

Ю. М. Гармаза, А. В. Тамашевский, член-корреспондент Е. И. Слобожанина

*Институт биофизики и клеточной инженерии Национальной академии наук Беларуси,
Минск, Республика Беларусь*

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ПРИРОДА ЦИТОТОКСИЧНОСТИ НАНОСТРУКТУР ОКСИДА ЦИНКА

Аннотация. Проведен сравнительный анализ молекулярных процессов, вызванных воздействием наноструктурированного оксида цинка разной формы (стержни и сферические частицы), а также хлоридом цинка как источника свободных ионов на лимфоциты человека. Выявлено снижение процента жизнеспособных клеток при инкубации их в течение 20 и 40 ч с наноструктурами оксида цинка и хлоридом цинка за счет увеличения внутриклеточной концентрации лабильного пула Zn^{2+} . Обнаружено, что наименьшей цитотоксичностью обладают наностержни оксида цинка, а наибольшей – хлорид цинка. Возможным механизмом цитотоксичного действия данных агентов выступает Zn-опосредованная активация свободнорадикальных процессов в клетке – увеличение накопления активных форм кислорода в модифицированных лимфоцитах. Таким образом, форма наноматериала и его способность «отдавать» ионы цинка вносят основной вклад в обнаруженные клеточные молекулярные процессы *in vitro*.

Ключевые слова: лимфоциты человека, наностержни и наночастицы оксида цинка, жизнеспособность, лабильный пул цинка, активные формы кислорода

Для цитирования. Гармаза, Ю. М. Молекулярная природа цитотоксичности наноструктур оксида цинка / Ю. М. Гармаза, А. В. Тамашевский, Е. И. Слобожанина // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2020. – Т. 64, № 4. – С. 448–456. <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2020-64-4-448-456>

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

MOLECULAR NATURE OF CYTOTOXICITY OF ZINC OXIDE NANOSTRUCTURES

Abstract. A comparative analysis of the molecular process of nanostructured zinc oxide of different shape (rod and spherical particle) and zinc chloride as a source of free ions on human lymphocytes was carried out. Our data indicated that ZnO nanostructures induced a decrease in the lymphocyte viability and an increase in the intracellular labile Zn^{2+} pool in a concentration-dependent manner after 20 and 40 h incubation with cells. It was found that ZnO NRs have the lowest cytotoxicity, but $ZnCl_2$ – the highest. The Zn-mediated activation of free radical processes – ROS accumulation in the cells – is a possible mechanism of the cytotoxic action of these agents. Thus, the shape of ZnO nanomaterial and its ability “to shed” zinc ions make the main contribution to the detected molecular and membrane process on human lymphocytes *in vitro*.

Keywords: human lymphocytes, zinc oxide nanorods and nanoparticles, viability, a label zinc pool, reactive oxygen species

For citation: Harmaza Yu. M., Tamashevski A. V., Slobozhanina E. I. Molecular nature of cytotoxicity of zinc oxide nanostructures. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2020, vol. 64, no. 4, pp. 448–456 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2020-64-4-448-456>

Введение. За последние десять лет достигнуты значительные успехи в исследованиях, касающихся биомедицинского применения наноматериалов. Установлено, что уменьшение размера частиц от объемного материала до наноразмера сопровождается изменением не только их химических и физических, но и биологических свойств [1; 2]. Эти особые характеристики в итоге и позволяют наночастицам взаимодействовать определенным образом с биомолекулами и проникать внутрь клетки [3]. Многие наноструктурированные материалы имеют большую площадь поверхности, что сказывается на их высокой реактивности. Однако несмотря на прогресс в наномедицине, исследования данной области еще далеки от достижения полного понимания поведения наноматериала в организме человека.

Наноструктурированный оксид цинка – наноматериал, который в настоящее время нашел широкое применение в биомедицинском секторе, в большей степени благодаря своей способности «отдавать» ионы цинка (ion-shedding effect), которые являются эссенциальными для организма, что и отличает ZnO от других используемых наноструктурированных металлсодержащих оксидов [4]. Известно, что цинк (Zn^{2+}) – жизненно необходимый микроэлемент, который контролирует процессы пролиферации, дифференцировки и клеточной гибели, может имитировать действие гормонов, ростовых факторов, цитокинов. Однако нами в [5; 6], посвященных действию цинка, показано, что существуют механизмы регуляции цинкового гомеостаза в эритроцитах человека и четкая концентрационная грань между его «эссенциальными» и токсичными свойствами.

В экспериментах как *in vivo*, так и *in vitro* продемонстрированы токсические эффекты наноструктурированного ZnO [4; 7]. Мы предположили, что ключевую роль в данном процессе играют именно ионы цинка, которые способны в высокой концентрации активировать свободнорадикальные реакции в клетках и запускать программируемую клеточную гибель. Поэтому целью данной работы явилось изучение молекулярных эффектов действия наностержней и сферических наночастиц оксида цинка после их взаимодействия с лимфоцитами человека и выявление механизмов цитотоксического действия данных наноструктур. В качестве источника свободных ионов для проведения сравнительного анализа был использован хлорид цинка.

Материалы и методы исследования. В работе использована периферическая кровь практически здоровых доноров в антикоагулянте «гепарин», полученная из РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий Министерства здравоохранения Республики Беларусь.

Периферические мононуклеарные клетки крови выделяли в градиенте плотности гистопак-1077 путем центрифугирования при 300g в течение 30 мин. Далее клетки отмывали в 10 мМ фосфатном буфере (PBS: KH_2PO_4 – 2 мМ, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ – 10 мМ, NaCl – 137 мМ, KCl – 2,7 мМ, pH 7,4) с последующим центрифугированием 300g, 15 мин.

В качестве источника наноструктурированного оксида цинка были использованы наностержни оксида цинка (ZnO NRs) и наночастицы оксида цинка (ZnO NPs) в виде белого порошка, предоставленные Институтом атомной физики и спектроскопии Латвийского университета (Рига, Латвия). Данные наноматериалы получали путем газодисперсионного синтеза. Порошок ZnO NPs и ZnO NRs растворяли в деионизированной воде до конечной концентрации 1 мг/мл. Перед каждым использованием полученную суспензию обрабатывали ультразвуком 22 КHz в течение 30 мин, после чего готовили необходимые стоковые растворы для обработки клеток. Хлорид цинка также растворяли в деионизированной воде до конечной концентрации 1 мг/мл. Морфология данных ZnO NRs и ZnO NPs нами ранее была изучена методом сканирующей электронной микроскопии, который продемонстрировал, что геометрические размеры ZnO NPs составляют 30–100 нм, а диаметр ZnO NRs: 70–150 нм и длина не превышала 500 нм [8].

Клетки, находящиеся в питательной среде RPMI-1640 с добавлением 10 %-ной эмбриональной телячьей сыворотки и 2 мМ L-глутамин, инкубировали с растворами наноструктурированного ZnO или $ZnCl_2$ в концентрациях 1; 10; 50, 100 мкг/мл в 24-луночных планшетах (600 тыс. клеток/на лунку) в увлажненной атмосфере с 5 %-ным содержанием CO_2 при температуре 37 °C в течение 20 и 40 ч, затем отмывали (300g, 10 мин) в 10 мМ PBS pH 7,4 от ксенобиотиков и RPMI-1640 и использовали согласно экспериментальным протоколам.

Оценку жизнеспособности лимфоцитов проводили с использованием теста аннексин-V-FITC/7-аминоактиномицин (7-AAD). Для этого лимфоциты (200 тыс. клеток/мл) ресуспензировали в холодном аннексин-V-связывающем буфере (HEPES/NaOH – 10 мМ, NaCl – 140 мМ, $CaCl_2$ – 2,5 мМ, pH 7,4), содержащем аннексин-V-FITC и 7-AAD, и инкубировали 15 мин на холоде. Далее незамедлительно проводили цитофлуориметрический анализ в FITC-H и PC 5.5-H каналах. Жизнеспособными считали клетки, неокрашенные аннексином-V и 7-AAD.

Оценку внутриклеточной концентрации лабильных ионов цинка проводили с использованием флуоресцентного зонда FluoZin-3-AM. Для этого лимфоциты, ресуспензированные в 10 мМ трисHCl буфере, содержащем 155 мМ NaCl pH 7,4 до 200 тыс. клеток/мл, нагружали красителем, который находился в растворе плюроновой кислоты F 127 и ДМСО, в течение 30 мин при 37 °C при постоянном перемешивании. Зонд, несвязавшийся с лимфоцитами, отмывали путем центри-

фугирования суспензии клеток (300g, 10 мин), ресуспензировали их в исходном буфере, содержащем 2 % бычьего сывороточного альбумина, инкубировали при комнатной температуре в течение 15 мин в темноте и дважды отмывали (300g, 10 мин) в 10 мМ трисНСI буфере + 155 мМ NaCl pH 7,4. После этого проводили измерение интенсивности флуоресценции в FITC-Н канале на проточном цитофлуориметре.

Оценку уровня содержания активных форм кислорода (АФК) проводили методом проточной цитофлуориметрии с применением флуоресцентного зонда 2',7'-дихлородигидрофлуоресцеин диацетата (H_2DCFDA). Изолированные лимфоциты (200 тыс. клеток/мл) помещали в 10 мМ PBS, содержащий H_2DCFDA в конечной концентрации 1 мкМ, и инкубировали в течение 40 мин при температуре 37 °С. Затем проводили отмывку лимфоцитов в PBS от несвязавшегося зонда (300g, 10 мин) и измерения на проточном цитофлуориметре в FITC-Н канале.

В работе использованы следующие химические реактивы: FluoZin-3-AM и 2',7'-дихлородигидрофлуоресцеин диацетат (H_2DCFDA) (Molecular Probes, США); FITC-конъюгированный аннексин V (Beckman Coulter, США); диметилсульфоксид (ДМСО), плюроновая кислота F-127, гистопак-1077, L-глутамин, питательная среда RPMI-1640, хлорид цинка, трисаминометан (Sigma, США); эмбриональная телячья сыворотка (Thermo Scientific, США); N-гидроксиэтилпиперазин-N-этансульфонат натрия соль (HEPES/NaOH), бычий сывороточный альбумин (Applichem, Германия); хлорид кальция, хлорид натрия, хлорид калия, натрий фосфорнокислый, калий фосфорнокислый, соляная кислота (Рехим, Россия).

Цитофлуориметрический анализ проводили на цитофлуориметре CytoFLEX (Beckman Coulter). Результаты экспериментов анализировали методом вариационной статистики с использованием непараметрических критериев Уилкоксона и Спирмена (R_s) в программе Statistica 8.0. В работе представлены средние значения 5–8 независимых экспериментов в виде $x_{cp} \pm s_x$, где x_{cp} – среднее значение, s_x – стандартное отклонение.

Результаты и их обсуждение. Для оценки жизнеспособности лимфоцитов после воздействия исследуемых форм наноструктурированного оксида цинка – сферических частиц и стержней, а также хлорида цинка как источника свободных ионов Zn^{2+} , был выбран тест FITC-аннексин-V / 7-AAD [5]. Данный метод предназначен для детекции клеток, в которых индуцированы процессы апоптоза и/или некроза. Принцип действия реагентов основан на высоком сродстве аннексина-V к фосфатидилсерину (ФС) в присутствии ионов Ca^{2+} и специфичном связывании 7-AAD с нуклеотидными парами гуанин–цитозин в ДНК. Клетки, находящиеся в апоптозе, связываются с аннексином-V до того, как происходят изменения в их морфологии и начинается гидролиз ДНК. Ранняя детекция ФС на всех апоптотических клетках делает тест по аннексину-V мощным средством исследования с точки зрения простоты и быстроты постановки. В данном эксперименте жизнеспособными считали только клетки, которые давали низкий сигнал по FITC-аннексину-V и 7-AAD (AnV^-7AAD^-). Все остальные 3 популяции клеток относили к нежизнеспособным: 1) клетки с ранними признаками апоптоза (AnV^+7AAD^-); 2) апоптотические клетки (AnV^+7AAD^+); 3) поврежденные клетки (некротические) (AnV^-7AAD^+).

Как видно из рис. 1, при 20 ч инкубации лимфоцитов с хлоридом цинка в концентрациях 10, 50, 100 мкг/мл процент жизнеспособных клеток в среднем составляет 98–99, 65–73 и 29–41 % соответственно, по сравнению с интактными лимфоцитами. При инкубации лимфоцитов с наночастицами оксида цинка в тех же концентрациях процент жизнеспособных клеток в среднем составил 95–99, 88–92 и 82–89 %, а при воздействии наностержней оксида цинка – 97–99, 95–98 и 90–95 % соответственно (рис. 1, а). Инкубация лимфоцитов как с наноструктурированным оксидом цинка различной формы, так и хлоридом цинка в концентрации 1 мкг/мл существенно не сопровождалась изменением жизнеспособности клеток по сравнению с интактными лимфоцитами.

Увеличение времени инкубации лимфоцитов с хлоридом цинка до 40 ч приводило к росту процентного содержания некротических и находящихся в ранней и поздней фазах апоптоза клеток от 5 до 95 %. Таким образом, процент жизнеспособных клеток составил: после воздействия 10 мкг/мл $ZnCl_2$: 95–97 %, 50 мкг/мл $ZnCl_2$: 30–38 %, 100 мкг/мл $ZnCl_2$: 7–14 % от всей популяции клеток. При инкубации лимфоцитов с наночастицами оксида цинка в концентрациях 10, 50 и 100 мкг/мл в течение 40 ч жизнеспособность лимфоцитов была снижена до 94–97, 70–77 и 42–

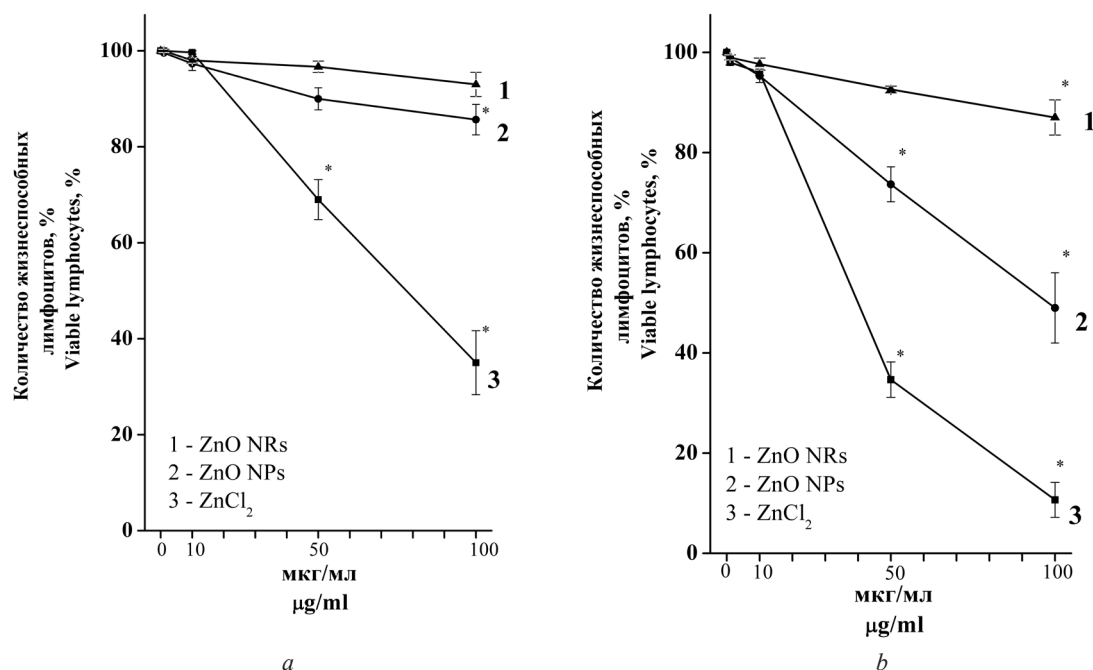


Рис. 1. Процентное содержание жизнеспособных лимфоцитов после их экспозиции *in vitro* с хлоридом цинка, наностержнями и наночастицами оксида цинка в течение 20 ч (а) и 40 ч (б). * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем
 Fig. 1. The percentage of viable lymphocytes after exposure *in vitro* with zinc chloride, zinc oxide nanorods and zinc oxide nanoparticles for 20 h (a) and 40 h (b). * – $p < 0.05$ compared to control

58 % соответственно. При 40-часовом воздействии наностержней оксида цинка в тех же концентрациях процент жизнеспособных лимфоцитов составил: 96–99, 92–93, 85–90 % соответственно. Инкубация лимфоцитов (40 ч) с исследуемыми агентами в концентрации 1 мкг/мл, также как и при 20-часовом воздействии, сопровождалась статистически незначимыми сдвигами процента жизнеспособных клеток в среднем на 1–5 %.

Таким образом, можно заключить, что через 20 ч инкубации количество нежизнеспособных лимфоцитов (апоптотических и некротических в сумме) возрастает в ряду ZnO NRs < ZnO NPs < ZnCl₂ и составляет в среднем 7, 14 и 65 % при действии максимально исследуемых концентраций. После 40 ч инкубации клеток с данными агентами направленность эффекта остается прежней (ZnO NRs < ZnO NPs < ZnCl₂), а процент нежизнеспособных клеток составляет в среднем 11, 51 и 85 % соответственно. Проведенный сравнительный анализ воздействия, оказываемого наностержнями и наночастицами оксида цинка на жизнеспособность лимфоцитов периферической крови человека, выявил более сильную цитотоксичность у наночастиц оксида цинка, возможно, в результате высвобождения из наноструктур свободных ионов Zn²⁺ (ion-shedding effect).

Литературные сведения относительно апоптотического действия повышенных концентраций ионов цинка носят противоречивый характер. С одной стороны, показано, что присутствие цинка в среде инкубации клеток оказывало защитный эффект против запуска апоптоза, индуцированного другими агентами, в том числе и ионами тяжелых металлов, например, ионами кадмия; глюкокортикоидами или ионизирующим излучением. Однако другие исследования, проведенные на клеточных линиях, продемонстрировали, что повышенные внеклеточные концентрации ионов цинка являются генотоксичными и сами по себе могут запускать запрограммированную клеточную гибель – наблюдалась фрагментация ДНК и конденсация хроматина, формирование апоптотических телец [7]. Ранее I. Tabas [9] показал, что ионы цинка активируют секреторную сфингомиелиназу (S-SMase), что, в свою очередь, приводит к усиленному образованию церамидов, важного триггера запрограммированной гибели клеток, ранним признаком которой, как было сказано выше, и является перераспределение фосфолипидов в мембранах клеток с переходом ФС во внешний монослой липидного бислоя.

Поэтому следующим этапом работы явилась оценка содержания внутриклеточного лабильного пула цинка после экспозиции лимфоцитов с исследуемыми агентами (наноструктурированный оксид цинка и хлорид цинка). Так как известно, что концентрация свободных ионов цинка в клетках крови человека составляет порядка 10 пМ, а уровень лабильного цинка колеблется в диапазоне 1 нМ [6], то для регистрации низких концентраций цинка был выбран относительно новый флуоресцентный индикатор – FluoZin-3. Он обладает рядом преимуществ по сравнению с другими аналогами: 1) чувствительностью к низким уровням Zn^{2+} и к незначительным концентрационным изменениям ($K_d = 15$ нМ); 2) стабильностью в присутствии окислителей; 3) относительной невосприимчивостью к колебаниям pH в физиологических условиях; 4) концентрации FluoZin-3, используемые в биологических системах, относительно малы в отличие от других аналогов (0,5–2 мкМ) [10]. Нами была использована эстерифицированная форма зонда – FluoZin-3-AM, которая способна проходить через мембрану внутрь клетки, где эндогенные эстеразы «активируют» ее с образованием свободной окисленной формы – FluoZin-3, непроницаемой для мембраны. Это приводит к аккумуляции загруженного зонда в клеточном цитозоле, что позволяет контролировать в нем даже незначительные колебания уровня Zn^{2+} .

Как видно из рис. 2, оценка изменения цитозольной концентрации лабильных ионов цинка в лимфоцитах человека с помощью FluoZin-3-AM после инкубации с наночастицами оксида цинка (ZnO NPs) в концентрациях 10, 50 и 100 мкг/мл в течение 20 ч выявила статистически достоверное дозозависимое увеличение внутриклеточного пула Zn^{2+} в среднем в 1,5–10 раз, по сравнению с интактными клетками. После 40 ч инкубации лимфоцитов с ZnO NPs зарегистрирован 20-кратный рост интенсивности флуоресценции FluoZin-3 (при максимально исследуемой концентрации) по сравнению с контролем. В свою очередь, выдерживание лимфоцитов в среде, содержащей ZnO NRs в концентрации 10 мкг/мл, в течение 20 и 40 ч не сопровождалось изменением цитозольного лабильного пула цинка, а инкубация клеток с ZnO NRs в концентрациях 50 и 100 мкг/мл выявила увеличение внутриклеточного пула ионов цинка в среднем в 1,2–2,5 раз (рис. 2). Однако изменения исследуемого параметра не зависели от времени экспозиции лимфо-

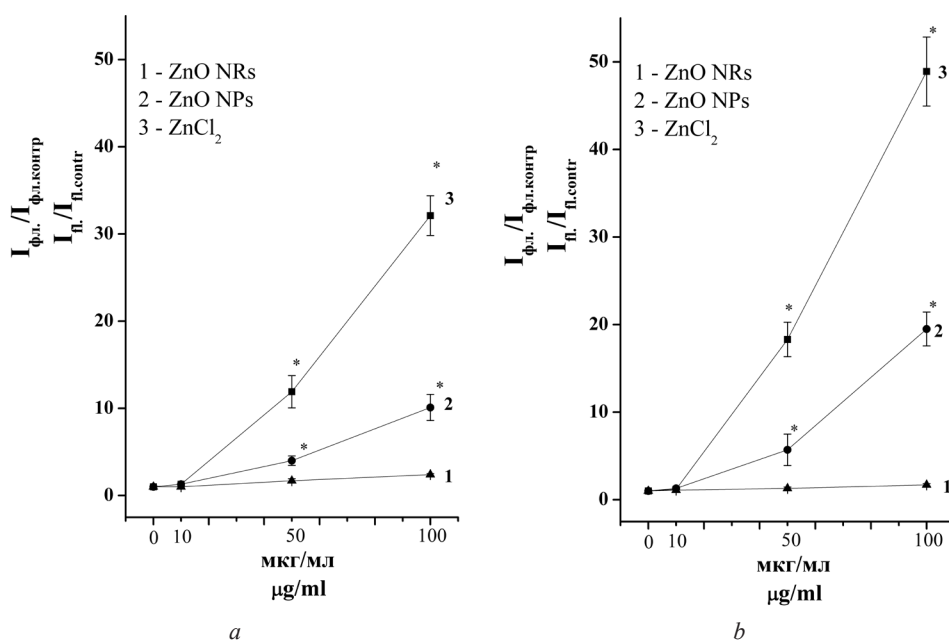


Рис. 2. Интенсивность флуоресценции FluoZin-3 в жизнеспособной популяции лимфоцитов доноров до и после воздействия *in vitro* хлорида цинка, наностержней и наночастиц оксида цинка в течение 20 ч (а) и 40 ч (б). За 1,0 принято значение интенсивности флуоресценции FluoZin-3 в интактных лимфоцитах (контроль); * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем

Fig. 2. Fluorescence intensity of FluoZin-3 in a viable population of donor's lymphocyte before and after exposure *in vitro* to zinc chloride, zinc oxide nanorods and zinc oxide nanoparticles for 20 h (a) and 40 h (b). The value of fluorescence intensity of FluoZin-3 in intact lymphocytes is taken as 1.0 (control); * – $p < 0.05$ compared to control

цитов с данным наноматериалом. Более того, наблюдалось незначительное снижение содержания цитозольного пула цинка после 40-часового воздействия (рост в среднем 1,2–1,8 раз), по сравнению с 20-часовым (рост в среднем в 1,5–2,5 раз). После инкубации лимфоцитов человека с хлоридом цинка в тех же концентрациях происходит резкое увеличение цитозольного уровня лабильного Zn^{2+} в клетках (рис. 2). Воздействие $ZnCl_2$ в концентрации 10 мкг/мл в течение 20 и 40 ч приводило к увеличению в 1,2–1,4 раз; в концентрации 50 мкг/мл: в 10–14 и 16–20 раз соответственно; а в концентрации 100 мкг/мл: к 30–34-кратному росту (20 ч) и 45–53-кратному росту (при 40 ч инкубации) цитозольной концентрации Zn^{2+} по сравнению с интактными клетками.

Проведенный корреляционный анализ выявил обратные достоверные зависимости между изменением внутриклеточного уровня лабильного цинка и процентом жизнеспособных лимфоцитов после экспозиции с $ZnCl_2$, как в течение 20 ч, так и 40 ч (коэффициент Спирмена, $r_{s1} = -0,928$, $p = 0,0003$ и $r_{s2} = -0,898$, $p = 0,001$ соответственно). Такая же статистически достоверная корреляция была обнаружена и при 20- и 40-часовом воздействии ZnO NPs ($r_{s1} = -0,888$, $p = 0,0014$ и $r_{s2} = -0,941$, $p = 0,00015$ соответственно). В отношении действия ZnO NRs статистически достоверная обратная зависимость была обнаружена только при 20-часовом воздействии ($r_{s2} = -0,764$, $p = 0,017$), но не при 40-часовом ($r_{s1} = -0,387$, $p = 0,304$). Полученные эффекты подтверждают результаты исследований, проведенных нами ранее [11; 12], о существовании зависимости между количеством свободного цинка в цитозоле клетки и ее выживаемостью. Данную тенденцию мы проследили как для $ZnCl_2$, так и для ZnO NPs, инкубация с которыми сопровождается многократным увеличением внутриклеточного пула Zn^{2+} .

Еще в 1999 г. Kim и соавт. в своей работе предположили, что возможным триггером Zn-индуцированной гибели нейронов с признаками апоптоза и некроза может быть генерация АФК [13]. D. Choi и J. Koh показали, что ионы цинка в высоких концентрациях (>100 мкМ) являются потенциально токсичными как *in vivo*, так и *in vitro*, и связали это также с усилением продукции АФК [14]. Нами в работах, выполненных на эритроцитах человека, также была продемонстрирована Zn-индуцированная активация свободнорадикальных процессов [6; 11; 12]. Можно было предположить, что нарушение баланса «антиоксиданты–прооксиданты» в лимфоцитах также служит одной из причин запуска процесса программируемой гибели клеток, индуцированного повышенным содержанием лабильного пула цинка в цитозоле. Проверка этой гипотезы и стала целью следующего этапа работы.

Степень образования свободнорадикальных соединений в лимфоцитах, подвергшихся воздействию наностержней и наночастиц оксида цинка, а также хлорида цинка, оценивали с помощью флуоресцентного зонда 2',7'-дихлородигидрофлуоресцеин диацетата ($H_2DCF-DA$), который, как известно, быстро проникает через клеточную мембрану и подвергается деацетилированию внутриклеточными эстеразами до нефлуоресцирующей формы 2',7'-дихлородигидрофлуоресцеин ($DCFH_2$). Далее, под действием АФК образуется флуоресцирующий компонент 2',7'-дихлорофлуоресцеин (DCF) [15].

Как видно из рис. 3, после воздействия на лимфоциты наноструктур оксида цинка и хлорида цинка в концентрациях 10, 50 и 100 мкг/мл в течение 20 и 40 ч наблюдался статистически достоверный концентрационно-зависимый рост интенсивности флуоресценции DCF. Причем максимальный эффект был характерен для хлорида цинка – 2-кратное увеличение при 20 ч и 4-кратное при 40-часовой инкубации клеток по отношению к интактным клеткам. Для сравнения, ZnO NPs активировали свободнорадикальные процессы на 10–70 % при 20-часовой инкубации и на 5–250 % при 40-часовом воздействии. При этом присутствие в среде инкубации ZnO NRs сопровождалось менее значительным ростом интенсивности флуоресценции DCF: в среднем на 5–55 % при 20-часовом воздействии и на 1–35 % при 40-часовом воздействии (рис. 3). Как было показано выше, цитозольный уровень лабильного пула цинка в клетках через 40 ч воздействия ZnO NRs также был снижен по сравнению с 20-часовой экспозицией (рис. 2). Данный факт свидетельствует о запуске в клетке адапционных процессов к изменяющемуся цинковому гомеостазу и может указывать на возможную активацию клеточных процессов его поддержания, который контролируется «импортерами» цинка (ZIPs/SLC39s), «экспортерами» цинка (ZnTs/SLC30s) и Zn-связывающими белками – металлотioneинами (MTs) [6]. В случае же воздействия хлорида цинка

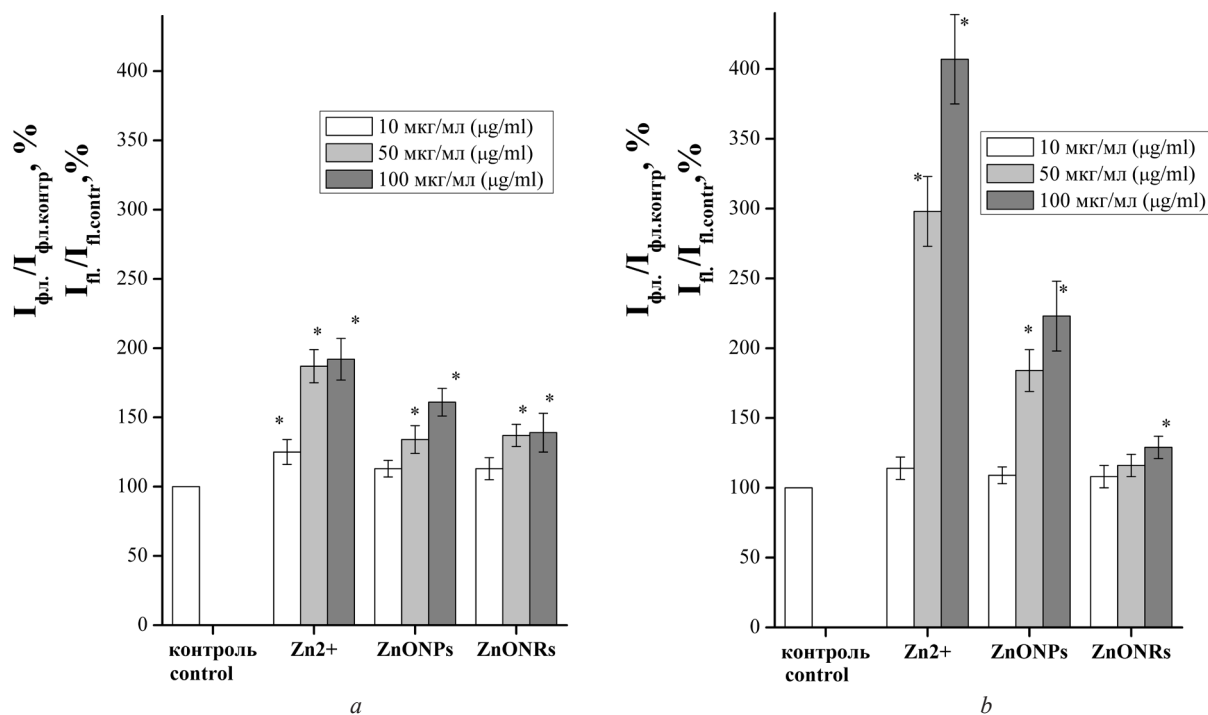


Рис. 3. Интенсивность флуоресценции DCF в жизнеспособной популяции лимфоцитов доноров до и после воздействия *in vitro* хлорида цинка, наностержней и наночастиц оксида цинка в течение 20 ч (а) и 40 ч (б). За 100 % принято значение интенсивности флуоресценции DCF в интактных лимфоцитах (контроль); * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем

Fig. 3. Fluorescence intensity of DCF in a viable population of donor's lymphocyte before and after exposure *in vitro* to zinc chloride, zinc oxide nanorods and zinc oxide nanoparticles for 20 h (a) and 40 h (b). The value of fluorescence intensity of DCF in intact lymphocytes is taken as 100 % (control); * – $p < 0.05$ compared to control

и наночастиц ZnO увеличение цитозольного лабильного пула цинка происходит настолько сильное, что клеточные системы поддержания гомеостаза уже не справляются.

Проведенный корреляционный анализ выявил прямые достоверные зависимости между изменением внутриклеточного уровня лабильного пула цинка и уровнем АФК в клетке при действии всех исследуемых агентов как после 20 ч воздействия, так и после 40 ч. После 20 и 40 ч экспозиции клеток с ZnCl_2 коэффициент Спирмена составил $r_{s1} = 0,833$, $p = 0,005$ и $r_{s2} = 0,883$, $p = 0,005$ соответственно. После 20 и 40 ч экспозиции клеток с ZnO NPs коэффициент Спирмена составил $r_{s1} = 0,867$, $p = 0,002$ и $r_{s2} = 0,917$, $p = 0,0005$ соответственно. После 20 и 40 ч экспозиции клеток с ZnO NRs коэффициент Спирмена составил $r_{s1} = 0,7$, $p = 0,036$ и $r_{s2} = 0,683$, $p = 0,042$ соответственно.

Полученные нами результаты исследования редокс-статуса лимфоцитов человека, модифицированных наностержнями и наночастицами оксида цинка, позволяют заключить, что одним из возможных механизмов цитотоксичного действия данных наноструктур может явиться активация свободнорадикальных процессов. Этот эффект ярко выражен именно для наночастиц оксида цинка. Наностержни, вероятнее всего, сами внутрь клетки проходят плохо и действуют опосредованно на клеточную мембрану. В нашем предыдущем исследовании [8] относительно мембранных эффектов воздействия наностержней и наночастиц оксида цинка на лимфоциты человека было показано, что именно воздействие ZnO NRs приводило к существенному изменению микровязкости липидного бислоя, а также к модификации структурного состояния белковой компоненты клеточной мембраны (уровень amino- и сульфгидрильных групп). Исходя из этих результатов, нами и был сделан вывод, что электростатическое взаимодействие или «прокальвание» цитоплазматической мембраны, по-видимому, является предполагаемым механизмом взаимодействия наностержней с клеткой.

Заклучение. Проведен сравнительный анализ молекулярных процессов, вызванных воздействием наноструктурированного оксида цинка разной формы (стержни и сферические частицы), а также хлоридом цинка как источника свободных ионов, на лимфоциты человека. Выявлено достоверное снижение процента жизнеспособных клеток при их экспозиции с наночастицами оксида цинка и хлоридом цинка за счет высвобождения Zn^{2+} во внутриклеточную среду. При этом установлено, что возможным механизмом цитотоксического действия данных агентов выступает Zn -опосредованная активация свободнорадикальных процессов в клетке. Таким образом, форма наноматериала и его способность «отдавать» ионы цинка вносят основной вклад в обнаруженное цитотоксическое действие, оказываемое наноструктурами оксида цинка.

Благодарности. Авторы выражают благодарность заведующему лабораторией Института атомной физики и спектроскопии Латвийского университета (г. Рига, Латвия) канд. физ.-мат. наук Р. В. Витеру за предоставленные образцы наноструктурированного оксида цинка. Работа поддержана грантом БРФФИ (проект Б17-128).

Acknowledgements. The authors are grateful to the Head of the Laboratory 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. This work was supported by the BRFFR (grant B17-128).

Список использованных источников

1. The size of zinc oxide nanoparticles controls its toxicity through impairing autophagic flux in A549 lung epithelial cells / B. Wang [et al.] // *Toxicol. Lett.* – 2018. – Vol. 285. – P. 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2017.12.025>
2. Size-dependent cytotoxicity study of ZnO nanoparticles in HepG2 cells / P. Chen [et al.] // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* – 2019. – Vol. 171. – P. 337–346. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.12.096>
3. Zinc overload mediated by zinc oxide nanoparticles as innovative anti-tumor agent / N. Wiesmann [et al.] // *J. Trace Elem. Med. Biol.* – 2019. – Vol. 51. – P. 226–234. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2018.08.002>
4. A review on ZnO nanostructured materials: energy, environmental and biological applications / J. Theerthagiri [et al.] // *Nanotechnology.* – 2019. – Vol. 30, N 39. – P. 392001. <https://doi.org/10.1088/1361-6528/ab268a>
5. Влияние внутриклеточного уровня ионов цинка на перераспределение фосфатидилсерина в мембранах и жизнеспособность эритроцитов человека / Ю. М. Гармаза [и др.] // *Новости мед.-биолог. наук.* – 2011. – Т. 3, № 1. – С. 90–95.
6. 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>
7. Singh, S. Zinc oxide nanoparticles impacts: cytotoxicity, genotoxicity, developmental toxicity, and neurotoxicity / S. Singh // *Toxicol. Mech. Methods.* – 2019. – Vol. 29, N 4. – P. 300–311. <https://doi.org/10.1080/15376516.2018.1553221>
8. Гармаза, Ю. М. Мембранные эффекты воздействия наностержней и наночастиц оксида цинка на лимфоциты человека / Ю. М. Гармаза, А. В. Тамашевский, Е. И. Слободжанина // *Докл. Нац. акад. наук Беларуси.* – 2019. – Т. 63, № 1. – С. 72–78. <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2019-63-1-72-78>
9. Tabas, I. Secretory sphingomyelinase / I. Tabas // *Chem. Phys. Lipids.* – 1999. – Vol. 102, N 1–2. – P. 123–130. [https://doi.org/10.1016/s0009-3084\(99\)00080-8](https://doi.org/10.1016/s0009-3084(99)00080-8)
10. Measuring zinc in living cells. A new generation of sensitive and selective fluorescent probes / K. R. Gee [et al.] // *Cell Calcium.* – 2002. – Vol. 31, N 5. – P. 245–251. [https://doi.org/10.1016/s0143-4160\(02\)00053-2](https://doi.org/10.1016/s0143-4160(02)00053-2)
11. Внутриклеточный цинк: роль в H_2O_2 -индуцированном окислительном стрессе в эритроцитах человека / Ю. М. Гармаза [и др.] // *Биофизика.* – 2016. – Т. 61, вып. 6. – С. 1149–1158.
12. Гармаза, Ю. М. Zn -дефицитные состояния в эритроцитах человека *in vitro* и свободнорадикальные процессы / Ю. М. Гармаза, А. В. Тамашевский // *Журн. Белорус. гос. ун-та. Экология.* – 2017. – № 3. – С. 54–63.
13. Zinc-induced cortical neuronal death with features of apoptosis and necrosis: mediation by free radicals / Y. H. Kim [et al.] // *Neuroscience.* – 1999. – Vol. 89, N 1. – P. 175–182. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(98\)00313-3](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(98)00313-3)
14. Choi, D. W. Zinc and brain injury / D. W. Choi, J. Y. Koh // *Annu. Rev. Neurosci.* – 1998. – Vol. 21, N 1. – P. 347–375. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.21.1.347>
15. Quantitative multiwell myeloid differentiation assay using dichlorodihydrofluorescein diacetate ($H_2DCF-DA$) or dihydrorhodamine 123 (H_2R123) / I. D. Trayner [et al.] // *J. Immun. Meth.* – 1995. – Vol. 186, N 2. – P. 275–284. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(95\)00152-z](https://doi.org/10.1016/0022-1759(95)00152-z)

References

1. Wang B., Zhang J., Chen C., Xu G., Qin X., Hong Y., Bose D. D., Qiu F., Zou Z. The size of zinc oxide nanoparticles controls its toxicity through impairing autophagic flux in A549 lung epithelial cells. *Toxicology Letters*, 2018, vol. 285, pp. 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2017.12.025>
2. Chen P., Wang H., He M., Chen B., Yang B., Hu B. Size-dependent cytotoxicity study of ZnO nanoparticles in HepG2 cells. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2019, vol. 171, pp. 337–346. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.12.096>
3. Wiesmann N., Kluecker M., Demuth P., Brenner W., Tremel W., Brieger J. Zinc overload mediated by zinc oxide nanoparticles as innovative anti-tumor agent. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 2019, vol. 51, pp. 226–234. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2018.08.002>

4. Theerthagiri J., Salla S., Senthil R. A., Nithyadharseni P., Madankumar A., Arunachalam P., Maiyalagan T., Kim H. S. A review on ZnO nanostructured materials: energy, environmental and biological applications. *Nanotechnology*, 2019, vol. 30, no. 39, pp. 392001. <https://doi.org/10.1088/1361-6528/ab268a>

5. Harmaza Y. M., Tamashevski A. V., Goncharova N. V., Slobozhanina E. I. Influence of intracellular level of zinc in human erythrocytes on the redistribution of phosphatidylserine and their viability. *Novosti mediko-biologicheskikh nauk = News of biomedical sciences*, 2011, vol. 3, no. 1, pp. 90–95 (in Russian).

6. 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>

7. Singh S. Zinc oxide nanoparticles impacts: cytotoxicity, genotoxicity, developmental toxicity, and neurotoxicity. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 2019, vol. 29, no. 4, pp. 300–311. <https://doi.org/10.1080/15376516.2018.1553221>

8. 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>

9. Tabas I. Secretory sphingomyelinase. *Chemistry and Physics of Lipids*, 1999, vol. 102, no. 1–2, pp. 123–130. [https://doi.org/10.1016/s0009-3084\(99\)00080-8](https://doi.org/10.1016/s0009-3084(99)00080-8)

10. Gee K. R., Zhou Z. L., Ton-That D., Sensi S. L., Weiss J. H. Measuring zinc in living cells. A new generation of sensitive and selective fluorescent probes. *Cell Calcium*, 2002, vol. 31, no. 5, pp. 245–251. [https://doi.org/10.1016/s0143-4160\(02\)00053-2](https://doi.org/10.1016/s0143-4160(02)00053-2)

11. Harmaza Yu. M., Tamashevski A. V., Kanash Yu. S., Zubritskaya G. P., Kutko A. G., Slobozhanina E. I. The role of intracellular zinc in H₂O₂-induced oxidative stress in human erythrocytes. *Biophysics*, 2016, vol. 61, no. 6, pp. 950–958. <https://doi.org/10.1134/s0006350916060087>

12. Harmaza Yu. M., Tamashevski A. V. Zn-deficient states in human erythrocytes *in vitro* and free radical processes. *Zhurnal Belorusskogo gosudarstvennogo universiteta. Ekologiya = Journal of Belarusian State University. Ecology*, 2017, vol. 3, pp. 54–63 (in Russian).

13. Kim Y. H., Kim E. Y., Gwag B. J., Sohn S., Koh J. Y. Zinc-induced cortical neuronal death with features of apoptosis and necrosis: mediation by free radicals. *Neuroscience*, 1999, vol. 89, no. 1, pp. 175–182. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(98\)00313-3](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(98)00313-3)

14. Choi D. W., Koh J. Y. Zinc and brain injury. *Annual Review of Neuroscience*, 1998, vol. 21, no. 1, pp. 347–375. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.21.1.347>

15. Trayner I. D., Rayner A. P., Freeman G. E., Farzaneh F. Quantitative multiwell myeloid differentiation assay using dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂DCF-DA) or dihydrorhodamine 123 (H₂R123). *Journal of Immunological Methods*, 1995, vol. 186, no. 2, pp. 275–284. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(95\)00152-z](https://doi.org/10.1016/0022-1759(95)00152-z)

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.

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.

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

Information about the authors

Harmaza Yuliya M. – 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.

Tamashevski Alexander V. – 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.

Slobozhanina Ekaterina I. – Corresponding Member, D. Sc. (Biology), Professor, Head of the 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.