52. Mu Yunsong, Wu Fengchang, Zhao Qing, Ji Rong, Qie Yu, Zhou Yue, et al. Predicting toxic potencies of metal oxide nanoparticles by means of nano-QSARs. *Nanotoxicology.* 2016;10(9):1207–1214. DOI: 10.1080/17435390.2016.1202352.

53. Hsiao I-Lun, Huang Yuh-Jeen. Titanium oxide shell coatings decrease the cytotoxicity of ZnO nanoparticles. *Chemical Research in Toxicology.* 2011;24(3):303–313. DOI: 10.1021/tx1001892.

54. Luo M, Shen C, Feltis BN, Martin LL, Hughes AE, Wright PFA, et al. Reducing ZnO nanoparticle cytotoxicity by surface modification. *Nanoscale.* 2014;6(11):5791–5798. DOI: 10.1039/c4nr00458b.

55. Xia T, Kovochich M, Liong M, Mädler L, Gilbert B, Shi H, et al. Comparison of the mechanism of toxicity of zinc oxide and cerium oxide nanoparticles based on dissolution and oxidative stress properties. *ACS Nano.* 2008;2(10):2121–2134. DOI: 10.1021/nn800511k.

56. Heng BC, Zhao X, Xiong S, Ng KW, Boey FYC, Loo JSC. Toxicity of zinc oxide (ZnO) nanoparticles on human bronchial epithelial cells (BEAS-2B) is accentuated by oxidative stress. *Food and Chemical Toxicology.* 2010;48(6):1762–1766. DOI: 10.1016/j.fct.2010.04.023.

57. Saptarshi SR, Feltis BN, Wright PFA, Lopata AL. Investigating the immunomodulatory nature of zinc oxide nanoparticles at sub-cytotoxic levels *in vitro* and after intranasal instillation *in vivo*. *Journal of Nanobiotechnology.* 2015;13:6. DOI: 10.1186/s12951-015-0067-7.

58. Shi J, Karlsson HL, Johansson K, Gogvadze V, Xiao L, Li J, et al. Microsomal glutathione transferase 1 protects against toxicity induced by silica nanoparticles but not by zinc oxide nanoparticles. *ACS Nano.* 2012;6(3):1925–1938. DOI: 10.1021/nn2021056.

59. Kao Yi-Yun, Chen Yi-Chun, Cheng Tsun-Jen, Chiung Yin-Mei, Liu Pei-Shan. Zinc oxide nanoparticles interfere with zinc ion homeostasis to cause cytotoxicity. *Toxicological Sciences.* 2012;125(2):462–472. DOI: 10.1093/toxsci/kfr319.

60. Sharma V, Anderson D, Dhawan A. Zinc oxide nanoparticles induce oxidative DNA damage and ROS-triggered mitochondria mediated apoptosis in human liver cells (HepG2). *Apoptosis.* 2012;17(8):852–870. DOI: 10.1007/s10495-012-0705-6.

61. Meyer K, Rajanahalli P, Ahamed M, Rowe JJ, Hong Y. ZnO nanoparticles induce apoptosis in human dermal fibroblasts via p53 and p38 pathways. *Toxicology in Vitro.* 2011;25(8):1721–1726. DOI: 10.1016/j.tiv.2011.08.011.

62. Guo Dadong, Bi Hongsheng, Liu Bing, Wu Qiuxin, Wang Daoguang, Cui Yan. Reactive oxygen species-induced cytotoxic effects of zinc oxide nanoparticles in rat retinal ganglion cells. *Toxicology in Vitro.* 2013;27(2):731–738. DOI: 10.1016/j.tiv.2012.12.001.

63. Wilhelmi V, Fischer U, Weighardt H, Schulze-Osthoff K, Nickel C, Stahlmecke B, et al. Zinc oxide nanoparticles induce necrosis and apoptosis in macrophages in a p47phox- and Nrf2-independent manner. *PLoS One.* 2013;8(6):e65704. DOI: 10.1371/journal.pone.0065704.

64. Wang Jieting, Deng Xiaobei, Zhang Fang, Chen Deliang, Ding Wenjun. ZnO nanoparticle-induced oxidative stress triggers apoptosis by activating JNK signaling pathway in cultured primary astrocytes. *Nanoscale Research Letters.* 2014;9:117. DOI: 10.1186/1556-276X-9-117.

65. Uzhytchak M, Smolková B, Lunova M, Frtús A, Jirsa M, Dejneka A, et al. Lysosomal nanotoxicity: impact of nanomedicines on lysosomal function. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 2023;197:114828. DOI: 10.1016/j.addr.2023.114828.

66. Kim Boyun, Kim Gaeun, Jeon Soyeon, Cho Wan-Seob, Jeon Hyun Pyo, Jung Jewon. Zinc oxide nanoparticles trigger autophagy-mediated cell death through activating lysosomal TRPML1 in normal kidney cells. *Toxicology Reports.* 2023;10:529–536. DOI: 10.1016/j.toxrep.2023.04.012.

67. Buerki-Thurnherr T, Xiao L, Diener L, Arslan O, Hirsch C, Maeder-Althaus X, et al. *In vitro* mechanistic study towards a better understanding of ZnO nanoparticle toxicity. *Nanotoxicology.* 2013;7(4):402–416. DOI: 10.3109/17435390.2012.666575.

68. Sharma V, Shukla RK, Saxena N, Parmar D, Das M, Dhawan A. DNA damaging potential of zinc oxide nanoparticles in human epidermal cells. *Toxicology Letters.* 2009;185(3):211–218. DOI: 10.1016/j.toxlet.2009.01.008.

69. Kermanizadeh A, Vranic S, Boland S, Moreau K, Baeza-Squiban A, Gaiser BK, et al. An *in vitro* assessment of panel of engineered nanomaterials using a human renal cell line: cytotoxicity, pro-inflammatory response, oxidative stress and genotoxicity. *BMC Nephrology.* 2013;14:96. DOI: 10.1186/1471-2369-14-96.

70. Hackenberg S, Scherzed A, Kessler M, Froelich K, Ginzkey C, Koehler C, et al. Zinc oxide nanoparticles induce photocatalytic cell death in human head and neck squamous cell carcinoma cell lines *in vitro*. *International Journal of Oncology.* 2010;37(6):1583–1590. DOI: 10.3892/ijo_00000812.

71. Moratin H, Scherzad A, Gehrke T, Ickrath P, Radeloff K, Kleinsasser N, et al. Toxicological characterization of ZnO nanoparticles in malignant and non-malignant cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis.* 2018;59(3):247–259. DOI: 10.1002/em.22156.

72. Demir E, Akça H, Kaya B, Burgucu D, Tokgün O, Turna F, et al. Zinc oxide nanoparticles: genotoxicity, interactions with UV-light and cell-transforming potential. *Journal of Hazardous Materials.* 2014;264:420–429. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2013.11.043.

73. Shen C, Turney TW, Piva TJ, Feltis BN, Wright PFA. Comparison of UVA-induced ROS and sunscreen nanoparticle-generated ROS in human immune cells. *Photochemical and Photobiological Sciences.* 2014;13(5):781–788. DOI: 10.1039/c3pp50428j.

Получена 28.04.2024 / исправлена 27.05.2024 / принята 27.05.2024.
Received 28.04.2024 / revised 27.05.2024 / accepted 27.05.2024.