

*Katarzyna Miranowicz-Dzierżawska*

## PORÓWNANIE CYTOTOKSYCZNEGO DZIAŁANIA NANO- I MIKRO- ZNO NA KOLEJNE PASAŻE STARZEJĄCYCH SIĘ KOMÓREK *IN VITRO*\*

Centralny Instytut Ochrony Pracy – Państwowy Instytut Badawczy  
Dyrektor: prof. dr hab. med. *D. Koradecka*

*Celem pracy było porównanie cytotoksyczności tlenku cynku(II) w postaci nanoproszku o wielkości cząstek <50 nm oraz tlenku cynku(II) o wielkości cząstek < 5 μm. Badania wykonano na dwóch starzejących się liniach komórkowych: diploidalnych fibroblastach płucnych oraz skórnych. ZnO w zależności od rozmiaru cząstek wykazywał zróżnicowaną cytotoksyczność w stosunku do badanych komórek. Związek o wielkości cząstek < 50 nm był mniej toksyczny niż ten sam związek o wielkości cząstek < 5 μm. Stwierdzono, że wrażliwość starzejących się komórek na działanie tlenku cynku(II) może zmieniać się w miarę ich starzenia się.*

Hasła kluczowe: tlenek cynku(II); nano; mikro; starzejące się komórki; *in vitro*.  
Key words: zinc oxide(II); nano; micro; senescent cells; *in vitro*.

Nanotechnologia to dziedzina nauki, która powstała w latach dziewięćdziesiątych XX wieku. Zajmuje się kontrolowanym wytwarzaniem nanocząstek i nanomateriałów oraz metodami służącymi do ich badania i modelowania (1).

W zaleceniu Komisji z 2011 r. dotyczącym definicji nanomateriału „nanomateriał” zdefiniowano jako „naturalny, powstały przypadkowo lub wytworzony materiał zawierający cząstki w stanie swobodnym lub w formie agregatu bądź aglomeratu, w którym co najmniej 50% lub więcej cząstek w liczbowym rozkładzie wielkości cząstek ma jeden lub więcej wymiarów w zakresie 1 nm ÷ 100 nm. W określonych przypadkach, uzasadnionych względami ochrony środowiska, zdrowia, bezpieczeństwa lub konkurencyjności, zamiast wartości progowej liczbowego rozkładu wielkości cząstek wynoszącej 50% można przyjąć wartość z zakresu 1–50%. [...]” (2).

Nanotechnologia może wpłynąć na polepszenie warunków życia i pracy człowieka. Należy jednak pamiętać także o potencjalnym szkodliwym działaniu nanocząstek na człowieka i środowisko, wynikającym z ich specyficznych właściwości fizycznych i chemicznych. Zakres potencjalnie szkodliwego działania nanoczą-

---

\* Opracowano w ramach III etapu programu wieloletniego „Poprawa bezpieczeństwa i warunków pracy”, finansowanego w latach 2014–2016 w zakresie badań naukowych i prac rozwojowych przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego/Narodowe Centrum Badań i Rozwoju. Koordynator programu: Centralny Instytut Ochrony Pracy – Państwowy Instytut Badawczy.

stek na organizm człowieka i środowisko nie w pełni jest jeszcze zdefiniowany, ponieważ odkrywanie stale nowych zastosowań nanoproductów może nieść za sobą nieuświadomione dzisiaj zagrożenia, skąd wynika pilna potrzeba badań tych związków.

Biorąc natomiast pod uwagę, iż w nadchodzących dziesięcioleciach kraje UE doświadczą gwałtownego wzrostu udziału w ogólnej populacji osób starszych, a co za tym idzie zwiększy się liczba seniorów na rynku pracy, pojawiła się pilna potrzeba uzupełnienia i poszerzenia badań o wykonywane na modelach, w których zachodzą zmiany typowe dla procesu starzenia się, jako niezbędnego narzędzia dla zapewnienia bezpiecznych warunków pracy również pracownikom w wieku uważanym do tej pory za poprodukcyjny.

Celem badań była zatem ocena wpływu tlenku cynku o dwóch wielkościach cząstek (nano i mikro) na starzejące się ludzkie linie komórkowe, przyjęte jako model starzejącego się organizmu człowieka.

## MATERIAŁ I METODY

Badania porównawcze przeprowadzono z wykorzystaniem związków komercyjnie dostępnych i opisanych przez producenta pod względem wielkości cząstek oraz powierzchni właściwej, których rozmiar potwierdzono za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM). Została oceniona cytotoksyczność tlenku cynku(II) (CAS 1314-13-2) ( $M_{cz} = 81,4$ ) w postaci nanoproszku o wielkości cząstek  $< 50$  nm (BET) i powierzchni właściwej  $> 10,8$  m<sup>2</sup>/g oraz tlenku cynku(II) o wielkości cząstek  $< 5$  μm. Badane związki pochodziły z firmy Sigma-Aldrich (Sigma Chemical Company, St. Louis, Mo USA).

Badania wykonano na dwóch starzejących się liniach komórkowych zakupionych w amerykańskiej kolekcji ATCC (Amerykańska Kolekcja Kultur Typowych): linii diploidalnych fibroblastów skórnych CCD-1136Sk (ATCC® CRL-2697™) oraz linii diploidalnych fibroblastów płucnych CCD-8Lu (ATCC® CCL-201™).

Do oceny cytotoksycznego działania badanych związków zastosowano test redukcji soli tetrazolowej MTT określający aktywność metaboliczną komórek (test MTT) oraz test NRU oceniający integralność błon komórkowych, którego zasada jest oparta na zdolności żywych, nieuszkodzonych komórek do pochłaniania barwnika – czerwieni obojętnej (chlorowodorek 3-amino-7-dimetylo-amino-2-metylofenazyny).

Zawiesiny wyjściowe badanych związków o stężeniu w/v przygotowywano bezpośrednio przed wykonaniem testów cytotoksyczności. Badane związki zawieszano bezpośrednio w medium hodowlanym (jednorodność zawiesiny utrzymywano poprzez wytrząsanie na Votrex'ie). Roztwory obu ksenobiotyków sporządzano w sześciu stężeniach w zakresie stężeń efektywnych w medium hodowlanym. Badanie cytotoksyczności wykonywano w trzech powtórzeniach. Czas narażenia komórek na badane substancje wybrano na podstawie przeglądu piśmiennictwa. Zastosowano narażenie trwające 24 h.

## WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Przeprowadzono badania porównawcze *in vitro* wrażliwości późnych, przyjętych jako model starzejącego się organizmu oraz wczesnych pasażów ludzkich komórek diploidalnych na cytotoksyczne działanie ZnO w postaci dwóch związków o różnych rozmiarach cząstek: nanotlenku cynku(II) z tlenkiem cynku(II) o wielkości cząstek < 5  $\mu\text{m}$ . W celu potwierdzenia deklarowanej przez producenta wielkości cząstek wykonano zdjęcia badanych związków za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM).

Badania wpływu ZnO o dwóch rozmiarach cząstek na komórki linii fibroblastów skórnych CCD-1136Sk (ATCC® CRL-2697™) przeprowadzono na pasażach 6–31.

Analizując wartości  $IC_{50}$  oznaczone przy narażeniu komórek fibroblastów skóry CCD-1136Sk (tab. I) stwierdzono, że tlenek cynku(II) o wielkości cząstek < 50 nm wykazywał słabsze działanie cytotoksyczne na kolejne pasażę komórek CCD-1136Sk niż ten sam związek o wielkości cząstek < 5  $\mu\text{m}$  na analogiczne pasażę tych komórek. Zjawisko to obserwowano zarówno w teście MTT, jak i NRU.

Tab e l a I. Wartości  $IC_{50}$  wyznaczone dla tlenku cynku o wielkości cząstek < 50 nm oraz < 5  $\mu\text{m}$  na kolejnych pasażach komórek CCD-1136Sk (ATCC® CRL-2697™) w teście MTT i NRU.

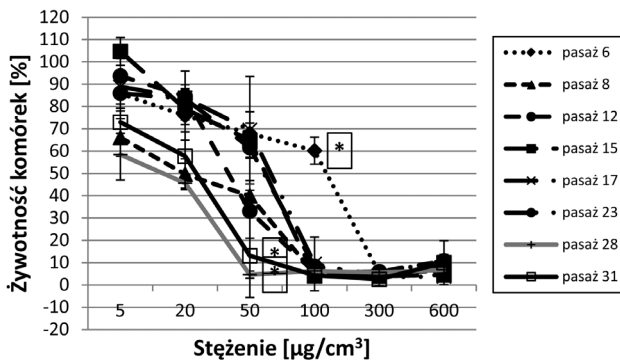
Tab l e I.  $IC_{50}$  values for < 50 nm and < 5  $\mu\text{m}$  zinc oxide particle sizes determined in consecutive passages of CCD-1136Sk (ATCC® CRL-2697™) cells in MTT and NRU tests

Numer pasażu	Wartość $IC_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )			
	ZnO nano (< 50 nm)		ZnO mikro (< 5 $\mu\text{m}$ )	
	MTT	NRU	MTT	NRU
pasaż 6	1384 $\pm$ 66	1687 $\pm$ 183	263 $\pm$ 1	428 $\pm$ 7
pasaż 8	592 $\pm$ 10	782 $\pm$ 11	246 $\pm$ 7	308 $\pm$ 40
pasaż 12	782 $\pm$ 59	1455 $\pm$ 250	503 $\pm$ 15	702 $\pm$ 17
pasaż 15	654 $\pm$ 33	857 $\pm$ 61	271 $\pm$ 6	439 $\pm$ 7
pasaż 17	734 $\pm$ 34	1006 $\pm$ 100	334 $\pm$ 8	442 $\pm$ 31
pasaż 23	664 $\pm$ 22	1035 $\pm$ 55	365 $\pm$ 4	450 $\pm$ 54
pasaż 28	239 $\pm$ 1	539 $\pm$ 19	171 $\pm$ 3	183 $\pm$ 36
pasaż 31	290 $\pm$ 4	725 $\pm$ 1	260 $\pm$ 1	264 $\pm$ 5

Wyniki przedstawiono jako wartości średnie  $\pm$  odchylenie standardowe (n=3).

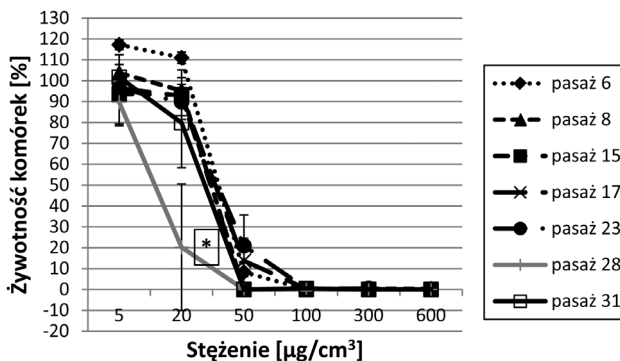
W ocenie działania cytotoksycznego (tj. obniżeniu żywotności komórek w porównaniu z kontrolą) badanych związków na komórki fibroblastów skórnych CCD-1136Sk oraz płucnych CCD-8Lu ocenianego na podstawie testu redukcji MTT i testu NRU za 100% przyjęto stopień pochłaniania czerwieni obojętnej i stopień redukcji MTT w próbach kontrolnych (nienarażanych). Każdy punkt reprezentuje średnią i odchylenie standardowe z 9 pomiarów w 3 niezależnych eksperymentach. Pełny profil działania toksycznego badanych związków ocenianych testem MTT i NRU, tj. obniżenie żywotności komórek w zakresie 20÷80% w porównaniu z kontrolą, uzyskano dla obu badanych związków.

Analizując przebieg krzywych zależności żywotności komórek od stężenia ZnO stwierdzono, że dwa ostatnie pasaży komórek CCD-1136Sk (pasaż 28 i 31) okazały się bardziej wrażliwe na działanie nanotlenku cynku(II) niż pasaży wcześniejsze. Było to widoczne w teście MTT przy narażeniu komórek na związek o wielkości cząstek < 50 nm w stężeniu 50  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$  (ryc. 1), podczas gdy w teście NRU, w którym obserwowano większą zmienność wartości oznaczanych w poszczególnych pasażach, bardziej wrażliwe okazały się tylko komórki pasażu nr 28. Jednocześnie komórki najmłodszego pasażu (nr 6) były statystycznie istotnie najmniej wrażliwe na badany związek o stężeniu 100  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ .



Ryc. 1. Wpływ tlenku cynku(II) o wielkości cząstek < 50 nm na żywotność komórek CCD-1136Sk (ATCC® CRL-2697™) ocenianą testem MTT. Wyniki przedstawiono jako wartość średnią  $\pm$  odchylenie standardowe (n=9); \* – wyniki istotne statystycznie (p<0,05).

Fig. 1. Effect of zinc (II) oxide < 50 nm particles on CCD-1136Sk (ATCC® CRL-2697™) cell viability assessed by MTT test. The results represent mean values  $\pm$  standard deviation (n=9); \* – statistically significant results (p<0.05).



Ryc. 2. Wpływ tlenku cynku(II) o wielkości cząstek < 50 nm na żywotność komórek CCD-1136Sk (ATCC® CRL-2697™) ocenianą testem NRU. Wyniki przedstawiono jako wartość średnią  $\pm$  odchylenie standardowe (n=9); \* – wyniki istotne statystycznie (p<0,05).

Fig. 2. Effect of zinc (II) oxide < 50 nm particles on CCD-1136Sk (ATCC® CRL-2697™) cell viability assessed by NRU test. The results represent mean values  $\pm$  standard deviation (n=9); \* – statistically significant results (p<0.05).

Podobną tendencję (zwiększoną wrażliwość pasaży 28), choć mniej nasiloną, zanotowano przy narażeniu badanych fibroblastów skórnych na mikro tlenek cynku(II) w teście NRU (ryc. 2), a także w teście MTT. Zjawisko takie zaobserwowano przy narażeniu na związek w stężeniu 20  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ .

Badania wpływu ZnO o dwóch rozmiarach cząstek na komórki linii fibroblastów płucnych CCD-8Lu (ATCC® CCL-201™) przeprowadzono na pasażach 11 ÷ 22.

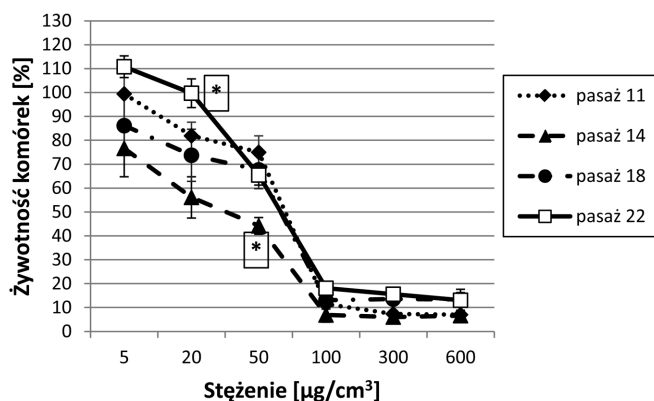
Podobnie jak w przypadku narażenia fibroblastów skórnych, tlenek cynku(II) o wielkości cząstek < 50 nm wykazywał słabsze działanie cytotoksyczne na komórki fibroblastów płucnych CCD-8Lu niż ten sam związek o wielkości cząstek < 5  $\mu\text{m}$ . Zjawisko to obserwowano zarówno w teście MTT, jak i NRU (tab. II).

Tabela II. Wartości  $\text{IC}_{50}$  wyznaczone dla tlenku cynku o wielkości cząstek < 50 nm oraz < 5  $\mu\text{m}$  na kolejnych pasażach komórek CCD-8Lu (ATCC® CCL-201™) w teście MTT i NRU

Table II.  $\text{IC}_{50}$  values for < 50 nm and < 5  $\mu\text{m}$  zinc oxide particle sizes determined in consecutive passages of CCD-8Lu (ATCC® CCL-201™) cells in MTT and NRU tests

Numer pasaży	Wartość $\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )			
	ZnO nano (< 50 nm)		ZnO mikro (< 5 $\mu\text{m}$ )	
	MTT	NRU	MTT	NRU
pasaż 11	766 ± 15	577 ± 48	423 ± 25	405 ± 45
pasaż 14	503 ± 78	705 ± 40	334 ± 9	405 ± 36
pasaż 18	667 ± 38	715 ± 62	342 ± 7	402 ± 23
pasaż 22	720 ± 1	798 ± 19	329 ± 41	351 ± 29

Wyniki przedstawiono jako wartości średnie ± odchylenie standardowe (n=3).



Ryc. 3. Wpływ tlenku cynku o wielkości cząstek < 50 nm na żywotność komórek CCD-8Lu (ATCC® CCL-201™) ocenianą testem MTT. Wyniki przedstawiono jako wartość średnią ± odchylenie standardowe (n=9); \* – wyniki istotne statystycznie (p<0,05).

Fig. 3. Effect of zinc (II) oxide < 50 nm particles on CCD-8Lu (ATCC® CCL-201™) cell viability assessed by MTT test. The results represent mean values ± standard deviation (n=9); \* – statistically significant results (p<0.05).

Analizując przebieg krzywych zależności żywotności komórek od stężenia badanych związków chemicznych w badanych pasażach komórkowych fibroblastów płucnych stwierdzono, że komórki ostatniego pasażu (nr 22) były z kolei najmniej wrażliwe (zjawisko odwrotne niż w przypadku fibroblastów skórnych) na nanotlenek cynku(II) w stężeniu  $20 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ , co zaobserwowano w teście MTT (ryc. 3). Komórki tego samego pasażu okazały się również najmniej wrażliwe w teście MTT na mikrotlenek cynku(II) w stężeniu  $300$  i  $600 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ , ale były najbardziej wrażliwe na ten związek o stężeniu  $20 \mu\text{g}/\text{cm}^3$  w teście NRU.

Zaobserwowana w niniejszych badaniach odmienna reaktywność fibroblastów pochodzących z różnych anatomicznie miejsc na cytotoksyczne działanie tych samych ksenobiotyków jest spójna z badaniami *Chang* i współpr. (3), którzy badali różnice na 50 pierwotnych liniach komórkowych fibroblastów wyprowadzonych z 10 miejsc u 16 dawców i obserwowali znaczące różnice między nimi.

Podobnie różną reaktywność komórek w zależności od ich pochodzenia stwierdzili *Hetzel* i współpr. (4), którzy zaobserwowali, że fibroblasty pochodzące z płuc prawidłowych oraz płuc objętych włóknieniem różnią się pod względem reakcji na czynniki wzrostu.

Wykazano także (5), że fibroblasty pochodzące z błony śluzowej jamy ustnej proliferują szybciej i mają większą zdolność podwojeń populacji niż fibroblasty skórne. Stwierdzono, że fibroblasty pochodzące z błony śluzowej jamy ustnej wydzielają więcej czynnika wzrostu hepatocytów (HGF) oraz keratynocytów (KGF) niż fibroblasty skórne.

Nawet w komórkach linii ustalonych (unieśmiertelnionych), które są utrzymywane przez długi okres czasu mogą występować mutacje, które zmieniają charakterystykę komórek, jaka była stwierdzona we wczesnych pasażach danej linii (6). Stwierdzono m.in. zmiany (aberracje) w kariotypie komórek (zestaw chromosomów komórki): duplikacje (powielenia odcinka chromosomu) oraz powielenia całych chromosomów. Autorzy podkreślają, że potwierdzenie pochodzenia linii komórkowej, jak również dokładna jej charakterystyka (z podaniem numeru pasażu) jest warunkiem niezbędnym do uzyskiwania wiarygodnych wyników doświadczeń, które tylko pod tym warunkiem mogą być przydatne dla innych badaczy.

Przy interpretacji wyników badania cytotoksyczności nanocząstek tlenku cynku(II) należy wziąć pod uwagę zasadę, która mówi, że badany nanomateriał, który nie jest rozpuszczalny w wodzie należy identyfikować jako potencjalnie inwazyjny dla organizmów żywych. Natomiast jeśli nanocząstki w temperaturze pokojowej rozpuszczają się w wodzie, to nie należy prowadzić dalszej ich oceny jako nanomateriałów (7). Biorąc pod uwagę, że ZnO nie jest związkiem całkowicie, w 100% nierozpuszczalnym w wodzie, należy wziąć pod uwagę, iż może to znajdować odzwierciedlenie we wpływie na jego cytotoksyczność również jonów, mogących tworzyć się (choć w bardzo niewielkich ilościach) podczas zawieszania związku w wodzie/medium hodowlanym (8, 9).

Porównując cytotoksyczne działanie dwóch tlenków cynku(II) o różnej deklarowanej przez producenta wielkości cząstek stwierdzono, że ZnO o wielkości cząstek  $< 50 \text{ nm}$  wykazywał słabsze działanie cytotoksyczne na komórki fibroblastów skóry CCD-1136Sk niż ten sam związek o wielkości cząstek  $< 5 \mu\text{m}$ . Prawidłowość tę stwierdzono zarówno w teście MTT, jak i NRU. Jest to godne uwagi, zwłaszcza,

że nie przeprowadzano sonikacji przygotowanych zawiesin, a więc komórki były narażane również na powstałe agregaty/aglomeraty nanotlenku cynku(II).

Zjawisko takie nie jest obserwowane powszechnie, ale w literaturze znajdują się doniesienia zarówno o wyższej toksyczności nanocząstek ZnO w porównaniu z tlenkiem cynku(II) o większym rozmiarze cząstek, o zjawisku odwrotnym, jak również o braku jakichkolwiek różnic związanych z rozmiarem cząstek (10).

Oznaczone w niniejszej pracy stężenia nanotlenku cynku(II) hamujące niemal całkowicie proliferację komórek są spójne z doniesieniami literaturowymi (11) tylko w przypadku doświadczeń na wczesnych pasażach komórkowych. Stwierdzono natomiast, że nanotlenek cynku(II) w analogicznych stężeniach działał bardziej toksycznie na komórki dwóch najstarszych pasażu fibroblastów skórnych, które okazały się bardziej wrażliwe na działanie ZnO o wielkości cząstek < 50 nm niż pasaż młodsze.

Przyczyną zróżnicowanych wyników badań nad nanocząstkami opisywanych przez różnych autorów może być duża liczba parametrów, które mogą mieć wpływ na ich toksyczność. Podstawowym zagadnieniem jest charakterystyka nanomateriałów oraz ich interferencja z metodami badawczymi (12).

Podstawowym problemem przy badaniu związków chemicznych w postaci pyłów metodami kolometrycznymi jest ich osadzanie się na dnie dołków mikroplytek, w których przeprowadzane są doświadczenia, co może zaburzać pomiar absorbancji. Z tego powodu ograniczony jest zakres stężeń badanych pyłów, na które mogą być narażane komórki, a co za tym idzie niekiedy niemożliwe staje się uzyskanie pełnego profilu działania związku i uzyskania działania cytotoksycznego na badane komórki.

Wyniki wielu doniesień literaturowych wskazują, że nanocząstki mogą wywoływać szeroki zakres odpowiedzi biologicznych, począwszy od działania cytotoksycznego aż po działanie „cytoochronne” (13), co stanowi ważną przesłankę do prowadzenia dalszych badań nad działaniem związków skali nano na organizmy.

## WNIOSKI

1. Tlenek cynku(II) o wielkości cząstek < 50 nm wykazywał słabsze działanie cytotoksyczne na komórki fibroblastów skóry oraz płuc niż ten sam związek o wielkości cząstek < 5  $\mu$ m. Zjawisko to obserwowano zarówno w teście MTT, jak i NRU.

2. Uzyskane wyniki wskazują, że wrażliwość starzejących się komórek na cytotoksyczne działanie badanych związków chemicznych może zmieniać się w miarę ich starzenia się, jednak zmiany te przy narażeniu na ZnO o dwóch rozmiarach cząstek nie są wyraźne.

3. Bardziej spójne wyniki porównania wrażliwości kolejnych pasażu starzejących się komórek uzyskano w badaniach na fibroblastach wyprowadzonych ze skóry.

4. Kluczowe znaczenie w porównaniu cytotoksycznego działania związków chemicznych na młodsze i starsze pasażu fibroblastów ludzkich może mieć stężenie badanego związku.

K. Miranowicz-Dzierżawska

COMPARISON OF THE CYTOTOXIC EFFECT OF NANO- AND MICRO-ZNO  
IN THE CONSECUTIVE PASSAGES OF SENESCENT CELLS *IN VITRO*

## Summary

The aim of the study was to assess whether there were differences between the results of determining cytotoxicity of ZnO in nano (< 50 nm) versus micro (< 5 µm) particle size on senescent cells of different age. Experiments were conducted on subsequent passages of senescent human lung CCD-8Lu (ATCC® CCL-201™) or skin CCD-1136Sk (ATCC® CRL-2697™) fibroblasts. Cytotoxicity of the xenobiotics was evaluated using two cell viability assays: MTT assay, determining metabolic activity of cells, and NRU assay, assessing the integrity of cell membranes.

The older skin fibroblasts CCD-1136Sk were more susceptible to the cytotoxic effect of both tested substances in comparison with younger cells, although not for all tested concentrations of the compounds.

Zinc oxide (II) having a particle size < 50 nm was less cytotoxic to the skin and lung fibroblasts than the same compound having a particle size of < 5 microns. This phenomenon was observed in both the MTT and the NRU assay.

The results showed that the passage number of diploid human fibroblasts had an important impact on the susceptibility of cells to chemicals. The concentration of the tested compounds may also play a key role in the influence of xenobiotics on successive passages of human diploid fibroblasts.

## PIŚMIENNICTWO

1. *Bujak-Pietrek S.*: Narażenie na nanocząstki w środowisku pracy jako zagrożenie dla zdrowia. Problemy oceny ekspozycji zawodowej. *Medycyna Pracy*, 2010; 61(2): 183-189. – 2. Komunikat Komisji Do Parlamentu Europejskiego, Rady i Europejskiego Komitetu Ekonomiczno-Społecznego. Drugi Przegląd Regulacyjny Poświęcony Nanomateriałom, COM(2012) 572 final, Bruksela, 2012. – 3. *Chang H.Y., Chi J.T., Dudoit S., Bondre C., van de Rijn M., Botstein D.*, et al.: Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002; 99: 12877-82. – 4. *Hetzel M., Bachem M., Anders D., Trischler G., Faehling M.*: Different effects of growth factors on proliferation and matrix production of normal and fibrotic human lung fibroblasts. *Lung*, 2005; 183: 225-237. – 5. *Gron B., Stoltze K., Andersson A., Dabelsteen E.*: Oral fibroblasts produce more HGF and KGF than skin fibroblasts in response to co-culture with keratinocytes. *APMIS*, 2002; 110: 892-898. – 6. *Wenger S.L., Senft J.R., Sargent L.M., Bamezai R., Bairwa N., Grant S.G.*: Comparison of established cell lines at different passages by karyotype and comparative genomic hybridization. *Bioscience Reports*, 2004; 24(6): 631-639. – 7. *Snopczyński T., Góralczyk K., Czaja K., Struciński P., Hernik A., Korcz W., Ludwicki J.K.*: Nanotechnologia – możliwości i zagrożenia. *Roczn. PZH*, 2009; 60(2): 101-111. – 8. *Adam N., Schmitt C., Galceran J., Companys E., Vakurov A., Wallace R., Knapen D., Blust R.*: The chronic toxicity of ZnO nanoparticles and ZnCl<sub>2</sub> to *Daphnia magna* and the use of different methods to assess nanoparticle aggregation and dissolution. *Nanotoxicology*, 2014; 8, 7: 709-717. – 9. *Roy R., Dasa M., Dwivedi P.D.*: Toxicological mode of action of ZnO nanoparticles: Impact on immune cells. *Molecular Immunology*, 2015; 63, 2: 184-192. doi:10.1016/j.molimm.2014.08.001. – 10. *Heggelund L.R., Diez-Ortiz M., Lofts S., Lahive E., Jurkschat K., Wojnarowicz J., Cedergreen N., Spurgeon D., Svendsen C.*: Soil pH effects on the comparative toxicity of dissolved zinc, non-nano and nano ZnO to the earthworm *Eisenia fetida*. *Nanotoxicology*, 2013; 8, 5: 559-572. doi: 10.3109/17435390.2013.809808.

11. *Włodarczyk A.J.*: „Aktywność cytotoksyczna tlenku cynku wobec komórki śródłonka ludzkiej żyły pępowinowej”. IV Konferencja Nanotechnologii NANO 2010, Poznań 2010. – 12. *Stone V., Johnston H., Roel P., Schins F.*: Development of *in vitro* systems for nanotoxicology: methodological considerations. *Crit. Rev. Toxicol.*, 2009; 39: 613-626. doi: 10.1080/10408440903120975. – 13. *Xia T., Kovochich M., Liong M., Mädler L., Gilbert B., Shi H., Yeh J.I., Zink J.I., Nel A.E.*: Comparison of the mechanism of toxicity of zinc oxide and cerium oxide nanoparticles based on dissolution and oxidative stress properties. *ACS Nano*, 2008; 2: 2121-2134. doi: 10.1021/nn800511k.